

2

ISSN 0233-7673

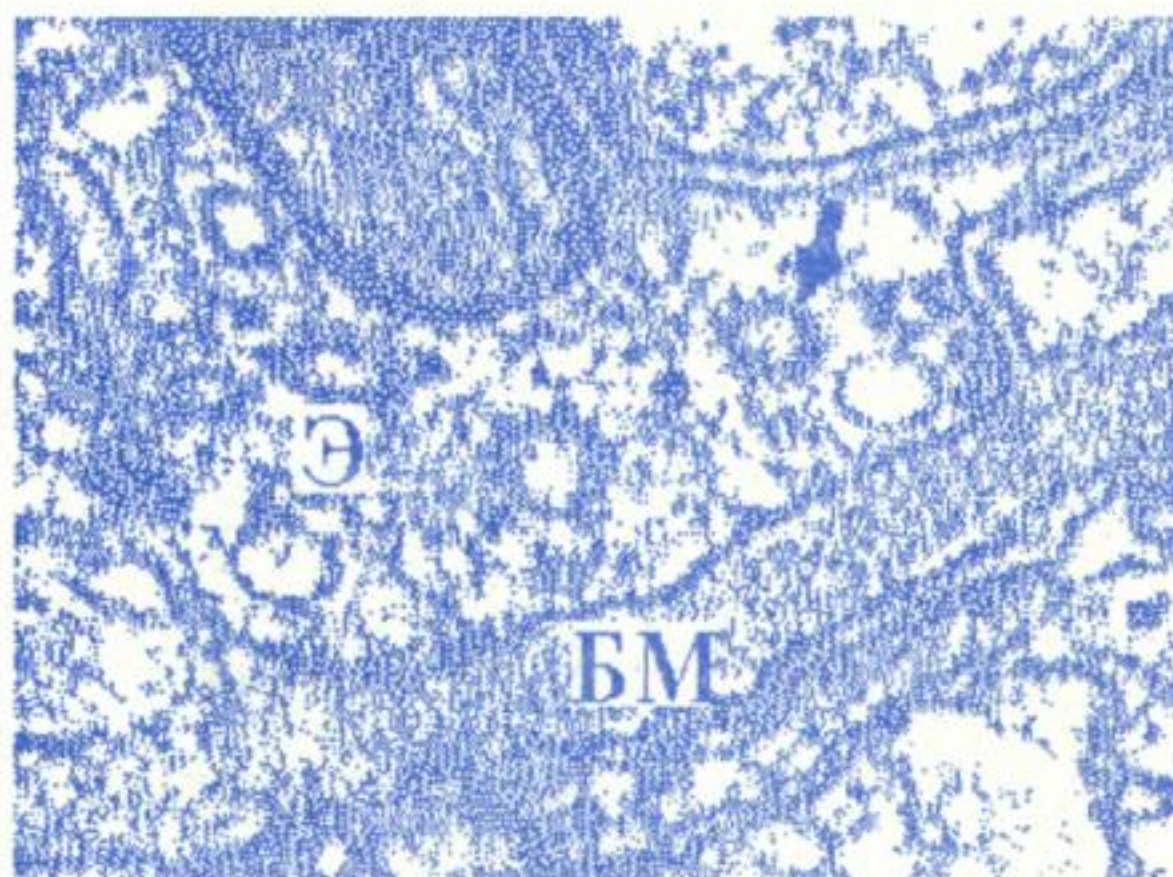
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1995

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭН-
ЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОХЛАЖДЕННОГО МОЗГА.
Сообщение 2. Ритмические холодовые воздействия повышают про-
ницаемость гематоэнцефалического барьера для терморегуляторных
нейромедиаторов Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, А.В.Шило, В.В.Ломако,
И.И.Ломакин, Л.Н.Марченко

КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫЙ КОСТНЫЙ МОЗГ: ПОТЕНЦИАЛ
И ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕН-
НОГО КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА Е.Д.Луценко, А.Н.Гольцев,
Т.Г.Дубрава, Л.В.Останкова, Е.В.Опанасенко

GENETIC CONTROL OF ROOSTER SPERMATOZOA FREEZABILITY
H.Fujihara, S.Oboshi, Y.Zhao

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.Гольцев (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

2

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

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1995

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Шило А.В., Ломако В.В., Ломакин И.И., Марченко Л.Н.*
К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 2. Ритмические холодовые воздействия повышают проницаемость гематоэнцефалического барьера для терморегуляторных нейромедиаторов 3
- Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г., Белоус А.М.* Влияние полиэтиленоксида и сахарозы на содержание Ca^{2+} и фосфорилирование белков спектрин-актинового комплекса эритроцитов при охлаждении и замораживании-отогреве 9
- Жегунов Г.Ф., Карманова И.Г.* Эволюционно-генетические аспекты изучения гипобиоза и зимней спячки 14
- Межидов С.Х.* Аномальное уменьшение микровязкости цитозоля эритроцитов в растворах 1,2-пропандиола 19
- Романец К.М., Скорняков Б.А., Коптелов В.А., Гирич С.О.* Влияние общей гипотермии и криопротекторов на активность трипсина и эстеразную активность плазмы крови крыс . . . 22
- Тодрин А.Ф.* О форме капли, замороженной на твердой поверхности 26

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Луценко Е.Д., Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Останкова Л.В., Опанасенко Е.В.* Криоконсервированный костный мозг: потенциал и ограничения использования в условиях измененного компонентного состава 29
- Чеканова В.В., Ханина Л.А., Мазалов В.К., Луговой В.И.* Цитотоксичность и криопротекторная активность оксипропилированных амидов при криоконсервировании клеток костного мозга крыс 36
- Тимакова Н.В., Гучок В.М., Шраго М.И., Киричек Л.Т., Ходько А.Т.* Токсикологическая характеристика полимерных материалов для контейнеров в технологиях криоконсервирования клеток крови 40

КРИОМЕДИЦИНА

- Корнух С.Ю., Сандомирский Б.П.* Криотерапия дегенеративных суставных процессов . . . 44

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Fujihara H., Oboshi S., Zhao Y.* Genetic control of rooster spermatozoa freezability 48
- Шиманко И.И., Суббота Н.П., Лебедева Ю.Н., Васина Н.В.* Применение изолированных клеток печени с целью лечения больных с печеночной недостаточностью различного генеза . 49
- Ханина Л.А., Кошый С.В., Воротилин А.М., Луговой В.И.* Количественный метод определения криопротекторов в лекарственных формах 50

Зинченко А.В., Дворцовой В.К., Диалло М. О влиянии сахарозы на низкотемпературные фазовые переходы в растворах некоторых криозащитных веществ 52

ХРОНИКА

РЕЦЕНЗИЯ

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

- Babiychuk G.A., Marchenko V.S., Shilo A.V., Lomako V.V., Lomakin I.I., Marchenko L.N.* On the mechanisms of regulation of BBB permeability of the cooled brain. Report II. Rhythmic cold exposures increase BBB permeability to thermoregulatory neuromediators. 3
- Babiychuk L.A., Zemlyanskikh N.G., Belous A.M.* Effect of polyethylene oxide and sucrose on the content of Ca²⁺ and phosphorylation of proteins of spectrin-actin complex of red blood cells during cooling and freeze-thawing. 9
- Zhegunov G.F., Karmanova I.G.* Evolutionary-genetic aspects of studying hypobiosis and hibernation. 14
- Mezhidov S.Kh.* Anomalous reduction in microviscosity of red blood cell cytosole in solutions of 1,2-propanediol. 19
- Romanets K.M., Skorniyakov B.A., Koptelov V.A., Girich S.O.* The effect of total hypothermia and cryoprotectants on the activity of trypsin and esterase in rat blood plasma. 22
- Todrin A.F.* On the shape of the drop, frozen on the solid surface. 26

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

- Lutsenko E.D., Goltsev A.N., Dubrava T.G., Ostankova L.V., Opanasenko E.V.* Cryopreserved bone marrow: potential and limitations in application under changes in component composition. 29
- Chekanova V.V., Khanina L.A., Mazalov V.K., Lougovoy V.I.* Cytotoxicity and cryoprotective activity of the oxyethylated amides during cryopreservation of rat bone marrow. 36
- Timakova N.V., Guchok V.M., Shrago M.I., Kirichek L.T., Khodko A.T.* Toxicologic characteristics of polymeric materials for containers in blood cell cryopreservation technologies. 40

CRYOMEDICINE

- Kornukh S.Yu., Sandomirsky B.P.* Cryotherapy of degenerative articular processes. 44

BRIEF COMMUNICATIONS

- Fujihara H., Oboshi S., Zhao Y.* Genetic control of rooster spermatozoa freezability. 48
- Shimanko I.I., Subbota N.P., Lebedeva Yu.N., Vasina N.V.* Application of isolated liver cells for treatment of patients with hepatic insufficiency of various genesis. 49
- Khanina L.A., Koschiy S.V., Vorotilin A.M., Lougovoy V.I.* Quantitative method of identifying cryoprotectants in medicinal drugs 50
- Zinchenko A.V., Dvortsev V.K., Diallo M.* On the action of sucrose on low temperature phase transitions in solutions of some cryoprotective substances 52

CHRONICLE

REVIEW

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

Научный редактор В.И.Луговой
Редактор Л.А.Рябинина
Компьютерный набор и верстка: И.П.Михайлова, А.М.Шаталов

Подп. в печ. 05.07.95. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.
Тираж 350 экз. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

УДК 612.822.1:615.832.9

**Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Шило А.В.,
Ломако В.В., Ломакин И.И., Марченко Л.Н.**

**К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОХЛАЖДЕННОГО
МОЗГА. Сообщение 2. Ритмические холодовые воздейст-
вия повышают проницаемость гематоэнцефалического
барьера для терморегуляторных нейромедиаторов***

Показана взаимосвязь изменений биоэлектрической активности (БЭА) в секундном диапазоне частот с колебаниями проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для катехоламинов. Отмечено, что ритмическое холодовое воздействие с частотой 0,1 Гц (0,1 КЦГ) вызывает более существенное изменение проницаемости ГЭБ по сравнению с краниocereбральной гипотермией до уровня 32 °С (КЦГ 32). Получила научное развитие идея о ГЭБ как структурно-функциональной основе сверхмедленной управляющей системы организма.

В регуляции функционального состояния ЦНС при экстремальных, в том числе температурных, воздействиях особая роль принадлежит гематоэнцефалическому барьеру (ГЭБ) как регулятору и защитнику относительного постоянства внутренней среды мозга. Известно, что возможное поступление катехоламинов, принимающих участие в центральных механизмах терморегуляции и опосредующих стрессорный ответ организма, из циркулирующей крови в ЦНС может существенно изменять функциональное состояние мозга [2]. Оценить же изменение состояния ЦНС, определить степень ее устойчивости к различным видам воздействий наиболее удобно по параметрам биоэлектрической активности (БЭА).

Электрофизиологические методы изучения функционирования головного мозга при различных видах охлаждения явились одними из немногих экспериментальных приемов, позволяющих с минимальным вмешательством в естественный ход процессов прижизненно оценивать его динамические характеристики. В частности, увеличение силы и длительности холодового воздействия вовлекает в реакцию ответа структуры ЦНС, функционально связанные с системой терморегуляции, что проявляется в характерном изменении БЭА, особенно в секундном диапазоне частот (ζ -диапазон) [1, 5]. Применяя данные положения к особенностям состояния ГЭБ охлажденного мозга, можно предположить, что на современном этапе наших знаний актуальной является постановка вопроса о взаимосвязи ζ -ритма биоэлектрических процессов мозговых структур и проницаемости ГЭБ.

Другая важная сторона проблемы заключается в необходимости управления проницаемостью ГЭБ для катехоламинов и других биоактивных веществ. Поэтому в рамках теоретической криобиологии хотелось подойти к решению проблемы соотношения нейромедиаторных механизмов функционирования ГЭБ и биоэлектрических реакций охлажденного мозга.

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г. КЦГ и ритмические холодовые воздействия осуществляли на установке для программного охлаждения, созданной в СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины. В ходе экспериментов измеряли температуру в прямой кишке при помощи электронного термометра СТЗ–18. Для блокирования рефлекторных терморе-

* В журнале "Проблемы криобиологии", 1995, № 1, с. 3 по техническим причинам отсутствует название Сообщения 1, а именно: Системное введение бомбезина повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера для нейромедиаторов.



гуляторных реакций организма экспериментальных животных наркотизировали внутривенными инъекциями смеси тиопентала натрия и оксибутирата натрия из расчета 30 мг/кг и 100 мг/кг массы соответственно. Истощение катехоламиновых депо у животных вызвали одноразовым введением резерпина из расчета 0,5 мг/кг массы за 18 ч до начала опытов. С этой целью использовали рауседил фирмы "Рихтер". Блокаду α - и β -адренорецепторов вызвали перфузией *ventriculus tertius* 2 мкМ раствором фентоламина и пропранолола и внутривенными инъекциями из расчета 1 мг на 100 г массы животного. Изучение секреции и проницаемости ГЭБ для меченных по тритию адреналина (А) и норадреналина (НА) проводили радиоизотопным методом с использованием push-pull канюли [3]. Проницаемость ГЭБ изучали в передней и задней областях гипоталамуса (ПГТ и ЗГТ), коре, таламусе, гиппокампе. Биоэлектрическую активность структур мозга отводили монополярно никромовыми электродами, вживленными по координатам стереотаксического атласа [4], и регистрировали на энцефалографе "Bioscript 1". Спектрально-корреляционный анализ проводили на IBM PC/AT – 286 с помощью специального пакета программ и ЭВМ СМ-4 при помощи программы КОСПА [1]. Частоту сердечных сокращений регистрировали во II-м стандартном отведении на кардиографе ЭКГ-04Т с последующей математической обработкой 100 кардиоинтервалов на ЭВМ СМ-4 по программе SERO и КОРГ [1] следующих показателей: моды (Мо), амплитуды моды (АМо), вариационного размаха (dX), индекса напряжения регуляторных систем (ИН), коэффициента корреляции после первого сдвига (Ik), количества сдвигов, через которое появляется первое отрицательное значение коэффициента корреляции (Мо), медленных волн первого порядка (Sm), медленных волн второго порядка (So). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили традиционными методами.

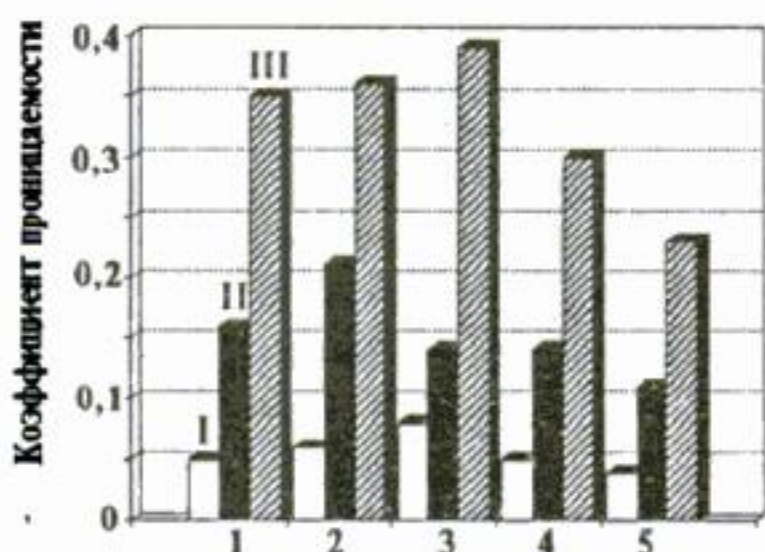


Рис. 1. Проницаемость ГЭБ для НА при различных видах охлаждения (I – наркоз, II – КЦГ 32 °С, III – 0,1 КЦГ): 1 – ПГТ, 2 – ЗГТ, 3 – таламус, 4 – гиппокамп, 5 – кора

ректальной температуры 32 °С было отмечено увеличение проницаемости ГЭБ для всех исследованных структур в среднем в 2 раза. Аналогичные изменения проницаемости ГЭБ выявлены и для адреналина.

Таким образом, при КЦГ отмечено усиленное поступление катехоламинов в структуры мозга через ГЭБ. Мы предположили, что проникший через ГЭБ нейромедиатор может принимать участие в синаптических процессах. Для этого через 40 мин после внутривенного введения меченого НА проводили перфузию гипоталамуса раствором Кребса-Рингера с повышенным содержанием ионов калия, так как повышение концентрации этого иона в перфузионном растворе способствует усилению секреции НА. Действительно, в наших экспериментах показано, что происходит захват и K^+ -индуцированная секреция синаптическими окончаниями экзогенного НА, проникшего через ГЭБ (рис. 1). Изменение проницаемости в структурах мозга должно привести

Проницаемость ГЭБ изменяется под воздействием различных физических факторов, одним из которых, по нашему мнению, может быть гипотермия. В связи с этим нами было изучено влияние КЦГ на проницаемость ГЭБ для меченных по тритию А и НА. После внутривенной инъекции меченого по тритию НА и последующей 60-минутной перфузии структур головного мозга интактных животных раствором Кребса-Рингера отмечено незначительное проникновение нейромедиатора через ГЭБ, причем уровень его в крови оставался высоким (рис. 1). При охлаждении до

к изменению параметров биоэлектрической активности, что и было показано в следующей серии экспериментов.

В основе различных реакций организма лежит образование определенных пространственно-временных паттернов биоэлектрической активности, для анализа которых нами был использован спектрально-корреляционный метод как наиболее адекватный для изучения пространственной организации электрических процессов структур головного мозга. Известно [6], что для облегчения передачи возбуждения необходимы синхронность биопотенциалов соответствующих пунктов коры (определяемая по параметрам функции когерентности), некоторая минимальная площадь синхронно действующих участков, наличие ритмических компонент в определенном диапазоне частот (выявляемых при помощи функции автокорреляции), когерентность и постоянные фазовые отношения этих ритмических составляющих, увеличение их выраженности в спектре БЭА.

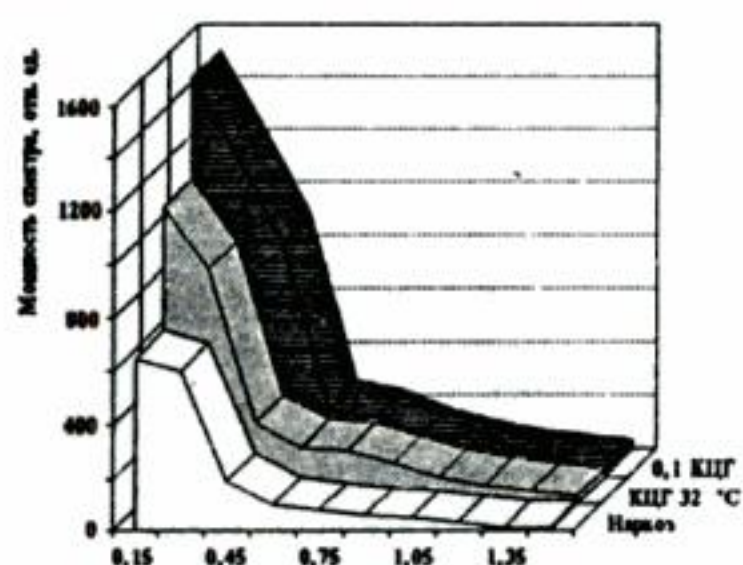


Рис. 2. Мощность спектра БЭА при различных видах охлаждения

В наших экспериментах было показано, что при наркозе наблюдаются существенные перестройки БЭА: подавляется мощность спектра в области высоких частот, несколько возрастает активность в секундном диапазоне (рис. 2). КЦГ 32 °С приводит к усилению мощности спектра в диапазоне 0,1–0,5 Гц в 1,5 раза, повышается вклад периодической составляющей (рис. 3), при этом возрастают значения функции когерентности особенно в ζ -диапазоне, достигая 0,7–0,8, т.е. усиливается пространственная синхронизация БЭА (рис. 4).

ζ -волны относятся к сверхмедленным колебаниям потенциалов мозга. Считается, что динамические изменения сверхмедленных колебаний потенциалов отражают различные функциональные состояния мозга и являются признаками деятельности сверхмедленной управляющей системы мозга. Для этой системы характерно "отсутствие реакции на кратковременные и случайные факторы среды и в то же время развитие изменений при систематических (или чрезмерных для организма) воздействиях" [5]. По нашему мнению, повышение мощности ζ -ритма может свидетельствовать о повышении активности "сверхмедленной управляющей системы мозга" при КЦГ 32 °С.

Таким образом, изменения БЭА в секундном диапазоне частот происходят параллельно и однонаправленно с изменениями проницаемости ГЭБ (рис. 5). Поэтому представлялось целесообразным изучить изменение БЭА и проницаемости ГЭБ при навязывании секундного ритма. Ритмическое холодовое воздействие с частотой близкой к секундному диапазону в течение 60–80 мин приводит к росту мощности спектра в ζ -диапазоне (рис. 2); на автокоррелог-

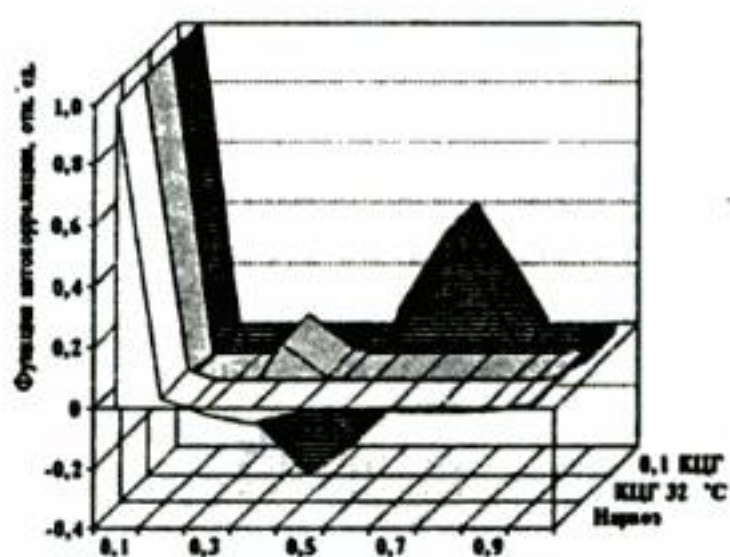


Рис. 3. Автокоррелогаммы БЭА при различных видах охлаждения

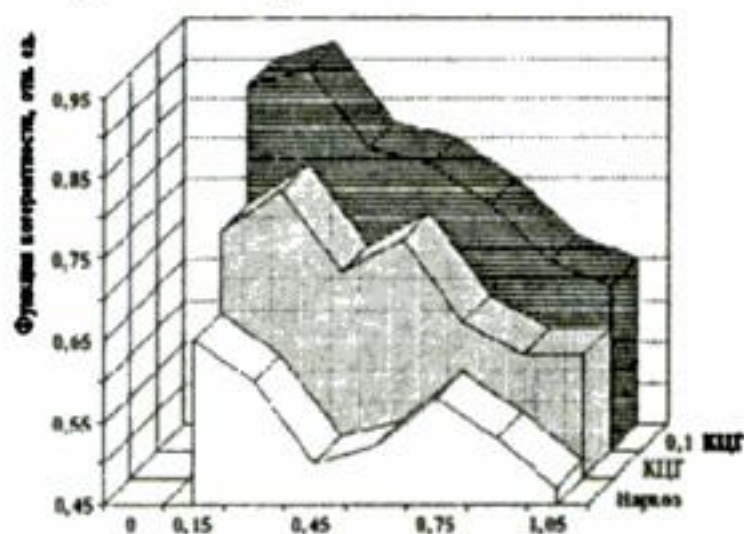


Рис. 4. Изменение функции когерентности при различных видах охлаждения

рамме процесса можно видеть устойчивую периодическую составляющую (рис. 3), происходит существенное усиление пространственной синхронизации ξ -ритма (рис. 4).

В процессе изучения состояния проницаемости ГЭБ при ритмическом холодовом воздействии (0,1 КЦГ) было обнаружено, что раздражение терморецепторов кожи головы с частотой 0,1 Гц в течение 60–80 мин приводит к увеличению проницаемости ГЭБ для НА во всех изученных структурах в среднем в 3–4 раза (рис. 1.). Сходные изменения проницаемости ГЭБ отмечены и для А. Таким образом, при 0,1 КЦГ, по сравнению с КЦГ при 32 °С без ритмического воздействия, более существенно повышается пространственная синхронизация секундного ритма и увеличивается проницаемость ГЭБ для А и НА в исследованных структурах мозга, что наводит на мысль о взаимосвязи этих процессов (рис. 5). Для подтверждения этого предположения были проведены модельные нейрофизиологические опыты.

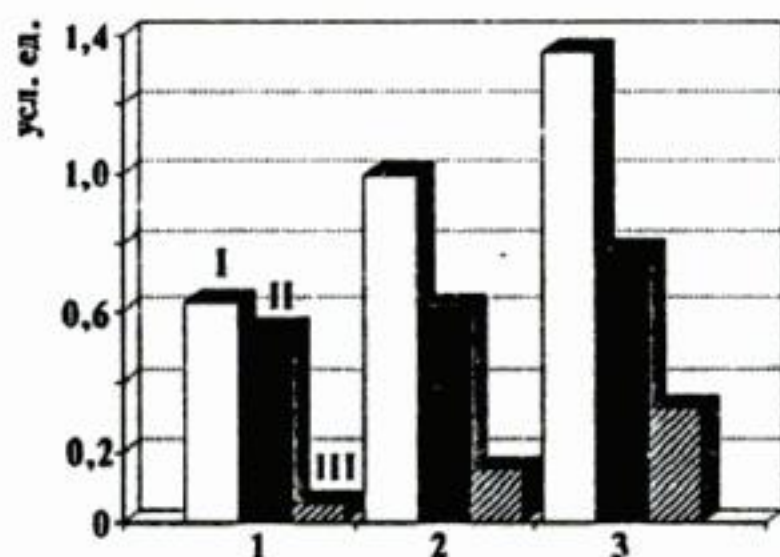


Рис. 5. Влияние различных видов охлаждения (1 – наркоз, 2 – КЦГ 32 °С, 3 – 0,1 КЦГ) на проницаемость ГЭБ для НА, когерентность и спектр мощности БЭА: (I – когерентность БЭА, II – спектр БЭА, III – проницаемость ГЭБ)

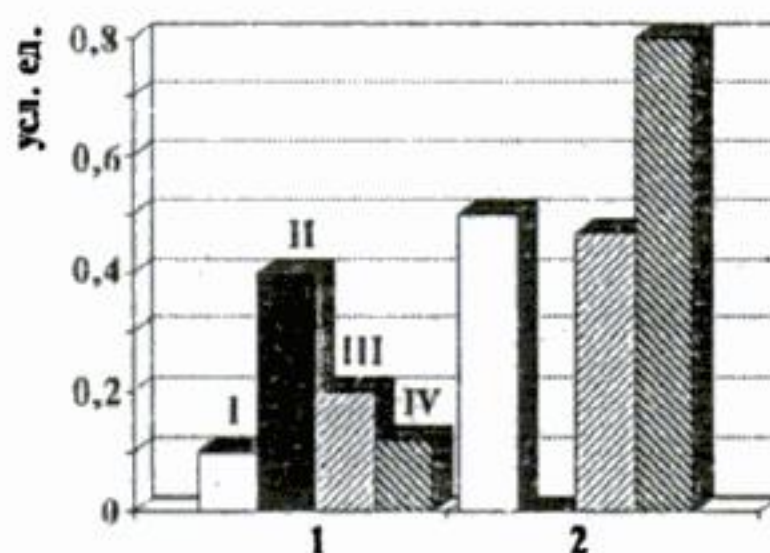


Рис. 6. Влияние блокаторов адренорецепторов (АР) на когерентность БЭА и проницаемость ГЭБ для НА: (1 – коэффициент проницаемости ГЭБ, 2 – функция когерентности БЭА); I – наркоз; II – 0,1 КЦГ; III – блокада β -АР пропранололом; IV – блокада α -АР фентоламином

Поскольку генезис секундного ритма медленной БЭА зависит от активности моноаминергической системы головного мозга [1], мы изучили влияние блокады адренорецепторов (АР) на параметры БЭА и проницаемость ГЭБ. Было показано, что блокада α -АР приводит к понижению функции когерентности (рис. 6), а блокада β -АР, наоборот, повышает функцию когерентности на фоне применения КЦГ. Если наше предположение о связи медленной активности и проницаемости ГЭБ верно, то блокада АР должна привести к соответствующему изменению проницаемости ГЭБ для А и НА, что и было показано в следующей серии экспериментов (рис. 6).

Чтобы учесть влияние собственной секреции норадренергических нейронов на БЭА и проницаемость ГЭБ, было необходимо изучить данные процессы в условиях резерпинового истощения катехоламиновых депо головного мозга при гипотермии. Введение резерпина не оказало какого-либо влияния на процесс проникновения НА при КЦГ 32 °С. Не был подавлен и процесс K^+ -индуцированной секреции нейромедиатора. Функция когерентности также не претерпевает существенных изменений. Эти данные позволяют отметить высокую активность проникшего нейромедиатора и предположить именно его участие в изменениях электроэнцефалограммы (ЭЭГ). Таким образом, результаты экспериментов показали, что проникший через ГЭБ нейромедиатор и в условиях истощения катехоламиновых депо на фоне гипотермии принимает участие в нейрофизиологических процессах мозга, в том числе и гипоталамуса, что должно отразиться, в частности, на активности сердечно-сосудистой системы. Поэтому при холодовых воздействиях возможен и электрокардиографический критерий изменения проницаемости ГЭБ для НА и А.

