

З

ISSN 0233-7673

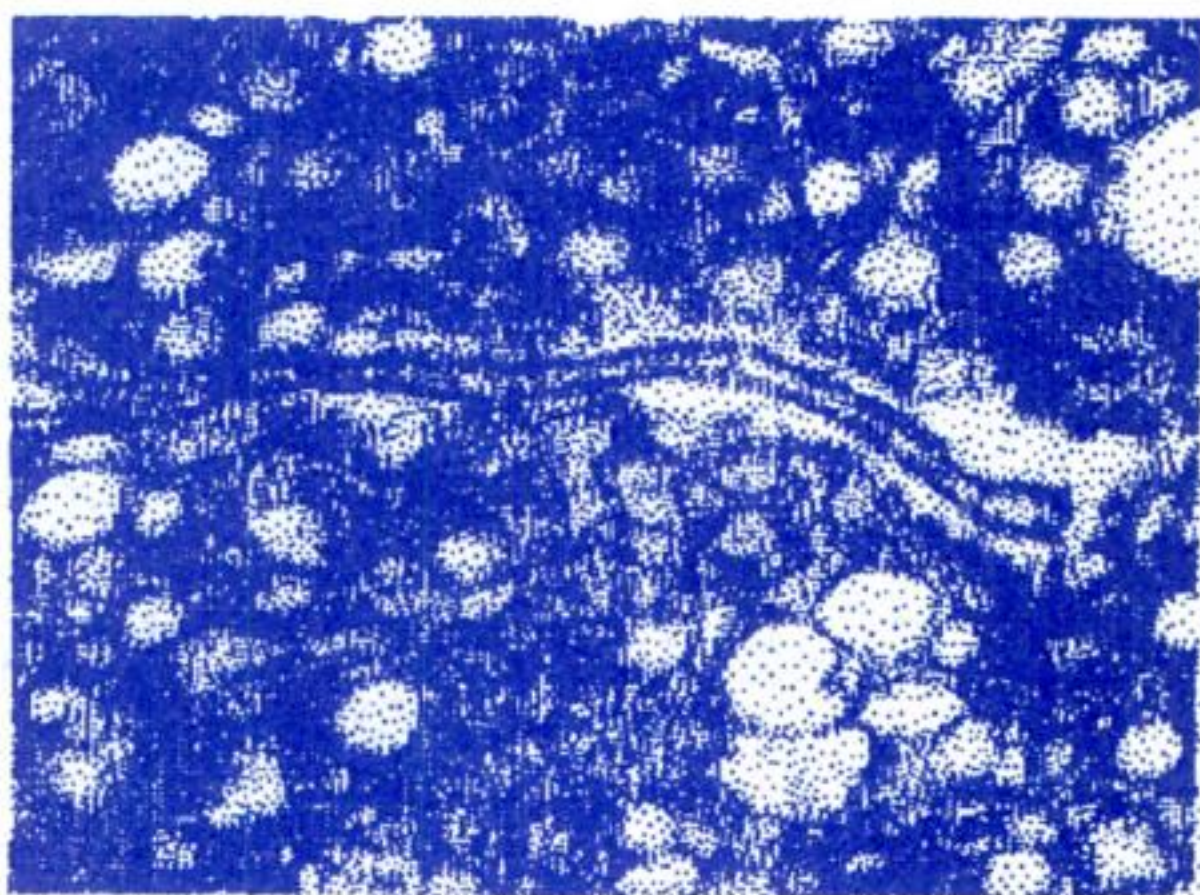
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1994

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



СВЕРХБЫСТРОЕ ЗАМОРАЖИВАНИЕ ЭМБРИОНОВ КРЫС И КО-
РОВ БЕЗ "КЛАССИЧЕСКОЙ" ЭКВИЛИБРАЦИИ *В.В.Исаченко,
В.И.Грищенко, Ф.И.Осташко, Е.Ф.Исаченко, А.Б.Сушко*

К ВОПРОСУ О РОЛИ МЕМБРАНЫ И ЦИТОМАТРИКСА В РАЗВИ-
ТИИ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ КЛЕТОК *Л.Ф.Розанов, Е.И.Смольяни-
нова, О.И.Гордиенко*

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МАССОПЕРЕНОСА ЖИДКОСТИ В
ИШЕМИЗИРОВАННОМ МИОКАРДЕ ПРИ НОРМОТЕРМИЧЕ-
СКОМ И ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ
СЕРДЕЦ *Г.Е.Загоруйко, Г.А.Бабийчук, Т.Н.Юрченко*

Главный редактор **В.И.Грищенко**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

С.И.Аксенов (Москва), Г.А.Бабийчук (Харьков), А.М.Белоус (зам. главного редактора, Харьков), М.Е.Бекер (Рига), Ю.П.Благой (Харьков), Л.Вонг (Канада), А.Н.Гсльцев (Харьков), В.М.Гордиенко (Киев), К.Дж.Грин (Великобритания), В.Н.Гурин (Минск), Г.Ф.Жегунов (Харьков), В.Де Лекер (Бельгия), В.И.Луговой (Харьков), В.Я.Малеев (Харьков), Г.Маттес (Германия), Г.Меримен (США), П.Мнержичка (Словакия), Е.Я.Панков (Харьков), Ю.Ф.Пастухов (Санкт-Петербург), Ф.А. Приходько (ответственный секретарь, Харьков), Н.С.Пушкар (Харьков), А.Роу (США), Б.П.Сандомирский (Харьков), А.С.Снурников (Харьков), С.Сумида (Япония), А.А.Цуцаева (Харьков), С.А.Шалимов (Киев), Э.З.Эмирбеков (Махачкала), Т.Н.Юрченко (Харьков)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Editor-in-Chief **V.I.Grishchenko**

EDITORIAL BOARD

S.I.Aksenov (Moscow), G.A.Babiychuk (Kharkov), A.M.Belous (Associated Editor, Kharkov), M.E.Beker (Riga), Yu.P.Blagoj (Kharkov), E.Z.Emirbekov (Makhachkala), A.N.Goltsev (Kharkov), V.M.Gordiyenko (Kiev), C.J.Green (Great Britain), V.N.Gurin (Minsk), W.De Loecker (Belgium), V.I.Lugovoj (Kharkov), V.Ya.Maleyev (Kharkov), G.Matthes (Germany), P.Mericka (Slovakia), H.T.Meryman (USA), E.Ya.Pankov (Kharkov), Yu.F.Pastukhov (Sankt-Petersburg), F.A.Prihodko (Executive Secretary, Kharkov), N.S.Pushkar (Kharkov), A.W.Rowe (USA), B.P.Sandomirsky (Kharkov), S.A.Shalimov (Kiev), A.S.Snurnikov (Kharkov), S.Sumida (Japan), A.A.Tsutsayeva (Kharkov), T.N.Yurchenko (Kharkov), L.Wang (Canada), G.F.Zhegunov (Kharkov)

EDITORIAL COUNCIL

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

3

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1994

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Исаченко В.В., Грищенко В.И., Осташко Ф.И., Исаченко Е.Ф., Сушко А.Б. Сверхбыстрое замораживание эмбрионов крыс и коров без "классической" эквilibраций 3
- Полетаев Л.И., Макеев Ю.В., Михайлов В.А., Полякова Н.В., Хвостов Л.Я. Измерение диэлектрических свойств биологических тканей на частоте 8,93 ГГц при замораживании . . . 8
- Розанов Л.Ф., Смольянинова Е.И., Гордиенко О.И. К вопросу о роли мембраны и цитоматрикса в развитии криоповреждений клеток 12
- Загоруйко Г.Е., Бабийчук Г.А., Юрченко Т.Н. Возможные механизмы массопереноса жидкости в ишемизированном миокарде при нормотермическом и гипотермическом хранении изолированных сердец 18
- Родионов В.С., Ильинова М.К. Принципиальное различие в характере изменений ненасыщенности жирных кислот нейтральных липидов, глико- и фосфолипидов почек сосны в периоды адаптации к морозу, перезимовки и весенней потери морозоустойчивости . . . 26
- Ханина Л.А., Гучок В.М., Чеканова В.В., Мельник А.П., Луговой В.И. Оксигенирование амидов алифатических низкомолекулярных кислот как экспериментальный подход для получения новых нетоксичных криопротекторов 30
- Пателарос С.В., Сынчикова О.П. Осмотическое поведение эритроцитов при постгипертоническом лизисе 35

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Белочкина И.В., Волкова Н.А. Культивирование изолированных гепатоцитов новорожденных поросят после низкотемпературного консервирования 41
- Севирикова Л.Г., Цуцаева А.А. Влияние условий и продолжительности гипотермического хранения на свойства *Drosophila melanogaster* разных стадий развития 47
- Антонюк В.А. Использование эритроцитов, хранившихся при умеренно низких температурах, для поиска лектинов и оценки их активности 50

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Петрушко М.П. Влияние криопротекторов на жизнеспособность мышинных эмбрионов . . 56

ХРОНИКА

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1994

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Isachenko V.V., Grishchenko V.I., Ostashko F.I., Isachenko E.F., Sushko A.B.</i> Ultrarapid freezing of embryos of rats and cattle without "classic" equilibration	3
<i>Poletayev L.I., Makeyev Yu.V., Mikhailov V.A., Polyakova N.V., Khvostov L.Ya.</i> Measurement of the electrical properties of biological tissues at the frequency of 8.93 GHz	8
<i>Rozanov L.F., Smolyaninova E.I., Gordienko O.I.</i> On the role of the membrane and cytomatrix in the development of cell cryoinjury	12
<i>Zagoruiko G.E., Babiychuk G.A., Yurchenko T.N.</i> On the possible mechanisms of fluid mass-transfer in the ischemized myocardium during normothermic and hypothermic storage of the isolated hearts	18
<i>Rodionov V.S., Ilyinova M.K.</i> Fundamental difference in the nature of changes in the extent of unsaturation of the neutral lipid fatty acids of glyco- and phospholipids of pine buds during adaptation to cold, wintering and spring loss of freeze- hardiness	26
<i>Khanina L.A., Guchok V.M., Chekanova V.V., Melnik A.P., Lugovoj V.I.</i> Oxyethylation of amides of aliphatic low molecular acids as an experimental approach to obtaining new non-toxic cryoprotectants	30
<i>Patelaros S.V., Synchikova O.P.</i> Osmotic behavior of red blood cells during posthypertonic lysis	35

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Belochkina I.V., Volkova N.A.</i> Culturing of isolated hepatocytes of new-born pigs after low temperature preservation	41
<i>Sevryukova L.G., Tsutsayeva A.A.</i> Effect of conditions and duration of hypothermic storage on the properties of <i>Drosophila melanogaster</i> at various stages of development	47
<i>Antonyuk V.A.</i> Application of cryopreserved red blood cells for evaluating activity and searching for plant lectins	50

NEWS IN BRIEF

<i>Petrushko M.P.</i> The effect of cryoprotectants on the viability of mouse embryos	56
---	----

CHRONICLE

DEFENSE OF THESES

Адрес редакции:
310015, Харьков,
ул. Переяславская, 23,
тел. (0572) 72-10-39

Научный редактор *В.И.Луговой*
Редактор *Ф.А.Приходько*
Компьютерный набор и верстка: *Л.В.Смык, А.М.Шаталов*

Подп. в печ. 07.07.94. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.
Тираж 400 экз. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

**В.В.Исаченко, В.И.Грищенко, Ф.И.Осташко,
Е.Ф.Исаченко, А.Б.Сушко**

СВЕРХБЫСТРОЕ ЗАМОРАЖИВАНИЕ ЭМБРИОНОВ КРЫС И КОРОВ БЕЗ “КЛАССИЧЕСКОЙ” ЭКВИЛИБРАЦИИ

Представлен обзор литературы по вопросам витрификации и сверхбыстрого замораживания эмбрионов млекопитающих. На основании обобщения литературных и экспериментальных данных делается вывод о целесообразности использования сверхбыстрого замораживания эмбрионов с целью снижения токсичности криопротекторов. Установлено, что вопрос скорости оттаивания эмбрионов, которые были сверхбыстро заморожены, не является актуальным.

С начала 80-х годов начинается довольно интенсивное изучение вопросов криоконсервации эмбрионов млекопитающих путем быстрого погружения в жидкий азот или в пары азота. Интерес к указанному методу объясняется рядом его преимуществ в сравнении с конвенционным [33]. Высокие скорости снижения температуры (200 °С/мин при быстром и 3000 °С/мин при сверхбыстром методах замораживания) определяют необходимость использования проникающих криопротекторов в высоких концентрациях [1]. Вместе с тем многочисленные литературные данные [5, 15, 22, 23, 31] свидетельствуют о токсических свойствах проникающих криопротекторов в высоких концентрациях. Актуальность вопроса снижения токсического воздействия криопротекторов увеличивается в связи с актуальностью проблемы трансплантации ядер: наиболее пагубно такое воздействие для эмбрионов, находящихся на ранних стадиях развития [23]. Понижение же концентрации проникающих криопротекторов приводит к разрушению интрацеллюлярных протеиновых структур [3, 19]. Вопрос устранения указанной токсичности без снижения криопротективных свойств является наиболее важным в общих проблемах быстрого и сверхбыстрого замораживания и витрификации эмбрионов млекопитающих.

Одним из путей решения этого вопроса является путь частичной дегидратации бластомеров [16], которая приводит к уменьшению количества интрацеллюлярной воды, введением в среду для замораживания непроникающего кристаллообразующего криопротектора. Однако в этом случае наблюдается отрицательное влияние кристаллов, образующихся в процессе консервации-деконсервации эмбрионов. Так, по данным ультраструктурных исследований [32], при замораживании раствора, состоящего из 25%-го глицерина и 1,2-пропандиола, кристаллы не образуются, в то время как замораживание раствора 0,25 М сахарозы и 3 М глицерина сопровождается кристаллообразованием.

В случае, когда в качестве замораживаемых криопротекторов используется только смесь проникающих (витрификация), кристаллообразование отсутствует, но эффект дегидратации протекает неинтенсивно. При замораживании смеси проникающих и непроникающих кристаллообразующих криопротекторов происходит частичная дегидратация бластомеров, что позволяет снизить токсичность проникающих криопротекторов, но наблюдается кристаллообразование со всеми его негативными последствиями.

Таким образом, к проблеме криоконсервации эмбрионов млекопитающих имеется два существенно отличающихся подхода – через витрификацию и через сверхбыстрое замораживание.

Впервые об успешной витрификации мышинных эмбрионов доложено в [21]. В дальнейшем наибольшее количество исследований вопросов витрифи-

кации было проведено на мышинных эмбрионах [2, 18, 21, 24], в том числе на химерных и полуэмбрионах [18].

Была проведена успешная витрификация эмбрионов крысы [8], кролика [25], овцы [26] и крупного рогатого скота [17].

По последним данным результативность развития "*in vitro*" и "*in vivo*" витрифицированных морул и бластоцист крупного рогатого скота приближается к таковой у эмбрионов, замороженных классическим, конвенционным методом [4, 6, 36].

Как и при изучении витрификации, наиболее интенсивно проводятся исследования вопросов быстрого [9, 34] и сверхбыстрого [10] замораживания на эмбрионах мыши. В качестве проникающих криопротекторов используются в основном глицерин, ДМСО, этиленгликоль, пропиленгликоль, ацетамид или смесь из этих криопротекторов. Предпринимались многочисленные попытки использования в качестве непроникающих агентов различных сахаров [1, 10, 29, 30], но большинство исследователей отдает предпочтение сахарозе [27, 28, 35]. В изучении вопросов быстрого и сверхбыстрого замораживания эмбрионов млекопитающих наблюдается заметный прогресс. Выживаемость "*in vitro*" и "*in vivo*" эмбрионов, замороженных этим методом, приближается к выживаемости эмбрионов, замороженных конвенционным методом [11, 14], а по некоторым данным [20] превосходит эти показатели.

Среди работ, посвященных сверхбыстрому замораживанию эмбрионов млекопитающих, особое внимание привлекают результаты исследований с использованием в качестве непроникающего криопротектора полисахарида [11–13]. Этим достигается двоякий эффект: с одной стороны, происходит частичная дегидратация бластомеров, с другой – кристаллообразующий полисахарид (Ficoll) препятствует кристаллизации экстрацеллюлярной воды.

Ранее нами были проведены исследования, направленные на решение вопроса: какой из двух, принципиально отличающихся способов криоконсервации эмбрионов млекопитающих, – витрификацию и сверхбыстрое замораживание – выбрать для более детального изучения, усовершенствования и внедрения в практику [7]. Результаты экспериментов продемонстрировали целесообразность использования способа сверхбыстрого замораживания.

Указанный выше прием, заключающийся во внесении в среду для консервации полимерного осмотически активного вещества, значительно улучшающий результативность сверхбыстрого замораживания эмбрионов, является, по нашему мнению, далеко не единственным моментом, могущим существенно улучшить схему подготовки эмбриона к прямому погружению в жидкий азот.

Так, в работе [11] эмбрионы мыши не подвергались классической 5-, 10-минутной эквilibрации в 0,8–2,0 М растворе проникающих криопротекторов и их смеси, а за 3-минутной обработкой раствором проникающих и непроникающих криопротекторов следовало погружение в жидкий азот.

Целью наших исследований было изучение возможности частичного насыщения бластомеров эмбрионов проникающим криопротектором с одновре-

Т а б л и ц а 1

Результативность сверхбыстрого замораживания крысиных эмбрионов без классической эквilibрации (I-я часть экспериментов)

Группа	Количество	Выживаемость	
		количество	$M \pm m$ (%)
1	217	171	$78,8 \pm 2,8$
2	117	93	$78,6 \pm 3,8$
Контроль	25	22	$88,0 \pm 6,6$

Примечание. $P_{1,2} > 0,1$.

менно (или последовательно) протекающим процессом дегидратации бластомеров, что позволяет снизить токсическое воздействие проникающего криопротектора. Также решался вопрос влияния режима оттаивания замороженных сверхбыстро эмбрионов на их жизнеспособность.

В I-й части экспериментов крысиные 6- и 8-бластомерные эмбрионы в количестве 359 были получены от несуперовулированных самок линии Вистар и разделены на 3 группы. Эмбрионы 1-й группы были заморожены с предварительной 10-минутной эквilibрацией в растворе 10%-го глицерина на среде для культивирования, состоящей из среды Дюльбекко (СССР) с 20% фетальной сыворотки телят, с последующим помещением на 90 с в соломинку, содержащую среду для замораживания (30% глицерин и 70% 1,0 М сахарозы (Украина) на среде культивирования) и погружением в жидкий азот.

Оттаивание эмбрионов 1-й группы было проведено в водяной бане при 37 °С, выведение криопротектора осуществлялось на протяжении 10 мин в 1,0 М растворе сахарозы.

Замораживание и оттаивание эмбрионов 2-й группы было проведено в соответствии с вышеописанным режимом за исключением того, что эмбрионы были помещены на 3 мин в соломинку, содержащую раствор для замораживания (30% глицерина и 70% 1 М сахарозы) и после этого погружены в жидкий азот.

После выведения криопротектора и пятикратной отмывки в растворе Дюльбекко с 20% фетальной сыворотки телят эмбрионы в этой же среде были поставлены для культивирования во влажную камеру на срок 24 ч.

Во II-й части эксперимента при изучении влияния скорости оттаивания замороженных сверхбыстро крысиных эмбрионов на их выживаемость было получено 519 10–12-бластомерных морул от несуперовулированных крыс линии Вистар. Эмбрионы были заморожены путем погружения в жидкий азот после 3-минутной выдержки в растворе, содержащем 30% глицерина, 70% 1,0 М сахарозы на буфере Дюльбекко с 20% фетальной сыворотки телят.

Эмбрионы были разделены на 4 группы. Оттаивание эмбрионов групп 1, 2 и 3 было проведено в водяной бане при 40, 20, и 4 °С соответственно. Оттаивание эмбрионов 4-й группы было проведено на воздухе при комнатной температуре. Выведение криопротектора проводилось на протяжении 3 мин в 1,0 М растворе сахарозы. После пятикратной отмывки в растворе Дюльбекко с 20% фетальной сыворотки телят в этом же растворе эмбрионы были помещены на 21–24 ч во влажную камеру для культивирования.

В III-й части эксперимента при получении, криоконсервации и пересадках эмбрионов крупного рогатого скота были использованы доноры и реципиенты молочных пород. Обработка доноров на суперовуляцию, извлечение эмбрионов, подготовка реципиентов, пересадка деконсервированных эмбрионов проводилась по стандартным методикам с использованием гонадотропина “Фоликотропин” (Чехословакия) и простагландина Ф₂ альфа “Ремофан” (Чехословакия). Было извлечено 107 эмбрионов на стадии морула и компактная морула, разделенных на 2 группы. Эмбрионы были заморожены и деконсервированы в точном соответствии с вышеописанными методиками, по которым были заморожены соответствующие 1-я и

Т а б л и ц а 2

Значение скорости оттаивания замороженных сверхбыстро крысиных эмбрионов

Группа	Количество	Выживаемость	
		количество	М±m (%)
1	151	131	86,7±2,9
2	149	127	85,2±2,9
3	82	70	85,4±3,9
4	137	116	84,7±3,0

Примечание. Р_{1,2,3,4} >0,1

Т а б л и ц а 3

Результативность сверхбыстрого замораживания коровьих эмбрионов без классической эквilibрации (III-я часть экспериментов)

Группа	Количество	Выживаемость	
		количество	М±m (%)
1	52	22	42,3±6,9
2	55	23	41,8±6,6

Примечание. Р_{1,2} >0,1.

2-я группы крысиных эмбрионов в I-й части экспериментов.

После выведения криопротектора и отмывки эмбрионов в растворе Дюльбекко с 20% фетальной сыворотки теленка эмбрионы были пересажены телкам-реципиентам.

Результаты культивирования крысиных эмбрионов, а также приживляемости трансплантированных коровьих представлены в табл. I-3.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что вопрос скорости оттаивания замороженных сверхбыстро крысиных эмбрионов не является актуальным. При сверхбыстром замораживании эмбрионов млекопитающих, при использовании проникающих криопротекторов в высоких концентрациях, полное их проникновение для связывания интрацеллюлярной воды не является обязательным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abas-Mazni O., Valdes C.A., Takahashi Y. et al. Quick freezing of mouse embryos using ethylene glycol with lactose or sucrose // *Anim. Reprod. Sci.* – 1990. – 22. – P. 161–169.
2. Bielanski A. Survival *in vitro* of zona pellucida – free mouse embryos after cooling by conventional two-step or vitrification methods // *Cryo-Letters.* – 1987. – 8. – P. 294–301.
3. Chaw J.M., Kola I., McFarlane R.D., Trounson A.O. An associate between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and ice-forming properties of the cryoprotective solution // *J. Reprod. Fertil.* – 1991. – 91. – P. 9–18.
4. Dobrinsky J.R., Stice S.L., Phillips P.E. et al. Development of IVM-IVF bovine embryos following vitrification delution treatments // *Theriogenology.* – 1992. – 37. – P. 202.
5. Fahy G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology // *Cryobiology.* – 1986. – 23. – P. 1–13.
6. Ishimori H., Miki Y., Kishi M. et al. Vitrification of bovine embryos // *Theriogenology.* – 1992. – 37. – P. 227.
7. Isachenko V.V., Ostashko F.I., Isachenko E.F. Vitrification and ultra-rapid freezing of rat embryos // *Theriogenology.* – 1992. – 37. – P. 227.
8. Kono T., Susuki O., Tsunoda Y. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification // *Cryobiology.* – 1988. – 25. – P. 170–173.
9. Kasai M., Niwa K., Iritani A. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly // *J. Reprod. Fertil.* – 1980. – 59. – P. 51–56.
10. Krag K.T., Koether I.M., Wright R.W. A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen // *Theriogenology.* – 1985. – 23. – P. 199 (Abst.).
11. Kasai M., Komi A., Takakamo A. et al. A simple method for mouse embryos cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability // *J. Reprod. Fertil.* – 1990. – 89. – P. 91–98.
12. Kasai M., Hamaguchi Y., Zhu S.E. et al. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method // *Biol. Reprod.* – 1992. – 46. – P. 1042–1046.
13. Kasai M., Nishimori M., Zhu S.E. et al. Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution at various temperatures // *Biol. Reprod.* – 1992. – 47. – P. 1134–1139.
14. Landa V. Cryopreservation of mouse zona-free embryos and embryos exposed to biopsy and reconstruction by vitrification in microdrops // *Folia. Biol.* – 1991. – 37. – P. 171–178.
15. Li R., Trounson A. Rapid freezing of the mouse blastocyst: effects of cryoprotectants and of time and temperature of exposure to cryoprotectants before direct plunging into liquid nitrogen // *Reprod. Fertil. Dev.* – 1991. – 3. – P. 175–183.
16. Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium and non-equilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell. Biophysics.* – 1990. – 17. – P. 53–92.
17. Massip A., Van Der Zwalm P., Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos // *Theriogenology.* – 1987. – 27. – P. 69–79.
18. Nagashima H., Kobayashi K., Yamakawa H., Ogawa S. Cryopreservation of mouse half morulae and chimeric embryos by vitrification // *Mol. Reprod. Develop.* – 1991. – 30. – P. 220–225.
19. Ng S.C., Bongso A., Sathananthan A.H. et al. Chromosome analysis of two-cell mouse embryos frozen by slow and ultrarapid method using two different cryoprotectants // *Fertil. Steril.* – 1988. – 49. – P. 908–912.
20. Rayos A.A., Takahashi Y., Hishinuma M., Kanagawa H. Quick freezing of one-cell mouse embryos using ethylene glycol with sucrose // *Theriogenology.* – 1992. – 37. – P. 595–603.
21. Rall W., Fahy G. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification // *Nature.* – 1985. – 313. – P. 573–575.
22. Rall W. F., Wood M.J., Kirby C., Whittingham D.G. Development of mouse embryos at cryopreserved by vitrification // *J. Reprod. Fertil.* – 1987. – 80. – P. 499–504.

23. Shaw J.M., Trownson A.O. Effect of dimethyl sulfoxide and protein concentration on the viability of two-cell mouse embryos frozen with a rapid freezing technique // *Cryobiology*. – 1989. – 26. – P. 413–421.
24. Scheffen B., Van Der Zwalm P., Massip A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification // *Cryo-Letters*. – 1986. – 7. – P. 260–269.
25. Smorag Z., Gaida B., Wieczorek B., Jura J. Stage dependent viability of vitrified rabbit embryos // *Theriogenology*. – 1989. – 31. – P. 1227–1231.
26. Szell A., Zhang J., Handson R. Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at -180°C // *Reprod. Fertil. Develop.* – 1990. – 2. – P. 613–618.
27. Szell A., Shelton J.N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen // *J. Reprod. Fertil.* – 1986. – 78. – P. 699–703.
28. Sathananthan A.H., Ng S.C., Trownson A.O. et al. The mitotic spindles of mouse oocytes and embryos // *Gamete Res.* – 1988. – 21. – P. 385–401.
29. Takahashi Y., Kanagawa H. Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapour : effects of sugar // *Jap. J. Vet. Res.* – 1985. – 33. – P. 141–144.
30. Takahashi Y., Kanagawa H. Effects of equilibration period on the viability of frozen-thawed mouse embryos after rapid freezing // *Mol. Reprod. Dev.* – 1990. – 26. – P. 105–110.
31. Van Der Zwalm P., Gaurois B., Ectors F.Jr. et al. Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts // *Theriogenology*. – 1988. – 30. – P. 1177–1183.
32. Valdez C.A., Abas Mazni O., Kanagawa H., Fujikawa S. Confirmation by cryo-electron microscopy of the absence of crystalization using a vitrification solution // *Cryo-Letters*. – 1990. – 11. – P. 351–358.
33. Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C // *Science*. – 1972. – 187. – P. 411–414.
34. Wood M.J., Farrant J. Preservation of mouse embryos by two-step freezing // *Cryobiology*. – 1980. – 17. – P. 178–180.
35. Williams T.J., Johnson S.E. A method for one-step freezing of mouse embryos // *Theriogenology*. – 1986. – 26. – P. 125–133.
36. Yang N.S., Lu K.H., Gordon I., Polge C. Vitrification of bovine blastocysts produced *in vitro* // *Theriogenology*. – 1992. – 37. – P. 326.

Ин-т животноводства УААН, г. Харьков
Ин-т проблем криобиологии и криомедицины
АН Украины, г. Харьков

Поступила 02.03.93

В.В.ІСАЧЕНКО, В.І.ГРИЩЕНКО, Ф.І.ОСТАШКО, Є.Ф.ІСАЧЕНКО, О.Б.СУШКО
**НАДШВИДКЕ ЗАМОРОЖУВАННЯ ЕМБРІОНІВ ЩУРІВ І КОРІВ БЕЗ
"КЛАСИЧНОЇ" ЕКВІЛІБРАЦІЇ**

Інститут тваринництва УААН, м. Харків
Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Подано огляд літератури з питань вітрифікації і надшвидкого заморожування ембріонів ссавців. На підставі узагальнення літературних даних зроблено висновок про доцільність використання надшвидкого заморожування ембріонів з метою зниження токсичності кріопротекторів. Встановлено, що питання швидкості відтавання ембріонів, що були надшвидко заморожені, не є актуальним.

V.V.ISACHENKO, V.I.GRISHCHENKO, F.I.OSTASHKO, E.F.ISACHENKO, A.B.SUSHKO
**ULTRARAPID FREEZING OF EMBRYOS OF RATS AND CATTLE
WITHOUT "CLASSIC" EQUILIBRATION**

Institute of Animal Science of the Ukrainian Agricultural Academy of Sciences,
Kharkov
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian
Academy of Sciences, Kharkov

A review of the literature, dealing with the problems of vitrification and ultrarapid freezing of mammalian embryos, is presented in the given report. On the basis of this review and the experimental data available we conclude on the expediency of applying snap freezing of embryos for reducing cryoprotectant toxicity. The problem of thawing embryos, which were ultrarapid-frozen, presents no difficulties.

This One



JLKC-3DZ-NECH

Матеріал, захищений авторським правом

**Л.И. Полетаев, Ю.В. Макеев, В.А. Михайлов,
Н.В. Полякова, Л.Я. Хвостов**

ИЗМЕРЕНИЕ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ НА ЧАСТОТЕ 8,93 ГГц ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ

Ввиду перспективности использования СВЧ энергии при размораживании биотканей и в СВЧ диагностике при криохирургии становится актуальным решение задач согласования контактных антенн (аппликаторов) с замороженными биообъектами. С этой целью проведены исследования диэлектрических свойств мышечной и жировой тканей собаки в интервале температур, включающем фазовый переход образования льда (20...–30 °С). Исследования проводились в волноводной установке методом короткого замыкания. Оценена погрешность измерения, в эксперименте предусмотрена компенсация погрешности, обусловленной линейным расширением волноводов.

В последние годы в медицине для терапии, диагностики, отогрева криоконсервированных тканей и т.д. находит применение энергия сверхвысоких частот (СВЧ). Для уменьшения потерь энергии СВЧ между биотканью и излучающим (приемным) устройством, т.е. наилучшего согласования, необходимо знание модуля диэлектрической проницаемости биологических тканей.

В настоящее время в диапазоне СВЧ диэлектрические свойства биологических тканей при комнатной температуре и температуре человеческого тела достаточно хорошо изучены [3, 6], однако в криобиологии практический интерес представляет интервал, включающий температуры образования льда и более низкие.

Известен ряд работ по исследованию диэлектрических свойств охлажденных [10] и замороженных [8, 9] биологических тканей, а также некоторых пищевых продуктов животного происхождения в диапазоне СВЧ [7], но опубликованные данные не дают возможности представить целостную картину изменения диэлектрических параметров, недостаточно подробно исследованы диэлектрические свойства жировых тканей (тканей с малым содержанием воды). Изучение этого и ставилось в качестве задачи для данной работы.

