

2

ISSN 0233-7673

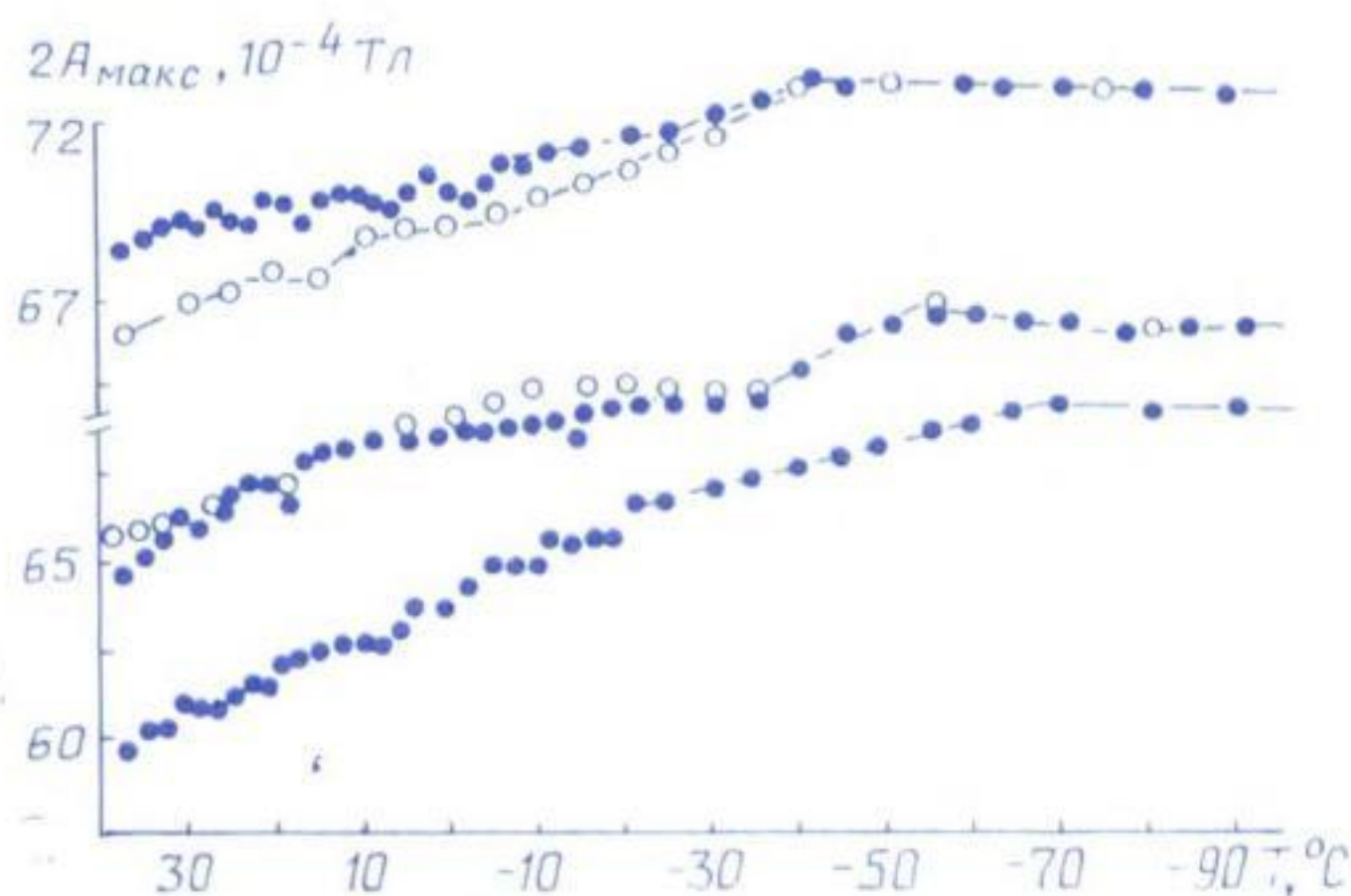
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ЗАГОРУЙКО Г.Е. Кинетика структурных изменений миокарда сусликов в процессе их пробуждения во время зимней спячки

ЦЫМБАЛ Л.В., МОИСЕЕВ В.А. Влияние криопротекторов на мембраносвязанные и цитозольные белки эритроцитов

ВЕРХОВСКАЯ Л.З., ЛУГОВОЙ В.И., ОЛЕЙНИК С.Т. Пропандиосахароль - криоконсервант для перевиваемых клеточных культур

ОСЕЦКИЙ А.И., ГУРИНА Т.М. Исследование фазовых состояний замороженных растворов и биосистем методом термопластической деформации

НОВИКОВ А.Н., ПИЧУГИН Ю.И., ЛИННИК Т.П. Влияние криопротекторов и ряда органических добавок на процесс рекристаллизации льда в модельных системах

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

2

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

ЗАГОРУЙКО Г. Е. Кинетика структурных изменений миокарда сусликов в процессе их пробуждения во время зимней спячки	3
ЦЫМБАЛ Л. В., МОИСЕЕВ В. А. Влияние криопротекторов на мембраносвязанные и цитозольные белки эритроцитов	13
НОВИКОВ А. Н., ПИЧУГИН Ю. И., ЛИННИК Т. П. Влияние криопротекторов и ряда органических добавок на процесс рекристаллизации льда в модельных системах	20
ОСЕЦКИЙ А. И., ГУРИНА Т. М. Исследование фазовых состояний замороженных растворов и биосистем методом термопластической деформации	24
ЖЕГУНОВ Г. Ф., ГОГИТИДЗЕ Е. А. Особенности деградации белков у сусликов на разных этапах баута	29
ЦЫГАНОВ Д. И., КОЧИЕВА Н. К. Методика расчета и исследование параметров режима локальной криотерапии	34

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

ВЕРХОВСКАЯ Л. З., ЛУГОВОЙ В. И., ОЛЕЙНИК С. Т. Пропандиосахароль — криоконсервант для перевиваемых клеточных культур	40
ОЧКУР С. И., КОПЕЙКА Е. Ф. Действие замораживания-оттаивания с различными криопротекторами на дыхание и активность спермиев петухов	43

© Институт проблем криобиологии и криомедицины АН Украины,
«Проблемы криобиологии», 1992 г.

This One



ОСКА-DXX-FL09

Материал, защищенный авторским правом

КРИОМЕДИЦИНА

ДРОНОВ М. М., ПИРОГОВ Ю. И. Клинико-иммунологические результаты использования криоконсервированной роговицы при кератопластике 47

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ХАНИНА Л. А., БРЕДИХИНА Л. П., ЧЕКАНОВА В. В., ЧЕРНИКОВА Л. А., ГУЧОК В. М. Оптимизация качества криопротектора ПЭО-1500 51

РОЗАНОВ Л. Ф., РОЗАНОВА Е. Д. Оценка внутриклеточной концентрации глицерина в эритроцитах человека методом пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии 54

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ 56

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

ZAGORUYKO G. E. The kinetics of structural changes in hibernating ground squirrel myocardium during arousal 3

TSYMBAL L. V., MOISEYEV V. A. The effect of cryoprotectants on erythrocyte membrane-bound and cytosol proteins 13

NOVIKOV A. N., PICHUGIN Yu. I., LINNIK T. P. The effect of cryoprotectants and some organic additives on the recrystallization in model systems 20

OSETSKY A. I., GURINA T. M. The investigation of phase states of frozen solutions and biological systems by the method of thermoplastic deformation 24

ZHEGUNOV G. F., GOGITIDZE E. A. Peculiarities of protein degradation in ground squirrels in different periods of hibernation 29

TSYGANOV D. I., KOCHIYEVA N. K. The method of calculation and investigation of parameter of local cryotherapy 34

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

VERKHOVSKAYA L. Z., LUGOVOY V. I., OLEYNIK S. T. The cryopreservative propandiosaccharol for passaged cell cultures 40

OCHKUR S. I., KOPEYKA E. F. The effect of freeze-thawing with different cryoprotectants on the respiration and motility of fowl spermatozoa 43