Известно, что ряд веществ обладает различным действием при центральном и периферическом способах введения. Так, НА и А, введенные в кровяное

русло, вызывают, в частности, повышение частоты сердечных сокращений (ЧСС), а будучи введенными в гипоталамус, приводят к ее урежению. Поэтому мы изучили реакцию сердечно-сосудистой системы на периферическое введение нейромедиаторов при КЦГ 32 °С и 0,1 КЦГ. Внутривенное введение катехоламинов животным оказывает слабый активирующий эффект. Введение нейромедиаторов на фоне применения КЦГ 32 °С и 0,1 КЦГ приводит к урежению ЧСС, более выраженному при ритмическом холодном воздействии (рис. 7).

Для выявления более тонких закономерностей при этих процедурах мы провели анализ сердечного ритма с привлечением специальных математических средств [1]. Было обнаружено (таблица), что показатели математического анализа сердечного ритма при КЦГ 32 °С отражают различные формы процессов регуляции. Возрастание M_o (указывает на наиболее вероятный уровень функционирования системы кровообращения) при мало измененном вариационном размахе dX (пока-

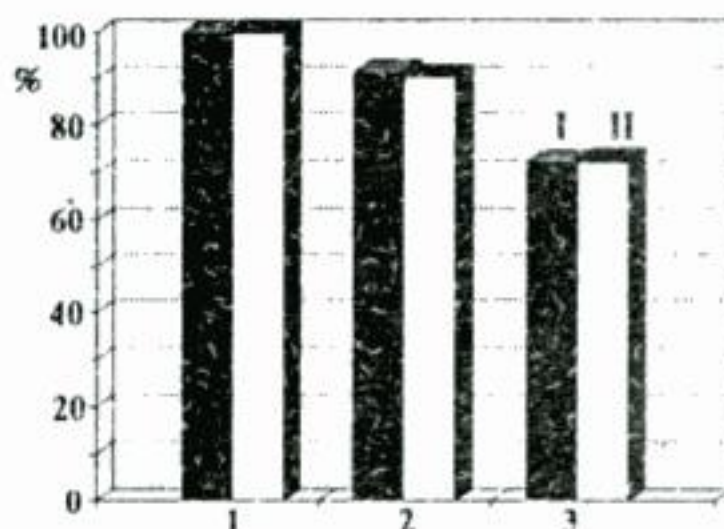


Рис. 7. Изменение ЧСС после периферического введения А (I) и НА (II) при различных видах охлаждения: 1 – наркоз, 2 – КЦГ 32 °С, 3 – 0,1 КЦГ

затель, связанный с активностью парасимпатической нервной системы) и $A M_o$ (показатель, отражающий мобилизующий эффект централизации управления ритмом сердца, обусловленный влиянием симпатического отдела вегетативной нервной системы) свидетельствуют о значительных перестройках в механизмах симпатических и парасимпатических звеньев регуляции. Низкие значения I_k , M_o (физиологический смысл которых заключается в оценке степени и характера влияния центрального контура на автономный), S_o (отражает активность межсистемного уровня управления) и S_m (характеризует состояние подкорковых нервных центров), а также падение IH (характеризует смещение вегетативного гомеостаза) свидетельствуют о преобладании активности парасимпатической нервной системы. По нашему мнению, эти изменения могут быть связаны с проникновением в условиях гипотермии катехоламинов в гипоталамус, где они оказывают парасимпатическое влияние на центры сердечно-сосудистой системы.

Следовательно, статистические характеристики динамического ряда кардиоинтервалов при гипотермии могут свидетельствовать об изменении проницаемости ГЭБ гипоталамуса для катехоламинов, а уровень пространственной синхронизации секундного биоэлектрического ритма — отражать общую функциональную активность ГЭБ охлажденного мозга. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что использованные холодные воздействия вносят существенные коррективы в изменение проницаемости ГЭБ для катехоламинов, более выраженные при применении навязанного холодного ритма. Проникший через ГЭБ в мозг нейромедиатор захватывается терминалями нейронов, секретируется, и, взаимодействуя с соответствующими рецепторами, приводит к изменению функционального состояния головного мозга, что наиболее удобно проследить по модификациям БЭА. Наблюдаемая при этом перестройка работы механизмов, обеспечивающих активацию “медленной управляющей системы мозга” [5], проявляется в усилении мощности спектра в секундном диапазоне частот (ζ -волны), повышении уровня пространственной синхронизации.

Математический анализ сердечного ритма на фоне действия КЦГ 32 °С

Показатели	Характер воздействия	
	Наркоз	КЦГ 32 °С
M_o	$0,228 \pm 0,005$	$0,336 \pm 0,010$
dX	$36,8 \pm 3,8$	$40,0 \pm 0,1$
$A M_o$	$64,6 \pm 2,6$	$74,6 \pm 5,4$
IH	$40,4 \pm 2,8$	$26,8 \pm 0,5$
I_k	$0,33 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,06$
M_o	$3,6 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,001$
S_o	$2,09 \pm 0,03$	$1,48 \pm 0,06$
S_m	$1,91 \pm 0,01$	$1,56 \pm 0,04$

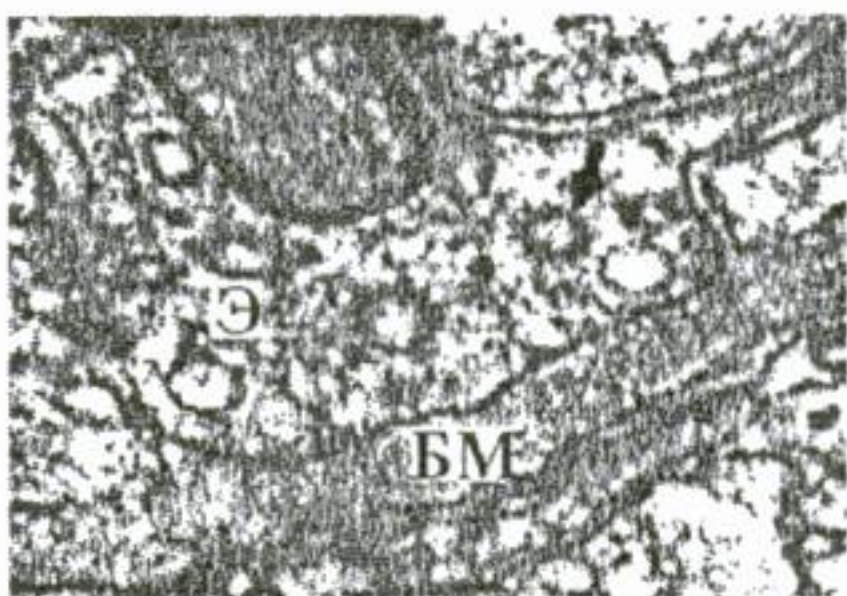


Рис. 8. Ультраструктура элементов ГЭБ (X 100000): ↓ – “опушенная” (клатриновая) везикула, БМ – базальная мембрана, Э – эндотелиальная клетка

ции и появлении устойчивой ритмической составляющей в БЭА головного мозга. Изменения параметров БЭА в секундном диапазоне частот и проницаемости ГЭБ для катехоламинов происходят параллельно и однонаправленно, и, возможно, имеют общую нейрофизиологическую основу.

Мы предположили, что повышение проницаемости ГЭБ при гипотермических воздействиях обусловлено явлением рецепторного трансцитоза (отмечается повышенное количество клатриновых везикул) (рис. 8). Этот процесс под-

держивается за счет долговременной потенциации, проявляется в сверхмедленной биоэлектрической активности и зависит от функционального состояния терморегуляторных нейромедиаторов и системы вторичных мессенджеров. Рассмотрению этих проблем будет посвящено следующее сообщение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Ломакин И.И., Белостоцкий А.В. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. – Киев: Наук. думка, 1992. – 208 с.
2. Белова Т.И., Юнсон Ю. Гемато-энцефалический барьер при эмоциональном стрессе // Успехи физиол. наук. – 1985. – 16, № 2. – С. 61–76.
3. Бредбери М. Концепция гемато-энцефалического барьера. – М.: Медицина, 1983. – 480 с.
4. Буреш Я., Петрань М., Захар И. Электрофизиологические методы исследования – М.: Изд-во иностр. лит., 1962. – 456 с.
5. Илюхина В.А. Сверхмедленные физиологические процессы и межсистемные взаимодействия в организме // Теоретические и прикладные аспекты. – Л.: Наука, 1986. – 188 с.
6. Ливанов М.Н., Русинов В.С., Симонов П.В. и др. Диагностика и прогнозирование функционального состояния мозга человека. – М.: Наука, 1988. – 206 с.

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

Поступила 13.10.94

Г.О.БАБІЙЧУК, В.С.МАРЧЕНКО, О.В.ШИЛО, В.В.ЛОМАКО, І.І.ЛОМАКІН, Л.М.МАРЧЕНКО
ДО МЕХАНІЗМІВ РЕГУЛЯЦІЇ ПРОНИКНОСТІ ГЕМАТОЕНЦЕ-
ФАЛІЧНОГО БАР'ЄРУ ОХОЛОДЖЕНОГО МОЗКУ. Повідомлення 2.
Ритмічні холодові впливи підвищують проникність гематоенце-
фалічного бар'єру для терморегуляційних нейромедіаторів

Інститут проблем кробиології і криомедицини НАН України, м. Харків

Показано взаємозв'язок зміни біоелектричної активності (БЕА) у секундному діапазоні частот з коливаннями проникності гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) для катехоламінів. Відзначено, що ритмічні холодові впливи з частотою 0,1 Гц (0,1 КЦГ) приводять до більш суттєвої зміни проникності ГЕБ порівняно з краніоцеребральною гіпотермією до рівня 32 °С (КЦГ 32). Знайшла науковий розвиток ідея про ГЕБ як структурно-функціональну основу надповільної управляючої системи організму.

G.A.BABIYCHUK, V.S.MARCHENKO, A.V.SHILO, V.V.LOMAKO, I.I.LOMAKIN, L.N.MARCHENKO

ON THE MECHANISMS OF REGULATION OF BBB PERMEABILITY
OF THE COOLED BRAIN. Report 2. Rhythmic cold exposures increase
permeability of BBB to thermoregulatory neuromediators

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

The report deals with the interrelation between the changes in bioelectrical activity in the seconds range of frequencies and the deviations of permeability of the blood-brain barrier to catecholamines.

Rhythmic cold exposure with the frequency of 0.1 Hz (0.1 CCH) was reported to result in a greater alteration in BBB permeability as compared with craniocerebral hypothermia to the level of 32°C (CCH 32). The idea on BBB being a structure-functional basis of a supralow controlling system of the organism is scientifically substantiated.

УДК 57.043.612.111

Л.А.Бабийчук, Н.Г.Землянских, А.М.Белоус

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА И САХАРОЗЫ НА СОДЕРЖАНИЕ Ca^{2+} И ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СПЕКТРИН-АКТИНОВОГО КОМПЛЕКСА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ И ЗАМОРАЖИВАНИИ-ОТОГРЕВЕ

Исследованы изменения концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ и процессы фосфорилирования мембранных белков эритроцитов после экспонирования клеток в растворе ПЭО-1500 при различных температурах и после замораживания-отогрева. Показано, что экспонирование эритроцитов при 0 °С криопротектором ПЭО-1500 сопровождается увеличением в 2,5 раза включения ^{32}P в спектрин, причем повышенный уровень фосфорилирования спектрина сохраняется и после замораживания-отогрева. Экспонирование клеток при 22 °С и последующее замораживание-отогрев не вызывают подобного эффекта. При исследовании влияния температуры и осмотически активных веществ на изменение концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ обнаружено, что инкубация клеток при 0 °С по сравнению с инкубацией при комнатной температуре вызывает более высокий рост Ca^{2+} как в изотонических условиях, так и при действии на клетки осмотически активных веществ. Полученные данные свидетельствуют о том, что в процесс холодовой адаптации эритроцитов при 0 °С вовлекаются структурные изменения белков цитоскелета, зависящие от степени их фосфорилирования и концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$.

В процессе охлаждения клеток в гипертонических растворах солей, а также в средах с высокой концентрацией непроникающих криопротекторов типа полиэтиленоксидов (ПЭО) модифицируются структурные и функциональные параметры плазматической мембраны [1], происходит изменение формы и объема клеток [3]. Характер модификации биоструктур зависит от температуры, концентрации осмотически активного вещества и времени экспонирования в нем клеток [1, 3]. В наших предыдущих исследованиях [2] было показано, что постепенное добавление к суспензии эритроцитов непроникающего криопротектора полиэтиленоксида с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500) при температуре близкой к 0 °С в значительной степени повышает устойчивость клеток к последующему замораживанию-отогреву по сравнению с клетками, экспонированными при комнатной температуре. При этом важная роль в индукции повышенной устойчивости клеток к воздействию осмотических и низкотемпературных факторов принадлежит белкам цитоскелета [4].

Участие белков цитоскелета в температурно-осмотической стабилизации клетки предполагает вовлечение в этот процесс довольно сложного регуляторного механизма, связанного с частичной дегидратацией клеток, перераспределением ионов, особенно ионов Ca^{2+} и других вторичных мессенджеров [9].

Генерализованные изменения плазматической мембраны при частичной дегидратации клеток в условиях действия осмотически активных веществ могут сопровождаться изменением процессов фосфорилирования-дефосфорилирования мембранных белков, что существенно влияет на характер белок-белковых и белок-липидных ассоциаций [15, 16]. Это изменяет прочность их ассоциативных связей с плазматической мембраной. Было выявлено [13], что процесс фосфорилирования мембранных белков осуществляется с помощью мембранно-связанной цАМФ независимой протеинкиназы, переносящей остаток фосфорной кислоты, находящейся в γ положении молекулы АТФ, на сериновые и треониновые остатки β -субъединицы спектрина. Активность данного фермента может модулироваться Ca^{2+} .

С другой стороны, Ca^{2+} в ионизированном состоянии влияет на структурное и агрегатное состояние белков цитоскелета [6]. Известно, что гипертонические растворы сахарозы вызывают повышение концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ в эритроцитах, наряду с активацией других ионотранспортирующих систем [10]. Гипертонический раствор ПЭО-1500, который вызывает частичную дегидратацию клеток [7] подобно сахарозе, может вызывать изменение концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$, а температура, по-видимому, оказывает влияние на эти изменения. Поскольку структурно-функциональное состояние клетки во многом зависит от концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$, то обнаруженные нами различия в устойчивости эритроцитов к факторам низкотемпературного консервирования в зависимости от температуры экспонирования в растворах ПЭО-1500, могут быть связаны с многофакторным воздействием температуры и осмотически активным веществом на Ca^{2+} -регулирующие системы и белки цитоскелета.

В связи с вышеизложенным целью данной работы явилось исследование процессов фосфорилирования мембранных белков и концентрации $\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$ в эритроцитах после экспонирования клеток в растворе ПЭО-1500 при различных температурах и после замораживания-отогрева.

В опытах использовали эритроциты донорской крови, заготовленные на среде "Глюгидир". Для удаления плазмы и лейкоцитов кровь центрифугировали 10 мин при 3000 g. Осадок эритроцитов трижды отмывали трех-четырехкратным объемом раствора, содержащего 150 mM NaCl и 10 mM *трис*-HCl, pH 7,4. Эритроциты перед замораживанием обрабатывали 30%-м раствором криопротектора полиэтиленоксида с молекулярной массой 1500, содержащего 150 mM NaCl и 10 mM *трис*-HCl, pH 7,4. Раствор ПЭО-1500 вводили в клеточную суспензию либо путем добавления равного объема криопротектора при комнатной температуре сразу, либо путем добавления через каждые 4 мин по каплям при перемешивании равными порциями в течение 40 мин при 0–2°C. При этом соотношение объемов эритроцитарной массы и раствора криопротектора при любом из способов обработки составляло 1:1. Замораживание производили в жидком азоте путем быстрого погружения. Отогревание осуществляли на водяной бане с постоянным покачиванием при температуре 42°C. Белые тени получали с помощью гипотонического шока по методу [14] из эритроцитов на разных этапах их криоконсервирования. Фосфорилирование мембранных белков осуществляли в среде следующего состава: 20 mM натрий фосфатный буфер, pH 7,4; 2 mM MgCl_2 ; γ - ^{32}P -АТФ 10 мкКи (удельная активность 1 мкКи/мл, концентрация белка 2 мг/мл). Реакцию проводили в 0,1 мл среды, инкубируя белые тени в течение 10 мин при 37°C, для остановки реакции добавляли 0,1 мл буфера следующего состава: *трис*-HCl 0,0625 M, pH 6,8, $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ 3 mM, 10% глицерин, 2% SDS, 0,01% бромфеноловый синий. Белковые фракции в образцах разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу [14]. Для количественной оценки радиоактивности белковых фракций кусочки геля с радиоактивно меченными белками растворяли в 30%-й перекиси водорода и просчитывали на сцинтилляционном счетчике LS-7800 "Beckman".

Определение концентрации Ca^{2+} в клетках при температурно-осмотическом воздействии проводили по методу [11]. 120 мкл эритроцитов инкубировали в течение 90 мин при 37°C в среде А следующего состава: 130 mM NaCl, 30 mM HEPES-*трис*-буфер (pH 7,4; 37°C), 3 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM глюкоза, 1 mM K_2HPO_4 и 100 мкМ Quin-2/AM. Затем суспензию клеток переносили на лед, где хранили в течение 12 ч. После центрифугирования клетки промывали 1 мл среды А, добавляли 1 мл той же среды и инкубировали 30 мин при 37°C, осаждали клетки и добавляли 480 мкл среды А, содержащей 4 мкКи/мл $^{45}\text{CaCl}_2$. Часть проб содержало 0,5 mM Na_2VO_4 , который используется как ингибитор АТФаз E_1 – E_2 -типа [8]. После этого эритроциты инкубировали 2 ч при 37°C, а затем часть проб переносили на лед, другую оставляли

при комнатной температуре. Раствор 30 %-го ПЭО-1500, 0,8 М сахарозы и 0,9 М NaCl добавляли в объемах, равных объемам клеточной суспензии, в результате чего их концентрация снижалась вдвое. Эритроциты инкубировали 30 мин при 0 и 22°C, после чего к ним при 0°C добавляли 1 мл среды, содержащей 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 10 мМ *трис*-HCl (pH 7,4), центрифугировали, надосадок удаляли и эритроциты еще раз промывали в тех же условиях. Затем к осадку добавляли 0,5 мл 0,5 %-го раствора тритона X-100 и 0,5 мл 10 %-го ТХУ. После центрифугирования радиоактивность надосадка определяли в растворе СЖ-8 на сцинтилляционном счетчике. Расчет концентрации Ca^{2+} производили как описано в работе [11].

Как видно из рис. 1, постепенное добавление криопротектора ПЭО-1500 при 0°C сопровождается увеличением включения ^{32}P в спектрин в 2,5 раза, причем повышенный уровень фосфорилирования спектрина сохраняется и после замораживания-отогрева эритроцитов, экспонированных в указанных выше температурных условиях. Инкубация эритроцитов с ПЭО-1500 при 22°C и последующее замораживание-оттаивание не вызывало подобного эффекта, т.е. уровень фосфорилирования спектрина достоверно не отличался от контроля. Можно предполагать, что увеличение степени фосфорилирования спектрина после инкубации эритроцитов с ПЭО-1500 при 0°C связано с его структурной перестройкой либо изменением активности цАМФ-независимой протеинкиназы, поскольку известно [17], что при 0°C энергетически более выгодной становится олигомерная форма спектрина. Если учесть дегидратирующий эффект ПЭО-1500, который вызывает концентрирование цитоскелетных белков в примембранной области, то вероятность формирования олигомерных форм спектрина при этом еще больше возрастает. Согласно данным [15], уровень фосфорилирования гексамерных и больших олигомерных форм спектрина более чем в 2 раза превышает уровень фосфорилирования его димеров и тетрамеров. Очевидно, подобного рода перестройки могут быть одной из причин повышения уровня фосфорилирования спектрина в процессе инкубации эритроцитов с криопротектором при 0°C. Повышение силы ассоциативных связей в спектрин-спектринном и спектрин-мембранном взаимодействии, происходящее в данных условиях, может приводить к повышению стабильности клеток к действию повреждающих факторов замораживания-отогрева.

Изменение активности мембранно-связанной цАМФ-независимой протеинкиназы, осуществляющей фосфорилирование спектрина в телях эритроцитов, может модулироваться Ca^{2+} , кальмодулином, диацилглицерином. Не исключается [9], что при осмотической деформации клеток может происходить активация полифосфоинозитидного цикла, которая сопровождается образованием активных фосфорилированных продуктов, в том числе и 1,2-диацилглицерина, который локализуется в мембране и активирует протеинкиназу С. Под воздействием специфической киназы 1,2-диацилглицерин превращается в фосфатидную кислоту, которая обладает Ca^{2+} -ионоформными свойствами, т.е. способна индуцировать поступление экзогенного Ca^{2+} в клетку, который влияет на состояние белков цитоскелета [6].

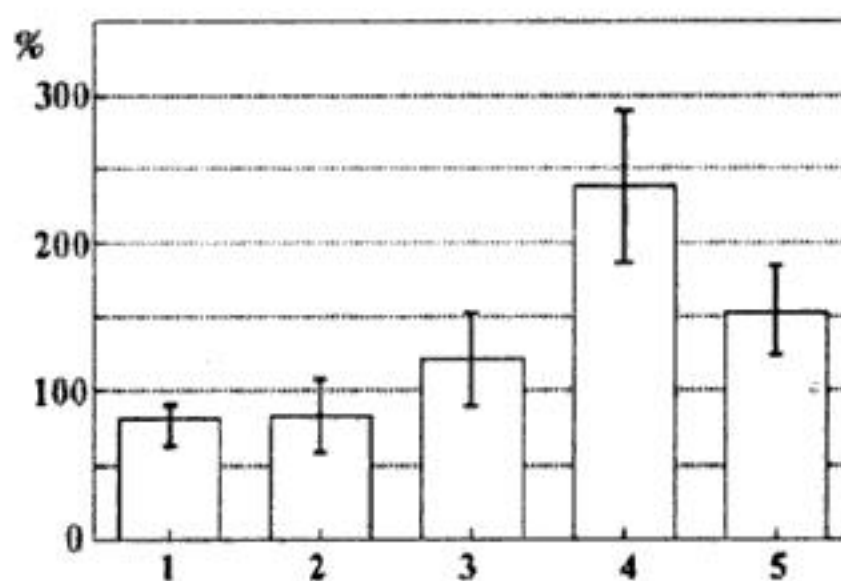


Рис. 1. Изменение фосфорилирования спектрина эритроцитов после инкубации с криопротектором ПЭО-1500 при различных температурах и замораживании-отогреве: 1 – замораживание без криопротектора, 2 – инкубация эритроцитов с ПЭО-1500 при 22°C и последующее замораживание (3), 4 – инкубация при 0°C и последующее замораживание-отогрев (5). За 100% принят уровень фосфорилирования спектрина в нативных эритроцитах

Из рис. 2 следует, что концентрация Ca^{2+} в эритроцитах после инкубации их в 15%-м растворе ПЭО-1500, 0,4 М растворе сахарозы и 0,45 М NaCl возрастает по сравнению с контролем. При этом увеличение концентрации Ca^{2+} наблюдается как при инкубации клеток при 22°C, так и при 0°C, т.е. различные по своей природе осмотически активные соединения вызывают сходный эффект.

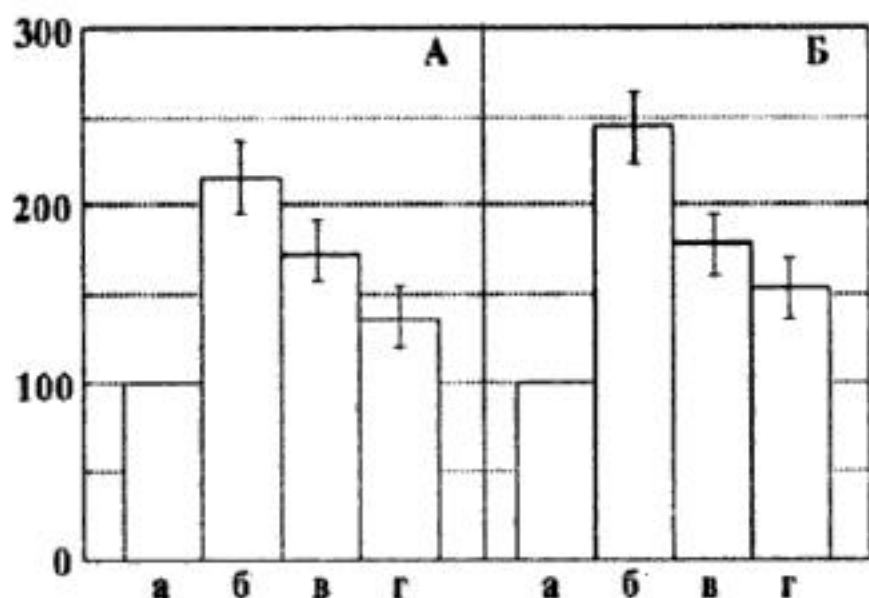


Рис. 2. Изменение уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ в эритроцитах после инкубации в гипертонических средах при 0 (А) и 22°C (Б): а – контроль, б – 15%-й раствор ПЭО-1500, в – 0,4 М раствор сахарозы, г – 0,45 М раствор NaCl

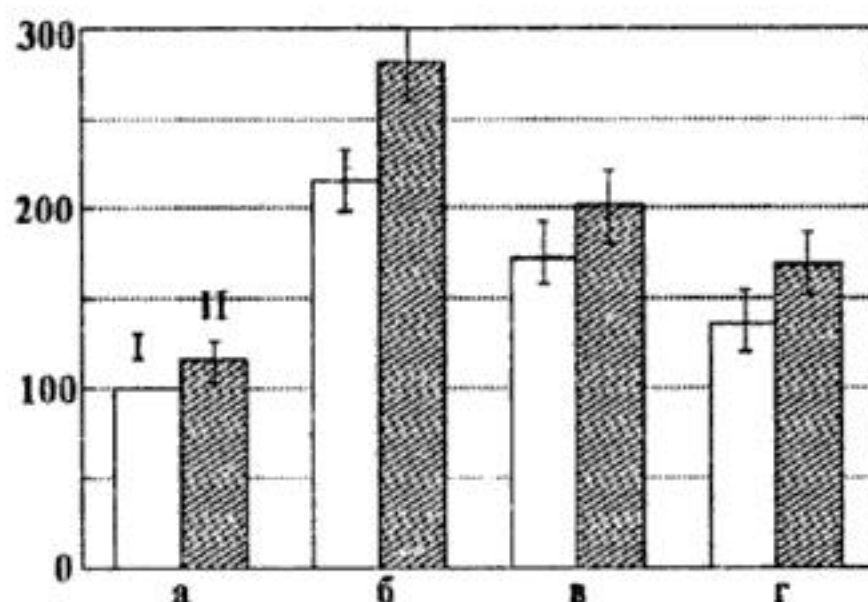


Рис. 3. Влияние температуры на изменение уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ в гипертонических растворах (I – инкубация при 22°C, II – инкубация при 0°C): а – нативные эритроциты, б – 15%-й ПЭО-1500, в – 0,4 М сахараза, г – 0,45 М NaCl

Вместе с тем выявлено, что при инкубации клеток вблизи 0°C все исследуемые осмотически активные вещества вызывают более высокий рост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ по сравнению с инкубацией при 22°C (рис. 3). Влияние температуры на уровень $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ обнаруживается не только в условиях гипертонического воздействия, но и в контроле. Как видно из рис. 3, при 0°C и в изотонических условиях накопление Ca^{2+} в клетках выше, чем при 22°C. При этом действие на клетки осмотически активных веществ сопровождается не только накоплением Ca^{2+} , но и изменением их объема и формы. Это позволяет предположить, что важным фактором, влияющим на повышение концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ является степень сжатия клеток [10].

