

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

2|90



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

Научный редактор *В. И. Луговой*
Редактор *Л. А. Рябина*
Технический редактор *В. Н. Волкова*
Корректор *Н. П. Спичак*

Сдано в набор 16.01.90. Подп. в печ. 26.03.90. БЦ 15680. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Уч.-изд. л. 5,33. Усл. кр.-от. 5,6. Тираж 1000 экз. Зак. № 29. Цена 65 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 558

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

2 1990

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1985 ГОДА
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1990

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Загоруйко Г. Е. Закономерности структурной перестройки стромы миокарда при адаптации к тканевой гипоксии и краниocereбральной гипотермии . . . 3
- Бабийчук Г. А., Марченко В. С., Чижевская И. В. Синаптические механизмы пространственной синхронизации биотоков охлажденного мозга . . . 11
- Батюк В. А., Мандругина Т. Н., Сергеев Г. Б. Кинетика ферментативного окисления в замороженных образцах, сформированных в режиме направленной кристаллизации . . . 18
- Красавцев О. А., Исабеков Б. М., Теркулова Л. П. Изменения осмотических свойств морозостойких растительных протопластов при обезвоживании . . . 25

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Кирпатовский В. И., Колоколова О. Б. Влияние температуры и объемной скорости перфузии на динамику насыщения и эффективность криозащиты изолированных почек крысы диметилсульфоксидом . . . 30
- Голимбет В. Е., Сидякина Т. М., Яковлев А. Г. Консервация культуры *Escherichia coli* НВ 101, несущей рекомбинантную плазмиду с фрагментом ДНК человека . . . 36
- Стрибуль Т. Ф., Лесив Т. К. Влияние криовоздействий на семена овощных культур . . . 39

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Резников В. И., Ткаченко С. И. Физико-математическая модель дифференцирующего устройства, измеряющего скорости замораживания и отогрева биоматериалов при криоконсервировании . . . 43

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Снурников А. С., Воротников Е. Г., Камышан В. И. Многоканальный электронный термометр с минимальным искажением температурного поля . . . 47
- Нардид О. А., Дюбко Т. С., Мангасаров Д. А., Гальченко С. Е., Подопригора Л. П. Установка комбинационного рассеяния для криобиологических исследований . . . 50
- Терентьев А. Н., Кадетов В. В., Богданова М. И., Цуцаева А. А., Рысканец И. П., Милютин А. В. Влияние низких температур на жизнеспособность бактерий *Y. Pestis EV76* . . . 52
- Шенталь В. В., Абдуллин Н. А., Хабибулаев Ш. З., Жумабаев А. Р. Возможности криолечения опухолей малых слюнных желез . . . 53

ХРОНИКА . . . 55

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ . . . 56

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

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Zagoruyko G. E.</i> Regularities of structural changes in the myocardial stroma during adaptation to tissue hypoxia and craniocerebral hypothermia	3
<i>Babiychuk G. A., Marchenko V. S., Chizhevskaya I. V.</i> Synaptic mechanisms of the spatial synchronization of biological impulses in cooled brain	11
<i>Batyuk V. A., Mandrugina T. N., Sergeyev G. B.</i> The kinetics of enzyme catalyzed oxidation in frozen samples formed under conditions of directed crystallization . .	18
<i>Krasavtsev O. A., Isabekov B. M., Terkulova L. P.</i> Changes in osmotic properties of frost hardy plant protoplasts during dehydration	25

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Kirpatovsky V. I., Kolokolova O. B.</i> The influence of temperature and perfusate flow rate on the dynamics of saturation and on the cryoprotective efficiency of isolated rat kidneys with dimethyl sulfoxide	30
<i>Golimbet V. E., Sidiyakina T., Yakovlev A. G.</i> The preservation of <i>Escherichia coli</i> HB 101 cultures containing a recombinant plasmid with the human DNA fragment.	36
<i>Stribul T. F., Lesiv T. K.</i> The effect of freezing on vegetable seeds	39

CRYOGENIC EQUIPMENT

<i>Reznikov V. I., Tkachenko S. I.</i> A physico-mathematical model of differentiating unit for measurement of freezing and rewarming rates in biomaterials subject to cryopreservation	43
---	----

SHORT COMUNICATIONS

<i>Snurnikov A. S., Vorotnikov E. G., Kamyshan V. I.</i> A multichannel electron thermometer with minimum distortion of the temperature field	47
<i>Nardid O. A., Dubko T. S., Mangasarov D. A., Galchenko C. E., Podoprigora L. P.</i> A devise for light scattering in cryobiological studies	50
<i>Terenytyev A. N., Kadetov V. V., Bogdanova M. I., Tsutsayeva A. L., Vysekantsev I. P., Milutin A. V.</i> The effect of low temperatures on the viability of <i>J. pestis</i> EV76	52
<i>Shental V. V., Abdullin N. A., Khabibulayev Sh. Z., Zhumbayev A. R.</i> Possibilitiues for cryogenic treatment of salivary gland tumors	53

<i>CHRONICLE</i>	55
----------------------------	----

<i>DEFENSE OF THESES</i>	56
------------------------------------	----

ЗАКОНОМЕРНОСТИ СТРУКТУРНОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ СТРОМЫ МИОКАРДА ПРИ АДАПТАЦИИ К ТКАНЕВОЙ ГИПОКСИИ И КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

На крысах-самцах Вистар (2,5 мес) с помощью методов трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и морфометрии установлена тесная взаимосвязь стадий развития тканевой гипоксии миокарда (ТГМ) и форм адаптивных реакций на гипоксию (Г) элементов стромы в условиях нормо- и краниocereбральной гипотермии (КЦГ) 29—28 °С.

Многие наркотические вещества, используемые для неингаляционного наркоза, как известно, обладают побочным токсическим действием и при многократном введении в ходе хирургических операций могут привести к развитию острой сердечной недостаточности и даже к внезапной смерти. С целью уменьшения осложнений, индуцированных наркозом и фармакологическими агентами, коррекции метаболических нарушений и предупреждения развития деструктивных процессов в тканях и органах во время операции в клинике широко используют различные виды гипотермии [4, 6]. Лечебно-профилактическое действие регионарной, в том числе краниocereбральной гипотермии, основано на повышении устойчивости клеток и тканей при охлаждении к повреждающему действию гипоксии и токсемии [7, 9]. Поэтому изучение молекулярных и клеточных механизмов кардиопротективного эффекта гипотермии при нарушениях функции сердечно-сосудистой системы является актуальной задачей не только экспериментальной кардиологии, но и практической медицины.

Ранее в экспериментах на животных было показано, что при однократном внутрибрюшинном введении токсических доз натрия оксибутирата и натрия тиопентала (компонентов неингаляционного наркоза), развивается острая гипоксия миокарда по циркуляторному типу [2, 3]. Выделены три стадии развития гипоксии миокарда и определены их временные интервалы: стадия мобилизации структурно-функциональных резервов сердечной мышцы продолжительностью 30 мин; стадия преимущественного накопления дистрофических изменений в миокарде продолжительностью 90 мин; стадия восстановления первоначально поврежденных ультраструктур миокарда $T \in 2 - 24$ ч. Однако взаимосвязи, последовательность структурной перестройки и морфологические проявления адаптации элементов стромы миокарда к тканевой гипоксии в условиях нормо- и гипотермии не изучены. Этим задачам и посвящено данное исследование.

Эксперимент проведен на крысах-самцах Вистар в возрасте 2,5 мес. Тканевую гипоксию (ТГ) миокарда и краниocereбральную гипотермию (КЦГ) осуществляли по ранее описанным методам [2, 3]. Первая группа наблюдений — животные с ТГ миокарда при комнатной температуре, вторая группа — крысы с ТГ миокарда в условиях применения умеренной (28 °С) КЦГ. Продолжительность эксперимента 5 ч. По завершении опытов животных декапитировали. Через 30, 60, 90, 120 мин, 3, 4, 5 и 24 ч после начала экспериментов забивали по 3 крысы в обеих группах наблюдений. Для электронно-микроскопических исследований из левого желудочка сердца крыс иссекали кусочки миокарда и обрабатывали по общепринятым методам [5]. В серии негативов ультратонких срезов миокарда, полученных при увеличении 2000 с помощью тест-систем ($N_1 = 384$ точки, $N_2 =$



≈ 600 точек) определяли объемные доли: стромы ($V_v^{стр}$), основного вещества соединительной ткани ($V_v^{об}$), клеточных элементов соединительной ткани ($V_v^{кл}$), капилляров ($V_v^{кап}$), просвета капилляров ($V_v^{пк}$) — объемная доля капиллярного русла, относительный объем циркулирующих эритроцитов в гемокапиллярном русле ($V_v^{эп}$), количество функционально активных

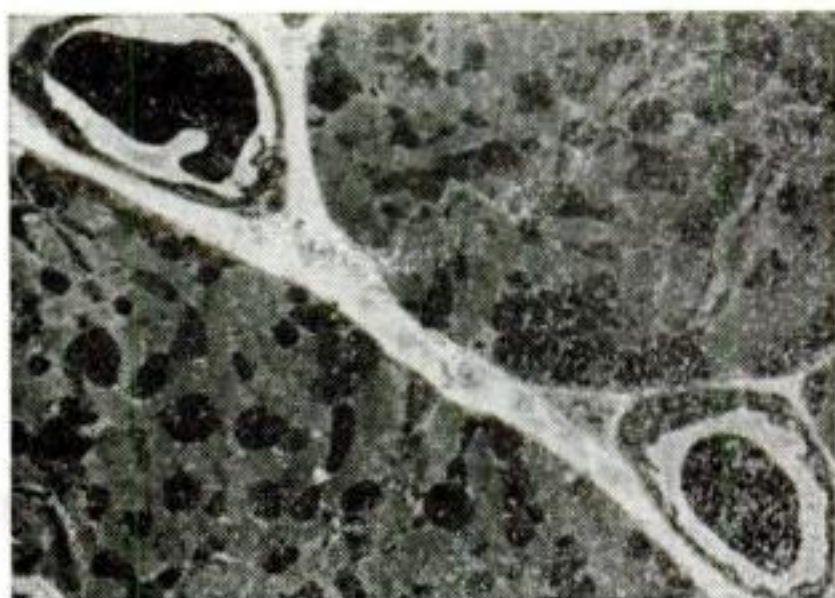


Рис. 1



Рис. 2



Рис. 3



Рис. 4

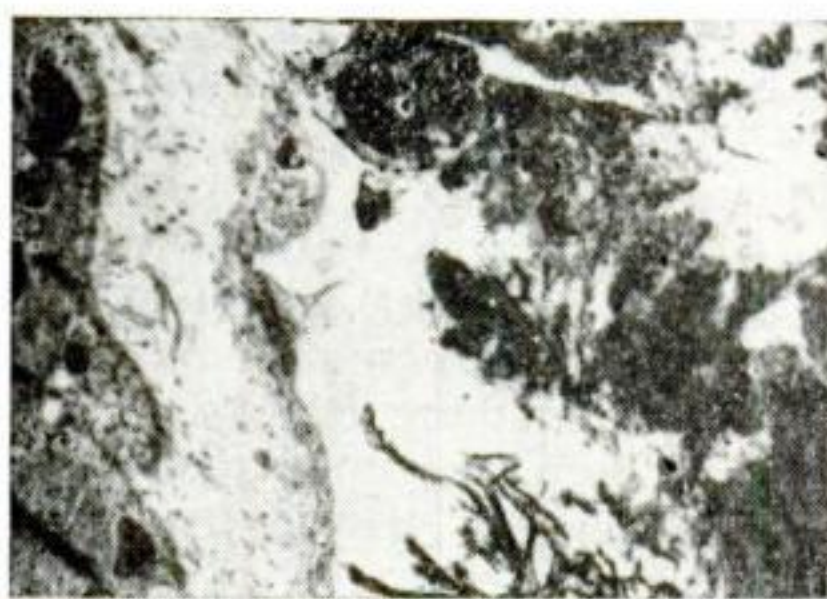


Рис. 5

Рис. 1. Ультраструктура миокарда крыс при 30-минутной гипоксии. Функционально активные «открытые» капилляры, в просвете которых определяются эритроциты

Рис. 2. Ультраструктура миокарда крыс в состоянии ТГ в течение 2 ч. Многочисленные микроворсинки выстилают просвет функционально покоящегося «закрытого» капилляра

Рис. 3. Ультраструктура миокарда крыс в состоянии ТГ в течение 3 ч. Отек стромы, повреждение цитоплазмы эндотелиоцита спавшегося капилляра

Рис. 4. Ультраструктура миокарда крыс в состоянии ТГ в течение 3 ч. Спазм артериолы и сужение просвета сосуда

Рис. 5. Ультраструктура миокарда крыс в состоянии ТГ в течение 5 ч. Тромбоз сосуда микроциркуляторного русла. В просвете сосуда определяются многочисленные плотно упакованные конгломераты фибриногена и пучки нитей фибрина

(открытых) капилляров ($N_{кап}$), в %. Статистическую обработку полученной цифровой информации проводили с помощью графического метода [1].

При 30 мин гипоксии в миокарде животных наблюдаются многочисленные открытые капилляры, в просвете которых часто определяются эритроциты (рис. 1). Через 1,5—2,0 ч после начала опытов в миокарде крыс определяется выраженный отек стромы. Большинство гемокапилляров находится в неактивном состоянии, при этом ядра эндотелиоцитов часто выбухают в просвет сосудов, частично или полностью перекрывая кровоток в них.

На люминальной поверхности многих эндотелиальных клеток функционально-покоящихся капилляров определяются различной величины и формы многочисленные микроворсинки, выстилающие просвет микрососудов (рис. 2). Такие морфологические изменения капилляров приводят к существенному снижению интенсивности кровотока по микроциркуляторному руслу, к уменьшению энергообеспечения сократительной функции кардиомиоцитов, к развитию ТГ миокарда. Вследствие перикапиллярного отека увеличивается расстояние между обменными капиллярами, возрастает радиус диффузии метаболитов.

В течение последующих 3—5 ч эксперимента в миокарде крыс при ТГ выявляются морфологические признаки дистрофических изменений элементов стромы. Определяется отек интерстиция (рис. 3) и спазм артериол миокарда (рис. 4). В капиллярах выявляются светлые эндотелиоциты с отечной, умеренно вакуолизированной цитоплазмой.

В просвете некоторых сосудов определяются тромбы, состоящие из многочисленных кровяных пластинок, находящихся в различном морфофункциональном состоянии. На периферии тромба определяются мелкодисперсные плотно упакованные конгломераты фибриногена и пучки нитей фибрина (рис. 5). К концу опыта наблюдается уменьшение отека стромы, выявляются морфологические признаки активации процессов внутриклеточной регенерации ранее поврежденных ультраструктур эндотелиоцитов капилляров. Через сутки явные дистрофические изменения в строме миокарда крыс не выявляются.

КЦГ 29—28 °С продолжительностью 5 ч обладает кардиозащитным противогипоксическим действием. Это проявляется в уменьшении времени развития ТГ миокарда. Быстрее происходит восстановление обратимо поврежденных элементов стромы сердечной мышцы.

Проведенный морфометрический анализ позволил выявить закономерности структурной перестройки элементов стромы миокарда при ТГ и ТГ + КЦГ. Как видно из рис. 6, ТГ миокарда сопровождается увеличением объемной доли стромы с 20,0 % в норме до 27,0 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %, кривая 1). Этот рост обусловлен развивающимся отеком интерстиция и увеличением объемной доли основного вещества соединительной ткани с 10,0 % в норме до 18,40 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %, кривая 3). Максимальные цифровые значения этих количественных показателей при ТГ наблюдаются к концу 2-го ч. В течение этого времени относительный объем клеточных элементов соединительной ткани миокарда не изменяется и в пределах ошибки опыта составляет $3,50 \pm 0,50$ % (кривая 5). В условиях ТГ + КЦГ также выявляется отек стромы миокарда, увеличивается ее объемная доля с 20,0 до 25,0 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %, кривая 2) и возрастает относительный объем основного вещества соединительной ткани с 10,0 до 15,50 %, ($\epsilon = \pm 0,30$ %, кривая 4). Однако по сравнению с ТГ, в условиях применения КЦГ достоверно сокращается период роста отека стромы миокарда ($T = 1,0$ ч, при ТГ $T = 1,5$ ч). Под воздействием КЦГ существенно уменьшаются максимальные значения объемных долей стромы и основного вещества соединительной ткани. Цифровые значения показателя $V_v^{кл}$ в пределах нормы. В интервале времени T (2—5 ч в группе животных при ТГ + КЦГ (кривые 2, 4) наблюдается быстрое уменьшение отека стромы миокарда. Уже к концу 5-го ч эксперимента цифровые значения показателей

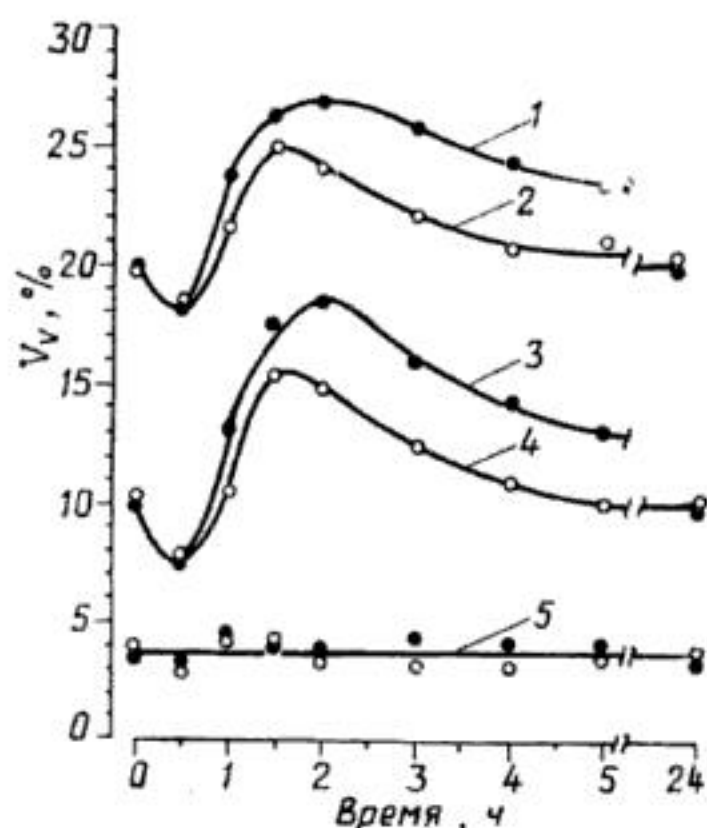


Рис. 6. Кинетика изменений: объемных долей стромы миокарда крыс при ТГ (1) и при ТГ+КЦГ (2); объемных долей основного вещества соединительной ткани при ТГ (3) и при ТГ+КЦГ (4); объемных долей клеточных элементов соединительной ткани (5); ● — при ТГ, ○ — при ТГ+КЦГ

$V_v^{стр}$ и $V_v^{об}$ приближаются к норме, в то время как в группе животных при ТГ (кривые 1, 3) эти изменения не столь выражены. Через сутки наблюдается отсутствие отека стромы миокарда в обеих группах крыс. И только в интервале времени Т (0—30 мин) левые участки кривых 1, 2 и 3, 4 не отличаются друг от друга. В течение первых 30 мин гипоксии в миокарде животных определяется убыль объемных долей стромы с 20,0 % до 18,50 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %) и основного вещества соединительной ткани с 10,0 % до 7,50 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %). Эти количественные изменения, вероятно, вызваны умеренной дегидратацией межклеточного матрикса миокарда на ранней стадии развития гипоксии.

Кинетики изменений объемных долей гемокапилляров и их просвета в миокарде крыс при ТГ и ТГ + КЦГ представлены на рис. 7. Полученные данные свидетельствуют о синхронизации и однонаправленности процессов роста и убыли цифровых значений этих показателей. В течение 30 мин гипоксии наблюдается интенсивный рост в миокарде крыс объемной доли

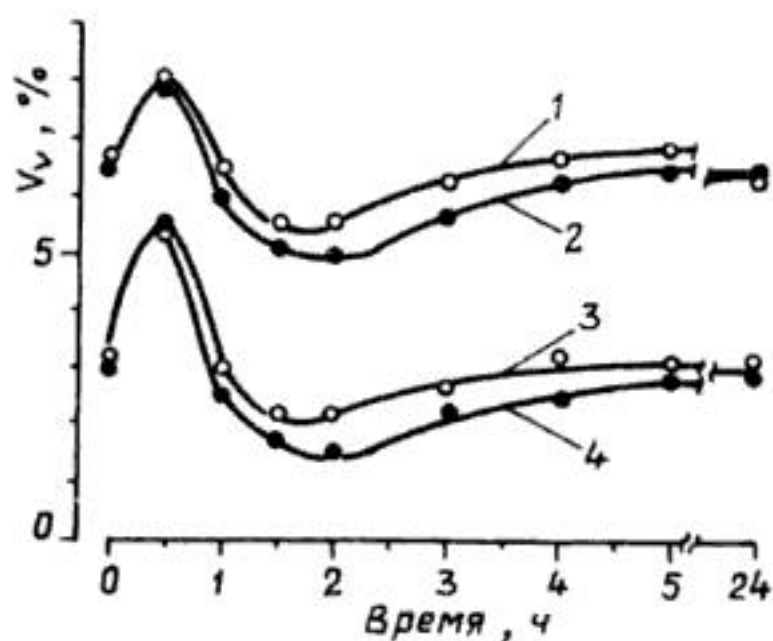


Рис. 7. Кинетика изменений: объемных долей капилляров миокарда крыс при ТГ (2) и при ТГ + КЦГ (1); объемных долей просвета капилляров при ТГ (4) и при ТГ + КЦГ (3)

капилляров с 6,50 % в норме до 7,80 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %, кривые 1, 2), обусловленный увеличением объемной доли просвета микрососудов с 3,0 % в норме до 5,50 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %, кривые 3, 4). В этот период в капиллярном русле миокарда возрастает количество циркулирующих эритроцитов. В норме объемная доля эритроцитов в сердечной мышце крыс равна $0,87 \pm 0,10$ %, что составляет 29,0 % общего объема капиллярного русла. Через 30 мин относительный объем эритроцитов в миокарде возрастает до $2,30 \pm 0,20$ % и составляет 41,80 % объема капиллярного русла. Эти данные свидетельствуют об увеличении капиллярного кровотока, росте количества циркулирующих эритроцитов в капиллярах миокарда и связанном с ними

увеличении кислородной емкости крови. В интервале времени Т $\in$ 30 — 2 ч развивается ТГ миокарда. Наблюдаются процессы убыли объемных долей капилляров с 7,80 до 5,00 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %, кривая 2) и просвета микрососудов с 5,50 до 1,50 % ($\epsilon = \pm 0,20$ %, кривая 4). Эти изменения структурной организации гемокапилляров обусловлены, вероятно, возрастающим отеком стромы миокарда. Происходит повышение гидростатического давления внеклеточной тканевой жидкости, которое в определенный момент времени становится выше осмотического давления плазмы крови в капиллярах. Это приводит к механическому сдавливанию микрососудов, их уплощению, частичному или полному перекрытию просвета. В капиллярах с суженным просветом уменьшается количество циркулирующих эритроцитов. В этот период объемная доля красных клеток крови в миокарде крыс убывает с 2,30 до $0,55 \pm 0,10$ %. Приведенные данные свидетельствуют о том, что к концу 2-го ч ТГ в миокарде животных наблюдается редукция кровенаполнения сосудов микроциркуляторного русла, существенно снижается кислородная емкость крови. В условиях ТГ + КЦГ также уменьшается объемная доля капилляров с 8,10 до 5,70 % ($\epsilon \pm 0,20$ %, кривая 1) и убывает относительный объем просвета микрососудов с 5,60 до 2,20 % ($\epsilon = \pm 0,30$ %, кривая 3). Однако по сравнению с ТГ, в условиях применения КЦГ существенно сокращается время развития спазма сосудов миокарда ($T = 1,0$ ч, при ТГ $T = 1,5$ ч) и возрастают минимальные цифровые значения количественных показателей $V_v^{кап}$ и $V_v^{пк}$. В интервале времени Т $\in$ 2—5 ч наблюдается монотонный рост объемных долей капилляров и просвета микрососудов в миокарде животных обеих групп наблюдения. Это увеличение объемной доли капиллярного кровотока происходит вследствие снижения

можно теоретически определить цифровые значения основных морфометрических показателей структурной организации стромы миокарда при ТГ и ТГ + КЦГ. Эти данные подтверждают тот факт, что сосудистая система является доминирующим структурно-функциональным компонентом соединительной ткани, определяющим ее состояние, обеспечивающим непрерывный кровоток и обмен веществ между кровью и клеточными элементами миокарда [8]. Полученные результаты позволяют заключить, что в условиях проведенного эксперимента наблюдается тесная взаимосвязь, координация и синхронизация процессов структурной перестройки элементов стромы миокарда крыс при ТГ и ТГ + КЦГ.

Анализ кинетических кривых изменений во времени показателей $V_v^{стр}$, $V_v^{ов}$, $V_v^{кап}$, $V_v^{пк}$, $N^{кап}$ позволил выявить три точки экстремума на временной шкале: $T_1 = 30$ мин, $T_2 = 1,5$ ч, $T_3 = 2,0$ ч. В этих точках наблюдается последовательное чередование во времени процессов роста и убыли цифровых значений количественных показателей структурной организации стромы миокарда. Следовательно, в точках экстремума происходит смена стадий развития гипоксии миокарда и форм адаптивных реакций на гипоксию элементов стромы.

Стадия компенсированной гипоксии миокарда. $T \in 0 - 30$ мин. В этот период тканевая гипоксия миокарда отсутствует. Адаптация к компенсированной гипоксии осуществляется путем активизации функции микроциркуляторной системы миокарда и мобилизации ее структурно-функциональных резервов. В этот период в сердечной мышце происходит:

- увеличение объемной доли капилляров с 6,50 до 7,80 %,
- увеличение количества функционирующих капилляров с 60 до 95 %,
- увеличение объемной доли эритроцитов с 0,87 до 2,30 %,
- увеличение объемной доли капиллярного русла с 3,0 до 5,50 %.

Стадия декомпенсированной гипоксии миокарда. $T \in 30$ мин — 2,0 ч, в условиях ТГ + КЦГ $T \in 30$ мин — 1,5 ч. В этот период развивается вторичная тканевая гипоксия миокарда вследствие спазма артериол и редукции кровенаполнения сосудов микроциркуляторного русла. Адаптация к прогрессирующей тканевой гипоксии осуществляется путем интенсификации функции части сосудов микроциркуляторной системы с одновременным ослаблением функции спазмированных сосудов миокарда. В этот период в сердечной мышце наблюдается:

- уменьшение объемной доли капилляров с 7,80 до 5,0 %, в условиях ТГ + КЦГ с 8,0 до 5,70 %;
- уменьшение количества функционирующих капилляров с 95 до 19 %, в условиях ТГ + КЦГ со 100 до 38 %;
- уменьшение объемной доли эритроцитов с 2,30 до 0,55 %, в условиях ТГ + КЦГ с 2,30 до 0,70 %;
- уменьшение объемной доли капиллярного русла с 5,50 до 1,50 %, в условиях ТГ + КЦГ с 5,60 до 2,20 %.

В результате продолжительной гемодинамической нагрузки в некоторых эндотелиоцитах активно функционирующих капилляров развиваются и прогрессируют дистрофические изменения, сопровождающиеся отеком и умеренной вакуолизацией цитоплазмы. Определяются необратимо поврежденные клетки сосудистого эндотелия. Однако в этих экстремальных условиях сохраняется целостность и жизнедеятельность эндотелиоцитов функционально покоящихся сосудов микроциркуляторной системы миокарда.

Стадия рекомпенсированной гипоксии миокарда. $T \in 2,0 - 24$ ч, в условиях ТГ + КЦГ $T \in 1,5 - 24$ ч. В этот период наблюдается постепенное уменьшение тканевой гипоксии миокарда вследствие прекращения патогенного воздействия токсических доз компонентов неингаляционного наркоза. Адаптация к уменьшающейся тканевой гипоксии осуществляется путем постепенной активации ранее функционально покоящихся спазмированных сосудов гемомикроциркуляторного русла с одновременным ослаб-

лением функции дистрофически измененных сосудов миокарда. В этот период в сердечной ткани происходит:

- увеличение объемной доли капилляров с 5,0 до 6,30 %, в условиях ТГ + КЦГ с 5,50 до 6,30 %;
- увеличение количества активно функционирующих капилляров с 19,0 до 54,10 %, в условиях ТГ + КЦГ с 38,0 до 55,0 %;
- увеличение объемной доли эритроцитов с 0,55 до 0,75 %, в условиях ТГ + КЦГ с 0,70 до 0,80 %;
- увеличение объемной доли капиллярного русла с 1,50 до 3,0 %, в условиях ТГ + КЦГ с 2,20 до 3,10 %.