CRYOMEDICINE

DRONOV M. M., PIROGOV Yu. I. Clinical and immunological results of the use of cryopreserved cornea in keratoplasty 47

BRIEF COMMUNICATIONS

KHANINA A. A., BREDIKHINA L. P., CHEKANOVA V. V., CHERNIKOVA L. A., GUCHOK V. M. Optimization of the quality of cryoprotectant PEO-1500 51

ROZANOV L. F., ROZANOVA E. D. The assessment of intracellular concentration of glycerol in human erythrocytes by the method of perturbational differential spectrophotometry 54

DEFENSE OF THESES 56

Адрес редакции:

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

Научный редактор В. И. Луговой

Редактор Л. А. Рябинина

Технический редактор В. Н. Волкова

Сдано в набор 16.01.92. Подп. в печ. 02.04.92. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Уч.-изд. л. 5,29. Усл. кр.-от. 5,4. Тираж 535. Зак. № 2-28. Цена 1 р. 20 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе - в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков. Университетская, 16. Зак. 649.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 591.415:611

Г. Е. Загоруйко

КИНЕТИКА СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МИОКАРДА СУСЛИКОВ В ПРОЦЕССЕ ИХ ПРОБУЖДЕНИЯ ВО ВРЕМЯ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

Проведено светооптическое и электронно-микроскопическое изучение структурной организации миокарда пробуждающихся сусликов при температуре тела 8, 10, 14, 16, 20, 25, 30, 36 °С. Построены графики изменений объемных долей: стромы, основного вещества соединительной ткани, клеток соединительной ткани, капилляров, просвета капилляров, эндотелиоцитов микрососудов, в кардиомиоцитах — гиалоплазмы и митохондрий. Определена точка экстремума на температурной шкале (15 °С), которая является естественной границей двух последовательных фаз активации функции сердечно-сосудистой системы: фазы преимущественного кровоснабжения органов и тканей передней части туловища животных $Ph.I.T$ (4—15) °С и фазы интенсификации кровоснабжения органов и тканей задней части туловища животных $Ph.II.T$ (15—36) °С. Сделан вывод о том, что эволюция адаптации сердца гетеротермов к функционированию при низких температурах тела осуществлялась путем отбора конкретного множества неспецифических реакций структурно-функциональных элементов, временная последовательность которых, их сочетание явилось специфическим для каждого последующего состояния организма: холодовое оцепенение, пробуждение, бодрствование и вхождение в зимнюю спячку.

В последние годы наблюдается повышенный интерес к проблеме холодовой адаптации гетеротермных животных, к природному феномену зимней спячки [9, 11, 12]. В проведенных исследованиях отечественными и зарубежными авторами установлена ведущая роль сердечно-сосудистой системы в поддержании жизнедеятельности животных во время баутов холодового оцепенения, когда сердце функционирует при температуре тела 2—4 °С [2, 15]. Выявлена уникальная способность гетеротермов периодически пробуждаться во время продолжительной зимней спячки и за короткий период времени переходить из состояния холодового оцепенения к активному бодрствованию [14, 15]. Показано, что процесс пробуждения сопровождается значительным повышением температуры тела зимоспящих млекопитающих. Так, у сусликов во время спонтанных пробуждений температура тела возрастает от 2—4 °С до 35—37 °С, а число сердечных сокращений увеличивается от 5—10 уд/мин до 350—400 уд/мин [2, 15]. После кратковременного периода бодрствования суслики вновь впадают в состояние холодового оцепенения.

Несмотря на достигнутые успехи в изучении динамики метаболических процессов развивающихся в сердечной мышце гетеротермов в различные сезоны года, морфологические проявления адаптации миокарда этих животных к возрастающей функциональной нагрузке в периоды спонтанных пробуждений мало изучены. Настоящая работа посвящена изучению закономерностей структурных изменений миокарда сусликов в процессе вызванных пробуждений животных во время зимней спячки.

Эксперимент проведен в январе-феврале, когда наблюдаются наиболее продолжительные бауты холодового оцепенения. Половозрелые якутские длиннохвостые суслики-самцы *Citellus undulatus* одного возраста (1,5 года) в количестве 30 особей содержались в виварии ИПК и К АН УССР в специально оборудованных для зимней спячки клетках при температуре —5, 5 °С. Вызванное пробуждение осуществляли путем энергичного тормошения животных. Декапитацию сусликов проводили при достижении температуры межлопаточной области соответственно 8, 10, 14, 16, 20, 25, 30, 36 °С. Для электронно-микроскопических и светооптических исследований из

свободной стенки левого желудочка вырезали кусочки миокарда и обрабатывали общепринятыми методами [8]. В серии негативов ультратонких срезов миокарда, полученных при постоянном увеличении $\times 2000$ на специальном приборе [7] с помощью набора прозрачных тест-систем с числом контрольных линий и точек соответственно $N_1 = 384$ точки и $N_2 = 600$ точек, определяли объемные доли: стромального компонента $V_v^{стр}$, основного вещества соединительной ткани — $V_v^{ов}$, клеток соединительной ткани — $V_v^{кст}$, капилляров — $V_v^{кап}$, просвета капилляров — $V_v^{пк}$, эндотелиоцитов капилляров — $V_v^{эн}$, в кардиомиоцитах — относительный объем митохондрий — $V_v^{мх}$, объемную долю гиалоплазмы — $V_v^{гп}$, %. Стабилизированные значения морфометрических показателей и погрешность измерений ($\pm \varepsilon$, %) средних величин (V_v) определяли с помощью графико-аналитического метода [4].

В течение первых 70—90 мин вызванного пробуждения температура межлопаточной области сусликов возрастала от 4 до 10 °С, а число сердечных сокращений от 7—10 до 70 уд/мин. В этот период в миокарде животных определяется умеренный отек стромального компонента. Многие фибробласты находятся в функционально активном состоянии. В цитоплазме этих клеток выявляются светлые митохондрии, многочисленные элементы гранулярной эндоплазматической сети, расширенные цистерны аппарата Гольджи, а со стороны интерстиция, в непосредственной близости от фибробластов, определяется множество мелких хлопьевидных образований, пучки хаотично расположенных коллагеновых фибрилл (рис. 1, а). Некоторые