Поскольку в эритроцитах человека нет резерва Ca^{2+} и плазматическая мембрана не содержит Na/ Ca^{2+} -обменника, уровень Ca^{2+} в клетке определяется балансом скорости его поступления и выхода из клетки [8]. Единственным механизмом, обеспечивающим выход Ca^{2+} против его электрохимического градиента, является Ca^{2+} -АТФаза [8]. Ранее было показано [10], что при сжатии эритроцитов человека происходит увеличение скорости выхода $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Возможно, именно это является причиной обнаруженного нами увеличения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . При этом не исключено, что в условиях гипертонического сжатия клетки происходит подавление функции Са-насоса, хотя прямых доказательств влияния осмотического сжатия на работу Са-АТФазы плазматической мембраны не обнаружено. Исследования на везикулах СР показали [5], что глицерин и ПЭО-400 в 10%-й концентрации оказывают ингибирующий эффект на активность Са-насоса в мембранах саркоплазматического ретикулума (СПР). Поэтому нельзя исключить и возможный вклад ингибирования Са-АТФазы в повышение уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ в эритроцитах при действии осмотически активных веществ. Известно [12], что температура является одним из важных факторов регуляции активности АТФазных систем, в том числе и Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны. Торможение функции Ca^{2+} -АТФазы при 0°C является, по-видимому, основной причиной повышения концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ при эквilibрации клеток в гипертонических растворах при 0°C, по сравнению с эквilibрацией при 22°C.

Согласно [6], повышение содержания $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ достаточно интенсивно влияет на структурное и функциональное состояние белков цитоскелета, ко-

эластических параметров мембраны и клетки в целом при температурно-осмотическом воздействии и замораживании. Поэтому при подборе соответствующих параметров эквilibрации клеток в растворах криоконсервантов и их замораживании-отогреве, во-первых, необходимо учитывать роль белков цитоскелета в поддержании низкотемпературной стабильности клеток и, во-вторых, предусмотреть селективную защиту систем регуляции структурно-функционального состояния указанных выше белков от повреждающего действия "эффектов растворов".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабийчук Л.А. Влияние охлаждения на структуру и осмотические свойства эритроцитов человека : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1985. – 22 с.
2. Бабийчук Л.А. "Холодовая адаптация" эритроцитов к действию низких температур // Биохимические аспекты холодовых адаптаций. – Харьков, 1991. – С. 21–25.
3. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бабийчук Л.А. Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология. – 1985. – № 2. – С. 25–32.
4. Белоус А.М., Гулевский А.К., Бабийчук Л.А. и др. Роль белков цитоскелета в изменении стабильности клеток при температурно-осмотическом воздействии // Криобиология. – 1990. – № 4. – С. 3–13.
5. Жегунов Г.Ф. Влияние замораживания-отогрева и криопротекторов на структурно-функциональное состояние Ca^{2+} -транспортирующей системы мембран саркоплазматического ретикулума : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1979. – 24 с.
6. Конев С.В. Структурная лабильность мембран и регуляторные процессы. – Минск: Наука и техника. – 1987. – 240 с.
7. Межидов С.Х. Влияние температуры на дегидратацию эритроцитов и проницаемость их мембран для криопротекторов : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1987. – 16 с.
8. Орлов С.Н. Кальмодулин. Общие проблемы физико-химической биологии. – М.: ВИНТИ, 1987. – Т. 8. – 182 с.
9. Орлов С.Н., Покудин Н.И., Котелевцев Ю.В. и др. О механизме индукции ионного транспорта при сжатии эритроцитов // Внутриклеточная сигнализация. – М.: Наука, 1988. – С. 118–127.
10. Орлов С.Н., Покудин Н.И., Ряжский Г.Г. и др. О механизме регуляции транспорта ионов через плазматическую мембрану // Биологические мембраны. – 1988. – № 10. – С. 1030–1041.
11. Покудин Н.И., Петруняк В.В., Орлов С.Н. Участвует ли кальмодулин в регуляции активности Са-насоса в эритроцитах *in vitro* // Биохимия. – 1988. – 53, № 5. – С. 753–758.
12. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988. – 568 с.
13. Fairbanks G., Avruch G., Dino J. Phosphorylation and dephosphorylation of spectrin // J. Supramol. Struct. – 1978. – 9. – P. 97–112.
14. Fairbanks G., Stek T.L., Wallach D.F.H. Electroforetic analysis of the major polipeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry – 1971. – 10. – P. 2606–2617.
15. Micshe S.M., Haigh W.B., Morrow J.S. Spectrin phosphorylation regulates spectrin self-association // Fed. Proc. – 1985. – 44. – P. 1934.
16. Micshe S.M., Morrow J.S. Post-translation regulation of the erythrocyte certial cytoskeleton // Protoplasma. – 145, № 2–3. – P. 167–175.
17. Morrow J.S., Marchesi V.T. Self-assamby of spectrin oligomers *in vitro*: a basis for a dynamic cytoskeleton // J. Cell. Biol. – 1981. – 88. – P. 463–468.

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

Поступила 08.02.95

Л.О.БАБІЙЧУК, Н.Г.ЗЕМЛЯНСЬКИХ, А.М.БІЛОУС

ВПЛИВ ПОЛІЕТИЛЕНОКСИДА І САХАРОЗИ НА ЗМІСТ Ca^{2+} І ФОСФОРИЛЮВАННЯ БІЛКІВ СПЕКТРИН-АКТИНОВОГО КОМПЛЕКСУ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ОХОЛОДЖЕННІ І ЗАМОРОЖУВАННІ-ВІДІГРІВІ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Досліджено зміни концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ і процеси фосфорилювання мембранних білків еритроцитів після експонування клітин у розчині ПЕО–1500 при різних температурах і після заморожування-відігріву. Показано, що експонування еритроцитів при 0°C і криопротектром ПЕО–1500 супроводжується збільшенням у 2,5 раза включення ^{32}P у спектрин, причому підвищений рівень фосфорилювання спектрина зберігається і після заморожування-відігріву. Експонування клітин при 22°C і наступне заморожування-відігрів не викликає подібного ефекту. При дослідженні впливу температури і осмотично активних речовин на зміну концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$

виявлено, що інкубація клітин при 0°C порівняно з інкубацією при кімнатній температурі викликає більш високий ріст Ca^{2+} як в ізотоничних умовах, так і при дії на клітини осмотично активних речовин. Одержані дані свідчать про те, що у процесі холодової адаптації еритроцитів при 0°C включаються структурні зміни білків цитоскелета, котрі залежать від ступеня їх фосфорилювання і концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$.

L.A.BABIYCHUK, N.G.ZEMLYANSKIKH, A.M.BELOUS

EFFECT OF POLYETHYLENE OXIDE AND SUCROSE ON THE CONTENT OF Ca^{2+} AND PHOSPHORYLATION OF PROTEINS OF SPECTRIN-ACTIN COMPLEX OF RED BLOOD CELLS DURING COOLING AND FREEZE-THAWING

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

There were studied the alterations in the concentration of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ and the processes of phosphorylation of the red blood cell (RBC) membrane proteins following cell exposure in a PEO-1500 solution at various temperatures and after freeze-thawing. RBC exposure at 0°C in the presence of a PEO-1500 cryoprotectant was shown to be accompanied by a 2.5-fold rise in ^{32}P incorporation into spectrin, and the increased level of phosphorylation of spectrin was also maintained after freeze-thawing. Cell exposure at 22°C and subsequent freeze-thawing did not produce a similar effect. When studying the effect of temperature and osmotically active substances on the alteration in the concentration of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ the authors found that cell incubation at 0°C, as compared with the incubation at room temperature, resulted in a higher growth of Ca^{2+} both under isotonic conditions and under the action of the osmotically active substances upon cells. The data obtained testify to the fact that the process of cold adaptation of RBC at 0°C involved structural alterations in the cytoskeletal proteins, which depended on the extent of their phosphorylation and concentration of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$.

УДК 57.017.3

Г.Ф.Жегунов, И.Г.Карманова

ЭВОЛЮЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ ГИПОБИОЗА И ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

Проведено сравнение реакции белок-синтезирующего аппарата клеток пойкилотермных и гетеротермных зимнеспящих животных при изменении температуры тела. Показано, что интенсивность синтеза белков в клетках лягушек, адаптированных к 5 °С, поддерживается на высоком уровне, лишь в 1,5–2 раза ниже, чем у приспособленных к 20 °С. При этом установлено, что у лягушек, находящихся в различных температурных условиях, имеются сдвиги в электрофоретических фракциях меченых белков. Во время зимней спячки сусликов синтез белка также не прекращается, хотя его интенсивность снижается на два порядка. При пробуждении наблюдается гиперактивация синтеза протеинов, а также осуществляется индукция синтеза определенного количества протеинов, характерных для этого состояния. Эти факты могут свидетельствовать о наличии генных механизмов регуляции метаболизма при изменении физиологического статуса гетеротермных животных.

Хорошо известно, что в процессе эволюции выживают организмы, использующие адекватные физиологические и биохимические механизмы адаптации к меняющимся условиям внешней среды. Известно также, что адаптации могут появляться на разных уровнях: популяционном, организменном, тканевом, клеточном, молекулярном. Этот процесс, если он оказывается полезным для организма, закрепляется и совершенствуется путем естественного отбора. В настоящее время считается, что для эволюции и закрепления полезных для организма признаков большое значение имеет фиксация этой информации в генетическом аппарате клеток. Генетические программы, в свою очередь, реализуются через синтез специфических белков, изменяя таким образом интенсивность и направленность метаболизма клеток и функций органов, что в результате сказывается на приспособляемости индивидуума [1]. Особи, относящиеся к разным типам и видам, имеют различные физиологические и метаболические особенности, поэтому пути приспособления их к одним и

тем же условиям могут быть разными. Поэтому представляло интерес сравнить реакцию белок-синтезирующего аппарата клеток пойкилотермных и гомойотермных зимнеящих животных при их приспособлении к холоду.

Опыты проводились в зимний период года на остромордых лягушках (*Rana terrestris*) следующих групп: а) акклиматизированные – 1-я группа (“холодные”) – обитавшие в аквариуме в течение 15 дней при 5 °С; 2-я группа (“теплые”) – обитавшие в аквариуме в течение 15 дней при 20 °С; б) акклимирующиеся – 3-я группа – пересаженные из теплой в холодную воду на 15 ч, 4-я группа – пересаженные из холодной в теплую воду на 15 ч. В ряде экспериментов использовали лягушек спустя 5 и 10 ч после перемещения животных из одних условий в другие.

До опыта лягушки содержались в двух аквариумах, один из которых находился в холодной комнате при температуре 5 °С, другой – в комнате, в которой температура поддерживалась на уровне 20 °С. Лягушки в таких условиях находились 15 дней. Затем аквариум с лягушками переносили из холодной комнаты в комнату, где температура поддерживалась около 20 °С. В этих условиях лягушки находились 15 ч. Аквариум с лягушками, обитавшими при комнатной температуре (20 °С), переносили в холодную комнату, где лягушки также содержались 15 ч (температура органов лягушек перед изменением условий обитания указана на рис. 1.).

С целью изучения интенсивности синтеза общих белков и спектра синтезируемых протеинов животным внутрибрюшинно вводили ^{35}S -метионин из расчета 0,05 мКи на 100 г массы тела. Кусочки тканей животных массой 20 мг гомогенизировали в ручном стеклянном гомогенизаторе в дистиллированной воде, аликвоты брали для проведения электрофореза по методу Лэммли [7]. После проведения электрофореза гель высушивали и накладывали на рентгеновскую пленку РМВ-640 для автордиографического выявления синтезируемых белков [5]. Интенсивность включения метки в белки определяли путем фильтрования через фильтры по методу Кеннела [4]. Печень и сердце амфибий фракционировали в забуференной солевой среде методом дифференциального центрифугирования [2].

Другую серию опытов проводили на длиннохвостых сусликах (*Sitellus undulatus*) в зимний период. Исследовали 3 группы животных: зимнеящие, температура тела которых 2–5 °С, пробуждающиеся — 32–35 °С, активные — 37 °С. Эксперименты проводили на тканях левого желудочка сердца и печени. Скорость синтеза белка исследовали изотопным методом, используя ^{35}S -метионин. Изотоп вводили животным внутрибрюшинно из расчета 0,2 мКи на 100 г массы. Спустя определенное время животных декапитировали, извлекали органы и брали навески до 10 мг. Их гомогенизировали в дистиллированной воде и брали аликвоты для проведения электрофореза. К остатку добавляли 10%-ю трихлоруксусную кислоту (ТХУ) и фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры “Сынпор” по методу Кеннела [4]. Затем сушили и просчитывали осадок в толуоловом сцинтилляторе на счетчике “Бекман-ЛС7800”. Мембранные фракции из тканей сердца и печени выделяли методом дифференциального центрифугирования [5].

При изучении процесса синтеза белка показано, что его интенсивность в сердце акклиматизированных к холоду лягушек примерно в 1,5 раза ниже, чем у

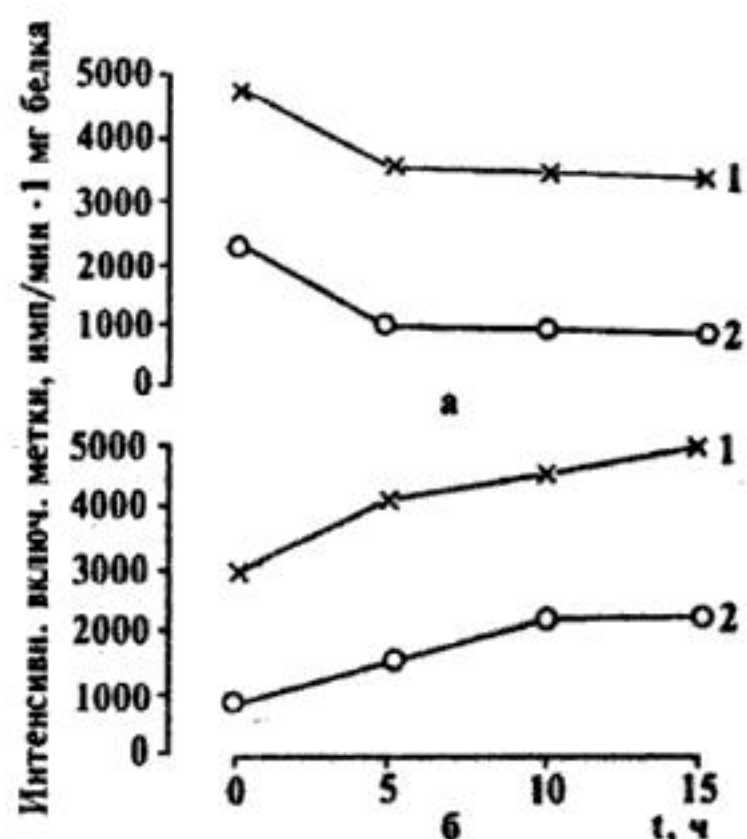


Рис. 1. Интенсивность синтеза общих белков в печени и сердце у акклиматизированных и акклимирующихся лягушек: а – акклиматизация к 5 °С, б – акклиматизация к 20 °С; 1 – печень, 2 – сердце

адаптированных к теплу животных (рис. 1). В печени указанный процесс протекает в 2 раза интенсивней у “теплых животных” по сравнению с “холодными”. При переносе животных из тепла в холод интенсивность синтеза понижается и спустя 5 ч составляет примерно половину величины, характерной для “теплых” лягушек. Интересно, что интенсивность синтеза белков падает быстрее, чем снижается температура органов. Это можно расценивать как наличие физиологических механизмов регуляции синтеза белков у амфибий независимо от прямого действия холода. При переносе животных из холода в тепло (рис. 1) спустя 5 ч наблюдается интенсификация синтеза общих белков, и через 10–15 ч интенсивность изучаемого процесса стабилизируется на уровне, характерном для “теплых” амфибий.

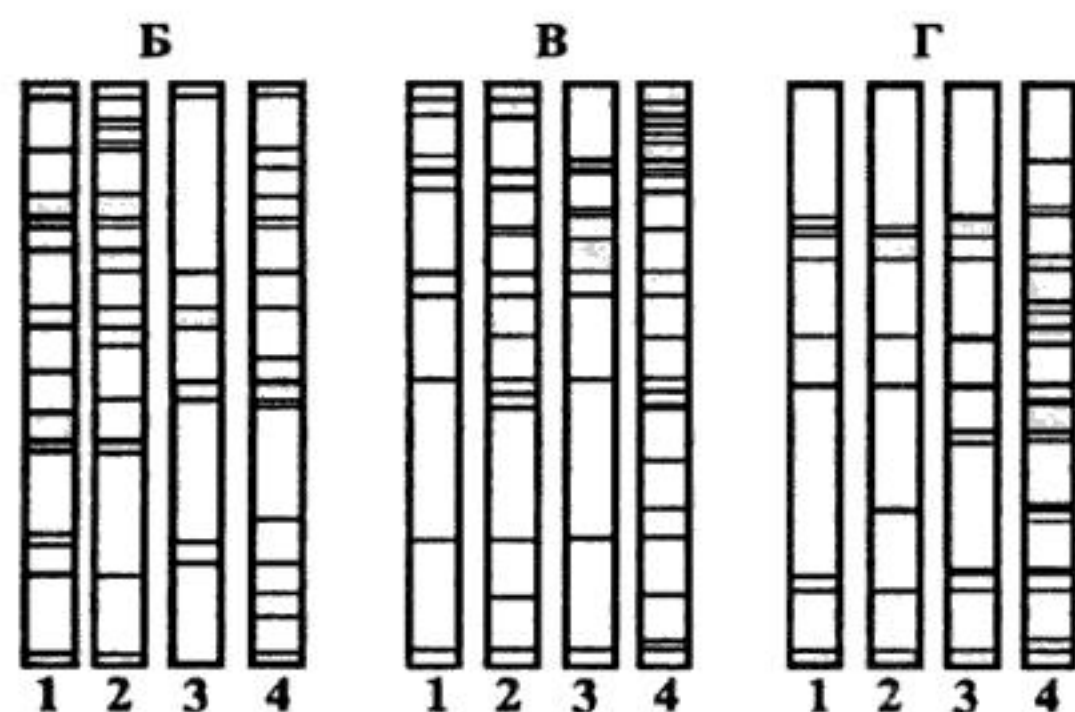


Рис. 2. Схема авторадииограмм полиакриламидных гелей клеточных фракций печени и сердца в различных группах лягушек: Б – растворимые белки печени, В – микросомы печени, Г – микросомы сердца; 1 – препарат 1-й группы (“холодные”) – лягушки, обитавшие в аквариуме в течение 15 сут при 5 °С, 2 – препарат 2-й группы (“теплые”) – лягушки, обитавшие в аквариуме в течение 15 сут при 20 °С, 3 – препараты 3-й группы – лягушки, пересаженные из теплой в холодную воду на 15 ч, 4 – препарат 4-й группы – лягушки, пересаженные из холодной в теплую воду на 15 ч

фракциях и гомогенате органов обнаруживаются вновь синтезированные белки, характерные только для определенных условий акклимации. На рис. 2 видно, что (при пересадке адаптированных к теплу животных в холод) через 15 ч происходит уменьшение количества вновь синтезированных протеинов во фракции микросом печени, и на фоне этого появляются полосы специфических белков. При пересадке адаптированных к холоду лягушек в тепло, количество синтезированных белков не увеличивается по сравнению с исходным состоянием, однако появляются протеины, не характерные для других групп животных. Аналогичную картину мы наблюдаем на примере фракции растворимых белков печени.

В сердце интенсивность обмена белков несколько ниже. Но, как и в случае с печенью, в разных состояниях обнаруживаются специфические протеины, изменяется также и количество некоторых синтезированных белков. Молекулярные массы вновь синтезируемых специфических протеинов тех же клеточных фракций печени и сердца разные в различных температурных условиях. Следовательно, процесс приспособления земноводных к теплу или холоду требует синтеза разных белков, что говорит о разных механизмах адаптации к повышенным или пониженным температурам.

Следует отметить также, что не существует сходства реакции в ответ на изменение температурных условий в тех же препаратах различных органов. В микросомах сердца при акклимации лягушек появляются специфические белки, отличные по своей молекулярной массе от таковых в микросомах печени.

При проведении электрофореза гомогенатов различных органов и их фракций нами ранее показано, что акклимация лягушек при 5 или 20 °С приводит к незначительному изменению в белковом составе клеток печени [2]. Более чувствительный метод авторадиографического выявления вновь синтезированных белков показал, что при различных температурных условиях у холоднокровных животных на фоне основных групп белков синтезируются специфические протеины (рис. 2). При пересадке лягушек из одних температурных условий в другие в субклеточных

Это может свидетельствовать о том, что при адаптации в различных органах функционируют свои “программы” приспособления, характерные для того или иного органа или ткани. Таким образом, представленные выше результаты косвенно свидетельствуют о том, что в процессе акклимации пойкилотермных животных участвует геном клеток, программы которого реализуются через синтез специфических белков, которые могут менять интенсивность и направленность метаболизма.

Интенсивность включения меченых аминокислот в белки сердца и печени после внутрибрюшинного введения ^{35}S -метионина (имп/мин · 10 мг ткани)

Физиологическое состояние сусликов	Сердце		Печень	
	1	2	1	2
Гибернирующий	150±20	42400±4000	390±40	86000±10000
Пробуждающийся	152000±16800	24500±2500	368000±40000	27500±3000
Активный	92700±10700	23500±2400	198000±20300	36000±5700

Примечание. 1 – включение меченых аминокислот в белки, 2 – пул меченых аминокислот в тканях.

В следующей серии опытов изучали интенсивность обмена и электрофоретический спектр синтезируемых белков в тканях сердца и печени у сусликов, находящихся в различных физиологических состояниях. Показано, что процесс синтеза не прекращается во время гибернации (таблица), хотя его интенсивность снижается более чем на 2 порядка по сравнению с активными животными. При пробуждении наблюдается активация биосинтеза в исследованных тканях, причем интенсивность включения меченых аминокислот превышает в 1,5–2,0 раза этот параметр у бодрствующих животных. Поскольку на первых этапах пробуждения температура тела в течение 1–2 ч остается невысокой и интенсивность синтеза мала [3], то можно заключить, что при пробуждении происходит гиперактивация синтеза белков и, по-видимому, скорость синтеза на последних этапах пробуждения в 3–5 раз выше, чем у активных животных. Причем после внутрибрюшинного введения меченые аминокислоты легко проникают в ткани сусликов независимо от их физиологического состояния (таблица). Следовательно, проницаемость аминокислот из внутрибрюшинного пространства в кровь и из крови в ткани не является лимитирующим фактором их включения во вновь синтезируемые белки.

Авторадиография полиакриламидных гелей белков мембранных фракций свидетельствует, что в различных физиологических состояниях зимне-спящих в их органах синтезируется не только разное количество белков, но и спектр синтезируемых белков довольно значительно изменен (рис. 3). Это характерно для клеточных фракций как сердца, так и печени. Например, в автографах митохондрий печени активных животных обнаруживается 16 полос вновь синтезируемых белков, а в аналогичном препарате у гибернирующих животных отмечено всего 5 полос, причем значительно меньшей интенсивности. Следовательно, интенсивность синтеза во время зимней спячки снижается не только за счет полного прекращения синтеза большинства протеинов. Кроме того, при гибернации синтезируются некоторые белки, характерные только для этого состояния.

При пробуждении сусликов в их тканях синтезируется большее количество белков, большинство из которых уже характерно для активных животных. Но и в состоянии пробуждения отмечено появление некоторых белков, не обнаруживаемых в автографах препаратов из активных или гибернирующих млекопитающих. Например, во фракции микросом печени при пробуждении выявляются 6 полос вновь синтезированных белков, характерных только для просыпающихся сусликов. Это значит, что процесс пробуждения грызунов требует присутствия в клетках белков, которые, по-видимому, необхо-

димы для обеспечения переходного периода и процесса адаптации клеток животных к новым температурным условиям. Можно сделать допущение о том, что в различных состояниях у животных синтез ряда белков может регулироваться включением или исключением определенных генетических механизмов. Во время гибернации, видимо, репрессирован ряд генов, обеспечивающих синтез ферментов, необходимых при более высоких температурах тела грызунов, но экспрессированы другие гены, обеспечивающие клетки специфическими белками во время гибернации.

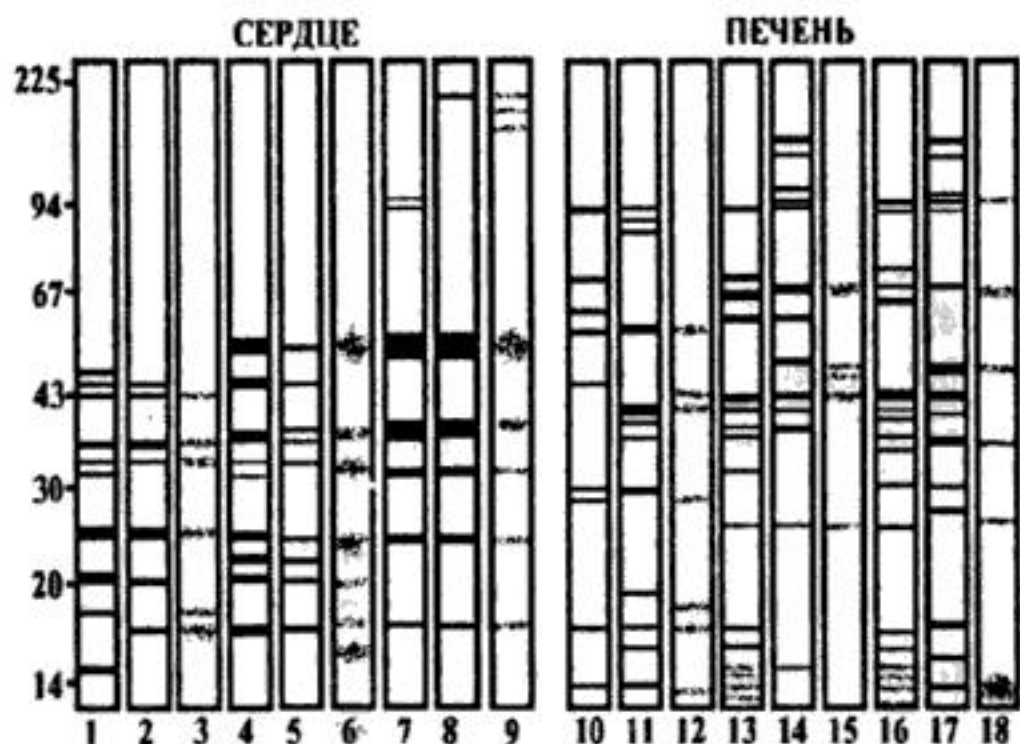


Рис. 3. Схема автордиограмм полиакриламидных гелей клеточных фракций сердца и печени сусликов: 1 – сарколемма сердца активного суслика, 2 – сарколемма сердца пробуждающегося суслика, 3 – сарколемма сердца гибернирующего суслика, 4 – саркоплазматический ретикулум активного суслика, 5 – саркоплазматический ретикулум пробуждающегося суслика, 6 – саркоплазматический ретикулум гибернирующего суслика, 7 – митохондрии активного суслика, 8 – митохондрии пробуждающегося суслика, 9 – митохондрии гибернирующего суслика, 10 – микросомы печени активного суслика, 11 – микросомы печени просыпающегося суслика, 12 – микросомы печени гибернирующего суслика, 13 – митохондрии печени активного суслика, 14 – митохондрии печени пробуждающегося суслика, 15 – митохондрии печени гибернирующего суслика, 16 – растворимые белки печени активного суслика, 17 – растворимые белки печени пробуждающегося суслика, 18 – растворимые белки печени гибернирующего суслика

[6]. Известно также, что белки играют ключевую роль, а их необходимая концентрация в клетке быстро регулируется путем изменения скорости их синтеза и распада [1]. Поэтому обнаруженные нами при адаптации процессы периодического обновления белкового состава у пойкилотермов и гетеротермов можно, на наш взгляд, рассматривать как генетически закрепленный приспособительный полифункциональный ответ клеток на необходимость изменения функциональной активности органов.

Очевидно, что как пойкилотермные, так и гетеротермные животные, приспособляясь к разным температурам, используют генетические механизмы, выработанные в процессе длительной эволюции. Однако эти механизмы специфичны для различных животных, органов и тканей, а также зависят от условий приспособления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. Рэфф М. и др. Молекулярная биология клетки. – М.: Мир, 1986, Т.3. – 230 с.
2. Жегунов Г.Ф., Котляров А.О. Белковый синтез в клетках пойкилотермных животных при акклимации к различным температурам // Криобиология. – 1991, № 3, – С. 26–31.

При сравнении спектра вновь синтезированных белков в различных клеточных фракциях сердца или печени видно, что нет белков одинаковой молекулярной массы у животных, находящихся в разных физиологических состояниях. Это говорит о том, что при адаптации к тем или иным температурным условиям функционируют, по-видимому, разные механизмы. То же самое касается и различных органов: не существует сходства реакции в синтезе белков в ответ на изменение температуры. В клеточных фракциях сердца появляются специфические белки, по своей молекулярной массе отличающиеся от таковых в тех же фракциях печени (рис. 3).