В цитоплазме дистрофически измененных клеток сосудистого эндотелия выявляются морфологические признаки постепенной активации процессов репаративной регенерации ранее поврежденных ультраструктур.

Результаты проведенных исследований позволили выявить следующие морфологические проявления противогипоксического эффекта краниоцеребральной гипотермии 29—28 °С при тканевой гипоксии миокарда: увеличение количества активно функционирующих сосудов микроциркуляторного русла, увеличение кровотока и циркулирующих в капиллярах эритроцитов, уменьшение гемодинамической нагрузки на сосуды миокарда, что создает более щадящие условия для функционирования мышечного и стромального компонентов сердца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Загоруйко Г. Е. Графико-аналитический метод в морфометрическом анализе ультраструктур мышечных клеток сердца // Научно-технический прогресс в кардиологии.— Харьков : Б. и., 1986.— С. 11—14.
2. Загоруйко Г. Е., Загоруйко Ю. В., Бабийчук Г. А. Влияние краниоцеребральной гипотермии на кинетику паренхиматозно-стромальных отношений в миокарде белых крыс // Криобиология.— 1989.— № 1.— С. 14—19.
3. Загоруйко Ю. В., Загоруйко Г. Е., Бабийчук Г. А. Влияние гипоксии и краниоцеребральной гипотермии на ультраструктуру миокарда белых крыс // Криобиология.— 1987.— № 1.— С. 32—38.
4. Земсков В. С., Корпан Н. Н., Побирчий А. А. Гипотермия в неотложной брюшной хирургии.— Киев : Здоровья, 1988.— 104 с.
5. Карупу В. Я. Электронная микроскопия.— Киев : Вища школа, 1984.— 208 с.
6. Копшев С. Н. Краниоцеребральная гипотермия в акушерстве.— М. : Медицина, 1985.— 112 с.
7. Мешалкин Е. Н., Верецагин И. П. Оклюзии в условиях неглубокой гипотермической защиты.— Новосибирск : Наука, 1985.— 197 с.
8. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций : Руководство : Л. И. Аруин, А. Г. Бабаева, В. Б. Гельфанд и др.— М. : Медицина, 1987.— 448 с.
9. Чепкий Л. П., Трещинский А. И. Лечебная гипотермия.— Киев : Здоров'я, 1969.— 204 с.

Харьковский НИИ терапии

Поступила 30.08.89

G. E. ZAGORUYKO

REGULARITIES OF STRUCTURAL CHANGES IN THE MYOCARDIAL STROMA DURING ADAPTATION TO TISSUE HYPOXIA AND CRANIO-CEREBRAL HYPOTHERMIA

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

A close relationship between hypoxia stages in the myocardial tissue and adaptive responses of stroma components to hypoxia has been found under conditions of normothermia and craniocerebral hypothermia (29 to 28 °C) on Wistar rat males (aged 2.5 months) using the method of transmission electron microscopy.

Г. А. Бабийчук, В. С. Марченко, И. В. Чижевская

СИНАПТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СИНХРОНИЗАЦИИ БИОТОКОВ ОХЛАЖДЕННОГО МОЗГА

При помощи локальной перфузии гипоталамуса *in vivo* и выделением синапсом *in vitro* с одновременной регистрацией сверхмедленных процессов изучалось действие краниocereбральной гипотермии на некоторые нейрoхимические и нейрoфизиологические показатели ЦНС.

Медицинская практика применения краниocereбральной гипотермии (КЦГ) определила задачу поиска интегральных показателей активности центров терморегуляции, несущих информацию о состоянии ключевого нейрoхимического звена в функциональной системе регуляции температурного гомеостаза. В рамках теоретической криобиологии — это проблема соотношения нейротрансмиттерных терморегуляторных процессов с электрофизиологическими реакциями охлажденного мозга.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение характера действия КЦГ на пространственно-временные характеристики биоэлектрической активности гипоталамо-кортикальной системы и протекающие при этом нейротрансмиттерные процессы секреции и рецепции норадреналина.

Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 200—250 г. КЦГ осуществлялась на установке для программного охлаждения, созданной в СКТБсОП ИПКиК АН УССР. В ходе экспериментов измеряли температуру в коре и гипоталамусе головного мозга, в среднем ухе, в прямой кишке. Измерение температуры осуществляли термисторами при помощи электронного термометра (разрешающая способность 0,1 °C), а также термопарами с помощью потенциометра Р-363-3 кл 0,005 с точностью 0,1 °C. Биоэлектрическую активность в диапазоне 0,1—15 Гц отводили монополярно константовыми макроэлектродами с сенсомоторной области коры (расстояние между отведениями 2 мм), передних и задних отделов гипоталамуса по стереотаксическим координатам [5] и регистрировали на энцефалографе «Биоскрипт BST-1». Постоянные потенциалы (Ω -потенциалы по [4]) отводили неполяризующимися хлор-серебряными электродами и регистрировали на иономере ЭВ-74. Нейрональную активность отводили экстраклеточно хлор-серебряными микроэлектродами и регистрировали на миографе М-42. Корреляционно-спектральный анализ кривых ЭЭГ проводился в автономном режиме на ЭВМ СМ-4. Обработывались пары дискретизированных во времени реализаций длиной 40 с (дискретность оцифровки 0,03 с).

Изучение секреции ^3H -норадреналина в процессе КЦГ в условиях *in vivo* проводили с использованием метода локальной суперфузии мозга при помощи нагнетательно-отсасывающей канюли [7].

Для изучения кинетики радиолигандного связывания адренорецепторов (АР) из коры и гипоталамуса головного мозга крыс получали препарат синаптических мембран [1, 3]. Кинетические характеристики (константу диссоциации — K_d и количество мест связывания — V_{max}) АР получали методом равновесного связывания меченых соединений с препаратом мембран синапсом. Связывание α_1 - и α_2 -А₁ проводили ^3H -WB 4101 и ^3H -нохимбином соответственно, связывание β -АР ^3H -дигидроальprenолом происходило в присутствии 10 ммоль MgCl_2 . Разделение связанного и свободного лиганда проводили методом вакуумного фильтрования через стекловолоконистые фильтры GF (C) «Ватман» (Англия) при температуре 0—4 °C. Анализ кривых связывания в координатах Скэтчарда [2, 6] проводили с учетом модели комплексообразования лигандов с несколькими типами центров связывания.

Краниocereбральная гипотермия вызывает прежде всего понижение температуры кожи, мышц головы и ткани головного мозга. Это обстоятельство неизбежно приводит к возникновению температурного градиента между

тканями, прилегающими к своду черепа, и глубоко лежащими участками мозга, а также между мозгом и внутренними органами тела. Поскольку кора головного мозга охлаждается наиболее сильно, уровень ее функционального состояния во многом определяет реакции ЦНС на гипотермию.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что охлаждение коры головного мозга вплоть до 22 °С сопровождается увеличением частоты разрядов нейронов, а при снижении температуры коры ниже 19 °С ее импульсивная активность подавляется (табл. 1).

Таким образом, экстраклеточная регистрация нейрональной импульсации показала, что функциональная активность неокортекса при охлаждении организма до 32 °С сохраняется. Характер и направление этого процесса выявлены в серии экспериментов по изучению пространственно-временных характеристик биоэлектрической активности в динамике КЦГ.

Оказалось, что на первом этапе краниocereбральной гипотермии (t гипоталамуса не ниже 33 °С) происходит резкое снижение большинства исследованных параметров

Таблица 1
Изменение нейрональной активности неокортекса при КЦГ ($n = 20$)

Ректальная температура, °С		Температура неокортекса, °С		Частота нейрональной активности, Гц	
$\bar{x}$	$S\bar{x}$	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
37,7	$\pm 1,31$	37,08	$\pm 0,59$	11,2	$\pm 2,51$
36,75	$\pm 1,04$	29,52	$\pm 1,94$	21,3	$\pm 2,31$
35,58	$\pm 0,53$	27,87	$\pm 2,08$	22,5	$\pm 2,01$
34,98	$\pm 1,07$	25,47	$\pm 1,27$	23,0	$\pm 2,54$
33,93	$\pm 2,67$	24,26	$\pm 0,41$	25,1	$\pm 3,08$
33,37	$\pm 1,10$	23,08	$\pm 0,45$	23,4	$\pm 2,11$
32,67	$\pm 1,33$	22,97	$\pm 0,97$	22,6	$\pm 1,94$
31,82	$\pm 1,49$	19,03	$\pm 0,64$	—	—

кортиса активности коры возрастает. Установлено, что при этом происходит замедление скорости охлаждения в 1,5—2 раза (по сравнению с первым этапом КЦГ), но только в случае наличия в биоэлектрической активности неокортекса квазисинусоидального секундного ритма, мощность спектра которого повышается в 1,5—2 раза. В этих условиях возрастают значения функции когерентности в тета- и, особенно, в дзета-диапазонах, достигая значений 0,7—0,9, более чем в 2 раза уменьшается фазовый сдвиг секундного ритма (рис. 3, 4).

Повышение на втором этапе пространственной когерентности секундного ритма происходит в неокортексе только при наличии высокой линейной связи с биоэлектрической активностью задних отделов гипоталамуса. На это указывают низкие значения функции частной когерентности ЭЭГ, которая позволяет определить величину связи между ЭЭГ двух точек коры, так что биоэлектрическая активность заднего гипоталамуса исключается методом оптимального (в смысле наименьших квадратов) прогнозирования. Таким образом, математически была показана связь усиления пространственной синхронизации ЭЭГ с активацией гипоталамуса, но это необходимо было подтвердить в нейрофизиологических и нейрохимических экспериментах.

Экспериментально установлено, что в условиях нормотермии при суперфузии задних отделов гипоталамуса норадреналином происходят аналогичные влиянию КЦГ изменения биоэлектрической активности коры, которые нивелируются добавлением в перфузионную среду ГАМК (рис. 5).

Вероятно, повышенная секреция норадреналина в заднем гипоталамусе явилась бы достаточным условием для усиления пространственной синхронизации ЭЭГ при КЦГ. В этом случае синхровлияния на кору должны

пространственной синхронизации биотоков коры головного мозга и гипоталамуса, особенно в секундном диапазоне частот. Мощность спектра секундного ритма (рис. 1) уменьшается более чем в 3 раза, во столько же раз снижается значение постоянного (Ω) потенциала, динамика которого коррелирует с изменением когерентности секундного (ζ) ритма неокортекса (рис. 2). На втором этапе КЦГ (t гипоталамуса 32—29 °С) пространственная синхронизация биоэлектрической

были, вероятнее всего, опосредоваться через АР, что поддается экспериментальной проверке. Так, при суперфузии гипоталамуса блокатором β -АР значения функции когерентности ЭЭГ повышаются, а фазовый сдвиг секундного ритма понижается, при суперфузии блокатором α -АР, наоборот, значения функции когерентности понижаются, а фазовый сдвиг секундного ритма повышается, что говорит о возможности передачи синхронизирующих влияний гипоталамуса действием норадреналина на α -АР, а пространствен-

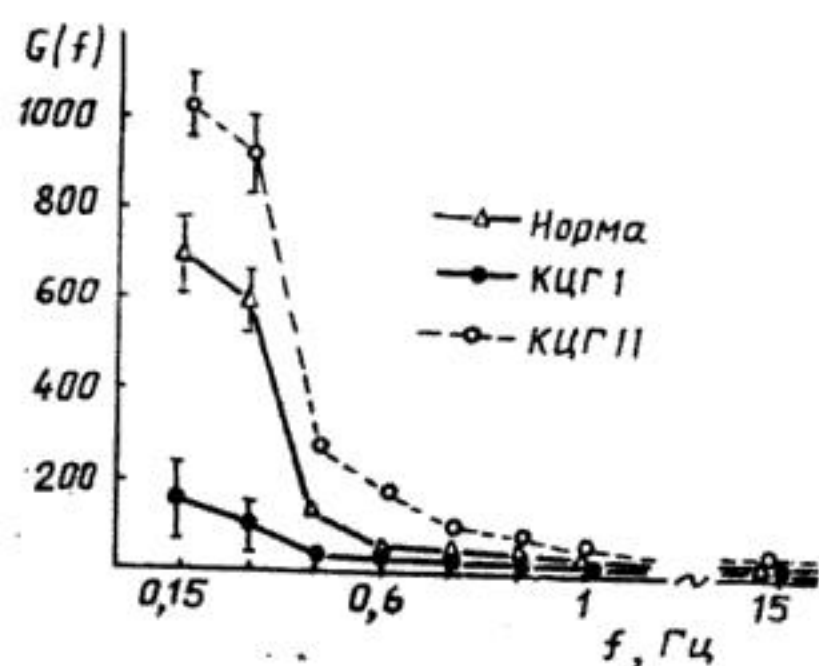


Рис. 1

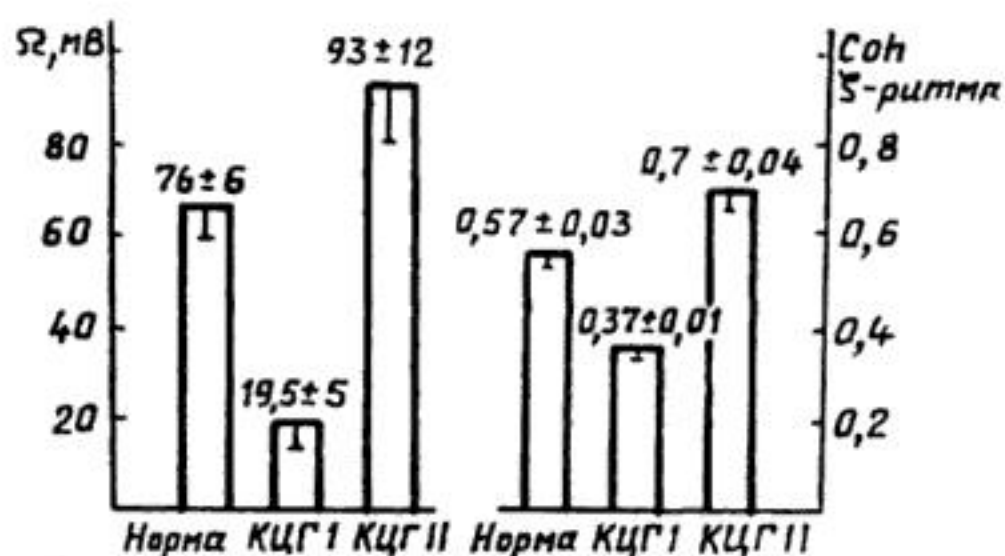


Рис. 2

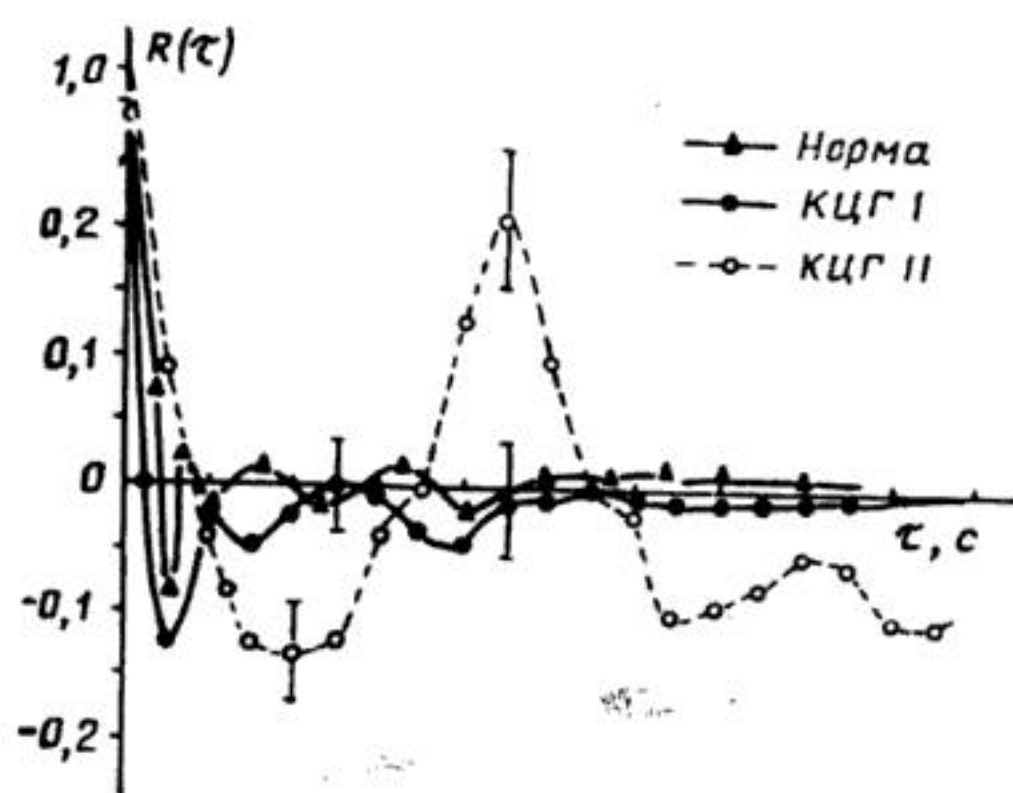


Рис. 3

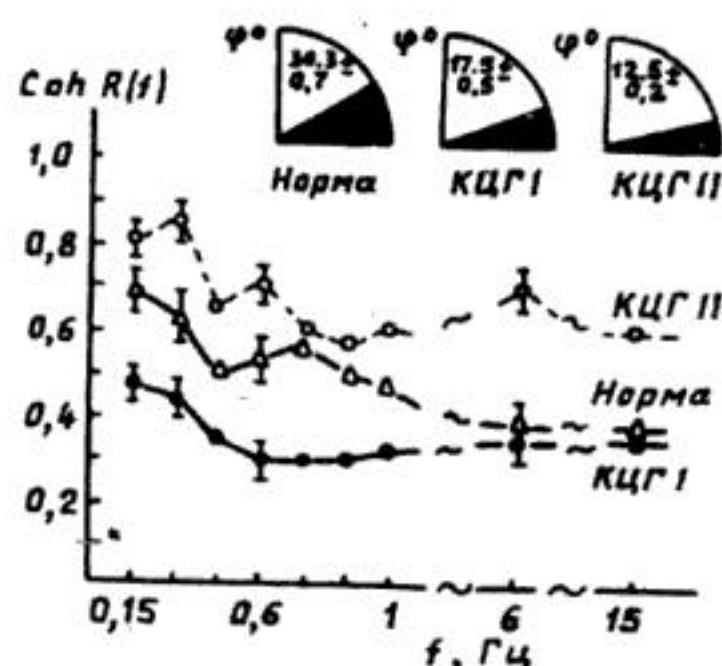


Рис. 4

Рис. 1. Спектр мощности биоэлектрической активности коры головного мозга крыс при краниocereбральной гипотермии: t гипоталамуса не ниже 33°C (КЦГ I); t гипоталамуса $32\text{--}29^\circ\text{C}$ (КЦГ II)

Рис. 2. Изменение постоянного (Ω) потенциала и когерентности секундного (ζ) ритма при краниocereбральной гипотермии

Рис. 3. Автокоррелограммы биоэлектрической активности коры головного мозга крыс на разных этапах КЦГ

Рис. 4. Изменение функции когерентности и фазового сдвига (ϕ°) секундного ритма при краниocereбральной гипотермии

но десинхронизирующих — на β -АР (рис. 6—8). Этот вывод будет корректен, если он характерен и для работы охлажденного мозга, когда возможны изменения функциональных характеристик АР.

Экспериментально установлено, что применение блокаторов β -АР на первом этапе КЦГ ведет после усиления к уменьшению значений функции когерентности ЭЭГ, а понижение фазового сдвига секундного ритма сменяется увеличением, в то время как блокада α -АР на этом этапе КЦГ сопровождается только подавлением пространственной синхронизации ЭЭГ. На втором этапе КЦГ при блокаде α -АР подавление сменяется усилением синхронизации биоэлектрической активности, а при блокаде β -АР в этих усло-

виях сохраняется однофазовая реакция в изменении пространственной синхронизации ЭЭГ (рис. 7,8).

Таким образом, эксперименты доказывают принципиальную возможность участия норадренергических нейротрансмиттерных систем гипоталамуса в модификации пространственной синхронизации биоэлектрической активности неокортекса при краниocereбральной гипотермии. Однако данная возможность могла бы реализовываться в действительности и при

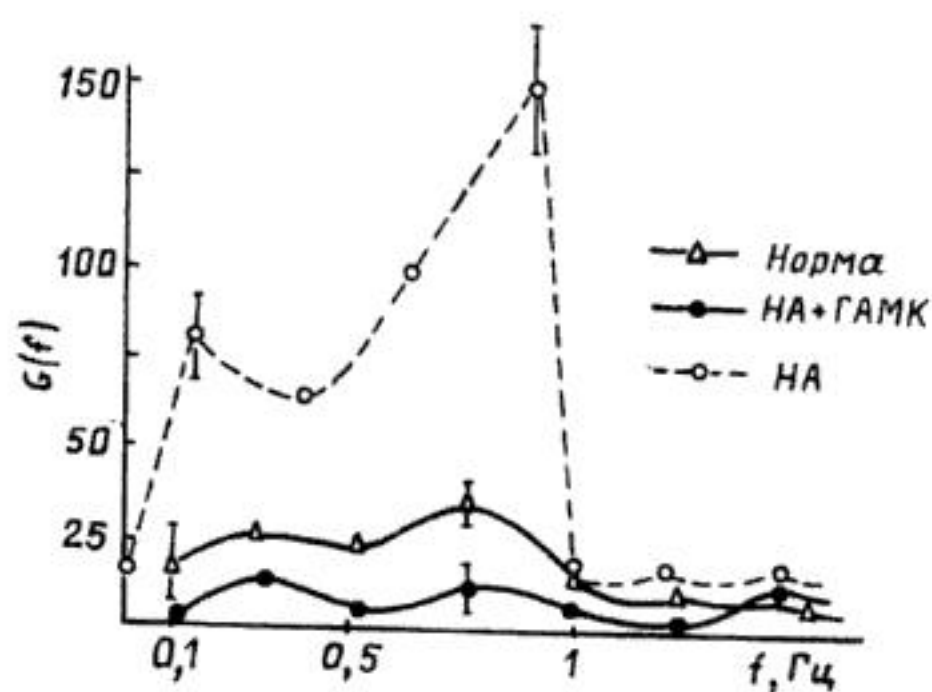


Рис. 5

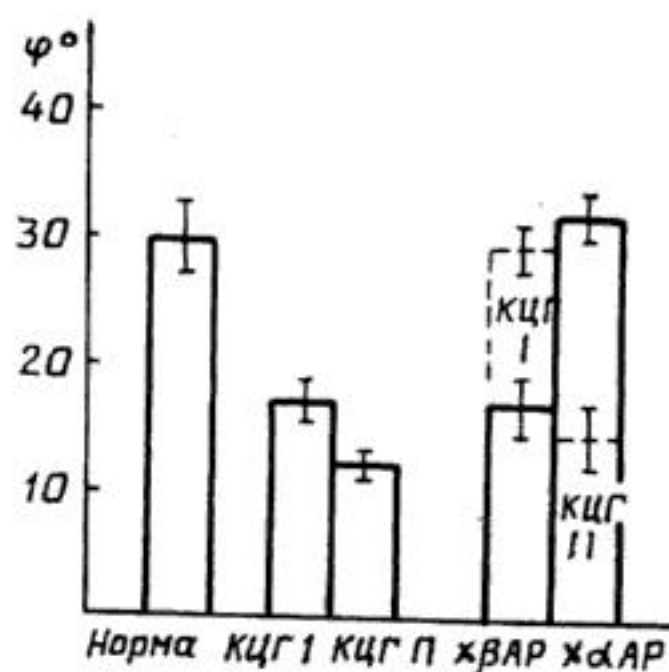


Рис. 6

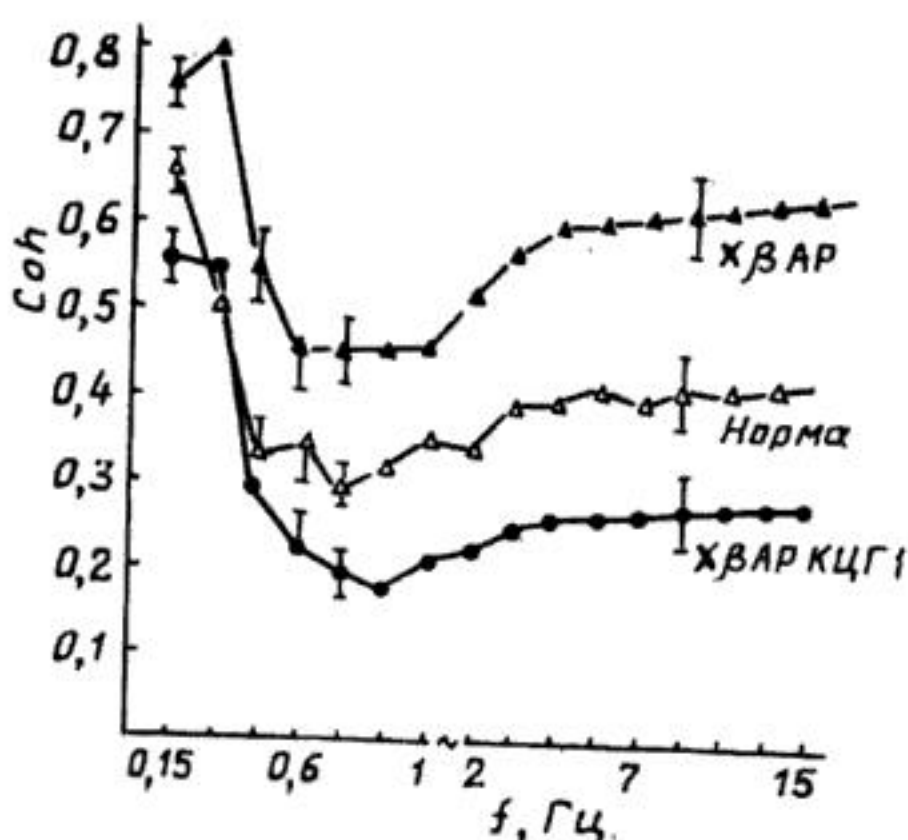


Рис. 7

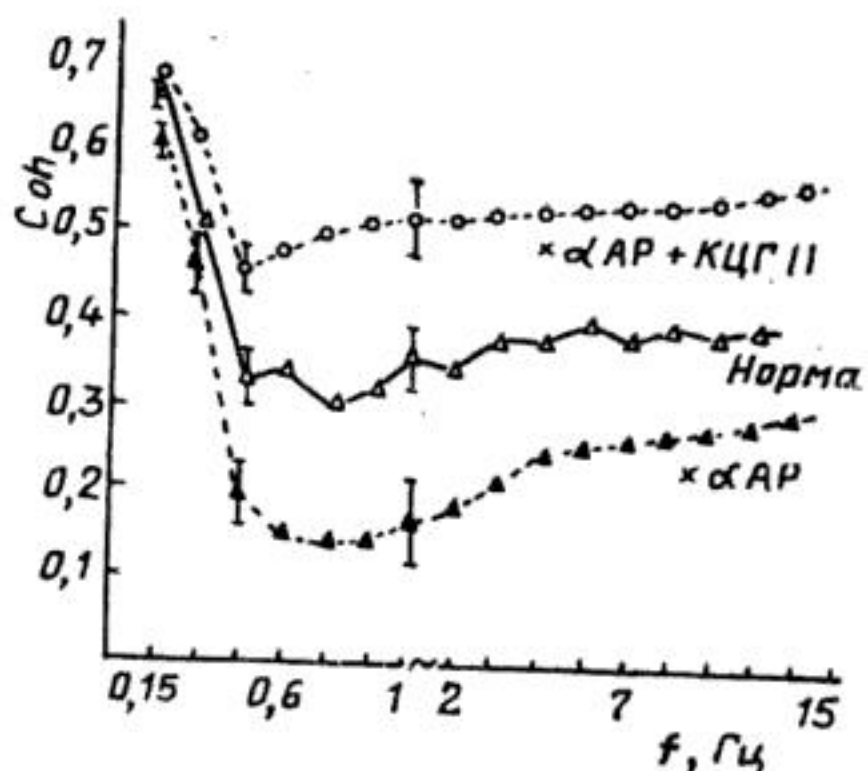


Рис. 8

Рис. 5. Спектр биоэлектрической активности коры головного мозга крыс при действии нейромедиаторов на гипоталамические центры

Рис. 6. Влияние КЦГ и блокады β - и α -адренорецепторов на фазовый сдвиг секундного ритма биоэлектрической активности

Рис. 7. Влияние блокады β -адренорецепторов ($\chi\beta$ -АР) на функцию когерентности ЭЭГ на разных этапах КЦГ

Рис. 8. Влияние блокады α -адренорецепторов ($\chi\alpha$ -АР) на функцию когерентности ЭЭГ на разных этапах КЦГ

этом не входить в противоречие с результатами наших модельных опытов только при выполнении ряда экспериментально подтвержденных условий:

во-первых, на начальном этапе КЦГ предполагается повышенная секреция норадреналина в передних отделах гипоталамуса при пониженном сродстве лигандов к α -АР и появление активной популяции β -АР с высоким сродством к лиганду;

во-вторых, на последующем этапе КЦГ предполагается усиление функциональной роли норадреналина в задних отделах гипоталамуса при пониженном сродстве лигандов к β -АР и появление активной популяции α -АР с высоким сродством к лиганду.