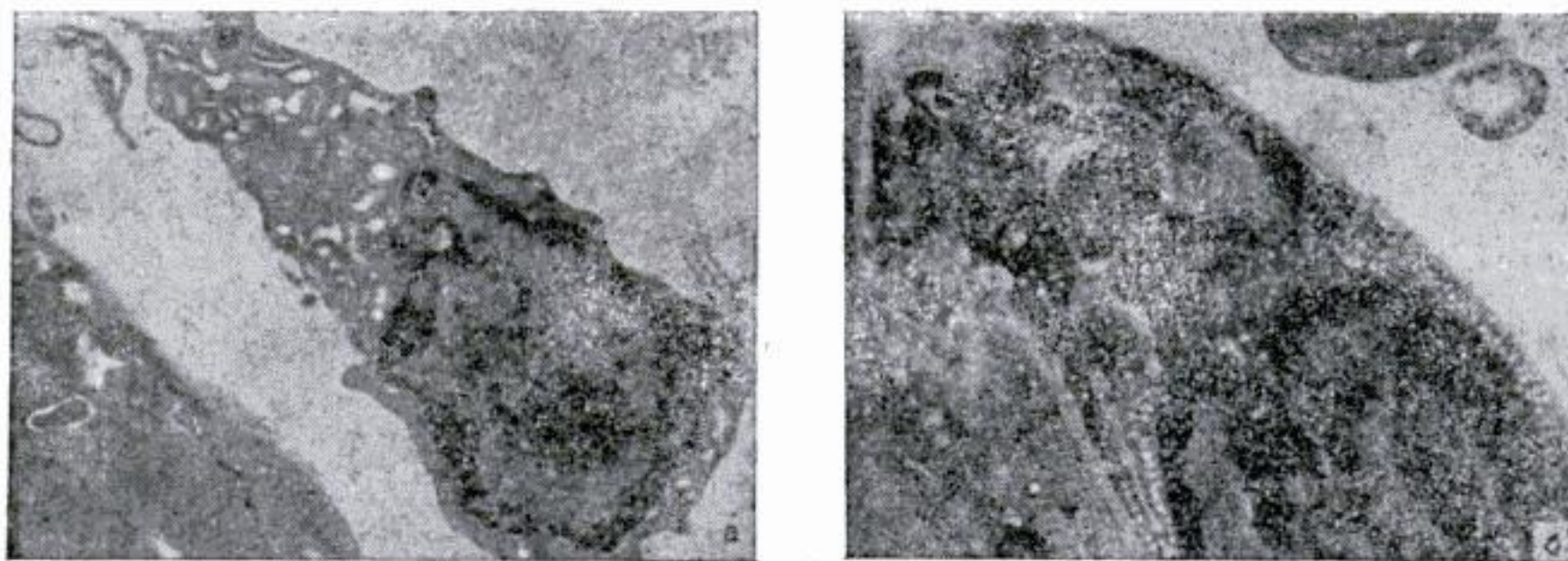


Рис. 1. Ультраструктура сердечной мышцы пробуждающихся сусликов при температуре тела 10 °С: а — функционально активный фибробласт, хлопьевидные мелкодисперсные образования в интерстиции миокарда. $\times 6000$; б — тотальная везикуляция маргинальных участков цитоплазмы эндотелиоцитов. $\times 10000$

фибробласты имеют удлиненную веретеновидную форму, цитоплазматические отростки и хорошо выраженный ведущий полюс клетки, что свидетельствует об активном перемещении фибробластов в интерстициальном пространстве. В этот период наблюдается постепенное увеличение количества микрососудов «открытого» типа, что свидетельствует о развитии процесса конформационных изменений вида «закрытые → открытые» капилляры. В маргинальных участках цитоплазмы эндотелиоцитов обнаруживается множество светлых окаймленных везикул, образующих упорядоченные цепочки, расположенные вдоль аблюминальной и люминальной поверхности капилляров (рис. 1, б). Базальная мембрана, окружающая микрососуды, заметно разрыхлена, в ней определяются хаотично расположенные переплетающиеся между собой многочисленные короткие микрофилламенты. Наряду с элементами соединительной ткани, в интерстиции миокарда выявляются липидные капли, везикулы и свободно расположенные митохондрии кардиомиоцитов. Эти органеллы с хорошо сохранившимися многочисленными кристами часто контактируют с цитоплазматическими отростками макрофагов, базальной мембраной эндотелиоцитов и нередко определяются внутри капилляров.

В паренхиматозном компоненте миокарда пробуждающихся сусликов выявляются преимущественно темные кардиомиоциты с морфологическими признаками умеренной дегидратации цитоплазмы и контрактуры миофибрилл. Поэтому в темных мышечных клетках существенно увеличена плотность упаковки внутриклеточных структур. В процессе роста температуры тела животных ($4 \rightarrow 10$) °C в кардиомиоцитах наблюдается умеренное набухание митохондрий, увеличиваются размеры этих органелл, просветляется их матрикс, более четко контурируются многочисленные извитые кристы. По сравнению с гибернирующими животными, в кардиомиоцитах пробуждающихся сусликов уменьшается содержание гликогена, количество липидных включений остается без изменений.

В интервале времени $T \in (90-120)$ мин после начала пробуждения температура межлопаточной области сусликов возрастает от 10 до 16 °C, а число сердечных сокращений увеличивается от 70 до 150—180 уд/мин. В этот период в миокарде животных определяется существенный отек стромального компонента и, вероятно, вследствие увеличения гидростатического давления внеклеточной жидкости, происходит сдавливание капилляров, уменьшение просвета микрососудов (рис. 2, а). Наблюдаются конформационные изменения по типу «открытые $\rightarrow$ закрытые» капилляры. В гемомикроциркуляторном русле миокарда выявляются темные и светлые эндотелиоциты. Цитоплазма светлых эндотелиальных клеток умеренно набухшая.

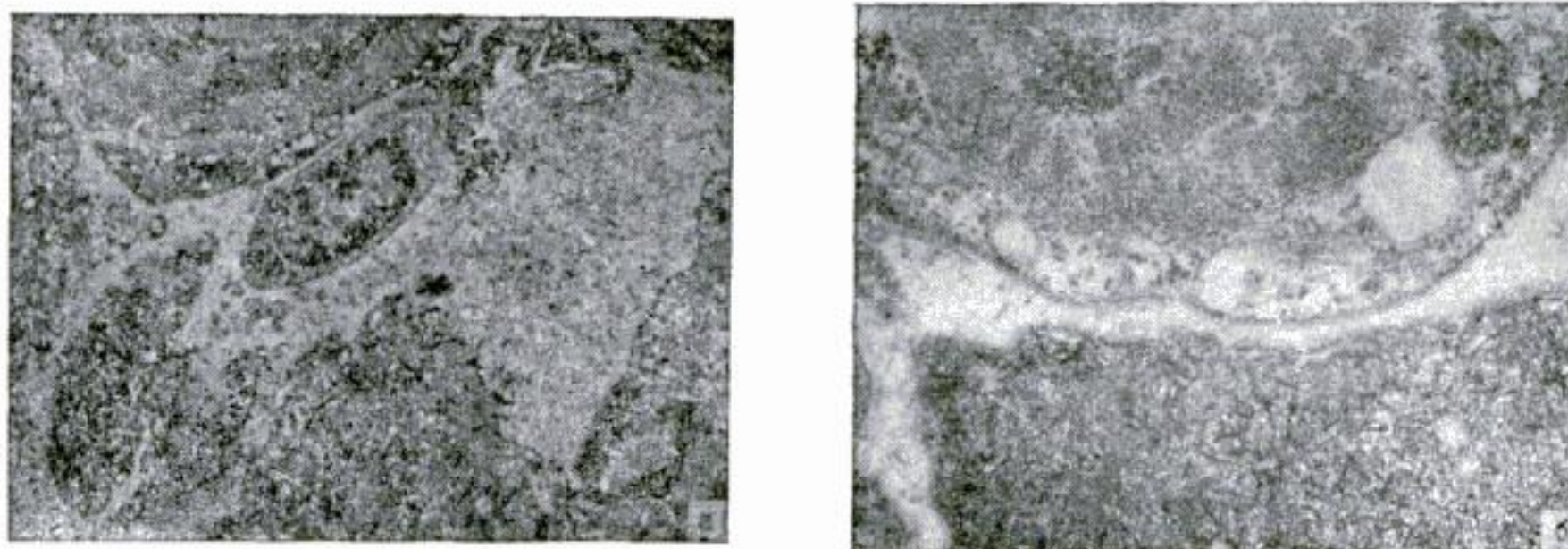


Рис. 2. Ультраструктура сердечной мышцы пробуждающихся сусликов при температуре тела 16 °C: а — интерстициальный отек, спавшиеся «закрытые» микрососуды. X4000; б — темные и светлые кардиомиоциты. X10000

В этих клетках уменьшается количество окаймленных везикул, выявляются округлые митохондрии с хорошо выраженными кристами и просветленным матриксом. В интерстициальном пространстве миокарда выявляются деформированные эритроциты, определяются разрыхленные пучки коллагеновых волокон с морфологическими признаками фрагментации и дезориентации фибрилл, наблюдаются свободно лежащие митохондрии мышечных клеток.