Из классических работ по биохимии известно, что интенсивность и направленность метаболизма определяется степенью активности, качественным составом и количеством ферментов в клетке

3. Жегунов Г.Ф. Активация синтеза белка в тканях сусликов на начальном этапе пробуждения от спячки // Криобиология. – 1988, № 1. – С. 45–46.
4. Кеннел Д. Использование фильтров для разделения радиоактивных ДНК, РНК и белка // Методы исследования нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1970. – С. 138–144.
5. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1981. – 286 с.
6. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. – М.: Мир, 1977. – 398 с.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature (London). – 1970. – 227. – P. 680–685.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН Украины, г. Харьков,
Ин-т эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М.Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург

Поступила 17.06.93

Г.Ф.ЖЕГУНОВ, І.Г.КАРМАНОВА

ЕВОЛЮЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВИВЧЕННЯ ГІПОБІОЗУ І ЗИМОВОЇ СПЛЯЧКИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м.Харків,
Інститут еволюційної фізіології і біохімії ім. І.М.Сеченова РАН, м. Санкт-Петербург

Проведено порівняння реакції білок-синтезуючого апарату клітин пойкилотермних і гетеротермних зимосплячих тварин при зміні температури тіла. Показано, що інтенсивність синтезу білків у клітинах жаб, адаптованих до 5 °С, підтримуються на високому рівні, лише в 1,5–2 рази нижче, ніж у пристосованих до 20 °С. При цьому встановлено, що у жаб, які знаходяться в різних температурних умовах, є зрушення в електрофоретичних фракціях мічених білків. Під час зимової сплячки ховрахів синтез білка також не припиняється, хоча його інтенсивність знижується на два порядки. Під час прокидання спостерігається гіперактивація синтезу протеїнів, а також здійснюється індукція синтезу певної кількості протеїнів, характерних для цього стану. Ці факти можуть свідчити про наявність генних механізмів регуляції метаболізму при зміні фізіологічного статусу гетеротермних тварин.

G.F.ZHEGUNOV, I.G.KARMANOVA

EVOLUTIONARY-GENETIC ASPECTS OF STUDYING HYPOBIOSIS AND HIBERNATION

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov
I.M.Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg

There was conducted a comparative investigation of the response of a protein-synthesizing apparatus of cells of poikilothermic and heterothermic hibernating animals after changing their body temperatures. The intensity of protein synthesis in the cells of frogs, adapted to 5°C, was shown to be maintained at a high level, which was only by 1.5-2-fold lower as compared with those adapted to 20°C. It was found that in the frogs, staying under different temperature conditions, there occurred shifts in electrophoretic fractions of labeled proteins. During hibernation of ground squirrels protein synthesis was not terminated, though its intensity was reduced by 2 orders. Upon arousal there was observed hyperactivation of protein synthesis, and there occurred an induction of synthesis of a certain amount of proteins which were characteristic of that state. These may be indicative of the availability of gene mechanisms of regulation of metabolism after alterations in physiological status of heterothermic animals.

УДК 576.311.32

С.Х. МЕЖИДОВ

АНОМАЛЬНОЕ УМЕНЬШЕНИЕ МИКРОВЯЗКОСТИ ЦИТОЗОЛЯ ЭРИТРОЦИТОВ В РАСТВОРАХ 1,2-ПРОПАНОДИОЛА

Методом ЭПР-спиновго зонда установлено аномальное уменьшение микровязкости цитозоля эритроцитов при увеличении концентрации натрия хлорида (НХ) в присутствии 1,2-пропандиола (1,2-ПД).

Знание процессов, происходящих в цитозоле клеток при криоконсервировании биологических объектов, имеет важное значение как для решения прикладных задач по консервированию биологических объектов, так и для теоретической биологии. Однако эти процессы до сих пор изучены недостаточно. Так, до сих пор не изучено влияние на микровязкость цитозоля клеток сочетания проникающего в клетку криопротектора с непроникающими в них веществами, хотя существующие биофизические методы позволяют неинвазивным способом исследовать ее. В связи с этим нами изучена микровязкость цитозоля эритроцитов в зависимости от концентрации НХ при различных концентрациях 1,2-ПД.

Все использованные препараты: 1,2-ПД, ферроцианид калия (ФК), НХ были марки ЧДА или ХЧ. Парамагнитный спиновый зонд 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил (ТЕМПОН) был синтезирован по известной методике [3] и идентифицирован методами ^1H -ЯМР, ЭПР и ИК-спектроскопии.

Эксперименты проведены на эритроцитах донорской крови человека 3-5 сут хранения при 4 °С. Перед экспериментом эритроциты отмывали физиологическим раствором НХ, приготовленным на натрийфосфатном буфере, рН 7,2. Затем к эритромассе добавляли раствор, содержащий 1,2-ПД соответствующей концентрации, физиологическую концентрацию НХ и натрий-фосфатный буфер (5 ммоль/л), рН 7,2. Через 30 мин центрифугированием при 3000 об/мин осаждали эритроциты и отбирали надосадок. В надосадке определяли содержание 1,2-ПД методом ^1H -ЯМР с точностью $\pm 1\%$. После этого добавляли к эритромассе растворы 1:25, содержащие 1,2-ПД с концентрацией равной его концентрации в надосадке, НХ соответствующей концентрации и натрий-фосфатный буфер 5 ммоль/л, рН 7,2. Через 5 мин эритроциты центрифугировали вновь при 2000-3000 об/мин в зависимости от концентрации НХ и удаляли надосадок. Затем добавляли к эритромассе 1:1 раствор, содержащий 1,2-ПД с концентрацией равной его концентрации в надосадке, НХ с концентрацией равной его концентрации в растворе добавленного перед этим раствором (с учетом концентрации ФК), ФК – 0,10 моль/л, ТЕМПОН – $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и натрий-фосфатный буфер с рН 7,2. Суспензию эритроцитов в кварцевом капилляре диаметром 0,5 мм помещали в резонатор спектрометра ЭПР и записывали первую производную спектра поглощения (ППСП) ЭПР. Температура при которой проводили эксперимент, исходная температура эритроцитов и растворов до и после смешения была (20 ± 1) °С. Более подробно методика исследования микровязкости цитозоля эритроцитов описана ранее [2].

Используя параметры спектра ЭПР, рассчитывали время корреляции вращательной диффузии спинового зонда ТЕМПОН ($\tau_{c(-1)}$ – далее τ) по формуле [1]:

$$\tau_{c(-1)} = \frac{((h_0/h(-1))^{1/2} - 1)}{3,6 \cdot 10^9} \cdot \delta H_0, \text{ с},$$

где h_0 – интенсивность центральной компоненты ППСП, отн. ед.; $h(-1)$ – интенсивность высокопольной компоненты ППСП, отн. ед.; δH_0 – полуширина центральной компоненты, Гс.

Микровязкость (η) прямо пропорциональна [1]

$$\tau = \eta 4\pi\alpha^3 / 3kT,$$

где T – температура, К; k – постоянная Больцмана; α – гидродинамический радиус спинового зонда.

На рис. 1 представлены зависимости τ от концентрации НХ при различных концентрациях 1,2-ПД. Из рисунка видно, что τ возрастает с увеличением концентрации НХ, указывая на увеличение микровязкости до концентрации НХ 0,4 и 0,8 моль/л. При дальнейшем увеличении концентрации НХ τ уменьшается, указывая на уменьшение микровязкости. Однако увеличение концентрации НХ приводит к дегидратации эритроцитов и увеличению кон-

центрации внутриклеточного гемоглобина, что должно привести к увеличению микровязкости и соответственно τ . Мы же наблюдаем, что микровязкость наоборот аномально уменьшается. Из рис. 1 также видно, что при концентрациях НХ 0,8 моль/л и выше τ тем меньше, чем выше концентрация криопротектора (различия между τ при 35 и 25% недостоверные). Это указывает на то, что микровязкость цитозоля эритроцитов тем ниже, чем выше концентрация криопротектора, т.е. тем выше, по-видимому, гидратация эритроцитов. Микровязкость остается на достаточно низком уровне для концентраций 1,2-ПД 35-15% в диапазоне концентраций НХ 0,8-2,0 моль/л. В растворах 35% 1,2-ПД τ , при дальнейшем увеличении концентрации НХ, повторно не увеличивается и происходит гемолиз эритроцитов, в то время как при остальных его концентрациях происходит увеличение τ , что указывает на отсутствие увеличения микровязкости цитозоля эритроцитов при концентрации 1,2-ПД 35%, тогда как при более низких его концентрациях (5, 15, 25%) она увеличивается.

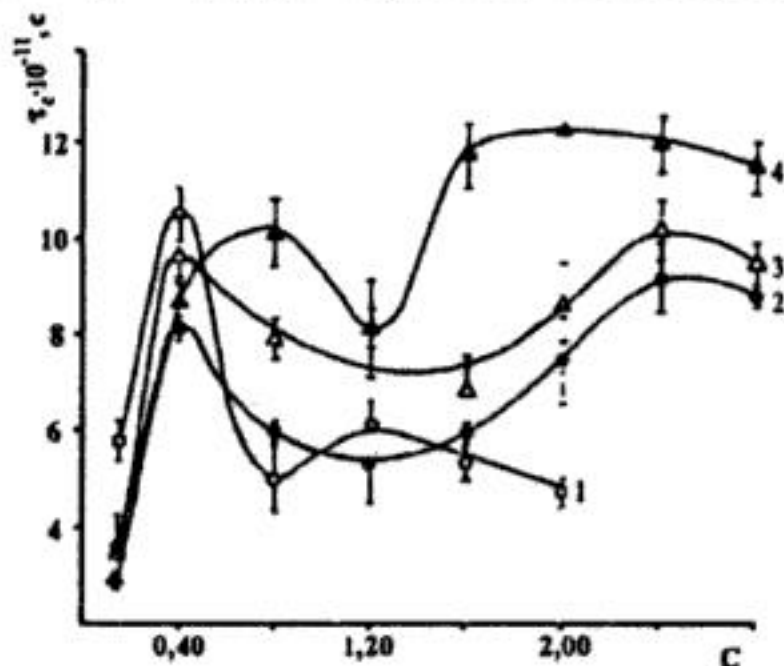


Рис. 1. Зависимость τ от концентрации НХ при различных концентрациях 1,2-ПД: 1 – 35%, 2 – 25%, 3 – 15%, 4 – 5%

Обнаруженное аномальное уменьшение τ в цитозоле эритроцитов может быть связано: 1) с отсутствием уширения спектра от внеклеточного спинного зонда ТЕМПОН; 2) с проникновением ФК в эритроциты; 3) с вытеснением спинного зонда ТЕМПОН в области с менее вязкой микрофазой в силу расслоения внутриклеточного содержимого или образования геля.

Исследование надосадка показало, что спектр спинного зонда в надосаде уширен полностью. Для решения вопроса о возможности проникновения ФК в цитозоль эритроцитов изучена полуширина центральной компоненты ППС (δH_0) ЭПР спинного зонда. Данные такого исследования представлены на рис. 2, из которого видно, что δH_0 сначала увеличивается, как и τ , а затем уменьшается (для 1,2-ПД 35%-е уменьшение недостоверное). Это указывает на то, что на-

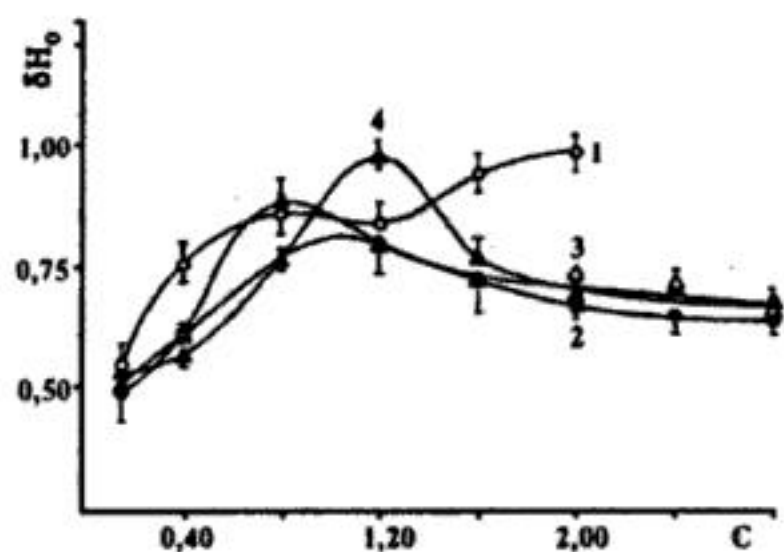


Рис. 2. Зависимость δH_0 от концентрации НХ при различных концентрациях 1,2-ПД: 1 – 35%, 2 – 25%, 3 – 15%, 4 – 5%

блюдаемое явление не связано с проникновением ФК, так как при проникновении ФК δH_0 должно возрастать в силу спин-спинового взаимодействия ФК со спинным зондом. При концентрации 1,2-ПД 35% увеличение δH_0 , по-видимому, связано с частичным проникновением ФК, на что указывает гемолиз эритроцитов при концентрациях НХ 1,2 моль/л и выше. Обращает на себя внимание то, что максимум δH_0 наблюдается для концентраций 1,2-ПД 35,25% при концентрации НХ 0,8 моль/л, и при дальнейшем снижении концентрации 1,2-ПД происходит смещение его максимума в сторону более высоких концентраций НХ. Для τ максимум смещен, по сравнению с δH_0 , в сторону более низких концентраций НХ 0,4 моль/л, за исключением случая, когда концентрация 1,2-ПД равна 5%. Такое расхождение между τ и δH_0 является неожиданным, так как между ними зависимость прямо пропорциональная.

Таким образом, есть основания полагать, что в цитозоле эритроцитов при увеличении концентрации НХ в присутствии 1,2-ПД происходит, по-видимому, образование геля или расслоение системы с вытеснением спинного зонда

ТЕМПОН в области менее вязкой микрофазы. Аналогичные изменения τ и δP_0 в цитозоле эритроцитов нами обнаружены, когда эритроциты находятся в растворах НХ и в растворе полиэтиленгликоля-1500 при кристаллизации воды (статья готовится к печати).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лихтенштейн Г.И. Метод спинового зонда в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 255 с.
2. Межидов С.Х., Моисеев В.А., Нардид О.А. Влияние повышенных концентраций хлорида натрия и температуры на состояние цитозоля эритроцитов // Биофизика. – 1987. – № 3. – С. 528–530.
3. Розанцев Э.Г. Иминоксильные радикалы. – М.: Химия, 1970. – 216 с.

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

Поступила 04.08.94

С.Х.МЕЖИДОВ

АНОМАЛЬНЕ ЗМЕНШЕННЯ МІКРОВ'ЯЗКОСТІ ЦИТОЗОЛЯ ЕРИТРОЦИТІВ У РОЗЧИНАХ 1,2-ПРОПАНДИОЛУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Методом ЕПР-спигового зонду встановлено аномальне зменшення мікрів'язкості цитозоля еритроцитів при збільшенні концентрації натрія хлориду (НХ) у присутності 1,2-пропандіолу (1,2-ПД).

S.Kh.MEZHDIV

ANOMALOUS REDUCTION IN MICROVISCOSITY OF RED BLOOD CELL CYTOSOLE IN SOLUTIONS OF 1,2-PROPANEDIOL

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

A method of EPR-spin probes showed an anomalous reduction in RBC cytosole microviscosity after increasing concentration of sodium chloride (NaCl) in the presence of 1,2-propanediol (1,2-PD).

УДК 57.043:615.832.9:591.111.1:577.152.3:547.42

К.М.Романец, Б.А.Скорняков, В.А.Коптелов, С.О.Гирич

ВЛИЯНИЕ ОБЩЕЙ ГИПОТЕРМИИ И КРИОПРОТЕКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНА И ЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС

Изучено влияние криопротекторов на эстеразную активность трипсина, а также на общую эстеразную активность плазмы крови и состояние сердечно-сосудистой системы крыс в условиях общей гипотермии до 22 °С. Показано, что все исследованные криопротекторы (глицерин, 1,2-пропандиол (1,2-ПД), этиленгликоль, диметилсульфоксид (ДМСО), сахароза, ПЭО-400 и ПЭО-1500) ингибируют активность трипсина причем в наибольшей степени ПЭО-400, а в наименьшей 1,2-пропандиол. ПЭО-400 в конечной концентрации 5 % ингибирует общую эстеразную активность плазмы крови крыс. Общее охлаждение животных до ректальной температуры 22 °С вызывает значительное повышение эстеразной активности плазмы крови крыс. Премедикация раствором ПЭО-400 за 10 мин до начала охлаждения нормализует эстеразную активность плазмы крови при гипотермии, а также снижает частоту сердечных сокращений (ЧСС) как до, так и в процессе охлаждения.

Все более широкое применение общей и регионарной гипотермии в медицинской практике требует детального изучения морфофункциональных изменений в теплокровном организме, возникающих при понижении температуры тела. Совершенно очевидно, что при значительной глубине или высокой скорости охлаждения возникающий температурный градиент необходимо рассматривать как экстремальный повреждающий фактор, который может привести к выраженным локальным или системным как обратимым, так и необратимым нарушениям в организме, объединяемым под общим названием "холо-

довая травма" [6]. Общепринятой концепции патогенеза холодовой травмы в настоящее время не существует, хотя имеющаяся информация свидетельствует об изменениях некоторых морфофункциональных параметров ряда органов и тканей [3]. Однако изучение реакции отдельных систем организма в ответ на охлаждение и выявление ключевых механизмов развития и реализации холодовой травмы позволят разработать эффективные методы предотвращения и устранения патологических изменений, вызванных действием холода. В основе подобных изменений зачастую лежит активация некоторых ферментативных систем катаболизма [1]. В связи с этим нами исследовано влияние общего охлаждения организма до 22 °С на активность некоторых ферментов плазмы крови крыс. Также изучено влияние криопротекторов глицерина, 1,2-ПД, этиленгликоля, ДМСО, сахарозы и полиэтиленоксидов с молекулярными массами 400 (ПЭО-400) и 1500 (ПЭО-1500) на активность трипсина и эстеразную активность плазмы крови крыс.

Эстеразную активность определяли флуоресцентным методом при температуре инкубации 20 °С. Использовали реакцию гидролиза флуоресцеинди-ацетата (ФДА) ("Serva", Германия) с образованием флуоресцеина, который при длине волны возбуждения 486 нм флуоресцирует с максимумом длины волны 517 нм. Интенсивность флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре "HITACHI" MPF-2A (Япония). Количество образовавшегося флуоресцеина определяли по калибровочной кривой. Активность трипсина выражали в нмоль/л флуоресцеина · мг⁻¹ трипсина · мин⁻¹. В работе использовали 0,25 %-й раствор трипсина (рН 7,4, НПО "Вирион", г.Томск), а также криопротекторы: глицерин, 1,2-ПД, этиленгликоль ("РЕАХИМ", ЧДА), ДМСО (ПО Львовфарм, Украина), сахарозу ("РЕАХИМ", ХЧ), ПЭО-400 ("LOVACHEMIE", Чехословакия) и ПЭО-1500 (синтезирован в отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины) в конечных концентрациях 5, 10, 15 и 20%. Перед определением активности осуществляли инкубацию трипсина с криопротекторами при температуре 20 °С в течение 10 мин. Кинетические параметры эстеразной реакции определяли методом Лайнуивера-Берка [4] при концентрации ФДА 200, 250, 300, 350 и 400 мкмоль/л. Для получения плазмы использовали беспородных крыс обоего пола массой 110–180 г. Животных декапитировали. Кровь собирали в пробирку, содержащую 0,2 мл (5000 ед.) гепарина ("Sandoz", Швейцария). Центрифугировали на ОПн-3 при 400 g, после чего собирали плазму. Эстеразную активность плазмы определяли в 0,002 М *трис*-HCl-буфере (рН 7,4) при температуре инкубации 20 °С. Общее охлаждение животных проводили путем погружения в холодную (3 °С) воду. Измерение ректальной температуры производили с помощью дифференциальной термодпары, один спай которой находился в сосуде Дьюара, наполненном тающим льдом (0 °С), а другой помещался в прямую кишку крысы на глубину 2–3 см. Охлаждение проводили в двух группах крыс до температуры 22 °С. Первая группа являлась контрольной. В другой группе животным за 10 мин до охлаждения внутрибрюшинно вводили 0,015 М раствор ПЭО-400 в дистиллированной воде из расчета 0,05 г/кг массы крысы. До премедикации, после нее и в ходе охлаждения животных контролировалась работа сердца. Кардиограмму регистрировали на ЭЭГП4-02. После достижения требуемой температуры охлаждения тела животное быстро декапитировали, собирали кровь и получали плазму.

На первом этапе проведены эксперименты по изучению влияния криопротекторов на активность модельного объекта, в качестве которого использовали трипсин. Такой выбор определялся рядом причин. Прежде всего трипсин занимает важное место в метаболизме животных и человека. Его роль не ограничивается участием только в процессах пищеварения. Активация процессов катаболизма и, в частности, реакций, катализируемых трипсином, является одним из звеньев в цепи повреждений организма при воздействии низких тем-

ператур [1]. Строение активного центра и механизм каталитического действия, присущие трипсину, обнаружены у многих других катаболических ферментов [2]. Важно и то, что трипсин обладает не одним, а четырьмя видами ферментативной активности. Кроме пептидазной, это еще эстеразная, амидазная и трансферазная. Полученные результаты свидетельствуют о том, что практически все исследованные криопротекторы оказывают существенное влияние на эстеразную активность трипсина. Действие криопротекторов почти всегда сводилось к уменьшению активности фермента, однако характер этого ингибирования для разных криопротекторов различен. Конкурентный тип ингибирования выявлен для ПЭО-400 (рис. 1), 1,2-ПД (рис. 2, в), ДМСО, бесконкурентный — для этиленгликоля (рис. 2, г), глицерина и сахарозы, а для ПЭО-1500 — неконкурентный (рис. 2, б). Наиболее сильное ингибирующее действие оказывает ПЭО-400. При 5%-й концентрации обнаружено увеличение константы Михаэлиса (K_m) почти в 20 раз при неизменной максимальной скорости (V_{max}) реакции (рис. 1). При увеличении концентрации ПЭО-400 до 10, 15 и 20% за наблюдаемое время реакции накопления продукта не зарегистрировано. Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы о действии полиэтиленгликолей на ферментативную кинетику [7,8].

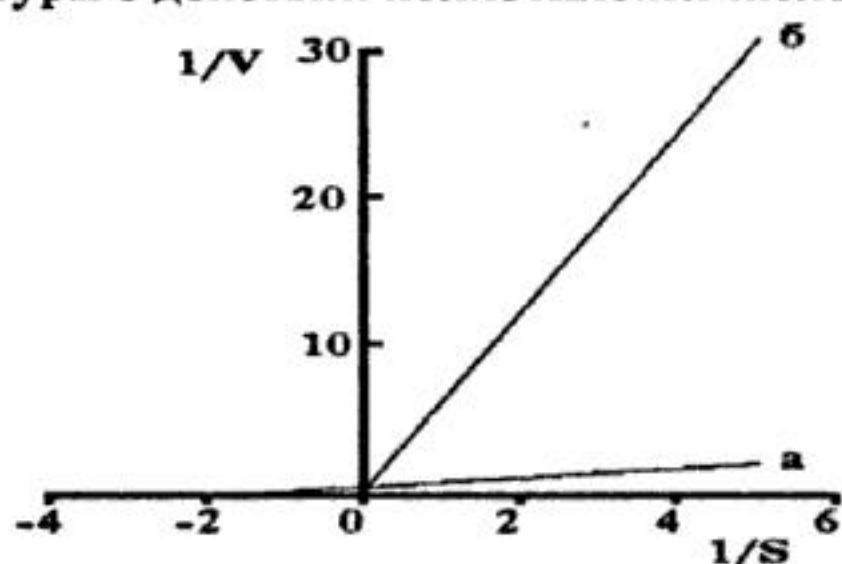


Рис. 1. Влияние ПЭО-400 на кинетику эстеразной реакции, катализируемой трипсином: а — без криопротектора, б — 5%-й раствор ПЭО-400. По вертикали — $1/V$, M^9 флуоресцеина · мг трипсина · мин. По горизонтали — $1/S$, M^6

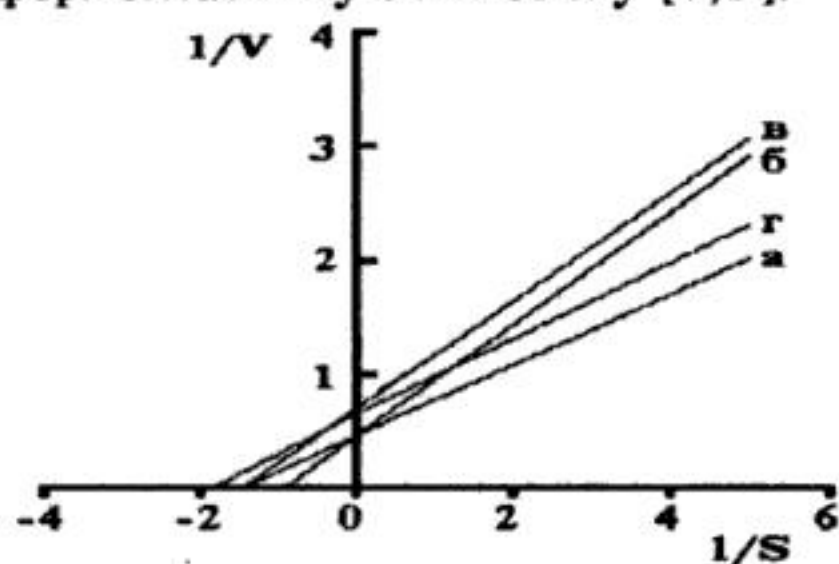


Рис. 2. Влияние ПЭО-1500, 1,2-ПД и этиленгликоля в 5%-й концентрации на кинетику эстеразной реакции, катализируемой трипсином: а — без криопротектора, б — ПЭО-1500, в — 1,2-ПД, г — этиленгликоль. По вертикали — $1/V$, M^9 флуоресцеина · мг трипсина · мин. По горизонтали — $1/s$, M^6

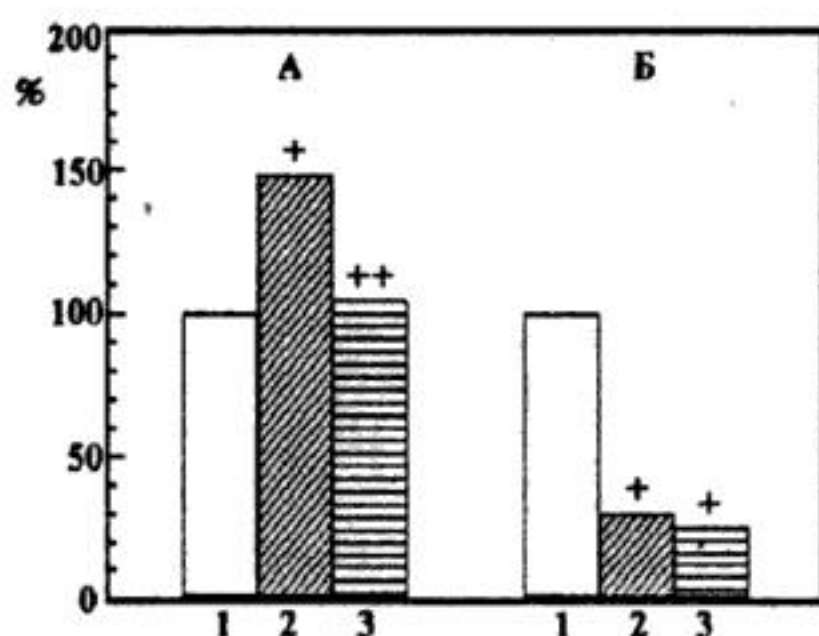


Рис. 3. Влияние общей гипотермии на эстеразную активность плазмы крови (А) и ЧСС (Б) при внутривенном введении ПЭО-400: 1 — нормотермия, 2 — гипотермия, 3 — гипотермия с введением ПЭО-400; + — $p < 0,05$ относительно нормотермии, ++ — $p < 0,05$ относительно гипотермии

в плазме крови крыс незначительна [9].

На третьем этапе исследовали влияние общей гипотермии организма и премедикации раствором ПЭО-400 на суммарную эстеразную активность плазмы крови крыс. Полученные результаты показали, что общее охлаждение

Так как ПЭО-400 оказался наиболее сильным ингибитором активности трипсина, то на втором этапе мы исследовали влияние этого криопротектора на общую эстеразную активность плазмы крови крыс. Показано, что ПЭО-400 практически полностью ингибирует эту ферментативную реакцию уже при 5%-й концентрации криопротектора. Можно предположить, что такое усиление ингибирующего действия ПЭО-400 вызвано уменьшением соотношения фермент/криопротектор по сравнению с модельной системой, так как доля ферментов, обладающих эстеразной активностью, в общем количестве белка

животных до ректальной температуры 22 °С вызывало явное повышение эстеразной активности плазмы крови крыс. При этом наблюдалось снижение ЧСС с 8 до 2,4 с⁻¹ (рис. 3,Б). Премедикация раствором ПЭО-400 снижала эстеразную активность практически до нормотермического уровня (рис. 3,А). В то же время при введении криопротектора происходило уменьшение ЧСС еще до охлаждения с 8 до 7,4 с⁻¹. При охлаждении животных с введенным ПЭО-400 ЧСС при 22 °С снижалась с 2,4 с⁻¹, зарегистрированной при охлаждении животных без премедикации, до 2 с⁻¹. В литературе [5] имеются данные о том, что введение крысам перед охлаждением перорально криопротекторов из ряда ПЭО приводит к повышению устойчивости организма животного к общей гипотермии. Нельзя исключить возможности того, что снижение активности эстераз плазмы крови, а вероятно, и других ферментов с аналогичным механизмом катализа, в присутствии криопротекторов является одним из механизмов их защитного действия. В работе [5] приводятся данные об увеличении вязкости крови при гипотермии, нарушении микроциркуляции, увеличении показателя гематокрита. Введение же животным до охлаждения растворов из ряда ПЭО приводит к снижению вязкости крови при гипотермии почти до нормотермического уровня, улучшению микроциркуляции и нормализации показателя гематокрита. Можно предположить, что именно снижение вязкости крови при введении криопротекторов является причиной (или одной из причин) уменьшения ЧСС, наблюдаемого в наших экспериментах.