Выбор частоты основывался на результатах расчетов, сделанных ранее [5], где критерием для определения оптимального для медицины диапазона послужило требование одновременного удовлетворения двух противоречивых условий: получение высокой разрешающей способности и локализации СВЧ энергии на значительной глубине.

Диэлектрическая проницаемость биологических тканей является комплексной величиной и определяется их составом, строением, концентрацией и процентным содержанием клеточного и межклеточного вещества, а также внешней воздействующей частотой, и может быть представлена в виде:

$$\epsilon^* = \epsilon_0 (\epsilon' - j\epsilon'') \quad (1)$$

где $\epsilon_0 = 8,8 \cdot 10^{-12}$ Ф/М – диэлектрическая проницаемость вакуума, ϵ' – действительная часть диэлектрической проницаемости, $\epsilon'' = \delta/\omega$ – мнимая часть диэлектрической проницаемости, δ – проводимость, $\omega = 2\pi f$ – рабочая частота.

Тангенс угла диэлектрических потерь определяется как $\operatorname{tg} \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'}$.

В качестве объекта исследований использовались мышечные и жировые ткани собаки. Для определения ϵ^* был применен метод полного заполнения сечения волновода [2], основанный на измерении смещения минимума стоячей волны l при внесении образца толщиной d в короткозамкнутый волновод. Нахождение действительной и мнимой частей диэлектрической проницаемости осуществлялось решением комплексного трансцендентного уравнения,

после подстановки в него экспериментальных данных d , l и ширины удвоенного минимума стоячей волны l' . Уравнение решалось относительно действительной α и мнимой β составляющих постоянной распространения волны в заполненном образцом волноводе: $\gamma = \alpha + i\beta$, методом последовательных приближений (градиентного спуска) после разделения действительной и мнимой частей.

$$\frac{\operatorname{th} \gamma_1 \cdot d}{\gamma_1 \cdot d} = -j \frac{\lambda_{в.в}}{2\pi d} \cdot \frac{\text{КБВ} - j \operatorname{tg} \Theta}{1 - j \text{КБВ} \cdot \operatorname{tg} \Theta}, \quad (2)$$

$$\Theta = \frac{2\pi}{\lambda_{в.в}} \left(\frac{\lambda_{в.в}}{2} - d - l \right) \quad (3)$$

где $\lambda_{в.в}$ — длина волны в волноводе, КБВ — коэффициент бегущей волны,

$$\text{КБВ} = \frac{\sin(\pi l' / \lambda_{в.в})}{\sqrt{2 - \cos^2(\pi l / \lambda_{в.в})}}. \quad (4)$$

Нахождение a и b осуществлялось с точностью до $5 \cdot 10^{-5}$ от искомой величины.

Действительная и мнимая части, а также модуль диэлектрической проницаемости вычислялись как

$$\epsilon' = \frac{1 + (\alpha^2 - \beta^2) (\lambda_{кр} / 2\pi)^2}{1 + (\lambda_{кр} / \lambda_{в.в})^2}, \quad (5)$$

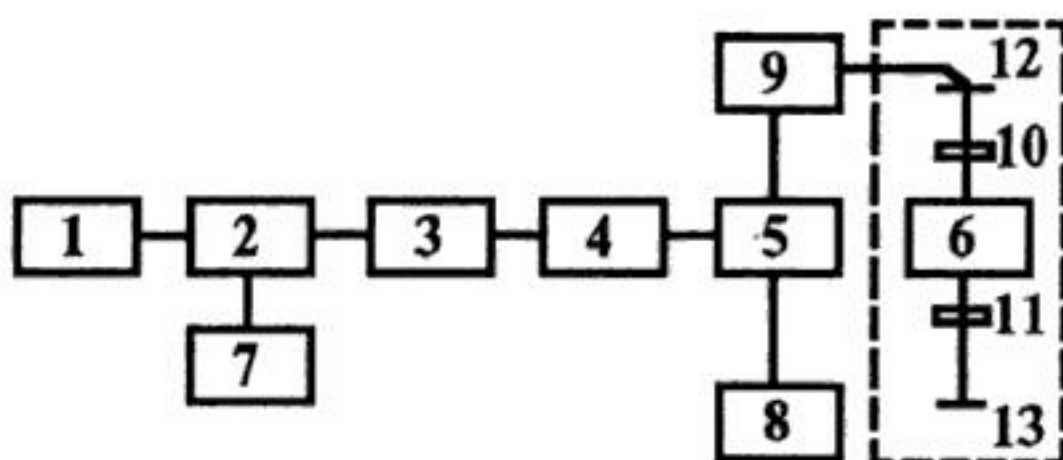
$$\epsilon'' = \frac{2\alpha\beta (\lambda_{кр} / 2\pi)^2}{1 + (\lambda_{кр} / \lambda_{в.в})^2}, \quad (6)$$

где $\lambda_{кр}$ — критическая длина волны в волноводе,

$$|\epsilon^*| = \sqrt{(\epsilon')^2 + (\epsilon'')^2}. \quad (7)$$

Структурная схема установки, реализующей выбранный метод измерения, приведена на рис. 1.

Рис. 1. Структурная схема экспериментальной установки: 1 — СВЧ-генератор; 2 — коаксиально-волноводный ответвитель; 3 — волноводный вентиль; 4 — аттенюатор; 5 — измерительная линия; 6 — волноводный переключатель; 7 — частотомер; 8 — измеритель отношения напряжений; 9 — потенциометр постоянного тока; 10 — «рабочий» к.з. волновод; 11 — «компенсирующий» к.з. волновод; 12 — термопара; 13 — термостат



Она состоит из СВЧ-генератора 1 (Г4-111), коаксиально-волноводного ответвителя 2, волноводного вентиля 3, аттенюатора 4 (Д5-5), измерительной линии 5 (Р2-4), волноводного переключателя 6, электронного частотомера 7 (ЧЗ-46), измерителя отношения напряжений 8 (В8-6), потенциометра постоянного тока 9 (ПП-63), «рабочего» 10 и «компенсирующего» 11 короткозамкнутых отрезков волновода, иглы с термопарой 12 и термостата 13.

Для предотвращения конденсации влаги внутри волновода установлены тонкие пенопластовые перегородки. С целью компенсации коэффициента линейного расширения при перепаде температур короткозамкнутый отрезок волновода в измерительной установке был заменен двумя идентичными, подключаемыми поочередно к регулярному тракту с помощью волноводного переключателя 6 (рис. 1). Один из короткозамкнутых отрезков 10 являлся «рабочим» (в него помещался образец), другой — «компенсирующим», позволяющим учитывать изменение длины волновода 10. Таким образом, температурные изменения линейных размеров волновода в эксперименте не влияли на результаты измерений. Температура образца определялась медь-константановой термопарой, вмонтированной в медицинскую иглу 0,9 мм, вводимую в

контакт с образцом через отверстие в боковой стенке волновода. Для приготовления образцов делались срезы биоткани толщиной от 0,5 мм до 1,0 мм из мышечной ткани и от 1,0 мм до 1,5 мм из жировой ткани.

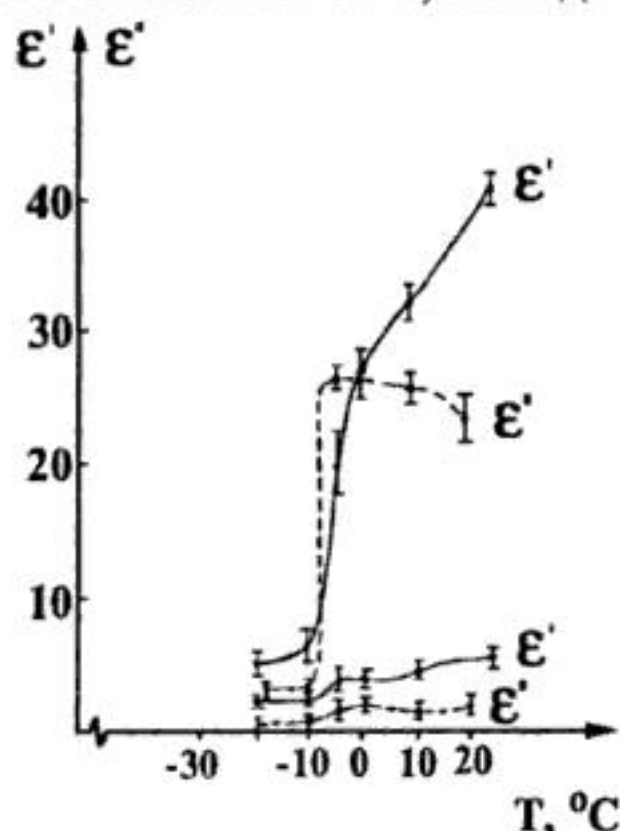


Рис. 2. Зависимости действительной и мнимой частей диэлектрической проницаемости мышечной и жировой тканей собаки от температуры

Здесь в области приблизительно -8°C наблюдается увеличение диэлектрической проницаемости, выявленное достоверно не во всех экспериментах, поскольку происходит оно в узком интервале температур $1 \div 2^{\circ}\text{C}$ и может не наблюдаться в точках измерений. Первые сведения о подобных явлениях получены при резонансном методе измерения диэлектрической проницаемости. Согласно ранее опубликованным данным [4], в этом интервале при понижении температуры вначале происходит переохлаждение жидкости, входящей в состав биоткани, до температуры $\sim -8^{\circ}\text{C}$. Затем начинается процесс образования кристаллов льда, что приводит к повышению температуры ее до $-2^{\circ}\text{C} \dots -3^{\circ}\text{C}$ за счет так называемого скрытого тепла кристаллизации. После стадии перехода образца в твердое состояние (период, характерный неизменностью температуры) происходит дальнейшее снижение температуры.

Третий интервал от -10°C и ниже (измерения производились до $-20 \dots -30^{\circ}\text{C}$) характерен практически неизменной диэлектрической проницаемостью. Зависимость диэлектрической проницаемости ϵ' жировых тканей по характеру близка к зависимости ϵ' мышечных тканей, однако из-за меньшего содержания в них влаги имеет менее выраженный характер.

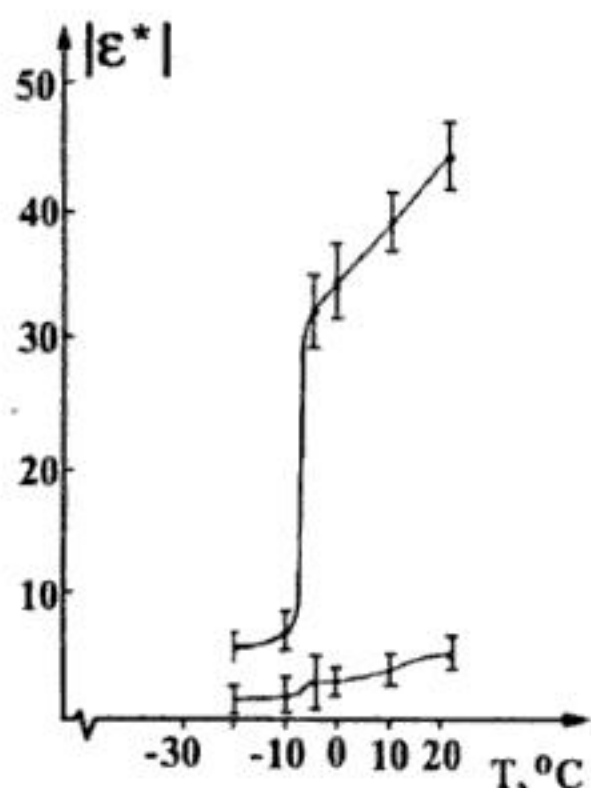


Рис. 3. Зависимость модуля диэлектрической проницаемости мышечной и жировой тканей собаки от температуры

На рис. 2 приведены графики полученных экспериментально зависимостей действительной ϵ' и мнимой ϵ'' частей диэлектрической проницаемости мышечной и жировой тканей собаки от температуры.

В качестве образцов использовались как свежесеченные, так и ранее замороженные ткани, однако достоверных различий между ними в характере изменения ϵ' от температуры не наблюдалось. Кривую зависимости ϵ можно разбить на три интервала.

Первый интервал от 22 до 0°C характерен достаточно быстрым изменением диэлектрической проницаемости ϵ' , причем ближе к 0°C крутизна уменьшается.

Наибольшее изменение диэлектрической проницаемости наблюдается в интервале температур от 0 до -10°C (второй интервал).

Кривую зависимости ϵ'' мышечной ткани также можно разбить на три аналогичных характерных интервала, причем только в интервале от 22 до -5°C наблюдается отличие от ϵ' , выражающееся в увеличении потерь.

Мнимая часть диэлектрической проницаемости ϵ'' жировых тканей имеет слабую зависимость потерь от температуры.

Кривые полученных зависимостей диэлектрической проницаемости достаточно хорошо согласуются с ранее опубликованными данными [1], однако тангенс угла диэлектрических потерь для мышечной ткани при нормальных условиях несколько выше, чем в [11], что может быть объяснено более высоким процентным содержанием жидкости в исследуемых нами образцах.

Кривые зависимости модуля диэлектрической проницаемости мышечной и жировой тканей собаки на частоте $f = 8,93$ ГГц приведены на рис. 3.

Численные результаты измерений действительной, мнимой частей и модуля диэлектрической проницаемости мышечной и жировой тканей собаки приведены в таблице.

Т а б л и ц а

Диэлектрические характеристики мышечных и жировых тканей собаки в диапазоне температур от 22 °С до замороженного состояния

Наименование параметра	Мышечная ткань	Жировая ткань
Пределы изменения диэлектрической проницаемости в диапазоне температур (усредненные значения):		
$ \epsilon^* $ – модуль	$47,3 \pm 1,0$... $5,7 \pm 1,0$	$4,6 \pm 0,4$... $1,7 \pm 0,3$
ϵ' – действительная часть	$40,6 \pm 1,1$... $5,4 \pm 1,3$	$4,4 \pm 0,3$... $1,6 \pm 0,4$
ϵ'' – мнимая часть	$24,1 \pm 1,7$... $1,8 \pm 1,7$	$1,4 \pm 0,7$... $0,4 \pm 0,3$
Относительное изменение диэлектрической проницаемости в диапазоне температур:		
$ \epsilon^* $ – модуль	8,3	2,7
ϵ' – действительная часть	7,5	2,8
ϵ'' – мнимая часть	13,4	3,5
Тангенс угла диэлектрических потерь в диапазоне температур	0,59 ... 0,33	0,32 ... 0,25

Величина инструментальной погрешности составила $\pm 7\%$, а остальной разброс является результатом неоднородности свойств измеряемых образцов, естественно максимальный в области наибольшей крутизны зависимости диэлектрической проницаемости от температуры.

Полученные данные можно использовать для решения задач согласования СВЧ антенн с биологическими тканями в интервале температур, содержащем фазовый переход воды в лед.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беттсон Н.Е., Олссон Т. СВЧ-нагрев в пищевой промышленности // ТИИЭР. – 1974. – 62, N. 1.
2. Брант А.А. Исследование диэлектриков на сверхвысоких частотах. – М.: Гос. изд-во физ.-мат. лит-ры, 1963.
3. Джонсон С.С., Гай А.В. Воздействие неионизирующего электромагнитного излучения на биологические среды и системы // ТИИЭР. – 1972. – 60, N. 6.
4. Криохирurgia / Под ред. Э.И.Канделя. – М.: Медицина, 1974. – 303 с.
5. Лин К.Д. Оптимизация частоты при СВЧ-визуализации биологических тканей // ТИИЭР. – 1985. – 73, N. 2.
6. Шван Х.П., Фостер К.Р. Воздействие высокочастотных полей на биологические системы: Электрические свойства и биологические механизмы // ТИИЭР. – 1980. – 68, N. 2.
7. Beugtsso N.E., Risman P.O. Dielectric properties of foods at 3 GHz as determined by a cavity perturbation technique II. Measurements on food material // J. Micr. Power. – 1971. – 6, N. 2. – P. 107.
8. Burdette E.C., Brown K., Karow A.M., Wiggins. Microwave thawing of frozen kidneys a theoretically based experimentally – effective design // Cryobiology. – 1980. – 17, N. 4. – P. 393–402.
9. Burdette E.C., Karow A.M. Kidney model for study electromagnetic thawing // Cryobiology. – 1978. – 15, N. 2. – P. 142–151.
10. Foster K.R., Schepps T.L. Dielectric properties of tumor and normal tissue at radio through microwave frequencies // J. Microwave Power. – 1981. – 16, N. 2. – P. 107–119.
11. Karolber B.D., Behari T., Prim A. Biological Tissues characterization at Microwave frequencies // IEEE Transaction. – 1985. – MTT-33, N.1. – P. 64–66.

Всесоюзный научно-исслед. и испытательный
ин-т медицинской техники г. Москва

Поступила 16.10.89

Л.І.ПОЛЕТАЄВ, Ю.В.МАКЕЄВ, В.А.МИХАЙЛОВ, Н.В.ПОЛЯКОВА, Л.Я.ХВОСТОВ

ВИМІР ДІЕЛЕКТРИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИН НА ЧАСТОТІ 8,93 ГГц ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ

Всесоюзний науково-дослідний і випробний інститут медичної техніки,
м. Москва

У зв'язку з перспективністю використання СВЧ енергії при розморожуванні біотканин і у СВЧ діагностиці при кріохірургії стає актуальним вирішення завдань погодження контактних антен (аплікаторів) з замороженими біооб'єктами. З цією метою проведено дослідження діелектричних властивостей м'язної і жирової тканин собаки в інтервалі температур, який включає фазовий перехід утворювання льоду (20...–30 °С). Дослідження проводились у хвильовідній установці методом короткого замикання. Оцінено погрішність вимірювання, в експерименті передбачено компенсацію погрішності, обумовленої лінійним розширенням хвильоводів.

L.I.POLETAYEV, Yu.V.MAKEYEV, V.A.MIKHAILOV, N.V.POLYAKOVA, L.Ya.KHVOSTOV

MEASUREMENT OF THE ELECTRICAL PROPERTIES OF BIOLOGICAL TISSUES AT THE FREQUENCY OF 8.93 GHz

All-Union Research and Testing Institute of Medical Equipment, Moscow

Since application of the UHF energy for thawing of biological tissues and for diagnostic purposes in cryosurgery seems promising, the task of matching the contact antennae (applicators) with frozen biological systems becomes very urgent. The present report deals with investigating dielectric properties of muscular and fatty tissue of the dog in the range of temperatures, including phase transition of ice-nucleation (20...–30 °C). The investigations were conducted with a waveguide device using a method of short circuit. The measurement error was determined, and the experimental design involves compensation of the error, caused by a linear expansion of the waveguides.

УДК 57.043 : 576.311.32

Л.Ф.Розанов, Е.И.Смолянинова, О.И.Гордиенко

К ВОПРОСУ О РОЛИ МЕМБРАНЫ И ЦИТОМАТРИКСА В РАЗВИТИИ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ КЛЕТОК

На основании проведенного анализа литературных и собственных данных авторы предлагают схему развития криоповреждений клеток под действием двух основных повреждающих факторов: внутриклеточной кристаллизации и дегидратации. Учитывая, что повреждения при нарушении мембранной проницаемости реализуются, как правило, через набухание клеток, авторы проводят сравнительную оценку набухания эмбрионов мыши в средах различного состава и, анализируя полученные данные с позиции мембранной теории проницаемости, показывают, что наблюдаемые отклонения в осмотическом поведении цитоматрикса могут быть интерпретированы как реакция внутриклеточного геля.

Основу защиты большинства биологических объектов составляют ограничение уровня дегидратации клеток и подавление внутриклеточного кристаллообразования.

Из кинетической теории кристаллообразования [4] следует, что подавить внутриклеточную кристаллизацию можно путем повышения вязкости внутриклеточных растворов и снижения до минимума уровня переохлаждения цитоплазмы до момента приобретения ею требуемой для стеклования консистенции. Первое может быть осуществлено насыщением клетки криопротектором и (или) ее дегидратацией, приводящей к повышению вязкости внутриклеточной среды как за счет концентрирования растворов, так и за счет ограничения размеров внутриклеточных компартментов (в последнем случае вязкость повышается, в частности, благодаря капиллярным эффектам). В свою очередь, уровень переохлаждения цитоплазмы в процессе внутриклеточного фазового перехода “вода – лед” снижается благодаря дегидратации, которая понижает температуру плавления внутриклеточного раствора.

Ограничения, накладываемые на темп дегидратации температурой, геометрическими и транспортными характеристиками клеток, определяют зависимость ее уровня и связанной с ним степени внутриклеточного переохлаждения от режимов замораживания. Существующий благодаря этой зависимости оптимальный режим замораживания может быть определен как максимально быстрое охлаждение, обеспечивающее минимальное переохлаждение цитоплазмы в зоне фазового перехода “вода – лед”.

В предположении, что дегидратация клеток до минимального объема может обеспечить эффективное подавление внутриклеточного кристаллообразования, можно представить себе криозащиту, основанную на подборе такого режима замораживания, при котором близкий к минимальному клеточный объем будет достигнут только при температурах, лимитирующих дальнейшее обезвоживание.

Гетерогенность клеточной популяции, проявляющаяся в различной динамике дегидратации отдельных клеток, приведет к тому, что оптимальная скорость охлаждения для популяции в целом может оказаться неоптимальной для значительной части клеток этой популяции и, следовательно, ей будет соответствовать довольно низкий процент сохранности. Эту ситуацию несколько смягчает то обстоятельство, что, благодаря вероятностному характеру внутриклеточного кристаллообразования и реализации дегидратационных повреждений, оптимум сохранности каждой отдельной клетки не будет соответствовать строго определенной скорости охлаждения, захватывая определенный диапазон скоростей. Криопротекторы расширяют этот диапазон. С одной стороны, они способствуют витрификации содержимого клеток, не достигая минимального объема, чем обеспечивают их криозащиту при более высоких, чем оптимальная, скоростях охлаждения, с другой – препятствуют чрезмерной дегидратации клеток при более низких скоростях охлаждения, благодаря, главным образом, увеличению объемной доли неводного содержимого клеток и повышению осмотической активности внутриклеточной среды [8].

Неоптимальные условия охлаждения чреваты либо внутриклеточной кристаллизацией, либо достижением клеткой опасного уровня дегидратации. Как следствие действия этих факторов, развиваются структурно-функциональные нарушения, затрагивающие, в итоге, как мембрану клеток, так и цитоплазму. В частности, дегидратация до критического уровня приводит к пертурбациям в структуре мембраны [1, 7] и делает ее проницаемой для непроницающих в норме веществ. Это будет способствовать нарушению устанавливаемого дегидратацией квазистационарного равновесия на мембране, характеризуемого равенством химпотенциалов вне- и внутриклеточной воды и неравенством химпотенциалов каждого из растворенных в ней веществ. Если мембрана остается непроницаемой для внутриклеточных макромолекул и ионов, став проницаемой для внеклеточных молекул и ионов, объем клетки будет увеличиваться за счет потока в нее внеклеточных веществ и сопутствующего потока воды, поддерживающего равновесие ее химических потенциалов на мембране. При этом можно ожидать, что исходный объем будет достигнут клеткой к моменту, когда разность химпотенциалов проникающего вещества на мембране снизится до уровня химпотенциала изотонической среды. Потеря клеткой ионов будет способствовать снижению этого уровня и уменьшению скорости восстановления клеточного объема. С позиций мембранной теории массопереноса точка достижения исходного объема на кривой его временной зависимости не имеет особенностей, и, по мере дальнейшего поступления внеклеточного раствора в клетку, увеличение ее объема продолжается как набухание. Если уровень набухания не ограничен добавлением во внеклеточную среду непроницающей добавки, его итогом может стать, после использования мембраной резервного запаса площади, возникновение в ней крупных



Рис. 1. Схематическая иллюстрация данных о кинетике осмотических реакций эмбрионов мыши в средах различного состава.

пор и разрывов в результате продуцируемого гидростатическим давлением растяжения. Таким образом, набухание может стать причиной потери клеткой биологически важных макромолекул и ионов. Можно также ожидать, что набухание приведет к дезинтеграции и дезориентации клеточных структур, а проникновение в клетку концентрированного внеклеточного раствора – к необратимым изменениям конформации внеклеточных белков.

В связи с известной способностью мембранных структур к репарации [6] особое значение приобретает момент, когда дегидратированная до минимального объема клетка начинает увеличивать свой объем вследствие нарушения мембранной проницаемости. Если это происходит на этапе замораживания, поступающий в клетку гипертонический внеклеточный раствор способен стать как причиной коагуляции цитоплазмы [9], так и источником дополнительного набухания клеток при последующем отогреве. Если же внеклеточный раствор начинает поступать в клетку с нарушенной проницаемостью при отогреве, вероятность ее насыщения растворами высоких концентраций уменьшается по мере увеличения скорости отогрева. В этих условиях любой механизм, блокирующий проникновение в клетку внеклеточного раствора до возвращения ее в зону температур, где становится возможной репарация мембран, может оказаться криозащитным.

В отличие от внеклеточного кристаллообразования, при внутриклеточном можно ожидать инициирования повреждений не только через нарушение мембранной проницаемости, но и через нарушения в цитоплазме при неповрежденной мембране. Если такие нарушения приведут при отогреве к повышению осмотической активности внутриклеточной среды, это также может стать причиной набухания клеток.

Учитывая, что набухание практически неизбежно должно сопровождать отклонение условий процедуры замораживания – отогрева от оптимальных и, принимая во внимание, что оно является следствием не только нарушения мембранной проницаемости, но и нарушения осмотического равновесия на мембране за счет более высокой токсичности внутриклеточной среды (или бо-

лее низкой тоничности внеклеточной, что имеет место, в частности, на этапе удаления криопротектора из деконсервированных клеток), мы изучали особенности этой реакции клеток в растворах, содержащих различные концентрации димексида и хлористого натрия.

Объектом исследования служили эмбрионы мыши линии CBWA, выделяемые по стандартной методике [10]. Исследования проводились методом микрорефотометрии [2]. При анализе полученных данных принимался в расчет двухфазный характер набухания эмбрионов: набухание бластомера как целого (с сохранением связи мембраны с цитоматриксом) и продолжение набухания за счет роста мембранных “пузырей” (“волдырей”). Существенное различие между последними заключается в том, что при образовании и росте “пузыря” отслоение мембраны происходит в локализованных участках, а “волдырь” захватывает значительную часть поверхности клетки.

На рис. 1 схематично систематизированы данные о кинетике изменения объема цитоматрикса (сплошные линии) в различных средах в сопоставлении с прогнозируемой мембранной теорией проницаемости кинетикой изменения объема клеток (пунктирные кривые).

Стрелками отмечен момент начала роста мембранных пузырей (волдырей). Серии экспериментов (А-Е) на рис. 1 являют собой примеры набухания клеток:

А – в изотоническом растворе димексида – проникающего криопротектора;

В – в гипотоническом (двухкратное разведение изотонического раствора) растворе хлористого натрия – в норме непроницающего вещества;

С – в гипертоническом растворе димексида;

Д – в растворе, содержащем гипертоническую концентрацию димексида и гипотоническую (двухкратное разведение изотонического раствора) концентрацию хлористого натрия;

Е – в гипертоническом растворе хлористого натрия (после нарушения мембранной проницаемости).

Во всех приведенных случаях (кроме В) набухание связано с поступлением в клетку воды только в результате поступления в нее внеклеточных растворенных веществ.

Полученные данные показывают, что набухание цитоматрикса эмбрионов в средах различного состава ограничено, но не прекращением действия движущей силы набухания, о чем свидетельствует рост мембранных пузырей (волдырей) – продолжение осмотической реакции после прекращения набухания цитоматрикса.

В условиях, когда мембранная теория прогнозирует набухание клеток, ограничиваемое, главным образом, образованием в мембране, израсходовавшей запас своей поверхности, пор и разрывов (случаи А, С и Е), набухание цитоматрикса ограничено превышением исходного объема клетки соответственно на 80, 25 и 110%. В случае А – исходная изотония проникающего вещества – набухание начинается с задержкой (до 1 мин), обусловленной, возможно, не только кинетикой проникновения димексида в бластомеры, но и сопротивлением цитоматрикса набуханию. Определяющую роль в таком сопротивлении может играть структура цитоматрикса. В связи с этим и различия в уровне набухания цитоматрикса отдельных клеток в одинаковых условиях могут быть связаны с различиями в их структуре. Характерная для случая А задержка между моментом прекращения набухания цитоматрикса до (1 мин) и продолжением набухания клетки как целого за счет образования и роста мембранных волдырей может свидетельствовать о том, что набухший цитоматрикс способен сдерживать поток в клетку внеклеточного раствора до момента разрыва связи мембраны с его структурой. Дальнейшее увеличение объема клетки за счет мембранных волдырей соответствует, в основных чертах, прогнозу мембранной теории. Так, рост волдырей в случае А продолжается до

их контакта с зоной пеллюцида, после чего мембрана оказывается еще способной преодолевать эту зону в форме растущего на ее поверхности пузыря, а в случае С рост мембранных волдырей во многих случаях заканчивается их исчезновением, возможно обусловленным разрывом мембраны [3].

В случаях С и Е набуханию клеток предшествует их дегидратация до критического объема и насыщение клетки, восстанавливающей свой объем, концентрированным раствором криопротектора или соли. Отсутствие в этих случаях каких-либо задержек в набухании в связи с этим можно объяснить действием этих концентрированных растворов. В свою очередь, существенные различия в уровне набухания цитоматрикса в растворах криопротекторов и соли, вероятно, отражают различие действия этих растворов на его структуру.

В условиях, когда мембранная теория прогнозирует набухание, ограниченное присутствие вне клетки непроникающего вещества в гипотонической концентрации (рис. 1В, D), рост мембранных волдырей также ограничен. Задержка набухания в случае В более очевидна, чем в случае А, свидетельствует о том, что за эту задержку ответственен сам цитоматрикс. Основной довод в пользу такого заключения состоит в том, что набухание в гипотоническом растворе непроникающего вещества связано только с потоком воды и не лимитируется скоростью проникновения в клетку других компаундов. Наличие в случае В задержки между моментом прекращения набухания цитоматрикса и началом роста мембранных волдырей и отсутствие такой задержки в случае D, по-видимому, можно объяснить исходя из уже приведенных соображений о способности цитоматрикса сопротивляться набуханию и необходимости разрыва связи мембраны с цитоматриксом для образования мембранного волдыря. Разрыву этой связи может способствовать, например, дегидратация или проникновение в клетку концентрированного раствора.