В паренхиме миокарда существенно увеличивается количество светлых кардиомиоцитов, в которых заметно возрастает объем гялоплазмы и уменьшается плотность упаковки внутриклеточных структур. Миофибриллы находятся преимущественно в состоянии умеренной релаксации. Определяются кардиомиоциты, часть клетки которых оптически темная, а другая — светлая. Эти данные свидетельствуют о том, что в интервале температур $T \in (10-16)$ °C в паренхиме миокарда развивается процесс направленного изменения морфофункционального состояния кардиомиоцитов по типу «темные $\rightarrow$ светлые» клетки (рис. 2, б). Среди множества сердечных миоцитов выявляются отдельные деструктивно измененные кардиомиоциты с участками обширных разрывов плазмолеммы и повреждениями сократительного аппарата в виде фрагментации миофибрилл. Именно вследствие нарушения целостности плазмолеммы, митохондрии из цитоплазмы кардиомиоцитов попадают во внеклеточное пространство. Появление в миокарде животных по-

врежденных кардиомиоцитов объясняется существенным увеличением функциональной и мышечной нагрузки на сердце пробуждающихся сусликов. В светлых кардиомиоцитах уменьшается складчатость плазмолеммы, заметно увеличивается общее количество набухших с расширенным просветом элементов саркоплазматической сети. В околоядерной зоне мышечных клеток часто определяются цистерны гранулярного ретикулума, возрастает содержание свободно лежащих рибосом. Вблизи плазмолеммы, в эктоплазме, выявляются мелкие везикулы, некоторые из которых контактируют, а затем и сливаются с наружной цитоплазматической мембраной кардиомиоцитов. Эти данные однозначно свидетельствуют о том, что при разогреве тела животных, особенно в интервале температур $T \in (10-16)^\circ\text{C}$, в цитоплазме кардиомиоцитов наблюдается интенсификация процессов биосинтеза белковых макромолекул, которые в составе везикул транспортируются на периферию клеток и в последующем встраиваются в плазмолемму. Результаты проведенных биохимических исследований [2] и полученные нами морфологические данные позволяют заключить, что целенаправленное обновление белково-липидного состава определенных участков плазмолеммы является важнейшим проявлением биохимической адаптации сердечных миоцитов пробуждающихся сусликов к изменяющимся температурным условиям функционирования, к возрастающей мышечной нагрузке на сердечно-сосудистую систему.

В процессе дальнейшего разогрева тела животных от 16 до 20°C число сердечных сокращений увеличивается от 180 до 220—250 уд/мин. В этот период в сердечной мышце животных существенно уменьшается отечность соединительной ткани и увеличивается количество функционально активных открытых капилляров. Наблюдается умеренная гиперемия сосудов гемомикроциркуляторного русла, более сглаженной становится их люминальная поверхность, заметно уменьшается толщина стенки капилляров. Следовательно, вновь происходит изменение микрососудов по типу «закрытые → открытые» капилляры. Маргинальные участки цитоплазмы эндотелиоцитов истончаются, в них расположены преимущественно светлые мелкие везикулы.

Существенные изменения наблюдаются в паренхиматозном компоненте миокарда, представленном преимущественно светлыми кардиомиоцитами.

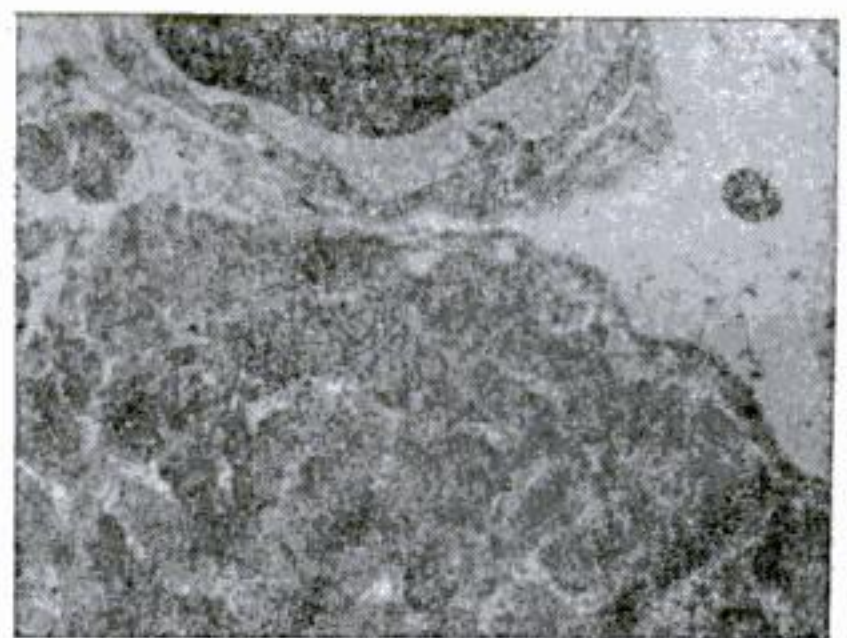
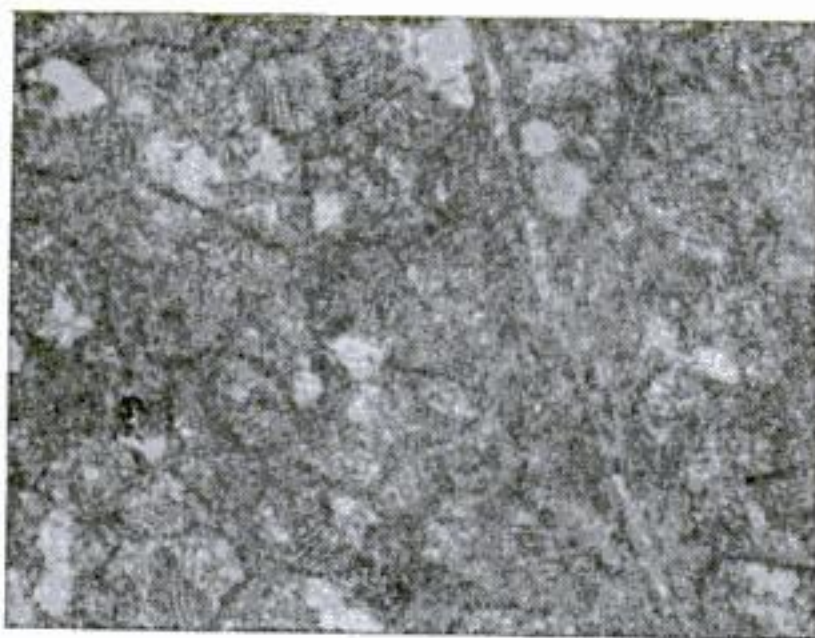


Рис. 3. Ультраструктура сердечной мышцы пробуждающихся сусликов при температуре тела 20°C . Тотальное умеренное набухание митохондрий, деструкция крист и неравномерное просветление матрикса органелл. X8000

Рис. 4. Ультраструктура сердечной мышцы пробуждающихся сусликов при температуре тела 36°C . Нормализация морфофункционального состояния кардиомиоцитов и капилляров миокарда. X7000

В цитоплазме этих клеток выявляется тотальное умеренное набухание митохондрий (рис. 3). Процесс набухания сопровождается увеличением размеров этих органелл. В митохондриях уменьшается количество крист вследствие их фрагментации и локального лизиса. Появляются кристы в форме миелиноподобных структур. Определяется неравномерное просветление их

матрикса. В некоторых митохондриях выявляются мелкие липидные включения и электронноплотные мелкодисперсные гранулы. Наблюдается тенденция к объединению многочисленных набухших митохондрий в своеобразные плотно упакованные структурно-функциональные комплексы. Состояние элементов саркоплазматической сети и аппарата Гольджи в пределах нормы, без признаков набухания. Существенно уменьшается количество цистерн гранулярного ретикулума и свободно расположенных рибосом. Эти данные свидетельствуют о значительном снижении интенсивности процессов биосинтеза макромолекул в цитоплазме кардиомиоцитов. В сердечных миоцитах уменьшается содержание липидных включений и количество гранул гликогена. Тотальное набухание митохондрий, значительное снижение содержания гликогена и липидных включений в цитоплазме кардиомиоцитов обусловлено увеличением функциональной нагрузки на миокард пробуждающихся сусликов, активацией кровоснабжения органов и тканей, что способствует более интенсивному разогреву тела животных.

В условиях дальнейшего повышения температуры тела от 20 до 36 °C наблюдается постепенная нормализация структурной организации активно функционирующих элементов сердечно-сосудистой системы. В этот период число сердечных сокращений увеличивается до 300—350 уд/мин. В строении миокарда не определяются морфологические признаки отека соединительной ткани. Большинство сосудов гемомикроциркуляторного русла находятся в функционально активном состоянии (рис. 4). Просвет капилляров расширен, маргинальные участки цитоплазмы эндотелиоцитов истончены, увеличивается площадь обменной поверхности микрососудов. Эти морфологические изменения капилляров способствуют интенсификации процессов обмена веществ между кровью и основным веществом соединительной ткани миокарда.