Эти предположения определили задачи следующих серий экспериментов. Их результаты свидетельствуют, что на начальном этапе действия КЦГ происходит усиление секреции ^3H -норадреналина в передних отделах гипоталамуса, сравнимое по величине с усилением секреции ^3H -норадреналина у контрольных животных при суперфузии гипоталамуса раствором Кребса-Рингера с высоким содержанием ионов K^+ (60 ммоль).

Наблюдаемое в экспериментах усиление секреции ^3H -норадреналина на начальном этапе действия КЦГ может свидетельствовать об усилении активности нейронов, посылающих свои аксоны в передние отделы гипоталамуса, так как хорошо известно, что аппликация растворов с высокой концентрацией ионов K^+ приводит к деполяризации пресинаптических окончаний, и этот методический прием моделирует усиление нейрональной активности. Эти данные хорошо согласуются с изложенными выше представлениями о десинхронизирующем влиянии передних отделов гипоталамуса на пространственно-временные характеристики ЭЭГ на первом этапе гипотермии. На втором этапе КЦГ при снижении ректальной температуры до $31\text{--}34^\circ\text{C}$ (t гипоталамуса $32\text{--}29^\circ\text{C}$) происходит уменьшение K^+ -индуцированной секреции ^3H -норадреналина в 1,9 раза по сравнению с контролем. Усиление секреции ^3H -норадреналина на начальном этапе охлаждения было характерно только для передних отделов гипоталамуса, так как проведение аналогичных исследований в структурах заднего гипоталамуса не выявило сходных изменений в уровне секреции (табл. 2).

Таблица 2

Уровень секреции ^3H -норадреналина (усл. ед.) на разных этапах охлаждения ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Передний гипоталамус		Задний гипоталамус	
	Спонтанная секреция	K^+ -стимулированная секреция	Спонтанная секреция	K^+ -стимулированная секреция
Нормотермия $n = 12$	$0,81 \pm 0,05$	$2,45 \pm 0,11$	$0,64 \pm 0,01$	$1,85 \pm 0,28$
КЦГ I-й этап $n = 12$	$2,47 \pm 0,4^*$	—	$0,71 \pm 0,04$	$1,73 \pm 0,31$
КЦГ II-й этап $n = 12$	$0,73 \pm 0,02$	$1,29 \pm 0,16^*$	$0,69 \pm 0,08$	$1,09 \pm 0,02$

Примечание. * — различия по сравнению с нормой достоверны ($p < 0,05$).

Так как не удалось объяснить усиление пространственной синхронизации ЭЭГ на втором этапе КЦГ повышенной секрецией ^3H -норадреналина в задних отделах гипоталамуса, а диффузия норадреналина из передних отделов гипоталамуса представляется маловероятной, как альтернативная возможность была предпринята попытка изучения проницаемости ГЭБ гипоталамуса для ^3H -норадреналина в динамике гипотермии. Результаты экспериментов показали, что на первом этапе КЦГ ГЭБ гипоталамуса как в передних, так и в задних отделах непроницаем для ^3H -норадреналина. Однако на втором этапе КЦГ при снижении температуры гипоталамуса до 32°C , но не ниже 29°C , увеличивается на порядок проницаемость ГЭБ для ^3H -норадреналина, причем в задних отделах гипоталамуса в 1,6 раза больше, чем в передних, и эти данные хорошо согласуются с обсуждаемым механизмом пространственной синхронизации ЭЭГ при КЦГ.

Для подтверждения предполагаемого нами участия адренорецепторов в процессах синхровлияний гипоталамуса на кору был проведен анализ кинетических характеристик α - и β -АР в аналогичных экспериментальных условиях. Динамика изменений кинетических параметров α -АР указывает на то, что на начальных этапах КЦГ понижается сродство лигандов к рецепторам (особенно резко это выражено в случае α_1 -АР), K_d возрастает примерно в 3 раза. При анализе кривых связывания в координатах Скэтчарда при температуре 32°C (второй этап КЦГ) график для α_1 -АР имеет нелинейный характер, что говорит о наличии двух популяций данного типа рецепторов с различными K_d . Если общую популяцию рецепторов принять за 100 %, то

то количество рецепторов с высокой степенью сродства составит примерно 40%. Для α_2 -АР, осуществляющих пресинаптическую регуляцию секреции НА, такой динамики не наблюдается. Появление двух популяций α_1 -АР на втором этапе КЦГ (или на первом этапе охлаждения, как показано для β -АР) может объясняться модификацией липидного окружения рецепторов таким образом, что насыщенность связывания неспецифическими компонентами будет находиться в пределах концентраций K_d и, следовательно, вытесняться 100-кратными концентрациями немеченного лиганда. График Скэтчарда при этом будет также нелинеен. Кроме того, появление популяции рецепторов с высоким и низким сродством может быть проявлением функциональной неоднородности рецепторов одного и того же фармакологического типа, что хорошо объясняется с позиций теории «кластеризации» [2] (рис. 9).

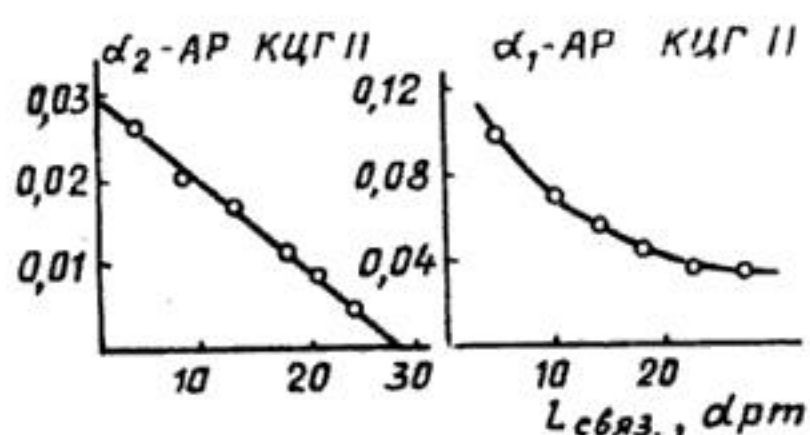
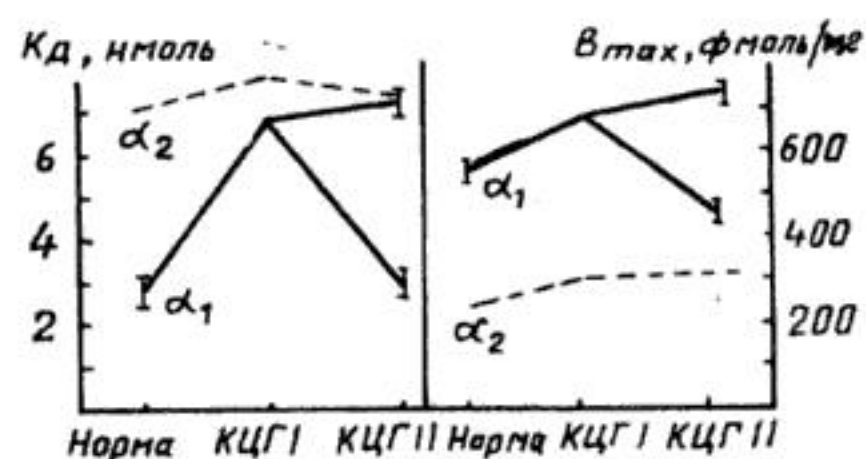


Рис. 9. Кинетические характеристики α -АР при КЦГ

Рис. 10. Кинетические характеристики β -АР при КЦГ

Для β -АР нелинейный график Скэтчарда выявляется уже на начальных этапах охлаждения. Доля рецепторов с высокой степенью сродства составляет 35%. На втором этапе КЦГ популяция рецепторов с низким сродством исчезает, а значение K_d понижается до более низкого уровня, чем у интактных животных, однако и количество мест связывания уменьшается вдвое по сравнению с нормой (рис. 10).

Сопоставляя полученные данные с динамикой высвобождения ^3H -НА в переднем и заднем гипоталамусе, мы видим, что на начальном этапе охлаждения происходит массивный выброс НА. Полученные результаты можно интерпретировать как явление десенсибилизации β -АР в результате довольно длительного контакта с высокими концентрациями агониста.

Итак, при КЦГ происходят взаимообусловленные изменения синаптических процессов, находящиеся в зависимости от температуры охлаждения. Гипотермия вносит существенные изменения в кинетику пре- и постсинаптических процессов адренергической передачи в ЦНС. В рецепторном звене динамика этих изменений различна для каждого типа рецепторов, общей закономерностью является в той или иной степени выраженное повышение специфичности рецепторов к лигандам после применения гипотермии. Возможно, гипотермия способна оказывать модулирующее влияние на конформационные переходы в рецепторных белках, доказательством которых является феномен десенсибилизации. Проведенный анализ кинетических параметров радиолигандного связывания АР позволил не только выявить вторую высокоспецифичную популяцию α -АР на втором этапе КЦГ и β -АР на первом этапе КЦГ, но и установить корреляцию с динамикой ЭЭГ на фоне применения блокаторов адренорецепторов при КЦГ.

В обобщенном виде результаты экспериментов могут быть представлены в виде схемы, в основе которой лежит предположение, что усиленная секреция НА в передних отделах гипоталамуса при КЦГ на первом этапе ведет к подавлению пространственной синхронизации ЭЭГ (0,1—15 Гц) вследствие более быстрого включения через β -АР системы торможения, а активация пространственной синхронизации опосредуется α_1 -АР на втором этапе КЦГ в условиях повышения проницаемости ГЭБ в задних отделах гипоталамуса для норадреналина (рис. 11).

Таким образом, возникают предпосылки для формирования гипоталамокортикальной системы, ответственной за регулирование уровня пространственной синхронизации медленной биоэлектрической активности. Функционирование этой системы способствует запуску терморегуляторных реакций в ЦНС. Предполагаемый механизм синхронизации в системе термогенеза может состоять в разнофункциональном воздействии сверхмедленного потенциала на порог возбудимости нейрональных ансамблей, что должно приводить к чередованию периодов передачи температурной информации с периодом поиска новых функциональных возможностей в адаптации к экстремальным воздействиям.

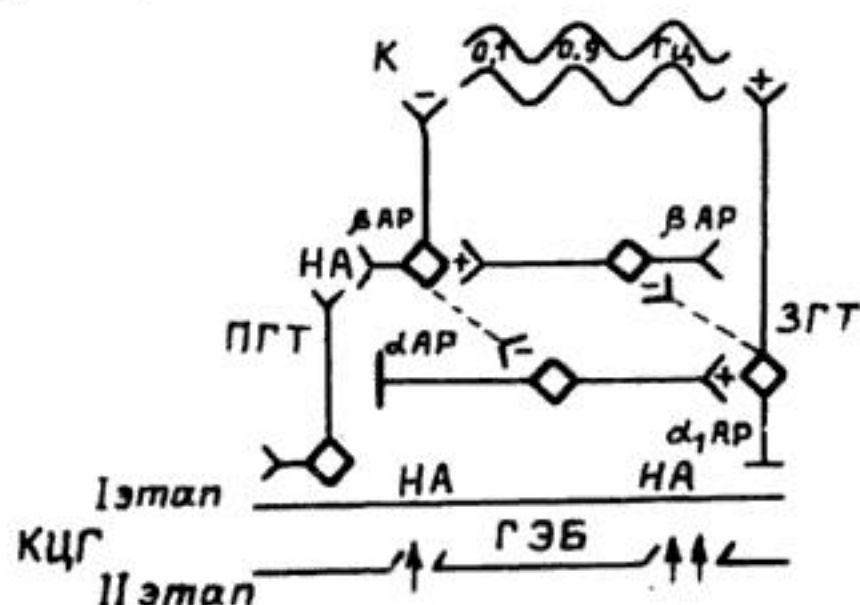


Рис. 11. Норадренергические механизмы пространственной синхронизации биоэлектрической активности при краниocereбральной гипотермии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. — М. : Из-во МГУ, 1982. — 345 с.
2. Воейков В. Л. Сопряжение рецепторов гормонов и нейромедиаторов с аденилатциклазой // Итоги науки и техники. Сер. Биохимическая химия. — 1984. — № 2. — С. 141—150.
3. Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Сергеева М. Г., Варфоломеев С. Д. Стабильность опиятных рецепторов «сырых» и лиофилизированных препаратов мембран головного мозга крыс // Биохимия. — 1984. — 49, № 7. — С. 1127—1133.
4. Илюхина В. А., Дамбинова С. А., Медведева Т. Г. Состояния головного мозга и организма и их физиолого-биохимические основы // Современные проблемы клинической физиологии ЦНС. — Л. : Медицина, 1981. — С. 18—58.
5. Fifcova E., Marsala J. Stereotaxic atlases for the cat, rabbit and rat // Electrophysiological methods in biological research. — Prague : Publ. House of the Czech. Acad. Sci. — 1960. — P. 426—467.
6. Klotz Arving M. Number of receptor sites from Scatchard graphs: facts and fantasies // Science. — 1982. — 21, N 7. — P. 1247—1249.
7. Myers R. D. Chronic methods intraventricular infusion, cerebrospinal fluid sampling, and push-pull perfusion // Methods in Psychobiology. — New York: Academic Press. — 1977. — P. 281—315.

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

Поступила 23.09.88

G. A. BABIYCHUK, V. S. MARCHENKO, I. V. CHIZHEVSKAYA SYNAPTIC MECHANISMS OF THE SPATIAL SYNCHRONIZATION OF BIOLOGICAL IMPULSES IN COOLED BRAIN

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

The effect of craniocerebral hypothermia on neurochemical and neurophysiological parameters of CNS was studied using a local perfusion of hypothalamus *in vivo* with simultaneous registration of superslow processes.

В. А. Батюк, Т. Н. Мандругина, Г. Б. Сергеев

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ЗАМОРОЖЕННЫХ ОБРАЗЦАХ, СФОРМИРОВАННЫХ В РЕЖИМЕ НАПРАВЛЕННОЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

На примере катализируемого пероксидазой окисления рассмотрены кинетические закономерности ферментативных реакций в замороженных образцах, сформированных в режиме направленной кристаллизации. Получены уравнения, позволяющие количественно оценить влияние изменения физико-химических свойств системы при замораживании на кинетику ферментативных реакций, протекание которых является одной из причин криодеструкции биологических объектов.

Решению проблем криоконсервации и хранения биологических объектов и пищевых продуктов мешает недостаточное знание происходящих в них при замораживании-оттаивании и хранении биохимических и биофизических процессов. При этом актуальной является задача определения вклада в криодеструкцию физических и биохимических факторов, в частности, необходимо знать поведение ферментативных систем. В начале 60-х годов было обнаружено, что в замороженных растворах при температуре ниже температуры плавления растворителя могут осуществляться химические и биохимические реакции [6, 8, 12, 14]. Кинетические особенности реакций в замороженных растворах определяются в значительной степени структурной и фазовой неоднородностью замороженных многокомпонентных систем [9]. Согласно кинетическим представлениям о протекании химических реакций в замороженных твердых матрицах многокомпонентных систем при замораживании возникают области с различными физико-химическими свойствами. Области с повышенной концентрацией реагентов в первом приближении удобно рассматривать как микрофазу с подвижностью реагентов, близкой к подвижности молекул в жидких системах, и находящуюся в твердой матрице. При этом необходимо учитывать отличие свойств этой области с повышенной подвижностью реагентов от свойств исходного раствора и даже от его свойств в переохлажденном виде [9]. Не располагая экспериментальной фазовой диаграммой реакционноспособной системы, можно в том или ином приближении получить уравнения для предсказания кинетики реакций в замороженных образцах, сделав некоторые общие предположения о ее поведении, исходя из кинетики реакции в жидкой фазе и основных физико-химических характеристик рассматриваемых систем (таких как состав, температуры и теплоты плавления растворителя и компонентов, взаимная растворимость компонентов, скорость их кристаллизации и др.). Выражение для константы скорости реакции в замороженном образце (k_3) при условии, что реакция происходит в микрообластях с достаточно высокой молекулярной подвижностью (имеющих объем V_3), имеет вид [9]:

$$k_3 = \frac{V_3}{V_n} \prod_{i=1}^l \left(\frac{C_{i3}}{C_{in}} \right)^{n_i} k_n(T), \quad (1)$$

где l — число реагентов (включая и катализатор) реакции; n_i — порядок реакции по i -реагенту; $k_n(T)$ — константа скорости реакции в жидкой фазе при температуре наблюдения T , отражающая изменения физико-химических свойств системы (f_i) при замораживании; V_n — объем образца в исходном жидком состоянии. Введем коэффициент фазовой неоднородности образца $\alpha = V_3/V_n$ (2) и фактор концентрирования $\beta = C_{i3}/C_{in}$ (3). Для перехода к количественному описанию влияния замораживания на кинетику реакций необходимо найти способы предсказания величин α и β и по возможности выразить их с помощью аналитических выражений через известные параметры и свойства исследуемой системы. Эти параметры зависят от способа получения замороженного образца. Для образцов, сформированных в

режиме направленной кристаллизации, когда на фронте кристаллизации соблюдаются условия термодинамического равновесия для сосуществующих фаз, оказывается возможным (этот случай является частным в рамках рассматриваемого кинетического подхода, однако он очень распространен на практике) продвинуться в количественном описании кинетики реакций.

Изменение концентрации растворенного вещества в жидкой фазе замороженного образца в зависимости от закристаллизовавшейся его части g описывается уравнением [5]:

$$C_{ж} = C_{н} (1 - g)^{K_i - 1}, \quad (4)$$

где $K_i = C_{иТ}/C_{иЖ}$ [11] — коэффициент распределения растворенного вещества между твердой и жидкой фазами замороженного образца. Уравнение (4) справедливо и для кристаллизации сферического образца, причем форма уравнения не зависит от того, идет кристаллизация из центра или с поверхности; несмотря на это кинетика реакции в замораживаемом образце в переходном режиме (при кристаллизации) может определяться тем, кристаллизуется ли образец изнутри или снаружи, поскольку функция g от времени может быть разной при различных тепловых режимах кристаллизации. Из уравнений (1) и (4) для микрообластей с высокой молекулярной подвижностью имеем

$$k_3 = \frac{V_3}{V_{н}} \prod_{i=1}^l (1 - g)^{n_i(K_i - 1)} k_{и}(T), \quad (5)$$

а учитывая, что $\alpha = \frac{V_3}{V_{н}} = (V_{н} - V_{Т})/V_{н} = 1 - \frac{V_{Т}}{V_{н}} = 1 - g$ получаем:

$$k_3 = \alpha^{1 + \sum_{i=1}^l n_i(K_i - 1)} k_{и}(T). \quad (6)$$

Для энергии активации реакции в замороженных образцах $E_{эз}$ из уравнений (5) и (6) получаем:

$$E_{эз} = -R \frac{d \ln k_3}{d(1/T)} = E_{эи} - R \left(1 - \sum_{i=1}^l n_i + \sum_{i=1}^l n_i K_i \right) \times \times \frac{d \left(\sum_{i=1}^l n_i K_i \right)}{d(1/T)} - R \ln \alpha \frac{d \left(\sum_{i=1}^l n_i K_i \right)}{d(1/T)}, \quad (7)$$

где $E_{эи} = E_0 - R \sum_{i=1}^k \frac{\partial \ln k_{и}}{\partial f_i} \left(\frac{\partial f_i}{\partial (1/T)} \right)$ (8) — энергия активации реакции в объе-

ме замороженного образца V_3 с учетом изменения физико-химических свойств системы при изменении температуры и состава; E_0 — изопараметрическая энергия активации реакции.

При выводе уравнения (7) принято, что n_i не зависят от температуры T . Отметим, что второй член уравнения (7) может быть отрицательным при

условии $\sum_{i=1}^l n_i > 1 + \sum_{i=1}^l n_i K_i$, которое, например, выполняется для

бимолекулярной реакции, тогда $K_1 + K_2 < 1$ (в частности, когда реагенты полностью концентрируются в жидкой фазе замороженного образца — при $K_1 + K_2 = 0$). Как видим, такая ситуация должна встречаться часто. Если при этом второй член уравнения (7) по модулю будет больше алгебраической суммы двух остальных членов в выражении, то для реакции в замороженном образце будет наблюдаться явление отрицательного температурного коэффициента, т. е. реакция будет ускоряться с понижением температуры. Из уравнения (7) следует важный вывод, что величина эксперименталь-

ной энергии активации определяется не только энергией активации собственно реакции, но и температурной зависимостью коэффициента фазовой неоднородности замороженного образца и температурными зависимостями коэффициентов распределения реагентов между областями с разной молекулярной подвижностью.

С понижением температуры растворимость большинства веществ уменьшается. При высокой начальной концентрации и достаточно сильном понижении температуры может возникнуть ситуация, когда произойдет пересыщение раствора по тому или иному компоненту системы. Для биомолекулярной реакции при условии, что первый компонент ограниченно растворим (пусть $N_{1P} = f(T)$ — его растворимость), из уравнений (1) и (7) для коэффициента ускорения реакции в замороженном образце $\gamma = k_3/k_n(T)$ (9) получим: $\gamma = (1 - g)^{K_2} N_{1P}/N_{10}$ (10), где K_2 — коэффициент распределения для второго компонента, а N_{10} — концентрация малорастворимого первого компонента в исходном растворе. Первый сомножитель в уравнении (6) может быть найден как функция температуры и исходного состава замороженного образца, если известна фазовая диаграмма системы.

При отсутствии данных о реальном фазовом состоянии замороженной системы кинетику реакции в ней можно описать с хорошим приближением, если воспользоваться линейным криоскопическим соотношением $N_2^* = A(T_0 - T)$ (11), где N_2^* — мольная доля растворенных веществ; $A = \Delta H_0/RT^2$ (12) — первая криоскопическая постоянная; $\Delta \sim 1/A$ — криоскопическая постоянная, приведенная к единицам концентрации моль/л; H_0 — мольная теплота плавления чистого растворителя при температуре плавления T_0 .

Наблюдаемые в эксперименте константы скорости k_3 реакций различных типов в замороженных растворах, содержащих добавку, не зависят от концентраций реагентов и отличаются от констант скоростей тех же реакций в жидкой фазе на множитель $\beta = (T_0 - T)/(\Delta \cdot C_D)$ (13) в степени $(\sum n_1 - 1)$. При отсутствии же добавки значения k_3 реакций, идущих с уменьшением или увеличением числа молей, оказываются зависящими от текущей концентрации реагентов и представляют собой функцию глубины реакции [9].

Если воспользоваться более точными криоскопическими соотношениями, например $N_2^* = 1 - \exp(-A \cdot \Delta \cdot T)$ (14) [1], то получим более низкие значения концентраций растворенных веществ, чем вычисленные по формуле (11) при том же значении температуры замороженного образца. К примеру, для $\Delta T = 10$ К эти концентрации ниже для камфоры, воды, бензола на 1,6; 4,6 и 7,2 % соответственно, а для $\Delta T = 30$ К — 4,8; 13,0 и 19,8 % соответственно. Криоскопическое соотношение (14) приводит к более низким значениям скоростей реакций по сравнению с линейным соотношением. Чем меньше криоскопическая постоянная, тем меньше различия в концентрациях, задаваемых уравнениями (11) и (14), а для замороженных растворов (водных) в области $\Delta T = 30$ К, где с заметными скоростями происходит большинство реакций, они не превышают ~ 5 %. Другими словами, если растворенные вещества не образуют с растворителем твердых растворов (например, не включаются в заметных количествах в лед) и если состояние замороженных растворов близко к равновесному, то линейное соотношение является очень хорошим приближением.

Рассмотрим результаты изучения ферментативного окисления 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата, катализируемого пероксидазой в присутствии NaCl (в качестве инертной добавки). Методическая часть работы подробно описана в [10]. На рис. 1 представлена в интервале $-30 \div +30$ °С температурная зависимость начальной скорости окисления (W_0) нафтохинолфосфата (ХФ) во льду и в жидкой фазе. Как видно из рис. 1, в замороженном состоянии в области температур $-8 \div 0$ °С наблюдается эффект абсолютного ускорения реакции. Так, при температуре $-8,5$ °С во льду реакция идет в 4 раза быстрее, чем в жидкой фазе при

0 °С. Качественное объяснение полученной зависимости заключается в том, что при замораживании происходит конкуренция процессов: замедление реакции с понижением температуры и ускорение реакции за счет увеличения действующих концентраций реагентов и изменения физико-химических свойств в микрообластях локализации реагентов, характеризующихся повышенной подвижностью компонентов по сравнению с твердой матрицей. Окисление ХФ в жидкой фазе имеет первый порядок по каждому из реагентов ($n_i = 1$, $l = 2$) [10]. Константу распределения K_i для NaCl учли прямым образом, воспользовавшись данными по растворимости, а для других компонентов системы ввиду отсутствия фазовых диаграмм считали, что они не включаются в лед.