После появления мембранных волдырей, а в некоторых случаях и без их появления, цитоматрикс не только прекращает набухание, но и может сжиматься (рис. 1В, С, D). Сжатие цитоматрикса может сопровождать как увели-

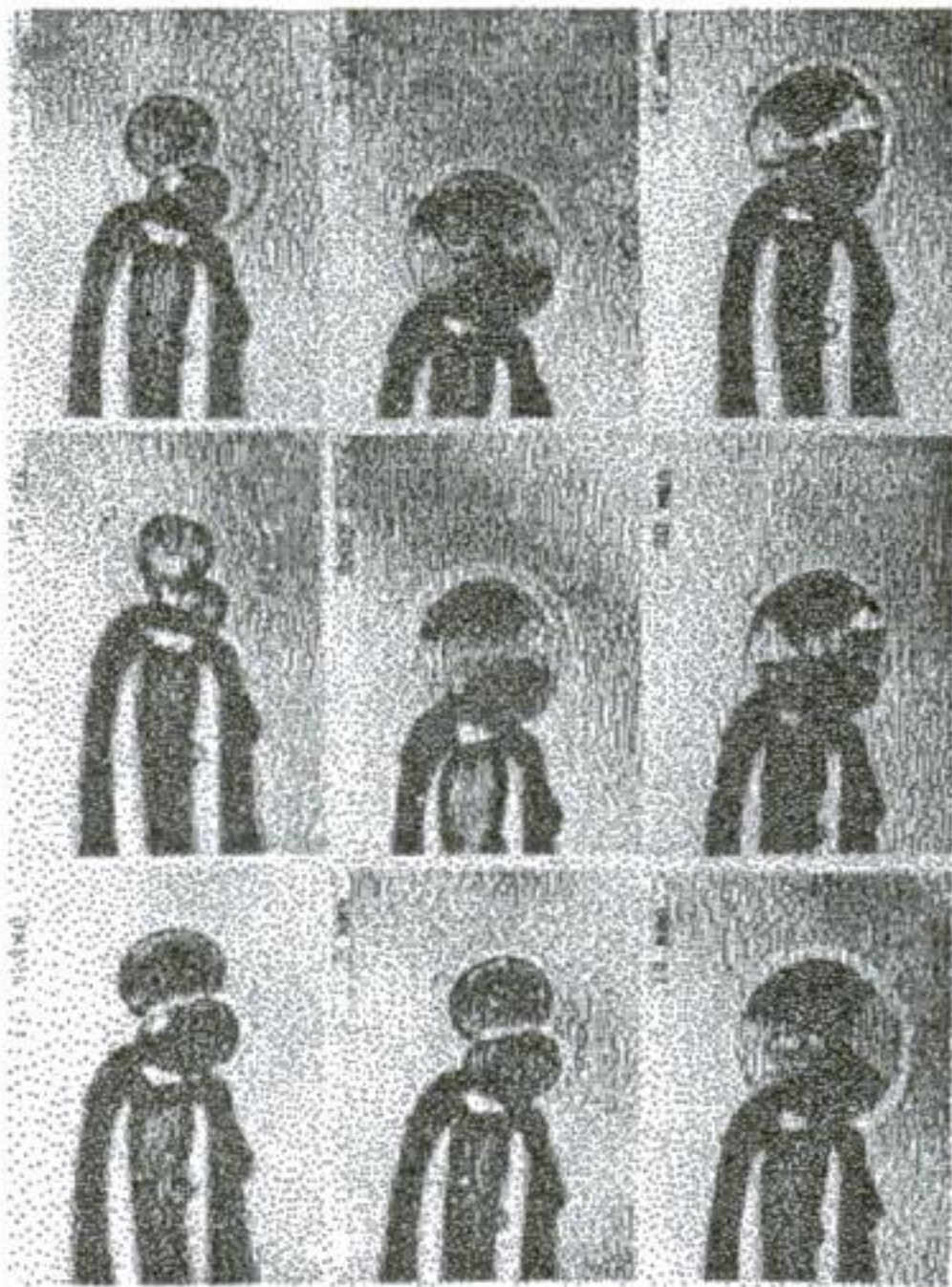


Рис. 2. Кинетика осмотической реакции эмбриона мышцы при последовательной смене среды в соответствии с рис. 1 F. (Физраствор добавляли на 6-й мин экспозиции в 30%-м ДМСО)

чение (С), так и уменьшение объема пузырей (В, D). Причины сжатия цитоматрикса нам пока не ясны. Так, если в случае С это явление можно было бы объяснить реакцией цитоматрикса на развивающееся в объеме мембранного волдыря гидростатическое давление при ограничении роста пузыря зоной пеллюцида, то для случая В и D такое объяснение неприемлемо. Более вероятно, что причиной сжатия цитоматрикса в этих случаях является выход из клеток осмотически активных компаундов, например, калия. Не исключено также, что сжатие цитоматрикса обусловлено реологическими свойствами его структуры и связано с релаксацией возникающих в нем при растяжении напряжений.

Подтверждением высказанному нами представлению о том, что рост мембранных волдырей является продолжением осмотической реакции клеток может слу-

жить и тот факт, что с момента появления они берут на себя осмотическую регуляцию клеточного объема. Так, перенося клетку, набухающую в 30%-м растворе димексида, в физраствор (рис. 1 и 2), мы наблюдали выраженную двухфазную реакцию, проявляющуюся в появлении, увеличении, а затем уменьшении объема пузыря, что может быть поставлено в соответствие: 1) поступлению в насыщенную криопротектором клетку воды и 2) выходу димексида из клетки, сопровождаемому выходом избыточной воды.

ПУТИ РАЗВИТИЯ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ И СПОСОБЫ КРИОЗАЩИТЫ



Рис. 3. Схема криоповреждений и криозащиты клеток. Блоками отмечены события, ведущие к криоповреждениям, вне блоков указаны способы криозащиты на различных этапах криоповреждения

Анализ представленных данных и данных литературы [5] об обратимости некоторых повреждений клеток, приводящих к образованию мембранных пузырей (волдырей), дает основание предположить, что регуляция клеточного объема за счет объема пузыря (волдыря) в определенных условиях может играть адаптивную роль.

С учетом высказанных в работе замечаний и предположений общая схема развития криоповреждений и действия факторов криозащиты может быть представлена в следующем виде (рис. 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М. Роль регуляторных систем, модулирующих состояние белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 4 – С. 3–14.
2. Пушкар Н.С., Белоус А.М., Вишневский В.И. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. – Киев: Наук. думка, 1977. – 243 с.
3. Розанов Л.Ф., Смольянинова Е.И. Осмотическое поведение яйцеклеток и эмбрионов мыши: роль цитоскелета // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 4. – С. 26–31.
4. Френкель Я.И. Кинетическая теория жидкостей. – Ленинград: Наука, 1975. – 592 с.
5. Gass G.V., Chernomordik L.V. Reversible large-scale deformations of electrically treated cells: electroinduced bleb formation // Biochemica et Biophysica Acta. – 1990. – 1023. – P. 1–11.
6. Fuller B.J., Grout B.W., James E. Cell membrane changes, related to metabolic and osmotic behaviour and hypertonic exposure // Cryo-Letters. – 1984. – 5, № 4. – P. 239–254.

7. *Meryman H.T.* Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // *Cryobiology*. – 1971. – 8, N. 1. – P. 489–500.
8. *Meryman H.T.* Cryoprotective agents // *Cryobiology*. – 1973. – 8, N. 1. – P. 173–183.
9. *Takahashi I., Mary S.T.J., Williams D.J. and R.J.* Coagulation of sea urchin egg cytoplasm by high salt concentrations // *Cryobiology*. – 1982. – 19, N. 5. – P. 511–519.
10. *Wittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P.* Survival of mouse embryos frozen to 196 °C and 269 °C // *Science*, N.Y. – 1972. – 178. – P. 411–414.

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

Поступила 15.06.93

Л.Ф.РОЗАНОВ, Є.І.СМОЛЬЯНИНОВА, О.І.ГОРДІЄНКО

ДО ПИТАННЯ ПРО РОЛЬ МЕМБРАНИ І ЦИТОМАТРИКСА У РОЗВИТКУ КРІОПОШКОДЖЕНЬ КЛІТИН

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

На підставі проведеного аналізу літературних і власних даних автори пропонують схему розвитку кріоповшкоджень клітин під дією двох основних пошкоджуючих факторів: внутріклітинної кристалізації і дегідратації. Враховуючи, що пошкодження при порушенні мембранної проникності реалізуються, як правило, через набухання клітин, автори проводять порівняльну оцінку набухання ембріонів миші в середовищах різного складу і, аналізуючи одержані дані з позиції мембранної теорії проникності, показують, що спостережені відхилення в осмотичній поведінці цитоматрикса можуть бути інтерпретовані як реакція внутріклітинного геля.

L.F.ROZANOV, E.I.SMOLYANINOVA, O.I.GORDIENKO

ON THE ROLE OF THE MEMBRANE AND CYTOMATRIX IN THE DEVELOPMENT OF CELL CRYOINJURY

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National
Academy of sciences of the Ukraine, Kharkov

On the basis of the literature review and analysis of the data available the authors suggest a scheme of the development of cell cryoinjury under the action of two damaging factors: intracellular crystallization and dehydration. Taking into account that the injuries after the impairment in membrane permeability are usually inflicted by cell swelling, the authors perform a comparative investigation of the mouse embryo swelling in the media of different compositions. From the point of view of the theory of membrane permeability the data obtained demonstrate that the observed deviations in the osmotic behavior of the cytomatrix may be interpreted as a response of the intracellular gel.

УДК 616.127-018.63

Г.Е.Загоруйко, Г.А.Бабийчук, Т.Н.Юрченко

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МАССОПЕРЕНОСА ЖИДКОСТИ В ИШЕМИЗИРОВАННОМ МИОКАРДЕ ПРИ НОРМОТЕРМИЧЕСКОМ И ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕРДЕЦ

Проведено електронно-микроскопічне і морфометричне дослідження міокарда і осадка саркоплазматического ретикулума (СР) при тотальній ішемії (ТІ) серця крыс Вистар в візасті 2,5–3 мес. Температура ТІ 37 і 0 °С. Продовжителыность ТІ 15 мин – 24 ч. Установлено, что скорость процессов массопереноса жидкости из паренхимы в строму миокарда и обратно коррелирует с размерами везикул и объемной долей элементов СР. Высказано предположение о том, что СР и поперечные трубочки сарколеммы участвуют в процессах массопереноса жидкости, транспортируя ее из кардиомиоцитов (КМЦ) в строму миокарда, а затем обратно в саркоплазму и митохондриальный компартмент КМЦ.

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в изучении структурно-биохимических изменений клеточных элементов миокарда при тотальной ишемии (ТІ) сердца, многие процессы, лежащие в основе развития ишемических повреждений компонентов паренхимы и стромы еще недостаточно исследованы. Это относится и к такому малоизученному, но характерному для ТІ

сердца биологическому процессу, как трансмуральный массоперенос жидкости между гидрофильными компартментами кардиомиоцитов (саркоплазмой, митохондриями) и стромой миокарда. Нами установлено [1], что при 37 и 0 °С хранения изолированных сердец крыс в отсутствие внешних источников жидкости (коронарного кровотока, перфузионного раствора) в ишемизированном миокарде определяется процесс трансмурального массопереноса тканевой жидкости (внутриклеточной, внеклеточной), обуславливающей развитие во времени экстра- и интрацеллюлярного отека, набухание и умеренную вакуолизацию митохондрий кардиомиоцитов (КМЦ).

Исходя из современных представлений об ультраструктурной организации КМЦ млекопитающих [6], нами высказано предположение о том, что массоперенос жидкости между различными компартментами КМЦ осуществляют множество взаимосвязанных элементов саркоплазматического ретикулума (СР), образующих внутри мышечных клеток сложно организованную разветвленную канальцевую (дренажную) систему, контактирующую с многочисленными поперечными трубочками (ПТ), образованными специализированными локальными участками инвагинации сарколеммы мышечных клеток сердца. ПТ глубоко пронизывают КМЦ и непосредственно связаны с экстрацеллюлярным пространством. Было установлено, что в условиях ТИ сердца диффузия плазменных белков в отмирающие мышечные клетки сократительного миокарда начинается с заполнения ими ПТ, охватывая затем весь объем поврежденного мышечного волокна [4]. С помощью электронно-микроскопических трейсеров (частиц коллоидного лантана) также было показано, что в процессе развития ТИ сердца частицы-трейсеры вначале обнаруживаются на поверхности сарколеммы, в просвете вставочных дисков, в ПТ, а затем в саркоплазме с последующей локализацией в матриксе митохондрий [7]. При физических нагрузках и развитии ряда патологических состояний сердечно-сосудистой системы (кардиомиодистрофия, тканевая гипоксия, постгемморагическая гипотензия и др.) в КМЦ определяются процессы дегидратации-гидратации (набухания) элементов СР [2, 5, 6]. Следовательно, СР является наряду с митохондриями гидрофильным элементом КМЦ и, возможно, участвует в процессах регуляции количества жидкости в различных компартментах мышечных клеток сердца.

Целью работы явилось исследование морфологических проявлений массопереноса жидкости в ишемизированном миокарде крыс и выяснение возможного участия в этом процессе элементов СР и ПТ сарколеммы КМЦ.

Опыты были проведены на изолированных сердцах крыс-самцов Вистар в возрасте 2,5–3 мес. Изолированные сердца помещали во влажные камеры-бюксы при температуре 37 °С – первая серия опытов и при 0 °С в условиях бесперфузионной глубокой гипотермии (БГГ) – вторая серия опытов. При $T > 2$ ч ТИ изолированные сердца запаивали в полиэтиленовые мешочки для предотвращения воздействия на мышечную ткань многочисленных микроорганизмов. Для электронно-микроскопических исследований из миокарда левого желудочка иссекали кусочки мышечной ткани через 15, 30 мин, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 18 и 24 ч от начала ТИ сердца и обрабатывали по общепринятым методам. В серии негативов ультратонких срезов миокарда в каждой опытной группе с помощью методов морфометрии определяли: в КМЦ относительные объемы митохондрий (V_v^{mx}), саркоплазмы (V_v^{cp}); в строме – объемные доли основного вещества соединительной ткани (V_v^{ob}), клеточных элементов соединительной ткани (V_v^{kc}), капилляров (V_v^{kap}). По экспериментальным данным строили графики кинетик вышеперечисленных морфометрических показателей. Некоторые результаты проведенных исследований изложены в работе [1], в которой было установлено, что в условиях длительной (24 ч) ТИ сердца при 37 °С и 0 °С в миокарде определяется развитие трех последовательных стадий ишемии.

1. Стадия обратимых ишемических изменений $S_1.T_1 \in (0-2)$ ч при 37°C и $S_1.T_1 \in (0-5)$ при 0°C . В продолжении S_1 ТИ сердца еще возможно полное или частичное восстановление сократительной способности миокарда. В это время определяется прогрессирующее обезвоживание КМЦ и массоперенос миоплазмы в строму миокарда, вследствие чего развивается выраженный отек основного вещества соединительной ткани.

2. Стадия накопления необратимых ишемических поражений $S_2.T_2 \in (2-5)$ ч при 37°C и $S_2.T_2 \in (5-12)$ ч при 0°C . В продолжение S_2 ТИ сердца в миокарде обнаруживается массоперенос внеклеточной жидкости в КМЦ с последующей ее локализацией в митохондриях мышечных клеток. Развивается тотальное набухание митохондрий КМЦ и определяется дегидратация основного вещества соединительной ткани.

3. Стадия ишемического некроза $S_3.T_3 \geq 5$ ч при 37°C и $S_3.T_3 \geq 12$ ч при 0°C . В стадии ишемического некроза миокарда наблюдается уменьшение отечности митохондрий и направленный массоперенос жидкости из митохондриальных структур в саркоплазму КМЦ и в интерстициальное пространство.

Для выяснения возможного участия элементов СР и ПТ сарколеммы КМЦ в механизмах массопереноса жидкости между различными компонентами миокарда нами проведено электронно-микроскопическое исследование осадка СР и морфометрический анализ СР в КМЦ в одни и те же сроки развития ТИ сердца при 37 и 0°C . Для получения сравнимых и сопоставимых между собой результатов исследовали морфологию осадка СР и определяли объемную долю элементов СР (V_v^{CP}) КМЦ в те промежутки времени развития ТИ сердца при 37 и 0°C , когда скорости процессов «дегидратации – гидратации» саркоплазмы, митохондрий мышечных клеток были максимальными и минимальными. С этой целью на графиках кинетик V_v^{CP} и V_v^{MX} [1] определяли временные координаты точек перегиба (скорость процесса максимальная) и точек экстремума (скорость процесса минимальная). Нами установлено, что наибольшая скорость убыли саркоплазмы из КМЦ ($\vartheta_{\text{max}}^{\text{CP}}$) при 37°C определяется через 1 ч, наименьшая ($\vartheta_{\text{min}}^{\text{CP}}=0$) – через 2 ч; наибольшая скорость процесса набухания митохондрий КМЦ ($\vartheta_{\text{max}}^{\text{MX}}$) обнаруживается через 3,5 ч, наименьшая ($\vartheta_{\text{min}}^{\text{MX}}=0$) – к 5 ч от начала ТИ сердца. В условиях БГГ (0°C) наибольшая скорость процесса дегидратации КМЦ определяется через 3 ч, наименьшая – к 5 ч от начала ТИ. Соответственно, наибольшая скорость процесса набухания митохондрий КМЦ определяется к 8 ч, наименьшая – через 12 ч.

При проведении морфометрического анализа за 100% принят объем паренхимы миокарда. Относительный объем элементов СР КМЦ выражен в %. Изменения ϑ^{CP} и ϑ^{MX} за единицу времени (час), характеризующие скорости процессов дегидратации–гидратации саркоплазмы и митохондрий КМЦ, выражены в %/ч.

Как следует из данных, представленных в табл. 1, в начальный период

Т а б л и ц а 1 .

Изменение скорости процессов «дегидратации–гидратации» гидрофильных компартментов КМЦ и объемной доли элементов СР в паренхиме миокарда 3-х месячных крыс при (37°C) сердца.

Стадии ТИ сердца	Время от начала ТИ, ч	ϑ^{CP} , %/ч	ϑ^{MX} , %/ч	V_v^{CP} $\varepsilon = \pm 0,20\%$
S_1	0	0	0	2,50
	1	-5,70	0	3,60
	2	0	0,80	1,70
S_2	3,5	0,43	3,80	3,30
	5	0,37	0	1,60

П р и м е ч а н и е. СР–саркоплазма, МХ–митохондрии, СР–саркоплазматический ретикулум КМЦ.

развития ТИ (37°C) сердца, в интервале времени $T \in (0-1)$ ч, в миокарде определяется дегидратация КМЦ и увеличение абсолютных цифровых значений показателя ϑ^{CP} от 0 до максимального, равного $-5,70\%/ч$ (знак «-» свидетельствует об убыли относительного объема саркоплазмы в КМЦ). Одновременно в КМЦ возрастает объемная доля элементов

СР от 2,50% в норме до 3,60%. В следующем временном интервале $T \in (1-2)$ ч скорость убыли относительного объема саркоплазмы КМЦ по абсолютной величине уменьшается от максимального значения до нуля. В этот период времени развития ТИ (37 °С) сердца в паренхиме миокарда существенно уменьшается и объемная доля элементов СР от 3,60% до 1,70%. В начале S_2 ТИ (37 °С) сердца в паренхиме миокарда определяется рост цифровых значений скорости набухания митохондрий от 0,80%/ч ($T=2$ ч) до максимального значения, равного 3,60%/ч к 3,5 ч от начала эксперимента.

Процесс прогрессирующего набухания митохондриальных структур КМЦ сопровождается увеличением объемной доли элементов СР от 1,70% до 3,30%. Наблюдается умеренная гидратация саркоплазмы мышечных клеток сердца. В конце S_2 ТИ сердца скорость процесса набухания митохондрий КМЦ существенно уменьшается и при $T=5$ ч равна нулю. Следовательно, в окрестности точек экстремума с временными координатами $T_1=2$ ч и $T_2=5$ ч, наблюдается существенное снижение интенсивности процессов массопереноса жидкости в ишемизированном миокарде (до нуля). Именно в этот период времени обнаруживается и достоверное уменьшение объемной доли элементов СР в КМЦ до 1,70% и 1,60%, что почти в 2 раза меньше, чем в периоды интенсификации процессов массопереноса тканевой жидкости в миокарде изолированных сердец.

Т а б л и ц а 2

При БГГ (0 °С), относительно условий нормотермии (37 °С), в ишемизированном миокарде изолированных сердец обнаружено существенное замедление скорости процессов “дегидратации-гидратации” компартментов КМЦ (табл. 2). Так, максимальная скорость убыли относительного объема саркоплазмы КМЦ при БГГ (0 °С) составляет $-1,60\%/ч$, что по абсолютной величине в 3,60 раза меньше, чем при ТИ (37 °С). Максимальная скорость набухания митохондрий КМЦ в стадии S_2 ТИ (0 °С) сердца равна $1,30\%/ч$, что почти в 2,9 раза меньше, чем при нормотермическом хранении изолированных сердец. Однако и в условиях БГГ (0 °С) динамике цифровых значений показателей $\dot{v}^{сп}$ и $\dot{v}^{мх}$ строго соответствуют изменения величины объемной доли элементов СР КМЦ. Различия состоят лишь в том, что при БГГ (0 °С), относительно нормотермии, существенно замедлены процессы трансмурального массопереноса жидкости. Из приведенных в таблицах данных следует, что в процессе развития ТИ (37 и 0 °С) сердца в миокарде определяется непосредственная взаимосвязь между скоростями “дегидратации-гидратации” КМЦ с одной стороны и изменениями объемных долей СР с другой стороны. Увеличение скорости процесса дегидратации КМЦ, набухания митохондрий, одновременно сопровождается увеличением объемной доли СР в КМЦ и, наоборот.

Несмотря на функциональную значимость элементов СР, относительный объем этих структур в КМЦ незначителен и составляет, примерно, 1,5–4,0%. Из-за относительной малочисленности исследовать морфологию элементов СР на ультратонких срезах миокарда представляет определенные затруднения. В этой связи для изучения структурных изменений элементов СР в процессе развития ТИ сердца нами проведен электронно-микроскопический анализ осадка этого компонента эргастоплазмы КМЦ. Осадок элементов СР выделяли из миокарда изолированных сердец крыс в норме, через 1 и 5 ч от

Изменения скорости процессов «дегидратации – гидратации» гидрофильных компартментов КМЦ и объемной доли элементов СР в паренхиме миокарда 3-х месячных крыс при ТИ (0 °С) сердца

Стадии ТИ сердца	Время от начала ТИ, ч	$\dot{v}^{сп}, \%/ч$	$\dot{v}^{мх}, \%/ч$	$V_{v,ср} \epsilon = \pm 0,20\%$
S_1	0	0	0	2,50
	3	-1,60	0	3,10
	5	0	0,40	1,60
S_2	8	0,34	1,30	3,00
	12	0,15	0	1,70

Примечание. СП–саркоплазма, МХ–митохондрии, СР–саркоплазматический ретикулум КМЦ.

начала ТИ при 37 °С, а также через 3 и 12 ч при ТИ (0 °С). Электронно-микроскопическое исследование осадка СР дает возможность, во-первых, выявить наиболее значимые структурные изменения этих элементов, во-вторых, получить интегральную морфологическую характеристику множества везикул СР, выделенных из миокарда сердца в целом.

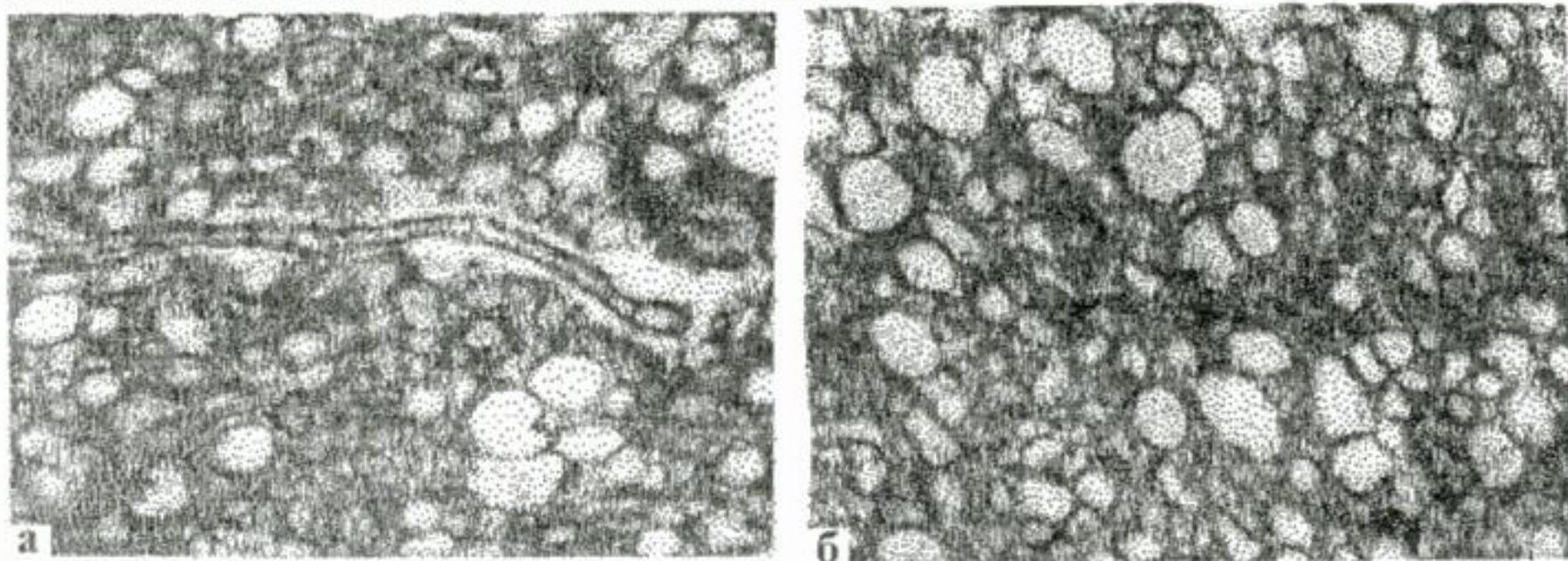


Рис. 1. Изменение ультраструктуры везикул осадка СР, выделенных из миокарда на различных стадиях развития ТИ (0 °С) сердца крыс: а) в норме; б) набухание везикул через 3 ч ТИ; в) уменьшение размеров везикул СР через 12 ч ТИ. $\times 30000$. Уменьшение при репродуцировании 2/3

В норме осадок СР миокарда представляет собой плотную массу мембранных элементов, образующих множество несколько уплощенных везикул и небольшое количество узких коротких и протяженных канальцев (рис. 1 а). В осадке везикул СР условно можно выделить три фракции: мелкодисперсную, среднедисперсную и крупнодисперсную. В норме немногочисленные везикулы крупнодисперсной фракции осадка СР преимущественно светлые и по своим размерам превосходят элементы мелко- и среднедисперсной фракции. Через 3 ч от начала ТИ (0 °С) сердца в миокарде определяется максимальная скорость процесса дегидратации КМЦ, увеличивается относительный объем элементов СР, а в осадке СР существенно возрастает количество везикул крупнодисперсной фракции (рис. 1 б).

К 12 ч развития ТИ (0 °С) сердца в миокарде определяется тотальное набухание митохондрий КМЦ, а скорость набухания этих органелл равна нулю. Относительный объем элементов СР в КМЦ уменьшается до минимального значения, а в осадке СР обнаруживаются преимущественно мелкодисперсные деформированные везикулы (рис. 1 в).

Аналогичные структурные изменения везикул осадка СР выявляются в миокарде при 37 °С хранения изолированных сердец. Так, через 1 ч от начала ТИ (37 °С) сердца в осадке СР определяются многочисленные набухшие везикулы, принадлежащие крупнодисперсной фракции. В это время в ишемизированном миокарде наблюдается интенсификация процесса дегидратации КМЦ и увеличение объемной доли элементов СР. К 5 ч от начала ТИ (37 °С) сердца в паренхиме миокарда крыс определяется «минимизация» процесса тотального набухания митохондрий, в КМЦ существенно уменьшается относительный объем элементов СР, а в осадке этих структур заметно возрастает количество везикул мелкодисперсной фракции.

Следовательно, увеличение активности процессов дегидратации-гидратации КМЦ одновременно сопровождается выраженным набуханием элементов СР, увеличением их размеров и объемной доли в мышечных клетках, и

наоборот. Именно это взаимно однозначное соответствие между морфометрическими показателями, характеризующими процессы дегидратации-гидратации паренхимы миокарда и позволяют нам предположить, что в условиях ТИ сердца элементы СР КМЦ принимают участие в механизмах трансмурального массопереноса жидкости.

В ранние сроки развития ТИ (37°C) сердца, в интервале времени (15–30) мин в миокарде крыс наблюдается образование многочисленных сарколеммальных пузырей, внутри которых содержится определенный объем миоплазмы и цитозольные ферменты КМЦ (рис. 2). В условиях БГГ (0°C) образование сарколеммальных пузырей не определяется. Следовательно, при ТИ (37°C) сердца в механизмах массопереноса жидкости из паренхимы в строуму миокарда принимают

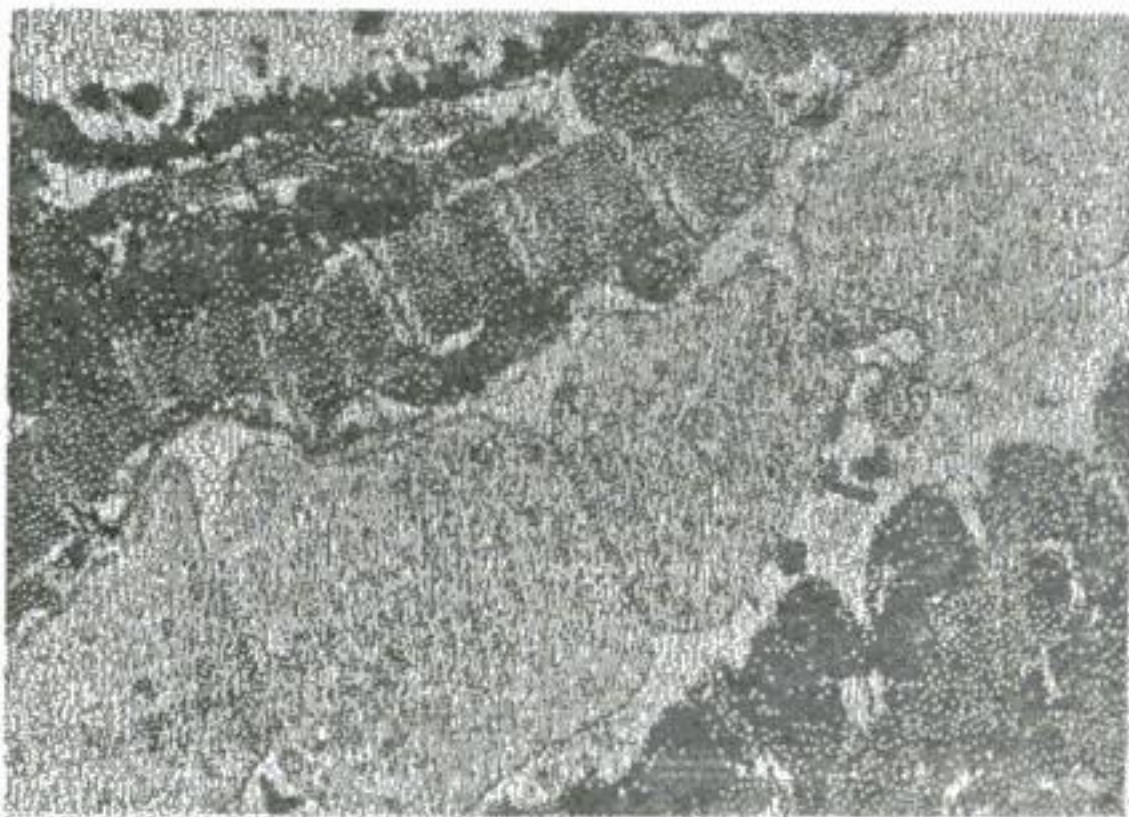


Рис. 2. Ультраструктура миокарда крыс через 30 мин от начала ТИ сердца при 37°C . Появление в интерстиции сарколеммальных пузырей. $\times 5000$. Уменьшение при репродукции 2/3

непосредственное участие сарколеммальные пузыри. Как оказалось, при ТИ (37°C) сердца продолжительностью более 30 мин, образование сарколеммальных пузырей прекращается, а ранее образованные пузыри отрываются от поверхности мышечных волокон и свободно располагаются в интерстициальном пространстве. Несмотря на своеобразный экзоцитоз, целостность наружной клеточной мембраны сохраняется. Это объясняется тем, что при дегидратации КМЦ уменьшается объем мышечных клеток и увеличивается складчатость сарколеммы. Именно за счет этих складок и образуются сарколеммальные пузыри.