Ультраструктура мышечных клеток сердца мало отличается от таковой, характерной для миокарда бодрствующих животных. Миофибриллы находятся преимущественно в состоянии умеренной релаксации, митохондрии без признаков набухания (рис. 4). В последних четко контурируются многочисленные кристы. В кардиомиоцитах уже не выявляются локальные скопления митохондрий, что свидетельствует о дезинтеграции структурно-функциональных комплексов этих органелл на множество отдельных митохондрий. В сердечных миоцитах уменьшается содержание гранул гликогена и липидных включений.

На основе данных морфометрических измерений нами проведено изучение кинетических характеристик структурных изменений компонентов сердечной мышцы в процессе разогрева тела животных и установлены закономерности функционирования миокарда сусликов на этапах пробуждения во время зимней спячки. Как оказалось (рис. 5, кривая 1), в процессе повышения температуры тела животных от 4 до 15—16 °C в миокарде наблюдается рост как абсолютного, так и относительного объемов стромального компонента от 18,50 до 22,50 % ($\sigma = \pm 0,50$ %). Увеличение объемной доли стромы обусловлено синхронно протекающим процессом роста абсолютного и относительного объемов основного вещества соединительной ткани миокарда от 9,40 до 14,50 % (рис. 5, кривая 2). В период дальнейшего разо-

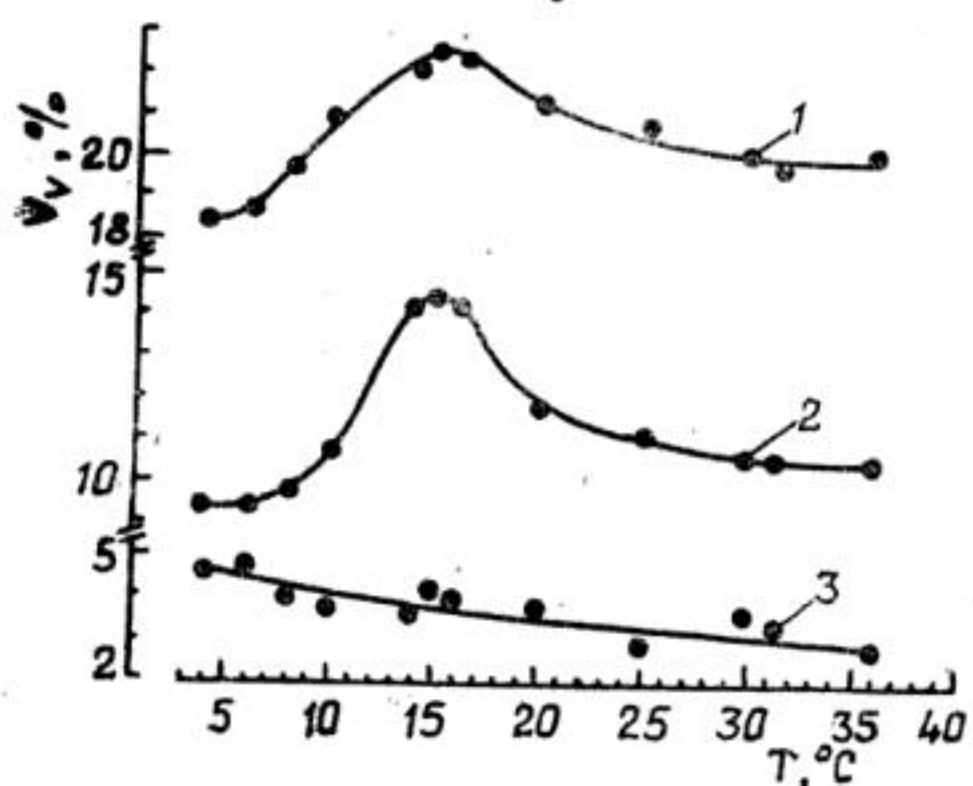


Рис. 5. Кинетика изменений объемных долей: стромального компонента (1), основного вещества соединительной ткани (2), клеток соединительной ткани (3) миокарда пробуждающихся сусликов в процессе повышения температуры тела

грева тела сусликов от 15—16 до 35—36 °С определяется вначале быстро, а затем плавное монотонное уменьшение цифровых значений морфометрических показателей $V_{\text{стр}}^{\text{стр}}$ и $V_{\text{ов}}^{\text{ов}}$ соответственно с 22,50 до 20,00 % и с 14,50 до 10,50 % ($\varepsilon = \pm 0,50$ %). Приведенные цифровые данные позволяют заключить, что при спонтанных пробуждениях животных наблюдается приток значительного количества жидкости в строму миокарда. Ранее нами было установлено, что в период зимней спячки в сердце сусликов определяется тотальное умеренное обезвоживание компонентов миокарда за исключением фибробластов, находящихся в функционально активном состоянии [5].

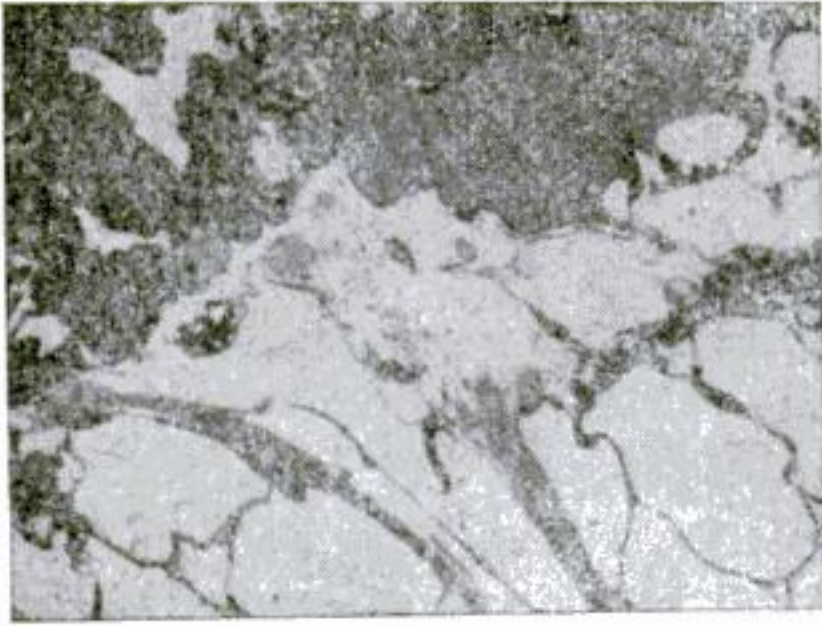


Рис. 6. Гистоструктура бурой жировой ткани и миокарда пробуждающихся сусликов при температуре тела 10 °С. Непосредственный контакт элементов бурой жировой ткани с паренхиматозным и стромальным компонентами сердечной мышцы. Полутонкий срез, об. X40, ок. X10

зимоспящих животных (рис. 6). В процессе разогрева тела сусликов в интервале температур $T \in (4 - 15)$ °С наблюдается расплавление липидных глобул в определенных ячейках бурой жировой ткани и образование водной эмульсии. Вода и эмульгированные в ней мелкодисперсные капельки жира поступают в интерстиций миокарда и вызывают набухание основного вещества соединительной ткани, увеличение объемной доли стромального компонента. В дальнейшем интерстициальная жидкость пропитывает мышечные волокна. Наблюдается процесс гидратации кардиомиоцитов, сопровождающийся структурно-функциональным переходом типа «темные → светлые» клетки. Мелкодисперсные капельки жира «утилизируются» в митохондриях соединительнотканых и мышечных клеток с образованием тепловой и химической энергии (АТФ). Следовательно, бурая жировая ткань, с одной стороны, участвует в теплообразовании и этим способствует быстрому повышению температуры аортальной области и зоны расположения синусного узла — водителя ритма сердца, с другой стороны, — является депо воды и высокоэнергетических субстратов, необходимых для интенсификации работы сердца пробуждающихся животных.