Приведенные выше уравнения позволили оценить возможное влияние изменения физико-химических свойств системы при переходе от жидкой фазы к замороженному состоянию на кинетические параметры ферментативного окисления. С помощью уравнения (11) оценили состав реакционной системы в объеме V_3 при различных температурах замораживания (табл. 1). При этом считали, что имеем дело с регулярными растворами компонентов; в частности, что суммарная концентрация веществ в мольных долях описывается уравнением (11). В этом случае выражение для константы ферментативного окисления в замороженных образцах, сформированных в режиме направленной кристаллизации, будет иметь вид: $k_3 = \alpha^{-1} k_{ж}$ (15), а для экспериментальной энергии активации получили следующее уравнение:

$$E_{33} = E_{3ж} + R \frac{d \ln \alpha}{d 1/T}. \quad (16)$$

Как видно из табл. 1, замораживание приводит к существенному возрастанию ионной силы (I) в местах локализации реакции. Известно, что измене-

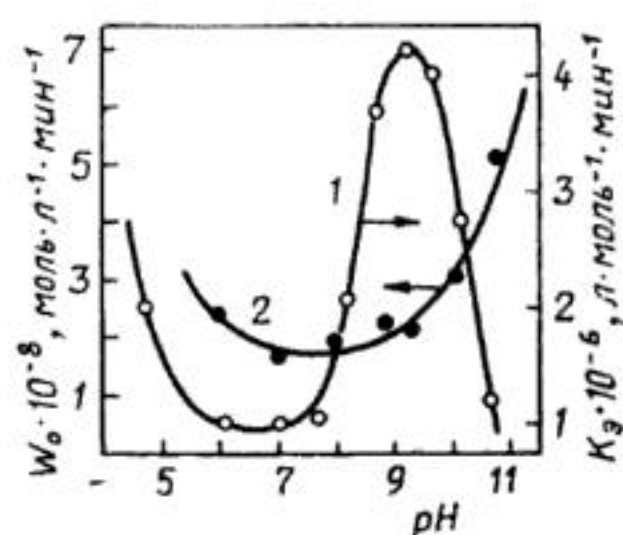


Рис. 1. Температурная зависимость скорости окисления 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата перекисью водорода, катализируемого пероксидазой: 1 — жидкая фаза; 2 — замороженные растворы ($[ХФ]_0 = 0,76 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $[H_2O_2]_0 = 1,9 \cdot 10^{-4}$ моль/л; $[HRP]_0 = 2,5 \cdot 10^{-9}$ моль/л, $pH = 7,0$ — фосфатный буфер; 0,5 моль/л NaCl; 0,5 об. % CH_3OH

Таблица 1

Влияние замораживания на физико-химические свойства системы

T°	d	I	$-\left(\frac{\partial pa_{H^+}}{\partial \frac{1}{T}}\right)$	$(pa_{H^+})_T$	ϵ	$\frac{\partial \lg \eta}{\partial \frac{1}{T}}$	$\frac{\partial pK^{ХФ}}{\partial \frac{1}{T}}$	$pK^{ХФ}$	$-\frac{\partial \frac{1}{\epsilon}}{\partial \frac{1}{T}}$	$\Delta H^{ХФ}$, кДж/моль
25	0	0,52	-110	6,90	78	7000	-1000	9,40	5,40	19,3
-5	0,36	1,44	5700	6,60	90		1870	9,75	2,56	35,7
-8,5	0,21	2,40	3040	5,96	91	1750	1000	10,20	2,53	19,3
-15	0,14	3,70	2300	5,50	93		310	11,00	2,47	5,9
-20	0,09	4,90	1240	4,60	94		30	11,60	2,44	0,6

ние активности ионов водорода в присутствии нейтральной соли связано с влиянием ионной силы на коэффициент активности ионов (γ) [3]. Полученные с учетом эффекта концентрирования значения ионной силы использовали при расчете коэффициентов $\partial \lg \gamma / \partial I$ по уравнению Дебая-Хюккеля. Изменение коэффициента активности с температурой (табл. 1) оценивали из соотношения $\partial \lg \gamma / \partial \frac{1}{T} = \frac{\partial \lg \gamma}{\partial I} \frac{\partial I}{\partial 1/T}$ (17). При данной температуре $I \sim \sim N_2 = A(T_0 - T)$, где N_2 — добавка NaCl, выражение (17) можно заменить на следующее: $\partial \lg \gamma / \partial 1/T = AT^2 \partial \lg \gamma / \partial I$ (18). Активность ионов

Водорода при температуре замораживания T $(ra_{H+})_{3T}$ рассчитывали следующим образом:

$$(ra_{H+})_{3T} = (ra_{H+})_{жT_0} + \left[\left(\frac{\partial ra_{H+}}{\partial \frac{1}{T}} \right)_{3T_0} - \left(\frac{\partial ra_{H+}}{\partial \frac{1}{T}} \right)_{3T} \right] \times \left[\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right], \quad (19)$$

где $(ra_{H+})_{жT_0}$ — активность ионов водорода фосфатного буфера в жидкой фазе при T_0 вычисляли по уравнению:

$$(ra_{H+})_{жT_0} = (ra_{H+})_{298,15} + \left(\frac{\partial ra_{H+}}{\partial I} \right)_{298,15} + \left(\frac{\partial ra_{H+}}{\partial \frac{1}{T}} \right) d \frac{1}{T}. \quad (20)$$

$\left(\frac{\partial ra_{H+}}{\partial \frac{1}{T}} \right)_{3T}$; $\left(\frac{\partial ra_{H+}}{\partial \frac{1}{T}} \right)_{3T_0}$ — температурные коэффициенты активности ионов водорода при температуре замораживания T и T_0 соответственно определяли по уравнению вида:

$$\frac{\partial ra_{H+}}{\partial \frac{1}{T}} = -\frac{1}{2} \left(\frac{\partial \lg K_1}{\partial \frac{1}{T}} + \frac{\partial \lg K_2}{\partial \frac{1}{T}} \right) + 2 \frac{\partial \lg \gamma}{\partial \frac{1}{T}}, \quad (21)$$

здесь K_1 и K_2 — константы диссоциации фосфорной кислоты. В табл. 1 приведены рассчитанные по формулам (19) и (21) величины $(ra_{H+})_T$ и

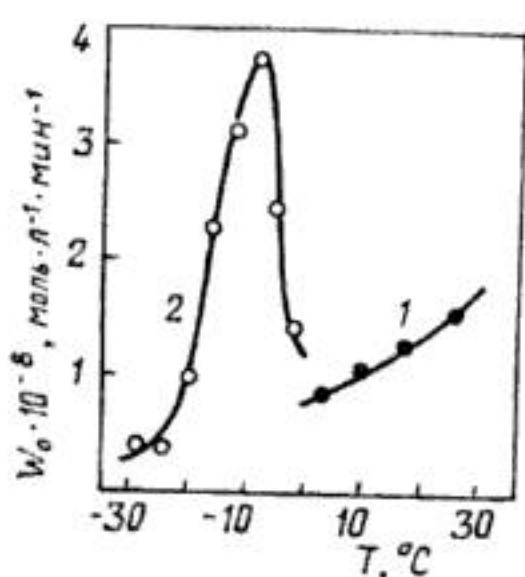


Рис. 2. Зависимость скорости окисления $(W_0)_{2,3}$ -диметил-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата (ХФ) перекисью водорода, катализируемого пероксидазой (HRP) от величины pH : 1 — в жидкой фазе; $28^\circ C$, 5 об. % CH_3OH , 0,01 моль/л фосфатный буфер; 2 — в замороженном растворе, $-8,5^\circ C$, 0,5 об. % CH_3OH , 0,01 моль/л фосфатный буфер; 0,5 моль/л $NaCl$; $[ХФ]_0 = 0,55 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $[H_2O_2]_0 = 2,2 \cdot 10^{-4}$ моль/л; $[HRP]_0 = 2,25 \times 10^{-9}$ моль/л

$\left(\frac{\partial ra_{H+}}{\partial \frac{1}{T}} \right)_T$ для замороженных и жидких растворов при различных температурах. Из данных табл. 1 следует, что при замораживании происходит уменьшение ra_{H+} фосфатного буфера; это хорошо согласуется с полученными экспериментальными данными по зависимости скорости исследуемой реакции от pH в замороженном состоянии, приведенными на рис. 2. Присутствие метилового спирта в реакционной среде изменяет диэлектрическую проницаемость среды (ϵ). Используя данные по изменению ϵ при концентрировании CH_3OH в замороженных образцах и литературные данные по зависимости ϵ от температуры для различных по составу водно-спиртовых смесей [2], оценили диэлектрическую проницаемость и $\frac{\partial \lg \gamma}{\partial \frac{1}{T}}$ в замороженных образцах (табл. 1). Концентрирование CH_3OH при замораживании частично компенсирует рост ϵ , вызванный понижением температуры. Температурный коэффициент вязкости замороженных образцов $\frac{\partial \lg \eta}{\partial \frac{1}{T}} = 1,7 \cdot 10^3$ находили по известным температурным зависимостям вязкости водно-солевых растворов различного состава [13] и данным по составу замороженных смесей $H_2O-NaCl$ [7].

Покажем возможное использование развиваемых кинетических представлений о протекании химических реакций в замороженных растворах для описания процессов, включающих равновесие стадии на примере ионизации OH -группы 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата. Выражение для энтальпии ионизации $ХФ \Delta H^{хф}$ в замороженных образцах имеет вид:

$$\Delta H^{хф} = -2,3 R \frac{d \lg K^{хф}(\epsilon, I)}{d \frac{1}{T}} = 2,3 R \left[\left(\frac{\partial p K^{хф}}{\partial \frac{1}{\epsilon}} \right)_{I,T} \frac{\partial \frac{1}{\epsilon}}{\partial \frac{1}{T}} + \left(\frac{\partial p K^{хф}}{\partial I} \right)_{\epsilon,T} \frac{\partial I}{\partial \frac{1}{T}} + \left(\frac{\partial p K^{хф}}{\partial \frac{1}{\epsilon}} \right)_{\epsilon,I} \frac{T^2}{2,3(T_0 - T)} \right]. \quad (22)$$

Зависимости $pK^{x\Phi}$ по каждому из параметров (ϵ , I) находили или экспериментально, как в случае $\left(\frac{\partial pK^{x\Phi}}{\partial \frac{1}{\epsilon}}\right)_T = 200$ [4], или расчетом соответ-

ствующих производных по уравнениям, связывающим $pK^{x\Phi}$ с этим параметром. Значения $\Delta H_3^{x\Phi}$ и $pK^{x\Phi}$ для замороженных растворов при различных температурах замораживания приведены в табл. 1. Как видно, $\Delta H^{x\Phi}$ ионизации в жидкой фазе и в замороженном состоянии отличаются не только по величине, но и по знаку. В области $pH = 5-7$ наибольший вклад в наблюдаемую скорость вносит реакция взаимодействия молекулы нафтохинолфосфата с электронейтральной формой фермента HRP—11. С учетом данных табл. 2 по уравнению (16) рассчитывали величину $E_{эз} = 68,6 + 7,3$ кДж/моль и величины вкладов ΔE_i температурозависимых свойств среды f_i в экспериментальную энергию активации реакции. В первом приближении за величину E_0 приняли изодиэлектрическую энергию активации исследуемой реакции в жидкой фазе E_e ($\epsilon = 78$) = 68 кДж/моль, экстраполированную на условия замороженной системы E_e ($\epsilon = 90$) = 61,7 кДж/моль. Аналогично рассчитали энергию активации реакции в жидкой фазе $E_{эи} = 30,6$ кДж/моль. Полученное значение хорошо совпадает с экспериментально найденной величиной $E_{эи} = 27,8 + 4$ кДж/моль [7]. Из полученных результатов можно заключить, что при переходе в замороженное состояние происходит резкое изменение физико-химических свойств системы в целом, которое влечет за собой изменение кислотно-основных равновесий реагентов и кинетических параметров реакции.

Таблица 2

Величины вкладов ΔE_i (кДж/моль) температурозависимых свойств f_i системы в экспериментальную энергию активации окисления 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата перекисью водорода, катализируемого пероксидазой, в жидких и в замороженных образцах.

f_i	$\frac{1}{\epsilon}$		$pH = 7,0$		$pK^{x\Phi}$		$\lg \eta$	
	ж	з	ж	з	ж	з	ж	з
$\partial f_i / \partial T$	5,0	-2,5	2000	-3000	-1000	1000	700	1750
$\partial \lg W_0 / \partial f_i$	470	-530	-0,06	-0,006	0,08	0,008	-1	-1
ΔE_i	44,7	25,6	-0,24	0,34	-0,54	0,60	-13,4	-32,6

Важно отметить, что экспериментальную зависимость скорости реакции от температуры удастся лучше описать в рамках кинетических представлений о протекании химических реакций в замороженных растворах при условии учета температурных изменений физико-химических параметров системы. Так, теоретически найденное значение температуры максимума на кривой зависимости скорости реакции от температуры $T_{\max} = 265$ К [9] хорошо совпадает с опытной величиной 264 К (рис. 1), если в расчете использовать величину $E_{эз}$.

Результаты анализа вкладов ΔE_i (табл. 2) в экспериментальную энергию активации ферментативного окисления 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата перекисью водорода позволяют сделать вывод, что низкие энергии активации ферментативных процессов на самом деле не свидетельствуют о малости энергетического барьера на пути превращения субстратов в продукты, а скорее указывают на наличие компенсирующих вкладов, связанных с температурной зависимостью физико-химических параметров системы. Для правильной оценки кинетических параметров реакций в замороженных растворах необходим конкретный учет изменения самих значений физико-химических свойств среды при замораживании и знака их тем-

пературных зависимостей. Физико-химические параметры микрообластей с достаточно высокой молекулярной подвижностью реагентов в замороженных образцах нельзя получить путем прямой экстраполяции данных для истинно жидких систем. Исходя из основных положений рассматриваемого кинетического подхода к описанию реакций в замороженных объектах, можно получить уравнения для скоростей реакций в замороженной системе. Полученные в работе уравнения позволяют понять, каким образом скорость реакции и величина ускорения зависят от порядка реакции, от характера распределения компонентов по фазам замороженного образца, от коэффициента фазовой неоднородности замороженного образца и физико-химических свойств системы, таких как вязкость, диэлектрическая проницаемость, ионная сила и др.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров Ю. И. Точная криометрия органических веществ.— Л. : Химия, 1975.— 160 с.
2. Ахадов Я. Ю. Диэлектрические свойства бинарных растворов.— М. : Наука, 1977.— 300 с.
3. Бейтс Р. Определение pH. Теория и практика / Под ред. Б. Н. Никольского и М. М. Шульца.— Л. : Химия, 1972.— С. 100—112.
4. Битко С. А. Кинетика и механизм окисления хинолфосфатов. Автореф. дис. ... канд. хим. наук.— М. : МГУ, 1974.— 193 с.
5. Вигдорович В. Н., Вольпин А. Е., Курдюмов Г. М. Направленная кристаллизация и физико-химический анализ.— М. : Химия, 1976.— 220 с.
6. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии.— Л. : Наука, 1972.— 288 с.
7. Мандругина Т. Н. Влияние на кинетику окисления нафтохинолфосфатов температурной зависимости свойств системы : Автореф. дис. ... канд. хим. наук.— М. : МГУ, 1982.— 204 с.
8. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Иткин Ю. А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.— Киев : Наук. думка, 1977.— 243с.
9. Сергеев Г. Б., Батюк В. А. Криохимия.— М.: Мир, 1978.— 197 с.
10. Сергеев Г. Б., Батюк В. А., Сергеев Б. М. и др. Пероксидазное окисление нафтохинолфосфатов. Влияние полярности среды на скорость окисления.— Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2.— 1979.— 20, № 2.— С. 140—144.
11. Херингтон Е. Зонная плавка органических веществ.— М. : Мир, 1965.— 25 с.
12. Grant N. H., Clark D. E., Alburn H. E. Amidazole — and Base — Catalyzed Hydrolysis of penicillin in Frozen systems // J. Am. Chem. Soc.— 1961.— 83, N 21.— P. 4476—4477.
13. The Physikal-chemical constants of Binary systems in concentrated Solutions / Timmermans J.— 1960.— 1.— P. 325—327.
14. Pincock R. E., Kioisky T. E. Reactions in Frozen solutions. III Methyl godine with Triethylamine in Frozen Benzene solutions // J. Am. Chem. Soc.— 1966.— 88, N 1.— P. 51—55.

МГУ им. М. В. Ломоносова

Поступила 18.06.87

V. A. BATYUK, T. N. MANDRUGINA, G. B. SERGEYEV

THE KINETICS OF ENZYME CATALYZED OXIDATION IN FROZEN SAMPLES FORMED UNDER CONDITIONS OF DIRECTED CRYSTALLIZATION

M. V. Lomonosov State University of Moscow

Peroxidase catalyzed oxidation was taken as an example, and kinetic features of enzymatic reactions in frozen samples formed under directed crystallization have been considered. The equations have been derived which give basis for quantitative description of the influence of alterations of physico-chemical properties during freezing on the kinetics of enzymatic reactions which may cause cryodestruction of biological systems.

О. А. Красавцев, Б. М. Исабеков, Л. П. Теркулова

ИЗМЕНЕНИЯ ОСМОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОРОЗОСТОЙКИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОТОПЛАСТОВ ПРИ ОБЕЗВОЖИВАНИИ

С помощью гипертонических растворов имитировали обезвоживание внеклеточным льдом протопластов коровой паренхимы бузины. Обнаружена линейная зависимость объема протопластов от величины обратной осмольности наружного раствора.

Исследовались осмотические свойства протопластов бузины красной (*Sambucus racemosa* L.), которые в зимнем закаленном состоянии имеют сверхвысокую морозоустойчивость [1]. Для выделения протопластов измельченную ткань плазмолизировали в 0,8 моляльном (зимой, закаленная ткань) или в 0,3 моляльном манните (летом). Ферментирующая смесь состояла из 0,8 или 0,3 моляльного маннита и содержала по 2 % дрейселазы, мацеразы Р-10 и онозуки-10.

Протопласты, изолированные зимой из закаленной коровой паренхимы бузины, выдерживали замораживание до -60°C , а также последующее погружение в жидкий азот. Показателями выживания были: осмотическая чувствительность протопластов и окрашивание вакуоли нейтральным красным [8]. Обезвоживание действия внеклеточного льда имитировали с помощью гипертонических растворов. Повышение концентрации наружного раствора производили путем ресуспензии или в перфузионной камере, которая была встроена в охлаждаемый столик микроскопа. Во время перфузии

перемещению кусочков ткани препятствовало трение их о стенки камеры. Протопласты при перфузии растворами сорбита уплывали из поля зрения, но часть протопластов удавалось закрепить в растворах CaCl_2 , отличающихся повышенной вязкостью. Охлаждение перфузионной камеры производили до температуры, на $3-5^{\circ}\text{C}$ превышающей температуру замерзания гипертонического раствора. Окуляр-микрометром измеряли диаметр 180 изолированных про-

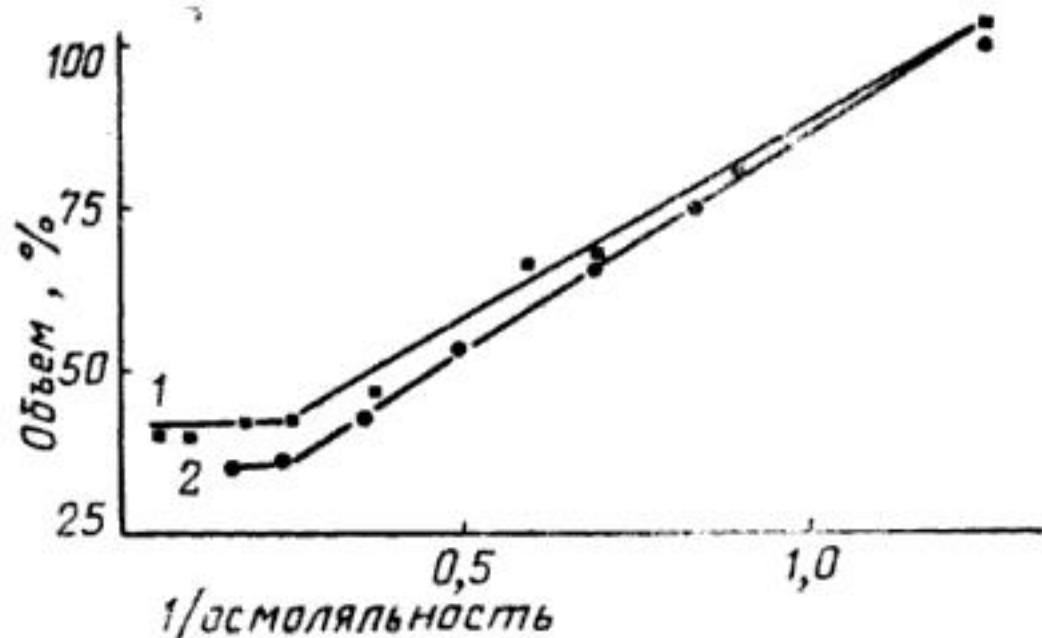


Рис. 1. Зависимость объема изолированных закаленных протопластов бузины от осмольности гипертонических растворов CaCl_2 : 1 — перфузия, 2 — ресуспензия

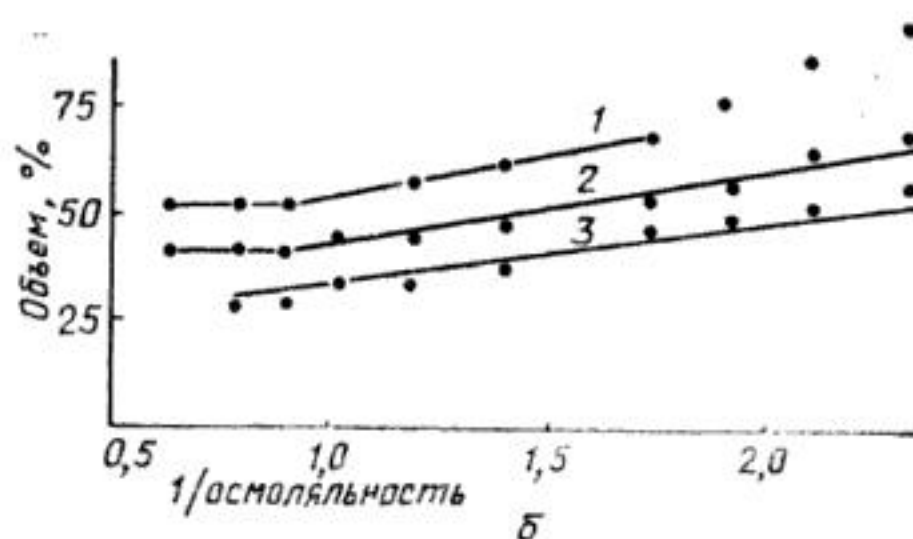
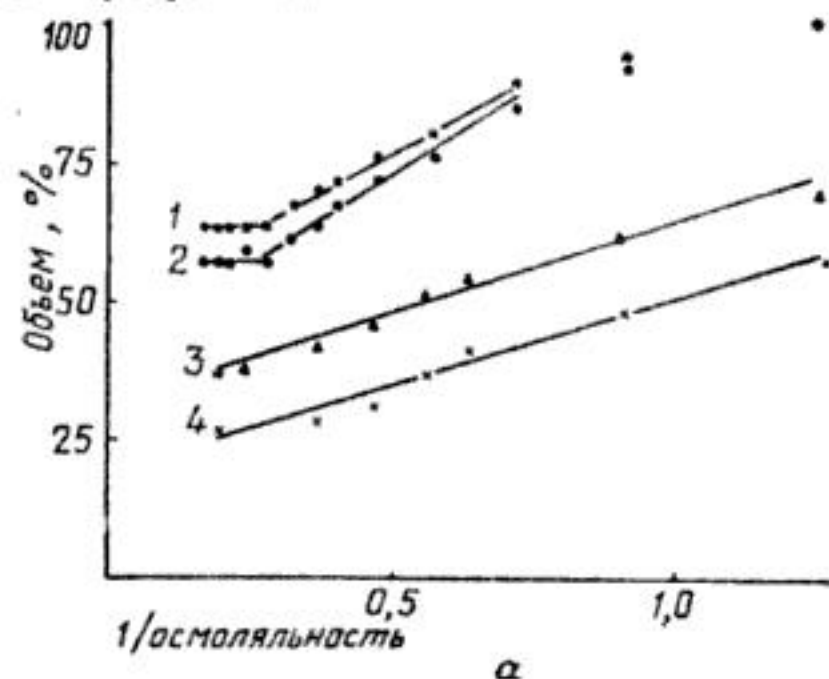


Рис. 2. Зависимость объема протопластов от осмольности гипертонических растворов CaCl_2 в плазмализированной коровой паренхиме бузины: а — закаленное зимнее состояние: 1 — при охлаждении, 2 — при комнатной температуре, 3 — после обработки 0,03 %-ным колхицином, 4 — после обработки 0,1 %-ным колхицином; б — незакаленное летнее состояние: 1 — при охлаждении, 2 — при комнатной температуре 3 — после обработки 1,0 %-ным колхицином

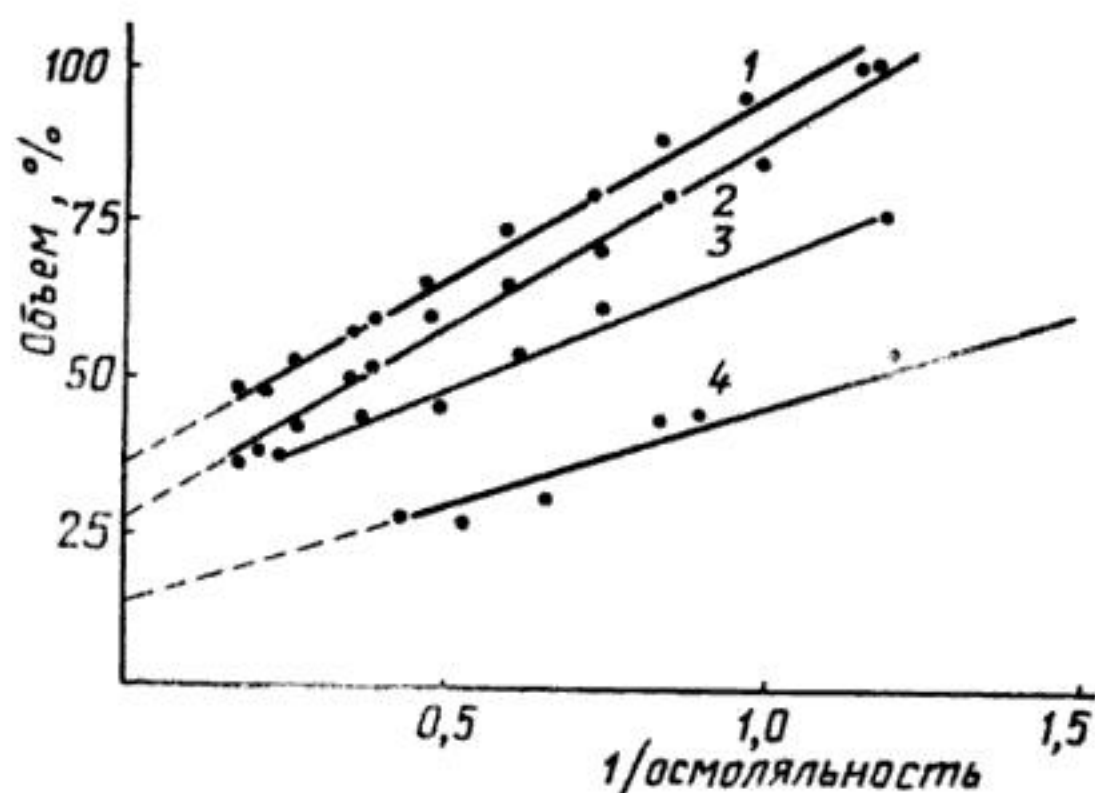


Рис. 3. Зависимость объема протопластов от осмоляльности гипертонических растворов сорбита в плазмализированной коровой паренхиме бузины (1—3 — закаленное зимнее состояние): 1 — растворы сорбита с раствором Хогланда-Арнонда 1, 2 — растворы сорбита, 3 — растворы сорбита после обработки 0,2 %-ным колхицином, 4 — незакаленное летнее состояние, растворы сорбита

топластов или длину плазмализированных протопластов в 10 клетках при каждой осмольной концентрации раствора.

Получили линейную зависимость относительного объема протопластов от величины обратной осмоляльности наружного раствора (рис. 1—3). В этом отношении наши результаты согласуются с данными Степонкуса [8].

Изменение объема протопластов коровой паренхимы бузины в гипертонических растворах (при комнатной температуре)

Варианты опытов	Объем, %, при:		Неосмотиче- ский объем, %
	2, 7 осмолей (—5° C)	5, 4 осмолей (—10° C)	
Закаленное зимнее состояние			
СОРБИТ			
Изолированные протопласты, ресу- пензия;	38,5 ± 2,5	26,8 ± 2,5	14,4 ± 1,0
Ткань, перфузия;	49,4 ± 1,1	35,4 ± 1,3	26,8 ± 0,5
То же, с раствором Хогланда— Арнонда 1;	57,5 ± 1,0	46,3 ± 1,1	35,2 ± 0,5
То же, после 0,2 % колхицина	41,8 ± 1,2	33,6 ± 0,8	25,4 ± 1,6
CaCl ₂			
Изолированные протопласты, ресу- спензия;	42,7 ± 1,5	35,0 ± 1,3	18,5 ± 0,3
То же, перфузия;	44,0 ± 1,2	41,0 ± 1,1	27,0 ± 0,4
Ткань, перфузия;	63,1 ± 0,7	56,0 ± 0,7	39,0 ± 0,2
То же, после 0,1 % колхицина	29,8 ± 1,3	24,0 ± 1,3	18,2 ± 1,1
Незакаленное летнее состояние			
СОРБИТ			
Изолированные протопласты, ресу- спензия;	21,0 ± 0,9		8,7 ± 0,9
Ткань, перфузия;	24,8 ± 1,3		12,9 ± 1,3
CaCl ₂			
Ткань, перфузия;	30,7 ± 1,9		23,9 ± 0,4
То же, после 1 % колхицина	28,0 ± 1,3		18,8 ± 0,7

Но в наших опытах был различный объем протопластов при одинаковой осмоляльности наружных растворов разного состава, большие различия имелись в величинах неосмотического объема (табл.). Особенно большой неосмотический объем был в растворах CaCl_2 (рис. 1, 2), а при концентрациях CaCl_2 выше 3,5 осмолей, когда достигался минимальный объем 3, график зависимости объема от обратной осмоляльности образовывал плато. При охлаждении сохранялся больший объем, чем при комнатной температуре. Аналогичная форма графика для клеток кизила описана Мерименсом и Виллиамсом [3]. Сопротивление уменьшению объема протопласта связывают с механическими свойствами плазмалеммы и подстилающего плазмаллемму

слоя протоплазмы. Структурные свойства протопласта, особенно его наружных слоев, в большой мере определяются цитоскелетом, в состав которого входят микротрубочки. Поэтому испытывалось влияние на объем протопластов растворов колхицина, действие которого связывают с деполимеризацией тубулина [4]. Общий относительный объем и неосмотический объем под влиянием колхицина уменьшался (табл.). Клетки при этом сохранялись живыми, и выход калия из закаленных кусочков паренхимы в наружный раствор CaCl_2 после обработки колхицином составлял 6,1 % от общего выхода из ткани, убитой кипячением, а в варианте без обработки колхицином — 5,0 %. Экзосмос калия при перфузии в растворах сорбита составлял 14,6 %.