Таким образом, глубокая гипотермия вызывает значительное увеличение активности некоторых ферментов катаболизма плазмы крови крыс, что, возможно, является одной из причин нарушений, возникающих при охлаждении организма. В то же время криопротекторы оказывают защитное действие на организм животных при охлаждении, вероятно, не только благодаря своим гидратационно-осмотическим свойствам, но и способности ингибировать активность катаболических ферментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Верболович В.П. Соотношение основных метаболических циклов и их регуляция в условиях искусственной гипотермии // Гипотермическая защита в кардиохирургии. – Новосибирск: Б.и., 1979. – С. 67–134.
2. Диксон М., Узбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Т. 1–3. – 1118 с.
3. Клинецвич Г.Н. Поражение холодом. – Л.: Медицина, 1973. – 214 с.
4. Корнши-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1979. – 279 с.
5. Липина О.В. Реологические свойства крови при охлаждении и действии веществ из ряда ПЭО: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1992. – 15 с.
6. Луговой В.И., Мазалов В.К., Скорняков Б.А. и др. Динамика некоторых показателей сердечно-сосудистой системы и реологических свойств крови у крыс при остром охлаждении // Влияние охлаждения на биологические объекты. – Харьков: Б.и., 1990. – С. 91–93.
7. Мосолов В.В., Соколова Е.В. Взаимодействие гликолей и глицерина с активным центром трипсина и химотрипсина // Докл. АН СССР. – 1972. – 207. – № 1. – С. 228–231.
8. Топчиева И.Н. Применение полиэтиленгликоля в биохимии // Успехи химии. – 1980. – 49. – № 3. – С. 494–517.
9. Хмелевский Ю.В., Усатенко О.К. Основные биохимические константы человека в норме и при патологии. – Киев: Здоров'я, 1987. – 180 с.

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

Поступила 29.08.94

К.М.РОМАНЕЦЬ, Б.О.СКОРНЯКОВ, В.О.КОПТЬОЛОВ, С.О.ГІРИЧ

ВПЛИВ ЗАГАЛЬНОЇ ГІПОТЕРМІЇ ТА КРІОПРОТЕКТОРІВ НА АКТИВНІСТЬ ТРИПСИНУ ТА ЕСТЕРАЗНУ АКТИВНІСТЬ ПЛАЗМИ КРОВІ ЩУРІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчено вплив кріопротекторів на естеразну активність трипсину, а також на загальну естеразну активність плазми крові та стан серцево-судинної системи щурів в умовах загальної

гіпотермії до 22 °С. Показано, що усі досліджені криопротектори (гліцерин, 1,2-пропандіол (1,2-ПД), етиленгліколь, диметилсульфоксид (ДМСО), сахароза, ПЕО-400 та ПЕО-1500) інгібують активність трипсину, при цьому найбільшу інгібуючу дію має ПЕО-400, а найменшу — 1,2-пропандіол. ПЕО-400 у кінцевій концентрації 5 % інгібує загальну естеразну активність плазми крові щурів. Загальне охолодження тварин до ректальної температури 22 °С викликає значне підвищення естеразної активності плазми крові щурів. Премедикація розчином ПЕО-400 за 10 хвилин до початку охолодження нормалізує естеразну активність плазми крові щурів в умовах гіпотермії, а також знижує частоту серцевих скорочень (ЧСС) як до охолодження, так і під час гіпотермії.

K.M.ROMANETS, B.A.SKORNYAKOV, V.A.KOPTELOV, S.O.GIRICH

THE EFFECTS OF TOTAL HYPOTHERMIA AND CRYOPROTECTANTS ON THE ACTIVITY OF TRYPSIN AND ESTERASE IN RAT PLASMA

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

The effect of cryoprotectants on trypsin esterase activity, and total activity of blood plasma and the state of the cardiovascular system of rats was studied during total hypothermia down to 22°C. It has been shown that all the studied cryoprotectants (glycerol, 1.2-propanediol, ethylene glycol, DMSO, sucrose, PEO-400 and PEO-1500) inhibit trypsin activity, and PEO-400 has the highest inhibiting activity, while 1.2-PD — the lowest. PEO-400 in the finite concentration of 5% inhibits total esterase activity of blood plasma of rats. Total cooling of animals down to the rectal temperature of 22°C results in a significant increase in the blood plasma esterase activity of rats. Premedication by a PEO-400 solution in 10 min prior to cooling normalizes the blood plasma esterase activity of rats under hypothermic conditions, as well as reduces the heart rate both prior to cooling and during hypothermic treatment.

УДК 532.62:536.421.3.4.

А. Ф. Тодрин

О ФОРМЕ КАПЛИ, ЗАМОРОЖЕННОЙ НА ТВЕРДОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Описаны методики проведения эксперимента и обработки экспериментальных данных по определению формы капли, упавшей на охлажденную горизонтальную поверхность. Приводятся эмпирические уравнения для определения диаметра пятна контакта капли с подложкой, высоты капли, полуосей усеченного эллипсоида вращения, форму которого принимает капля, в зависимости от диаметра капли, скорости ее полета и свойств жидкости. Среднеквадратическая погрешность приведенных зависимостей не превышает $\pm 7,3\%$.

Замораживание капель жидкости на охлажденных поверхностях получило широкое распространение в ряде технологических процессов. При этом спектр скоростей охлаждения, получаемых при таком замораживании, весьма широк: от нескольких тысяч градусов Кельвина в секунду до нескольких градусов Кельвина в минуту. Сверхвысокие скорости охлаждения используются в металлургии при получении аморфных металлов [5], в химии — при получении материалов с полупроводниковыми свойствами [6], в криобиологии — при замораживании эритромаcсы без криопротектора [7]. В этих случаях замораживаются капли размером менее 300 мкм на высокотеплопроводных подложках. В то же время в криобиологии при замораживании капель применяются и медленные скорости охлаждения, например при криоконсервировании спермы рыб и животных. При этом замораживаются капли диаметром до 10 мм на фторопластовой поверхности [1].

При данных способах замораживания возникают сложности с определением скорости охлаждения капель. При замораживании мелких капель в них невозможно разместить термопару или термометр. В крупных каплях есть возможность поместить термопару, но при этом будет вноситься существенная погрешность за счет подвода тепла по проводам термопары. Кроме того, не известно, в каком сечении капли необходимо размещать термопару, так как скорости охлаждения основания и вершины капли могут различаться более чем в

два раза [3]. Поэтому актуальным является теоретическое определение средней и локальных скоростей охлаждения, для чего необходимо знать форму, которую принимает капля на охлажденной поверхности. Как следует из литературных источников [2,5], зависимость формы капли, упавшей на охлажденную поверхность, от ее кинетической энергии и свойств жидкости не определена.

Для получения экспериментальных данных о форме капли было разработано устройство, позволяющее сбрасывать с заданной высоты капли различных размеров на охлаждаемую горизонтальную поверхность, где они фотографировались. Для предотвращения конденсации влаги на охлажденной поверхности устройство помещалось в герметичный корпус, заполненный газообразным азотом, нагретым до требуемой температуры.

Были исследованы капли воды и водных растворов глицерина объемной концентрацией 10 и 30%, диаметр которых изменялся в пределах 1,9–3,8 мм, падавшие на подложки, изготовленные из меди М1 и алюминиевого сплава АМЦ, со скоростями 0–1,5 м/с. При более высоких скоростях падения капли растекались очень тонким слоем и были трудноразличимы на подложке. Капли и газ в камере предварительно охлаждались до температуры, близкой к температуре кристаллизации исследуемой жидкости (на 1–3 °С выше), температура подложки изменялась в пределах –165 ÷ –190 °С.

Обработка результатов экспериментов проводилась на ЭВМ СМ-4 путем обмера меридионального сечения капли с помощью УСО "Штрих". В результате обмера были получены данные о высоте капли, диаметре пятна контакта капли с подложкой, площади и периметру сечения капли. Получены данные при обработке изображений более 1000 капель. Из наших наблюдений следует, что лежащая капля имеет форму усеченного эллипсоида вращения; это согласуется с данными работы [4]. Поэтому для построения эмпирических зависимостей по определению формы капли от ее кинетической энергии и теплофизических свойств жидкости необходимо определить полуоси эллипсоида, а также объем и диаметр капли, так как при таком способе каплеобразования получить абсолютно одинаковые капли невозможно. Поскольку капля представляет собой усеченный эллипсоид, получаемый путем вращения усеченного эллипса, форму которого имеет меридиональное сечение капли, относительно вертикальной оси, то определению подлежат только полуоси эллипса.

Полуоси эллипса находят путем решения следующей системы уравнений

$$\frac{d^2}{4a^2} + \frac{(b-h)^2}{b^2} = 1, \quad (1)$$

$$S = 2 \frac{a}{b} \int_{b-h}^b \sqrt{b^2 - y^2} dy = \frac{a}{b} \left(\frac{\pi^2 b}{2} - (b-h) \sqrt{b^2 - (b-h)^2} - b^2 \arcsin \frac{b-h}{b} \right), \quad (2)$$

где S – площадь меридионального сечения капли, a , b – полуоси эллипса, d – диаметр пятна контакта капли с подложкой, h – высота капли.

Для проверки правильности расчетов и точности измерений применяется уравнение для определения длины дуги купола меридионального сечения капли:

$$L = 2 \frac{a}{b} \int_{b-h}^b \sqrt{\frac{b^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2 - y^2}} dy, \quad (3)$$

где y – текущая координата. Интеграл, стоящий в правой части уравнения (3), решается численно. Диаметр капли определяется соотношением:

$$D = \left(\frac{6 V_k}{\pi} \right)^{0,333},$$

где V_k – объем капли, определяемый уравнением

$$V_k = \pi a^2 \int_{b-h}^b \left(1 - \frac{y^2}{b^2}\right) dy = \pi a^2 \left(h - \frac{b}{3} + \frac{(b-h)^3}{3b^2}\right).$$

Дальнейшая обработка проводилась в безразмерных величинах. Методом наименьших квадратов была определена следующая система уравнений, позволяющая определить форму капли в зависимости от ее кинетической энергии и свойств жидкости:

$$\frac{D}{h} = 0,07740 \text{ We} + \frac{3604690}{\hat{P}} + 1, \quad (4)$$

$$\frac{D}{d} = \frac{0,989311}{\exp(0,016801 \text{ We}) + \text{We}^{0,09724}}, \quad (5)$$

$$\frac{D}{a} = \frac{2}{\exp(0,0380721 \text{ We} + 92455/\hat{P})}, \quad (6)$$

$$\begin{cases} b = h / \left(1 - \frac{1}{2a} \sqrt{4a^2 - d^2}\right), & \text{We} > 4,4 \\ b = h / \left(1 - \frac{1}{2a} \sqrt{4a^2 - d^2}\right), & \text{We} \leq 4,4 \end{cases}, \quad (7)$$

где $\text{We} = \frac{\rho v^2 D}{2\sigma}$ – критерий Вебера; ρ и σ – плотность и поверхностное натяжение жидкости; v – скорость движения капли с учетом сопротивления газа, определяемая по формуле:

$$v = \sqrt{2gH} - \frac{\rho_r \nu_r H}{D^2 \rho} - \frac{9\rho_r \nu_r^{0,333}}{4\rho D^{1,333}} (2g)^{0,333} H^{1,333},$$

g – ускорение свободного падения, H – высота падения капли, ρ_r и ν_r – плотность и кинематическая вязкость газа при данной температуре, $\hat{P} = \frac{P_L}{P}$ – отно-

сительное давление Лапласа, $P_L = \frac{4\sigma}{D}$ – давление Лапласа в капле, P – атмосферное давление. Среднеквадратичная погрешность зависимостей (4)–(7) не превышает $\pm 7,3\%$.

Как видно из полученных уравнений, форма капли не зависит от теплофизических свойств подложки, а зависит только от скорости полета, диаметра капли и свойств жидкости при данной температуре, что согласуется с материалами работ [8].

Полученные зависимости могут применяться для определения формы крупных капель (диаметром более 1,5 мм), упавших на горизонтальную высокотеплопроводную поверхность, охлажденную до температуры -160°C и ниже. Для более мелких капель данные зависимости применять вряд ли целесообразно, поскольку кристаллизация в мелких каплях проходит параллельно с их растеканием по поверхности, и капля не успевает принять равновесную форму до замораживания из-за высоких скоростей охлаждения. Крупные же капли до кристаллизации успевают принять равновесную форму.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы криобиологии / Под общ. ред. Н.С.Пушкаря и А.М.Белоуса. – Киев: Наук. думка, 1981. – 608 с.
2. Быховский А.И. Растекание. – Киев: Наук. думка, 1983. – 192 с.
3. Клименко А.В., Колосов М.Ю., Бегма А.А. Неравномерность скорости охлаждения при криоконсервировании биологических объектов в гранулах // Сб. науч. тр. Моск. энерг. ин-та. – 1989. – № 191. – С. 122–129.
4. Клименко А.В., Колосов М.Ю., Пеньков Ф.М. Замораживание капель на подложке // Теплофиз. высок. температур. – 1988. – 26, № 1. – С. 131–136.
5. Металлические стекла / Под ред. Гилмана Дж. и Линих Дж. – М.: Металлургия, 1984. – 264 с.

6. Фельц А. Аморфные и стеклообразные неорганические твердые тела. – М.: Мир, 1986. – 558 с.
7. А. с. N 1597505 СССР, МКИ⁴ F25 D 3/10. Устройство для замораживания эритромаcсы / А.Ф.Тодрин, Ю.М.Рудько, Ю.В.Космодемьянский. – Оpubл. 07.10.90. Бюл. № 37.
8. Madejski J. Droplets on impact with a solid surface // Int. J. Heat Mass Transfer. – 1983. – 26, № 7. – P. 1095–1098.

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

Поступила 03.03.95

О.Ф.ТОДРИН

ПРО ФОРМУ КРАПЛІ, ЯКА ЗАМОРОЖЕНА НА ТВЕРДІЙ ПОВЕРХНІ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Описані методики проведення експерименту й обробки експериментальних даних по визначенню форми краплі, яка впала на охолоджену горизонтальну поверхню. Наводяться емпіричні рівняння для визначення діаметра плями контакту краплі з підкладкою, висоти краплі, півосей урізаного еліпсоїда обертання, форму якого приймає крапля, в залежності від діаметра краплі, швидкості руху та властивостей рідини. Середньоквадратична похибка наведених залежностей не перевершує $\pm 7,3\%$.

A.F.TODRIN

ON THE SHAPE OF THE DROP, FROZEN ON THE SOLID SURFACE

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

There is described a technique of staging an experiment and processing its results on the determination of the shape of the drop, which has fallen on the cooled horizontal surface. The empirical equations for calculating the diameter of the site of contact of the drop with the underlayer, the height of the drop, semi-axes of the truncated ellipsoid of revolution, the form of which is assumed by the drop depending on its diameter, its velocity and properties of the fluid are submitted. Root-mean-square error of the submitted dependencies does not exceed $\pm 7.3\%$.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 615.361.018.46.014.41

**Е.Д.Луценко, А.Н.Гольцев, Т.Г.Дубрава,
Л.В.Останкова, Е.В.Опанасенко**

КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫЙ КОСТНЫЙ МОЗГ: ПОТЕНЦИАЛ И ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОГО КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА

Проведена оценка функциональной активности нативного и криоконсервированного миелотрансплантата с измененным компонентным составом. Установлено, что среди адгезивных клеток костного мозга присутствуют аксессуарно-регуляторные элементы, обеспечивающие защитный потенциал миелотрансплантата. Показано, что регуляторная роль этих клеток проявляется в отношении как медуллярного, так и селезеночного кроветворения. Установлено, что Thy-1,2^+ и Thy-1,2^+ фракции костного мозга обладают различной способностью репопулировать кроветворные и лимфоидные органы облученных животных. Отмечено, что тест экзогенного колониеобразования коррелирует с защитным потенциалом пересаженной гемопоэтической ткани при условии сохранения компонентного состава ("полноты") миелотрансплантата.

Обобщение современных данных клинических и экспериментальных исследований свидетельствует о том, что при использовании самых различных режимов замораживания-отогрева отмечаются выраженные изменения функционального статуса криоконсервированного миелотрансплантата в сравнении с нативным. Хотя механизм наблюдаемых нарушений восстановления гемопоэза реципиентов криоконсервированного костного мозга остается до конца не выясненным, есть основания считать, что причиной таких изменений

может быть не только снижение количества и функциональных свойств в криоконсервированном миелотрансплантате стволовых кроветворных элементов [5], но и параметров клеточных популяций костного мозга, выполняющих акцессорные функции в гемопоэзе [4]. Претендентами на эту роль в первую очередь являются клетки Т-ряда, обладающие достаточно высокой криочувствительностью, а также клетки адгезивной фракции костного мозга (макрофаги, фибробласты, эндотелиальные клетки), продуцирующие множество регуляторных в отношении кроветворных предшественников молекул. Подтверждением участия фракции адгезивных клеток (АК) костного мозга в гемопоэзе служат данные литературы [4] и полученные нами ранее результаты [3], свидетельствующие о том, что изменение компонентного состава миелотрансплантата за счет элиминации фракции АК, не обладающих колониеобразующей активностью, изменяло способность костного мозга формировать колонии. При этом элиминация АК в различной степени отражалась на колониеобразующей способности нативного и криоконсервированного костного мозга, вне зависимости от гибели кроветворных клеток в криоконсервированном необработанном трансплантате. Общеизвестно, что колониеобразование в селезенке [7] является важным, но не единственным показателем, характеризующим состояние миелотрансплантата. Отмечалось, что тест экзогенного селезеночного колониеобразования может объективно отражать функциональное состояние пересаженного костного мозга при сбалансированном клеточном составе миелотрансплантата [3]. Криоконсервирование, являясь мощным физико-химическим фактором, в той или иной степени воздействующим на разные клетки гетерогенной популяции костного мозга, существенным образом нарушает его стабильное функциональное состояние, включая и колониеобразующую активность [5]. Измененное (сниженное) содержание колоний в селезенке в этом случае характеризует состояние кроветворения конкретно лишь в данном органе, куда поступило (даже на фоне гибели 15–20% клеток после криоконсервирования) определенное количество потенциально способных формировать колонии кроветворных единиц. Некоторые из них при изменении состава регуляторных клеток миелотрансплантата могут не проявить колониеобразующую способность в селезенке. Но не менее важным является и то, что после воздействия на костный мозг различных факторов кроветворные предшественники изменяют свою миграционную активность и тропность к расселению (хомингу) даже в пределах двух главных кроветворных органов грызунов – селезенки и костного мозга [7]. В этой связи одним из подходов к изучению возможных причин модификации функциональных свойств криоконсервированного костного мозга может быть определение характера изменений компонентного состава трансплантируемого криоконсервированного миелотрансплантата и роли этих изменений в проявлении репопуляционной активности костного мозга в организме облученных реципиентов. Очевидно, что в этом случае объективным критерием оценки качества (защитного потенциала) трансплантируемой гемопоэтической ткани является интегральный показатель выживаемости облученных и защищенных костным мозгом реципиентов. Поэтому важно определить, какую роль в этом играют клетки, относящиеся к регуляторным элементам костного мозга; существует ли корреляция между изменениями характера колониеобразования *in vivo* при трансплантации криоконсервированного и нативного костного мозга с измененным компонентным составом и его защитным потенциалом. Изучению этих вопросов посвящена настоящая работа.

Эксперименты выполнены на мышах линии (СВАхС57В1)F₁ массой 20–22 г. Костный мозг вымывали из бедренной кости средой 199 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и цитрата Na. Удаление из костного мозга АК проводили путем двойной инкубации суспензии в чашках Петри при 24 °С в течение 40 мин. Для получения фракции Thy-1,2⁺ клеток костного

мозга был использован прямой пеннинг-метод с моноклональными антителами (МАТ) к антигену Thy-1,2 [9]. Антитела были получены из лаборатории иммунохимии Института канцерогенеза РАМН. Кратко: в экспериментах использовали пластиковые планшеты (Linbro) с диаметром ячеек 16 мм, в которые вносили МАТ в разведении 1:300. После удаления неприкрепившихся антител в ячейки вносили костный мозг в концентрации $3,5-4,0 \times 10^6$ /мл ядерных клеток в объеме 0,5 мл, из которого предварительно были удалены АК, и инкубировали 70 мин при 4 °С. После сорбции на МАТ неприкрепившиеся (Thy-1,2⁻) клетки удаляли мягким пипетированием. Сорбированные (Thy-1,2⁺) клетки снимали с антител жестким пипетированием.

Костный мозг криоконсервировали под защитой криопротекторов 7,5%-го полиэтиленоксида (ПЭО) и 10%-го диметилсульфоксида (ДМСО) на установке УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины, г. Харьков). Скорость замораживания составила 1 °С/мин до -25 °С с последующим погружением ампул в жидкий азот. Отогрев суспензии проводили на водяной бане при температуре 39-40 °С в течение 50-60 с.

Животных облучали на установке РУМ-17 в дозе 800 Р. Через 24 ч после облучения мышам-реципиентам внутривенно вводили клетки в объеме 0,2 мл нативного или криоконсервированного костного мозга. Для оценки защитного потенциала костного мозга определяли 30-дневную выживаемость животных-реципиентов. Состояние лимфомиелоидного комплекса реципиентов оценивали по количественному содержанию клеток в тимусе, селезенке, паховых лимфоузлах, для чего из органов были приготовлены клеточные суспензии путем гомогенизации измельченной ткани в среде 199 с 3% ЭТС. После фильтрации в суспензии считали количество ядерных клеток. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью критерия Стьюдента-Фишера. Различия сравниваемых величин считали существенными при $p < 0,05$ [1].

Т а б л и ц а 1

Выживаемость, селезеночное колониеобразование и содержание ядерных клеток в костном мозге ($\cdot 10^6$) и селезенке ($\cdot 10^7$) у летально облученных мышей после трансплантации костного мозга с измененным компонентным составом

Трансплантат	Выжившие животные к 30-м сут по отношению к 1-й группе, %**	Колониеобразующая активность КОЕ _с * [*]		Содержание ядерных клеток °, **			
				Костный мозг		Селезенка	
		9-е сут	11-е сут	11-е сут	20-е сут	11-е сут	20-е сут
1. Нативный интактный	100	100,0±12,0	100,0±6,7	9,8	11,0	8,0	14,0
2. Криоконсервированный	91	95,0±4,0	82,3±10,4	8,3	10,0	12,1	13,5
3. Криоконсервированный с 7,5%-м ПЭО	42	52,4±3,8*	73,6±6,86*	6,0	10,9	10,2	11,6
4. Нативный без АК	75	112,0±7,8	98,5±7,9	4,2	6,0	7,4	8,0
5. Криоконсервированный без АК	50	50,0±3,4*	71,7±7,1*	4,6	9,7	8,6	7,4
6. Нативный Thy-1,2 ⁻	94	97,8±5,5	98,0±7,4	9,0	8,0	14,5	11,0
7. Криоконсервированный Thy-1,2 ⁻	96	85,0±5,8	70,0±10,5*	7,0	10,0	18,4	18,0
8. Нативный Thy-1,2 ⁺	80	—	78,4±3,7	8,5	9,5	3,0	21,0
9. Криоконсервированный Thy-1,2 ⁺	63	—	91,3±9,1	8,0	10,0	6,0	22,0

Примечание. * — доза введенных клеток животным 1-7-й групп $1 \cdot 10^5$ кл/мышь, 8, 9-й групп $1 \cdot 10^4$ кл/мышь; ** — доза введенных клеток животным 1-7-й групп $1 \cdot 10^6$ кл/мышь, 8, 9-й групп $1 \cdot 10^5$ кл/мышь; * — $p < 0,05$ между 1-й группой, контрольной и опытной; ° — доверительный интервал в группах не превышал 2-6%

В опубликованных нами ранее работах [3] было показано, что среди 15-18% клеток костного мозга, обладающих адгезивными свойствами, но не способных к гемопоэтическому колониеобразованию, присутствуют аксессуарные клетки, обеспечивающие вместе с кроветворным микроокружением реципи-

ента функционирование донорских кроветворных предшественников — КОЕ_с и, следовательно, обладающие “трансплантабельностью”. Удаление АК не изменяло существенным образом колониобразующей активности нативного костного мозга, однако регуляторная роль этих клеток в отношении КОЕ_с была доказана изменением характера колониобразования при совместном введении лишенной АК суспензии миелокариоцитов совместно с перитонеальными макрофагами.

Более того, приведенные в табл. 1 данные доказывают необходимость АК в обеспечении защитного потенциала нативного и криоконсервированного миелотрансплантата: эффективность применения истощенного по АК костного мозга была значительно ниже в сравнении с цельной суспензией. Снижение выживаемости может быть объяснено недостаточной интенсивностью медуллярного кроветворения на ранних этапах посттрансплантационного периода, что подтверждается низким содержанием ядерных клеток в бедренных костях реципиентов данной группы на ранних сроках (табл. 1). При этом селезеночное кроветворение, судя и по количеству ядерных клеток, и по количеству колоний в органе, лишь незначительно отличалось от контроля. Этот факт представляет дополнительный интерес с точки зрения значимости теста селезеночного колониобразования в интегральной оценке полноценности миелотрансплантата. Как известно, каждый из гемопозитических органов грызунов (селезенка, костный мозг) вносит определенный вклад в обеспечение физиологического уровня функционирования гемопозитической системы в целом [7]. Репопуляция этих органов кроветворными предшественниками обеспечивает восстановление гемопоза облученных реципиентов [7]. Не удивительно, что используемые в эксперименте АК обладают в большей степени влиянием на гемопоз в костном мозге, так как среди них присутствуют стромальные элементы, регуляторная роль которых в медуллярном кроветворении убедительно доказана [4]. Принимая во внимание данный факт, необходимо учитывать, что то или иное изменение компонентного состава миелотрансплантата, в том числе обусловленное действием различных физико-химических факторов (например, криоконсервирование), может в какой-то степени искажать объективность метода экзогенного колониобразования в оценке качества трансплантата. Действительно, даже в группе мышей, защищенных костным мозгом, криоконсервированным по оптимальной программе, отмечается некоторое несоответствие этих двух показателей. Но еще большие различия выявлены в случае трансплантации криоконсервированного костного мозга, предварительно лишенного АК (группа 5). Очень близкие результаты по выживаемости и колониобразованию наблюдаются и в группе животных с трансплантатом костного мозга, криоконсервированного под защитой ПЭО-400 (группа 3), что, по нашему мнению, может объясняться различной устойчивостью аксессуарных-регуляторных элементов костного мозга к различным режимам криоконсервирования [3].

Необходимо отметить, что удаление АК (как один из этапов методического подхода) существенно не отразилось на защитном потенциале нативной суспензии, полученной после пеннинга, т. е. лишенной основной массы Thy-1,2⁺ клеток: фракции Thy-1,2⁻ клеток. Как нативная, так и криоконсервированная популяция обеспечила выживаемость животных, сходную с группой, являющейся для них контрольной — животные с нативным трансплантатом без АК. Аналогичный эффект отмечен при оценке колониобразующей активности этой фракции: процент колоний, формируемых нативными Thy-1,2⁻ клетками, на 11-е сут составил $98,0 \pm 7,4$ (контроль $100,0 \pm 6,7$), после криоконсервирования и пеннинга процентное содержание колоний, формируемое Thy-1,2⁻ клетками, было $70,0 \pm 10,5$ (контроль $82,3 \pm 10,4$). Складывается впечатление, что Thy-1,2⁻ фракция при осуществлении своей защитной функции менее чувствительна к действию регуляторных сигналов, осуществляемых

АК. Кроме того, эта популяция лишена клеток Т-ряда, являющихся регуляторными элементами, функция которых после криоконсервирования может существенно модифицироваться [12], что в конечном итоге может изменить цепь регуляторных взаимодействий в гемопоэзе, по крайней мере в каком-то из кроветворных органов.