В период роста температуры тела сусликов в миокарде наблюдается плавное изменение объемной доли клеток соединительной ткани (рис. 5, кривая 3). Монотонное уменьшение цифровых значений показателя $V_{\text{стр}}^{\text{стр}}$ от 4,70 % до 2,80 % ($\varepsilon = \pm 0,30$ %), вероятно, обусловлено несколькими причинами:

- увеличением абсолютной массы и объема миокарда в результате процесса его гидратации,
- снижением функциональной активности фибробластов и уменьшением размеров этих клеток,
- миграцией определенного количества моноклеарных клеток в сосудистое русло,

Возникает вопрос, откуда поступает дополнительное количество межклеточной жидкости в строму и какое биологическое значение имеет процесс гидратации миокарда для активации сократительной способности сердца пробуждающихся сусликов? Анализ данных литературы [10,13] позволил нам предположить, что поступление жидкости в интерстиций миокарда пробуждающихся сусликов, возможно, происходит из бурой жировой ткани, расположенной в аортальной области сердца. Наше предположение основано на том, что, во-первых, бурая жировая ткань депонирует значительное количество воды [1, 10], а во-вторых, анатомически тесно взаимосвязана со стромой миокарда

— гибелью некоторых клеток соединительной ткани.

Нами установлено, что в процессе разогрева тела животных от 4 до 36 °C в миокарде наблюдается волнообразное изменение объемных долей капилляров, просвета капилляров и эндотелиоцитов (рис. 7). Анализ кинетических характеристик структурных изменений микрососудов позволил выявить наличие тесной положительной корреляции и синхронизации процессов роста и убыли объемной доли капилляров (кривая 1) и относительного объема просвета микрососудов (кривая 2). Эта структурно-функциональная корреляция может быть описана следующей эмпирической формулой:

$$V_v^{\text{кап}} = 0,71 \cdot V_v^{\text{пк}} + 3,14.$$

Как следует из приведенной формулы, чем больше относительный объем капилляров, тем больше просвет микрососудов, а следовательно, больше кровоснабжение сердечной мышечной ткани, и наоборот. Сравнительный

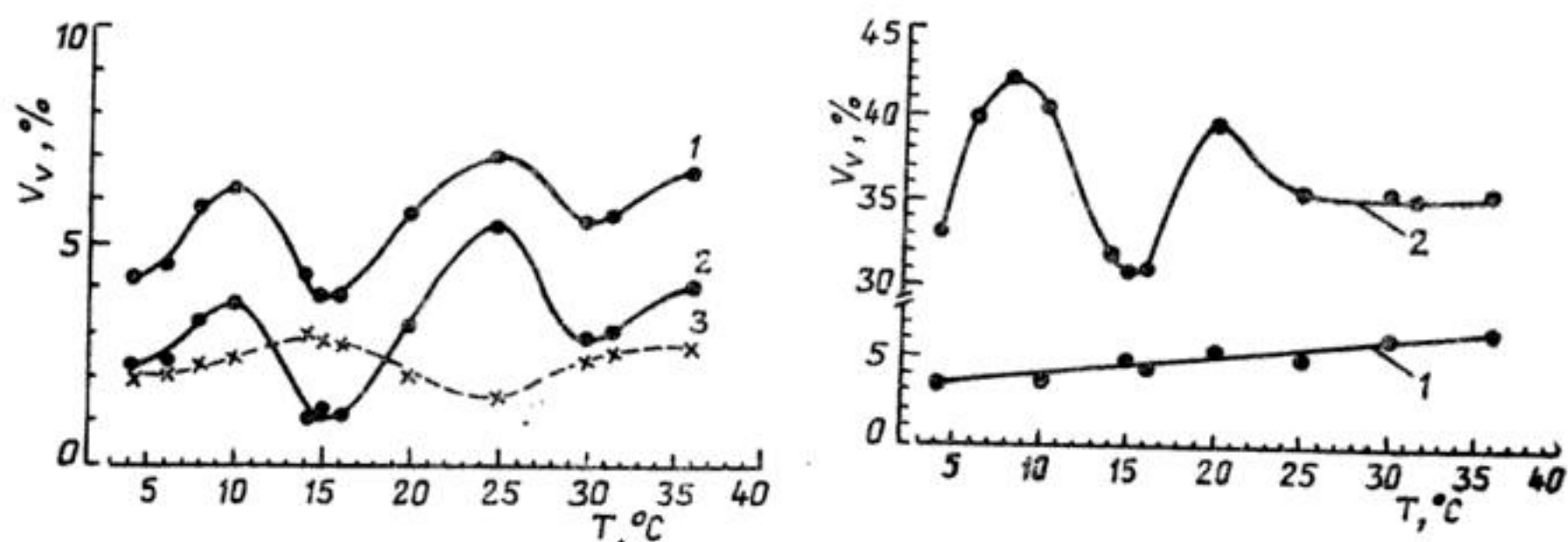


Рис. 7. Кинетика изменений относительных объемов: капилляров (1), просвета капилляров (2), эндотелиоцитов микрососудов (3) миокарда пробуждающихся сусликов в процессе разогрева тела животных

Рис. 8. Кинетика изменений относительных объемов: гиалоплазмы (1), митохондрий (2) кардиомиоцитов миокарда пробуждающихся сусликов в процессе повышения температуры тела

анализ кинетических кривых (1 и 2) позволил выявить общие для обоих графиков четыре точки экстремума на температурной шкале: $T_1 = 10$ °C, $T_2 = 15$ °C, $T_3 = 25$ °C, $T_4 = 30$ °C. В этих точках наблюдается последовательное чередование процессов роста и убыли объемных долей капилляров и просвета микрососудов с температурным периодом равным 15 °C. Приведенные данные позволяют предположить наличие двух фаз (Ph) интенсификации кровоснабжения сердечной мышечной ткани: 1 — Ph_1 , $T_1 \in (4-15)$ °C с максимумом кровоснабжения при температуре тела 10 °C, 2 — Ph_2 , $T_2 \in (15-30)$ °C, с максимумом кровоснабжения при температуре тела 25 °C. На рис. 7 (кривая 3) приведен эмпирический график изменения относительного объема эндотелиоцитов капилляров миокарда пробуждающихся сусликов. Волнообразное изменение цифровых значений показателя $V_v^{\text{эн}}$ объясняется периодически повторяющимися конформационными переходами типа «открытые $\rightleftharpoons$ закрытые» капилляры, процессами «дегидратации $\rightleftharpoons$ гидратации» цитоплазмы эндотелиоцитов.

На рис. 8 (кривая 1) представлен график изменения относительного объема гиалоплазмы кардиомиоцитов пробуждающихся сусликов. Как оказалось, в процессе повышения температуры тела животных в сердечных миоцитах происходит монотонное увеличение относительного объема гиалоплазмы от 3,50 % при 4 °C до 7,00 % при 36 °C ($\epsilon = \pm 0,30$ %). Приведенные данные свидетельствуют о постепенной гидратации ранее умеренно обезвоженных сердечных миоцитов, о направленном изменении морфофункционального состояния этих клеток по типу «темные $\rightarrow$ светлые» кардиомиоциты.

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что существует тесная взаимосвязь между увеличением количества светлых кардиомиоцитов в паренхиме миокарда и ростом числа сердечных сокращений. Следовательно, процессы «дегидратации $\rightleftharpoons$ гидратации» миокарда имеют важное биологическое значение для сохранения сократительной функции сердца гетеротермных животных в состоянии холодового оцепенения, во время пробуждения, бодрствования и последующего вхождения в зимнюю спячку. Нами установлено, что при разогреве тела пробуждающихся сусликов наблюдается волнообразный характер изменения объемной доли митохондрий кардиомиоцитов (рис. 8, кривая 2). Периоды роста цифровых значений показателя V_v^{mx} , вызванные набуханием митохондрий, сменяются периодами нормализации ультраструктуры этих органелл. Максимальные значения показателя V_v^{mx} равные 42,50 и 39,50 % определяются при температурах тела животных соответственно $T_1 = 8^\circ\text{C}$ и $T_2 = 20^\circ\text{C}$, а минимальное значение равное 31,00 % — при температуре тела сусликов равной 15°C . Общеизвестно, что набухание митохондрий в кардиомиоцитах является неспецифической реакцией и наблюдается, в частности, при повышении функциональной нагрузки на сердечно-сосудистую систему. В условиях холодового оцепенения (зимней спячки) суслики находятся в состоянии полной гипокинезии с минимумом функциональной активности сердца. В период пробуждения животных наблюдается набухание митохондрий в кардиомиоцитах, вызванное существенным увеличением функциональной нагрузки на сердце (рост числа сердечных сокращений) и мышечной нагрузки (сопротивление перфузии спавшимися сосудами большого круга кровообращения).