Выход калия характеризует начальную фазу нарушения полупроницаемости плазмалеммы. Сахара, аминокислоты, а также белки вымываются при более значительных повреждениях. Существенная убыль сухого вещества из протопластов при незначительном выходе калия исключается. Но структурные изменения цитоплазматического матрикса зависят от ионного состава внутриклеточного раствора [4]. В таком аспекте небольшой выход калия из протопластов может сопровождаться значительными изменениями их водоудерживающей способности. Представление о протопласте как идеальном осмометре исходит из упрощенной модели. Протопласт уподобляют некоторому объему идеального раствора, окруженному полупроницаемой мембраной. Такая модель усложняется наличием в протопласте неосмотического объема (или нерастворяющегося объема, осмотически неактивного объема, неводного объема, остаточного объема), который интерпретируется как объем сухого вещества протопласта и объем связанной воды [3, 5, 8]. Связанная вода удерживается силами, превышающими водоотнимающие силы наружного раствора. Такие водоудерживающие силы протопласта обуславливаются матричным и отрицательным тургорным потенциалами, они определяются водоудерживающей способностью цитоплазматического матрикса и его упругими свойствами.

Осмотические свойства сверхморозостойких протопластов бузины можно объяснить, исходя из более сложной модели, которая предполагает, что объем и водоудерживающая способность цитоплазматического матрикса зависят от ионного состава внутриклеточного раствора. Аналогичные осмотические свойства описаны для эритроцитов [7].

В работе [6] показано стабилизирующее действие на мембраны тилакоидов раствора солей, имитирующих состав внутреннего раствора хлоропластов. Аналогично этим результатам можно было предполагать, что для протопластов стабилизирующим действием будет обладать раствор, имитирующий солевой состав апопласта. О составе апопласта мы не имели сведений, но предположили, что в некоторой мере его может моделировать питательный раствор Хогланда-Арнонда 1, поскольку он имеет уравновешенный солевой состав. В результате добавления смеси Хогланда-Арнонда 1 в раствор сорбита получено увеличение неосмотического объема протопластов (табл., рис. 3), что можно объяснить стабилизацией плазмалеммы, уменьшением выхода ионов. Вследствие этого предотвращаются те изменения в цитоплазматическом матриксе, которые в растворе одного сорбита ведут к уменьшению водоудерживающей способности протопласта, соответствующему уменьшению связанной воды и неосмотического объема протопластов.

В растворах $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$ в молярном соотношении 9 : 1 мы также получили линейную зависимость относительного объема протопластов от величины обратной осмоляльности наружного раствора. Очень большой неосмотический объем протопластов был в варианте с перфузией $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$ — до 61 %, что объясняется проникновением солей из наружного раствора внутрь протопластов. Такое объяснение исходит из наблюдений быстрого деплазмолиза при перфузии растворов $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$. Проникновение солей в раствор $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$ связано с особенностями свойств плазмалеммы нашего объекта.

Частичная диффузия осмотически активных веществ и изменения водоудерживающих свойств цитоплазматического матрикса не нарушает прямолинейной зависимости объема протопластов от величины обратной осмоляльности наружного раствора. Этот факт согласуется с предложенной Нобелом [5] расширенной интерпретацией уравнения Бойля-Вант-Гоффа, исходящей из принципа Онзагера.

У изолированных протопластов неосмотический объем был меньше по сравнению с протопластами плазмализированных клеток (см. табл.), что объясняется частичным нарушением цитоскелета в изолированных протопластах, имеющих форму шара.

Закаленные протопласты имели больший неосмотический объем по сравнению с незакаленными во всех сравнимых вариантах (см. табл.), что согласуется с данными Степонкуса [8]. У закаленных протопластов ржи неосмотический объем, однако, достигал лишь 14,4 %, тогда как у бузины — 35—39 %, а при охлаждении — даже 48 % (см. табл., рис. 2). Это соответствует большому относительному объему протоплазмы в морозостойких клетках бузины [1].

По нашим данным, у закаленных протопластов неосмотический объем может сильно изменяться в зависимости от условий обезвоживания, что свидетельствует о подвижности цитоплазматических структур. Предполагается, что при внеклеточном льдообразовании, в зависимости от его режима, структура цитоплазматического матрикса может изменяться и соответственно изменяется водоудерживающая способность протопластов. При благоприятных условиях замораживания закаленные протопласты имеют большой неосмотический объем и, соответственно, содержат большое количество связанной воды. Сохранение в протопласте большого количества незамерзшей воды ослабляет морозный стресс.

В работе [2] на основе определений содержания незамерзшей воды в растительных тканях с помощью ЯМР-спектроскопии делается вывод об отсутствии корреляции между содержанием связанной воды в растительных тканях и их морозоустойчивостью. Однако методом ЯМР-спектроскопии определяют содержание воды или льда во всех структурных элементах ткани в сумме, включая механические элементы и клеточные стенки. Водоудерживающая способность структур значительна и она может маскировать содержание связанной воды в цитоплазматическом матриксе протопластов. В работе [2] отмечают также отсутствие измеряемых количеств жидкой воды, связанной нативными протопластами. Наши данные указывают на наличие в закаленных протопластах лабильной связанной воды. Эти данные подтверждают представления Туманова [1] о наличии в протопластах воды, связанной с живым состоянием, которая может замерзать при критических отрицательных температурах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Туманов И. И. Физиология закаливания и морозостойкости растений.—М.: Наука, 1979.— 350 с.
2. Gusta L. V., Burke M. J., Kapoor A. C. Determination unfrozen water in winter cereals at subfreezing temperatures // *Plant Physiology*.— 1975.— 56, N 5.— P. 707—709.
3. Meryman H. T., Williams R. J. Basic principles of freezing injury to plant cells: natural tolerance and approaches to cryopreservation // *Cryopreservation of plant cells and organs*.— Florida: CRC Press.— 1985.— P. 13—47.
4. Morejohn J. C., Fosket D. E. Tubulins from plants, fungi and protists, a review // *Cell and molecular biology of the cytoskeleton*.— N. Y., London: Plenum Press.— 1986.— P. 257—329.
5. Nobel P. S. Biophysical plant physiology and ecology.— San Francisco: W. H. Freeman and company.— 1983.— 608 p.
6. Santarius K. A. Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. 2. Simulation of the condition in the chloroplast stroma // *Cryo-Letters*.— 1986.— 7, N 1.— P. 31—40.

7. Solomon A. K., Toon M. R., Dix J. A. Osmotic properties of human red cells // The Journal of membrane biology.— 1986.— 91, N 3.— P. 259—273.
8. Steponkus P. J. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation // Annual review of plant physiology.— 1984.— 35.— P. 543—584.

Ин-т физиологии растений
им. К. А. Тимирязева АН СССР, г. Москва

Поступила 01.02.88

O. A. KRASAVTSEV, B. M. ISABEKOV, L. P. TERKULOVA

CHANGES IN OSMOTIC PROPERTIES OF FROST HARDY PLANT PROTOPLASTS DURING DEHYDRATION

K. A. Timiryazev Institute for Plant Physiology of the USSR Academy of Sciences, Moscow

Dehydration of elder bark parenchyma protoplasts due to extracellular ice was simulated by hypertonic solutions. A linear dependence of the protoplast volume on the reverse osmolality of external solution has been found. However, nonosmotic volumes of protoplasts were different in CaCl_2 or sorbitol solutions and in media treated with Hogland-Arnold's solution or colchicine. The differences might be conditioned by changes in the cytoskeleton structure.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА» ГОТОВИТ К ВЫПУСКУ:

Криобиология и проблема бесплодия / В. И. Грищенко, Ф. В. Дахно, Ю. С. Парашук и др.— Киев: Наук. думка, 1990 (III). 10 л. 2 р. 10 к.

В монографии с современных позиций показана роль криобиологии в репродукции млекопитающих и человека, освещены социальные и медицинские проблемы бесплодного брака. Представлены методы криозащиты спермиев человека, разработанные авторами на основе полученных ими данных о механизмах повреждающего действия низких температур на гаметы.

Для специалистов по репродуктологии, криобиологии, акушеров-гинекологов, андрологов, студентов вузов.

Гипотермия в лечении острых отравлений / Г. А. Бабийчук, В. А. Аркатов, Ю. Н. Арцыбушев и др.— Киев: Наук. думка, 1990 (III).— 15 л. 3 р. 30 к.

В монографии обобщены сведения о различных способах лечения острых отравлений. Рассматриваются механизмы развития коматозного состояния при отравлении с сопутствующими нарушениями регуляции вегетативных функций, метаболизма, мозговой гемодинамики и ликворообращения, возникновением отека-набухания мозга и выраженной гипоксии.

Для физиологов, биохимиков, врачей.

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ОБЪЕМНОЙ СКОРОСТИ
ПЕРФУЗИИ НА ДИНАМИКУ НАСЫЩЕНИЯ
И ЭФФЕКТИВНОСТЬ КРИОЗАЩИТЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ
ПОЧЕК КРЫСЫ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ**

В опытах на 26 белых беспородных крысах исследовали динамику накопления диметилсульфоксида (ДМСО) в ткани почек при перфузионном насыщении органов 15 %-ным ДМСО в различных температурных условиях (18 или 8 °С), а также степень сохранности показателей клеточного метаболизма (тканевое содержание K^+ и Na^+ , степень отека, выход белка и ЛДГ в перфузат) после криоконсервирования при -50°C . Накопление ДМСО в почке оценивали по поглощению криопротектора из перфузата. Установлено, что скорость накопления ДМСО в органе зависит как от температуры перфузии, так и от объемного потока перфузата.

Эффективность защиты органа от низкотемпературного повреждения при криоконсервации во многом зависит от качества насыщения его ткани криопротектором. Только проведение адекватной перфузии может обеспечить равномерное и достаточно быстрое распределение криозащитного средства во всех отделах органа. Целью данной работы явилась оценка влияния двух наиболее важных факторов адекватности насыщения органа криопротектором — температуры перфузии и объемного потока перфузата на динамику накопления криопротектора в ткани и выраженность защитного действия от криоповреждения.

Опыты были проведены на почках 26 белых беспородных крыс массой 200—240 г. Под гексеналовым наркозом после лапаротомии производили инфильтрацию 0,5 %-ным новокаином парааортальной и периренальной клетчатки, выделяли аорту выше и ниже места отхождения почечных сосудов, вводили канюлю в ее дистальный отрезок и отмывали почки от крови охлажденным раствором НИИТиЮ-2 (KH_2PO_4 — 1,02, K_2HPO_4 — 3,8, $NaHCO_3$ — 0,84, Na цитрат — 0,3, Na сукцинат — 0,5, маннит — 38,0, г/л). После этого выделяли обе почки из жировой клетчатки и удаляли вместе с аортой и нижней полую вену. Блок почек подключали к стендовой установке для проведения перфузии, которую осуществляли раствором НИИТиЮ-2 при температуре 18 или 8 °С под постоянным давлением 70 мм рт. ст. В консервирующий раствор постепенно в течение 30—35 мин добавляли диметилсульфоксид (ДМСО) фирмы «Серва» до конечной концентрации 15 %, после чего перфузию продолжали при этой концентрации еще 25—30 мин. В процессе перфузии определяли концентрацию ДМСО в растворе, притекающем к почке и оттекающем от нее, по величине осмолярности раствора на осмометре «Эдванс Диги Мэтик Осмометр 3ДII» (США), а также величину объемной скорости перфузии путем сбора оттекающего от почки перфузата за единицу времени. Из полученных данных рассчитывали скорость накопления ДМСО в почке в процессе перфузии (v) по формуле:

$$v = \frac{\Delta c \cdot Q}{p}, \text{ мг ДМСО / мин / г массы почки,}$$

где Δc — разница содержания ДМСО в притекающем и оттекающем перфузате, мг/мл; Q — поток перфузии, мл/мин; p — масса почки, г. Кроме того, рассчитывали суммарное накопление ДМСО в органе за весь период перфузии.

После завершения периода насыщения почки криопротектором (определяли по исчезновению артерио-венозной разницы содержания ДМСО в перфузате) почки отключали от перфузионной установки, помещали в ме-

таллический контейнер, заполненный перфузатом и переносили в камеру программного замораживателя ЗПБ 01.00.00 (производство СКТБ с ОП ИПК и К АН УССР). Охлаждение вели парами жидкого азота со скоростью 1—3 °С/мин до температуры — 50 °С. После хранения при этой температуре в течение 1—2 сут органы отогревали в водяной бане при 40 °С и перфузировали при 18 или 8 °С раствором Хенкса с добавлением маннитола (начальная осмолярность перфузата 900 мосм/л) для удаления криопротектора. Через 10 мин перфузии осмолярность раствора уменьшали до 700 мосм/л, еще через 10 мин — до 500 мосм/л, а спустя еще 15—20 мин — до 300 мосм/л. Этим раствором перфузировали еще 30 мин. В процессе перфузионного удаления криопротектора из почки регистрировали динамику объемной скорости перфузии, оценивали выход лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из клеток почки в перфузат (определяли с помощью наборов реактивов фирмы «Берингер»), а также белка (определяли методом Лоури). В конце эксперимента исследовали содержание K^+ и Na^+ в ткани почки (методом пламенной фотометрии) и тканевое содержание воды (высушиванием в течение суток при 100—110 °С).

Статистическую обработку полученного цифрового материала проводили по методу Стьюдента и методом корреляционного анализа. Достоверность разницы результатов в группах определяли с использованием критерия t .

Перфузия почек раствором с ДМСО приводила к прогрессивному накоплению криопротектора в паренхиме органа. Однако скорость накопления в различные периоды насыщения была неодинаковой (рис. 1). Во время насыщения почек при температуре 18 °С скорость поглощения ДМСО прогрессивно увеличивалась. Время достижений максимальных значений скорости зависело от начальных значений потока перфузии. При высоких значениях потока (0,32—

1,12 мл/мин/г) максимальная скорость накопления ДМСО отмечена уже с 20-й мин перфузии и держалась на этом уровне до 35-й мин. При низких значениях потока перфузата (0,05—0,22 мл/мин/г) скорость поглощения ДМСО возрастала медленнее и достигала максимальных значений к 35-й мин перфузии, то есть практически к концу периода увеличения концентрации ДМСО в притекающем перфузате. Максимальные значения скорости в 1-й и 2-й сериях опытов достоверно не различались между собой, составляя $13,7 \pm 1,4$ и $10,9 \pm 2,6$ мг ДМСО/мин/г. В более поздние сроки происходило быстрое снижение скорости поглощения ДМСО с достижением равновесного состояния между почкой и перфузатом через 60 мин.

В опытах с проведением перфузии при 8 °С четко выявилась фазность поглощения ДМСО почкой, особенно ярко выраженная в 1-й серии, где начальный поток перфузата был в пределах 0,21—0,97 мл/мин/г. В этих экспериментах зарегистрировано три периода ускоренного накопления ДМСО, сменяющихся периодами замедления накопления (в интервале времени 50—60 мин отмечено даже выведение некоторого количества ДМСО из почки в перфузат). Во 2-й серии опытов (начальный поток перфузии — 0,08—0,16 мл/мин/г) первый и последний периоды усиленного поглощения

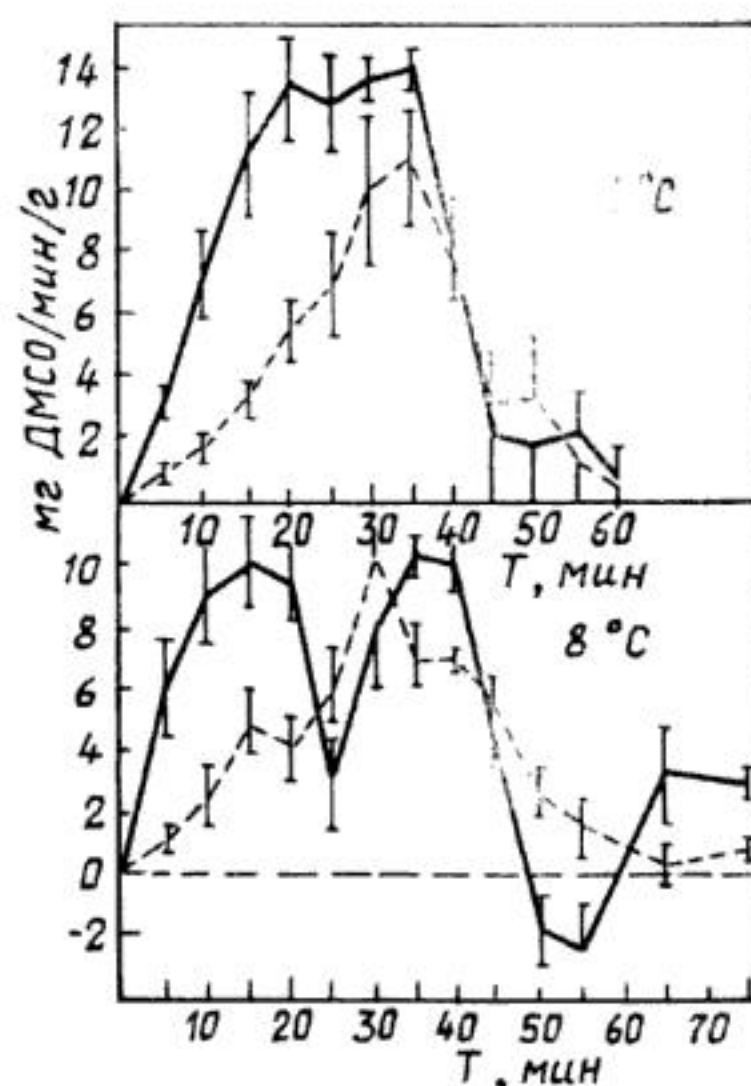


Рис. 1. Влияние температуры и потока перфузии на динамику скорости накопления ДМСО в почке крысы при ее насыщении 15 %-ным ДМСО: — опыты с высокой объемной скоростью перфузии, ---- опыты с низкой объемной скоростью перфузии

ДМСО были слабо выражены, а второй период был растянут во времени по сравнению с экспериментами 1-й серии; длительность этого периода в 1-й и 2-й сериях опытов составила 20 и 45 мин соответственно. Максимальные значения скорости поглощения ДМСО почкой в обоих случаях были примерно одинаковы, составляя $10,2 \pm 0,7$ и $10,5 \pm 0,7$ мг ДМСО/мин/г соответственно.

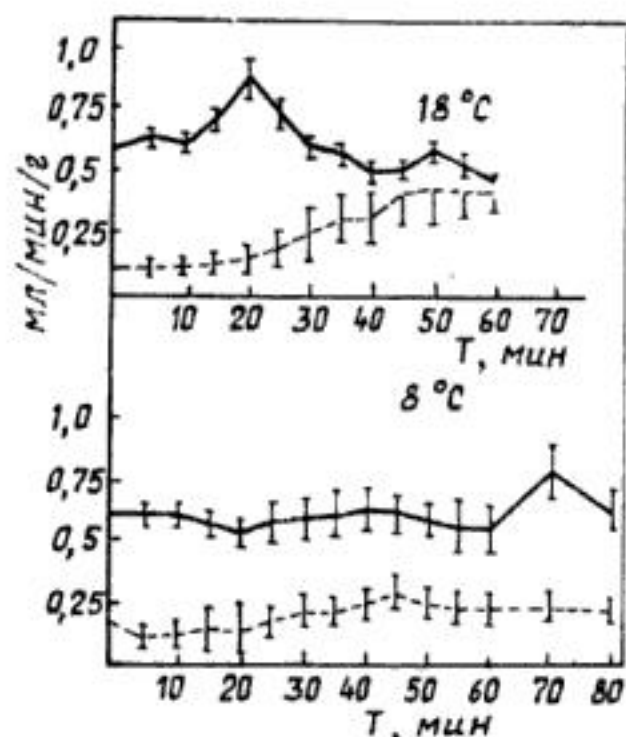


Рис. 2. Динамика потока перфузии почек крыс при насыщении 15 %-ным ДМСО в различных температурных условиях: — опыты с высокой объемной скоростью перфузии; --- опыты с низкой объемной скоростью перфузии

значения величин объемной скорости перфузии в 1-й и 2-й сериях достоверно не различались.

Изменения потока перфузии в процессе насыщения почек криопротектором при 8 °С были менее выражены, чем при температуре 18 °С. В 1-й серии опытов отмечено лишь некоторое увеличение потока перфузии в конце процесса насыщения и по времени оно совпадало с 3-м периодом ускоренного накопления ДМСО в почке. В опытах 2-й серии отмечалось незначительное уменьшение потока перфузата. При этом его значения в течение всего периода насыщения оставались достоверно более низкими, чем в опытах 1-й серии.

Влияние начальной величины объемной скорости перфузии проявлялось не только в отношении динамики проникновения ДМСО в паренхиму почки, но и в отношении общего количества ДМСО, накапливающегося в органе за весь период перфузии. Оказалось, что в 1-й серии опытов тканевое содержание криопротектора в конце перфузии 15 % ДМСО было достоверно выше, чем во 2-й, причем это различие проявлялось вне зависимости от температуры, при которой проводили перфузию. Так, при 18 °С накапливалось 436 ± 31 (1-я серия), 256 ± 28 (2-я серия) мг ДМСО/г ткани, а при 8 °С накапливалось соответственно 463 ± 47 и 266 ± 21 мг ДМСО/г.

Корреляция между величиной начальной объемной скорости перфузии и количеством накопившегося в почке криопротектора была выявлена и при анализе отдельных экспериментов в 1-й серии опытов, тогда как во 2-й серии такой корреляции не было выявлено (рис. 3).

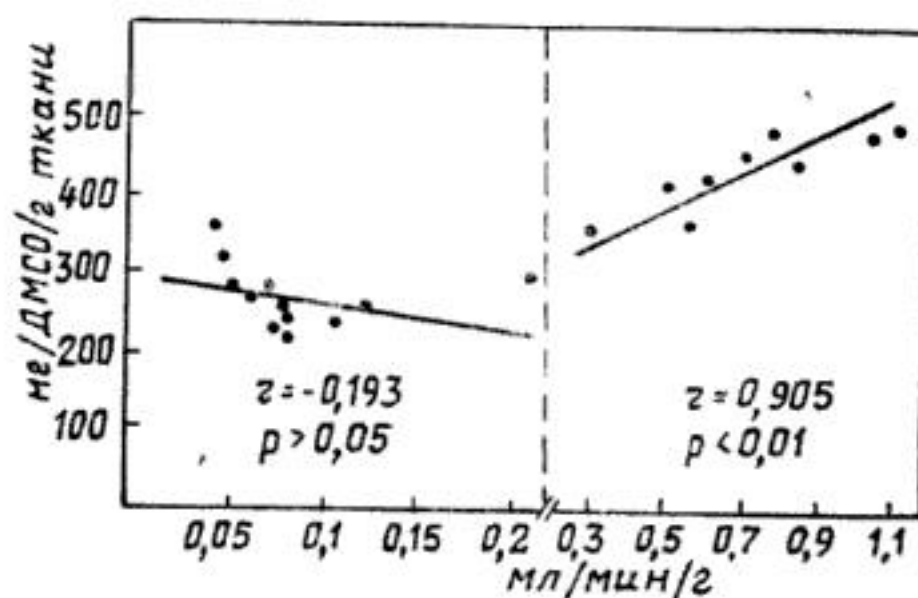


Рис. 3. Корреляция между начальной объемной скоростью перфузии и количеством ДМСО, поглощенного почкой из перфузата

Оценка изменений показателей метаболизма почек после криовоздействия выявила, что если насыщение почки криопротектором и его удаление из органа проводили при 18 °С, криповреждение в целом было менее выражено, чем в случае, когда перфузию проводили при 8 °С (табл.). При более низкой температуре в большей степени уменьшалось тканевое содержание K^+ , больше накапливалось Na^+ , более значительной была потеря белка, вымываемого из почки перфузатом в первые 5 мин перфузии после отогрева. Однако выход ЛДГ в перфузат был менее выражен в экспериментах, где перфузию проводили при 8 °С.

Влияние температуры и объемной скорости перфузии на показатели степени криповреждения почек крысы

Серия опытов	Температура перфузии, °С	Тканевое содержание электролитов, мэкв/кг сух. массы		Отек, %	Выход белка в перфузат в первые 5 мин после отогрева, мкг/мин/г сух. массы	Выход ЛДГ в перфузат, МЕ/мин/г сух. массы		
		K^+	Na^+			5 мин после отогрева	30 мин после отогрева	90 мин после отогрева
1-я	18	152 ± 12	587 ± 25	$57,4 \pm 5,3$	667 ± 51	$29,4 \pm 4,2$	$4,1 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,1$
	8	127 ± 6^a	747 ± 28^a	$61,0 \pm 3,1$	1391 ± 129^a	$19,9 \pm 2,3^a$	$2,1 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,1$
2-я	18	198 ± 16	603 ± 31	$47,4 \pm 4,2$	605 ± 58	$22,5 \pm 2,1$	$2,4 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1$
	8	$101 \pm 7^{a, b}$	$850 \pm 43^{a, b}$	$45,7 \pm 2,8^b$	554 ± 56^b	$9,9 \pm 1,2^{a, b}$	$1,8 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2^a$

Примечание. Тканевое содержание электролитов в интактных почках: K^+ — 371 ± 13 мэкв/кг сух. массы, Na^+ — 187 ± 7 мэкв/кг сух. массы; а — различия между сериями опытов, проведенных при разной температуре, достоверны; б — различия между 1-й и 2-й сериями опытов достоверны.

Начальная величина объемной скорости перфузии также оказывала влияние на изменение некоторых показателей степени криповреждения. Во 2-й серии опытов, проводимых при 8 °С, отмечены достоверно более низкие значения отека органа, а также уменьшение выхода ЛДГ и вымывания белка из почки перфузатом в первые 5 мин перфузии.

На основании полученных данных о динамике накопления ДМСО в почке крысы в различных условиях можно сделать заключение, что скорость этого процесса зависит как от доставки криопротектора к тканям органа, так и от проницаемости клеточных мембран для этого соединения. В начальный период перфузии возрастание скорости поглощения ДМСО почкой, вероятнее всего, связано с увеличением концентрации криопротектора в притекающем к органу перфузате. Однако при высокой объемной скорости перфузии (условия избыточной доставки криопротектора тканям почки) через 20 мин при 18 °С или 10 мин при 8 °С скорость накопления ДМСО в органе не увеличивается, несмотря на продолжающееся возрастание концентрации ДМСО в притекающем к почке растворе. Стабильные значения скорости поглощения ДМСО с 20-й по 35-ю мин перфузии при 18 °С (13,1—14,0 мг ДМСО/мин/г), видимо, характеризуют максимальную проникающую способность ДМСО через клеточные мембраны. В условиях перфузии при 8 °С значение максимальной проникающей способности ДМСО было несколько ниже — 10,2—10,9 мг ДМСО/мин/г.

В опытах, когда насыщение почки криопротектором проводили при 8 °С, удалось четко зарегистрировать фазность накопления ДМСО в почке. Подобная динамика была выявлена при насыщении ткани поджелудочной железы глицерином и ДМСО при 0 °С [4].

Наличие нескольких максимумов поглощения ДМСО можно объяснить разделением во времени процессов насыщения внеклеточного и внутриклеточного пространства почки, причем 1-й максимум, возможно, соответствует накоплению ДМСО преимущественно во внеклеточном секторе, а 2-й — преимущественно во внутриклеточном секторе. Причина кратковременного

выведения ДМСО из почки в перфузат на 50—60-й мин перфузии (отрицательные значения скорости накопления ДМСО) остается неясной. Можно полагать, что более раннее насыщение криопротектором внеклеточного пространства связано с относительно низкой исходной проницаемостью цитоплазматической мембраны клеток почки для ДМСО. Подтверждения такой точки зрения имеются в работе [5], где показано, что при насыщении почки кролика 3 М ДМСО при температуре 10 °С криопротектор до 60-й мин перфузии практически не проникал во внутриклеточное пространство, а с 60-й по 75-ю мин проникновение ДМСО внутрь клетки существенно усиливалось. В процессе контакта мембраны с ДМСО, накопившимся во внеклеточном пространстве, видимо, происходит повышение ее проницаемости для криопротектора за счет взаимодействия молекул ДМСО с белками или липидами, входящими в состав мембраны. Модификация проницаемости клеточных мембран протекает более быстро при 18 °С и замедлена при 8 °С, поэтому разграничение процессов насыщения вне- и внутриклеточного пространства может быть более выраженным лишь в условиях более глубокой гипотермии. Зависящее от температуры влияние ДМСО на проницаемость клеточных мембран для криопротекторов отмечено также в работе [1].