При $T > 30$ мин, в ишемизированном миокарде крыс наблюдается разрушение сарколеммальных пузырей, содержимое которых поступит во внеклеточное пространство. Однако процесс дегидратации КМЦ не завершается на этапе образования сарколеммальных пузырей, а продолжается в течение последующих 90 мин, вплоть до окончания стадии обратимых ишемических изменений S_1 . $T \in (0-2)$ ч при ТИ (37°C). Направленный массоперенос саркоплазмы из КМЦ во внеклеточное пространство происходит при сохранении относительной целостности сарколеммы. Это позволяет предположить, что при ТИ (37°C) сердца, последующий (после образования сарколеммальных пузырей) массоперенос миоплазмы в интерстиций миокарда осуществляется не через возможные участки повреждений наружной клеточной мембраны, а посредством ПТ сарколеммы КМЦ.

Следовательно, пространственно-разветвленная система канальцев СР совместно с ПТ сарколеммы КМЦ позволяет, как мы считаем, в различных экстремальных условиях, в том числе и при ТИ сердца, довольно быстро осуществлять транспорт жидкости из любого компартмента КМЦ в строуму миокарда и, обратно, доставлять в толщу мышечных волокон интерстициальную жидкость из основного вещества соединительной ткани при сохранении относительной целостности сарколеммы.

Обобщая результаты проведенных исследований, предлагаем следующую схему путей и механизмов массопереноса жидкости в миокарде при ТИ сердца (рис. 3). Из данной схемы следует, что в стадиях S_1 и S_2 ТИ сердца, массоперенос жидкости между различными компартментами КМЦ осуществ-

Рис. 3. Возможные пути и механизмы трансмурального массопереноса жидкости в миокарде в процессе развития ТИ сердца. S_1 , S_2 , S_3 – последовательные стадии развития ТИ миокарда при 37 и 0 °C хранения изолированных сердец; СТ – соединительная ткань; ОВ – основное вещество соединительной ткани; КМЦ – кардиомиоциты; МХ – митохондриальный компартмент; СП – саркоплазма; СР – саркоплазматический ретикулум; ПТ – поперечные трубочки сарколеммы; СПП – сарколеммальные пузыри; $\rightarrow$ – основные пути массопереноса жидкости $\bullet$; $\rightarrow$ – возможные направления массопереноса жидкости $\bullet$; — — — — — целостная сарколема; — — — — — поврежденная сарколема КМЦ

Предлагаемая схема, в определенной мере, позволяет прогнозировать результаты биохимических исследований, посвященных изучению кинетики выхода цитозольных ферментов, мембраносвязанных белков, липидов, аминокислот из ишемизированного миокарда в среду перфузии изолированных сердец. Так, в стадии S_1 массоперенос жидкости направлен из паренхимы в строму миокарда. Поэтому в ранние сроки развития ТИ (37°C) сердца, в среде перфузии вначале будут определяться цитозольные ферменты эндотелиоцитов капилляров. Затем, по мере разрушения сарколеммальных пузырей, в среде перфузии должна существенно возрасти ферментативная активность цитозольных ферментов КМЦ, с максимумом к 2 ч от начала ТИ (37°C) сердца. В стадии S_2 массоперенос жидкости направлен из стромы в паренхиму миокарда. Поэтому в перфузате существенно уменьшится количество цитозольных ферментов КМЦ. Ферменты матрикса митохондрий, а затем и белковые комплексы митохондриальных мембран появятся в перфузате, вероятно, не ранее 5 ч от начала ТИ (37°C) сердца, когда массоперенос жидкости направлен из паренхимы (из митохондриальных структур КМЦ) в строму миокарда. Количество митохондриальных белков в перфузате существенно возрастет в процессе активации катаболического аутолиза, в интервале времени (8–12) ч от начала ТИ (37°C) сердца. Затем, при $T > 12$ ч ТИ в перфузате появятся и будет нарастать количество миофибриллярных белков и свободных аминокислот вследствие развития лизосомального аутолиза. Наши теоретические положения хорошо согласуются, в частности, с данными биохимических исследований, приведенными в работе [3]. Как оказалось, выявленная нами ранее [1] S -образная кинетика процесса дегидратации КМЦ при ТИ (37°C) сердца с максимумом на 120 мин от начала эксперимента, одновременно сопровождается S -образной кинетикой выхода в перфузат цитозольного фермента лактат-

дегидрогеназы, с максимумом ферментативной активности для сердца 3-месячных крыс – на 140-й мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Загоруйко Г.Е. Последовательность структурных изменений миокарда при тотальной ишемии сердца в условиях нормо- и глубокой гипотермии // Проблемы криобиологии. – 1991. – № 3. – С. 3–10.
2. Загоруйко Ю.В., Загоруйко Г.Е., Бабийчук Г.А. Влияние гипоксии и кранио-церебральной гипотермии на ультраструктуру миокарда белых крыс // Криобиология. – 1987. – № 1. – С. 32–38.
3. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Троянова В.Н. и др. Особенности ишемического повреждения мембран и активация перекисного окисления липидов в миокарде крыс разного возраста // Укр. биохим. журн. – 1989. – 61, № 2. – С. 98–105.
4. Рукоусев В.С. Диффузия плазменных белков в отмирающие волокна миокарда // Архив патологии. – 1970. – № 6. – С. 16–19.
5. Серов В.В., Пауков В.С. Ультраструктурная патология клетки. – М.: Медицина, 1975. – 432 с.
6. Хитров Н.К., Пауков В.С. Адаптация сердца к гипоксии. – М.: Медицина, 1991. – 240 с.
7. Шаров В.Г., Дженнингс Р.Б., Хокинс Х.К. и др. Сравнительное изучение дефектов проницаемости мембран кардиомиоцитов при глубокой ишемии миокарда и при воздействии изопроterenоло с помощью коллоидного лантана // Метаболизм миокарда. – М.: Медицина, 1981. – С. 321–336.

НИИ биологии при ХГУ
Ин-т проблем криобиологии и криомедицины
АН Украины, г. Харьков

Поступила 20.12.93

Г.Е.ЗАГОРУЙКО, Г.П.БАБІЙЧУК, Т.М.ЮРЧЕНКО

МОЖЛИВІ МЕХАНІЗМИ МАСОПЕРЕНОСУ РІДИНИ В ІШЕМІЗОВАНОМУ МІОКАРДІ ПРИ НОРМОТЕРМІЧНОМУ І ГІПОТЕРМІЧНОМУ ЗБЕРІГАННІ ІЗОЛЬОВАНИХ СЕРДЕЦЬ

Науково-дослідний інститут біології Харківського державного університету
Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Проведено електронно-мікроскопічне і морфометричне дослідження міокарду і осадку саркоплазматичного ретикулуму (СР) при тотальній ішемії (ТІ) сердець щурів Вістар у віці 2,5–3 міс. Температура ТІ 37 і 0 °С. Тривалість ТІ 15 хв.–24 г. Встановлено, що швидкість процесів масопереносу рідини з паренхіми в строму міокарда і назад корелює з розмірами везикул і обсяговою долею елементів СР. Висловлено припущення про те, що СР і поперечні трубочки сарколеми беруть участь у процесах масопереносу рідини, транспортуючи її із кардіоміоцитів (КМЦ) у строму міокарду, а після того назад у саркоплазму і мітохондріальний компартмент КМЦ.

G.E.ZAGORUIKO, G.A.BABIYCHUK, T.N.YURCHENKO

ON THE POSSIBLE MECHANISMS OF FLUID MASS-TRANSFER IN THE ISCHEMIZED MYOCARDIUM DURING NORMOTHERMIC AND HYPOTHERMIC STORAGE OF THE ISOLATED HEARTS

Scientific-Research Institute of Biology with Kharkov State University
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian
Academy of Sciences, Kharkov

We have conducted electron-microscopic and morphometric investigations of myocardium and sarcoplasmic reticulum (SR) pellet during total ischemia (TI) of the hearts of Wistar rats, aged 2.5–3 months. The temperatures of TI were 37°C and 0°C. The duration of TI ranged from 15 min to 24 hours. We have found that the rate of the processes of fluid mass-transfer from parenchyma into myocardial stroma and back correlates with the size of vesicles and volume portion of the SR elements. We have assumed that SR and transversal tubules of the sarcolemma are involved into the processes of fluid mass-transfer, carrying it from cardiomyocytes (CMC) into myocardial stroma, and then back to sarcoplasm and mitochondrial compartment of CMC.

В.С.Родионов, М.К.Ильинова**ПРИНЦИПИАЛЬНОЕ РАЗЛИЧИЕ В ХАРАКТЕРЕ ИЗМЕНЕНИЙ
НЕНАСЫЩЕННОСТИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НЕЙТРАЛЬНЫХ
ЛИПИДОВ, ГЛИКО- И ФОСФОЛИПИДОВ ПОЧЕК СОСНЫ
В ПЕРИОДЫ АДАПТАЦИИ К МОРОЗУ, ПЕРЕЗИМОВКИ
И ВЕСЕННЕЙ ПОТЕРИ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ**

Выдвигается гипотеза о самостоятельных температуро-, светозависимой и стабилизирующей системах регуляции жирнокислотного состава. Предполагается, что первые две системы включают рецепторы (для температуры рецептор неизвестен, для света – фитохром и другие), посредники (фитогормоны), участки ДНК ядер, хлоропластов и РНК, полирибосомы, ферменты биосинтеза и расщепления (перекисного?) жирных кислот и систему репрессии генов.

В последние годы накапливается все больше данных о различном характере сезонных изменений состава нейтральных липидов, глико- и фосфолипидов древесных растений. Так, нейтральные липиды, которые входят преимущественно в состав сферосом [13] и среди которых преобладают триацилглицероли [13, 14], накапливаются летом – в первой половине осени и мобилизуются частично во второй половине осени-зимой и, главным образом, весной-летом следующего года, в период роста побегов и листьев [2–8, 14]. Содержание же гликолипидов, входящих в состав мембран хлоропластов [12] и представленных моно-, дигалактозилдиацилдиглицеринами, сульфолипидами, увеличивается во время зеленения и роста листьев, заметно снижается при их осеннем старении у листопадных [3] и перезимовке вечнозеленых растений [2, 3, 6, 7], снова повышается весной, коррелируя с развитием и дегидратацией мембран хлоропластов [2, 11].

Концентрация фосфолипидов – составных компонентов мембран ядер, митохондрий, пероксисом, эндоплазматического ретикулума, диктиосом, плазмалеммы, фосфатидилглицерином, фосфатидилинозитом, уменьшается летом при зеленении и росте листьев [2–4], повышается во время адаптации растений к морозу, стабилизируется зимой и снижается весной с переходом к новому вегетационному периоду. О характере сезонных изменений жирнокислотного состава глико-, фосфолипидов древесных растений существуют противоречивые мнения [2–7, 9, 16–19], а изучением нейтральных липидов древесных растений занимались немногие исследователи [3–7].

В настоящем сообщении показано, что характер сезонных изменений жирнокислотного состава нейтральных липидов, глико- и фосфолипидов почек сосны является специфичным для каждого класса липидов.

Объектом исследования были почки с побегов 2–5 мутовок верхней части кроны деревьев сосны обыкновенной *Pinus silvestris* L., произрастающей в естественных условиях в 50 км к северу от г. Петрозаводска. Пробы почек в количестве 10 г отбирали и фиксировали в кипящем этаноле, который сливали на воронку со стеклянным фильтром, вставленным в колбу Бунзена. Осадок переносили в гомогенизатор, заливали жидким азотом и измельчали до порошкообразного состояния. Липиды экстрагировали и промывали от нелипидных загрязнений [3], разделяли на колонках силикагеля ЛС 100/160 на фракции нейтральных липидов, глико- и фосфолипидным путем элюции соответственно хлороформом, ацетоном и метанолом, а остатки фосфолипидов дополнительно бн НСООН в метаноле и эту фракцию после удаления муравьиной кислоты объединяли с основной фосфолипидной фракцией [1]. Метилловые эфиры жирных кислот получали с помощью реакции переметилирования [3], их разделяли на газовых хроматографах Хром-41. Использовали колонки диаметром 3 мм и длиной 2,5 м, которые наполняли хроматоном N-AW-DMCS с размерами частиц 0,125–0,160 мм с 15%-м полиэтиленгликольадипинатом. Темпера-

тура разделения 198 °С, скорость воздуха, водорода и гелия соответственно 400, 40 и 40 мл/мин. Концентрацию жирных кислот определяли по площади пиков и выражали в мол. % от их суммы. Индекс двойной связи, характеризующий степень ненасыщенности жирных кислот (СНЖК) липидов, вычисляли как указывалось ранее [2]. В работе использовали метеорологические данные местных метеостанций.

Установлен разный характер изменений жирнокислотного состава групп липидов в течение сезонов года (рис. 1): индекс двойной связи жирных кислот гликолипидов снижается осенью-зимой по сравнению с началом осени в 1,2 раза и повышается весной – в начале лета по сравнению с концом февраля в 1,3 раза, в то время как в фосфолипидах увеличивается осенью – в начале зимы в 1,1 раза и снижается весной в 1,5 раза, в нейтральных липидах в течение осенне-зимнего периода существенных изменений не наблюдается.

Содержание линоленовой кислоты в гликолипидах уменьшается осенью-зимой по сравнению с началом осени в 3,1 раза и увеличивается весной – в начале лета по сравнению с февралем в 4,7 раза, а концентрация диеновых кислот (линолевой, октадекадиеновой) и в меньшей степени моноеновых (олеиновой) и насыщенных (пальмитиновой) соответственно этим сезонам года увеличивается и уменьшается. В фосфолипидах осенью – в начале зимы растет содержание диеновых кислот (линолевой, октадекадиеновой, эйкозодиеновой), моно- (олеиновой) и триеновых (эйкозатриеновой) и снижается насыщенных (преимущественно пальмитиновой). Весной – в начале лета растет концентрация насыщенных кислот при одновременном снижении моно-, ди- и триеновых. В нейтральных липидах жирнокислотный состав изменяется незначительно. Осенью-зимой в них несколько снижается содержание триеновых кислот (декановой, додекановой, эйкозатриеновой, линоленовой), моноеновой (олеиновой), а диеновых (линолевой и эйкозодиеновой) – возрастает. Весной увеличивается количество насыщенных и триеновых кислот, а моноеновых – снижается (рис. 2).

Новым в наших исследованиях является то, что вопреки существующему мнению о стабильности жирнокислотного состава фосфолипидов [19] или об увеличении ненасыщенности жирных кислот как фосфолипидов, так и гликолипидов [16–18] при искусственном или естественном закаливании древесных растений к морозу, нами показано (рис. 1, см. также [1–7]), что только в фосфолипидах ненасыщенность жирных кислот изменяется в зависимости от сезонных изменений температуры. В гликолипидах же ненасыщенность жирных кислот не коррелирует с сезонными изменениями температуры, но коррелирует с освещенностью, а в нейтральных липидах она остается стабильной в течение осени – зимы – весны, несмотря на колебания факторов окружающей среды. Можно полагать, что причиной различий между получен-

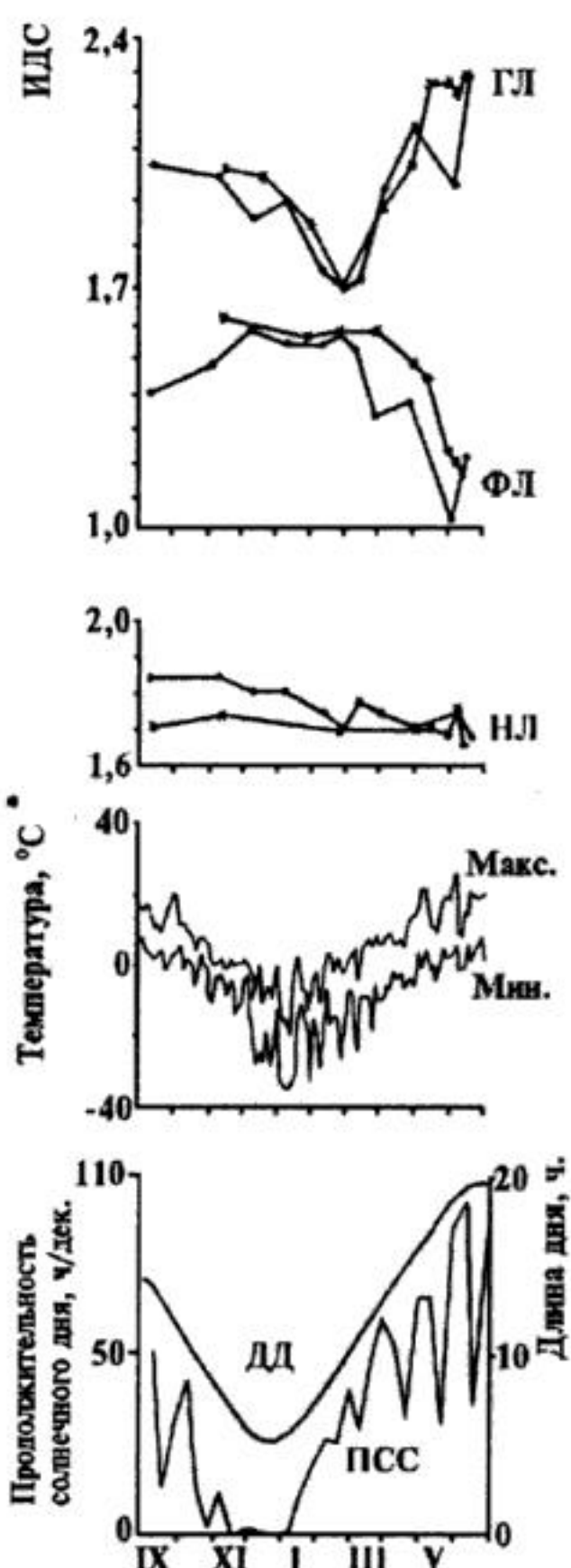


Рис. 1. Изменение индексов двойной связи (ИДС) гликолипидов (ГЛ), фосфолипидов (ФЛ) и нейтральных липидов (НЛ) почек сосны при осенней адаптации растений к морозу, перезимовке и весенней потере морозоустойчивости, а также максимальных (макс.), минимальных (мин.) температур, продолжительности солнечного сияния (ПСС) и длины дня (ДД)

ным нами данными (рис. 1, 2) и результатами других авторов [16–19] является несоответствие искусственных условий закаливания к морозу естественным, а также различия в климате.

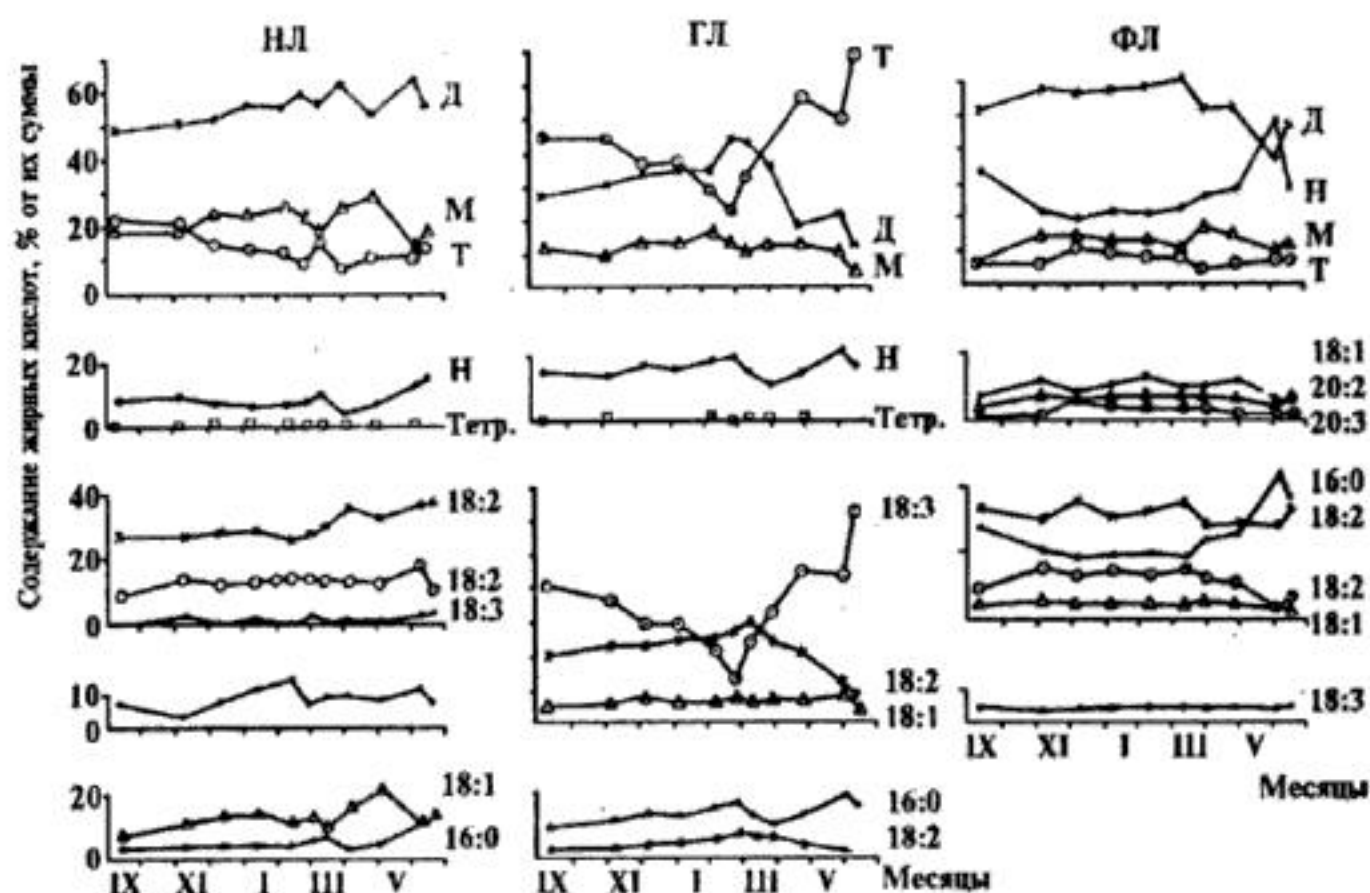


Рис. 2. Изменение содержания насыщенных (Н), моно- (М), ди- (Д), три- (Т) и тетраеновых (Тетр.) кислот глико-, фосфолипидов, нейтральных липидов почек сосны при осенней адаптации растений к морозу, перезимовке и весенней потере морозостойчивости. Жирные кислоты: 16:0 – пальмитиновая, 16:1 – гексадеценовая, 18:1 – олеиновая, 18:2 – линолевая, 18:2' – октадекадиеновая, 18:3 – линоленовая, 20:2 – эйкозодиеновая

Таким образом, регуляция текучести липидных компонентов мембран путем изменения степени ненасыщенности жирных кислот при сезонных изменениях температуры у древесных растений возможна только в фосфолипидах, что наглядно видно на примере почек (рис. 1) и хвои [2, 5] сосны, почек березы [3, 7]. Наоборот, в гликолипидах почек (рис. 1) и хвои [2, 5] сосны, почек березы [3, 7] и в нейтральных липидах хвои сосны [2] она мало вероятна из-за деструкции линоленовой кислоты при осенне-зимнем стрессе. Эти изменения в гликолипидах коррелируют с деградацией тилакоидов хлоропластов осенью-зимой [10, 11]. Весной с повышением освещенности восстанавливается прежний уровень линоленовой кислоты в гликолипидах и число тилакоидов в хлоропластах. Невозможность сезонной регуляции текучести нейтральных липидов почек сосны [6] и березы [3, 7], вероятно, связана с присутствием «внутреннего» стабилизирующего фактора.

На основании полученных данных нами выдвигается гипотеза о самостоятельных температурно-, светозависимой и стабилизирующей системах регуляции жирнокислотного состава. Предполагается, что первые две системы включают рецепторы (для температуры рецептор неизвестен, для света – фитохром и другие [20]), посредники (фитогормоны), участки ДНК ядер, хлоропластов, иРНК, полирибосомы, ферменты биосинтеза и расщепления жирных кислот; третья – ингибитор биосинтеза и расщепления (перекисного?) жирных кислот и систему репрессии генов. Самостоятельность этих систем проявляется в том, что при воздействии на почки комплекса факторов природной среды клетки их обладают способностью к избирательности отдельных факторов с целью направленного изменения состава веществ, например, жирных кислот. Взаимоисключающая направленность сезонных изменений ненасыщенности жирных кислот (рис. 1), по-видимому, свидетельствует о функционировании трех центров регуляции в клетках почек: температурозависимого – в эндоплазматическом ретикулуме, где гидрогенизируются жирные кислоты фосфолипидов [15], светозависимого – в хлоропластах, в которых в составе гликолипидов линолевая кислота на свету дегидрогенизируется до линоленовой [15] и стабилизирующего – в липидных телах, в котором, как мы полагаем, отсутствуют условия для изменения жирнокислотного состава триацилглицеролов под действием факторов среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Родионов В.С. Методы хроматографии и количественного анализа галакто- и фосфолипидов листьев растений // Известия АН СССР. Сер. биол. – 1979. – N. 2. – С. 238–250.
2. Родионов В.С., Ильинова М.К. Ритмичность сезонных колебаний в содержании и жирнокислотном составе липидов хвои // Экофизиологические исследования древесных растений. – Петрозаводск. – 1987. – С. 36–50.
3. Родионов В.С., Ильинова М.К. Изменение жирнокислотного состава и содержания нейтральных липидов, глико- и фосфолипидов в процессе развития почек и листьев березы // Биол. науки. – 1988. – С. 74–79.
4. Родионов В.С., Новицкая Ю.Е., Полежаева Н.С. и др. Сезонные изменения в липидах почек, побегов и хвои в связи с ростом сосны // Лесоведение. – 1988. – N. 4. – С. 74–81.
5. Родионов В.С., Ильинова М.К., Степанов А.А. Динамика содержания жирных кислот нейтральных липидов, глико- и фосфолипидов однолетней хвои сосны обыкновенной // Липидный обмен древесных растений в условиях Севера. – Петрозаводск. – 1983. – С. 78–96.
6. Родионов В.С., Ильинова М.К., Шуляковская Т.А. Годичные ритмы в изменении концентрации и жирнокислотного состава липидов почек сосны // Известия АН СССР. Сер. биол. – 1986. – N. 6. – С. 898–907.
7. Родионов В.С., Ильинова М.К., Шуляковская Т.А. Годичные ритмы концентрации и жирнокислотного состава липидов почек березы // Лесоведение. – 1987. – N. 4. – С. 57–64.
8. Царегородцева С.О. Годичная динамика основных липидов почек сосны // Науч. докл. высшей школы. Биол. науки. – 1975. – N. 12. – С. 89–92.
9. De Yoe D.R., Brown G.N. Glycerolipid and fatty acid changes in eastern white pine chloroplasts lamellae during the onset of winter // Plant physiol. – 1979. – 64, N. 6. – P. 924.
10. Kupila-Ahvenniemi S., Taanila-Kukka A., Rautiainen L. Effect of hormone treatments and unusual temperature condition on the structure of cells in pine during the fall and early winter // Aquilo. – 1984. – 20, N. 1. – P. 24–34.
11. Martin B., Oquist G. Seasonal and experimentally induced changes in the ultrastructure of chloroplasts of *Pinus silvestris* // Physiol Plantarum. – 1979. – 46, N. 1. – P. 42–49.
12. Mazliak P. Glyco- and phospholipids of biomembranes of higher plants // Lipids and lipid polymers in higher plants. – Berlin etc.: Springer Verlag, 1977. – P. 48–74.
13. Parker M.L., Murphy G.I.F. Oleosomes in flag leaves of wheat their distribution, composition and fate senescence and rust infection // Planta. – 1981. – 152, N. 1. – P. 36–43.
14. Pihakaski K., Pihakaski S., Karunen P., Kallio P. Seasonal changes in leaf lipids of *Diapensia lapponica* with special reference to storage lipid bodies // Nord. J. Bot. – 1987. – 7, N. 3. – P. 281–292.
15. Roughan P.G., Slack C.R. Cellular organisation of glycerolipid metabolism // Ann. Plant Physiology. – 1982. – 33, N. 1. – P. 97–132.
16. Senser M., Beck E. Frost resistance in spruce *Picea abies* (L.) Karst. V. Influence of photoperiod and temperature on the membrane lipids of needlies // Z. Pflanzephysiol. – 1982. – 108, N. 1. – P. 71.
17. Senser M., Beck E. Frost resistance in spruce *Picea abies* (L.) Karst III. Seasonal changes in the phospho- and galactolipids of spruce needles // Ibid. – 1982. – 105, N. 3. – P. 229–235.
18. Senser M., Beck E. Frost resistance in spruce *Picea abies* (L.) Karst V. The lipid composition of frost resistant and frost sensitive spruce chloroplasts // Ibid. – 1982. – 105, N. 3. – P. 241–245.
19. Siminovich D. Common and separate elements in the process of adaption of herbaceous and woody plants to freezing – a perspective // Cryobiology. – 1981. – 18, N. 2. – P. 166–185.
20. Tevini M. Light, function and lipid during plastid development lipids and polymers in higher plants. – Berlin etc.: Springer verlag, 1977. – P. 121–145.

Ин-т леса Карельского научного центра АН СССР,
г. Петрозаводск

Поступила 10.04.91

В.С.РОДИОНОВ, М.К.ІЛЬІНОВА

ПРИНЦИПОВА ВІДМІННІСТЬ У ХАРАКТЕРІ ЗМІН НЕНАСИЧЕНОСТІ
ЖИРНИХ КИСЛОТ НЕЙТРАЛЬНИХ ЛІПІДІВ, ГЛІКО- І ФОС-
ФОЛІПІДІВ БРУНЬОК СОСНИ В ПЕРІОДИ АДАПТАЦІЇ ДО МОРОЗУ,
ПЕРЕЗИМУВАННЯ І ВЕСНЯНОЇ ВТРАТИ МОРОЗОСТІЙКОСТІ

Інститут лісу Карельського наукового центру АН СРСР, м. Петрозаводськ

Висувається гіпотеза про самостійні температуро-, світлозалежну і стабілізуючу системи регуляції жирнокислотного складу. Припускається, що перші дві системи включають рецептори (для температури рецептор невідомий, для світла – фітохром та інші), посередники (фітогормони), ділянки ядер, хлоропластів і РНК, полірибосоми, ферменти біосинтезу і розщеплення жирних кислот; третя – інгібітор біосинтезу і розщеплення жирних кислот і систему репресії генів.

V.S.RODIONOV, M.K.ILYINOVA

FUNDAMENTAL DIFFERENCE IN THE NATURE OF CHANGES IN THE EXTENT OF UNSATURATION OF THE NEUTRAL LIPID FATTY ACIDS OF GLYCO- AND PHOSPHOLIPIDS OF PINE BUDS DURING ADAPTATION TO COLD, WINTERING AND SPRING LOSS OF FREEZE-HARDINESS

Institute of Forest of Karelia Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk

We hypothesize on the existence of the independent temperature-and light-dependent, and stabilizing systems of the regulation of the fatty acid composition. We suppose that the first two systems involve the receptors (the receptor for temperature is unknown, while that for the light is phytochrome and others), intermediates (phytohormones), sites of the nucleated DNA, chloroplasts, mRNA, polyribosomes, enzymes of biosynthesis and lysis of fatty acids. The third system consists of the inhibitor of the biosynthesis and lysis of fatty acids, and the system of gene repression.