Анализ и сопоставление эмпирических кривых изменений морфометрических показателей: $V_v^{стр}$, $V_v^{ов}$, $V_v^{кап}$, $V_v^{пк}$, V_v^{mx} — позволили выявить общую для всех графиков точку экстремума на температурной шкале $T = 15^\circ\text{C}$. В этой точке наблюдается смена двух последовательных волнообразных процессов изменений морфофункционального состояния основных элементов сердечной мышечной ткани. Следовательно, точка экстремума на температурной шкале (15°C) является естественной границей двух последовательных фаз активизации функции сердечно-сосудистой системы.

1. Фаза преимущественного кровоснабжения органов и тканей передней части туловища животных $Ph.I.T \in (4-15)^\circ\text{C}$. В этот период частота сердечных сокращений возрастает от 7—10 до 150—180 уд/мин. Определяется химический, а затем и сократительный термогенез. Последний проявляется в постепенно усиливающейся треморе скелетных мышц передних конечностей. Скелетные мышцы задних конечностей находятся в состоянии относительного покоя, без видимых проявлений сократительной активности.

2. Фаза интенсификации кровоснабжения органов и тканей задней части туловища животных $Ph.II.T \in (15-36)^\circ\text{C}$. В этот период частота сердечных сокращений возрастает от 150—180 до 350—370 уд/мин. Определяется постепенно усиливающийся сократительный термогенез в виде треморы скелетных мышц задних конечностей. В конце этой фазы активизации функций сердечно-сосудистой системы суслики переходят в состояние бодрствования.

Результаты проведенных исследований позволили установить, что на всех уровнях организации сердца определяются морфологические проявления процесса адаптации этого органа к возрастающей функциональной и мышечной нагрузке.

1. Органный уровень организации:

- химический термогенез в бурой жировой ткани [11—12],
- образование водной эмульсии и направленное перемещение воды и высокоэнергетических метаболитов из бурой жировой ткани в сердечную мышечную ткань.

2. Сфеоргонный уровень организации. В условиях пробуждения сусликов функционирование сердечной мышечной ткани осуществляется путем

целенаправленной перемежающей активности конкретного множества паренхиматозно-стромальных порционов — участков мышечной ткани, представляющих собой структурно-функциональные единицы миокарда — миокардионы [6]:

- активизация функции синхронно работающих темных (умеренно обезвоженных) миокардионов в начале пробуждения животных,
- асинхронность работы темных и светлых миокардионов,
- интенсификация функции синхронно работающих светлых миокардионов. Следовательно, способность миокардионов работать в цикле «синхронно-асинхронно» играет важную роль в процессах адаптации сердца к изменяющимся условиям функционирования.

3. Тканевой уровень организации:

- «гидратация $\rightleftharpoons$ дегидратация» стромы миокарда,
- конформационные переходы типа «закрытые $\rightleftharpoons$ открытые» капилляры,
- гидратация паренхиматозного компонента миокарда.

4. Клеточный уровень организации:

- гидратация темных кардиомиоцитов и повышение их сократительной способности,

- «гидратация $\rightleftharpoons$ дегидратация» цитоплазмы эндотелиоцитов капилляров,

- снижение функциональной активности фибробластов, миграция определенного количества мононуклеарных клеток в сосудистое русло.

5. Субклеточный уровень организации кардиомиоцитов:

- релаксация миофибрилл и увеличение амплитуды цикла «сокращение $\rightleftharpoons$ расслабление»,

- «гидратация $\rightleftharpoons$ дегидратация» митохондрий,

- «интеграция $\rightleftharpoons$ дезинтеграция» структурно-функциональных комплексов митохондрий,

- деление митохондрий,

- «сборка $\rightleftharpoons$ разборка» внутримитохондриальных мембран с образованием крист разной протяженности и различной конфигурации,

- целенаправленное обновление белково-липидного состава плазмолеммы [2],

- циклическое изменение состояния хроматина ядра «эухроматин $\rightleftharpoons$ гетерохроматин»,

- гликолиз и липолиз высокоэнергетических субстратов [11, 12],

- активация белок-синтезирующего аппарата, лизосом и рециклизация макромолекул протеина [3].

Таким образом, обобщая результаты проведенных исследований и данные [5, 6], можно заключить, что эволюция адаптации сердца гетеротермов к функционированию при низких температурах тела животных осуществлялась путем отбора конкретного множества специфических реакций структурно-функциональных элементов, временная последовательность которых, их сочетание явилось специфическим для каждого последующего состояния организма: холодное; оцепенение, пробуждение, бодрствование и вхождение в зимнюю спячку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Высочина Т. К. Содержание воды, калия и натрия в некоторых органах краснощекого суслика (*Citellus Erythrogenys Rr.*) в различные сезоны года и во время зимней спячки // Зимняя спячка и сезонные ритмы физиологических функций. — Новосибирск : Наука, 1971. — С. 205—221.
2. Жегунов Г. Ф. Биохимические и ультраструктурные основы функциональной активности сердца зимоспящих животных : Дис. ... докт. биол. наук. — Харьков, 1990. — 267 с.
3. Жегунов Г. Ф., Загоруйко Г. Е. Возможная роль лизосом в поддержании белкового гомеостаза кардиомиоцитов сусликов в период зимней спячки // Влияние охлаждения на биологические объекты. — Харьков: ИПК и К АН УССР, 1990. — С. 55—59.
4. Загоруйко Г. Е. Графико-аналитический метод в морфометрическом анализе ультраструктур мышечных клеток сердца // Научно-технический прогресс в кардиологии. — Харьков : Б. и., 1986. — С. 11—14.

5. Загоруйко Г. Е. Закономерности структурной перестройки стромы миокарда сус-
ликов при адаптации к зимней спячке // Проблемы криобиологии.—1991.—
№ 1.— С. 3—8.
6. Загоруйко Г. Е., Жегунов Г. Ф., Загоруйко Ю. В. Миокардионы в процессах адап-
тации и компенсации нарушенных функций миокарда // Структурно-функциональ-
ные единицы и их компоненты в органах висцеральных систем в норме и патоло-
гии : Тез. докл. науч.-практич. конф.— Харьков : Б. и., 1991.— С. 83—85.
7. Загоруйко Г. Е., Офицеров В. Н. Механическое устройство для морфометрического
и ориентационного анализа биологических структур // Бюл. эксперим. биологии
и медицины.— 1979.— 88, № 11.— С. 625—626.
8. Каруну В. Я. Электронная микроскопия.— Киев : Вища школа, 1984.— 208 с.
9. Круман И. И. Сравнительный анализ пролиферативных процессов у зимоспящих // Успехи соврем. биол.— 1989.— 107.— № 3.— С. 434—445.
10. Медведев Л. Н., Замай Т. Н., Медведева С. Е. Депонирование калия и воды в бурой
жировой ткани у адаптированных к холоду крыс // Физиол. ж. СССР.— 1987.—
73, № 1.— С. 124—129.
11. Механизмы зимней спячки.— Пушино : Б. и., 1987.— 206 с.
12. Механизмы зимней спячки : Тез. докл. Всесоюз. симпозиума.— Махачкала :
Б. и., 1990.— 147 с.
13. Nnodim Joseph O. Development of adipose tissues // Anat. Rec.— 1987.— 219, N 4.—
P. 233—237.
14. Wang L. C. H. Energetic and field aspects of mammalian torpor: the Richardson's
ground squirrel // Strategies in cold : Academic Press.— 1978.— P. 109—149.
15. Wang L. C. H. Life at low temperatures: mammalian hibernation // Cryo-Letters.—
1985.— 6, N 4.— P. 257—274.