Данные литературы и результаты ранее проведенных нами исследований [2] дают основание считать возможным присутствие на кроветворных клетках (КОЕ_с) антигена Thy-1,2. Приведенные в табл. 1 результаты свидетельствуют о том, что выделенная пеннингом обогащенная кроветворными предшественниками Thy-1,2⁺ фракция (нативная и криоконсервированная) обеспечивала 80–60%-ю выживаемость животных при дозе введенных клеток в 10 раз меньшей, чем в других группах. Эти показатели согласуются с результатами, свидетельствующими о способности Thy-1,2⁺ клеток обеспечивать защиту животных от летального облучения в течение более 6 мес при сингенной и аллогенной трансплантации [11]. Необходимо отметить, что фракция Thy-1,2⁺ клеток обогащена малодифференцированными КОЕ_с, формирующими колонии на 12–13-е сут, и согласно ранее полученным величинам с использованием теста экзогенного селезеночного колониеобразования такие клетки в присутствии криопротектора ДМСО обладают высокой криоустойчивостью [2]. Вместе с тем защитный потенциал криоконсервированных Thy-1,2⁺ клеток уступает нативному (табл. 1). Это еще раз подтверждает, что в данной модели оценка колониеобразования недостаточна для оценки функциональной полноценности криоконсервированного трансплантата в целом.

Определение восстановления клеточности селезенки облученных реципиентов на ранних сроках после трансплантации (табл. 1) свидетельствует о том, что Thy-1,2⁺ и Thy-1,2⁺ клетки обладают различной способностью репопулировать этот орган: на 11-е сут после трансплантации Thy-1,2⁺ фракция обладала более выраженной, чем Thy-1,2⁺ фракция, способностью заселять селезенку; на 20-е сут соотношение было обратным. Известно, что отсутствие Т-клеток в трансплантате приводит к усилению эритропоэза в сингенной системе [6], которому способствует красная пульпа селезенки. А именно такой популяцией (лишенной Т-клеток) и является Thy-1,2⁺ фракция. Можно отметить, что присутствие или отсутствие определенных ростовых факторов может изменять процесс миграции клеток из костного мозга в селезенку [10]. Кроветворное микроокружение костного мозга разнообразнее селезеночного, оно обеспечивает большую концентрацию стволовых клеток и поддерживает гемопоэз всех направлений [7]. Очевидно, в этом органе в первую очередь и начинают пролиферировать малодифференцированные стволовые кроветворные элементы. Об этом свидетельствует тот факт, что в костном мозге реципиентов, защищенных Thy-1,2⁺ клетками (обогащенными полипотентными элементами) при дозе введения в 10 раз меньшей, чем в других группах, количество ядерных клеток уже на 11-е сут было таким, как в группе с трансплантатом интактного костного мозга.

Необходимо подчеркнуть, что Thy-1,2⁺ фракция костного мозга представляет собой популяцию, содержащую не только КОЕ_с, но и клетки-предшественники Т-лимфоцитов, идентифицированные как SC-1⁺, Thy-1⁺ клетки [8]. Этими авторами было установлено, что обогащение суспензии клеток костного мозга такими предшественниками в результате удаления эритроцитов, прилипающих клеток, зрелых Т, В-лимфоцитов приводит к повышению концентрации клеток, способных заселять тимус: к 16-м сут обогащенная суспензия претимоцитов из костного мозга приводит к 20-кратному усилению заселения тимуса по сравнению с интактным костным мозгом. С этими результатами полностью согласуются наши данные, представленные в табл. 2.

Фракция Thy-1,2⁺ клеток как нативных, так и криоконсервированных уже к 11-м сут обладала повышенной способностью заселять тимус по сравне-

нию с интактным костным мозгом. Этот факт имеет важный клинический аспект: обогащенная Т-предшественниками популяция клеток костного мозга может быть использована для быстрой реабилитации после лучевой или химиотерапии центрального органа иммунитета — тимуса, что снижает вероятность развития вторичной инфекции у данной категории больных. Хотя динамика восстановления тимуса этой фракции костного мозга носит волнообразный характер, можно отметить, что почти во все сроки после трансплантации Thy-1,2^+ клетки обладали повышенной в сравнении с цельным трансплантатом способностью репопулировать тимус. Интерес представляет также анализ динамики заселения тимуса Thy-1,2^- клетками. Не отличаясь от контроля способностью репопулировать тимус на начальных этапах (11, 20-е сут), эта фракция значительно теряла активность восстанавливать клеточность тимуса в более поздние сроки. Требуется более глубокое осмысление этого явления, так как объяснение его только фактом сниженного количества SC-1^+ , Thy-1,2^+ клеток в трансплантате не может быть принято как окончательное.

Т а б л и ц а 2

Изменение содержания клеток в тимусе (млн) облученных мышей после трансплантации нативного и криоконсервированного с 10%-м ДМСО костного мозга

Трансплантат	Доза введенных клеток	Сутки после трансплантации**			
		11	20	30	40
Нативный интактный	$1 \cdot 10^6$	36,4	9,5	18,0	86,5
Криоконсервированный	$1 \cdot 10^6$	29,9	11,5	13,1	79,7
Нативный Thy-1,2^-	$1 \cdot 10^6$	26,4	10,0	5,2*	18,0*
Криоконсервированный Thy-1,2^-	$1 \cdot 10^6$	32,3	10,5	7,6*	25,0*
Нативный Thy-1,2^+	$1 \cdot 10^5$	51,0	15,5	13,0	104,0
Криоконсервированный Thy-1,2^+	$1 \cdot 10^5$	48,1	9,5	51,0	40,0

Примечание. * — $p < 0,05$ между первой группой (контрольной) и опытной; ** — доверительный интервал в группах не превышал 3–5%.

Таким образом, полученные результаты дают основание сделать следующие выводы:

1. Среди адгезивных клеток костного мозга присутствуют акцессорно-регуляторные элементы, обеспечивающие защитный потенциал миелотрансплантата. Регуляторная роль этих клеток в большей степени проявляется в отношении медуллярного кроветворения, влияя на селезеночное колониобразование лишь в условиях трансплантации костного мозга с измененным компонентным составом.

2. Тест экзогенного колониобразования коррелирует с защитным потенциалом пересаженного костного мозга при условии сохранения “полноты” миелотрансплантата. После криоконсервирования костного мозга по различным программам отмечается различное изменение содержания в нем регуляторных клеток, входящих в состав фракции АК. В этом случае тест колониобразующей активности костного мозга не коррелирует с его защитным потенциалом, что определяет необходимость выбора метода интегральной оценки морфофункционального состояния миелотрансплантата.

3. Thy-1,2^- и Thy-1,2^+ фракции костного мозга обладают различной способностью репопулировать кроветворные и лимфоидные органы облученных животных, а наиболее эффективной в восстановлении центрального органа иммунитета (тимуса) является фракция Thy-1,2^+ .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы микробиологических исследований. — Л.: Медицина, 1972. — 180 с.
2. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г. и др. Идентификация антигена Thy-1,2 на кроветворных предшественниках (КОЕ_c) и оценка его состояния после криоконсервирования костного мозга / ИПКиК АН УССР. — Харьков, 1990. — 51 с. — Деп. в ВИНТИ 18.07.90, № 4039-В90.

3. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д. и др. Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток (КОЕ_с) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Пробл. криобиол. – 1993. – № 4. – С. 34–38.
4. Дыгай А.М., Шахов В.П. Роль межклеточных взаимодействий в регуляции гемопоэза. – Томск: Изд.-во Томск. ун-та, 1989. – 224 с.
5. Криоконсервирование клеточных суспензий /Под ред. А.А.Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
6. Петров Р.М., Манько В.М. Взаимодействие Т-лимфоцитов со стволовыми кроветворными клетками // Итоги науки и техники. Иммунология. – 1986. – 15. – С. 109–148.
7. Чертков И.Л., Фриденштейн А.Я. Клеточные основы кроветворения. – М.: Медицина. – 1977. – 277 с.
8. Ярилин А.А., Мирошниченко И.В., Шарова Н.И. Взаимодействие клеток костного мозга, несущих "антиген стволовых клеток" и лишенных его в процессе селезеночного колониеобразования // Иммунология. – 1985. – № 6. – С. 49–52.
9. Greenberg P., Baker S. Immunological selection of hematopoietic precursors cells utilizing antibody-mediated plate binding ("penning") // Blood – 1985. – 65, № 1. – P. 190–197.
10. Goris H., Bungart B. Migration of stem cells and progenitors between marrow and spleen following thiampnicol treatment of mice // Exp. Hematol. – 1990. – 18, № 5. – P. 400–407.
11. Lebkowski J.S., McNally M.A. Long term reconstitution of all hematopoietic lineages in haplotype mismatched mice using purified bone marrow stem cells // Cell. Biochem. – 1992. – 16.A. – P. 190.
12. Venkataraman M., Westerman M.P. Susceptibility of human T-cells, T-cell subsets and B cells to cryopreservation // Cryobiology. – 1986. – 23, №2. – P. 199–208.

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

Поступила 03.11.94

О.Л.ЛУЦЕНКО, А.М.ГОЛЬЦЕВ, Т.Г.ДУБРАВА, Л.В.ОСТАНКОВА, О.В.ОПАНАСЕНКО

КРІОКОНСЕРВОВАНИЙ КІСТКОВИЙ МОЗОК: ПОТЕНЦІАЛ І ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ В УМОВАХ ЗМІНЕНОГО КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Проведена оцінка функціональної активності нативного і криоконсервованого міелотрансплантата із зміненим компонентним складом. Встановлено, що серед адгезивних клітин кісткового мозку присутні акцесорно-регуляторні елементи, котрі забезпечують захисний потенціал міелотрансплантата. Показано, що регуляторна роль цих клітин проявляється відносно як медулярного, так кровотворення у селезінці. Встановлено, що Thy-1,2⁻ і Thy-1,2⁺ фракції кісткового мозку мають різну здатність репопулювати кровотворні та лімфоїдні органи опромінених тварин. Відзначено, що тест екзогенного колонієутворення корелює з захисним потенціалом пересаженої гемопоетичної тканини за умовою збереження компонентного складу ("повноти") міелотрансплантата.

E.D.LUTSENKO, A.N.GOLTSEV, T.G.DUBRAVA, L.V.OSTANKOVA, E.V.OPANASENKO

CRYOPRESERVED BONE MARROW: POTENTIAL AND LIMITATIONS IN APPLICATION UNDER CHANGES IN COMPONENT COMPOSITION

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

There was conducted an assay of the functional activity of the native and cryopreserved myelotransplant with the altered component composition. It was found that among adhesive cells of the bone marrow there exist accessory-regulatory elements, which provide for protective potential of a myelotransplant. The regulatory role of these cells was shown to be manifested towards both medullary and spleen hemopoiesis. It was found that Thy-1.2⁻ and Thy-1.2⁺ of the bone marrow fraction possessed varying ability for regulating hemopoietic and lymphoid organs of irradiated animals. It was reported that the test of exogenous colony-formation correlates with the protective potential of the transplanted hemopoietic tissue providing the component composition ("completeness") of a myelotransplant was maintained.

В.В.Чеканова, Л.А.Ханина, В.К.Мазалов, В.И.Луговой**ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И КРИОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ
ОКСИЭТИЛИРОВАННЫХ АМИДОВ ПРИ КРИОКОНСЕР-
ВИРОВАНИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС**

Представлены результаты исследований цитотоксического и криозащитного действия оксиэтилированных амидов на клетки костного мозга крыс, определения зависимости их криозащитного действия от молекулярной массы и молекулярно-массового распределения. Показано, что оксиэтилированные ацетамиды со степенью полимеризации $n=3-4, 6, 9-10$ могут быть использованы в качестве криопротекторов для изучения их криопротекторной активности при замораживании клеток костного мозга.

Для замораживания клеток костного мозга широко применяются полиэтиленоксиды со степенью полимеризации от 2 до 90 и молекулярной массой от 100 до 4000 [5]. Лучшие результаты получены при использовании полиэтиленоксида-400 (ПЭО-400) [5], причем существенное значение в проявлении криозащитных свойств имеет молекулярно-массовое распределение в образцах ПЭО-400 [4]. Подобная зависимость криозащитного и токсического действий от молекулярной массы для клеток костного мозга определена также в гомологических рядах оксиэтилированных глицеринов и оксиэтилированных пентаэритритов [6]. Представляет интерес также исследование цитотоксического и криозащитного действия оксиэтилированных амидов на клетки костного мозга крыс, определение зависимости их криозащитного действия от молекулярной массы и молекулярно-массового распределения, что и явилось основной целью данной работы.

Оксиэтилирование амидов проводили в установке синтеза УС-1 производства ИПКиК НАН Украины с дискретной подачей окиси этилена с подогревом по методу [1]. Для получения миелокариоцитов были использованы 200 крыс линии Вистар, содержащихся в условиях вивария ИПКиК НАН Украины. После декапитации выделяли длинные трубчатые кости конечностей и вымывали миелокариоциты физиологическим раствором или средой Хенкса. Для изучения цитотоксичности в отношении клеток костного мозга растворы оксиэтилированных амидов смешивали с клеточной суспензией миелокариоцитов в соотношении 1:1 и выдерживали при комнатной температуре в течение 30-180 мин, контролируя их жизнеспособность через 1, 2, 3 ч [7]. Изучена цитотоксичность веществ в 15%-й концентрации (конечная концентрация в клеточной взвеси). Криоконсервацию клеток костного мозга крыс осуществляли по методу, разработанному авторами. Растворы оксиэтилированных амидов на среде Хенкса смешивали с клеточной суспензией костного мозга, как описано выше. Выдерживали при комнатной температуре 30 мин, затем замораживали в полиэтиленовых ампулах емкостью 1 мл по программе: 1 °С/мин до -12 °С, после 4-минутного интервала — 30 °С/мин до -80 °С с последующим погружением в жидкий азот (-196 °С). Образцы с клеточной суспензией хранили в жидком азоте от 2 недель до 3 мес; размораживали на водяной бане 42-43 °С со скоростью 50 °С/мин. Определяли общее количество клеток в камере Горяева и их жизнеспособность по окрашиванию трипановым синим [7]. В качестве контроля были использованы результаты эквивилляции клеток с ПЭО-400, а также с исходными "стартовыми" амидами. Жизнеспособность выделенных клеток находилась в пределах $(96 \pm 1,05) - (93 \pm 1,58) \%$.

Как видно из табл. 1, под влиянием формамида после 30-минутной экспозиции его 15%-го раствора с миелокариоцитами сохраняется только 30% жизнеспособных клеток. При увеличении времени экспозиции формамида с миелокариоцитами до 180 мин клетки полностью погибают. Оксиэтилированный формамид со степенью полимеризации $n=4$ обладает меньшей цитотоксичностью, чем исходный формамид, при 30-минутной эквивилляции этого

вещества сохраняется 38 % жизнеспособных клеток. Ацетамид проявляет несколько большую цитотоксичность по сравнению с ПЭО-400, особенно при увеличении времени экспозиции этих веществ с клетками ($P < 0,05$).

Цитотоксичность всех оксиэтилированных ацетамидов, особенно со степенью полимеризации $n=3-4$ оказалась достоверно ниже ($P < 0,05$), чем цитотоксичность ацетамида. Примерно такое же действие оказывает на клетки оксиэтилированный ацетилацетамид $n=5$, тогда как оксиэтилированный трифторацетилэтанолламин $n=7$ оказывал абсолютное цитотоксическое влияние, вызывая полную гибель клеток независимо от времени эквilibрации.

Т а б л и ц а 1

Влияние 15%-х растворов оксиэтилированных амидов на жизнеспособность миелокариоцитов крыс

Наименование вещества	Молекулярная масса	Степень полимеризации, n	Количество жизнеспособных клеток после экспозиции, %		
			30 мин	60 мин	180 мин
1. Полиэтиленоксид 15%-й (контроль)	400	7-8	$96,0 \pm 1,3$	$95,2 \pm 1,3$	$95,0 \pm 2,6$
2. Формамид			$30,0 \pm 0,5^*$	0	0
3. Формамид оксиэтилированный	200	4	$38,0 \pm 0,5^*$	0	0
4. Ацетамид	59	-	$91,5 \pm 1,5^*$	$88,5 \pm 2,0^*$	$83,0 \pm 0,6^*$
Оксиэтилированные:					
5. Ацетамид	213	3-4	$95,1 \pm 1,5$	$95,0 \pm 0,8$	$94,0 \pm 1,3^{**}$
6. Ацетамид	370	6	$95,2 \pm 1,5$	$95,0 \pm 0,8$	$90,5 \pm 4,3^{**}$
7. Ацетамид	420	7	$94,0 \pm 1,3$	$94,0 \pm 1,4$	$91,0 \pm 2,5^{**}$
8. Ацетамид	530	9-10	$93,0 \pm 1,2$	$92,8 \pm 1,3$	$91,2 \pm 2,5^{**}$
9. Ацетилацетамид	270	5	$95,0 \pm 1,3$	$91,0 \pm 1,3$	$89,0 \pm 2,4^{**}$
10. Трифторацетилэтанолламин	421	7	0	0	0

Примечание. * – различия достоверны; $P < 0,05$ по отношению к ПЭО-400; ** – $P < 0,05$ по отношению к ацетамиду.

На основании проведенного сравнительного анализа цитотоксического действия амидов и продуктов их оксиэтилирования можно прийти к заключению, что все оксиэтилированные производные обладают меньшей цитотоксичностью, чем исходные амиды. Анализ экспериментальных данных, приведенных в табл. 1, показал, что все оксиэтилированные производные ацетамида не проявляют отрицательного действия на клетки даже при эквilibрации в течение 3 ч. Введение дополнительной N - ацетильной группы в молекулу оксиэтилированного ацетамида также не увеличивает количество погибших клеток (соединение 9, табл. 1). При введении же в молекулу ацетамида перфторацетильной группировки, обладающей сильным акцепторным действием, амид становится цитотоксичным, вызывая гибель всех клеток в течение первых минут эквilibрации. При сравнении оксиэтилированных производных амидов, не обладающих цитотоксическим действием, с ПЭО-400 оказалось, что соединения обоих рядов достоверных различий не обнаруживают. Поэтому на следующем этапе изучались криопротекторные свойства оксиэтилированных амидов различной степени оксиэтилирования в сравнении с исходными амидами и ПЭО-400. Криозащитные свойства оксиэтилированных амидов изучались на клетках костного мозга крыс в диапазоне концентраций 5-15%. В качестве контроля также использован ПЭО-400 и исходные амиды.

Известно, что некоторые исходные амиды обладают высокой криопротекторной активностью при криоконсервировании различных биологических объектов [3,5]. При применении отдельных представителей ряда как криопротекторов для замораживания миелокариоцитов также были получены хорошие показатели сохранности клеток (табл. 2). Однако применение амидов в качестве криопротекторов ограничивается их высокой токсичностью на организменном уровне [2]. При испытании оксиэтильных производных формамида с молекулярными массами 89, 133, 177^{xx}, 220, 278 и степенью полимериза-

ции $n=1-5$ установлено, что эти соединения не обладают заметной криозащитной активностью по отношению к клеткам костного мозга, хотя после оттаивания в костномозговой взвеси, замороженной в растворах оксиэтилированного формамида с молекулярной массой 200, было обнаружено 18% жизнеспособных клеток, тогда как у формамида жизнеспособность клеток равна 0. Отсутствие криопротекторной активности у оксиэтилированных формамидов в отношении клеток костного мозга обусловлено их высокой цитотоксичностью еще на этапе эквilibрации до замораживания (табл. 3).

Т а б л и ц а 2

Жизнеспособность клеток костного мозга после замораживания-оттаивания в присутствии исходных амидов

Амид	$R - C(=O) - N \begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix}$			Количество жизнеспособных клеток, %
	R	R ₁	R ₂	
1. Формамид	H	H	H	0
2. <i>N,N</i> -диметилформамид	H	CH ₃	CH ₃	39,5±0,3
3. <i>N</i> -ацетамид	CH ₃	H	H	69,0±1,0
4. <i>N,N</i> -диметилацетамид	CH ₃	CH ₃	CH ₃	57,0±0,8
5. <i>N</i> -ацетилэтаноламин	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	H	28,0±0,4
6. <i>N</i> -метилацетамид	CH ₃	H	CH ₃	77,1±1,0
7. <i>N</i> -ацетилацетамид	CH ₃	CH ₃ CO	H	58,0±0,5

В присутствии 5%-го раствора оксиэтилированного метилацетамида обнаружена более низкая жизнеспособность миелокариоцитов (44,3%) по сравнению с исходным *N*-метилацетамидом, который оказывал более выраженный эффект в отношении этих клеток в такой же концентрации ($P<0,05$).

Сравнительный анализ криозащитных свойств *N*-ацетамида и оксиэтилированных *N*-ацетилацетамидов со степенью полимеризации $n=3, 4$ и молекулярными массами 225, 270 в 5%-х концентрациях на миелокариocyтах также показывает, что криопротекторные свойства *N*-ацетамида выше, чем у оксиэтилированных *N*-ацетилацетамидов. Из табл. 3 видно, что жизнеспособность миелокариоцитов под защитой оксиэтилированных ацетамидов со степенью полимеризации $n=3-4, 6, 9-10$ и молекулярными массами 213, 370, 530 в 15%-й концентрации выше, чем жизнеспособность миелокариоцитов под защитой исходного ацетамида ($P<0,05$). Оксиэтилированные производные *N*-ацетамида со степенью полимеризации 2-10 и их узкие фракции в 15%-й концентрации отличаются стабильными и высокими показателями криозащитной активности, практически не зависящими от молекулярной массы (соед. 10, 11, 12, 13, табл. 3). Жизнеспособность клеток после криоконсервирования под защитой находилась в пределах 78-81%, т.е. на уровне лучших образцов ПЭО-400.

Таким образом, показано, что введение оксиэтильных групп в молекулу изученных амидов приводит к изменению криозащитной активности исходных соединений, которое проявляется по-разному: оксиэтилирование амидов (формамида, *N*-метилацетамида) не оказывает существенного влияния на криозащитные свойства исходных веществ. Отмечено также, что оксиэтилирование *N*-метилацетамида приводит к снижению криозащитной активности амида в отношении клеток костного мозга. Во всех случаях, где оксиэтилирование приводило к увеличению криозащитной активности исходных веществ, повышение ее не превосходило криозащитной активности ПЭО-400, изученного как стандартного криопротектора для клеток костного мозга. Кроме оксиэтилированного ацетамида со степенью полимеризации 3-4, жизнеспособность клеток костного мозга после криоконсервирования была на уровне контроля (ПЭО-400). Однако следует сказать, что, в отличие от оксиэтильных производных *N*-ацетилэтанолamina, криопротекторная активность ПЭО-400

в значительной мере определяется молекулярно-массовым распределением компонентов в его составе [4], поэтому приведенное в качестве контроля высокое значение данного показателя для ПЭО-400 характерно лишь для образцов с оптимальным молекулярно-массовым распределением. Полученные данные дают основание полагать, что продукты оксиэтилирования *N*-ацетамида с различной степенью полимеризации $n=3-4, 6, 9-10$ могут быть использованы в качестве соединений для детального изучения их криопротекторной активности при замораживании клеток костного мозга и, возможно, других клеток и тканей.

Т а б л и ц а 3

Жизнеспособность клеток костного мозга после замораживания-оттаивания в присутствии оксиэтильных амидов

Наименование вещества	Средняя молекулярная масса	Степень полимеризации, n	Концентрация в клеточной суспензии, %	Жизнеспособность, %	
				до замораживания	после оттаивания
1. Полиэтиленоксид 15%-й (контроль)	400	—	15	96,8±0,5	80,5±0,9
2. Формамид	45	—	5	95,0±0,7	0
Оксиэтилированные:					
3. Формамид ^{xx}	89	1	5	94,0±0,7	3,7±0,05*
			15	93,0±0,7	9,5±0,1*
4. Формамид ^{xx}	133	2	5	94,0±0,7	0
			15	93,0±0,7	0
5. Формамид ^{xx}	177	3	5	94,0±0,7	0
			15	93,0±0,7	0
6. Формамид	220	4	5	94,0±0,7	18,0±0,2*
			15	94,0±0,7	0
7. Формамид	278	5	5	94,0±0,7	1,2±0,02*
			15	94,0±0,7	13,5±0,2*
8. Ацетамид	59	—	15	91,0±0,7	69,1±1,02**
9. <i>N</i> -ацетилэтаноламин	103	1	15	94,0±0,7	28,2±0,4**
Оксиэтилированные:					
10. Ацетамид ^x	213	3-4	15	95,0±0,7	81,2±1,1**
11. Ацетамид	370	6	15	94,8±0,7	78,2±0,9**
12. Ацетамид	420	7	5	93,0±0,7	25,2±0,3**
13. Ацетамид	530	9-10	15	94,4±0,6	79,2±1,1**
14. Метилацетамид	72	—	5	95,0±0,7	77,1±1,03**
15. Метилацетамид оксиэтилированный	230	4	5	95,0±0,7	44,3±0,6**
16. <i>N</i> -ацетилацетамид	101	—	5	94,0±0,6	58,0±0,5
Оксиэтилированные:					
17. Ацетилацетамид	225	3	5	94,0±0,7	53,2±0,7**
18. Ацетилацетамид	270	4	5	94,0±0,7	43,7±0,6**

Примечание: ^x — получен оксиэтилированием ацетилэтанолamina, ^{xx} — получен оксиэтилированием формилэтанолamina, * — различия достоверны: $P<0,05$ по отношению к ПЭО-400; ** — различия достоверны: $P<0,05$ по отношению к ацетамиду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов И.А., Шеломов И.К., Осипов О.А. и др. Дипольные моменты и строение этаноламинов карбоновых кислот // Журн. общ. хим. — 1966. — 36, № 2. — С. 189-194.
2. Лазарев Н.В. Вредные вещества в промышленности. — Л.: Химия, 1976, т. I. — 590 с.
3. Линник Т.П. Зависимость криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1986. — 19 с.
4. Луговой В.И., Шраго М.И., Ханина Л.А. и др. Криопротекторные свойства полиэтиленоксида-400 в зависимости от молекулярно-массового распределения // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. — Харьков, 1990. — С. 76-81.
5. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова А.И. и др. Криоконсервирование клеточных суспензий. — Киев: Наук. думка, 1983. — 240 с.
6. Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А. и др. Влияние криопротекторов на биологические системы. — Киев: Наук. думка, 1989. — 238 с.

7. Ashwood-Smith M.J., Warby C., Becker G. Low temperature preservation of mammalian cells in tissue culture with polyvinylpyrrolidone, dextrans and hydroxyethyl starch (Hes) // Cryobiology. – 972. – 9, № 5. – P. 441–449.

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

Поступила 18.01.94

В.В.ЧЕКАНОВА, Л.А.ХАНІНА, В.К.МАЗАЛОВ, В.Й.ЛУГОВИЙ

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ І КРІОПРОТЕКТОРНА АКТИВНІСТЬ ОКСИЕТИЛЬОВАНИХ АМІДІВ ПРИ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ПАЦЮКІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Подані результати досліджень цитотоксичної і кріозахисної дії оксietiльованих амідів на клітини кісткового мозку пацієнтів, визначення залежності їх кріозахисної дії від молекулярної маси і молекулярно-масового розподілу. Показано, що оксietiльовані ацетаміди із ступенем полімеризації $n=3-4, 6, 9-10$ можуть бути викоростані як кріопротектори для вивчення їх кріопротекторної активності при заморожуванні клітин кісткового мозку.

V.V.CHEKANOVA, A.A.KHANINA, V.K.MAZALOV, V.I.LOUGOVOY

CYTOTOXICITY AND CRYOPROTECTIVE ACTIVITY OF THE OXYETHYLATED AMIDES DURING CRYOPRESERVATION OF RAT BONE MARROW

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National cademy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

The report deals with the results of studying cytotoxic and cryoprotective action of the oxyethylated amides upon bone marrow cells of rats, determining the dependence of their cryoprotective action on molecular mass and molecular-mass distribution. The oxyethylated amides with the degree of polymerization of $n=3-4, 6, 9-10$ were shown to be used as cryoprotectants for investigating their cryoprotective activity when freezing bone marrow cells.

УДК 678:615.9:612.59:615.387

Н.В.Тимакова, В.М.Гучок, М.И.Шраго, Л.Т.Киричек,
А.Т.Ходько

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ КОНТЕЙНЕРОВ В ТЕХНОЛОГИЯХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ КЛЕТОК КРОВИ

Приведена оценка токсичности комбинированной полимерной пленки на основе фторопласта Ф4МБ по результатам острой токсичности криоконсервантов, хранившихся при различных температурных режимах в сделанных из этой пленки контейнерах. Не установлено достоверных изменений показателей острой токсичности исследуемых образцов после хранения в контейнерах из испытываемой пленки. Делается вывод о возможности и перспективности использования этого полимерного материала для изготовления контейнеров и применения их в технологиях криоконсервирования.

Возросшая опасность заражения реципиента ВИЧ, вирусным гепатитом В и другими тяжелыми инфекционными заболеваниями после переливаний крови, костного мозга и клинического применения других биологических объектов поставило перед трансфузиологами и трансплантологами новые задачи – модернизировать технологии получения препаратов таким образом, чтобы свести к минимуму риск при их использовании.