С температурозависимым торможением диффузионных и транспортных процессов связаны более стабильные значения потока перфузии почек в процессе их насыщения криопротектором. Увеличение потока перфузии в этих условиях, возможно, связано с увеличением суммарного просвета микроциркуляторного русла органа за счет дегидратации и уплощения клеток эндотелия и всей сосудистой стенки, которое обусловлено преобладанием скорости диффузии воды через клеточную мембрану над скоростью проникновения ДМСО в клетку. Особенно выражен этот процесс в опытах, где перфузию проводили при 18 °С при высоком потоке перфузата. Последующее снижение объемной скорости перфузии связано, по-видимому, с восстановлением объема эндотелиальных клеток за счет ускорения проникновения ДМСО в клетку и частичной ее регидратацией. В экспериментах с низкой начальной скоростью перфузии на динамику этого показателя, вероятно, влияет и сосудистый спазм, развивающийся при выделении органа, который постепенно ликвидировался в процессе перфузии. В экспериментах, где перфузию проводили при 8 °С, поток перфузата достоверно не менялся, что, с одной стороны, свидетельствовало о большей сбалансированности перераспределения воды и ДМСО между сосудистой стенкой и перфузатом, а с другой, — о длительном сохранении сосудистого спазма во 2-й серии опытов.

Труднообъяснимым фактом является уменьшение суммарного количества накопленного в почке ДМСО в опытах с низким начальным потоком перфузии. Очевидно, что это не связано с «недонасыщением» почки, так как к концу перфузии во всех опытах поглощение криопротектора из перфузата отсутствовало, то есть происходила полная эквilibрация ткани почки с перфузатом. Возможно, что этот факт каким-то образом связан с составом использованного нами раствора. В работе [3] приведены данные о различном количестве ДМСО, накопившегося в срезах почки, инкубированных в растворах разного ионного состава. При этом больше криопротектора накапливалось в том случае, если использовали раствор деполяризованного типа, близкий по соотношению K^+ и Na^+ к использованному нами раствору. Видимо, деполяризация клеточной мембраны способствует избыточному проникновению ДМСО в клетку. В работе [2] было также показано, что клетка не остается пассивной к деполяризующему действию консервирующего раствора, а частично восстанавливает свой мембранный потенциал. По всей видимости, в условиях высокой объемной скорости перфузии клетка в меньшей степени способна к реполяризации клеточной мембраны, и более глубокая деполяризация приводит к более значительному накоплению ДМСО в органе.

После выявления существенных различий в параметрах процесса насыщения почек раствором криопротектора в зависимости от разных температурных условий и величины объемной скорости перфузии, представлялось целесообразным исследовать, каким образом указанные различия отражаются на эффективности защиты органа от низкотемпературного повреждения. Оказалось, что, судя по таким показателям, как тканевое содержание электролитов и выход белка из почки в перфузат после отогрева, процесс насыщения и удаления криопротектора целесообразнее проводить при 18 °С. Однако выход ЛДГ из клеток почки в перфузат в этих условиях был более высоким, чем при перфузии в условиях 8 °С. Очевидно, что развивающееся повреждение клеток почки связано как с токсическим действием ДМСО, так и с влиянием самой гипотермии. Оба типа повреждения реализуются через разные механизмы, а их выраженность зависит от температуры перфузии: по-видимому, при более высокой температуре (18 °С) преобладает токсическое действие криопротектора, а при более низкой (8 °С) — более выражено повреждающее действие гипотермии. Низкие значения потока перфузата уменьшали выраженность изменений ряда показателей (отек, выход ЛДГ) или не влияли на них, но не усугубляли степень криоповреждения.

Таким образом, в заключение можно сделать следующие выводы:

— при насыщении изолированной почки крысы 15%-ным ДМСО динамика накопления криопротектора зависит как от температурных условий, так и от величины объемной скорости перфузии;

— процесс насыщения почки крысы ДМСО протекает фазно, что, видимо, отражает неодновременность насыщения вне- и внутриклеточного пространства. Разделение этих процессов во времени более выражено при 8 °С;

— низкие значения объемной скорости перфузии в начальный период насыщения почки криопротектором не снижают эффективности криозащиты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кнубовец Т. Л., Зинченко В. Д., Сибельдина Л. А. Исследование действия диметилсульфоксида на мембраны эритроцитов человека методом ^{31}P -ЯМР // Биологические мембраны. — 1987. — 4, № 1. — С. 84—89.
2. Онищенко Н. А., Лубяко А. А. Противоишемическая защита миокарда кардиоплегическими растворами // Вестник АМН СССР. — 1985. — № 4. — С. 40—47.
3. Clark P., Fahy G. M., Karow A. M. Factors influencing renal preservation. 1. Effects of three vehicle solutions and the permeation kinetics of three cryoprotectants assessed with rabbit cortical slices // Cryobiology. — 1984. — 24. — P. 260—273.
4. Mazur P., Rajotte R. V. Permeability of the 17-day fetal rat pancreas to glycerol and dimethylsulfoxide // Cryobiology. — 1981. — 18. — P. 1—16.
5. Segal N. B., Guttman F. M. Kinetics of permeation and intracellular events associated with Me_2SO permeation of rabbit kidneys during preservation at +10 °C // Cryobiology. — 1982. — 19. — P. 41—49.

НИИ трансплантологии и
искусственных органов, г. Москва

Поступила 23.03.87

V. I. KIRPATOVSKY, O. B. KOLOKOLOVA

THE INFLUENCE OF TEMPERATURE AND PERFUSATE FLOW RATE ON THE DYNAMICS OF SATURATION AND ON THE CRYOPROTECTIVE EFFICIENCY OF ISOLATED RAT KIDNEYS WITH DIMETHYL SULFOXIDE

Research Institute for Transplantology and Artificial Organs, Moscow

The dynamics of DMSO accumulation in renal tissue perfused with 15 % DMSO at different temperatures (18 or 8 °C) as well as the parameters of cell metabolism (the contents of K^+ and Na^+ in tissue, the extent of oedema, release of protein and LDH into the perfusate) after cryopreservation to —50 °C were studied on 26 white rats. The accumulation of DMSO was estimated by its uptake from perfusate. The rate of DMSO accumulation appeared to depend both on the perfusion temperature and flow rate.

КОНСЕРВАЦИЯ КУЛЬТУРЫ *ESCHERICHIA COLI* HB 101, НЕСУЩЕЙ РЕКОМБИНАНТНУЮ ПЛАЗМИДУ С ФРАГМЕНТОМ ДНК ЧЕЛОВЕКА

Исследовано влияние различных методов консервации (лиофилизация, низкотемпературное замораживание на носителе и криоконсервация) на жизнеспособность и генетическую стабильность культуры *Escherichia coli* HB 101, несущей рекомбинантную плазмиду с фрагментом ДНК человека. Генетическую стабильность оценивали по сохранению селективных маркеров устойчивости к антибиотикам и стабильности сайтов рестрикции в рекомбинантной ДНК. Показано, что оптимальным режимом хранения, обеспечивающим высокую жизнеспособность и генетическую стабильность, является криоконсервация и хранение при -196°C .

Успешное развитие методологии рекомбинантных ДНК сегодня трудно переоценить. Эта новая отрасль биологической науки все шире находит свое практическое применение в самых разнообразных областях. Основную ценность представляют индивидуальные специфические фрагменты ДНК (клоны), введенные в состав вспомогательных молекул-векторов, которые способны автономно реплицироваться и во многих случаях функционировать в бактериальных и дрожжевых клетках. Число ценных с практической точки зрения клонов стремительно увеличивается. В связи с этим возникает вопрос об оптимизации условий длительного хранения таких клонов без потери или изменения их нативных свойств.

Данные о длительном хранении микроорганизмов, содержащих индивидуальные плазмиды или рекомбинантные ДНК, немногочисленны [5, 6, 8]. Целью настоящей работы являлось изучение влияния различных условий длительного хранения рекомбинантного клона *pHS35*, включающего фрагменты генома человека, на его жизнеспособность и генетическую стабильность при различных методах консервации.

В качестве объекта исследования был выбран рекомбинантный клон *pHS35*, включающий *Pst*-I-фрагмент геномной ДНК человека длиной 990 пар нуклеотидов, встроенный в плазмиду *pKN 01* [7]. Рекомбинантная ДНК введена в клетки *E. coli* HB 101 — одного из наиболее часто используемых в генно-инженерных работах штамма [4]. В составе клонированного *Pst*-I-фрагмента ДНК человека находятся две последовательности A_{1n} -семейства повторов [1].

Для консервации клона в работе были использованы методы лиофилизации, криоконсервации и низкотемпературного замораживания на носителе [3]. Бактериальную культуру выращивали в стандартных условиях до ранней стационарной фазы роста. Для лиофилизации и криоконсервации 0,2 мл суспензии клеток плотностью 10^9 — 10^{11} клеток/мл в защитных средах помещали в ампулы из нейтрального стекла типа Л-80.

Лиофилизацию культуры проводили на центробежно-сублимационной установке фирмы «Эдвардс» (Англия) при температуре рефрижератора $t_p = -45^{\circ}\text{C}$, температуре сублиматора $t_c = 22^{\circ}\text{C}$ и вакууме 100 мк рт. ст. до остаточной влажности 2—2,5 %. Защитными средами при лиофилизации служили 10 %-ное сепарированное молоко и СЖА (10 % сахарозы, 1,5 % желатины, 0,1 % агар-агара). Лиофилизированные препараты запаивали в ампулах под вакуумом и хранили при 4°C без доступа света. Для регидратации культуры использовали стерильную водопроводную воду при комнатной температуре.

Криоконсервацию культуры осуществляли как ультрабыстрым способом (со скоростью охлаждения $400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) путем непосредственного погружения в жидкий азот ($t = -196^{\circ}\text{C}$), так и с использованием предварительного программного замораживателя ЗПБ (производства ИПКиК АН УССР, Харьков) с медленными скоростями охлаждения: программа 1 — охлажде-

ние до температуры -15°C со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и далее до температуры -140°C со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. После достижения температуры -140°C ампулы с замороженной культурой погружали непосредственно в жидкий азот. В качестве криопротекторов использовали 10 %-ный раствор глицерина в дистиллированной воде, 12 %-ный раствор сахарозы, а также раствор, содержащий 5 % диметилсульфоксида и 8 % глюкозы. Криоконсервированные культуры хранили при температуре -196°C . Для восстановления культуры после криоконсервации использовали быстрое оттаивание в теплообменном размораживателе при температуре 37°C с покачиванием в течение 1 мин для улучшения теплообмена.

Низкотемпературное замораживание культуры осуществляли путем нанесения густой, охлажденной до 4°C суспензии клеток в 10 %-ном растворе глицерина на предварительно обезвоженный силикагель, который рассыпали в стерильные ампулы из полипропилена с герметично навинчивающимися крышками (фирмы «Нунк», Дания). Ампулы с культурой помещали на хранение в холодильники с температурой -70°C , контрольный вариант культуры хранили при 4°C .

Эффективность использованных методов консервации оценивалась жизнеспособностью клеток и их генетической стабильностью в течение 2 лет наблюдений. Жизнеспособность определялась высевом культуры после хранения на агаризованную питательную среду с последующим подсчетом числа выросших колоний. Для каждого варианта консервации культуры использовали не менее 3 ампул, из каждой ампулы проводили параллельный посев на 3 чашки Петри с питательной средой. При низкотемпературном замораживании на носителе жизнеспособность культуры определяли качественным методом путем оценки наличия роста на агаризованной питательной среде.

Генетическую стабильность оценивали по сохранению клонами селективных признаков устойчивости к антибиотикам, обусловленных маркерными генами в плазмидной ДНК [7], и по сохранению нативной структуры рекомбинантными молекулами. Выделение плазмидой ДНК, расщепление ее рестриктазами и электрофоретический анализ рестриктных фрагментов ДНК проводили общеизвестными методами молекулярной генетики [2].

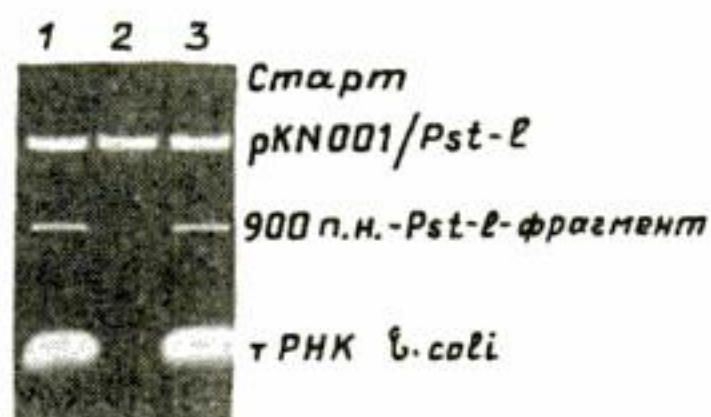
Известно, что в некоторых случаях при клонировании происходят частые рекомбинационные события, приводящие в результате к потере или значительному изменению первичной структуры клонированной последовательности ДНК. Высокая частота рекомбинации может быть обусловлена особенностями структуры как вектора клонирования (например, в случае фага M13 и его производных), так и самого клонированного фрагмента. Так, сравнительно частые рекомбинации отмечают в случае повторяющихся фрагментов генома эукариот [2]. В частности, по некоторым данным опыты по клонированию повторов ДНК A_{1n} -семейства свидетельствуют о высокой нестабильности сохранения этого типа последовательностей в векторах [1]. Поэтому в качестве модельного объекта с наибольшим риском рекомбинации и был выбран рекомбинантный клон *pHS 35*, несущий две копии A_{1n} -последовательности.

Сравнительный анализ жизнеспособности культуры, законсервированной и хранящейся при разных условиях (табл.), показывает предпочтительность использования метода криоконсервации для длительного хранения клеток. При криоконсервации число сохраняющих жизнеспособность клеток выше, чем при лиофилизации, примерно на порядок. Потеря жизнеспособности в процессе хранения после лиофилизации более значительна, чем при криоконсервации. Через 2 года хранения жизнеспособность лиофилизированной культуры снижается в 20—30 раз, в то время как для криоконсервированных клеток снижение жизнеспособности составляет 2—5 раз (относительно контроля до консервации). Исключение составляет вариант с использованием в качестве криопротектора диметилсульфоксида с глюкозой.

Метод консервации и режим	Жизнеспособность клеток, % к контролю		
	После консервации	2 мес	2 года
Криоконсервация			
Ультрабыстрый, 10 %-ный глицерин	31—78*	15—29	17—26
Программный, 10 %-ный глицерин	50—67	26—34	16—20
Ультрабыстрый, 12 %-ная сахароза	51—61	7—17	9—16
Программный, 12 %-ная сахароза	16—26	10—29	7—14
Ультрабыстрый, 5 %-ный ДМСО + 8 %-ная глюкоза	19—26	12—13	1,5—1,9
Программный, 5 %-ный ДМСО + 8 %-ная глюкоза	9—19	10—15	
Вода (контроль)	12—13	6—7	0,2—0,3
Лиофилизация			
С предварительным центрифугированием			
Молоко	4—12	1,5—1,9	1,1—1,2
СЖА	17—25	1,8—5,9	0,8—1,0
Вода (контроль)	4—5	0,0	0,0

Примечание. * — Значения жизнеспособности клеток представлены в виде граничных значений доверительных интервалов средних ($P_{0,95}$) из 9 проб. Расчет проведен для малых выборок.

Наиболее высокая степень выживаемости обнаружена при криоконсервации культуры с использованием в качестве криопротектора 10 %-ного раствора глицерина. Этот результат полностью соответствует литературным



Пример электрофореграммы плазмидной ДНК клона *pHS* 35, выделенной щелочным методом и рестриktированной рестриктазой *Pst*-I: 1 — лиофилизация с использованием в качестве протектора сепарированного молока, 2 — плазмида *pKN* 0,01, 3 — лиофилизация с использованием в качестве протектора СЖА

и не содержащих антибиотик, показало 100 %-ное наличие маркера устойчивости к тетрациклину при всех исследованных методах консервации культуры.

С другой стороны, анализ длин рестриктных *Pst*-I-фрагментов плазмидной ДНК, выделенной из выросших после хранения колоний клона *pHS* 35, в агарозном геле (рис.) показал полную идентичность структуры рекомбинантной ДНК во всех вариантах контроля. Эта структура — наличие 2 сайтов рестрикции *Pst*-I, длина векторной молекулы (около 12 тыс. пар нуклеотидов) и длина вставочного *Pst*-I-фрагмента (990 пар нуклеотидов) — полностью соответствует определенной ранее [1].

сведениям о высокой эффективности криопротекторных свойств глицерина [3]. При хранении культуры на носителе при температуре -70°C клетки сохраняли жизнеспособность в течение 2 лет наблюдений.

Генетическую стабильность клона при хранении различными методами определяли по 2 показателям: наличию (сохранению) селективного маркера устойчивости к тетрациклину — признаку, кодируемому геном в составе векторной плазмиды, и сохранению сайтов рестрикции *Pst*-I в рекомбинантной ДНК и исходной длины клонированного в векторе *Pst*-I-фрагмента ДНК человека.

Параллельное определение титра жизнеспособных клеток в каждом варианте опыта на питательных средах, содержащих

Таким образом, все исследованные в данной работе методы консервации могут быть рекомендованы для длительного хранения клонов без потери ими маркерных свойств. Наиболее простым способом является низкотемпературное замораживание на носителях. Однако наилучшим методом длительного хранения рекомбинантных клонов с минимальным снижением их жизнеспособности является криоконсервация с использованием в качестве криопротектора 10 %-ного раствора глицерина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайцев И. З., Гиндилис В. М., Шапиро Ю. А., Яковлев А. Г. Структурный анализ $A_{1\text{H}}$ -содержащего фрагмента ДНК с дисперсным распределением в хромосомах человека // Генетика.— 1984.— 20, № 5.— С. 738—745.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М. : Мир, 1984.— 282 с.
3. Сидякина Т. М. Консервация микроорганизмов.— Пущино : ОНТИ НЦ БИ АН СССР.— 1985.— 63 с.
4. Bolivar F., Backman K. Plasmids of *E. coli* as cloning vectors // Methods Enzymol.— 1979.— N 68.— P. 245.
5. Breese M. D., Sharp R. J. Storage of *E. coli* strains containing plasmid DNA in liquid nitrogen // Journ. Appl. Bacteriol.— 1980.— N 48, P. 63—68.
6. Kaneko J., Mikata K., Banno I. Maintenance of recombinant plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* after L-drying. // I. F. O. Res. Commun.— 1985.— N 12.— P. 78—82.
7. Schumann W., Lögl Ch. Plasmid vectors derived from phage Mu allow direct selection of transformants containing cloned Hind III and Pst-I fragments // Molec. Gen. Genet.— 1980.— N 179.— P. 369—372.
8. Sharp R. J. The preservation of genetically unstable microorganisms and the cryopreservation of fermentation seed cultures // Adv. Biotechnol. Processes.— 1984.— 3.— P. 81—109.

Всес. научный центр психического здоровья
АМН СССР, г. Москва,

Поступила 10.12.86

Всес. коллекция микроорганизмов Ин-та
биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР,
г. Пущино

V. E. GOLIMBET, T. M. SIDYAKINA, A. G. YAKOVLEV

THE PRESERVATION OF *ESCHERICHIA COLI* HB 101 CULTURES CONTAINING A RECOMBINANT PLASMID WITH THE HUMAN DNA FRAGMENT

All-Union Scientific Center of Psychic Health of the USSR Academy of Medical Sciences, Moscow; All-Union Collection of Microorganisms of the Institute for Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the USSR Academy of Sciences, Pushchino

The influence of different preservation methods such as lyophilization, freezing on carriers, and cryopreservation on the viability and genetic stability of *E. coli* HB 101 cultures containing a recombinant plasmid with the human DNA fragment was studied. The genetic stability was estimated by monitoring the maintenance of selective markers of the antibiotic resistance and stability of restriction sites in recombinant DNA. Cryopreservation and storage at -196°C appeared to be the optimum method providing a high viability and genetic stability.

УДК 57.043

Т. Ф. Стрибуль, Т. К. Лесив

ВЛИЯНИЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЙ НА СЕМЕНА ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

Исследуется влияние различных режимов охлаждения до -196°C и отогрева на семена салата, укропа, лука, томатов. На основании анализа показателей всхожести семян и биометрии проростков делается предположение о стимулирующем влиянии низких температур на семена исследованных культур, проявляющемся на этапе прорастания.

Исследования по предотвращению потери генетической информации растений являются необходимым условием при решении проблемы сохранения генетической стабильности семян коллекционного фонда — основного источника селекционных программ. Эти исследования в качестве первоочередной задачи включают разработку методов консервирования генофонда растений при одновременном определении жизнеспособности и качества деконсервированного материала [2, 6, 7, 8].

Основными показателями жизнеспособности семян, как правило, считают величины энергии прорастания и всхожести. Качество деконсервированного материала оценивают, например, количеством ненормальных проростков, массой корней и надземной части проростков, а также высотой проростков [3, 5].

Таблица 1

Влияние режимов охлаждения и отогрева на всхожесть семян салата, укропа, лука

Культура	Партия семян	Скорость охлаждения, °С/мин	Скорость отогрева, °С/мин	Всхожесть, %
Салат	1-я	Контроль	60	15 ± 3, n = 4
		700		30 ± 3*, n = 6
	2-я	Контроль	620	90 ± 2, n = 4
		7		91 ± 2, n = 6
Укроп	1-я	Контроль	60	61 ± 1, n = 6
		700		48 ± 2*, n = 5
	2-я	Контроль	620	37 ± 2, n = 4
		2		39 ± 3, n = 5
Лук	1-я	Контроль	60	85 ± 2, n = 5
		700		86 ± 2, n = 5
	2-я	Контроль	620	69 ± 1, n = 4
		22		85 ± 1*, n = 5
		700	620	89 ± 3*, n = 4

Примечание. * — Различие достоверно по отношению к контролю, $p = 0,05$.

различные режимы замораживания до -196°C и отогрева семян овощных культур и оценено влияние этих режимов и сроков посева после деконсервирования на всхожесть и биометрию проростков подвергнутых криовоздействию семян.

Объектом исследования служили семена урожая 1984 г. (1-я партия) и 1985 г. (2-я партия), полученные из фондов Укр.НИИ овощеводства и бахчеводства: салата (салат кочанный Львовский), укропа (укроп Пахучий), лука (лук Стригуновский носовский), томатов (томаты «Киевский-139»).

Для замораживания использовались полиэтиленовые конические ампулы емкостью $0,8\text{ см}^3$, которые закрывались герметически.

Криовоздействие на семена проводилось по 4 режимам. 3 из них — медленные, описываются экспоненциальной зависимостью изменения температуры от времени [1] и характеризуются следующими интегральными скоростями охлаждения (по камере замораживателя УОП-6) в интервале температур от 0°C до -60°C : $V_{\text{охл}_1} = 2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $V_{\text{охл}_2} = 7^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $V_{\text{охл}_3} = 22^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. 4-й режим — быстрый, осуществляемый непосредственным погружением контейнеров с семенами в жидкий азот, $V_{\text{охл}_4} = 700^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Конечная температура охлаждения для всех 4 режимов была равна -196°C .

При деконсервировании семян использовались режимы отогрева, характеризующиеся следующими интегральными скоростями в интервале температур от -10 до -160°C : $V_{\text{отогр}_1} = 60^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $V_{\text{отогр}_2} = 620^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Главной задачей исследований в этой области является, по меньшей мере, сохранение жизнеспособности материала на уровне исходного или ниже этого уровня в допустимых пределах. Однако в отдельных работах встречаются данные об улучшении показателей всхожести и энергии прорастания семян культурных растений после криовоздействия [3, 4, 6]. Этому явлению не уделялось должного внимания, поэтому целью настоящей работы является изучение стимулирующего действия низких температур на семена некоторых сельскохозяйственных культур. Были испытаны

$V_{\text{отогр}_1}$ достигалась при размораживании контейнеров с семенами на воздухе с $T = 20^\circ\text{C}$, $V_{\text{отогр}_2}$ — при отогреве в водяной бане 30°C .

Оценка сохранности семян определялась по показателям всхожести в лабораторных условиях. Измерялась также высота проростков, полученных на 6-й день с момента посева семян.

Проращивание семян как контрольных (незамораживаемых), так и деконсервированных производилось на увлажненной фильтровальной бумаге в чашках Петри при $T = 20^\circ\text{C}$ в темноте. Всхожесть семян оценивалась отношением количества проросших семян к количеству посеянных и выражалась в процентах. Каждое значение всхожести — это среднее значение из 4—6 повторностей (по 100 шт. семян в каждой). Всхожесть салата определялась на 10-й день проращивания, укропа — на 14-й день, лука — на 12-й день, томатов — на 10-й день (согласно ГОСТ 12038—66). Высота проростков оценивалась как среднее значение из 3—6 (как минимум) повторностей (по 10 проростков в каждой). Статистическая обработка результатов проводилась методом Фишера-Стьюдента.

Влияние низких температур на 1-ю партию семян проявилось в увеличении всхожести семян салата в 2 раза по сравнению с контролем, и уменьшении всхожести укропа на 20 %. Всхожесть лука не изменилась. Для 2-й партии семян применение как быстрых, так и медленных режимов охлаждения не изменило показателей всхожести салата и укропа, но увеличило на 23—28 % всхожесть лука (табл. 1). Эти данные позволяют сделать вывод о том, что эффект криовоздействия существенным образом зависит не только от природы семян, но и от условий их получения, поскольку 1-я и 2-я партии отличались по всхожести уже в контроле.

Анализ биометрических показателей (высоты проростков) криообработанных семян 2-й партии показал (табл. 2), что криовоздействие, практически не влияя на всхожесть, повышение которой наблюдалось только у лука, стимулировало рост проростков салата, лука и томатов. Исключение составили семена укропа и лука, у проростков которых наблюдалось небольшое угнетение роста при быстром режиме охлаждения. Следует отметить, что для укропа и лука предпочтительнее медленные режимы охлаждения, а для салата — быстрые.

Во всех описанных выше экспериментах семена, как правило, высаживались на проращивание на 3-й день после деконсервирования. В табл. 3

Таблица 2
Биометрия проростков и всхожесть семян (2-й партии), подвергшихся криовоздействию

Культура	Скорость охлаждения, $^\circ\text{C}/\text{мин}$	Скорость, отогрева, $^\circ\text{C}/\text{мин}$	Всхожесть, %	Высота проростков, см
Салат	Контроль		90 ± 3 $n = 4$	$7,1 \pm 0,2$ $n = 7$
	2	620	91 ± 1 $n = 8$	$8,0 \pm 0,4^*$ $n = 7$
	7	620	90 ± 1 $n = 8$	$7,6 \pm 0,4$ $n = 6$
	700	620	88 ± 2 $n = 12$	$8,5 \pm 0,2^*$ $n = 14$
	700	60	88 ± 3 $n = 10$	$8,6 \pm 0,2^*$ $n = 14$
Укроп	Контроль		37 ± 2 $n = 4$	$7,6 \pm 0,4$ $n = 8$
	2	620	39 ± 3 $n = 8$	$7,0 \pm 0,6$ $n = 3$
	7	620	37 ± 2 $n = 11$	$7,1 \pm 0,3$ $n = 6$
	700	620	41 ± 3 $n = 11$	$6,6 \pm 0,2^*$ $n = 14$
	Контроль		69 ± 1 $n = 4$	$8,0 \pm 1,0$ $n = 3$
Лук	2	620	$82 \pm 1^*$ $n = 12$	$9,9 \pm 0,6^*$ $n = 9$
	7	620	$78 \pm 2^*$ $n = 13$	$10,3 \pm 0,8^*$ $n = 7$
	700	620	$78 \pm 2^*$ $n = 6$	$5,1 \pm 0,2^*$ $n = 9$
	700	60	$77 \pm 2^*$ $n = 14$	$8,9 \pm 0,3$ $n = 14$
	Контроль		93 ± 2 $n = 4$	$8,5 \pm 0,5$ $n = 6$
Томаты	2	60	92 ± 1 $n = 8$	$11,3 \pm 1,3^*$ $n = 4$
	7	60	96 ± 1 $n = 10$	$11,9 \pm 1,0^*$ $n = 8$

Примечание. * — Различие достоверно по отношению к контролю, $p = 0,05$.