УДК 57.043:547.298.1:57.084:615.015.38

Л.А.Ханина, В.М.Гучок, В.В.Чеканова, А.П.Мельник, В.И.Луговой

ОКСИЭТИЛИРОВАНИЕ АМИДОВ АЛИФАТИЧЕСКИХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КИСЛОТ КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ НЕТОКСИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Исследованы показатели токсичности продуктов оксиэтилирования амидов алифатических низкомолекулярных кислот. В отличие от исходных амидов продукты их оксиэтилирования значительно менее токсичны на организменном уровне, в связи с чем они могут быть использованы при низкотемпературном криоконсервировании различных биологических объектов.

Амиды низкомолекулярных алифатических кислот издавна привлекали внимание криобиологов как криоконсерванты различных биологических объектов. С применением амидов были проведены эксперименты по криоконсервированию клеток человека, почки телят, эмбрионов цыпленка, спермы животных и птиц [2, 5].

По классификации Кероу [2], амиды относятся к эффективным криозащитным агентам. Сравнительное изучение NN-диметилацетамида (ДМАЦ) глицерина и диметилсульфоксида при замораживании гранулоцитов и тромбоцитов показало, что наиболее эффективным из них является ДМАЦ [1, 6]. Однако широкого применения амиды не нашли, ввиду выраженной токсичности как на организменном, так и на клеточном уровнях [3]. При исследовании подопытных животных обнаруживаются различные повреждения органов и тканей – очаги некроза в почках, поражения различных отделов нервной системы, развитие уродств у потомства и т.д. [4].

Целью настоящего исследования явилось изучение возможных подходов изменения острой токсичности при вариации структуры амидов, выявления структурных факторов и путей химической модификации амидов низкомолекулярных (НМК) алифатических кислот для понижения токсичности.

N-формилэтаноламид был получен по методу [9], т. кип. в вакууме (5÷7 мм) 185 °С, n_D^{20} 1,4795.

N-метилацетамид дважды перегоняли в вакууме (3÷5 мм), отбирая фракцию, кипящую при 82÷85 °С.

N-ацетилацетамид технический очищали перекристаллизацией из смеси бензола с петролевым эфиром 1:1 бесцветные кристаллы с температурой плавления 75 °С. Идентифицирован по пробе смешения. Перфторацетилмо-

ноэтанолламин получали из моноэтанолламина и трифторуксусного ангидрида при температуре не выше 5 °С. Трифторацетат отделяли, промывали диэтиловым эфиром, остаток после удаления эфира фракционировали в вакууме (30 мм), отбирая фракцию 123÷125 °С, n_D^{20} 1,4038.

N-ацетилэтанолламин получен взаимодействием моноэтанолламина с уксусной кислотой по методу [9], n_D^{20} 1,4720.

N-ацетилдиэтанолламин получен этерификацией диэтанолламина этилацетатом при повышенном давлении (300÷500 кПа). После отделения воды и непрореагировавшего этилацетата продукт очищен активированным углем. Вещество идентифицировано по ПМР-спектру, хроматографически чистое.

Оксиэтилирование амидов проводили при повышенной температуре 90÷130 °С и давлении 200÷600 кПа на щелочных катализаторах при различном соотношении реагентов в токе инертного газа (азот). Реакцию проводили в реакторе из нержавеющей стали с дискретной подачей оксида этилена, снабженным механическим перемешиванием (50÷150 об/мин), термостатируемым обогревом и рубашкой охлаждения, производства СКТБ с ОП при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины.

Узкие фракции этоксидатов амидов получены методом дистилляции в глубоком вакууме ($2\div4\cdot10^{-5}\div10^{-4}$ мм), фракции отбирались через 10÷15 °С в интервале 85÷180 °С.

Хроматографический анализ оксиэтильных производных амидов проводили в виде их триметилсилилиловых эфиров (ТМС) на хроматографе ЛХМ-80, детектор ДИП, газ-носитель-гелий со скоростью 40 мл/мин, температура испарителя и детектора соответственно 250 °С÷160 °С со скоростью 4÷6 °С/мин, длина колонки 1 м, диаметр 3 мм, заполненная хроматоном N-супер с 3% SE-30.

Спектры ПМР исследовали в дейтероацетоне (5÷20%-е растворы) на приборе BS-497 с рабочей частотой 100 МГц на протонах. В качестве внешнего стандарта применяли ТМС в запаянных ампулах.

Острая токсичность исследовалась на 378 беспородных мышах обоего пола, содержащихся в одинаковых условиях вивария на общем рационе питания.

В качестве интегрального показателя токсичности учитывалась гибель животных к 20%-м растворам внутрибрюшинно введенных веществ в течение двухнедельного наблюдения.

Оценку чувствительности лабораторных животных к 20%-м растворам внутрибрюшинно введенных веществ проводили по среднесмертельным дозам (ЛД-50), рассчитанным по методу В.Б.Прозоровского [7].

ЛД-50 выражали в граммах вещества на килограмм массы животного. Такое представление показателя может быть в этом случае наиболее адекватным, так как полученные синтетические олигомеры имеют усредненную молекулярную массу (согласно общему молекулярно-массовому распределению) и поэтому количественное выражение их возможно достаточно точно в весовых, а не в мольных единицах.

На первом этапе исследования объектом анализа явились исходные амиды, структура которых постепенно усложнялась при переходе от формамида, не содержащего никаких функциональных групп, кроме амидной ($R=R_1=R_2=H$, соединение 1, табл. 1), последовательным введением донорно-акцепторных заместителей в различные положения молекулы формамида.

В табл. 1 представлены показатели токсичности для амидов низкомолекулярных алифатических кислот в указанной выше последовательности. Сопоставление показателей острой токсичности исследуемого ряда амидов показало, что определенное сочетание структурных фрагментов молекулы, обладающих различной гидрофобностью, а также донорно-акцепторской способ-

ностью обуславливает вариацию значений ЛД-50 в широком интервале от 0,8 до 12 г/кг в пределах одного гомологического ряда.

Т а б л и ц а 1

Токсичность амидов алифатических низкомолекулярных кислот

NN п/п	Название вещества	Формула $R-\overset{\text{O}}{\underset{\text{N}}{\text{C}}}\begin{matrix} // \\ \backslash \end{matrix} \begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix}$			Молеку- лярная масса	Токсичность ЛД-50 г/кг
		R	R ₁	R ₂		
1.	Формаид	H	H	H	45	3,7(3,4-3,9)
2.	N-метилформаид	H	CH ₃	H	57	1,0 [4]
3.	N,N-диметилформаид	H	CH ₃	CH ₃	69	4,2 [4]
4.	Ацетаид	CH ₃	H	H	57	11,8(10,8-12,8)
5.	N-метилацетаид	CH ₃	CH ₃	H	69	1,9(1,6-2,3)
6.	N,N-диметилацетаид	CH ₃	CH ₃	CH ₃	81	4,2 [4]
7.	Карбаид	NH ₂	H	H	66	12,0 [4]
8.	N-метилкарбаид	NH	CH ₃	H	78	9,0 [4]
9.	N,N-диэтилацетаид	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	139	1,65 [4]
10.	Фторацетаид	CH ₂ F	H	H	77	0,013 [4]
11.	N-(β-оксиэтил)перфтора- цетаид	CF ₃	CH ₂ CH ₂ OH	H	156	0,80(0,6-0,9)
12.	N-ацетилацетатаид	CH ₃	COCH ₃	H	101	7,1(6,3-7,9)
13.	N-(β-оксиэтил)формаид	H	CH ₂ CH ₂ OH	H	88	7,1(6,0-7,7)
14.	N-(β-оксиэтил)-ацетаид	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	H	103	6,8(6,0-7,7)
15.	NN-(ββ ¹ -диоксиэтил)-аце- таид	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	147	1,5(1,3-1,8)
16.	N,N-диэтилпропиоаид	CH ₂ CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅ , 153	0,77 [4]	
17.	Акрилаид	CH=CH	H	H	69	0,15

Введение алкильных групп к атому азота, нарушающих симметрию молекулы амида, с одновременным увеличением гидрофобности приводит к резкому повышению токсичности. Токсичность N-монометилзамещенных формаида и ацетаида оказывается значительно выше незамещенных аналогов (соединения 2 и 1, 3 и 4, табл. 1). В то же время введение второй алкильной группы к азоту аминогруппы оказывает гораздо менее выраженный эффект – наблюдается даже некоторое снижение токсичности для диметилзамещенных формаида и ацетаида (сравните соедин. 5 и 6, 3 и 4 табл. 1). Подобный же эффект наблюдается и при сравнении производных карбаида (соед. 7 и 8 табл. 1). Эффект замещения атома водорода алкильными радикалами проявляется в еще более значительной мере при вариации R-радикала (формула табл. 1). Так, соединение незамещенного фрагмента амидной группы со структурным фрагментом углеводородной цепи, содержащей атом галоида (фтор либо перфтор – соедин. 10, 11 табл. 1), ненасыщенную связь (акрилаид соедин. 17 табл. 1), либо тяжелый гидрофобный радикал (пропиоаид либо бутираид) приводят к возрастанию токсичности во всех без исключения перечисленных случаях. В то же время присоединение фрагментов донорного характера (амино-, метильная группы как в соедин. 4 и 7 табл. 1) к амидной группе значительно понижают токсичность полученных веществ в сравнении с незамещенным формаидом.

Можно предположить, что наличие в молекуле амидов групп – акцепторов является одним из факторов повышения токсичности соединений данного ряда, независимо от места их присоединения в молекуле амида. Так, замещение атома водорода у атома азота амидной группы ацетаида N-ацетильной группой также приводит к повышению токсичности N-ацетилацетаида в

сравнении с незамещенным ацетамидом – ЛД-50 для ацетамидов составляет 11,8 г/кг, N-ацетилпроизводного – 7,1 г/кг.

Таким образом, сравнительный анализ химической структуры и показателей токсичности ряда амидов, приведенных в табл. 1, позволяет предположить, что в основу химической модификации молекул амидов с целью снижения их токсичности должна быть положена реакция, приводящая к усилению протонакцепторных, а следовательно, и гидрофильных свойств молекул амидов. В качестве таковой была выбрана реакция взаимодействия амидов НМК с оксидом этилена, позволяющая варьировать количество оксиэтильных звеньев в зависимости от степени полимеризации (n).

Ранее нами было показано, что при целенаправленном регулировании степени полимеризации олигомеров в гомологических рядах оксиэтилированных многоатомных спиртов (этиленгликоль, глицерин, пентаэритрит) можно с некоторой вероятностью изменять характер криопротекторного действия и уровня токсичности веществ. При этом установлена зависимость между молекулярной массой веществ и их токсичностью в гомологических рядах, полученных оксиэтилизацией указанных спиртов. [11].

Судя по представленным в табл. 2 данным, все исследованные оксиэтильные производные по сравнению с исходными веществами по степени острой токсичности оказываются менее токсичными (сравните с табл. 1).

Все известные изученные оксиэтильные производные амидов НМК, согласно укрупненной классификации веществ по степени токсичности (И.В.Саноцкий, И.П.Уланова), относятся к классу малотоксичных, кроме оксиэтилированного трифторацетилэтанолamina. Последний относится к классу токсичных веществ [8].

Т а б л и ц а 2

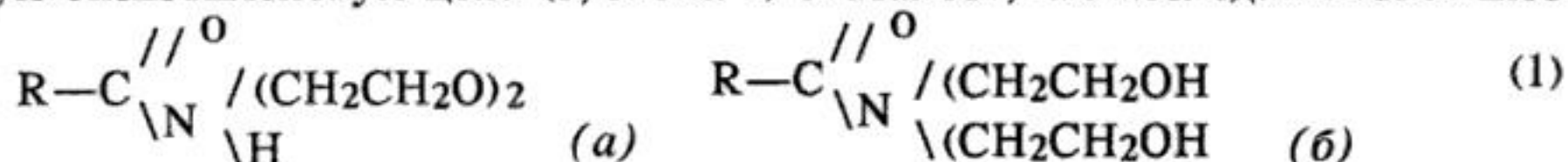
Влияние оксиэтилирования амидов низкомолекулярных кислот на токсичность

N/N п/п	Вещество $R-C \begin{matrix} // O \\ \backslash N \\ \backslash (CH_2CH_2O)_nH \end{matrix} /R_1$		Степень полиме- ризации	Молекуляр- ная масса	ГЛБ	Токсичность ЛД-50 г/кг
	R	R ₁	n			
1.	H	H	1	90	-0,465	7,1 (6,3-7,9)
2.	CH ₃ , H	1	103	-0,313	6,8 (6,0-7,7)	
3.	CH ₃ , H	2	147	-0,287	8,7 (8,1-9,2)	
4.	CH ₃	H	3	191	-0,215	14,8 (12,0-18,0)
5.	CH ₃	H	4	235	-0,186	14,8 (13,0-18,0)
6.	CH ₃	H	5	279	-0,164	17,2 (15,0-19,0)
7.	CH ₃	H	7	365	-	17,8 (13,4-22,3)
8.	CH ₃	H	11	541	-	14,6 (13,5-15,6)
9.	CH ₃	CH ₃	6	337	-0,251	17,8 (16,0-20,0)
10.	CH ₃	CH ₃	9	468	-0,168	14,1 (13,0-16,0)
11.	CH ₃	COCH ₃	4	277	-0,409	19,1 (16,0-23,0)
12.	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	1	147	-0,309	1,5 (1,0-1,80)
13.	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	4	235	-0,195	6,1 (5,4-7,0)
14.	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	6	323	-	5,4 (4,8-6,1)
15.	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	10	501	-	4,7 (4,3-5,1)
16.	CH ₃	H	7	422	-	0,98 (0,86-1,12)

Из представленных в табл. 2 данных видно, что введение в состав молекулы формамида одной оксиэтильной группы вызывает снижение токсичности полученного таким образом N-формилэтанолamina в 1,9 раза. Токсичность изученных фракций оксиэтилированного ацетамидa уменьшается по сравнению с исходным амидом в 1,2 – 1,5 раза. При этом наблюдается тенден-

ция снижения токсичности с увеличением степени полимеризации веществ. При получении оксиэтилированного ацетамида, исходя из форполимера, токсичность этоксилата ацетамида снижается в 2,1 раза. При увеличении числа оксиэтильных звеньев в молекуле N-метилацетамида токсичность олигомеров уменьшилась в сравнении с исходным амидом в 7–8,8 раза. Оксиэтилирование N-ацетилацетамида понижает его токсичность в 2,7 раза.

Интересные данные получены при сравнительном исследовании изомерных производных оксиэтилированного N-ацетилмоно- и N-ацетилдиэтаноламина (соединение 15 табл. 1 и соединение 3 табл. 2). При сравнении токсичности изомера с вытянутой цепью (а, схема 1) с изомером, имеющим разветвленную оксиэтиленовую цепь (б, схема 1) оказалось, что последний токсичнее в



4,5 раза.

Однако при оксиэтилировании N-ацетилдиэтаноламина полученные продукты с молекулярной массой 323–586 обладают токсичностью в 3–4 раза меньшей, чем исходный амид.

Известно, что токсичность соединений в гомологических рядах коррелирует с параметрами гидрофобности химических соединений. Одним из параметров, характеризующих гидрофобность соединений, может служить гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) молекулы. Экспериментально установлено, что увеличение числа оксиэтильных звеньев в молекуле амидов, как правило, приводит к веществам с менее выраженной токсичностью (соед. 5, 6, 7, табл. 2). Оксиэтилирование амидов сопровождается снижением гидрофобных свойств и, как следует из данных табл. 2, в рядах оксиэтилированных олигомергомологов амидов отмечается четкая зависимость ГЛБ от степени оксиэтилирования. Эти результаты согласуются с данными литературы, полученными при исследовании амидов высших жирных кислот, а также оксиэтилированных спиртов [10]. Токсичность оксиэтилированных кислот со степенью полимеризации 40 и спиртов со степенью полимеризации 20 уменьшалась при росте степени оксиэтилирования, а для аддуктов с одинаковой степенью оксиэтилирования она снижалась с уменьшением длины алкильных цепей. Последнее наблюдение четко подтверждает известную зависимость токсичности веществ от их гидрофобности.

Таким образом, резюмируя приведенные данные, можно сделать следующее заключение. Оксиэтилирование как способ получения новых химических соединений приводит, как правило, к снижению токсичности исходных амидов, хотя прямой зависимости между их степенью оксиэтилирования и уровнем снижения токсичности, как явствует из представленных данных, не наблюдается. Данный подход модификации структуры амидов НМК, на наш взгляд, может оказаться полезным при скрининге и создании новых криозащитных веществ со сниженной токсичностью в других рядах химических соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аграненко В.Н., Ермолович С.В. Криоконсервирование лейкоцитов // Криоконсервирование клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1983. – С. 98–106.
2. Актуальные проблемы криобиологии / Под ред. Н.С.Пушкаря. – Киев: Наук. думка, 1981. – 606 с.
3. Виноград-Финкель Ф.Р., Леонтович В.А. Теоретические проблемы криоконсервирования крови // Пробл. гематол. и переливания крови. – 1977. – 22, N 2. – С. 3–9.
4. Вредные вещества в промышленности / Под ред. Н.В.Лазарева. – Л.: Химия, 1976. – Т. 1. – 590 с.
5. Курбатов А.Д. Низкотемпературное хранение спермы птиц // Криобиология. – 1985. – N 3. – С. 13–15.

6. Луговой В.И., Ханина Л.А., Шраго М.И. и др. Синтез, структура и криопротекторные свойства оксиэтилированных амидов при применении их для консервирования клеточных суспензий // Патофизиологические аспекты действия холода на организм. – Харьков: Б.и., 1989. – С. 89–93.
7. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.Н. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология. – 1978. – 151, N 4. – С. 497–502.
8. Саноцкий И.В., Уланова И.П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. – М.: Медицина, 1975. – 329 с.
9. Хитрин С.В., Зильберман Е.Н., Спасская Р.И., Сякина А.В. Ацилирование этаноламина // Изв. вузов. Сер. «Химия и хим. технология». – 1983. – 26, N 6. – С. 765–776.
10. Шенфельд Н. Поверхностно активные вещества на основе оксида этилена. – М.: Химия, 1982. – 748 с.
11. Шраго М.И., Коций С.В., Гучок В.М., Ханина Л.А. Взаимосвязь структуры и показатели токсичности криопротекторов в ряду замещенных глицерина // Криоконсервирование клеток и тканей. – Харьков: Б. и., 1989. – С. 3–8.

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

Поступила 14.06.93

Л.А.ХАНИНА, В.М.ГУЧОК, В.В.ЧЕКАНОВА, О.П.МЕЛЬНИК, В.Й.ЛУГОВИЙ

ОКСИЭТИЛЮВАННЯ АМІДІВ АЛІФАТИЧНИХ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ КИСЛОТ ЯК ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИЙ ПІДХІД ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ НОВИХ НЕТОКСИЧНИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Досліджено показники токсичності продуктів оксиетилювання амідів аліфатичних низькомолекулярних кислот. На відміну від похідних амідів продукти їх оксиетилювання значно менш токсичні на організменному рівні, у зв'язку з чим вони можуть бути використані при низькотемпературному криоконсервуванні різноманітних біологічних об'єктів.

L.A.KHANINA, V.M.GUCHOK, V.V.CHEKANOVA, A.P.MELNIK, V.I.LOUGOVOY

OXYETHYLATION OF AMIDES OF ALIPHATIC LOW MOLECULAR ACIDS AS AN EXPERIMENTAL APPROACH TO OBTAINING NEW NON-TOXIC CRYOPROTECTANTS

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

The toxicity indices of the products of the oxyethylation of the aliphatic low molecular acid amides were studied. Unlike the original amides, the products of their oxyethylation are much less toxic at the level of the organism. Thus, they may be applied in the low temperature cryopreservation of various biological systems.

УДК 612.111

С.В.Пателарос, О.П.Сынчикова

ОСМОТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ПОСТГИПЕРТОНИЧЕСКОМ ЛИЗИСЕ

Исследуется осмотический отклик регидратированных эритроцитов в электролитных и неэлектролитных изотонических средах, предварительно инкубированных в условиях гипертонии. Установлено, что постгипертонический лизис связан с формированием мембранных гемолитических пор на этапе регидратации при восстановлении объема эритроцитов. Гемолиз более сильно проявляется в неэлектролитных средах, особенно усиливается при увеличении времени гипертонической инкубации и ингибируется при увеличении ионной силы среды регидратации. Однако изменение pH среды регидратации не оказывает значительного влияния на уровень постгипертонического лизиса эритроцитов.

Способность некоторых организмов, приобретенная в процессе эволюции, обратимо терять большую часть внутриклеточной воды и восстанавливать свой метаболизм после регидратации [6–8] обусловлена накоплением в

цитоплазме этих организмов протектирующих веществ (глицерина, тригало-зы, аминокислот), предотвращающих изменения в структурной организации клеток и способствующих их выживанию в экстремальных условиях [7]. Однако установлено, что при переходе клеток от дегидратированного к нормальному изотоническому состоянию, т.е. при регидратации, клетки погибают. Это явление, получившее название постгипертонического лизиса (ПЛ), характерно для эритроцитов человека [12, 14]. Описываемое явление имеет место и при низкотемпературном консервировании биологических объектов, в том числе и эритроцитов человека. Принцип действия проникающих и непроникающих криопротекторов заключается в их способности ограничивать критическую степень дегидратации клеток, имеющую место при увеличении то-ничности внешней среды из-за кристаллизации льда, и тем самым способство-вать увеличению их сохранности после размораживания. Однако механизмы, ответственные за повреждение эритроцитов при переносе их из гипертониче-ских условий в изотонические, и основные стадии этого процесса остаются не-известными.

В настоящей работе с целью выявления природы ПЛ исследуется осмоти-ческое поведение эритроцитов, регидратированных в электролитных и не-электролитных изотонических средах после предварительной дегидратации в гипертонических условиях. Для проведения исследований были использованы эритроциты донорской крови второй группы, стабилизированной консерван-том Глюгидир. Осадок эритроцитов получали центрифугированием (300 об/мин по 3 мин) и трижды отмывали физиологическим раствором (150 mM NaCl 20 mM *трис*-HCl, pH 7,4). Степень лизиса эритроцитов при регидрата-ции определяли спектрофотометрическим методом на длине волны 720 нм при расходимости светового пучка 3 градуса. В кювету с изотоническим раствором (2 мл) 0,15 M NaCl или 0,27 M сахарозы при постоянном перемешивании вно-сили 7 мкл суспензии эритроцитов, предварительно инкубированных в гипер-тоническом растворе 1,2 M сахарозы (5 mM фосфатный буфер, pH 7,4) в тече-ние 1, 15, 30 мин при температуре 37 °C. Кроме того, для определения влияния ионной силы среды на уровень гемолиза, после внесения эритроцитов в элек-тролитную изотоническую среду, добавляли 100 мкл 4 M NaCl до конечной концентрации в растворе 0,33 M.

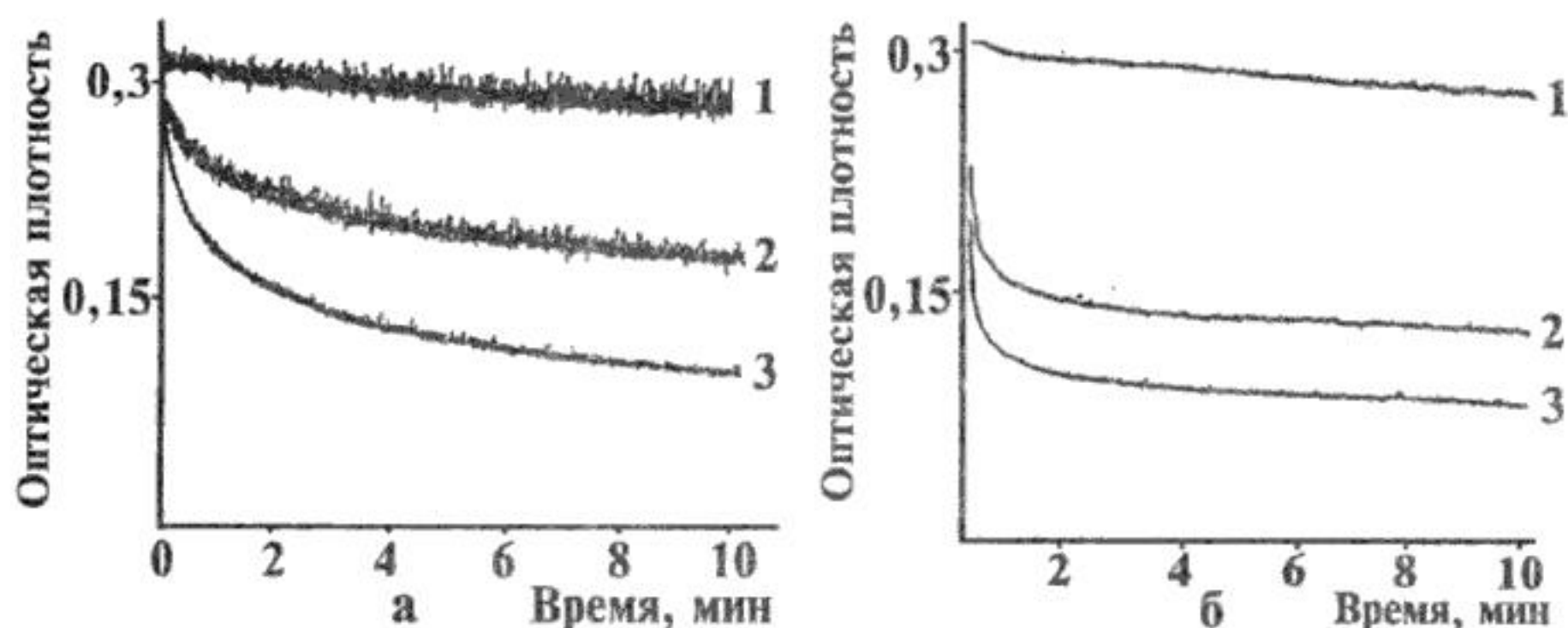


Рис. 1. Динамика лизиса эритроцитов, инкубированных в растворе 1,2 M сахарозы при 37 °C в течение 1 мин (1); 15 мин (2) и 30 мин (3) и регидратированных в растворах 0,15 M NaCl (а) и 0,27 M сахарозы (б) при 20–22 °C

Светопоглощение (оптическая плотность) клеточной суспензии прямо пропорционально количеству интактных клеток, так как на длине волны 720 нм светорассеяние теней, образующихся в процессе лизиса клеток, и поглощение света гемоглобином пренебрежимо мало. При перемешивании клеточной суспензии специальной мешалкой внутри кюветы регистрируются флуктуации светопоглощения, причем средняя амплитуда этих флуктуаций для сферулированных эритроцитов равна нулю ("шум" отсутствует) и возра-

стает по мере увеличения степени дискоидности. Таким образом, имеется возможность регистрировать как динамику изменения формы клеток, так и динамику лизиса. В работе использовалась установка, созданная на базе монохроматора СФ-4А. Кривые динамики лизиса получали на самописце.

Для того, чтобы проверить влияние состава гипертонической и изотонической сред на уровень ПЛ, 100 мкл эритроцитов инкубировали в 0,9 мл гипертонических растворов 1,5 М NaCl или 1,2 М сахарозы в течение 15 мин при 37 °С. Затем объем суспензии 10 мкл переносили в изотоническую среду, через 5 мин центрифугировали (3000 об/мин, по 2 мин) и в надосадочной жидкости спектрофотометрически на длине волны 415 нм определяли уровень свободного гемоглобина по отношению к 100%-му лизису такого же количества клеток, индуцированного тритоном Х-100 (1%). Таким же образом определяли уровень ПЛ эритроцитов, регидратированных в электролитной изотонической среде NaCl (0,15 М) с разным рН от 4 до 9.

Из данных, представленных на рис. 1, а, б, видно, что регидратация эритроцитов в изотонических средах NaCl (а) и сахарозы (б) приводит к прогрессирующему уменьшению светопоглощения (оптической плотности) с увеличением времени гипертонической инкубации клеток от 1 до 30 мин. Можно выделить две характеристики светового сигнала – амплитуду его изменения и ширину шумовой дорожки (амплитуду флуктуации), несущие информацию о степени набухания и лизиса и степени дискоидности или сферичности клеток. С увеличением продолжительности гипертонической инкубации от 1 до 30 мин уменьшается дискоидность регидратированных клеток и увеличивается степень их набухания и лизиса, что выражается в более значительном уменьшении светопоглощения суспензии и амплитуды флуктуации сигнала. При этом лизис особенно явно проявляется в неэлектролитной среде (рис. 1, б). Таким образом, сравнивая кривые на рис. 1, а, б можно прийти к выводу о том, что поведение эритроцитов при регидратации зависит от времени инкубации в гипертонической сахарозе и состава регидратирующей среды. Набухание и лизис эритроцитов при регидратации указывает на то, что при восстановлении объема клеток может происходить нарушение структурной целостности клеточных мембран. Эти изменения могут отразиться на осмотическом поведении клеток, в частности, на характере их осмотического ответа при помещении в гипертонические или гипотонические среды. В связи с этим была изучена динамика осмотического отклика эритроцитов в широком диапазоне концентраций дегидратирующих сред. На рис. 2 представлены серии кривых, отражающих динамику лизиса эритроцитов, регидратированных в электролитной среде после 15 мин инкубации в гипертонических растворах сахарозы с концентрацией от 0,5 до 1,2 М, а также осмотический отклик клеток при увеличении осмолярности внешней среды до 330 мМ путем добавления концентрированного раствора NaCl (4 М). Видно, что осмотический ответ эритроцитов зависит от степени первоначальной дегидратации, то есть от концентрации исходного гипертонического раствора. При этом можно выделить три диапазона концентрации сахарозы, в пределах которых характер осмотического отклика клеток существенно отличается. В первом диапазоне концентрации (0,5–0,6 М) параметры осмотического отклика сравнимы как в случае контрольных клеток, так и в случае, когда эритроциты инкубировались в гипертонической сахарозе (1,2 М) в течение 1 и 15 мин (рис. 1, а). В связи с этим можно отметить, что кратковременная (1 мин) дегидратация не приводит к существенному изменению осмотического поведения эритроцитов и нарушению их мембранной структуры после регидратации. Во втором диапазоне концентрации (0,7–0,9 М) наблюдается постепенная сферуляция клеток, однако динамика осмотического отклика не высокая. Третий диапазон (1–1,2 М) характеризуется максимальным уровнем осмотического отклика и наиболее высокой скоростью набухания и лизиса клеток. Как видно из рис. 2, увеличение ионной силы сре-

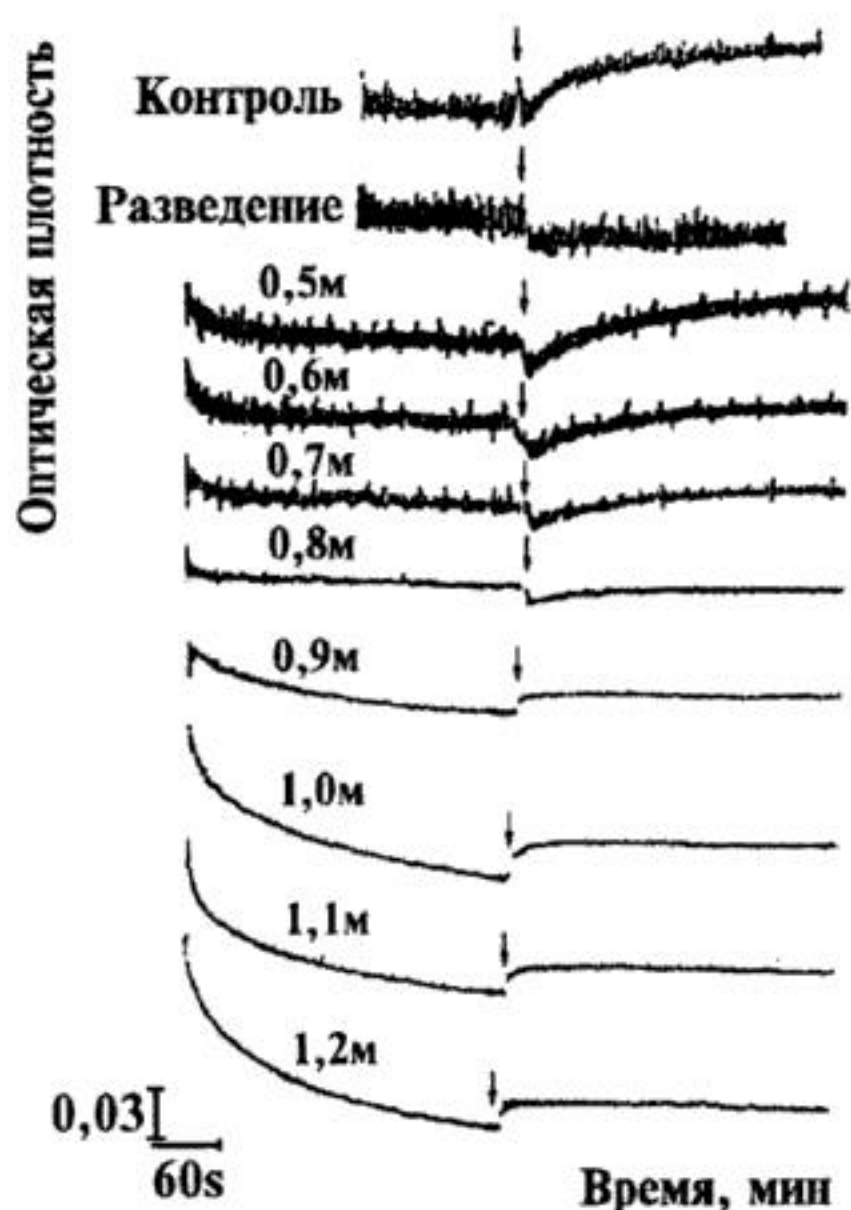


Рис. 2. Динамика лизиса эритроцитов, регидратированных в растворе 0,15 М NaCl после инкубации в гипертонических растворах (0,5 – 1,2 М) сахарозы при 37 °С в течение 15 мин. Стрелками указаны моменты добавления в изотоническую среду 100 мкл 4 М NaCl до конечной его концентрации в среде 0,33 М. Указан ответ контрольных эритроцитов на добавление 4 М NaCl и уменьшение оптической плотности при разведении тем же количеством физического раствора

яснить значительным возрастанием проницаемости мембраны непосредственно на этапе восстановления объема клеток до изотонической величины [9].