Остро стоят эти вопросы перед низкотемпературными банками крови и тканей, создающими запасы замороженного биологического материала для лечебных целей. Самым узким местом в технологиях криоконсервирования клеток и тканей в банках является отсутствие необходимой тары (контейнеров) одноразового использования для хранения гемопрепаратов в условиях

глубокого холода. Создание таких изделий является первоочередной задачей, решение которой даст возможность значительно снизить вероятность заражения реципиента.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины ведутся разработки контейнеров для низкотемпературного консервирования клеток крови и гемопоэтической ткани, пригодных для долгосрочного хранения биологического материала. Эти исследования предполагают выбор соответствующего материала для контейнеров, который сохранял бы заданные свойства как при положительной температуре, так и при температуре жидкого азота (-196°C), а также переносил перепады температур, не оказывал бы токсического влияния на содержащиеся в них объекты. На заключительном этапе разработок предполагается определение возможности их использования в технологиях криоконсервирования в банках для достижения сохранности морфологических и функциональных показателей объектов, получивших применение по медицинским показаниям и, наконец, оказались бы доступными для заданных целей. В настоящее время представляется наиболее перспективным материалом для изготовления контейнеров полимерные пленки, аналогичные получившим применение в банках крови за рубежом.

Мы остановили свой выбор на пленке на основе фторопласта Ф4МБ. Фармакологические исследования начали с определения показателей острой токсичности. Последние определяли в криоконсервантах, которые хранили в контейнерах при различных температурах: $(4 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, $(37 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ и -196°C . Перед заполнением контейнеров средами их подвергали тепловой стерилизации – выдерживали 60 мин в сухо-воздушных шкафах при температуре 180°C [4]. После стерилизации и заполнения контейнеров растворами их выдерживали 21–44 сут при заданной температуре.

Исследовали влияние полимерной пленки на два криоконсерванта, получивших широкое применение в банках при замораживании клеток крови: пропандиосахароль (ПДС) [2] и ЦНИИГПК 115 [3]. Таким же температурным воздействиям в идентичных условиях подвергали и 0,9%-й раствор хлористого натрия. Влияние материала контейнеров определяли также по методике ускоренного старения и выдерживали образцы при температуре $(60 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 21 сут, что соответствует хранению в течение 1 года [1].

Работа выполнена на 306 беспородных белых мышах обоего пола массой 18,0 – 23,0 г, 270 крысах линии Вистар обоего пола массой 200,0–300,0 г и 27 кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2,0–3,0 кг. При изучении острой токсичности на мышах и крысах криоконсерванты вводили однократно внутривентриально в дозах, возрастающих от максимально переносимых до абсолютно смертельных; кроликам в ушную вену со скоростью 3 мл в течение 5 мин. Контрольным животным вводили 0,9%-й раствор натрия хлорида в максимально допустимых количествах с соблюдением аналогичных условий опытов. Критерием оценки острой токсичности была гибель животных в течение 24 ч с момента введения препарата, при этом наблюдали за клиническим проявлением отравления. Наблюдение за выжившими животными продолжалось 14 сут. На основании полученного ряда доз определялись верхние параметры токсичности с вычислением среднесмертельных (LD_{50}) для мышей и крыс по методам [5, 6], для кроликов – по методу [7]. Рассчитывались коэффициенты видовой чувствительности. Вскрытие выживших животных производили под легким эфирным наркозом, состояние внутренних органов оценивали визуально и рассчитывали коэффициенты массы внутренних органов. Статистическую обработку полученных цифровых данных проводили методом вариационного ряда по критерию Стьюдента на ЭВМ «Электроника БЗ-23», достоверность различий оценивали с помощью t -критерия с 5%-м уровнем значимости.

Т а б л и ц а 1

Коэффициенты массы внутренних органов крыс при остром отравлении пропандиосахаролем и ЦНИИГПК 11₅ ($M \pm m$; $n=15$)

Группы животных, вещества, дозы	Массовые коэффициенты, г/100 г массы тела животных							
	Почки		Надпочечники		Печень	Селезенка	Сердце	Легкие
	Левое	Правое	Левое	Правое				
Контрольная 0,9% NaCl; 30 мл/кг	0,35±0,030	0,33±0,020	0,013±0,001	0,012±0,0030	2,69±0,060	0,40±0,076	0,35±0,092	0,76±0,064
Опытная ПДС; 12,6 г/кг	0,43±0,154	0,43±0,154	0,015±0,002	0,014±0,0038	2,55±0,085	0,39±0,047	0,35±0,092	0,80±0,050
Опытная ЦНИИГПК 11 ₅ ; 6 г/кг	0,26±0,030	0,27±0,015	0,013±0,008	0,012±0,0021	2,78±0,23	0,40±0,076	0,34±0,0079	0,69±0,026

Примечание. Различия показателей массы коэффициентов внутренних органов контрольных и опытных групп крыс и кроликов недостоверны ($P>0,05$).

В результате проведенного исследования получены данные, свидетельствующие о том, что парентеральное введение мышам и крысам криоконсервантов в летальных дозах вызывает острое отравление, проявляющееся резким общим угнетением, учащением дыхания, нарушением координации движений, периодическими тоническими судорогами, цианозом видимых слизистых и кожных покровов. Гибель животных наступала в период от 30 мин до 24 ч. Продолжительность жизни погибших мышей и крыс зависела от величины смертельной дозы. При введении криоконсервантов в дозах, близких к ЛД₅₀, интоксикация развивалась медленно и не достигла резкой выраженности. Выжившие животные постепенно приобретали исходную активность и к концу двухнедельного наблюдения по внешнему виду и поведению (двигательному, пищевому) приближались к практически здоровым. Масса тела их нарастала. При вскрытии таких животных макроскопически не обнаружено видимых отклонений по сравнению с контролем. При изучении коэффициентов массы внутренних органов подопытных и контрольных крыс, как видно из табл. 1, статистически достоверных изменений не выявлено.

Результаты исследований острой токсичности ПДС и ЦНИИГПК 11₅ на мышах, крысах и кроликах представлены в табл. 2. Полученные величины сравнивали с соответствующими исходными для тех же криоконсервантов.

Т а б л и ц а 2

Показатели острого смертельного отравления криоконсервантами пропандиосахаролем и ЦНИИГПК 11₅ до их хранения и хранившихся в контейнерах при различных температурных режимах для мышей, крыс и кроликов при парентеральном введении

Вещество	Вид животных	Пути введения	ЛД ₅₀ в г/кг (средняя величина и размах ее колебаний)				
			До хранения	При различных режимах хранения, °C			
				4	37	60	-196
0,9% NaCl	Мыши	Внутрибрюшинно	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
ПДС	Мыши	То же	14,2 (11,7-16,7)	14,1 (11,0-19,0)	14,1 (11,0-19,0)	14,8 (14,0-16,0)	14,1 (11,0-19,0)
ЦНИИГПК 11 ₅	Мыши	То же	7,9 (7,1-8,7)	8,9 (7,9-10,0)	8,9 (7,9-10,0)	11,2 (10,0-12,0)	8,9 (7,9-10,0)
0,9% NaCl	Крысы	То же	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
ПДС	Крысы	То же	11,8 (9,4-14,7)	11,2 (10,0-12,6)	11,2 (10,0-12,6)	11,2 (10,0-12,6)	11,2 (10,0-12,6)
ЦНИИГПК 11 ₅	Крысы	То же	4,8 (4,0-5,7)	4,5 (4,0-5,0)	4,5 (4,0-5,0)	4,5 (4,0-5,0)	4,5 (4,0-5,0)
0,9% NaCl	Кролики	То же	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
ПДС	Кролики	То же	~12,0	~12,6	~12,6	~12,6	~12,6

В условиях острых опытов при внутрибрюшинном введении ПДС мышам ЛД₅₀ составляет 14,1 (11,0±19,0) – 14,8 (14,0±16,0) г/кг; ЦНИИГПК 115 – 7,9 (7,1±8,7) – 8,9 (7,9±10,0) г/кг.

В серии исследований на крысах установлено, что при однократном внутрибрюшинном пути введения ПДС ЛД₅₀ составляет 13,0 (10,0±15,0) – 14,8 (14,0±16,0) г/кг; ЦНИИГПК 115 – 4,5 (4,0±5,0) – 4,8 (4,0±5,7) г/кг. У кроликов при внутривенном введении ПДС ЛД₅₀ составила ~12,0 – 12,6 г/кг. При введении физиологического раствора в максимально допустимых объемах гибели животных не отмечалось. Представленные данные свидетельствуют о том, что степень токсичности ПДС и ЦНИИГПК 115 в острых опытах на мышах, крысах и кроликах фактически не отличается от контроля (до хранения) и остается на низком уровне после хранения при разных температурных режимах.

Коэффициенты видовой чувствительности грызунов (в ряду мыши, крысы, кролики) при действии исследуемых криоконсервантов в различных диапазонах температур для ПДС колеблется в интервалах от 1,12 до 1,32, ЦНИИГПК 115 – от 1,43 до 2,48, что указывает на отсутствие видовой чувствительности животных к данным препаратам.

Температурные режимы, при которых хранились контейнеры с криоконсервантами, не оказали воздействия на полимерные композиции контейнеров, а следовательно, и на токсичность самих препаратов.

Таким образом, хранение криоконсервантов в полимерных контейнерах на основе фторопласта Ф4МБ при различных температурных режимах не влияет на их острую токсичность для лабораторных животных, что позволяет говорить о возможности его использования для контейнеров в технологиях криоконсервирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Временная инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода ускоренного старения при повышенной температуре:* Утв. МЗ СССР 22.08.79.
2. *Криоконсервирование эритроцитов под защитой криоконсерванта «Пропандиосахароль»:* Метод. рекомендации. – М.: Б.и., 1990. – 12 с.
3. *Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузий:* Метод. рекомендации. – М.: Б.и., 1980. – 47 с.
4. ОСТ 42-21-2-85.
5. *Прозоровский В.Б.* Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности // *Фармакол. и токсикол.* – 1962. – № 1. – С. 115–120.
6. *Прозоровский В.Б., Прозоровская В.М., Демченко В.М.* Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // *Фармакол. и токсикол.* – 1978. – № 4. – С. 497–502.
7. *Саноцкий И.В., Уланова И.П.* Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. – М.: Медицина, 1975. – 328 с.

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

Поступила 02.11.93

Н.В.ТІМАКОВА, В.М.ГУЧОК, М.Й.ШРАГО, Л.Т.КИРИЧОК, О.Т.ХОДЬКО
ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОПОЛІМЕРНИХ
МАТЕРІАЛІВ ДЛЯ КОНТЕЙНЕРІВ У ТЕХНОЛОГІЯХ
КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИН КРОВІ

Харківський медичний інститут,
Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м.Харків

Приведена оцінка токсичності комбінованої полімерної плівки на основі фторопласта Ф4МБ за результатами гострої токсичності криоконсервантів, які зберігаються при різних температурних режимах у зроблених із цієї плівки контейнерах. Не встановлено переконливих змін показників гострої токсичності досліджуваних зразків після зберігання у контейнерах з випробуваної плівки.

Зроблено висновок про можливість і перспективність використання цього полімерного матеріалу для виготовлення контейнерів і застосування їх у технологіях кріоконсервування.

N.V.TIMAKOVA, V.M.GUCHOK, M.I.SHRAGO, L.T.KIRICHEK, A.T.KHODKO

TOXICOLOGIC CHARACTERISTIC OF POLYMERIC MATERIALS FOR CONTAINERS IN TECHNOLOGIES OF BLOOD CELL CRYOPRESERVATION

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

The toxicity of the combined polymeric film, manufactured on the basis of a F4MB fluoroplast, was evaluated using the results of the acute toxicity of cryopreservatives, which were stored at various temperatures in the containers, made out of this film. We failed to observe significant alterations in the indices of the acute toxicity of the studied samples following storage in the above containers. We concluded on the possibility and expediency of utilizing this polymeric material for production of the containers and their application in cryopreservation technologies.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 616.2-002.77:615.832.9

С.Ю.Корнух, Б.П.Сандомирский

КРИОТЕРАПИЯ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ СУСТАВНЫХ ПРОЦЕССОВ

Обследовано 120 больных деформирующим остеоартрозом с различными стадиями данного процесса после криоорошения жидким азотом пораженных суставов. Стадия процесса определялась по рентгенологическим и биохимическим данным. Криотерапия рассматривалась и как самостоятельный метод, и в сочетании с другими общепринятыми методиками. Результаты проведенного исследования дают основание считать, что широкое внедрение криотерапии позволит значительно увеличить уровень медицинской, трудовой и социальной реабилитации больных.

Лечение заболеваний суставов является трудной и актуальной задачей большой социально-экономической значимости, так как эта группа заболеваний приводит к значительной потере трудоспособности и ранней инвалидизации [3], что обуславливает постоянный поиск новых перспективных методов лечения данной категории больных. Холодовое лечение используется в медицине преимущественно как аппликационное локальное воздействие на патологический очаг. Если определение зоны замораживания и деструкции тканей после криоаппликации не вызывает затруднений, то распределение температурных полей в биологическом объекте, подвергнутом охлаждению струей хладагента, в доступной литературе не освещено достаточно [2]. В то же время криотерапия патологического очага является перспективным приемом, который позволяет более равномерно и на большей площади получить желаемые параметры охлаждения [4]. В настоящее время является актуальным исследование применения данной методики при заболеваниях суставов, выработка определенных параметров воздействия при различных стадиях изучаемой патологии. Криотерапия ревматических заболеваний, таких как артроз, артрит может проводиться с помощью воздействия на ткани низкотемпературной струей жидкого азота, и лечебный эффект связан преимущественно с воздействием низких температур на механизмы терморегуляции организма через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему, а также с увеличением периферического кровообращения [1].

В поликлиническом объединении №10 г. Иркутска проведено лечение больных с деструктивными суставными процессами методом криоорошения пораженных суставов с помощью аппарата Крио-7. Обследованы 120 больных деформирующим остеоартрозом в возрасте от 45 до 71 года, которые отбира-

лись в три равные группы. 1-я группа (А) — это пациенты, с неизменными лабораторными показателями, без явлений реактивного синовита, с начальными нарушениями функции суставов без рентгенологических признаков, с давностью заболевания до 5 лет. 2-я группа (В) — это больные с наличием реактивного синовита и стойким нарушением функции суставов с рентгенологическим подтверждением при давности заболевания до 7 лет. В анамнезе при лечении данной группы больных интроартикулярное введение лекарственных веществ не применялось. 3-я группа (С) — это пациенты с выраженными явлениями реактивного синовита, с выраженным нарушением функции суставов и рентгенологическими признаками внутрисуставного процесса с давностью заболевания более 7 лет. В анамнезе при лечении этой группы больных неоднократно применялось интроартикулярное введение лекарственных веществ.

Артрологический статус исследовался по критериям, выработанным Американской Ассоциацией ревматологов, то есть оценивался суставной синдром: боль при пальпации и субъективно, число пораженных суставов, наличие реактивного синовита, окружность и амплитуда движения в суставах, функция суставов по стадиям. Результаты лечения оценивались по четырем ступеням: ухудшение, без перемен, улучшение, значительное улучшение. В группах А и В выделены подгруппы, в которых лечение проводилось сочетанием криолечения с базисной терапией (артепорон, румалон, мукартрин) или применялись неспецифические противовоспалительные средства (НПВС) (ортафен, индометацин, др.). В группе С выделена подгруппа, в которой криотерапию сочетали с введением лекарственных препаратов интроартикулярно.

Криотерапия проводилась ежедневно, количество процедур зависело от наступления стойкого клинического эффекта, вариабильность от 5 до 10 процедур, время воздействия зависело от интенсивности потока жидкого азота, ткани над пораженным суставом обрабатывались до выраженной гиперемии. Параметры процесса охлаждения были выбраны, исходя из требований умеренного охлаждения здоровой биоткани, не приводящего к необратимым изменениям в ней, то есть после снятия охлаждения здоровая биоткань возвращалась в свое исходное состояние. Противопоказанием для данной методики является холодовая аллергия и нарушение целостности кожных покровов над суставом, который подвергается криовоздействию. Во всех группах, где проводилась криотерапия, наблюдалось уменьшение отечности периартикулярных тканей, стабилизация реактивного синовита за счет уменьшения количества синовиальной жидкости, исчезновение или значительное уменьшение боли, увеличение или восстановление амплитуды движения в суставах.

В 1-й группе минимальный положительный эффект наблюдался у 21 (70%) больного к 3-й процедуре, у 8 (26,7%) — ко 2-й процедуре, у 1 (3,3%) — к 4-й процедуре. Максимальный положительный эффект наблюдался у 27 (90%) после 5–6 процедур, у 3 (10%) пациентов после 7–8 процедур. Такой разброс в количестве процедур обусловлен различной локализацией процесса. При локализации патологического очага в мелких суставах кистей и стоп разумна кратность воздействия равная 6 процедурам, при локализации в коленных, локтевых, голеностопных суставах — до 7 процедур, в плечевых — до 5 процедур, в тазобедренных суставах количество воздействий зависит от выраженности подкожной жировой клетчатки над суставом, процедур не менее 8. В этой группе применение НПВС не дает выраженного усиления лечебного эффекта, поэтому целесообразно применение только криотерапии. У 11 (36,7%) пациентов достигнуто значительное улучшение, у 19 (63,3%) — улучшение.

Можно сделать выводы, что криотерапия на разных стадиях деформирующего остеоартроза позволяет в короткие сроки добиться хороших результатов в лечении. Замечена такая особенность: чем ярче выражен болевой синд-

ром, тем более эффективной оказывается криотерапия. Это обусловлено действием холода на периартикулярные ткани, воспаление в которых является основополагающим фактором болевого синдрома. При применении базисной терапии у многих больных появляется усиление боли в суставах. Таким пациентам можно рекомендовать ее сочетание с криотерапией, так как на фоне криоорошения переносимость препаратов улучшается.

Во 2-й группе (В) всем больным курс лечения составил в среднем 8–10 процедур. Эффект после лечения лучше у больных, у которых выражен болевой синдром, что не всегда зависит от выраженности синовита. После лечения у 7 (24%) больных — значительное улучшение, у 20 (66%) — улучшение, у 3 (10%) — без изменения. Трем (10%) пациентам с незначительным результатом после лечения было рекомендовано удаление синовиальной жидкости из сустава с последующей криообработкой, после этого эффективность процедур увеличивалась. Наличие у больных реактивного синовита задерживало процесс лечения и требовало большего количества криопроцедур. Уменьшить количество криовоздействий на пораженный сустав до 10–12 возможно лишь при сочетании криоорошений с эвакуацией синовиальной жидкости из сустава. При этом мы отказались от интроартикулярного введения лекарственных препаратов, что само по себе несет угрозу осложнений. Можно сделать выводы, что в группе В криотерапию можно широко применять, так как эта методика позволяет в короткий срок восстановить объем движений в пораженном суставе и уменьшить выраженность болевого синдрома, что отмечалось у 27 (90%) пациентов. Больным с выраженным реактивным синовитом рекомендуется сочетанная методика. Применение НПВС в данной группе больных оправдано в течение 2–3 недель: в дозировке 150–200 мг в сут в течение 1,5–2 недель с последующим уменьшением дозировки в два раза.

В группе С всем больным ранее вводились стероидные гормональные препараты интроартикулярно. Выяснить зависимость эффективности криотерапии от кратности курсов внутрисуставного введения лекарственных препаратов не удалось, так как исходное состояние сустава от этого не зависит. По-видимому, переносимость интроартикулярного введения лекарственных препаратов является индивидуальной особенностью каждого исследуемого случая. В целом, эффективность криотерапии в данной группе больных менее выражена; это, вероятно, связано с действием гормональных препаратов на клетки внутрисуставного хряща, что ведет к его постепенному разрушению и усугублению нарушения функции движения в пораженных суставах. Учитывая вышесказанное, в этой группе больных у 13 (60%) пациентов отмечалось улучшение, а у остальных пациентов улучшение достигалось при применении не только НПВС, но и эвакуации из сустава синовиальной жидкости, причем у 6 (20%) больных применялось введение лекарственных препаратов интроартикулярно. Можно сделать выводы, что у этой группы больных применение криотерапии позволяет в некоторых случаях избежать интроартикулярного введения лекарственных веществ или сократить количество интроартикулярных вмешательств с сохранением выраженного положительного эффекта.

В процессе лечения все больные переносили криовоздействие хорошо. Обостренная чувствительность к холоду на первой процедуре постепенно ослабевала, и остальные переносились без неприятных ощущений. Таким образом, криотерапия является не только самостоятельным методом лечения дегенеративных заболеваний суставов, но и вспомогательным при применении лекарственной терапии, облегчает применение препаратов хряща, улучшая их переносимость больными. Значительно расширяется спектр помощи больным с непереносимостью НПВС, физиотерапии (электро-, магнитотерапия и др.) из-за сердечно-сосудистых заболеваний, гинекологической патологии, патологии желудочно-кишечного тракта. Поэтому в данных случаях криотерапия является самой эффективной и наиболее безопасной методикой. При

этом наступает более ранняя реабилитация больных с деформирующим остеоартрозом, так как после воздействия холодом, амплитуда движений в пораженных суставах значительно возрастает, что ведет к сокращению дней временной нетрудоспособности. Отмечено, что у данной категории больных уменьшается риск осложнений после интраартикулярного введения лекарственных веществ, так как в ряде случаев криотерапия позволяет не применять внутрисуставное введение лекарственных препаратов. Сочетанное лечение, то есть применение внутрисуставного введения с последующей криообработкой также оправдано, так как восстановить объем движения в суставе и уменьшить болевой синдром возможно за более короткий срок, а также возможно уменьшение количества интраартикулярных введений.

Орошение хладагентом патологического очага имеет большое значение как метод медицинской профилактики начальных проявлений деформирующего остеоартроза, что позволяет отдалить более серьезные нарушения функции в пораженных суставах. Результаты проведенного исследования дают основание считать, что внедрение криотерапии дегенеративных суставных процессов как эффективного, экономичного, не дающего осложнений метода в широкую практику позволит значительно увеличить уровень медицинской, трудовой и социальной реабилитации данной категории больных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Локальная терапия при ревматических заболеваниях: Тез. докл. Всесоюз. конф. – М., 1988. – 139 с.
2. Практическая криомедицина / Под ред. В.И.Грищенко, Б.П.Сандомирского. – Киев: Здоров'я, 1987. – 248 с.
3. Ремус Н. Диагностика ревматических заболеваний. – Бухарест: Медицинское издательство, 1975. – 320 с.
4. Сандомирский Б.П., Хворостов Е.Д., Брехов Е.И. Низкие температуры и лазеры при лечении заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки. – Киев: Наук. думка, 1989. – 192 с.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков,
Поликлиническое объединение № 10, г. Иркутск

Поступила 28.08.94

С.Ю.КОРНУХ, Б.П.САНДОМИРСЬКИЙ

КРІОТЕРАПІЯ ДЕГЕНЕРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ В СУГЛОБАХ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м.Харків,
Поліклінічне об'єднання № 10, м. Іркутськ

Обстежено 120 хворих деформуючим остеоартрозом з різними стадіями процесу після криозрошення рідким азотом уражених суглобів. Стадія процесу визначалась по рентгенологічних та біохімічних показниках. Кріотерапія розглядається як самостійний метод, а також у комплексі з іншими загально застосованими методиками. Результати проведеного дослідження дають змогу вважати, що широке впровадження кріотерапії дозволить значно підняти рівень методичної, трудової та соціальної реабілітації хворих.

S.Yu.KORNUKH, B.P.SANDOMIRSKY

CRYOTHERAPY OF DEGENERATIVE ARTICULAR PROCESSES

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National
Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov
Clinical Corporation №10, Irkutsk

There were examined 120 patients with deforming osteoarthritis with different stages of this process following cryospraying of the affected joints with liquid nitrogen. The stage of the process was identified by the X-ray and biochemical data. Cryotherapy was applied both independently and in combination with other routinely used methods. The results of the investigations conducted made it possible to conclude on the wide introduction of cryotherapy into clinical practice to considerably expand the level of the medical, labour and social rehabilitation of patients.

N. Fujihara, S. Oboshi, J. Zhao

GENETICAL CONTROL OF THE FREEZABILITY OF ROOSTER SPERMATOZOA

It has already been suggested that the freezability of rooster spermatozoa might be controlled genetically by selecting males for the tolerance of spermatozoa to freeze-thaw [1-5]. An obvious difference has also been observed in membrane function of spermatozoa among individual male birds [6]. The previous experiments have suggested that the commercial males produced spermatozoa whose membrane was probably more cohesive and rigid than the membrane of the spermatozoa from the selected line males [7].

Concerning the mode of action of cryoprotectants [11-13], cryoprotective substances like glycerol and DMSO confer cryoprotection by permeating the cell. Thus, cells more permeable to these cryopreservatives tend to withstand slow freezing injury better than the less permeable cells [1]. It has also been reported that the survival of human red cells frozen under conditions where little intracellular glycerol was present was lower than that of cells frozen after equilibration with glycerol [8]. However, other reports demonstrated that protection of bovine red cells from freezing damage did not require the permeation of glycerol into cells at the start of freezing [14]. Recently, it has been reported that high post-thaw survival of rat pancreatic cells required full permeation of glycerol and DMSO into the cells [15].

It was postulated that the selection of males for increased fertility of frozen-thawed rooster spermatozoa using glycerol as cryoprotective agent may imply the increased ability of the spermatozoa to take up glycerol [7].

On the one hand, cholesterol has been reported to cause a reduction in the permeability of glycerol through membrane transport systems [8-10].

In the present study, therefore, membrane function of rooster spermatozoa was examined by the method of determining the uptake rate of non-metabolizable chemicals such as α -aminoisobutyric acid (AIB), 2-deoxy-D-glucose (2DG), and a cryopreservative glycerol by sperm cells from two male lines, i.e. commercial control and genetically selected birds [1].

For the experiment, semen was collected by the lumbar massage method, then pooled, washed twice with non-glycerolized diluent [16] and diluted with the same solution to prepare sperm suspension containing $1.0-3.0 \times 10^9$ cells/ml.

Prior to the experiment of uptake rate, spermatozoa from two line males were frozen without cryoprotective agent to examine the tolerance of spermatozoa to freezing and thawing.

Following the experiment, the uptake rates of AIB, 2DG and glycerol by sperm cells of both male lines were determined.

The uptake rates by rooster spermatozoa of non-metabolizable substances such as α -aminoisobutyric acid (AIB), 2-deoxy-D-glucose (2DG), and a cryoprotectant glycerol were measured. Male birds used here were from two lines, commercial broiler males and genetically selected broiler line males, which were selected for the duration of fertility of frozen-thawed spermatozoa for seven years (generation 7). The freezability of rooster spermatozoa was shown to be controlled by the genetical selection of males. In particular, the uptake rates of AIB, 2DG and glycerol by the sperm cells from the selected male lines increased significantly (p) as compared with those from the control commercial males. Fertilizing ability and motility score of the spermatozoa from the selected male lines was greatly higher (p) than those from the commercial males. Therefore, these results suggest that with rooster spermatozoa, more than simple diffusion system may be involved in the uptake of glycerol to enhance its cryoprotective effects. This experiment also lead to the conclusion that membrane function of the rooster spermatozoa could be controlled genetically, and the fertilizing ability of the frozen-thawed spermatozoa from the selected male lines was significantly improved (p).

In particular, the former two chemicals have been considered to be transported into sperm cells via carrier-mediated process [1].

Collectively, these findings may indicate the possibility of genetical selection of male birds for the tolerance of spermatozoa to freezing and thawing.

REFERENCES:

1. Ansah G.A., Buckland R.B. The uptake of glycerol, α -aminoisobutyric acid and 2-deoxy-D-glucose by spermatozoa of a line of chicken selected for fertility of frozen-thawed semen and a control line // *Theriogenology*. - 1982. - 17. - P. 401-408.
2. Fujihara N., Buckland R.B., Koga O. Transport of α -aminoisobutyric acid into chicken and turkey spermatozoa // *Proc. Vth World Conf. Anim. Prod.*, Tokyo. - 1983. - V. 2. - P. 185-186.
3. Fujihara N., Koga O. The uptake of amino acid and glucose by chicken spermatozoa // *Develop. Growth Differ. Suppl.* - 1986. - P. 43.