Влияние сроков посева после деконсервирования ($V_{охл} = 700\text{ }^{\circ}\text{C/мин}$, $V_{отогр} = 620\text{ }^{\circ}\text{C/мин}$) на всхожесть семян и биометрию проростков

День посева после деконсервирования	Салат		Укроп		Лук	
	Всхожесть, %	Высота проростков, см	Всхожесть, %	Высота проростков, см	Всхожесть, %	Высота проростков, см
Контроль	90 ± 3 $n = 4$	$7,1 \pm 0,3$ $n = 7$	37 ± 2 $n = 4$	$7,6 \pm 0,4$ $n = 8$	69 ± 1 $n = 4$	$8,0 \pm 1,0$ $n = 3$
1	$84 \pm 2^*$ $n = 4$	$8,1 \pm 0,4^*$ $n = 4$	37 ± 2 $n = 4$	$4,8 \pm 0,6^*$ $n = 4$	$78 \pm 2^*$ $n = 6$	$5,1 \pm 0,2^*$ $n = 9$
4	—	—	$42 \pm 2^*$ $n = 5$	$6,4 \pm 0,6$ $n = 5$	$77 \pm 2^*$ $n = 4$	$9,7 \pm 0,6^*$ $n = 4$
8	92 ± 3 $n = 4$	$8,7 \pm 0,4^*$ $n = 5$	41 ± 3 $n = 4$	$7,7 \pm 0,5$ $n = 5$	$77 \pm 2^*$ $n = 4$	$8,6 \pm 0,4$ $n = 4$
14	87 ± 2 $n = 4$	$8,4 \pm 0,3^*$ $n = 4$	$44 \pm 4^*$ $n = 5$	$8,0 \pm 0,5$ $n = 4$	72 ± 3 $n = 4$	$8,2 \pm 0,3$ $n = 5$

Примечание. * — Различие достоверно по отношению к контролю, $p = 0,05$.

приведены показатели всхожести и биометрии деконсервированных семян, высаженных на 1-й, 4-й, 8-й, 14-й день после отогрева. Как следует из табл. 3, всхожесть семян салата, посеянных в 1-й день после деконсервирования, снижена, а при посеве в более поздние сроки после отогрева — приближается к контрольному уровню. Высота проростков криообработанных семян салата увеличена по сравнению с контролем независимо от срока хранения семян после оттаивания.

Семена укропа, посеянные в 1-й день после деконсервирования, имели всхожесть на уровне контроля, а, начиная с 4-го дня хранения после размораживания, всхожесть их увеличилась. При этом наблюдалось угнетение их роста при посеве в 1-й день после размораживания с последующим восстановлением данного показателя у семян с большими сроками хранения.

Повышение всхожести семян лука отмечено при посеве на 1-й — 8-й день после отогрева. Высота проростков снижена на 1 день, увеличена на 4-й день и приближается к контрольному уровню начиная с 8-го дня после деконсервирования семян.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о сложном влиянии криовоздействия на всхожесть семян и биометрические показатели проростков изученных овощных культур, которое зависит от скоростей охлаждения и отогрева, качества биоматериала и сроков его хранения после криообработки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новиков А. Н., Ткаченко С. И., Стрибуль Т. Ф., Рындин В. Ф. О возможности использования экспоненциальных режимов охлаждения при криоконсервировании биологических объектов // Биофизика. — 1985. — XXX. — Вып. 6. — С. 1042—1045.
2. Мануильский В. Д. Проблемы консервации генетических ресурсов растений // Криобиология. — 1987. — № 2. — С. 11—16.
3. Молодкин В. Ю. Хранение семян зерновых бобовых и технических культур при сверхнизких температурах // Научно-технический бюллетень ВИР. — 1984. — Вып. 144. — С. 36—40.
4. Молодкин В. Ю. Методы консервации семян культурных растений при низких и сверхнизких температурах : Автореф. дис. ... канд. с-х. наук. — Л. : Б.и. 1987. — 18 с.
5. Сытник К. М., Мануильский В. Д., Моргунов В. В., Ларченко Е. А. Наследственные изменения растений при действии ультранизких температур // Доклады АН УССР. — Сер. Б. — 1980. — № 9. — С. 80—82.
6. Федосенко В. А. Использование сверхнизких температур для длительного сохранения семян // Бюлл. ВИР. — 1978. — № 77. — С. 53—57.
7. Хорошайлов Н. Г., Жукова Н. В. Длительное хранение семян мировой коллекции ВИР // Бюлл. ВИР. — 1978. — № 77. — С. 8—16.

8. Stanwood P. C. Cryopreservation of Seed Germplasm for Genetic Conservation // Cryopreservation of Plant Cells and Organs. — Florida : CRC Press. — 1985. — P.199—226.

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

Поступила 12.04.88

Филиал УкрНИИ овощеводства и бахчеводства при львовской овощной
фабрике, г. Львов

T. F. STRIBUL, T. K. LESIV

THE EFFECT OF FREEZING ON VEGETABLE SEEDS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov; Branch of the Ukrainian Research Institute for Vegetable and Melon Growing Attached to the Vegetable Factory of Lvov, Lvov

The effects of different regimes of cooling to -196°C and thawing on lettuce, fennel onion, and tomato seeds were studied. A stimulating effect of low temperatures on the seeds which manifested itself at the germinating stage was suggested basing on the analysis of seed germinating capability and shoot biometry.

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

УДК 57.043 : 519.876.2

В. И. Резников, С. И. Ткаченко

ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕГО УСТРОЙСТВА, ИЗМЕРЯЮЩЕГО СКОРОСТИ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТОГРЕВА БИОМАТЕРИАЛОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ

Разработана физико-математическая модель реального дифференцирующего устройства (ДУ), осуществляющего точное измерение скорости процесса программного замораживания-оттаивания путем соответствующей обработки сигнала, пропорционального текущему значению температуры. Точность вычисления и измерения скорости составляет 0,1 %. Разработанная модель рекомендуется к применению в программных замораживателях биоматериалов.

Скорости замораживания и оттаивания оказывают существенное влияние на повышение уровня жизнеспособности клеток и понижение степени разрушения биологического материала [1, 2]. Для обеспечения выбранных в процессе экспериментов скоростей замораживания-оттаивания применяют специально разработанные в СКТБ с ОП ИПКиК АН УССР многопрограммные замораживатели, автоматически выполняющие любую из предусмотренных многоэтапных линейных программ.

Настоящая статья посвящена разработке физико-математической модели реального дифференцирующего устройства (ДУ), осуществляющего точное измерение скорости процесса программного замораживания-оттаивания путем соответствующей обработки сигнала, пропорционального текущему значению температуры.

Из существующих видов математических описаний для физико-математического (в дальнейшем для удобства — математического) моделирования ДУ был выбран детерминированный вид описания, строящийся на основе фундаментальных теоретических законов электродинамики, электротехники и физики, и применен изоморфный метод моделирования, устанавливающий полное поэлементное соответствие между математическим описанием и реальным дифференцирующим устройством, полученное в результате применения метода расчленения функциональной схемы ДУ на отдельные функциональные блоки (звенья).

Разработка и исследование математической модели дифференцирующего устройства производились согласно алгоритма функционирования ДУ, функциональная схема которого изображена на рис. 1. Рассматриваемая математическая модель ДУ описывает устройство дискретного действия, управляемое по двум каналам импульсами длительностью τ от генератора синхронизированных импульсов (ГСИ) с периодом следования синхроимпульсов T .

Наибольший интерес в математической модели ДУ представляют описания звена, создающего сигнал постоянной крутизны (рис. 2), и фазочувствительного демодулятора (рис. 3). С помощью этих звеньев реализуется в основном выбранный метод дифференцирования, основанный на получении и измерении разности двух сдвинутых по фазе на величину $(T/2 - \tau)$ сиг-

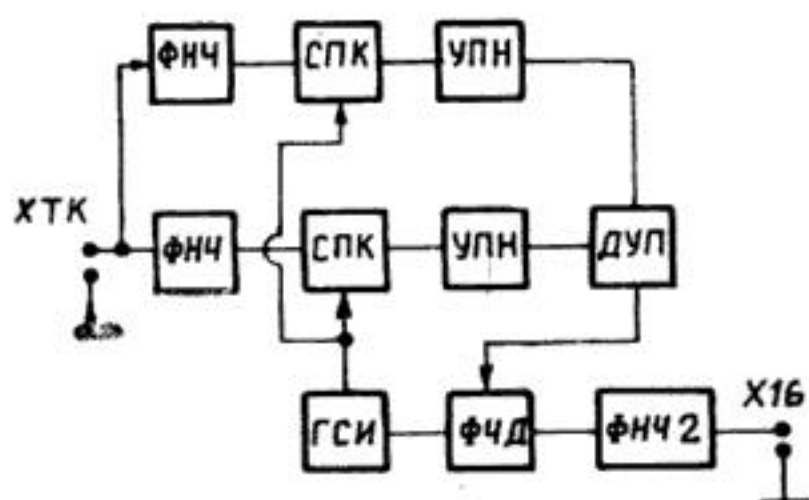


Рис. 1

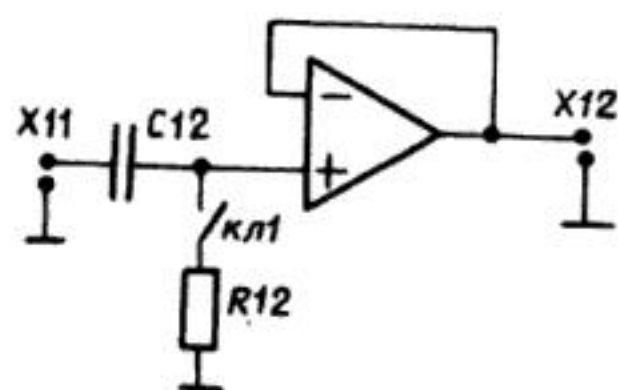


Рис. 2

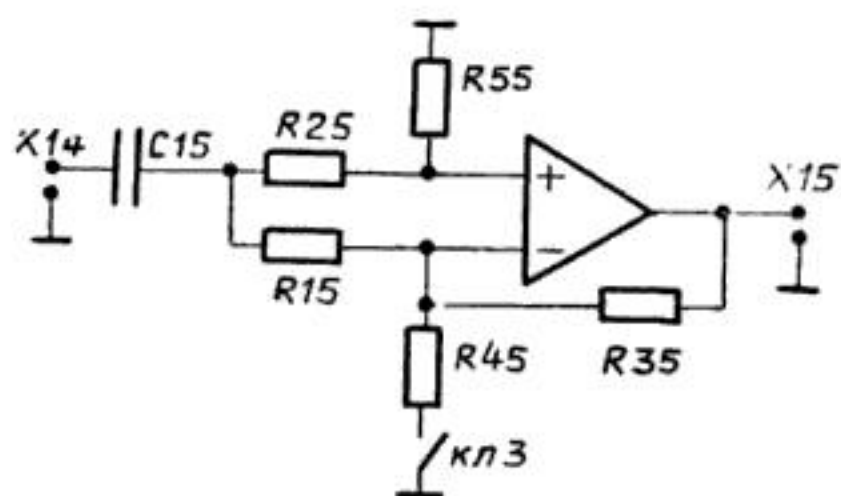


Рис. 3

Рис. 1. Функциональная схема дифференцирующего устройства: ФНЧ — фильтр нижних частот, СПК — звено, создающее сигнал постоянной крутизны, УПН — усилитель переменного напряжения, ДУП — дифференциальный усилитель переменного напряжения, ФЧД — фазочувствительный демодулятор, ФНЧ2 — фильтр нижних частот второго порядка, ГСИ — генератор синхронизированных импульсов, ХТК — входной сигнал (температура в вольтах), Х16 — выходной сигнал (скорость измерения температуры в вольтах)

Рис. 2. Звено, создающее сигнал постоянной крутизны

Рис. 3. Фазочувствительный демодулятор

налов, имеющих одинаковую крутизну [3]. На входы звеньев СПК (рис. 1) по двум цепям подается отфильтрованный и усиленный входной сигнал ХТК. Ключи кл1 и кл2 (рис. 2), выполненные на МОП-транзисторах, управляются импульсами, поступающими от генератора синхроимпульсов ГСИ.

Если условно считать:

$$\text{кл1 (кл2)} = \begin{cases} 1 & \text{при замкнутом ключе;} \\ 0 & \text{при разомкнутом ключе,} \end{cases} \quad (1)$$

то работу ключей можно описать уравнениями:

$$\begin{aligned} \text{кл1} &= \begin{cases} 1 & \text{при } k \cdot T \leq t \leq k \cdot T + \tau; (k = 0, 1, 2 \dots); \\ 0 & \text{в остальное время;} \end{cases} \\ \text{кл2} &= \begin{cases} 1 & \text{при } (k + 0,5) \cdot T \leq t \leq (k + 0,5) \cdot T + \tau (k = 0, 1, 2, \dots); \\ 0 & \text{в остальное время;} \end{cases} \end{aligned} \quad (2)$$

где T — период синхроимпульсов; τ — длительность синхроимпульсов, k — номер периода T ; t — текущее время.

Из приведенных уравнений (2) видно, что моменты поступления импульсов на ключ кл2 сдвинуты на 0,5 периода следования синхроимпульсов ГСИ.

Принцип работы звеньев СПК можно описать следующим образом. При очередном замыкании ключей кл1 и кл2 через емкости $C12$ (рис. 2) и $C22$ начинают протекать токи $I1$ и $I2$ равные:

$$\begin{aligned} I1(t) &= \begin{cases} (X11 - XK1)/R12 & \text{при кл1} = 1; \\ 0 & \text{при кл1} = 0; \end{cases} \\ I2(t) &= \begin{cases} (X21 - XK2)/R22 & \text{при кл2} = 1; \\ 0 & \text{при кл2} = 0, \end{cases} \end{aligned} \quad (3)$$

где $X11$ — сигнал на входе первого звена СПК; $XK1$ — напряжение на емкости $C12$; $X21$ — сигнал на входе звена СПК во втором канале, $R12$, $R22$ — сопротивления ключей кл1 и кл2. Этими токами конденсаторы $C12$ и $C22$ заряжаются до некоторого значения, близкого к входному сигналу ХТК в моменты времени $kT + \tau$ и $(k + 0,5)T + \tau$ соответственно.

Уравнения заряда конденсаторов имеют вид:

$$\begin{aligned} XK1 &= (1/C12) \cdot \int_0^t I1(t) dt + XK10; \\ XK2 &= (1/C22) \cdot \int_0^t I2(t) dt + XK20, \end{aligned} \quad (4)$$

где $XK10$ — начальное напряжение на емкости $C12$; $XK20$ — начальное напряжение на емкости $C22$. После размыкания ключей кл1 и кл2 напряжения $XK1$ и $XK2$ сохраняют свои значения до следующей коммутации.

Постоянные времени $R12 \cdot C12$ и $R22 \cdot C22$ заряда конденсаторов $C12$ и $C22$ выбирались из условия:

$$\begin{aligned} R12 \cdot C12 &< (1/3) \cdot \tau; \\ R22 \cdot C22 &< (1/3) \cdot \tau, \end{aligned} \quad (5)$$

что обеспечивает полный подзаряд конденсаторов за время действия управляющего импульса τ .

Напряжения $X12$ и $X22$ на выходах этих звеньев в течение времени:

$$\begin{aligned} k \cdot T + \tau \leq t \leq (k + 1) \cdot T; \quad (k = 0, 1, 2, \dots) & \quad \text{для 1 звена} \\ \text{и } (k + 0,5) \cdot T + \tau \leq t \leq (k + 1,5) \cdot T & \quad \text{для 2 звена} \end{aligned} \quad (6)$$

будут равны приращению входных сигналов $X11$ и $X21$ над сигналами правых обкладок конденсаторов $XK1$ и $XK2$:

$$\begin{aligned} X12 &= X11 - XK1 & \text{для 1 звена СПК;} \\ X22 &= X21 - XK2 & \text{для 2 звена СПК.} \end{aligned} \quad (7)$$

Крутизна сигналов $X12$ и $X22$ на выходах звеньев СПК, в силу сказанного выше, будет такая же, как и у входного сигнала ХТК, но сами сигналы будут сдвинуты относительно друг друга на 0,5 периода следования синхроимпульсов ГСИ.

Фазочувствительный демодулятор (рис. 3) выполнен на операционном усилителе (ОУ), в цепи отрицательной обратной связи которого находится делитель напряжения, эквивалентное сопротивление ($R15$) которого изменяется в зависимости от положения ключа кл3. Ключ кл3, выполненный на МОП-транзисторах, управляется импульсами длительностью 0,5 T , поступающими от генератора синхроимпульсов ГСИ. Если условно считать:

$$\text{кл3} = \begin{cases} 1 & \text{при замкнутом ключе;} \\ 0 & \text{при разомкнутом ключе,} \end{cases} \quad (8)$$

то работу ключа можно описать уравнениями:

$$\text{кл3} = \begin{cases} 1 & \text{при } k \cdot T \leq t \leq (k + 0,5) \cdot T; \quad (k = 0, 1, 2, \dots), \\ 0 & \text{в остальное время,} \end{cases} \quad (9)$$

где T — период следования синхроимпульсов.

При замкнутом ключе кл3 напряжение на выходе ФЧД не изменяется по фазе. При разомкнутом ключе кл3 осуществляется сдвиг по фазе на -180° входного сигнала X_{14} .

Для описания принципа работы фазочувствительного демодулятора в зависимости от положения ключа кл3 составим систему уравнений:

$$X_{15K} = (1/C_{15}) \cdot \int_0^t T_{15} \cdot dt + X_{15K0}, \quad (10)$$

$$X_{C15} = X_{14} - X_{15K},$$

$$T_{25} = X_{C15} / (R_{25} + R_{55}),$$

если кл3 = 0, то

$$X_{15M} = (X_{15} \cdot R_{15} + X_{C15} \cdot R_{35}) / (R_{15} + R_{35}),$$

если кл3 = 1, то

$$X_{15M} = R_{15} \cdot (X_{15}/R_{35} + X_{C15}/R_{15}),$$

$$T_{215} = (X_{C15} - X_{15M}) / R_{15},$$

$$T_{15} = T_{215} + T_{25},$$

$$X_{15} = \begin{cases} X_{C15} & \text{при кл3} = 1, \\ -X_{C15} & \text{при кл3} = 0, \end{cases}$$

где X_{15K} — напряжение на правой обкладке емкости C_{15} ; T_{15} — ток в цепи емкости C_{15} ; X_{C15} — напряжение на выходе емкости C_{15} ; T_{25} — ток в цепи неинвертирующего входа ОУ; R_{25} , R_{55} — резисторы в цепи (+) ФЧД; X_{15M} — напряжение на входе (—) ФЧД; R_{15} , R_{35} , R_{45} — резисторы в цепи (—) ФЧД; X_{15} — напряжение на выходе ФЧД; $R_{15} = R_{15} \cdot R_{35} \times R_{45} / ((R_{35} + R_{45}) \cdot R_{15} + R_{35} \cdot R_{45})$; T_{215} — ток в цепи инвертирующего входа ОУ.

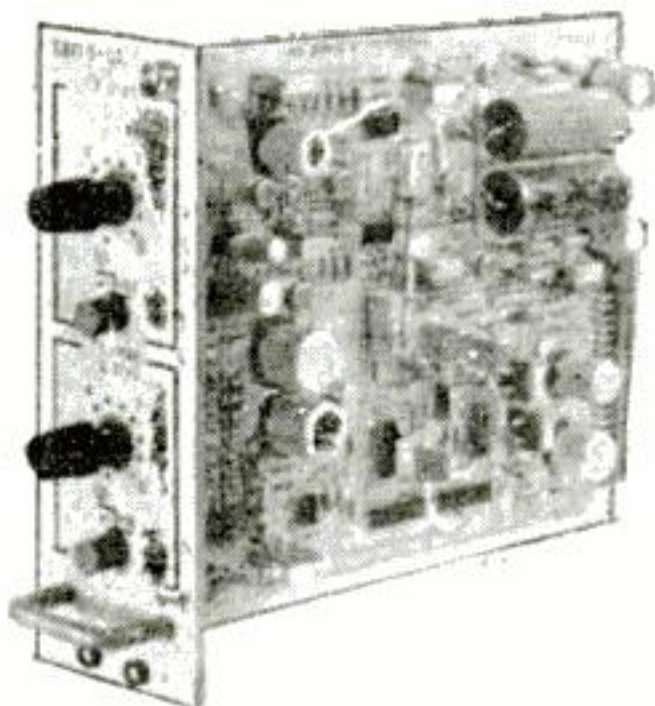


Рис. 4. Устройство измерительного дифференцирования

Для моделирования на ЭВМ сигнал X_{15K} был приведен к виду

$$X_{15K} = X_{15K} + (T_{15P} + T_{15}) \cdot H / (2 \cdot C_{15}), \quad (11)$$

где T_{15P} — ток в цепи емкости C_{15} на предыдущем шаге счета задачи, H — временной шаг счета задачи на ЭВМ. Остальные звенья дифференцирующего устройства (рис. 1): ФНЧ, ФНЧ2, УПН, ДУП и ГСИ описаны в модели очевидными соотношениями, которые в статье не приводятся.

Синтез параметров разработанной математической модели дифференцирующего устройства проведен при цифровом моделировании уравнений математической модели на ЭВМ СМ-4 в диалоговом режиме.

Найденные в ходе машинного эксперимента оптимальные параметры математической модели: постоянные времени и коэффициенты передачи звеньев, период и длительность синхроимпульсов ГСИ и другие соотношения обеспечивают хорошее качество динамики переходных процессов в математической модели дифференцирующего устройства. При этом точность измерения скоростей замораживания-оттаивания биоматериала при его криоконсервации составляет: 0,1 % — для скоростей от $\pm 1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до $\pm 150^\circ\text{C}/\text{мин}$ соответственно, 1 % — для скоростей от $-0,9^\circ\text{C}/\text{мин}$ до $+0,9^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Полученная точность измерения дифференцирующим устройством скоростей замораживания-оттаивания биоматериала при криоконсервировании позволяет сделать вывод о применимости разработанной модели ДУ в системах автоматического управления процессами программного замораживания биоматериалов и о целесообразности использования предложенного

метода математического моделирования для разработки реальных устройств, подобных по математическому описанию дифференцирующему устройству.

На основании предложенного метода было осуществлено проектирование устройства измерительного дифференцирования БВП5.00.00.00 (рис. 4), которое используется в программных замораживателях серии УОП, разработанных СКТБсОП ИПКиК АН УССР. БВП5.00.00.00 осуществляет измерение скоростей изменения температуры в диапазоне $0,1-100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ со средней погрешностью в установившемся режиме не более $\pm 2\%$, постоянной времени не более 5 с (в диапазоне $0,1-1,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). Измерение производной осуществляется в температурном диапазоне $40 \div -160\text{ }^{\circ}\text{C}$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Актуальные проблемы криобиологии.— Киев : Наук. думка, 1981.— 271 с.
2. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цуцаева А. А. и др. Низкотемпературное консервирование костного мозга.— Киев : Наук. думка, 1976.— 72 с.
3. Юревич Е. И. Теория автоматического управления.— Л. : Энергия, 1969.— 38 с.

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

Поступила 13.12.88

V. F. REZNIKOV, S. I. TKACHENKO

A PHYSICO-MATHEMATICAL MODEL OF DIFFERENTIATING UNIT FOR MEASUREMENT OF FREEZING AND REWARMING RATES IN BIOMATERIALS SUBJECT TO CRYOPRESERVATION

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

A physico-mathematical model of differentiating unit for accurate measurement of the process of programmable freeze-thawing by corresponding treatment of signals conforming to temperature value has been developed. The accuracy of calculation and measurement was 0.1 %. The suggested model can be recommended for use in programmable freezers for biomaterials.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 536.531

А. С. Снурников, Е. Г. Воротников, В. И. Камышан

МНОГОКАНАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОННЫЙ ТЕРМОМЕТР С МИНИМАЛЬНЫМ ИСКАЖЕНИЕМ ТЕМПЕРАТУРНОГО ПОЛЯ

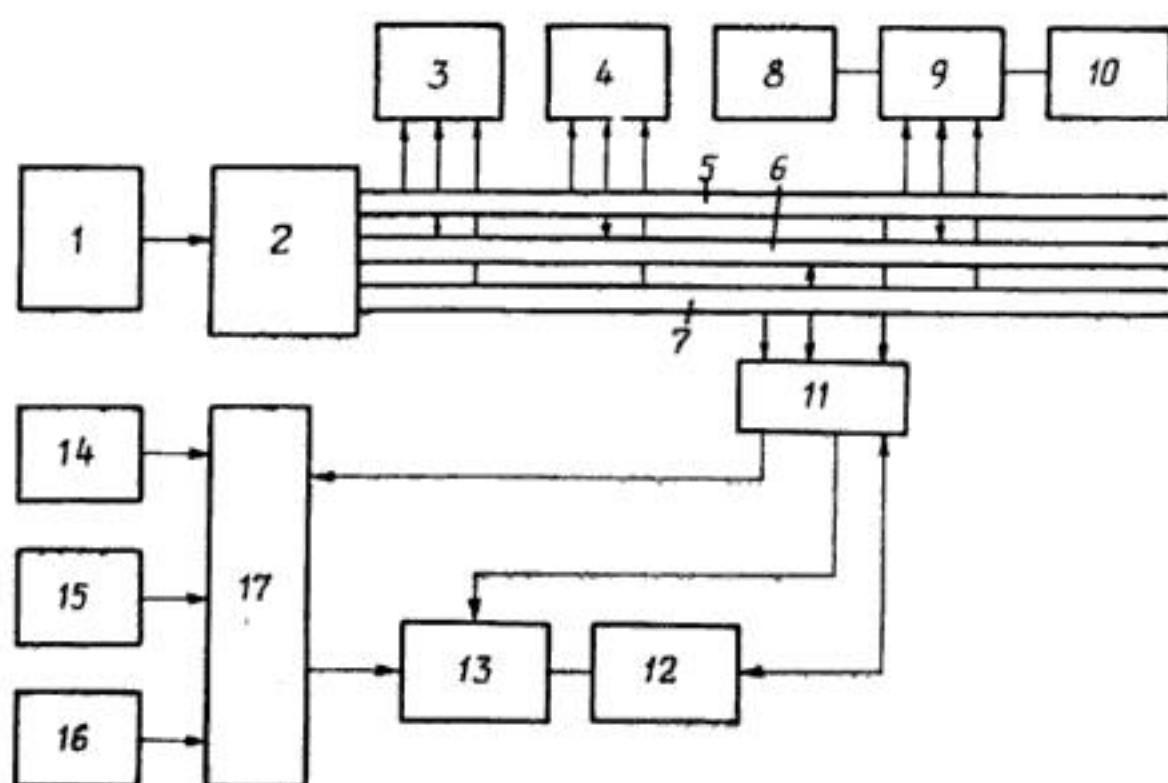
В настоящее время в биологии и медицине значительный интерес представляют исследования распределения температуры в биообъектах, подвергающихся гипотермии или замораживанию, и динамика температурного поля при криовоздействии с целью изучения свойств биообъектов и контроля режима криовоздействия.

Комплексное решение задачи требует применения многоточечной методики измерения температуры, а также разности температур между двумя любыми точками с высокой разрешающей способностью и точной локализацией места измерения как на поверхности, так и внутри объекта с минимальным искажением температурного поля в месте измерения. Для этих целей разработан восьмиканальный электронный термометр с применением поликристаллических терморезисторов в качестве первичного термопреобразователя датчиков.

Применение поликристаллических терморезисторов в качестве элементов датчиков температуры ограничено из-за нелинейности температурной характеристики и технологического разброса параметров. Линеаризация характеристики терморезистора в широком диапазоне температур традиционными методами (унификация температур-

ных характеристик с помощью пассивных резисторных корректирующих цепей, применение нелинейных функциональных преобразователей, аппроксимация) не позволяет строить на их основе достаточно точные, компактные, технологичные в производстве и калибровке, удобные в эксплуатации, универсальные измерители температуры. Построение термометра, удовлетворяющего этим требованиям, возможно на базе микропроцессорной техники и требует решения комплекса технических, программных и организационных задач.

В приборе решены задачи преобразования термозависимого сопротивления терморезистора в напряжение, усиления напряжения до необходимого уровня и аналого-цифрового преобразования с целью получения цифрового кода, содержащего информацию об измеряемой температуре. Для реализации многоканальной схемы измерения в прибор введен коммутатор датчиков, подключающий выбранный датчик к генератору тока и входу усилителя. В приборе применен интегральный АЦП поразрядного уравнивания типа 572 ПВ1, удовлетворяющий противоречивым требованиям высокой точности аналого-цифрового преобразования, определяемой разрядностью АЦП и



Блок-схема прибора: 1 — генератор токовых сигналов, 2 — центральный процессор, 3 — ОЗУ, 4 — ПЗУ, 5 — шина адреса, 6 — шина данных, 7 — шина управления, 8 — клавиатура, 9 — контроллер ввода-вывода, 10 — индикатор, 11 — интерфейс, 12 — АЦП, 13 — программируемый усилитель, 14 — блок датчиков, 15 — блок эталонных резисторов, 16 — генератор тока, 17 — коммутатор

быстродействия. Поскольку время подключения датчика к генератору тока ограничивается средней мощностью, выделяемой на терморезисторе, допустимое значение которой не более 10^{-6} Вт, сокращение времени подключения датчика к генератору тока позволяет уменьшить погрешность за счет саморазогрева терморезистора во время аналого-цифрового преобразования.