Согласно другим данным, мембрана эритроцитов, прошедших через фазу лизиса, способна замыкаться и восстанавливать проницаемость, близкую к исходной [9, 10]. Это подтверждается и нашими результатами: регидратация в изотонической сахарозе сопровождается относительно быстрым прекращением критического набухания эритроцитов по сравнению с изотоническим раствором NaCl, где этот процесс растянут во времени (рис. 1, а, б). Последнее

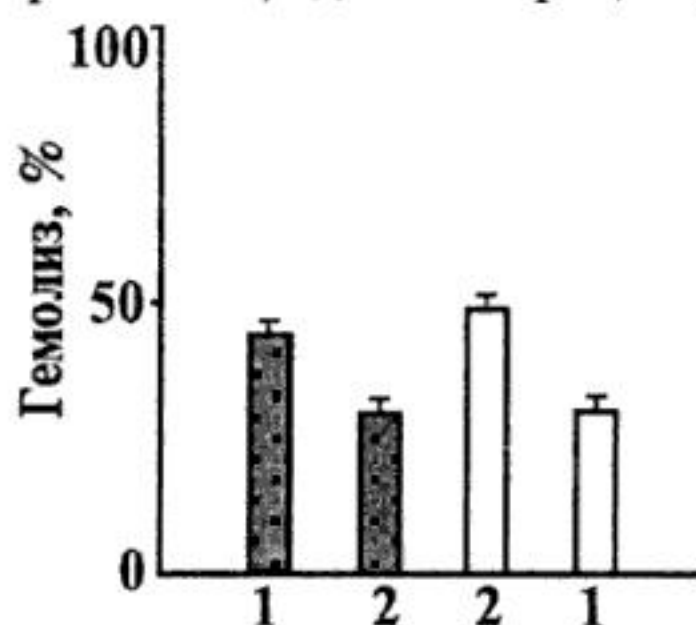


Рис. 3. Уровень лизиса эритроцитов, инкубированных в гипертоническом растворе 1,5 М NaCl (■) и 1,2 М сахарозы (□) при 37 °С в течение 15 мин и перенесенных в изотонические растворы 0,15 М NaCl (1) и 0,27 М сахарозы (2) при 20–22 °С.

ды регидратации добавлением NaCl (4 М) после внесения клеток в изотоническую среду приводит к ингибированию гемолиза. Наблюдаемая разница в характере осмотического ответа клеток при изменении степени и времени их предварительной дегидратации указывает на то, что в процессе регидратации в зависимости от исходных условий могут индуцироваться различные структурные состояния цитогелия и цитоскелета, отличающиеся по способности реагировать на действующий на клетку осмотический градиент.

В ранних работах ПЛ связывали с «нагрузением» клеток в гипертонических растворах непроницающими в нормальных условиях ионами Na^+ и сахарозой. Соответственно предполагалось, что при возвращении таких клеток в изотонические условия они гемолизуют по коллоидно-осмотическому механизму [12–14]. Однако позже выяснилось, что непосредственно на этапе гипертонической инкубации не наблюдается значительного поступления в клетки ионов Na^+ или сахарозы [11]. В то же время включение в эритроциты Na^+ и сахарозы было обнаружено после переноса клеток из гипертонических в изотонические условия, что можно объ-

яснить значительным возрастанием проницаемости мембраны непосредственно на этапе восстановления объема клеток до изотонической величины [9]. Согласно другим данным, мембрана эритроцитов, прошедших через фазу лизиса, способна замыкаться и восстанавливать проницаемость, близкую к исходной [9, 10]. Это подтверждается и нашими результатами: регидратация в изотонической сахарозе сопровождается относительно быстрым прекращением критического набухания эритроцитов по сравнению с изотоническим раствором NaCl, где этот процесс растянут во времени (рис. 1, а, б). Последнее означает, что непроницаемость мембраны для молекул сахарозы восстанавливается раньше, чем для ионов Na^+ , имеющих меньший размер. Ингибирование ПЛ после увеличения концентрации соли в регидратирующей среде объясняет, почему уровень гемолиза меньше в гипертонических средах по сравнению с изотоническими [1, 11], однако механизмы подобного влияния электролитов на развитие лизиса остаются неясными. Можно предположить, что главным действующим фактором в этих условиях является ионная сила раствора, контролирующая скорость замыкания дефектов мембраны, возникающих при регидратации.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что ПЛ развивается не по коллоидно-осмотическому механизму, а связан с формированием мембранных дефектов (пор) на стадии регидратации клеток.

На рис. 3 представлены данные о влиянии состава сред дегидратации и регидратации на уровень ПЛ эритроцитов. Видно, что уровень лизиса при регидратации в изотонической сахарозной среде больше для клеток, дегидратированных в гипертонической сахарозе, чем в гипертонической среде NaCl, в то время как для регидратирующей среды NaCl справедливо обратное. Таким образом, уровень ПЛ эритроцитов повышается, когда природа среды дегидратации и регидратации одинакова по сравнению с обратным случаем, когда уровень ПЛ низкий.

Как видно из рис. 4, изменение pH электролитной среды регидратации не привело к значительным изменениям уровня ПЛ, хотя при низких [4, 5] и больших [9] значениях pH наблюдается снижение уровня гемолиза в случае инкубирования клеток в гипертонических сахарозе и NaCl соответственно.

Согласно другим источникам, где исследуется лизис эритроцитов, вызванный экзогенными агентами, в структуру гемолитической поры входят ионизированные группы фосфолипидов, гликолипидов или белков, регулирующие транспорт через гемолитическую пору [3, 4]. В данном случае лизис клеток активируется, когда указанные группы ионизированы. Когда группы протонизированы (связаны с ионами H^+) или связаны с дивалентными катионами, лизис ингибируется. Таким образом, в случае лизиса, вызванного экзогенными агентами, существует зависимость уровня повреждения клеток от pH среды [2–5], однако при ПЛ такая зависимость менее выражена. При этом можно предположить, что формируемые гемолитические поры в стадии регидратации эритроцитов содержат заряженные группы с низкой способностью связываться с ионами H^+ .

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующие выводы: 1) ПЛ эритроцитов развивается не по коллоидно-осмотическому механизму, а связан с формированием в мембранах гемолитических пор на стадии регидратации при восстановлении объема клеток; 2) в случае ПЛ ключевым звеном в развитии повреждения клеток при регидратации является стадия дегидратации, на которой создаются предпосылки возникновения указанных повреждений; 3) уровень ПЛ зависит от состава сред дегидратации и регидратации. При этом лизис особенно явно проявляется в неэлектролитных средах и слабо зависит от изменений pH регидратирующей среды. При одинаковом составе (электролитном и неэлектролитном) сред дегидратации уровень ПЛ выше, чем в случае, когда состав сред разный; 4) кратковременная дегидратация не вызывает серьезных нарушений структурной организации мембран при последующей регидратации, однако увеличение времени приводит к развитию повреждений и активированию гемолиза; 5) размеры и/или количество мембранных дефектов регулируются ионной силой среды регидратации, увеличение которой приводит к замыканию дефектов и ингибированию гемолиза; 6) восстановление исходной проницаемости мембран регидратированных эритроцитов происходит раньше в неэлектролитных изотонических средах по сравнению с электролитными.

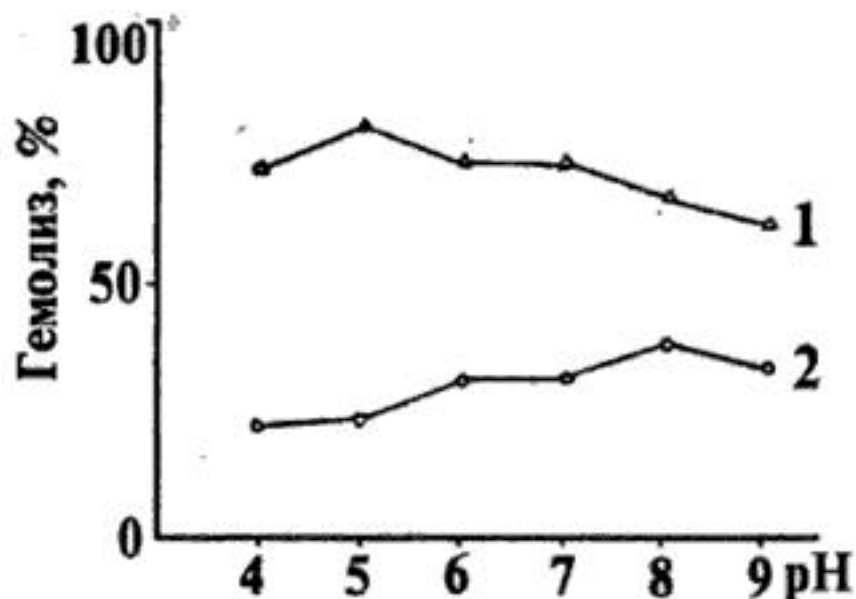


Рис. 4. Уровень лизиса эритроцитов, инкубированных в течение 15 мин при 37 °С в гипертонических растворах 1,5 М NaCl (1) и 1,2 М сахарозы (2) и перенесенных в изотонические растворы 0,15 М NaCl с разным pH от 4 до 9 при 20 – 22 °С

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1988. – 30 с.
2. Alder G.M., Arnold W.M., Bashford C.L. et al. Divalent cation-sensitive pores formed by natural and synthetic melittin and by Triton X-100 // BBA. – 1991. – 1061. – P. 111–120.
3. Bashford C.L., Alder G.M., Menestrina G. et al. Membrane damage by hemolytic viruses, toxins, complement and other cytotoxic agents // J. Biol. Chem. – 1986. – 261. – P. 9300–9308.
4. Bashford C.L., Alder G.M., Grahman J.M. et al. Ion modulation of membrane permeability: Effect of cation on intact cells and on cells and phospholipid bilayer treated with pore-forming agents // J. Membr. Biol. – 1988. – 103. – P. 79–94.
5. Bashford C.L., Rodrigues L., Pasternak C.A. Protection of cell against membrane damage by haemolytic agents: divalent cations and protons act at the extracellular side of the plasma membrane // Biochim. et Biophys. Acta. – 1989. – 983, N 1. – P. 54–56.
6. Clegg J.S., Seith P., Seith W., Hazlewood C.F. Cellular Response to extreme water loss: the water-replacement hypothesis // Cryobiology. – 1982. – 19. – P. 306–316.
7. Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F., Winstrom C.A. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars // Biochem. – 1987. – 242. – P. 1–10.
8. Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F., Rudolf A.S. Interactions of sugar with membranes // Biochim. et Biophys. Acta. – 1988. – 947. – P. 367–384.
9. Daw A., Farrant J., Morris G.J. Membrane leakage of solutes after thermal shock of freezing // Cryobiology. – 1973. – 10, N 2. – P. 155–163.
10. Pegg D.E., Diaper M.P. On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes // Biophys. J. – 1988. – 54, N 3. – P. 471–488.
11. Woolgar A.E., Morris G.J. Some combined effect of hypertonic solutions and changes in temperature on posthypertonic hemolysis of human RBC // Cryobiology. – 1973. – 10, N 1. – P. 82–86.
12. Zade-Oppen A.M.M. Posthypertonic hemolysis in sodium chloride systems // Acta Physiol. Scand. – 1968. 73, N 4. – P. 341–364.
13. Zade-Oppen A.M.M. The effect of mannitol, sucrose, raffinose and dextran on posthypertonic hemolysis // Acta Physiol. Scand. – 1968. – 74, N 1–2. – P. 195–206.
14. Zade-Oppen A.M.M. Posthypertonic hemolysis in sucrose systems // Experientia. – 1970. – 26, N 9. – P. 1087–1088.

Харьковский государственный университет

Поступила 09.12.93

С.В.ПАТЕЛАРОС, О.П.СИНЧИКОВА

ОСМОТИЧНА ПОВЕДІНКА ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ПОСТГІПЕРТОНІЧНОМУ ЛІЗИСІ

Харківський державний університет

Досліджується осмотичний відгук регідратованих еритроцитів у електролітних і неелектролітних ізотонічних середовищах, заздалегідь інкубованих в умовах гіпертонії. Встановлено, що постгіпертонічний лізис зв'язаний з формуванням мембранних гемолітичних пор на етапі регідратації при відновленні обсягу еритроцитів. Гемоліз сильніше проявляється в неелектролітних середовищах, особливо посилюється при збільшенні йонної сили середовища регідратації. Однак зміна рН середовища регідратації відчутно не впливає на рівень постгіпертонічного лізису еритроцитів.

S.V.PATELAROS, O.P.SYNCHIKOVA

OSMOTIC BEHAVIOR OF RED BLOOD CELLS DURING POSTHYPERTONIC LYSIS

Kharkov State University

The present report deals with the investigation of the osmotic response of the rehydrated red blood cells (RBC) in the electrolyte and non-electrolyte isotonic media, pre-incubated under hypertonic solutions. Posthypertonic lysis has been found to be related to the formation of membrane hemolytic pores at the stage of rehydration during restoration of the RBC volumes. Hemolysis is stronger manifested in the non-electrolyte media, it is intensified with the prolongation of the hypertonic incubation, while a rise in the ionic strength of the rehydration medium results in its inhibition. However, a change in pH of the rehydration medium does not significantly affect the level of posthypertonic lysis of RBC.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 57.043

И.В.Белочкина, Н.А.Волкова

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ НОВорожденных поросят после НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ

При поддержании криоконсервированных печеночных клеток *in vitro* изучали морфологические особенности формирования монослойной культуры гепатоцитов, пролиферативные процессы и динамику синтеза мочевины. Криоконсервирование гепатоцитов в присутствии 10% ДМСО и 10% ПЭО-1500 со скоростью охлаждения 1 °С/мин приводит к снижению значений изучаемых показателей в первые сутки культивирования по сравнению с свежеизолированными печеночными клетками с последующим восстановлением функций до уровня контроля.

Паренхиматозные клетки печени, выполняющие большинство органоспецифических функций, на протяжении многих лет являются моделью для изучения различных сторон метаболизма печени, вопросов регенерации и канцерогенеза этого органа, для токсикологических и фармакологических исследований [8]. В последнее десятилетие широко испытываются возможности применения изолированных гепатоцитов для временного органозамещения при заболеваниях печени [5, 7].

Решение перечисленных экспериментальных задач, а также широкое клиническое использование изолированных печеночных клеток реально при наличии значительных запасов гепатоцитов.

Низкотемпературное консервирование является сейчас практически безальтернативным способом сохранять значительные количества клеточного материала без больших материальных затрат и значительно дольше, чем это позволяют методы культивирования или гипотермического хранения клеток. Оценка функциональной сохранности деконсервированных гепатоцитов, производимая преимущественно в первые часы после отогрева, позволяет лишь весьма условно судить о ходе восстановительных после действия холода процессов, о сохранности метаболического и пролиферативного потенциала печеночных клеток. Поэтому целью проведенной работы явилось изучение в условиях культивирования ряда элементарных и специфических свойств деконсервированных печеночных клеток (прикрепление, распластывание на субстрате, формирование монослоя, пролиферация, мочевинообразование).

Приемы криоконсервирования описаны в основном для гепатоцитов крыс и, в меньшей степени, человека. В наших экспериментах в качестве источника гепатоцитов была выбрана печень новорожденных поросят. Этот объект позволяет получать до одного миллиарда клеток (масса печени – 22 ± 2 г), по функциональным свойствам весьма сходных с человеческими, и в случае их клинического использования избежать опасности вирусных заражений, которая существует при работе с человеческим материалом.

В основу методики получения гепатоцитов положен способ [10] двухступенчатой перфузии печени с использованием коллагеназы в нашей модификации. Наркотизированному животному (1 мл 5%-го раствора тиопентала натрия внутривенально) стерильно производили срединную лапаротомию, канюлировали нижнюю полую вену выше ответвления правой почечной вены и производили перфузию печени по открытому контуру последовательно такими растворами: 1) 0,4 л фосфатно-солевого буфера (ФСБ) Дюльбекко и Фогта без Ca^{2+} ; 2) 0,2 л 2мМ ЭДТА в ФСБ (при 37 °С); 3) 0,2 л раствора, содержащего смесь препаратов бактериальной (*Streptomyces sp.*) коллагеназы с разной степенью очищенности: 0,05% менее очищенной коллагеназы ГЗХ и 0,01% - Г10Х, более очищенной (маркировка производителя НПО «Фермент», г.

Вильнюс), при температуре 42 °С. Скорость перфузии 25 мл/мин. По окончании перфузии печень дезагрегировали в среде следующего состава: 250 мМ сахарозы, 5 мМ KCl, 0,4 мМ KH_2PO_4 , 1,6 мМ Na_2HPO_4 , 1 мМ CaCl_2 , 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), pH 7,4. Полученную взвесь клеток фильтровали через капроновый фильтр, затем дважды отмывали центрифугированием (300 об/мин, 2 мин) в среде того же состава. Все манипуляции с клеточной суспензией производили на льду, с холодными растворами (4 °С).

Целостность плазматической мембраны определяли традиционным способом по устойчивости к окрашиванию трипановым синим [10]. Наблюдали также прижизненную флуоресценцию клеток после двойного окрашивания ФДА и бромидом этидия [6].

Для постановки культуры гепатоциты высевали в пластиковые чашки Петри диаметром 35 мм, покрытые пленкой коллагена. Посевная доза – 450 тыс клеток/чашку. Прикрепление гепатоцитов происходило в среде 199 при 37 °С в течение 1 ч. Затем жидкую фазу с неприкрепившимися клетками удаляли, и дальнейшее культивирование проводили в среде L-15, дополненной 10% ЭТС и антибиотиками.

Пролиферативный потенциал культуры гепатоцитов определяли методом гистоавторадиографии по уровню включения меченного тритием тимидина в ядра гепатоцитов при его контакте с клетками в течение 5 ч. Гисторадиоавтографы окрашивали гематоксилином и эозином традиционным способом. Меченные ^3H -тимидином ядра подсчитывали в сорока полях зрения в каждой чашке при увеличении микроскопа $\times 420$, определяли индекс меченых ядер (ИМЯ) как отношение количества клеток с мечеными ядрами к общему количеству подсчитанных клеток и выражали его в процентах.

Продукцию мочевины гепатоцитами в культуре оценивали с помощью стандартного набора реактивов ("Lachema", Чехословакия). Содержание мочевины определяли в культуральной среде, собранной за сутки культивирования гепатоцитов.

В культуре нативных гепатоцитов непрямой иммунопероксидазным методом выявляли клетки, синтезирующие альфафетопротеин [5, 11].

Гепатоциты порослят замораживали в солевой среде, дополнительно содержащей 250 мМ сахарозы, 20% ЭТС и криопротектор – 10% ДМСО или 10% ПЭО-1500, со скоростью 1 °С/мин до –70 °С, затем переносили в жидкий азот. Отогрев суспензии производили на водяной бане при 37 °С, после чего клетки ступенчато отмывали от криопротектора.

Жизнеспособность свежевыделенных гепатоцитов составляла $78 \pm 6\%$. После их посева через 1 ч инкубации клеточной суспензии при 37 °С на подложке выявлялись преимущественно гепатоциты, форма которых варьировала от почти сферической через округленную к полигональной. При этом часть клеток демонстрировала четко контурированную мембрану, в ряде случаев отмечено образование везикул.

Спустя 1 сут наблюдается разреженный монослой, сформированный из крупных распластаных клеточных элементов эпителиоидного характера со светлой цитоплазмой и округлым базофильным ядром с гиперхромным ядрышком. Изредка встречаются двуядерные клетки. Участки разреженного монослоя, напоминающие ячеи сети, перемежаются локусами многослойного эпителия, лежащего в "узлах" этой сети. Размеры клеток довольно широко варьируют: на участках, где имеется высокая плотность, размеры гепатоцитов существенно меньше, чем в краевых отделах неоднородного монослоя.

3-и сут наблюдения характеризуются увеличением количества клеточных элементов на подложке. Встречаются и некрупные веретенообразные клетки – фибробласты, повидимому, изначально незначительно контаминирующих культуру, однако индентификация этих клеток, обычно активно размножающихся в культуре, с помощью светового микроскопа становится воз-

можной только к третьим суткам наблюдения. Обращает на себя внимание наличие печеночных клеток, находящихся в состоянии митоза (рис. 1).

При наблюдении флуоресценции чашек с гепатоцитами в 1-е сут культивирования выявлялось темно-зеленое свечение невысокой интенсивности живых клеток, кирпично-красное окрашивание ядер бромидом этидия не наблюдалось. На 3-и сут в культуре нативных гепатоцитов наблюдали интенсивную зеленую флуоресценцию клеток с ФДА, причем более активное свечение обнаруживали фибробластические клетки. Выявлялись также погибшие клетки с ядром, окрашенным бромидом этидия.

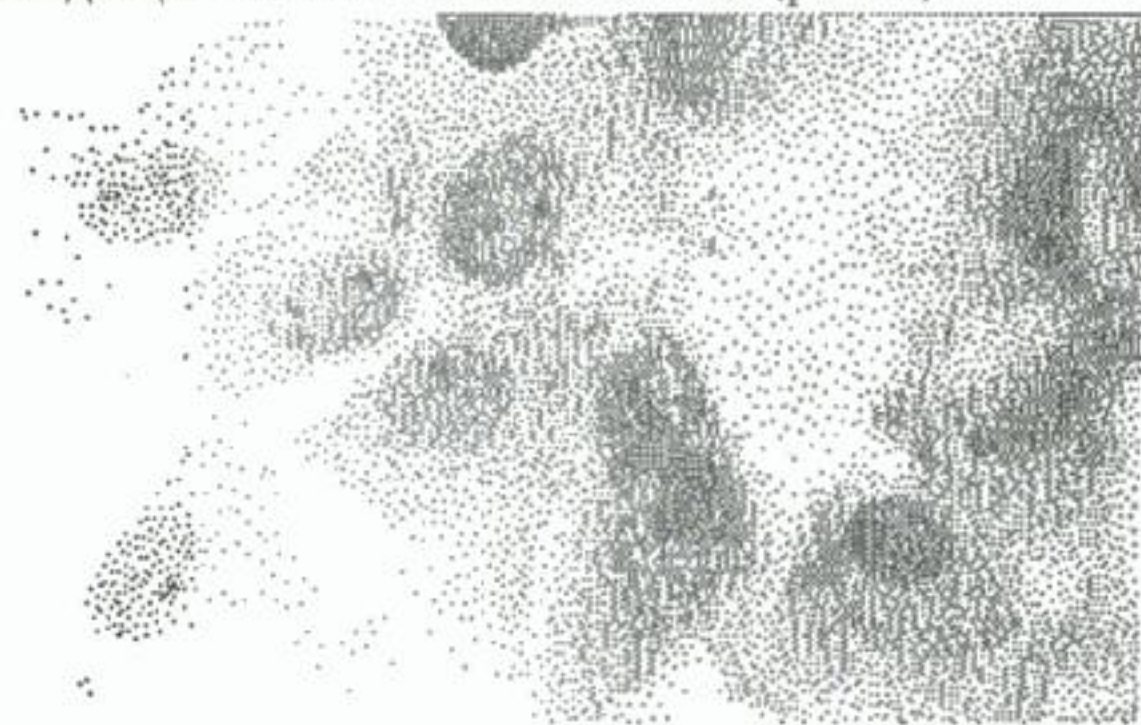


Рис. 1. Нативные гепатоциты, 3 сут культивирования. Митотическое деление печеночных клеток. Окраска гематоксилином и эозином $\times 900$

К 5-м сут культивирования клеточный монослой несколько видоизменяется. Его отдельные менее плотные участки приобретают вид потоков, состоящих из слегка вытянутых клеток, ориентированных вдоль оси потока. Значительная часть клеток еще сохраняет полигональную форму. Вместе с тем появляются клетки, синтезирующие альфафетопротейн (рис. 2).

После размораживания жизнеспособность гепатоцитов, криоконсервированных с ДМСО и ПЭО-1500, составляла $68 \pm 5\%$ и $57 \pm 4\%$ соответственно.

Размороженные гепатоциты, подобно нативным, оседали и прикреплялись к покрытому коллагеном пластику. Через 1 ч после посева на подложке, преимущественно в центре чашки Петри, выявлялись небольшие скопления клеток, имеющих правильную округлую форму и четко обозначенную мембрану. По сравнению с нативными клетками эффективность посева криоконсервированных гепатоцитов была снижена почти вдвое. 24-часовая культура размороженных гепатоцитов характеризуется наличием в основном распластаных полигональных клеток, объединенных в незначительные по площади монослойные участки. Морфологически эти клетки, имеющие тонкогранулярную структуру цитоплазмы, 1–2 ядра, хорошо заметные ядрышки и клеточную мембрану, весьма сходны с нативными. По всему полю чашки обнаруживаются также одиночно лежащие округлые базофильные клетки, по-видимому, неразвернувшиеся гепатоциты, что говорит о функциональной неоднородности деконсервированного материала: устойчивость клеточной мембраны к прижизненному красите-



Рис. 2. Нативные гепатоциты, 5 сут культивирования. Окраска на альфафетопротейн при помощи непрямого иммунопероксидазного метода, докрашено гематоксилином $\times 400$

культуры свежевыделенных гепатоцитов здесь не обнаружены митотически делящиеся клетки.

Анализ радиоавтографов клеточных культур показал, что нативные гепатоциты сохраняют способность к синтезу ДНК на протяжении 5 сут. При этом активность включения метки в ядро гепатоцитов минимальна в 1-е сут культивирования, ИМЯ составлял $(1,9 \pm 0,4) \%$. Дальнейшее культивирование характеризовалось воз-

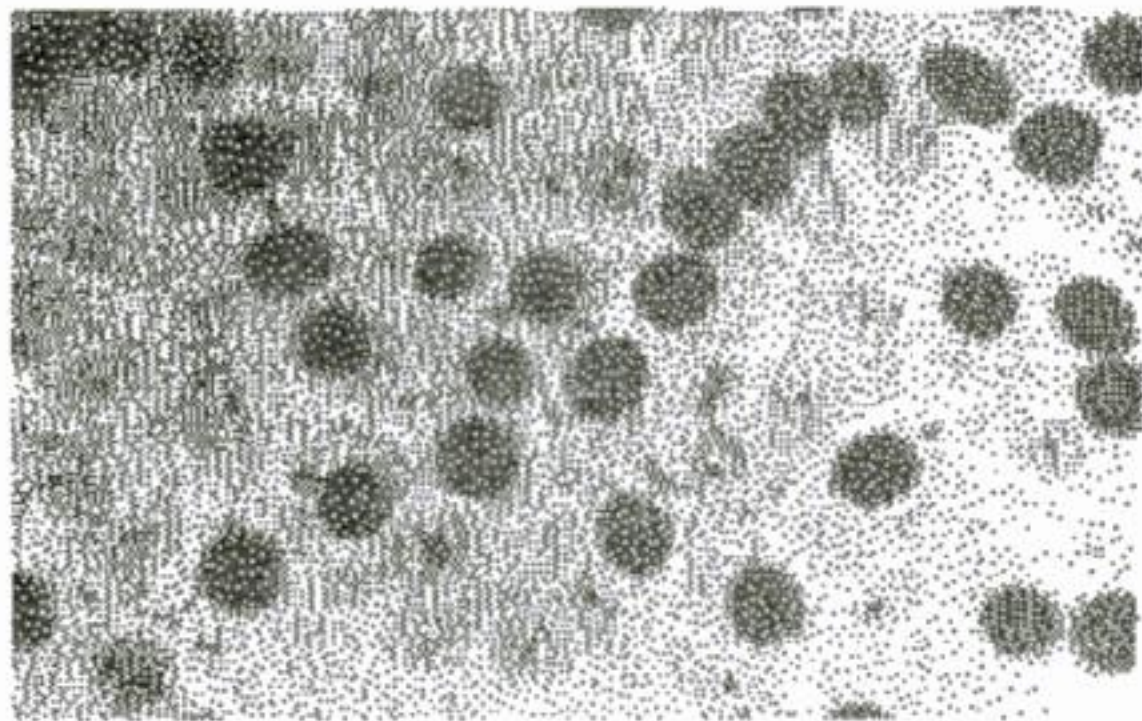


Рис. 3. Радиоавтограф 3-суточной культуры нативных гепатоцитов. Включение ^3H -тимидина в ядра печеночных клеток. Окраска гематоксилином и эозином $\times 400$

растанием числа клеток, вступающих в S-фазу клеточного цикла: на 2-е сут метка выявлялась в $4,5 \pm 0,8 \%$ клеток, а к 3-м сут – в $13,0 \pm 1,5 \%$ ядер (рис. 3, 4). На 5-е сут ^3H -тимидин включало около 10% ядер гепатоцитов. Аналогичная динамика включения ^3H -тимидина в ДНК характерна для гепатоцитов, криоконсервированных с ДМСО и ПЭО-1500.