4. Fujihara N., Koga O. Uptake of α -aminoisobutyric acid (AIB) by rooster spermatozoa // Asian-Aust.J.Anim.Sci. – 1990. – 3. – P. 91-96.
5. Fujihara N., Koga O. Transport of α -aminoisobutyric acid (AIB) into turkey spermatozoa // Pharmacol. (Life Sci.Adv.). – 1990. – P. 686-696.
6. Fujihara N., Koga O. Physiological differences in membrane functions between cryopreserved chicken and turkey spermatozoa // Cryobiology. – 1991. – 28. – P. 573-574.
7. Ansah G.A., Buckland R.B. Genetic variation in fowl semen cholesterol and phospholipid levels and the relationship of these lipids with fertility of frozen-thawed and fresh semen // Poultry Sci. – 1982. – 61. – P. 623-637.
8. Lovelock J.E. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing // Biochim.Biophys.Acta. – 1953. – 11. – P. 28-36.
9. Meryman H.T. Freezing injury and its prevention in living cells // Ann.Rev.Biophys.Bioenerg. – 1974. – 3. – P. 341-363.
10. Meryman H.T., Williams R.J. and Douglas M.St.J. Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection // Cryobiology. – 1977. – P. 287-302.
11. De Gier J., Mandershoot J.G., van Deenen L.L.M. Lipid composition and permeability of liposomes // Biochim.Biophys.Acta. – 1968. – 150. – P. 666-675.
12. Bruckdorfer K.R., Demel R.A., De Gier J., van Deenen L.L.M. The effect of partial replacements of membrane cholesterol by other steroids on the osmotic fragility and glycerol permeability of erythrocytes // Biochim.Biophys.Acta. – 1969. – 183. – P. 334-345.
13. Deuticke B. Properties and structural basis of simple diffusion pathways in the erythrocyte membrane // Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol. – 1977. – 78. – P. 1-97.
14. Mazur P., Miller R.H., Leibo S.P. Survival of frozen-thawed bovine red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose // J.Membrane Biol. – 1974. – 15. – P. 137-158.
15. Rajotte R.V., Mazur P. Survival of frozen-thawed fetal rat pancreases as a function of the permeation of dimethylsulfoxide and glycerol, warming rate, and fetal age // Cryobiology. – 1981. – 18. – P. 17-31.
16. Lake P.E., Stewart J.M. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen – an improved method // Br.Poultry Sci. – 1978. – 19. – P. 187-194.
17. Fujihara N., Buckland R.B. Effect of different freezing rates on fertilizing ability of frozen-thawed chicken spermatozoa // Jpn.J.Anim.Reprod. – 1987. – 33. – P. 11-14.

Laboratory of Animal Reproduction
Department of Animal Sciences
College of Agriculture Kyushu University,
Hakozaki, Fukuoka Japan

Accepted on January 20, 1995

УДК 57.043

И.И.Шиманко, Н.П.Суббота, Ю.Н.Лебедева, Н.В.Васина

ПРИМЕНЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ С ЦЕЛЬЮ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

За последние годы научными разработками биохимиков, цитологов, физиологов удалось доказать, что гепатоциты, выделенные из целого органа, находясь во взвешенном состоянии в субстрате, обладают всеми органоспецифическими функциями. Мы располагаем многолетним опытом использования изолированных гепатоцитов с многократным (от 2 до 12 сеансов) их применением у одного больного. Гепатоциты получали ферментно-механическим методом с использованием коллагеназы или метода вибрации. К полученной массе клеток добавляли равное количество раствора Хенкса. Взвесь центрифугировали во флаконах по 250 мл со скоростью до 1000 об/мин в течение 5 мин. Осадок гепатоцитов расфасовывали по 50 мл взвеси клеток в каждом и заполняли средой 199 по 500 мл. В 1 мл полученной таким образом взвеси содержится $2 \cdot 10^7$ клеток. Для оценки жизнеспособности гепатоцитов использовалась суправитальная окраска трипановым и метиленовым синим с последующим подсчетом клеток в камере Горяева. Параллельно с морфологическими методами проводились биохимические исследования, изучалась способность гепатоцитов синтезировать мочевины и захватывать ксенобиотик бифенил. В большинстве случаев 80% полученных гепатоцитов морфологически сохранены и функционально активны. Взвесь клеток, помещенную в среду 199, хранили при температуре 4 °C.

Гепатоциты применяли у больных с острой и хронической печеночной недостаточностью в качестве компонента биологической диффузионной системы. Показанием к клеточному диализу явились тяжелые формы острой печеночной недостаточности с резко выраженным эндотоксикозом и нарушением основных показателей гомеостаза. Для приготовления биологического диализирующего раствора брали клеточную взвесь из расчета 5–10 мл клеток на 1 кг массы больного. Гепатоциты разводили в растворе Хенкса и помещали в капиллярный диализатор. Подключение

проводилось с использованием артерио-венозного шунта или кубитальных вен. Перфузия осуществлялась с помощью роликового мотора или аппарата "искусственная почка" со скоростью 50–80 мл/мин в течение 1–2 ч. Об эффективности применения гепатоцитов судили по уменьшению проявлений токсической энцефалопатии, улучшению клинического состояния больных, динамике снижения билирубина, фракций, трансаминаз, уменьшению эндотоксикоза, который оценивался по уровню средних молекул.

Приводились клинические наблюдения. Больной К. 36 лет находился в отделении острой печеночно-почечной недостаточности с диагнозом — "Отравление дихлорэтаном. Острая печеночно-почечная недостаточность (ОППН)". Из анамнеза: с суицидальной целью принял 15 мл дихлорэтана. При поступлении: жалобы на слабость, боли в правом подреберье. В сознании, сонлив, заторможен. Выраженная иктеричность склер, кожных покровов. Печень + 5 см из-под края реберной дуги, увеличена селезенка. Больному проведены лечебные мероприятия по выведению яда из организма. Однако несмотря на проводимую терапию, у больного развилась ОППН. На 4-е сут после отравления больному, наряду с сеансами гемодиализа, начато лечение диализом с использованием аллогенных гепатоцитов. Было проведено 5 клеточных диализов с интервалом в 1–2 дня. После проведенного лечения больной стал активен, появился аппетит, улучшился сон, сознание ясное. Отмечена положительная динамика со стороны биохимических показателей: уровень общего билирубина снизился с 300 мкмоль/л до нормальных цифр, аспартатаминотрансфераза (АсАТ) с 3,2 до 0,5 мкмоль час/мл, аланинаминотрансфераза (АлАТ) с 8,4 до 0,8 мкмоль час/мл. Отмечено улучшение печеночного кровотока по данным доплерографии.

Больная М. 48 лет поступила с диагнозом: "Биллиарный цирроз печени". При поступлении состояние средней тяжести. Беспокоит кожный зуд, слабость, тяжесть в правом подреберье, в анализах крови имеется выраженная билирубинемия, ферментемия. Больной проводились консервативные методы лечения и некоторые хирургические — плазмаферезы. Состояние больной не улучшалось, поэтому в комплекс проводимой терапии были включены клеточные гемодиализы со свиными гепатоцитами. После проведения 8 клеточных диализов значительно улучшилось самочувствие больной, появился аппетит, уменьшились слабость, кожный зуд, улучшились биохимические показатели крови. Отмечается снижение билирубинемии, ферментемии, улучшилась экскреторная функция гепатоцитов по данным вофавердиновой пробы. Больная выписана в удовлетворительном состоянии. Таким образом, применение изолированных гепатоцитов в клинической практике у самых тяжелых больных с эндотоксикозом дает обнадеживающие результаты.

Однако при гипотермических температурах гепатоциты могут храниться непродолжительное время. Доказано, что уже через 48 ч хранения количество жизнеспособных клеток уменьшается на 50%. Заготовленные гепатоциты, как правило, не удается использовать полностью. Ограничена возможность транспортировать гепатоциты на большие расстояния. В связи с этим более перспективным является применение для лечения печеночной недостаточности криоконсервированных гепатоцитов. Гипотермическое хранение печеночных клеток можно использовать как этап для подготовки гепатоцитов к криоконсервации.

НИИ СП им. Н.В.Склифасовского, г. Москва,
Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступило 09.03.95

УДК 57.043:543.831 + 543.45

Л.А.Ханина, С.В.Коций, А.М.Воротилин, В.И.Луговой

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ

Лекарственные формы криопротекторных соединений представляют собой двух- и более компонентные системы, в которых необходимо определение количества основного вещества. В последние годы отделом криопротекторов ИПКиК НАН Украины предложены и внедряются в медицинскую практику две лекарственных формы, содержащие криопротекторные вещества — растворы "Криополиосм" и "Пропандиосахароль". В растворе "Криополиосм", предназначенном для инъекций, в качестве осмодиуретического средства субстанцией, требующей количественного контроля, является криополиэтиленоксид-400 (КПЭО-400). В криопротекторе для консервирования эритроцитов "Пропандиосахароле" объектом контроля содержания в препарате служит 1,2-пропандиол (1,2-ПД).

Разработанные ранее спектрофотометрические методы определения ПЭО-400 [1] и ПД-1,2 [4] в препаратах, основанных на образовании и количественном определении окрашенных комплексов ПЭО-400 с нитритом натрия и производных 1,2-ПД с хромотроповой кислотой, трудоемки, многостадийны, требуют дефицитных и дорогостоящих химических реактивов. При разработке фармакопейных статей на лекарственные формы криополиэтиленоксида-400 и 1,2-пропандиола в ИПКиК НАН Украины был предложен рефрактометрический метод определения этих соединений в их лекарственных формах.

Точность данного метода определяется соотношением между точностью определения показателей преломления и разницей в показателях преломления определяемых соединений КПЭО-400 или 1,2-ПД и соответствующих растворов, содержащих остальные компоненты лекарственных форм согласно рецептуре для "Криополиосма" и "Пропандиосахароля".

При измерении показателей преломления на рефрактометре ИРФ-22 оказалось, что разница указанных величин для КПЭО-400 с остальными компонентами лекарственной формы составляет 0,02, а для 1,2-ПД и компонентов его раствора — 0,03. Данный факт в сочетании с прямолинейной зависимостью коэффициентов преломления растворов указанных веществ от их концентрации в широком интервале (0–80%) обуславливает возможность определения КПЭО и 1,2-ПД в соответствующих препаратах, а также в других растворах с точностью порядка десятых процента [3].

По результатам измерения коэффициентов преломления специально приготовленных растворов точно известного состава (искусственных смесей) были построены калибровочные кривые (рисунок). Смесей известного состава готовили весовым (для КПЭО-400) и объемно-весовым (для "Пропандиосахароля") методами. Для расчета содержания КПЭО применили способ, сущность которого состоит в том, что после промера коэффициентов преломления эталонных растворов по графику вычисляют фактор F , равный величине прироста показателя преломления при увеличении концентрации вещества на 1%. При определении соответствующих величин оказалось, что F для КПЭО-400 составляет $1,3 \cdot 10^{-3}$, а для 1,2-ПД — $1,1 \cdot 10^{-3}$. Содержание вещества рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{n_D^{20} - n_D^0}{F},$$

где n_D^{20} — показатель преломления соответствующего препарата при температуре 20 °С; n_D^0 — показатель преломления раствора препарата, не содержащего субстанцию; F — величина прироста показателя преломления при увеличении концентрации соответствующего вещества в препарате на 1%.

Основное преимущество рефрактометрического способа состоит в том, что источники систематических ошибок легко исключаются одновременным измерением показателей преломления раствора препарата и его компонентов на одном и том же приборе в одинаковых условиях. В качестве примера приводим экспериментальные данные по определению концентрации КПЭО-400 в растворе "Криополиосм" для инъекций в сравнении с эталонными растворами. Статистическую обработку результатов проводили по методу наименьших квадратов [2]. В таблице представлены метрологические характеристики метода количественного определения вещества на модельной смеси раствора "Криополиосм" для инъекций.

Результаты определения и статистической обработки данных концентраций КПЭО-400 методом рефрактометрии

$C_{\text{ввс}}$	n_D^{20}	Снайф	$\bar{x}$	$\bar{x} - x_i$	P	Δx	ε	$C_{\text{выч}}$
14,95	1,3534	15,11	15,03	0,08	0,95	0,148	0,98	15,03±0,15
	1,3532	14,96		0,07				
	1,3533	15,02		0,01				
	1,3535	15,18		0,15				
	1,3531	14,88		0,15				

Примечание. Символы статистических величин представлены по [2].

Как видно из приведенных данных, достоверных различий содержания КПЭО-400 в растворе и определенных рефрактометрическим методом не выявлено, что указывает на пригодность данного метода для количественного определения субстанции в готовых лекарственных средствах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Верховская Л.З., Шраго М.И., Ханина Л.А. Количественное определение полиэтиленоксида в моче // Лаб. дело. — 1984. — № 2. — С. 121–122.
2. Государственная Фармакопея СССР. XI издание. Вып. I. — М.: Медицина, 1987. — 334 с.
3. Иоффе Б.В. Рефрактометрические методы в химии. — Л.: Химия, 1983. — С. 121–122.
4. Лоевский М.М., Воротилин А.М. Колориметрический метод определения остаточного 1,2-пропандиола в размороженных эритроцитах // Криобиология и криомедицина. — 1983. — Вып. 13. — С. 77–78.

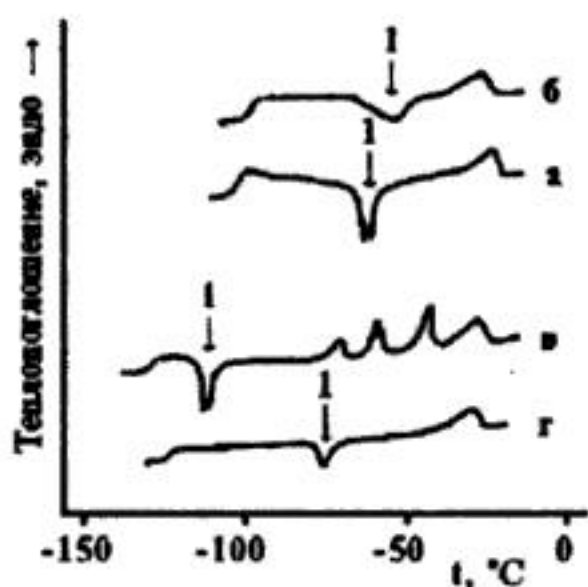
Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН Украины, г. Харьков

Поступило 01.02.94

О ВЛИЯНИИ САХАРОЗЫ НА НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЕ ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В РАСТВОРАХ НЕКОТОРЫХ КРИОЗАЩИТНЫХ ВЕЩЕСТВ

Сахароза входит в состав ряда многокомпонентных криозащитных веществ, который подобран эмпирически. Обычно ее содержание в таких криозащитных системах невелико по сравнению с другими неводными добавками. Например, в криозащитном растворе пропандиосахароль добавка сахарозы составляет 3% [3], в консерванте гепатоцитов – 8,5 % [4]. Физический механизм действия таких небольших добавок сахарозы изучен недостаточно. Целью настоящей работы явилось исследование влияния сахарозы на низкотемпературные фазовые переходы в растворах этиленгликоля (ЭГ) и 1,2-пропандиола (1,2-ПД) в диапазоне температур $0 \div -196^\circ\text{C}$ при охлаждении и нагреве со скоростями близкими к тем, которые используются при низкотемпературном консервировании биологических систем.

Использовали низкотемпературный дифференциальный калориметр, разработанный в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [2], позволяющий снимать термограммы при нагреве образцов после их охлаждения с любой скоростью вне калориметра. Растворы готовили из 1,2-ПД и ЭГ квалификации ХЧ (Россия). Объем образцов составлял 0,5 мл. Образцы охлаждали погружением ячейки с раствором в жидкий азот, средняя скорость охлаждения при этом составляла $200^\circ\text{C}/\text{мин}$, затем ячейку с образцом помещали в предварительно охлажденный до -196°C калориметр. Термограмму регистрировали при нагреве со скоростью $-0,5^\circ\text{C}/\text{мин}$.



Термограммы водных растворов 1,2-ПД: *а* – 50%-й водный раствор 1,2-ПД, *б* – 50%-й водный раствор 1,2-ПД с добавкой 10 мас.% сахарозы; *в* – 50%-й водный раствор ЭГ; *г* – 50%-й водный раствор ЭГ с добавкой 10 мас.% сахарозы

Текст в скобках: тектик исчезают, а пик кристаллизации льда сильно смещается в область более высоких температур, уменьшается по интенсивности. Как в случае 1,2-ПД, так и ЭГ температура стеклования незначительно повышается.

Кристаллизация, согласно представлениям Френкеля и Данилова, состоит из двух стадий: образование критических зародышей и их рост. Если максимумы этих двух процессов сильно отличаются по температуре, то система склонна к стеклованию. Вероятно, действие сахарозы состоит в том, что в ее присутствии возрастает разность между температурами максимумов скорости нуклеации и линейной скорости роста кристаллов. Можно предположить, что это связано с коллективными взаимодействиями в системе [5], которые усиливаются в присутствии сильно гидратированной сахарозы.

Таким образом, из приведенных выше результатов видно, что добавки сахарозы уменьшают склонность исследованных водных растворов неэлектролитов к образованию кристаллических форм на стадии нагрева. Считается, что именно рост кристаллов льда в ходе криоконсервирования лежит в основе одного из механизмов криоповреждения [1]. Более высокая склонность растворов к стеклованию в присутствии сахарозы благоприятно сказывается на сохранности криоконсервированных биологических объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 432 с.

На рисунке (*а, б*) показаны типичные термограммы, полученные для 50%-го раствора 1,2-ПД. Цифрами возле кривых обозначены характерные экзо- и эндотермические эффекты, а также скачок теплоемкости при стекловании. В водном 50%-м растворе 1,2-ПД регистрируется интенсивная кристаллизация воды из переохлажденного состояния (рис., *а*, пик 1 на термограмме). После добавления в раствор 10 мас.% сахарозы интенсивность этого пика сильно уменьшается, что видно из рис., *б*.

На рисунке (*в, г*) показаны результаты аналогичного эксперимента с ЭГ. В отличие от 1,2-ПД наблюдается несколько эндотермических пиков, отвечающих плавлению стабильных и метастабильных эвтектик (рис. *в*). Механизм их возникновения исследовался одним из авторов ранее [2]. Экзотермический пик 1, как и в предыдущем случае, отвечает кристаллизации воды из переохлажденного состояния. На рис., *г* показана термограмма этого раствора с добавкой 10 мас.% сахарозы. Видно, что пики плавления стабильных и метастабильных эвтектик

2. Зинченко А.В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур $-150 \div 0$ °С: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. — Харьков, 1983. — 22 с.
3. Зинченко А.В., Воротилин А.М., Моисеев В.А. Повреждение эритроцитов при низких температурах // Криобиология. — 1990. — № 4. — С. 48–49.
4. Зинченко А.В., Петренко А.Ю. Низкотемпературные фазовые переходы в среде для криоконсервирования гепатоцитов на основе ДМСО // Физико-химические процессы в криобиологических системах. — Харьков: Б. и. — 1991. — С. 56–60.
5. Шахпаронов М.И. Механизмы быстрых процессов в жидкости. — М.: Высшая школа, 1980. — 325 с.

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

Поступило 27.02.95

ХРОНИКА

I МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

(21–23 ноября 1994 г., Тель-Авив, Израиль)

С 21 по 23 ноября 1994 года в Тель-Авиве (Израиль) состоялся I Международный конгресс по биологической медицине, проведенный Интернациональной академией биологической медицины (Тель-Авив, Израиль). С приветственным словом к участникам конгресса обратился Д.Ортмейер — представитель Doc Park — International, являющийся генеральным консультантом в области цитобиологии, фармакологии Америки, стран Латинской Америки и Германии. Председатель оргкомитета Дж.Троцкий (Израиль) в своем выступлении обобщил результаты теоретических и прикладных исследований в области биологической медицины. Учеными из различных стран были представлены данные об эффективности клеточной терапии (КТ) при различных патологических состояниях организма человека, определена основная концепция ее применения в клинических условиях, обсуждены перспективы использования КТ в медицине будущего.

В представленных на конгрессе сообщениях подчеркивалось, что стандартный перечень показаний, принятый в традиционной медицине, не существует в биологической медицине, особенно — в клеточной терапии. Д-р Дж.Троцкий считает, что “устаревшая концепция показаний, связанных с применением химических препаратов, прямо противоположна концепции КТ. Цель КТ — строить и восстанавливать” (А.М.Гофельд, Украина; С.Белоцки, Дж.Троцкий, Израиль), в то время как действие химических медикаментов направлено на то, чтобы разрушить что-либо в организме: инородное (опухоли, вирусы) или принадлежащее самому организму (гипертрофированные органы, гиперфункции желез). Была показана также эффективность использования КТ при нарушениях ЦНС и ПНС (Н.Е.Мольская и соавт., Украина), эндотоксикозах различного генеза (Н.П.Суббота и соавт., Украина), сахарном диабете (Б.П.Сандомирский, Украина), сепсисе (С.Белоцки, Израиль), гормональных нарушениях, истощениях, дефиците энергии (Дж.Троцкий, Израиль; Д.Ортмейер, Германия). Исходя из обсуждения работ, следует сделать вывод, что наибольший терапевтический эффект при использовании КТ достигается при лечении хронических и близких к хроническим случаям. Выдающимся феноменом КТ, согласно представленным данным, является уникальная способность КТ оказывать эффект при патологии, вызванной наследственными хромосомными нарушениями (Дж.Троцкий, Д.Ортмейер).

Анализ представленных на конгрессе данных позволяет считать, что общий терапевтический эффект КТ должен быть разделен на две группы. К первой группе можно отнести неспецифические эффекты, достигаемые при использовании КТ, например иммуномодуляцию. Ко второй группе — специфич-

ческие эффекты, которые являются уникальными для любой имплантированной ткани или сочетания тканей. При этом подчеркивается, что терапевтическое воздействие КТ является аккумулятивным и эффект достигается при проведении курса лечения. При обсуждении полученных в настоящее время клинических наблюдений были определены противопоказания к проведению клеточной терапии. Ими являются: острая стадия любого заболевания или гиперчувствительность пациента.

Новым перспективным направлением, развиваемым в рамках биологической медицины, является использование, помимо КТ, клеточных экстрактов. В то время как препараты КТ состоят из подклеточных фракций, клеточные экстракты содержат только чистые молекулы (например, полинуклеотиды РНК и ДНК). Интерес участников конгресса вызвали также доклады, посвященные моделированию биологических процессов в организме при использовании КТ (В.М.Яненко и др., Украина).

Подводя итоги работы конгресса, следует указать на приоритетность представленных на конгрессе данных в области биологической медицины и надеяться, что правильное сочетание биопрепаратов клеточной терапии позволит обеспечить опытных врачей очень эффективным средством для лечения многих "безнадежных синдромов".

Н.П.Суббота

ПЕРВЫЙ СЪЕЗД УКРАИНСКОГО ОБЩЕСТВА КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

I съезд Украинского общества криобиологии и криомедицины состоится в г.Харькове 18–20 октября 1995 г. Цель съезда — установить наиболее перспективные фундаментальные и прикладные научные направления развития криобиологии и криомедицины; роль криобиологических технологий в различных областях народного хозяйства на Украине с целью создания на их основе не имеющих аналогов новых технологий, а также координация деятельности специалистов, обмен информацией о достижениях и потребностях в этой области науки и техники.

Участники съезда будут иметь возможность предложить свои научные, конструкторские или технические достижения по применению холода в биологии, сельском хозяйстве, промышленности непосредственно заинтересованным в их приобретении организациям, а также получить информацию по наиболее перспективным направлениям дальнейших исследований и разработок, которые пользуются наибольшим спросом.

Потребители криобиологических технологий будут иметь возможность ознакомиться с существующими новейшими достижениями в этой отрасли, поставить перед научными работниками и конструкторами конкретные задачи, решение которых принесет социальный и экономический эффект.

Оргкомитет приглашает спонсоров к взаимовыгодному участию в работе съезда. Списки лиц и организаций, которые изъявили желание финансировать работу съезда, будут отмечены в программе, а их реклама напечатана в материалах съезда.

На съезде планируется рассмотреть следующие вопросы:

1. Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов.
2. Низкотемпературные банки.
3. Современные аспекты применения температур в медицине, ветеринарии, промышленности и сельском хозяйстве.
4. Механизмы адаптации животных и растений при естественном и искусственном охлаждении.
5. Криогенное приборостроение, источники холода.
6. Выставка криобиологического оборудования, криотехнологии.

Кроме того, ряд перспективных фундаментальных научных направлений создания новых криотехнологий, методов, приборов может быть обсужден по Вашему предложению за "круглым столом". Программой съезда предусмотрены пленарные, симпозиальные и стендовые доклады. Планируется издание тезисов докладов.

Рабочие языки съезда — украинский и русский.

Телефоны для справок (код Харькова 0572):

728-807, БАБИЙЧУК Георгий Афанасьевич,

720-072, ГАРБУЗ Владимир Иванович,

721-039, СНУРНИКОВ Александр Сергеевич

ОРГКОМИТЕТ

РЕЦЕНЗИЯ

На книгу Patrick Echlin "Low-temperature microscopy and analysis". New York and London: Plenum Press, 1992, 539 p.

Вниманию читателей предлагается монография, которая даже при современной обширной информации в этой области способна заинтересовать широкий круг научных работников не только объемом предлагаемого материала, его прекрасной систематикой, но и формой изложения. Книга объемом 539 страниц состоит из 12 глав, перечисление которых позволяет получить представление о масштабности излагаемых проблем и тщательности в подборке сведений.

Глава 1 — свойства и структура воды (7 с.), глава 2 — структура и свойства замороженной воды и водных растворов (38 с.), глава 3 — методы замораживания образцов (40 с.), глава 4 — криомикротомия (39 с.), глава 5 — низкотемпературное скалывание и репликация при замораживании-скалывании (50 с.), глава 6 — замораживание-высушивание (29 с.), глава 7 — метод низкотемпературного замораживания-замещения, глава 8 — низкотемпературная световая микроскопия (28 с.), глава 9 — низкотемпературная трансмиссионная электронная микроскопия (53 с.), глава 10 — низкотемпературная сканирующая электронная микроскопия (62 с.), глава 11 — низкотемпературный микроанализ (77 с.), глава 12 — современное состояние низкотемпературной микроскопии и анализа (7 с.).

В своем труде автор обобщил более чем 25-летний мировой опыт работы в области использования холода для получения сведений о состоянии биологических структур, включая клетки, органеллы, макромолекулы и ионы в условиях, максимально приближающихся к нативным.

Обращает на себя внимание научный подход при изложении чисто практических тонкостей в подготовке объектов для исследования. Хотя автор и не является криобиологом, глубокая эрудиция позволяет ему объяснить многие методические задачи и пути их решения с точки зрения теоретической криобиологии. Так, в частности, в главах 1 и 2 большая часть текста посвящена исследованиям процесса замораживания в модельных системах и стратегии превращения нестабильной гидратированной системы в стабильную — твердое состояние, когда вода и водные растворы охлаждаются до достаточно низких температур. При этом рассматриваются процессы нуклеации и последующий рост кристаллов льда как кинетический феномен, являющийся функцией температуры. В сжатой форме даны современные представления о метастабильном состоянии воды. Приводятся диаграммы, позволяющие получить наглядное представление о динамических процессах, протекающих в воде при различных температурах. По мнению автора, изучение структуры в больших образцах (гл. 3) требует при использовании метода криомикроскопии применения антифризных агентов для предотвращения кристаллообразования, при

этом проникающие криопротекторы более эффективны в сочетании с некоторыми видами химической фиксации, в то время как непроникающие криопротекторы вызывают сморщивание клеток уже на этапе экспозиции с ними в результате частичной дегидратации. Таким образом, автор подводит к мысли, что, как правило, исследователю приходится идти на компромисс либо выбирая путь химической префиксации перед охлаждением, либо допуская появление кристаллов льда, отчасти повреждающих замораживаемый образец.

В главе 4 приводятся подробные сведения о методических подходах получения замороженных срезов как для трансмиссионной, так и световой микроскопии. Автор уделяет внимание артефактам, образующимся в ходе приготовления срезов, а также способам их устранения. Метод замораживания-скалывания и получение реплик в условиях низких температур (гл. 5) рассматривается автором как способ, позволяющий получить информацию о мембранных образованиях клетки. Хотя метод был предложен в качестве оригинального подхода для ультраструктурного анализа, в настоящее время он используется и для других аналитических процедур, таких как автордиография, иммуноцитохимия, связанных с введением в клетку специфических меток.

Главы 8 и 9 насыщены фактическим материалом, представляющим интерес не только для начинающего микроскописта, обеспечивающего правильную методическую постановку эксперимента, но и для работника, имеющего большой стаж исследовательской работы, так как позволяет провести тщательную оценку вклада каждого этапа подготовки образца в общую картину изменений нативного состояния биологического объекта. Р. Echlin обращает внимание на своеобразие процессов кристаллизации в тонких срезах и пленочных препаратах, полученных из суспендированных объектов и бесклеточных систем.

Монография прекрасно иллюстрирована графиками, таблицами и электроннограммами, в книге собрано много справочных данных. Детально излагаются описания устройств и приспособлений, необходимых для сложных электронно-микроскопических исследований.

В журнальной рецензии нет возможности дать подробный анализ всех глав книги, однако мы надеемся, что даже краткое изложение позволит читателю получить представление о многоплановом подходе в освещении специальных вопросов. Весь материал изложен четко, прекрасным стилем, легко доступным для перевода, в связи с чем можно лишь выразить сожаление о невозможности использования широким кругом отечественных специалистов этой книги в качестве настольного руководства.

Библиография включает более тысячи наименований, в том числе и данные 90–91 гг., однако в ней присутствуют лишь единичные работы отечественных авторов, в то время как вопросы криомикроскопии и криомикроанализа, а также фундаментальные проблемы криобиологии нашли достаточно полное освещение и в отечественной литературе.

Книга интересна не только специалистам, занимающимся вопросами криобиологии, но и исследователям, решающим общебиологические проблемы с помощью современных морфологических криометодов.

Т.Н.Юрченко, Н.В.Репин

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

2¹⁹⁹⁵

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. 1995. №2. 1-56 ИНДЕКС 70474