Для максимального использования разрядности АЦП (число разрядов 12) диапазон измерения сопротивления терморезистора, равный примерно 200, приведен к диапазону изменения напряжения на входе АЦП, равному 2. Это достигается введением в состав прибора программируемого усилителя с двоичным законом изменения коэффициента передачи. Усилитель имеет 8 поддиапазонов и управляется микропроцессором.

Для реализации алгоритма вычисления температуры достаточно знать коэффициент передачи прибора на выбранном поддиапазоне, что достигается введением на каждом поддиапазоне эталонного резистора. Измеряя падение напряжения на эталонном резисторе, соответствующем выбранному поддиапазону, микропроцессорный вычислитель получает достаточную информацию для определения истинного значения сопротивления терморезистора.

Подключение эталонных резисторов ко входу прибора осуществляется через коммутатор эталонных резисторов, аналогичный коммутатору датчиков. Управление коммутаторами, программируемым усилителем и АЦП осуществляет микропроцессорный вычислитель через интерфейсную БИС. В состав микропроцессорного вычислителя входят также: центральный процессор 580ИК80, генератор тактовых сигналов, ПЗУ емкостью $4K \times 8$ бит, ОЗУ емкостью $1K \times 8$ бит и БИС интерфейса клавиатуры и индикации, обслуживающая матрицу клавиатуры управления и 8-разрядный цифровой индикатор (рис.).

Таким образом, техническое решение задачи обеспечивает требуемые энергетические соотношения в цепи датчика, самокалибровку прибора в процессе измерения

по набору эталонных резисторов и преобразование сопротивления терморезистора в пропорциональный ему 11-разрядный двоичный код, обеспечивающий достаточную точность представления исходных данных для вычисления текущей температуры.

Программные средства решения задачи базируются на использовании аналитического описания температурной характеристики терморезистора. Зависимость сопротивления терморезистора $R_{(T)}$ от текущей температуры T имеет вид:

$$R_{(T)} = R_0 \left(\frac{T}{T_0} \right)^b \exp \left[B \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right], \quad (1)$$

где R_0 — сопротивление терморезистора при некоторой температуре T_0 ; B — коэффициент температурной чувствительности терморезистора; b — корректирующий коэффициент, учитывающий отклонение температурной характеристики от экспоненциальной.

Текущее значение температуры с заданной точностью вычисляется с применением метода итераций:

$$T = \frac{B}{\log_2 R_{(T)} - C(T) + A}; \quad C(T) = b \log_2 \frac{T}{T_0}, \quad (2)$$

где A и B — постоянные коэффициенты, величина которых определяется параметрами конкретного терморезистора; $\log_2 R_{(T)}$ — двоичный логарифм текущего нормированного значения сопротивления терморезистора.

Микропроцессорный вычислитель интерпретирует данные, полученные в результате аналого-цифрового преобразования текущего сопротивления датчика, как приближенное значение двоичного логарифма нормированного сопротивления датчика.

Вычисление двоичного логарифма нормированного сопротивления терморезистора с заданной точностью реализуется алгоритмом вычисления логарифма с использованием его приближенного значения и функции разности между приближенным и точным значением логарифма. Реализация этого алгоритма позволила значительно повысить производительность микропроцессорного вычислителя и использовать его в многоканальных измерителях температуры на базе терморезисторов.

Организационные средства решения задачи включают в себя разработку методик калибровки и поверки датчиков и прибора, обеспечение взаимозаменяемости датчиков, определение дополнительных сервисных функций, реализуемых прибором, выбор средств взаимодействия оператора и прибора. Прибор реализует трехточечный алгоритм линеаризации температурной характеристики терморезистора. Это значит, что для вычисления температуры по текущему значению сопротивления терморезистора достаточно знать его сопротивление в трех точках температурной характеристики. В процессе калибровки датчиков по результатам измерения сопротивления каждого датчика вычисляются значения коэффициентов, входящих в формулу (2). Вычисленные значения коэффициентов заносятся в электрически программируемую память с помощью клавиатуры прибора отдельно для каждого датчика. Датчик снабжается паспортом, в котором указываются численные значения коэффициентов, дата калибровки и периодичность поверки. Поверка датчиков производится в одной точке температурной характеристики терморезистора, а именно измеряется сопротивление R при температуре T_0 . По отклонению параметра от нормы принимают решение о необходимости перекалибровки датчика. При замене вышедшего из строя датчика на новый необходимо занести в память прибора паспортные данные нового датчика.

Микропроцессорная организация прибора позволяет значительно расширить его функциональные возможности. Так, в прибор введена функция вычисления разности температур между двумя любыми датчиками, а также индикация температуры как по абсолютной шкале температур, так и в $^{\circ}\text{C}$. Дополнительная функция вывода данных на внешнее устройство, драйвер которого включен в состав программного обеспечения, позволяет выводить результаты измерения как на внешнее регистрирующее устройство, так и на ЭВМ для дальнейшей обработки. В приборе предусмотрен режим самокалибровки, в котором по трем из восьми эталонных резисторов вычисляется значение калибровочной температуры, выводимой на цифровой индикатор прибора.

Прибор воспринимает сопротивление терморезистора в определенном диапазоне его изменения, который жестко задается аппаратной частью прибора, соответствует оптимальному, с точки зрения точностных характеристик измерительного канала, и равен $0,5\text{--}100\text{ кОм}$, что соответствует диапазону измеряемых температур — $50 \div \div 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, выбранному базовым как наиболее широко применяемый в биологии и медицине.

Однако использование свойства перепрограммируемости прибора позволяет реализовать значительно более широкий диапазон измеряемых температур. Для этого достаточно выбрать терморезистор с таким сопротивлением R при температуре T_0 , чтобы в диапазоне измеряемых прибором сопротивлений этого терморезистора температура соответствовала требуемому диапазону (например, $-100 \div 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $0 \div 100\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Таким образом, описан многоканальный, управляемый микропроцессором прибор для измерения температуры в нескольких точках или разности температур между двумя любыми точками с минимальным возмущением температурного поля объекта и точной локализацией места измерения.

Датчики прибора размещены внутри инъекционной иглы с регулируемой глубиной погружения и калибруются независимо от прибора. Замена датчиков не требует их перекалибровки. Паспортные данные датчика вводятся в память прибора с клавиатуры на весь период эксплуатации датчика. Диапазон измеряемых температур — базовый: $-50 \div 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, дополнительный $0 \div 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-100 \div 0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Абсолютная погрешность измерения $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, число каналов 8.

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

Поступило 13.10.89

УДК 57.043 : 535.375.5

*О. А. Нардид, Т. С. Дюбко, Д. А. Мангасаров, С. Е. Гальченко,
Л. П. Подопригора*

УСТАНОВКА КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ КРИОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС) может с успехом использоваться в качестве самостоятельного метода исследования для решения достаточно широкого круга криобиологических задач [3], однако низкая интенсивность линий КРС

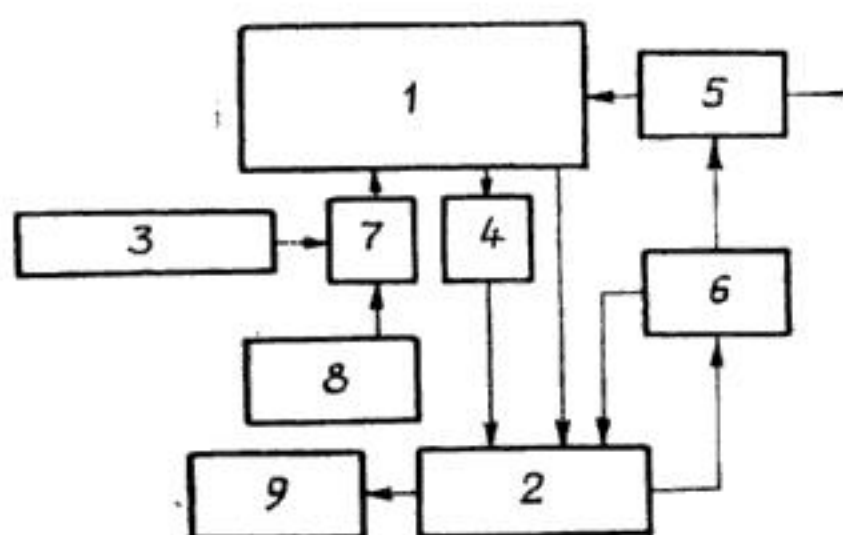


Рис. 1. Принципиальная схема установки комбинационного рассеяния для криобиологических исследований: 1 — двойной монохроматор ДФС-24, 2 — вычислительный комплекс МК-1-01, 3 — лазер, 4 — фотоумножитель ФЭУ-136, 5 — шаговый двигатель ШД-5Д1М, 6 — реверсивный счетчик Ф 5264, 7 — ячейка с образцом, 8 — регулятор температуры, 9 — графопостроитель

биологических объектов не позволяет получать хорошо разрешенные спектры без применения специальной регистрирующей аппаратуры. В настоящее время отечественная промышленность не выпускает спектрометров, позволяющих решать такие задачи. Это приводит к тому, что ряд исследователей вынужден вносить усовершенствования в серийно выпускаемые приборы в соответствии с требованиями экспериментов [1, 2]. Целью данной работы явилось создание автоматизированного спектрометра КРС для изучения биологических объектов при низких температурах на основе двойного монохроматора ДФС-24 (спектральная область прибора $400\text{--}850\text{ нм}$) и комплекса сбора и обработки информации МК-1-01, в состав которого входит микро-ЭВМ «Искра

1256» (рис. 1). В качестве источников возбуждающего излучения использовались аргонный ($\lambda_{\text{ген}} = 488 \text{ нм}$), гелий-неоновый ($\lambda_{\text{ген}} = 632,8 \text{ нм}$) и гелий-кадмиевый ($\lambda_{\text{ген}} = 442 \text{ нм}$) лазеры непрерывного действия. Детектором рассеянного излучения служил фотоэлектронный умножитель ФЭУ-136, работающий в наиболее чувствительном режиме счета одиночных фотонов. Однако в большинстве случаев интенсивность сигналов КРС от биологических объектов крайне низкая и приближается к уровню шумов. Поэтому для регистрации таких сигналов целесообразно сочетать ФЭУ, работающий в одноэлектронном режиме, с многоканальным цифровым накоплением [4]. При этом достигается значительный выигрыш в чувствительности за счет усреднения шумов и суммирования полезного сигнала, амплитуда которого пропорциональна времени накопления. Для реализации работы спектрометра в режиме накопления в него дополнительно встроен шаговый двигатель типа ШД-5Д 1М, обеспечивающий дискретную развертку спектра. Управление работой спектрометра осуществляется по специально разработанной программе микро-ЭВМ «Искра 1256» совместно с программируемым реверсивным счетчиком типа Ф 5264 [2], который используется в качестве задающего генератора импульсов и определяет длину шага. В функции МК-1-01 входят: измерение на данном шаге сканирования, считывание и накопление информации, в том числе на микро-ЭВМ возлагается управление работой шагового двигателя, управление процессом накопления, обработки информации и вывода данных на внешние устройства (кассетный накопитель, графопостроитель). Для обеспечения обратной связи спектрометра с микро-ЭВМ в последнюю вводятся реперы от датчика, встроенного в систему развертки спектра монохроматора.

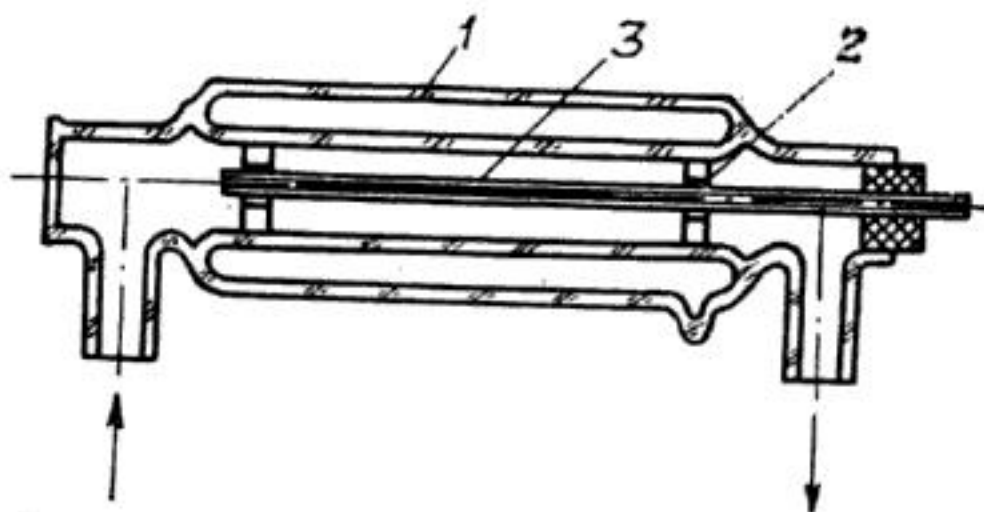


Рис. 2. Проточный криостат для оптических исследований: 1 — корпус криостата, 2 — держатель образца, 3 — капилляр с образцом

Для проведения температурных измерений образец в запаянном стеклянном капилляре помещается в специально разработанный малогабаритный проточный кварцевый криостат (рис. 2), который имеет двойные плоскопараллельные стенки с вакуумной изоляцией. Такая конструкция криостата позволяет снизить уровни поступающего в монохроматор релеевского рассеяния и деполяризации, присущей обычным криостатам, в которых она достигает 20—40 %. Размеры криостата позволяют размещать его непосредственно под кожухом осветительного устройства монохроматора, не внося дополнительных изменений в оптическую схему.

Изменение и стабилизация температуры образца осуществляется путем подачи хладагента с заданной температурой. Точность поддержания температуры $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Контроль температуры осуществляется хромель-копелевой термопарой, расположенной внутри криостата.

Описанная установка позволяет с достаточной точностью проводить температурные исследования колебательных спектров биологических объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаджиев З. И., Чуринов А. А., Пащенко В. З., Рубин Л. Б. Спектрограф комбинационного рассеяния для биологических исследований // Научн. докл. высшей школы. Биол. науки. — 1980. — № 8. — С. 98—104.
2. Жувикин Г. В. Шаговая система сканирования на базе программного реверсивного счетчика Ф 5007 // Приборы и техника эксперимента. — 1979. — № 1. — С. 137—139.
3. Нардид О. А., Дюбо Т. С. Применение спектроскопии комбинационного рассеяния света в криобиологии // Криобиология. — 1987. — № 4. — С. 3—9.
4. Соловьев К. Н., Гладков Л. Л., Старухин А. С., Шкирман С. Ф. Спектроскопия порфиринов: колебательные состояния. — Минск: Наука и техника, 1985. — 415 с.

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

Поступило 11.01.88

А. Н. Терентьев, В. В. Кадетов, М. И. Богданова,
А. А. Цуцаева, И. П. Высеканцев, А. В. Милютин

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ *Y. PESTIS* EV76

В настоящее время весьма актуальной является проблема длительного хранения коллекционных культур, а также живых бактериальных и вирусных вакцин. Профилактическая эффективность последних в существенной мере зависит от жизнеспособности микроорганизмов в процессе их хранения.

Лиофилизация обеспечивает выживание не более 50 % бактерий чумного микроба [1, 3]. Хранение лиофилизированного препарата даже под вакуумом при 0—4 °С не исключает процессов изменения свойств штаммов возбудителя чумы [2]. Все это заставляет искать более эффективные приемы консервации чумного микроба.

Целью работы являлось изучение влияния различных режимов замораживания на сохранение жизнеспособности вакцинного штамма *Y. pestis* EV76.

Бактерии выращивали на агаровой среде СО, приготовленной на основе аутолизата селезенки крупного рогатого скота с добавлением белков гидролизата пшеничных отрубей. После культивирования микроорганизмов при 28 °С в течение 48 ч бактерии смывали с ростовой среды различными криопротекторами: 5 %-ным диметилсульфоксидом (ДМСО); 10 %-ным полиэтиленоксидом-400 (ПЭО-400); 5 %-ным поливинилпироллидоном (ПВП); средой Файбича (10 %-ная сахароза и 1 %-ная желатина) и средой СЖТ (10 %-ная сахароза, 10 %-ная желатина и 0,5 %-ная тиомочевина). Контролем служили образцы с бактериями, суспендированными в физиологическом растворе.

Для определения возможного токсического действия использованных защитных сред бактериальную взвесь выдерживали при комнатной температуре 5, 10, 20, 30 мин, 1 и 3 ч. По истечении указанных интервалов времени в образцах определяли чашечным методом Коха число жизнеспособных клеток *Y. pestis* EV76.

Бактериальную взвесь разливали по 2 мл в стеклянные ампулы объемом 5 мл и замораживали в нескольких режимах: погружали в этиловый спирт, охлажденный до —30 °С (режим I), до —50 °С (режим II) и до —70 °С (режим III). В целях более медленного охлаждения суспензий ампулы помещали в низкотемпературный холодильник при температуре камеры —30 °С (режим IV) и —50 °С (режим V).

Для определения скоростей охлаждения бактериальной суспензии в один из контейнеров, замораживаемых по определенному режиму, помещали термопарный датчик ТСМ 6-12, показания которого подавались на самописец КСП4. Запись проводили при скорости ленты самописца 240 мм/ч. Оттаивание замороженных культур осуществляли на водяной бане при 37 °С в течение 5 мин. До и после замораживания определяли чашечным методом Коха жизнеспособность бактерий, высевая 100 и 1000 микробных клеток.

Таблица 1
Скорости охлаждения материала при различных режимах замораживания суспензий микробных клеток *Y. pestis* EV76

Этапы охлаждения	Скорости охлаждения при замораживании в режимах:				
	I	II	III	IV	V
До температуры —4 °С	37° С/мин	60° С/мин	78° С/мин	13° С/мин	13° С/мин
До температуры —30 °С	4° С/мин	—	—	0,7° С/мин	—
До температуры —50 °С	—	10° С/мин	—	—	1,5° С/мин
До температуры —70 °С	—	—	34° С/мин	—	—

Примечание. Определение скоростей охлаждения осуществляли в образцах с криопротективной средой СЖТ.

больные были подвергнуты хирургическому вмешательству. Отметим, что 2-й больной умер через 2 года от прогрессирования процесса.

Представленные наблюдения позволяют сделать заключение о достаточной эффективности использования метода криолечения при новообразованиях малых слюнных желез полости рта различного гистологического строения. Локальное криовоздействие показано прежде всего при ограниченных аденогенных опухолях. Небольшое число наблюдений не позволяет сделать окончательные выводы о возможности применения этого вида лечения, требуется дальнейшее изучение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пачес А. И. Опухоли головы и шеи.— М. : Медицина, 1983.— 138 с.
2. Шенталь В. В. Криодеструкция опухолей головы и шеи : Дис. ... д-ра мед наук.— М. : Б. и., 1980.— 285 с.
3. Eneroth C. M., Jacobson P. A., Zajicec J. Salivary gland tumors in the parotid submandibular and palat region // Cancer.— 1971.— 27, N 6.— P. 415—418.
4. Spiro R. H., Koss U. G., Haidy S. L., Strong E. W. Tumors of minor salivary origion/ Cancer.— 1973.— 31, N 1.— P. 117—119.
5. Brocherion C., Landebach P., Bakir M. Les tumors des glandes salivares accessoires // Arch. anat. pathol.— 1975.— 23, N 2.— P. 117—122.

Всесоюзный онкологический научный
центр АМН СССР, г. Москва

Поступило 20.06.89

ХРОНИКА

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ БАНК ПРОМЫСЛОВЫХ И ДРУГИХ ВИДОВ РЫБ И ВОДНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

В г. Пущино Московской обл. 19—21 декабря 1989 г. состоялось рабочее совещание по программе «Низкотемпературный генетический банк промысловых и других видов рыб и водных беспозвоночных», разработанной совместно Научным центром биологических исследований Институтом биологической физики АН СССР, Институтом проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Министерством рыбного хозяйства СССР и Ихтиологической комиссией. Она охватывает все основные проблемы криоконсервации, хранения генетического материала и его получения, а также разработку практических методов реализации генетической информации криоконсервированных клеток. Эту программу предполагается включить в Межведомственную экологическую программу СССР. Б. Н. Вепринцев (Институт биологической физики АН СССР) в своем докладе осветил проблемы сохранения генетических ресурсов и создания генетического банка рыб, особо подчеркнув перспективы использования методов замораживания спермий. Программа предполагает проведение фундаментальных исследований в области биологии развития и имеет большое прикладное значение. Поставлена задача создания банка криоконсервированных клеток, несущих генетическую информацию различных видов рыб, в частности исчезающих, к числу которых относятся и промысловые рыбы. Большое внимание уделено разработке технологии замораживания и оттаивания больших объемов спермы и методов сохранения генетической информации. Л. И. Цветкова (ВНИИПРХ) выступила с сообщением о низкотемпературном банке рыб во ВНПО по рыбоводству, создаваемом совместно с ИПКиК АН УССР, в котором обобщены методы оценки спермы карпов после длительного хранения в замороженном состоянии и оценки потомства, полученного после использования этой спермы, а также способы повышения ее жизнеспособности после размораживания. В. Е. Евтодиенко (ИБФ АН СССР) особое внимание уделил изучению роли процессов перекисного окисления липидов в клетке до и после замораживания, которые интенсивно развиваются при криоповреждении мембраны и приводят к синтезу внутриклеточных регуляторов. В. Г. Ивков (ИБФ АН СССР) остановился на проблемах влияния низко- и высокомолекулярных криопротекторов на мембраны, роли переохлаждения и фазовых переходов при замораживании зародышей рыбы. Т. П. Линник (ИПКиК АН УССР) в докладе о перспективных криопротекторах дала характеристику проникающих и непроникаю-

щих криопротекторов, используемых при замораживании биологических объектов, и возможности их применения в рамках программы. Перспективы поиска соединений других классов с криозащитной активностью и использование смеси криопротекторов. В докладе Л. А. Никтиной (ИБФ АН СССР), прочитанном Н. Н. Ротт (ИБР АН СССР), на основании литературных данных показано, что межвидовые пересадки ядер необходимые для реализации генетической информации, сохраненной в соматических клетках, у амфибий осуществляются достаточно успешно. В докладе Н. Н. Ротт обобщены собственные и литературные данные по методам получения химер у различных групп клеток, использованию их для реализации генетической информации нежизнеспособных зародышей: однородительских (партено-, андро- и гиногенетических), с пересаженным ядром, несущих летальные мутации, летальных гибридов, а также отдельных клеток и групп клеток. Б. И. Гомельский (ВНИИПРХ) сообщил о генетических методах селекции рыб и возможности их использования для сохранения генетических ресурсов, в частности воспроизводства видов путем получения гиногенетического потомства, например редких видов, и индуцированного андрогенеза. Обсуждены проблемы восстановления генофонда из замороженной спермы, способы гормональной регуляции пола у рыб и экспериментальной полиплоидии. Е. Ф. Копейка (ИПКиК АН УССР) посвятил свой доклад методам криоконсервации спермы различных видов рыб, подчеркнув значение режима предобработки спермы, состава разбавителя и среды замораживания, выбора криопротектора, способа замораживания и условий нереста рыб. Криоконсервации клеток, спор и меристем морских водорослей посвятила свое сообщение Л. В. Калинина (Ин-т цитологии АН СССР).

З. В. Линевиц

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИИ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в 1989 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени доктора биологических наук В. Ф. Козловой «Морфофункциональная характеристика действия криопротекторов ряда полиолов и их оксиэтилированных производных на биологические системы». В результате проведенного комплексного исследования установлены низкая токсичность и отсутствие кумулятивных свойств синтезированных экзоцеллюлярных криопротекторов, оксиэтилированных производных многоатомных спиртов. Определены их летальные, сублетальные, пороговые и безопасные дозы. Сформулирована научная концепция взаимодействия изученных веществ с клетками и тканями организма, в основе механизма которого лежат гидратационно-осмотические свойства. Выявлена многоуровневая сопряженность деструктивных и репаративных процессов в связи с дозой и режимом введения вещества, обуславливающих развитие адаптационно-компенсаторных реакций организма. Разработанные способы низкотемпературного консервирования эритроцитов под защитой «Пропандиосахароля» и тканей яичников человека с ПЭО-400 получили широкое медицинское применение в клинических учреждениях страны.

В диссертационной работе В. И. Пиняева «Влияние низкотемпературного консервирования на первичные половые клетки ранних зародышей человека» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук с помощью разработанного оригинального устройства показана возможность получения и низкотемпературного консервирования эмбриональных тканей человека на этапах ранней дифференцировки.

Диссертационная работа В.С. Марченко «Норадренергические механизмы пространственной синхронизации биотоков охлажденного мозга» на соискание ученой степени кандидата биологических наук посвящена изучению действия краниоцеребральной гипотермии (КЦГ) на пространственную синхронизацию биоэлектрической активности гипоталамо-кортикальной системы головного мозга и протекающие при этом нейротрансмиттерные процессы секреции и рецепции норадреналина. На основании комплексного исследования биоэлектрических и нейрохимических процессов в ЦНС при КЦГ разработан оригинальный метод оценки холодовой устойчивости человека.

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ ЖУРНАЛА «КРИОБИОЛОГИЯ»

Статья представляется в 2 экз. с сопроводительным письмом и экспертным заключением. Объем оригинальной статьи — не более 10, обзорной — 12 стр. машинописного текста, включая список литературы, таблицы, иллюстрации и подписи под рисунками. Объем краткого сообщения — 3 стр. Оба экземпляра статьи подписываются авторами с указанием учреждения, фамилии, имени и отчества, домашнего и служебного адресов, номеров телефонов, даты.

Статья печатается на машинке черной лентой через 2 интервала на белой бумаге форматом А₄ (210×297 мм). На странице не более 30 строк, в строке не более 60—62 знаков. Абзацный отступ равен 5 знакам. Левое поле страницы — не менее 25, правое — 10, верхнее — 20, нижнее — 20 мм.

В левом верхнем углу проставляется УДК, затем инициалы и фамилия автора (авторов), название статьи. Название учреждения указывается под списком литературы слева.

В тексте ссылки на номер статей по списку литературы даются в квадратных скобках.

Иностранные фамилии и названия фирм даются в русской транскрипции.

Таблицы печатают на отдельных страницах, помещают в рукописи вслед за страницей, содержащей первую ссылку на эту таблицу. На полях проставляют номера таблиц и рисунков против тех мест текста, где они должны быть заверстаны.

Формулы и буквенные обозначения должны быть выполнены четко, крупно, черными чернилами. Прописные и строчные буквы в формулах, одинаковые по начертанию и отличающиеся только размером, подчеркиваются: прописные буквы — двумя черточками снизу, строчные — двумя черточками сверху. Следует особенно четко вписывать сходные по написанию буквы: *e* и *l*, *I* и *J*, *h* и *n*.

Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые буквы, а также нуль, *sin*, *cos*, *exp* и т. д. размечаются на прямой набор знаком $_$. Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках). Разметка формул производится синей или фиолетовой пастой, греческие буквы подчеркиваются или обводятся красным карандашом, готические — синим. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) выписываются на поле (один раз) с указанием их значения.

Рисунки в количестве не более 5 выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге (или в виде фотографий). На них наносятся только необходимые условные обозначения. Расшифровка их дается в тексте или в подписи к рисунку. На обороте рисунка указывается его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и журнала.

Список литературы печатается на отдельной странице через 2 интервала и составляется в алфавитном порядке авторов, русский, затем латинский алфавит. В списке необходимо привести следующие сведения: фамилия и инициалы авторов в оригинальной транскрипции, название статьи, журнала или книги и далее: для периодических изданий: 1) год издания, 2) том, 3) номер, 4) номера страниц; для монографий — место издания, название издательства, год издания, общее количество страниц.

Названия периодических и продолжающихся изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНТИ.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Объем списка литературы не должен превышать 5 % общего объема рукописи.

Реферат к статье подается на русском и английском языках объемом до 0,3 стр.

Материалы направлять по адресу: 310015, Харьков-15, ул. Переяславская, 23. Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, редакция журнала «Криобиология».

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

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

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

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

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

KRIOBIOLOGIYA is published 4 times a year.

ISSN 0233-7673. Криобиология, 1990, № 2. 1-56