Определение содержания мочевины в среде культивирования показало, что работа цикла мочевинообразования в нативных гепатоцитах наиболее эффективна в 1-е сут культивирования. Количество мочевины составляло около $10,5 \text{ мкмоль/сут } 10^6 \text{ клеток}$. По мере дальнейшего переживания культуры ко 2-м сут скорость синтеза мочевины снижается вдвое, оставаясь, однако достаточно высокой и постоянной до 3-их суток (около $5,5 \text{ мкмоль/сут } 10^6 \text{ клеток}$). Сопоставление полученных значений с активностью мочевинообразования в организме человека показало, что это величины одного порядка. К 5-м сут в среде культивирования нативных гепатоцитов обнаруживаются следовые количества мочевины.

Обе группы криоконсервированных гепатоцитов в 1-е сут культивирования сохраняли около 60% синтеза мочевины от уровня контроля (рис. 5). Ко 2-м и 3-м сут производство мочевины поддерживалось на уровне незначительно ниже, чем в контроле.

Представленные данные свидетельствуют о том, что после помещения в

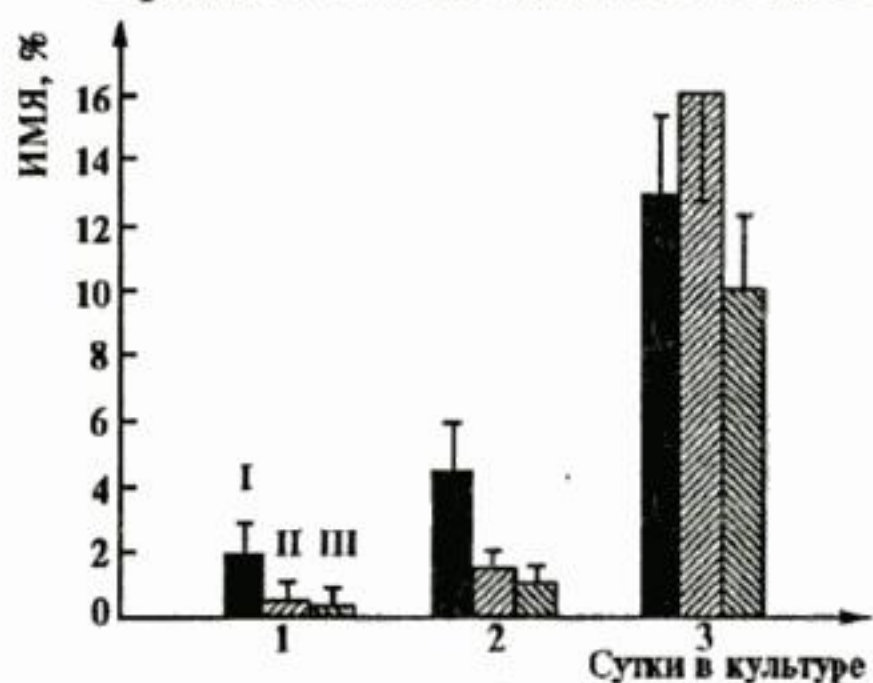


Рис. 4. Динамика пролиферации в культуре свежеизолированных (I) и криоконсервированных с 10% ДМСО (II) или 10% ПЭО-1500 (III) гепатоцитов

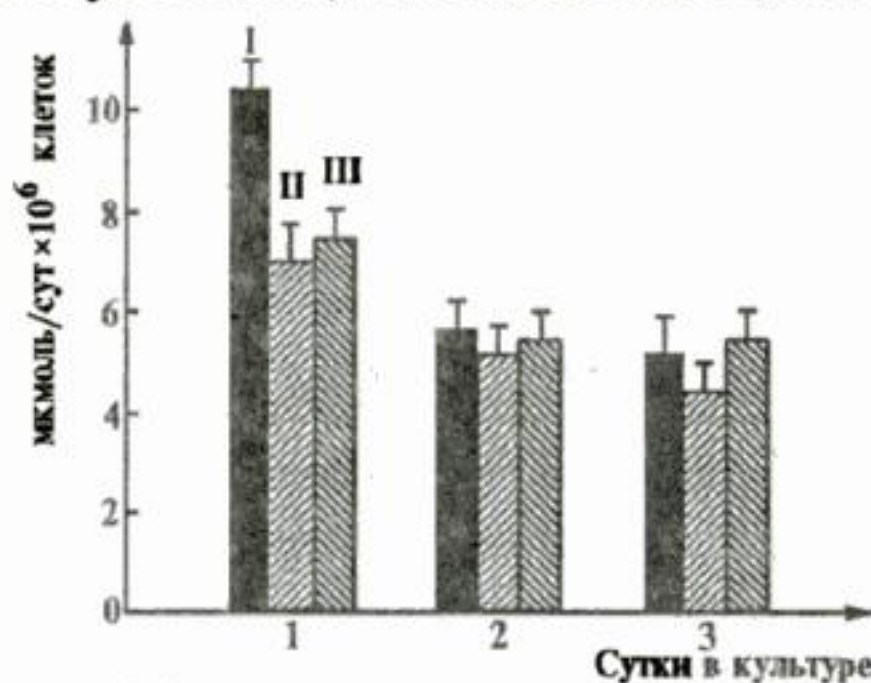


Рис. 5. Синтез мочевины в культуре свежеизолированных (I) и криоконсервированных с 10% ДМСО (II) или 10% ПЭО-1500 (III) гепатоцитов

культуру и свежевыделенные, и криоконсервированные гепатоциты переживают периоды адаптации к изменившимся условиям среды, временной стабилизации функций и, наконец, стадию инволюционных изменений, наблюдаемых в культуре нативных гепатоцитов. Этот процесс прослеживается на уров-

не всех исследуемых показателей. Так, наличие и усиление зеленой флуоресценции нативных гепатоцитов от 1-х к 3-м сут культивирования свидетельствует не только об интактности клеточной мембраны. ФДА в клетках подвергается гидролизу эстеразами с образованием свободного флуоресцеина, концентрация которого определяет интенсивность наблюдаемой флуоресценции, поэтому, при одинаковых условиях окрашивания ФДА, имеется возможность судить о гидролазной активности в клетках по интенсивности их зеленого свечения. Активность внутриклеточного ферментативного гидролиза в нативных гепатоцитах усиливается в течение первых 3-х сут культивирования.

Модификация монослоя гепатоцитов к 5-м сут является признаком необратимых изменений в культуре, что подтверждается и появлением альфафетопротейнсинтезирующих клеток. В норме синтез альфафетопротейна в клетках печени свиней прекращается на этапе внутриутробного развития. Наличие в культуре альфафетопротейнсинтезирующих клеток свидетельствует об эволюции культуры в сторону эмбрионализации. Такое развитие гепатоцитов неонатальных поросят в условиях традиционной культуры является закономерным и совпадает с результатами, полученными при культивировании гепатоцитов других видов животных [4, 8].

Наиболее интенсивно свежевыделенные гепатоциты пролиферируют в 3-суточной культуре, сохраняя высокие значения включения ^3H -тимидина до 5-х сут. После низкотемпературного консервирования с ДМСО и ПЭО-1500 в культивированных гепатоцитах в 1-е–2-е сут наблюдается временное снижение относительно контроля синтеза ДНК. Однако к 3-м сут культивирования индекс меченых ядер деконсервированных гепатоцитов резко повышается, оказываясь на уровне свежевыделенных гепатоцитов. Примечательно, что гепатоциты новорожденных поросят, и нативные и деконсервированные, в отличие от гепатоцитов взрослых животных, обнаруживают высокие резервы пролиферации, вплоть до митозов в культуре свежевыделенных клеток, в среде без ростостимулирующих добавок и гормонов. Присутствующая в среде ЭТС способна оказывать некоторое стимулирующее действие [3], недостаточное однако для активизации пролиферативных процессов в гепатоцитах взрослых животных. Пролиферирующая культура гепатоцитов новорожденных поросят может явиться удобной моделью для испытания гепатотропных факторов как стимулирующего, так и ингибирующего действия.

Процесс мочевинообразования, специфический для гепатоцитов, является одним из проявлений обезвреживающей функции печени. Резкое снижение синтеза мочевины нативными гепатоцитами ко 2-м сут культивирования, видимо, определяется метаболическими перестройками в адаптирующихся клетках. Известно, что свежевыделенные гепатоциты в течение первых нескольких часов после выделения находятся в состоянии отрицательного азотистого баланса [3]. Оно вызвано сдвигом равновесия между скоростями утилизации и образования аминокислот в сторону катаболического направления белкового обмена. Усиление распада белка ведет к повышению объема свободных аминокислот в цитозоле клетки и, соответственно, субстратов для образования мочевины, чем, возможно, объясняется высокая активность синтеза мочевины в 1-е сут культивирования гепатоцитов. Поскольку образование мочевины является энергоемким процессом, можно допустить, что снижение этой функции на 2-е сут культивирования вызвано нехваткой в клетках АТФ. Однако скорость синтеза мочевины поддерживается на постоянном и высоком физиологическом уровне в течение 2-х–3-х сут, что говорит о достаточном энергетическом потенциале системы. Так как реакции процесса мочевинообразования протекают в различных компартментах клетки, в митохондриях и в цитоплазме, то по уровню его восстановления после криоконсервирования можно косвенно судить о сохранности системы энергообеспечения, мембранно-транспортных процессов в митохондриях, активности ферментативной си-

стемы цикла мочевинообразования. Деконсервированные гепатоциты в течение первых суток культивирования синтезировали мочевины на 40% менее активно, чем свежесыводенные. Существенно, что на 2-е и 3-и сут культивирования и нативные и деконсервированные гепатоциты поддерживают образование мочевины на приблизительно одинаковом и постоянном уровне.

Таким образом, индуцированное процессом криоконсервирования снижение функций в гепатоцитах обратимо. Подобное влияние криоконсервирования обнаруживается и для других биологических объектов [1]. Требуется некоторый латентный период, в наших экспериментах 1–2 сут, для восстановления наблюдаемых функций до контрольного уровня. Не исключено, что процессы, обуславливающие длительность этого периода, поддаются регулируемому влиянию со стороны внешних факторов [9].

Характерно, что по функциональным показателям гепатоциты, замороженные с ДМСО и ПЭО-1500 и сохранившие способность к переживанию в культуре, идентичны. Преимущества ДМСО выявляются на уровне устойчивости к окрашиванию трипановым синим, а также сохранности адгезивных свойств, которые выражаются в способности клеток к прикреплению и распластыванию на субстрате [2].

Изложенное позволяет говорить о возможности криоконсервирования гепатоцитов неонатальных поросят, сохраняющего способность значительной части клеток к последующему культивированию с проявлением ряда элементарных и специфических функций

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы криобиологии / Под ред. Н.С.Пушкаря, А.М.Белоуса. – Киев: Наук. думка, 1981. – 607 с.
2. Белочкина И.В., Волкова Н.А. Адгезивные способности гепатоцитов новорожденных поросят после низкотемпературного консервирования // Проблемы криобиологии. – 1994. – № 2. – С. 52–54.
3. Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства / Под ред. Л.Д.Лукьяновой. – М.: Наука, 1985. – 272 с.
4. Глейberman А.С., Гальперина Е.Э., Староверцева Д.Б. Торможение синтеза альфафетопротейна в гепатоцитах взрослых мышей *in vivo* и *in vitro* сульфатом декстрана // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1987. – 93, № 4 – С. 470–473.
5. Маргулис М.С., Ерухимов Е.А., Андрейман Л.А. Лечение печеночной недостаточности с помощью гемоперфузии через взвесь живых изолированных гепатоцитов // Анестезия и реаниматол. – 1986. – № 3. – С. 29–31.
6. Dankberg F., Persidsky M.D. A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function // Cryobiology. – 1976. – 13, № 4. – P. 430–432.
7. Demetriou A.A., Reisner A., Sanchez J. et al. Transplantation of microcarrier-attached hepatocytes into 90% partially hepatectomized rats // Hepatology. – 1988. – 8, № 5. – P. 1006–1009.
8. Isolated and cultured hepatocytes / A.Guillouzo and C. Guguen-Guillouzo Eds. – Le editions INSERM, Paris, John Libbey, London eurotext, 1986. – 408 p.
9. Moshage H.J., Rijntjes P.J., Hafkenscheid J.C.M. et al. Primary culture of cryopreserved adult human hepatocytes on homologous extracellular matrix and the influence of monocytic products on albumin synthesis // J. of Hepatology. – 1988. – № 7. – P. 34–44.
10. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells / In: «Methods in cell Biology» (D.M.Prescott, Ed.). – New York: Acad. Press, 1976. – 13. – P. 29–33.

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

Поступила 03.01.94

І.В.БЕЛОЧКІНА, Н.О.ВОЛКОВА

КУЛЬТИВУВАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ ГЕПАТОЦИТІВ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ ПІСЛЯ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВУВАННЯ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м. Харків

При культивуванні кріоконсервованих клітин печінки вивчали морфологічні особливості формування моношарної культури гепатоцитів, проліферативні процеси та динаміку синтезу сечовини. Кріоконсервування гепатоцитів у присутності 10% ДМСО і 10% ПЕО-1500 зі швидкістю

охлаждения 1 °C/хв веде до зниження функціональних показників, що вивчались, в першу добу культивування щодо свіжоізолюваних клітин печінки з подальшим відновленням процесів до рівня контролю.

I.V.BELOCHKINA, N.A.VOLKOVA

CULTURING OF ISOLATED HEPATOCYTES OF NEW-BORN PIGS AFTER LOW TEMPERATURE PRESERVATION

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

Morphological peculiarities of the formation of the monolayer culture of hepatocytes, proliferative processes and dynamics of the urea synthesis were studied *in vitro* using cryopreserved liver cells. Cryopreservation of hepatocytes in the presence of 10%-DMSO and 10%-PEO-1500 with the rate of 1C/min reduces the values of the studied indices in the first day of culturing as compared with the freshly isolated liver cells with subsequent restoration of the functions up to the control level.

УДК 57.043:595.773.4

Л.Г.Севрюкова, А.А.Цуцаева

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО ХРАНЕНИЯ НА СВОЙСТВА *DROSOPHILA MELANOGASTER* РАЗНЫХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ

В работе рассматривается влияние гипотермического хранения на выживаемость *Drosophila melanogaster* на разных стадиях онтогенетического развития (эмбрионы, личинки, куколки, имаго). Показано, что наиболее криолабильными являются эмбрионы ранних стадий развития, что представляет существенный интерес, т.к. в многочисленных работах показано, что биологические объекты с низким уровнем метаболизма более устойчивы к воздействию нефизиологических температур.

Drosophila melanogaster является традиционным объектом исследования в области генетики, молекулярной биологии [1, 2], а также фармакологии, радиобиологии, экологии [3–5].

Для унификации обеспечения работы со стандартным жизнеспособным материалом возникает необходимость в создании надежных способов хранения *D. melanogaster* на разных этапах их онтогенетического развития. Долгосрочное хранение биологических объектов возможно только при максимальном понижении уровня клеточных процессов, которое достигается при понижении температуры окружающей среды либо при обезвоживании.

Наиболее предпочтительны низкие температуры, особенно азотные. Однако полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что криоконсервированию при отрицательных температурах подвергались только *D. melanogaster* на стадии яйца, и количество жизнеспособных эмбрионов после возврата к нормотермии варьировалось от 10 до 15%.

Целью данного исследования было изучение характера влияния условий и продолжительности гипотермического хранения на свойства *D. melanogaster*, находящихся на разных стадиях развития. В работе использовалась *D. melanogaster* линии Ва.

Для получения эмбрионов известного возраста виргинные самки ссаживались на час с самцами, после чего самки помещались по 10 штук в чашки Петри на 1,2% агар-агар с каплей питательной смеси (5% глюкоза + дрожжевой экстракт). Спустя 1 ч самки удалялись, а яйца развивались до необходимого возраста при комнатной температуре (25 °C).

Личинок получали, отмывая их от каши дистиллированной водой и высушивая фильтровальной бумагой. Для опыта личинок помещали в пенициллиновые флаконы по 50 штук во флакон. После экспозиции их переносили в пробирки со средой для дальнейшего развития. Для получения куколок, готовых

к окукливанию, личинки вносили по 50 штук в пенициллиновые флаконы и оставляли их до достижения необходимого возраста при комнатной температуре. Имаго известного возраста для опыта отсаживали по 50 штук в пенициллиновые флаконы. Влияние субнулевых температур изучали, помещая флаконы или чашки Петри в холодильник (4 °С – на полку, 0 °С – на лед на полку) с постоянным температурным контролем ртутным термометром.

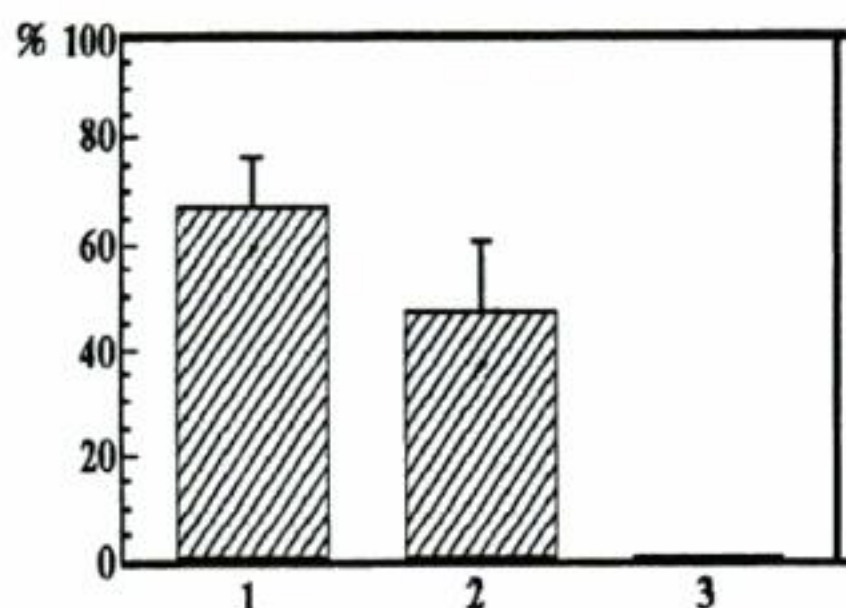


Рис 1. Влияние условий и продолжительности гипотермического хранения на количество жизнеспособных эмбрионов *Drosophila melanogaster*. Достоверность – $p < 0,005$. Возраст эмбрионов – 3 ч. Условия гипотермии – 0 °С; продолжительность гипотермии: 1 – 4 ч; 2 – 5 ч; 3 – 6 ч

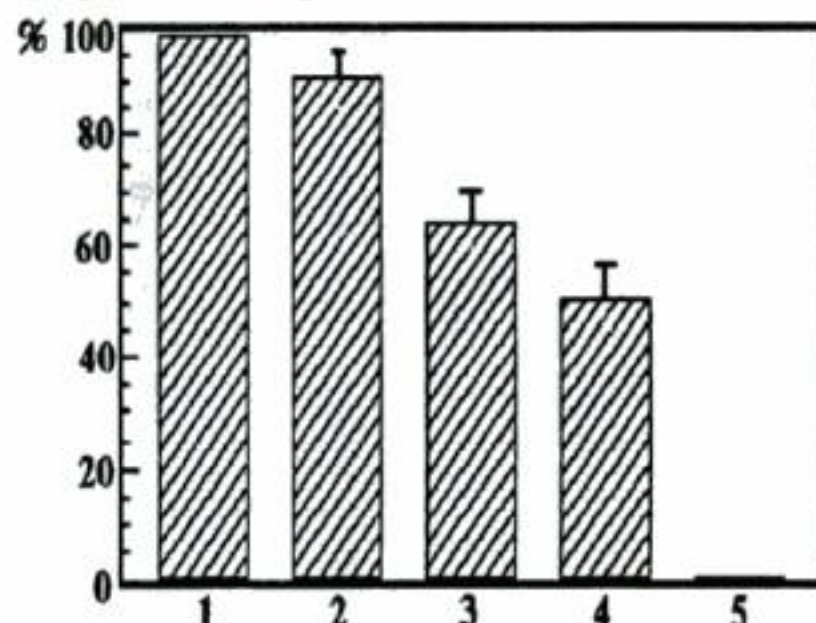


Рис 2. Влияние условий и продолжительности гипотермического хранения на количество жизнеспособных эмбрионов *Drosophila melanogaster*. Достоверность – $p < 0,005$. Возраст эмбрионов – 12–13 ч. Условия гипотермии – 0 °С. Продолжительность гипотермии: 1–3 ч; 2–6 ч; 3–20 ч; 4–24 ч; 5–48 ч

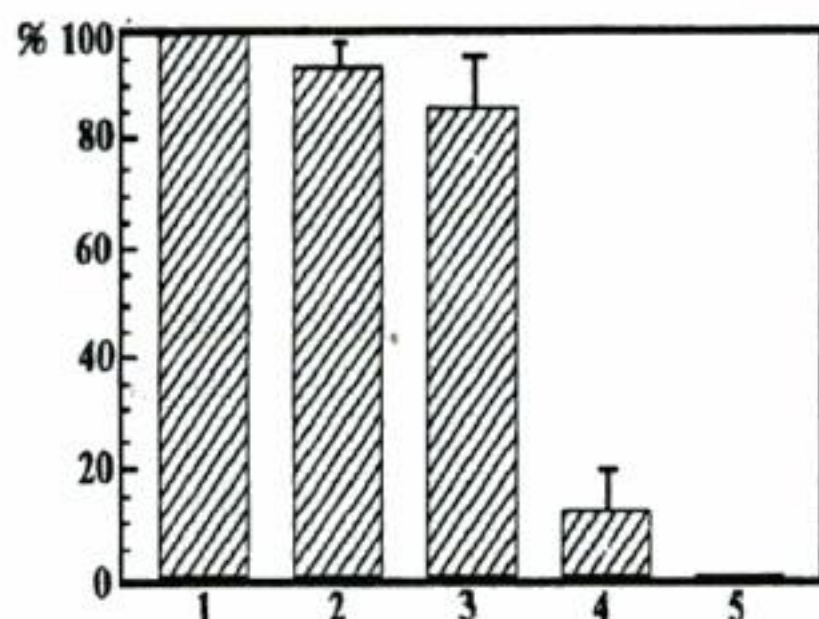


Рис 3. Влияние условий и продолжительности гипотермического хранения на количество жизнеспособных личинок *Drosophila melanogaster*. Достоверность – $p < 0,005$. Возраст личинок – 1 сут. Условия гипотермии – 0 °С. Продолжительность гипотермии: 1–3 ч; 2–6 ч; 3–14 ч; 4–20 ч; 5–24 ч

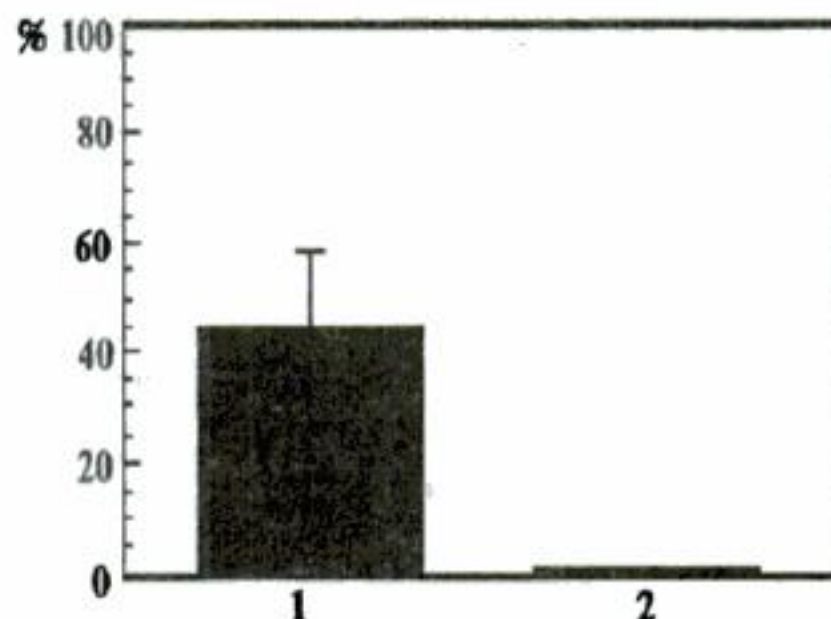


Рис 4. Влияние условий и продолжительности гипотермического хранения на количество жизнеспособных личинок *Drosophila melanogaster*. Достоверность – $p < 0,005$. Возраст личинок – 5 сут. Условия гипотермии – 0 °С. Продолжительность гипотермии: 1–18 ч; 2–19 ч

Отогрев объектов производился при температуре 25 °С. Выживаемость эмбрионов определяли по вылупляемости, подсчитывая количество вылупившихся из яиц личинок и количество невылупившихся яиц. Выживаемость личинок определялась визуально через 10 ч, учитывая, что погибшие личинки чернеют через 8 ч вследствие активации фенолоксидазы. Выживаемость куколок определялась по выходу из них имаго. Выживаемость имаго определялась методом подсчета подвижных мух (проводилось определение репродуктивной способности выживших мух).

Эмбрионов *D. melanogaster* разного возраста подвергали воздействию субнулевых температур в течение различных промежутков времени. Эмбрионы находились по 50 штук на агар-агаровых пластинках в закрытых чашках Петри. Контролем служили эмбрионы, которые выдерживали при функциональных условиях при температуре 25 °С. Чашки Петри помещались на лед на полку холодильника (0 °С). Сохранность яиц определялась по количеству яиц, из которых вылупились личинки.

Наиболее чувствительными к холоду оказались эмбрионы ранних стадий развития. Так, эмбрионы 2–3 часового возраста после инкубации 6 ч при 0 °С погибали полностью (рис. 1). По мере увеличения возраста эмбрионов до 12–13 ч устойчивость их к гипотермическому хранению возрастает. 50%-я гибель эмбрионов этого возраста наблюдается только спустя 24 ч их хранения в условиях гипотермии и 100%-я гибель спустя 48 ч (рис. 2).

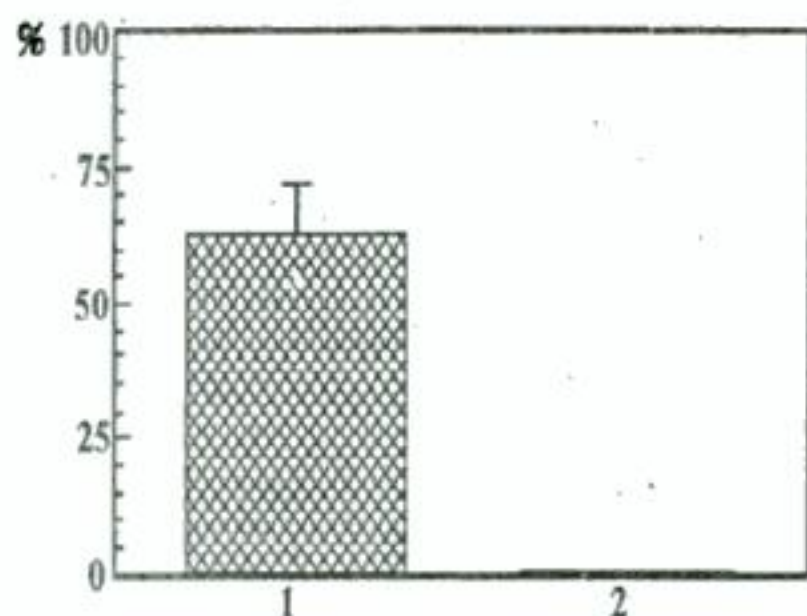


Рис. 5. Влияние условий и продолжительности гипотермического хранения на количество жизнеспособных куколок *Drosophila melanogaster*. Достоверность – $p < 0,005$. Возраст куколок – 3 ч. Условия гипотермии – 0 °С. Продолжительность гипотермии: 1–18 ч; 2–19 ч

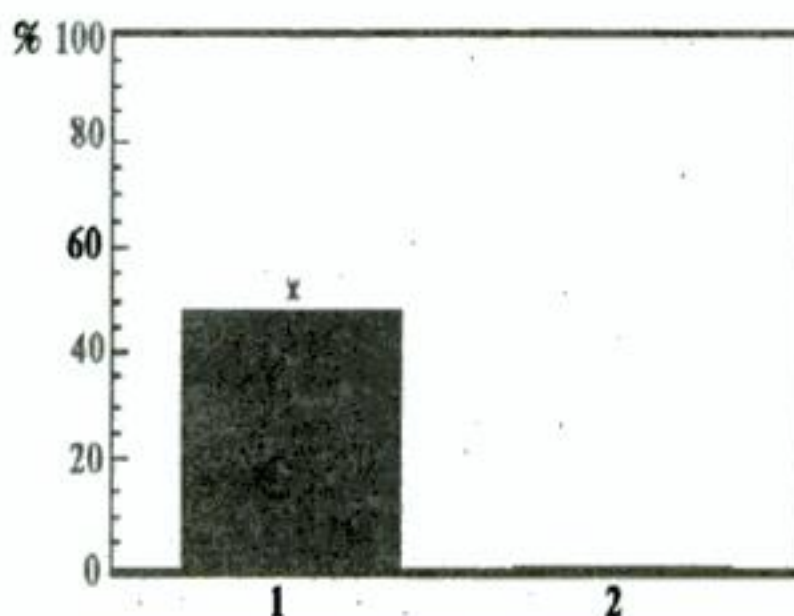


Рис. 6. Влияние условий и продолжительности гипотермического хранения на количество жизнеспособных имаго *Drosophila melanogaster*. Достоверность – $p < 0,005$. Возраст личинок – 5 сут. Условия гипотермии – 0 °С. Продолжительность гипотермии: 1–12 ч; 2–24 ч

У личинок снижалась устойчивость к гипотермическим воздействиям по сравнению с эмбрионами поздних стадий развития. 15–20% личинок 5-дневного возраста погибало спустя 14 ч экспозиции при 0 °С, а через 20 ч сохранялось жизнеспособных только 12%. Лабильность к холодовому воздействию личинок пятидневного возраста по сравнению с личинками однодневного возраста возрастала, личинки пятидневного возраста погибали спустя 18 ч хранения в условиях гипотермии, а личинки однодневного возраста – после 24 ч (рис. 3, 4).

Холодоустойчивость куколок трехчасового возраста незначительно отличалась от холодоустойчивости личинок пятидневного возраста (рис. 5). Аналогичная криоустойчивость обнаруживалась и у пятидневных имаго (рис. 6). Определение репродуктивной способности выживших мух не показало достоверных отличий от контроля.

Полученные результаты свидетельствуют об изменении устойчивости к холодовым воздействиям *D. melanogaster* в зависимости от стадии онтогенеза.

Наиболее лабильной оказалась стадия ранних эмбрионов, что представляет существенный интерес, т.к. в многочисленных работах показано, что биологические объекты с низким уровнем метаболизма более устойчивы к воздействию нефизиологических температур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биохимическая генетика дрозофилы // Под ред. Л.И.Корочкина и М.Д.Голубовского. – Новосибирск: Наука, 1981. – 246 с.
2. Дрозофила в экспериментальной генетике // Под ред. В.В. Хвостова, М.Д.Голубовского, Л.И.Корочкина. – Новосибирск: Наука, 1978. – 286 с.
3. Burton V., Mitchell H.K., Young D., Petersen N. Cold shock Protection against Cold Stress of *Drosophila melanogaster* // Molecular and Cellular Biology. – 1988. – 8, N 8. – P. 3550–3552.
4. Mazur P., Schneider U., Jacobson, Tachowald A.P. Cold Damage in *Drosophila melanogaster* Intact Eggs Different Developmental Stages between 0 to –25 °C without Ice Formation // Cryobiology. – 1988. – 25, N 6. – P. 544.
5. Mazur P. Kinetics of the killing of unfrozen intact *Drosophila* embryos at Low Temperature // Cryobiology. – 1990. – 27, N 6. – P. 650–651.

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

Поступила 15.06.93

Л.Г.СЕВРЮКОВА, А.А.ЦУЦАЄВА

ВПЛИВ УМОВ І ТРИВАЛОСТІ ГІПОТЕРМІЧНОГО ЗБЕРІГАННЯ НА ЯКОСТІ *DROSOPHILA MELANOGASTER* РІЗНИХ СТАДІЙ РОЗВИТКУ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м. Харків

У роботі розглядається вплив гіпотермічного зберігання на виживаність *Drosophila melanogaster* на різних стадіях онтогенетичного розвитку (ембріони, личинки, імаго). Показано, що найбільш кріолабільними є ембріони ранніх стадій розвитку, що являє істотний інтерес, бо у багатьох роботах показано, що біологічні об'єкти з низьким рівнем метаболізму більш стійкі до впливу нефізіологічних температур.

L.G.SEVRYUKOVA, A.A.TSUTSAYEVA

EFFECT OF CONDITIONS AND DURATION OF HYPOTHERMIC STORAGE ON THE PROPERTIES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* AT VARIOUS STAGES OF DEVELOPMENT

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

The effect of hypothermic storage on the survival of *Drosophila melanogaster* at various stages of the ontogenic development (embryo, larva, chrysalis, imago) has been investigated. Embryos of the early stages of development have been shown to be the most cryolabile, which is of certain interest, since many researchers have reported on the biological systems with low level of metabolism to be more resistant to the effect of the non-physiological temperatures.

УДК 615.387:581.19

В. А. Антонюк

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ, ХРАНИВШИХСЯ ПРИ УМЕРЕННО НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ, ДЛЯ ПОИСКА ЛЕКТИНОВ И ОЦЕНКИ ИХ АКТИВНОСТИ

Испытан метод хранения эритроцитов в присутствии криоконсерванта в морозильной камере бытового холодильника (-12°C) на протяжении 9 мес. Отмытые от криоконсерванта эритроциты могут быть использованы при поиске новых сырьевых источников лектинов и оценке их активности.

При поиске новых сырьевых источников лектинов в растительном сырье, а также при оценке их активности чаще всего используют реакцию агглютинации с эритроцитами [1, 8]. Для повышения чувствительности реакции эритроциты обрабатывают протеолитическими ферментами (нейраминидазой, трипсином, папаином), проводят реакцию в среде сывороточного альбумина, поливинилпирролидона и др.

Интерес к лектинам сильно возрос после открытия того факта, что некоторые из них агглютинируют эритроциты лишь определенных видов животных или групп крови человека [11]. Такие лектины, как было показано [10], могут найти применение для определения антигенов крови человека и в ряде судебно-медицинских исследований. Кроме того, лектины подобного типа обладают высокой селективностью к углеводам и находят применение как гистохимические маркеры [7]. В частности, НПК «Лектинотест» для гистохимических целей выпускает лектины, меченные флюорохромами (ФИТЦ, РИТЦ), коллоидным золотом и пероксидазой из корней хрена.

При поиске новых сырьевых источников лектинов или при оценке их перспективности для серологических исследований и нужд судебной медицины необходимо использование широкого набора эритроцитов от различных животных и человека. Использование такой коллекции часто тормозится чи-

сто техническими причинами: отмытые эритроциты в фосфорно-солевом буферном растворе (ЗФР) при 4 °С в нестерильных условиях хранятся максимум 7–10 дней, после чего нужно производить забор крови и использовать свежие эритроциты. Это создает определенные неудобства для исследователей. Если эритроциты обработать формалином или глутаровым альдегидом, то они могут храниться в холодильнике до месяца, но при этом сильно уменьшается их чувствительность. В то же время разработаны и испытаны методы долгосрочного хранения эритроцитов при низких температурах. Лучшим для длительного хранения считается метод криоконсервирования в жидком азоте при –196 °С, так как при его применении полностью сохраняется функциональная полноценность эритроцитов [3]. Однако для такого хранения необходимо иметь сложное криогенное оборудование с постоянным обеспечением его жидким азотом, что достаточно сложно и недоступно для многих лабораторий. В связи с этим все более широкое распространение приобретает криоконсервирование при умеренно низких температурах [4, 5]. Нами в работе использовалась методика, разработанная в Львовском НИИ гематологии и переливания крови по криоконсервированию эритроцитов при –40 °С с использованием глицерина в качестве криопротектора [5]. Эту методику мы решили адаптировать для хранения эритроцитов в бытовом холодильнике типа «Апшерон» или «Чинар» при температуре –12 °С (морозильная камера холодильника).

Эритроциты человека групп 0, А и В брали на Львовской областной станции переливания крови, кровь животных – в виварии Львовского мединститута и на Львовском мясокомбинате. Для предупреждения свертывания перед взятием крови в ЗФР добавляли гепарин. Затем эритроцитную массу три раза отмывали ЗФР. Криоконсервант готовили по прописи методических рекомендаций [5]: этилендиаминтетераацетата натрия – 3 г., глюкозы – 90 г., глицерина – 791 г., воды дистиллированной до 1000 мл.

К отмытым эритроцитам добавляли криоконсервант в количестве от 1/2 до 1 объема от объема эритроцитарной массы. Для избежания осмотического повреждения клеток прибавление криоконсерванта проводили медленно с перемешиванием раствора. Затем эту смесь помещали в морозильную камеру холодильника, где поддерживалась температура –12 °С.

После длительного хранения в холодильнике перед использованием эритроциты необходимо отмыть от криоконсерванта. Это наиболее ответственный этап, при котором начинающих исследователей чаще всего преследуют неудачи. Для отмывки эритроцитов готовили 30, 10 и 5 %-е растворы глюкозы. К 2 мл эритроцитарной взвеси в криоконсерванте при перемешивании добавляли 0,8 мл 30 %-го раствора глюкозы. Через 5 мин к смеси добавляли 8 мл 10 %-го раствора глюкозы и осторожно перемешивали. Затем через 5 мин эритроциты центрифугировали при 1000 g 5 мин, надосадочную жидкость сливали, а к эритроцитарной массе добавляли 4 объема 10 %-го раствора глюкозы. После перемешивания через 5 мин надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли два объема 5 %-го раствора глюкозы и через 5 мин центрифугировали при 1000 g. После удаления надосадочной жидкости снова добавляли 5 %-й раствор глюкозы. Через 5 мин эритроциты центрифугировали и осадок ресуспендировали в 0,9 %-м растворе хлорида натрия или ЗФР, после чего готовили 2 %-ю суспензию эритроцитов и использовали для постановки реакции гемагглютинации.

Реакцию гемагглютинации проводили в пробирочном варианте с оценкой полученных результатов невооруженным глазом при встряхивании пробирок [7]. В работе использовались лектины, которые серийно выпускаются научно-производственным кооперативом «Лектинотест», а также те новые лектины, которые были обнаружены с привлечением описанной методики и планируемые к серийному выпуску. Степень сохранности эритроцитов после 9-месячного хранения при указанных условиях оценивали по следующим критериям:

потерей клеток после размораживания (выраженном в % к исходному) и по уровню свободного гемоглобина в ЗФР после 5-дневного хранения размороженных эритроцитов при 4 °С [6].

Т а б л и ц а 1

Показатели, характеризующие степень сохранности эритроцитов (после 9-месячного хранения с криоконсервантом при -12 °С)

Тип эритроцитов	Потеря клеток после размораживания, %	Свободный гемоглобин в мг, после 5-дневного хранения при 4 °С	
		Размороженные	Контрольные
Человек, нативные	8±1,7	20,4±1,1	17,4±0,6
Человек, трипсинизованные	12±3,2	31,5±1,2	18,5±0,6
Кролик	7±1,8	18,7±1,3	16,4±1,5
Крыса	8±1,6	21,5±1,3	18,2±1,4
Мышь	8±2,1	17,7±1,5	16,8±1,4
Баран	9±1,4	14,9±0,8	11,6±0,9
Лягушка	23±5,5	46,5±2,7	34,1±1,8
Бык	7±1,7	18,3±1,5	14,2±1,6

Результаты исследований сохранности эритроцитов представлены в табл. 1. Они свидетельствуют, что криоконсервирование хуже всего переносят эритроциты лягушки, а эритроциты человека и других млекопитающих обладают примерно одинаковой сохранностью. Эритроциты человека, обработанные трипсином, также более чувствительны к крио-

консервированию, что, возможно, связано с некоторым повреждением мембран эритроцитов при трипсинизации.

При смешивании отмывой эритроцитарной массы с равным количеством криоконсерванта образующаяся смесь находится чуть ниже точки замерзания и при повышении температуры в морозильной камере холодильника до -10 °С она размораживается. Это мало отображается на сохранности эритроцитов, но многократное замораживание-оттаивание увеличивает количество поврежденных клеток.

Одним из важных свойств лектинов является их способность агглютинировать эритроциты. Агглютинация последних объясняется наличием на поверхности эритроцитарных мембран специфических углеводов, с которыми взаимодействуют лектины. Агглютинация имеет место лишь при выполнении двух условий: наличии у лектина не менее двух активных центров связывания углеводов и наличии этих углеводов на поверхности эритроцитов. Если углеводный рецептор лектина на поверхности эритроцита отсутствует, агглютинации не наблюдается. В связи с этим эритроциты различных видов животных и групп крови человека агглютинируются в разной степени. Существуют видо- и группоспецифические лектины, поиск которых имеет важное практическое значение.

Наибольшее разведение лектина, вызывающее агглютинацию, обозначается как титр гемагглютинации. Чем выше титр гемагглютинации, тем больше сродство лектина к углеводам эритроцитарных мембран или выше плотность углеводных рецепторов на поверхности соответствующих эритроцитов. В пределах популяции эритроцитов одного вида животных или группы крови человека эта величина в большинстве случаев достаточно стабильна и может служить важной характеристикой лектина. Для того, чтобы титры гемагглютинации можно было сравнить, их соотносят к одной и той же концентрации, как правило, 10 мг/мл (1 %) лектина, растворенного в ЗФР. Значение титров гемагглютинации 1 %-х растворов лектинов можно использовать для оценки активности и количественной оценки содержания лектина в растворе. При этом необходимо помнить, что это выполнимо при условии использования эритроцитов от одного и того же вида или группы крови человека (желательно даже от одного и того же донора). Кроме того, результаты определения концентраций лектинов с помощью титра гемагглютинации имеют ошибку определения до 50%. Это понятно, так как на практике при проведении ана-

лизом используются разведения в геометрической прогрессии, например – 1:2, 1:4, 1:8 и т.д., кроме того, результат реакции оценивают невооруженным глазом, т.е. субъективно. В связи с этим в табл. 2 не приведены статистические данные, так как ошибка определений во всех случаях составляет 50%, а если два параллельных определения с одними и теми же эритроцитами дают несовпадение на одно разведение, то это скорее всего может расцениваться как промах. Однако при очистке лектинов и определении количества лектинов в смеси таким анализом часто пользуются, так как он очень простой в исполнении, а по чувствительности он не уступает радиоизотопному методу. Действительно, например, титр гемагглютинации 2^{-25} с эритроцитами лошади лектина семян гороха соответствует концентрации последнего 3 нм/мл $\pm$ 1,5 нг/мл. Такие концентрации очень трудно измерить другими методами, а есть лектины, обладающие и более высокой чувствительностью к эритроцитам (см. табл. 2).

В табл. 2 приведены титры гемагглютинации лектинов с криоконсервированными эритроцитами, которые хранились 9 мес при -12°C . При использовании свежих эритроцитов были получены те же результаты, поэтому мы решили, что нет необходимости приводить их отдельно. Приведенные в табл. результаты определений важны и в практическом плане, так как они помогают сориентироваться, какие эритроциты можно использовать для тестирования того или иного лектина. И хотя некоторые из этих данных (для достаточно продолжительное время выпускаемых коммерческих лектинов) можно найти в литературе, эти данные трудно систематизировать, так как авторы использовали различные варианты постановки гемагглютинации. Кроме того, в таблице приведены сведения для лектинов, которые ранее не были описаны в литературе или изучены недостаточно (лектины подснежника белоснежного (п. 5 табл.), белоцветника весеннего (п. 6), купены многоцветковой (п. 7), алеврии оранжевой (п. 21), бобовника анагирилистного (п. 22)).

Способность лектинов агглютинировать эритроциты связана с наличием на поверхности эритроцитов определенных углеводных рецепторов. Как следует из таблицы, лектины, специфичные к D-маннозе, следует искать используя эритроциты кролика, а вероятность нахождения L-фукозоспецифичных лектинов значительно выше при использовании эритроцитов человека. Уже давно известно, что лектины, специфичные к α -N-ацетил-D-галактозамину и одновременно не взаимодействующие с D-галактозой проявляют высокую избирательность к эритроцитарным антигенам A-группы крови человека, а лектины, обладающие высоким сродством к α -D-галактозе и не взаимодействующие с α -N-ацетил-D-галактозамином, могут использоваться для выявления эритроцитарного B-антигена человека.

В ряде случаев интересные сведения можно получить, изучая спектр взаимодействий лектина с эритроцитами разных животных и человека. Так, взаимодействие лектина купены многоцветковой (п. 7 таблицы) с эритроцитами мыши, крысы и кролика и отсутствие агглютинации эритроцитов человека, быка и слабая агглютинация эритроцитов лошади и барана позволяет предположить, что данный лектин наибольшим сродством обладает к 9-0-ацетилнейраминовой кислоте и, возможно, слабо взаимодействует также с 4-0-ацетилнейраминовой кислотой [12].

В некоторых случаях взаимодействие лектинов с эритроцитами носит более сложный характер. Так, лектин коры бобовника анагирилистного имеет значительные колебания в титре гемагглютинации в пределах популяции одной группы крови, что возможно, связано с тем, что он одновременно взаимодействует с двумя эритроцитарными антигенами, которые выражены в различной степени на эритроцитах в пределах одной группы крови (подробнее в работе [2]).

Все вышесказанное подтверждает, что, как правило, лектины обладающие высокой видовой или групповой специфичностью обладают и высокой селективностью к углеводам. Такие лектины являются ценными инструментами для гистохимических исследований [7]. Использование коллекции эритроцитов, взятых от разных животных, позволяет такие лектины обнаружить, а метод низкотемпературного их хранения может помочь исследователю создать набор эритроцитов для исследований.

Т а б л и ц а 2

Взаимодействие лектинов, выпускаемых НПК "Лектинотест", с эритроцитами человека и животных

Сырьевой источник или коммерческое название лектина	Углеводная специфич- ность лектина	Титры гемагглютинации с эритроцитами видов:									
		Человек гр. крови			Кро- лик	К р ы са	М ы ш ь	Ба- р ан	Ля- гу шка	Ло- ша дь	Б ы к
		I (0)	II (A)	III (B)							
1. <i>Pisum sativum</i> L.	α -DManp> α -DGlc	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹⁷	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹¹	-	-	2 ⁻²⁵	-
2. <i>Lens culinaris</i> L.	α -DManp> α -DGlc	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹⁰	2 ⁻²⁰	2 ⁻⁸	2 ⁻¹⁰	-	-	2 ⁻¹⁴	-
3. <i>Vicia faba</i> L.	α -DManp> α -DGlc	2 ⁻⁸	2 ⁻⁸	2 ⁻⁸	2 ⁻¹⁴	2 ⁻⁹	2 ⁻⁹	-	2 ⁻³	-	-
4. <i>Vicia sativa</i> L.	α -DManp> α -DGlc	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹⁰	2 ⁻²³	2 ⁻⁹	2 ⁻⁹	-	-	2 ⁻²³	-
5. <i>Galanthus nivalis</i> L.	α -DManp	-	-	-	2 ⁻¹¹	-	2 ⁻⁴	-	2 ⁻³	-	-
6. <i>Leucojum vernum</i> L.	α -DManp	-	-	-	2 ⁻¹¹	-	2 ⁻⁴	2 ⁻¹	-	-	-
7. <i>Polygonatum multiflorum</i> (L.) All.	NANA	-	-	-	2 ⁻⁹	2 ⁻⁸	2 ⁻⁶	2 ⁻²	-	2 ⁻⁴	-
8. <i>Allium sativum</i> L.	олигосахарид	2 ⁻⁵	2 ⁻⁴	2 ⁻⁴	2 ⁻⁷	2 ⁻⁴	2 ⁻³	2 ⁻³	2 ⁻³	2 ⁻¹⁸	-
9. <i>Triticum vulgare</i> L.	(NAcDGlc) ₃ , NANA	2 ⁻¹⁴	2 ⁻¹⁴	2 ⁻¹⁴	2 ⁻¹⁷	2 ⁻¹²	2 ⁻¹⁵	2 ⁻¹⁴	2 ⁻¹⁴	2 ⁻⁷	2 ⁻⁷
10. <i>Solanum tuberosum</i> L.	(NAcDGlc) ₄	2 ⁻²³	2 ⁻²³	2 ⁻²³	2 ⁻²³	2 ⁻¹⁹	2 ⁻¹⁹	2 ⁻¹⁸	2 ⁻¹⁴	2 ⁻¹⁵	2 ⁻⁷
11. <i>Sambucus nigra</i> L.	Neu5Ac(2→6)Galp	2 ⁻¹²	2 ⁻¹²	2 ⁻¹²	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹¹	-	-	-	2 ⁻²⁵	-
12. <i>Caragana arborescens</i> Lam.	NAcDGalpDManp	2 ⁻⁸	2 ⁻¹⁰	2 ⁻⁹	2 ⁻¹⁵	2 ⁻¹²	2 ⁻⁷	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹	2 ⁻¹⁸	-
13. <i>Glycine hispida</i> (Moenh.) Maxim.	NAcDGalp,DGalp	2 ⁻⁶	2 ⁻⁶	2 ⁻⁶	2 ⁻¹³	2 ⁻⁴	-	-	-	2 ⁻⁹	2 ⁻³
14. <i>Arachis hypogaea</i> L.	DGalp(1→3)NAcDGalp	-	-	-	2 ⁻¹⁰	-	-	-	-	2 ⁻¹⁰	-
15. <i>Phaseolus limensis</i> L.	α -NAcDGalp	-	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹	2 ⁻²	-	-	-	-	2 ⁻⁵	-
16. <i>Robinia pseudoacacia</i> L.	NAcDGalp	2 ⁻¹²	2 ⁻¹³	2 ⁻¹²	2 ⁻¹⁰	2 ⁻⁷	2 ⁻⁷	2 ⁻⁸	-	2 ⁻¹⁴	-
17. <i>Helix pomatia</i> L.	α NAcDGalp	-	2 ⁻¹⁴	-	2 ⁻⁹	-	-	-	-	2 ⁻²⁰	-
18. Эритроагглютинин	олигосахарид	2 ⁻¹⁶	2 ⁻¹⁶	2 ⁻¹⁶	2 ⁻²²	2 ⁻⁸	2 ⁻⁷	2 ⁻⁵	2 ⁻⁶	2 ⁻²⁸	-
19. Фитогемагглютинин Р	олигосахарид	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹⁶	2 ⁻⁸	2 ⁻⁶	2 ⁻³	2 ⁻⁶	2 ⁻²⁰	-
20. Фитогемагглютинин Л	олигосахарид	2 ⁻⁵	2 ⁻⁵	2 ⁻⁵	2 ⁻⁹	2 ⁻⁵	2 ⁻⁴	-	2 ⁻⁵	2 ⁻²⁵	-
21. <i>Aleuria aurantia</i> (Fr.) Fecl.	L-Fuc	2 ⁻¹⁰	2 ⁻⁸	2 ⁻⁹	2 ⁻⁸	2 ⁻⁴	-	-	-	2 ⁻¹⁸	-
22. <i>Laburnum anagyroides</i> Medik.	L-Fuc	2 ⁻¹¹	2 ⁻⁷	2 ⁻⁶	2 ⁻³	-	-	-	-	2 ⁻¹⁶	-

Примечания. Начальная концентрация лектинов во всех случаях – 1,0%. Титры гемагглютинации выражены в виде показателя степени, например: 2⁻¹⁰ = 1:2¹⁰ = 1:1024. Прочерк обозначает отсутствие гемагглютинации. Лектин алеврии оранжевой (п. 21) НПК "Лектинотест" не выпускает в связи с отсутствием сырьевой базы.

Использование криоконсервированных эритроцитов имеет и другую сторону – оно помогает более рационально использовать лабораторных животных как доноров эритроцитов, особенно животных редких и мелких видов.

В заключение можно сделать следующие выводы:

1. Испытанный нами метод хранения при умеренно низких температурах позволяет хранить эритроциты в условиях бытового холодильника (-12 °С на протяжении 9 мес и использовать их по мере надобности при поиске новых сырьевых источников лектинов, оценке их активности и измерения количественного содержания в растворе.

2. Метод хранения при умеренно низких температурах может помочь исследователям создать коллекцию эритроцитов от разных животных для прове-

дения поисковых работ, экономит время исследователя и позволяет более рационально использовать лабораторных животных как доноров эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонюк В.А., Луцик М.Д., Ладная Л.Я. Фитолектины во флоре УССР и специфичность связывания ими углеводов // Растительные ресурсы. – 1983. – N 2. – С. 151–159
2. Антонюк В.О. Дослідження імунохімічних властивостей лектинів кори та насіння золотого дощу звичайного // Фарм. журнал. – 1988. – N 1. – С. 57–61.
3. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. – М.: Высшая школа, 1987. – 80 с.
4. Виноград-Финкель Ф.Р., Бурдыга М.А., Тальская И.Н. Разработка метода замораживания и длительного хранения эритроцитов с глицерином в диапазоне температур от -25°C до -60°C // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1969. – N 3. – С. 34–38.
5. Гланц Р.М., Качоровский Б.В., Криворучко Р.А. и др. Метод медленного замораживания эритроцитов при умеренно низкой температуре (-40°C) в рефрижераторах (методические рекомендации для практических врачей). – Львов: Б.и., 1984. – 20 с.
6. Дервиз Г.Б., Бялко Н.К. Уточнение метода определения гемоглобина, растворенного в плазме крови // Лаб. дело. – 1966. – N 8. – С. 461–464.
7. Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. Лектины в гистохимии. – Львов: Б.и., 1989. – 142 с.
8. Луцик А.Д., Панасюк Е.Н., Антонюк и др. Методы исследования углеводной специфичности лектинов (методические рекомендации). – Львов: Б.и., 1983. – 20 с.
9. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. – Львов: Б.и., 1981. – 156 с.
10. Потапов М.И. Изучение растительных «антител» (лектинов) и практическое применение их в судебной медицине: Автореф. дис... д-ра мед. наук. – 1970. – 28 с.
11. Boyd W., Requena R. Hemagglutinating substances in various plants // J. Immunol., – 1949 – 62. – P. 333–339.
12. Mandal Chitra, Basu Sujata. An unique specificity of a sialic acid binding lectin achaning from the hemolymph of Achatina Fulica snail // Biochem and Biophys. Res. Commun. – 1987. – 148, N 2. – P. 795–801.

Научно-производственный кооператив «Лектинотест» при
Львовском мед. ин-те

Поступила 17.08.92

В.О:АНТОНЮК

ВИКОРИСТАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ, КОТРІ ЗБЕРІГАЛИСЯ ПРИ ПОМІРНИХ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ, ДЛЯ ПОШУКІВ ЛЕКТИНІВ І ОЦІНКИ ЇХ АКТИВНОСТІ

Науково-виробничий кооператив «Лектинотест» при Львівському медично-му інституті

Випробувано метод зберігання еритроцитів у присутності кріоконсерванта в морозильній камері побутового холодильника (-12°C) протягом 9 міс. Відмиті від кріоконсерванта еритроцити можуть бути використані при пошуку нових сировинних джерел лектинів і оцінці їх активності. Наводиться таблиця результатів взаємодій між еритроцитами 7 видів тварин і людини з лектинами, що випускає НБК «Лектинотест».

V.A.ANTONYUK

APPLICATION OF CRYOPRESERVED RED BLOOD CELLS FOR EVALUATING ACTIVITY AND SEARCHING FOR PLANT LECTINS

Scientific-Production Cooperative Society «Lektinotest» with the Lvov Medical Institute

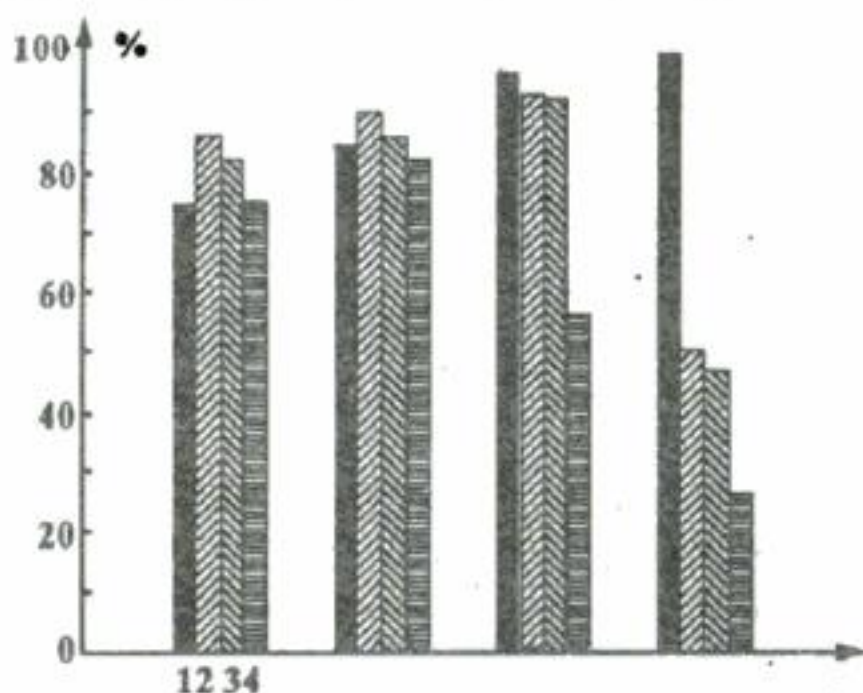
A method of storage of red blood cells (RBC) in the presence of the cryoprotectant in the freezing chamber of the utility refrigerator (-12°C) for 9 months has been tested. Cryoprotectant-washed RBC may be used in the search for new sources of lectins and for evaluation of their activity. The submitted Table summarizes the results of the interactions between RBC of the 7 types of animals and man with lectins, manufactured by a «Lektinotest» scientific-industrial company.

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭМБРИОНОВ МЫШИ

Важность добавления криозащитной среды к различным клеткам и, в частности, к эмбрионам при подготовке к криоконсервированию отмечал ряд исследователей [1, 2]. При этом, прежде всего, имеет значение температура, концентрация и способ добавления криопротектора, а также стадия развития эмбрионов.

Целью нашей работы было определить влияние растворов ряда криопротекторов на дальнейшее развитие в культуре мышинных эмбрионов при разной температуре.

В нашей работе мы использовали мышей линии СВВА. После естественного спаривания и обнаружения копулятивной пробки самок забивали путем дислокации шейных позвонков. Эмбрионы на стадии морулы вымывали из яйцеводов или рогов матки на третий день беременности фосфатно-солевым буфером с 20%-й инактивированной сывороткой крови плодов коровы. В качестве криопротекторов использовали 1 М глицерин, 1,5 М ДМСО, 3 М ДМСО. Капельно добавляли растворы криопротекторов и проводили эквilibрацию эмбрионов в течение 20 мин при температуре 0, 10, 22, 37 °С. После поэтапного отмыва



Способность эмбрионов мышей дробиться в культуре до стадии бластоцисты после эквilibрации эмбрионов в растворах криопротекторов при разных температурах: 1 – контроль – среда без криопротекторов; 2 – 1 М глицерин; 3 – 1,5 М ДМСО; 4 – 3 М ДМСО;

ДМСО – 82,2%. Недостаточно высокий процент сохранности эмбрионов, эквilibрированных при 0 °С без криопротектора можно объяснить высокой чувствительностью эмбрионов к действию низких температур. Однако добавление криопротектора в среду при этой же температуре увеличивает число жизнеспособных эмбрионов до 86,1% в случае глицерина и 81,9% – 1,5 М ДМСО. 20-минутная эквilibрация с 3 М ДМСО дает такое же количество жизнеспособных эмбрионов, как и в контроле.

Таким образом, из полученных результатов следует, что добавление растворов таких криопротекторов, как 1 М глицерин и 1,5 М ДМСО при 10 и 0 °С повышает количество дробящихся эмбрионов по сравнению с эмбрионами, находящимися в контрольной среде, а 3 М ДМСО уменьшает число жизнеспособных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И., Паращук Ю.С. Криоконсервация репродуктивных клеток. – Киев: Наук. думка, 1986. – 207 с.
2. Wittingham D., Leibo S., Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 °C. // Science. – 1972. – 178. – P. 411–414.

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

Поступило 18.03.94

ХРОНИКА

ПОЗДРАВЛЯЕМ!

Колин Джеймс Грин всемирно известный ученый в области криобиологии. Он является директором авторитетнейшего и самого крупного в Европе медико-биологического центра Херроу в Лондоне. Возглавлял Европейское научное общество низкотемпературной биологии, член медицинской и ветеринарной Академии Великобритании, автор многих работ в области криобиологии и микрохирургии, которую он использует для решения криобиологических проблем.

Колин Грин ведет совместные исследования с ИПКиК НАН Украины по двустороннему научному соглашению. Он постоянный участник, член оргкомитета международных криобиологических конференций, проходивших в Харькове. Оказывает значительную помощь по большому кругу разнообразных вопросов Институту проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Колин Грин является членом редколлегии журнала «Проблемы криобиологии».

Ученый совет Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины выдвинул кандидатуру Колина Грина для выборов как иностранного члена Академии наук Украины. На общем собрании Национальной Академии наук Украины 23 марта 1994 г. он избран иностранным членом Национальной Академии наук Украины.

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины в 1993 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук М.Ю.Стегний на тему “Влияние криоконсервирования на сохранность и биологические свойства вируса инфекционного ринотрахеита”, в которой экспериментально установлен факт снижения инфекционной активности вируса, что связано с разрушением вирусных частиц, нарушением целостности их липопротеидной оболочки или капсида в процессе криоконсервирования по неоптимальным программам. В результате изучения биосинтетических процессов в системах “нативный вирус–клетка”, “криоконсервированный вирус–клетка” показано, что повреждение вирусных частиц имеет место даже в случае применения оптимальных режимов замораживания вируса, но они не столь значительны, чтобы вызвать снижение инфекционной активности. Разработанный способ криоконсервирования вируса инфекционного ринотрахеита позволяет использовать его в биотехнологии, медицине и ветеринарии с целью долгосрочной стабилизации биологических свойств вирусов.

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

3 1994

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. – "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском языках. Объем 5,6 печ. л., периодичность четыре номера в год. 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.

Our Journal PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY is published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences in Russian and in English. The journal provides basic information to researchers investigating the various phenomena involved in the interaction between low temperatures and living cells or tissue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are of utmost importance with regard to preservation of cells, tissues and organs, cell damage caused by freezing, cold acclimation and hardiness in plants, mechanisms of cold survival in animals and microorganisms. The journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology and pharmaceuticals, low temperature techniques and equipment. A subscription to PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY includes 4 issues a year.

Subscription orders should be addressed to
Editor-in Chief V.I. Grishchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of the Ukraine
23 Pereyaslavskaya Str., 310015 Kharkov, The Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84

ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1994. №3. 1-56 ИНДЕКС 70474