Харьковское обл. правление
Всес. науч. медико-техн. общества

Поступила 29.10.91

G. E. ZAGORUYKO

THE KINETICS OF STRUCTURAL CHANGES IN HIBERNATING GROUND SQUIRREL MYOCARDIUM DURING AROUSAL

Regional Board of the All-Union Research Medical and Technical Society,
Kharkov

The structure of myocardium of arousing ground squirrel has been studied using light and electron microscopy at body temperatures 8, 10, 14, 16, 20, 25, 30, 36 °C. Plots were constructed for proportional changes in stroma, connective tissue bulk, connective tissue cells, capillaries, capillary lumens, capillary endotheliocytes, hyaloplasm and mitochondria of cardiomyocytes. The extremum has been determined which appeared to be a natural borderline between two subsequent phases of the functional activation of cardiovascular system, i. e. the phase of preferential blood supply to organs and tissues of the anterior body part of animals Ph. I. T (4—15) °C and the phase of intensification of blood supply to organs and tissues of the posterior body part Ph. II. T (15—36) °C. It has been concluded that the evolution of cardiac adaptation of heterothermal animals and functioning at low body temperatures was carried out by selection of a concrete set of unspecific reactions of structural and functional elements whose time sequence and combination were specific for every further condition of the body such as torpor, arousal, awake and entering to hibernation.

Г. Е. ЗАГОРУЙКО

КІНЕТИКА СТРУКТУРНИХ ЗМІН МІОКАРДА ХОВРАХІВ У ПРОЦЕСІ ПРОБУДЖЕННЯ ПІД ЧАС ЗИМОВОЇ СПЛЯЧКИ

Харківське обл. правління
Всес. наукового мед.-техн. т-ва,
м. Харків.

Проведено світлооптичне і електронно-мікроскопічне вивчення структурної організації міокарда ховрахів, що пробуджуються при температурі тіла 8, 10, 14, 16, 20, 25, 30, 36 °C. Створені графіки змін об'ємних частин: стромы, основної речовини з'єднувальної тканини, клітин з'єднувальної тканини, капілярів, просвіту капілярів, ендотеліоцитів мікросудин, в кардіоміоцитах — гіалоплазми і мітохондрій. Визначена точка екстремума на температурній шкалі (15 °C), яка є природною межею двох послідовних фаз активації функції серцево-судинної системи: фази переважного кровопостачання органів і тканин передньої частини тулуба тварин Ph. I. T (4—15) °C і фази інтенсифікації кровообігу органів і тканин задньої частини тулуба тварин. Ph. II. T (15—36) °C. Зроблено висновок про те, що еволюція адаптації серця гетеротермів до функціонування при низьких температурах тіла здійснювалась шляхом відбору багатьох неспецифічних реакцій структурно-функціональних елементів, часова послідовність котрих, їх сполучення стало специфічним для кожного наступного стану організму: холодове заціпеніння, пробудження, неспання і входження у зимову сплячку.

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЕ И ЦИТОЗОЛЬНЫЕ БЕЛКИ ЭРИТРОЦИТОВ

Методом ЭПР спиновых меток и зондов исследована конформационная динамика белков эритроцитов в интервале температур $40 \div -130$ °С. Показано, что замораживание клеток приводит к необратимым изменениям структуры водно-белковой поверхности и гидрофобных полостей биомакромолекул. Замещение молекулы воды на молекулы неэлектролитов вызывает модификацию водно-белковых взаимодействий и термотропного поведения белков и цитозоля эритроцитов. Высказано предположение об увеличении кооперативности водно-белковых и белок-белковых взаимодействий, в том числе между мембраной и цитозольными структурами, под действием криопротекторов.

Известно, что действие различных факторов (температуры, неэлектролитов, ионов) на структуру водорастворимых изолированных биомакромолекул можно объяснить в рамках динамической модели белок-вода [4]. Для криобиологии большой интерес представляет выяснение особенностей воздействия указанных агентов на структуру мембраносвязанных белков, образующих белок-липидные и белок-белковые комплексы, в том числе с цитозольными структурами. Наиболее хорошо в этом отношении изучено влияние температуры и химических агентов на липид-липидные взаимодействия в мембранах. Известная неспецифичность реакции биомембран на присутствие в среде ионов (модификация электростатических взаимодействий вблизи поверхности мембраны, фазовое разделение липидов и агрегация белков [10, 13]), а также амфифильных веществ (нарушение структурной упорядоченности мембран, появление в бислойе зон с небислойной упаковкой липидов, изменение микроокружения белков [8, 11]) обусловлена, по-видимому, общей природой сил, стабилизирующих липид-липидные и белок-липидные взаимодействия. Последние могут регулироваться изменением липидного микроокружения либо непосредственно взаимодействием мембранотропных агентов с белками. Большую роль в этих взаимодействиях играет вода, структура которой в клетках еще недостаточно изучена.

Настоящая работа посвящена вопросам воздействия внеклеточных и проникающих через мембраны неэлектролитов на водно-белковую поверхность мембраносвязанных и цитозольных структур.

Динамическую структуру белков эритроцитов изучали методом спиновых меток и зондов. Использовали йодацетамидную и малеимидную спиновые метки, модифицирующие SH- и NH₂-группы белков. Показано [12], что при использовании изолированных мембран около 80 % меток связываются с белками спектрин-актинового комплекса, что позволяет исследовать цитозольную водно-белковую поверхность мембран. Учитывая важную роль цитозольных белков в стабилизации нативных взаимодействий мембранных компонентов, мембраносвязанные белки цельных эритроцитов изучали также с помощью гидрофобного спинового зонда на основе бензокарболина, который эффективно связывается мембранами.

Использовали эритроциты из донорской крови, хранившейся 3—5 сут при 4 °С, отмытые от плазмы физиологическим раствором. Тени эритроцитов (любезно предоставленные сотрудниками ИПКиК АН УССР Репиной С. В. и Стусь Л. К.) были получены гипотоническим лизисом в натрийфосфатном буфере (5 ммоль/л Na-фосфатный буфер, 150 ммоль/л NaCl, pH 7,4). Для экспериментов с мечением белков применяли белые тени, не содержащие свободного гемоглобина. В ряде случаев использовали розовые тени, замкнутость которых контролировали по способу [9]. Концентрацию белка в образцах определяли спектрофотометрически.

Ковалентное присоединение меток осуществляли смешиванием эритро-массы (гематокрит 100 %) или суспензии мембран (концентрация белка около 5 мг/мл) со спиртовым раствором меток до конечной концентрации спирта и радикалов соответственно 1—5 % и 1 ммоль/л. Смесь инкубировали

в течение 2 ч при 20 °С и далее в течение 12 ч при 4 °С. Несвязавшиеся метки удаляли центрифугированием суспензии при разбавлении ее изотоническим буфером. Гидрофобный зонд вводили в мембраны из спирта (1 % спирта и 0,1 ммоль/л радикалов в суспензии эритроцитов).

Локализацию нитроксильных радикалов в клетках контролировали, используя методику добавочного уширения с применением ионов феррицианида калия (ФЦ) [6]. Концентрация парамагнитных ионов, необходимая для полного уширения сигнала ЭПР от растворенных во внеклеточной среде нитроксильных радикалов, составила 100 ммоль/л. Этот же подход использовали для изучения цитозоля клеток, в том числе при последовательной отмывке лизированных эритроцитов от гемоглобина. В этом случае применяли водорастворимый спиновый зонд ТЕМРОН, который легко проникает в клетки, в отличие от парамагнитных ионов, не проникающих через мембраны нативных эритроцитов. Количество замкнутых для ионов розовых теней варьировало в различных опытах и зависело, по-видимому, от исходной гетерогенности эритроцитов.

В качестве неводных добавок использовали криопротекторы (КП): полиэтиленгликоль с молекулярной массой 2000 (ПЭГ) производства фирмы «Мерк», глицерин (ГЛ) и 1,2-пропандиол (ПД) отечественного производства марки ХЧ. Необходимые концентрации веществ получали смешиванием соответствующих растворов 1 : 1 с суспензией клеток или теней. Нативность мембран контролировали по способу [9].

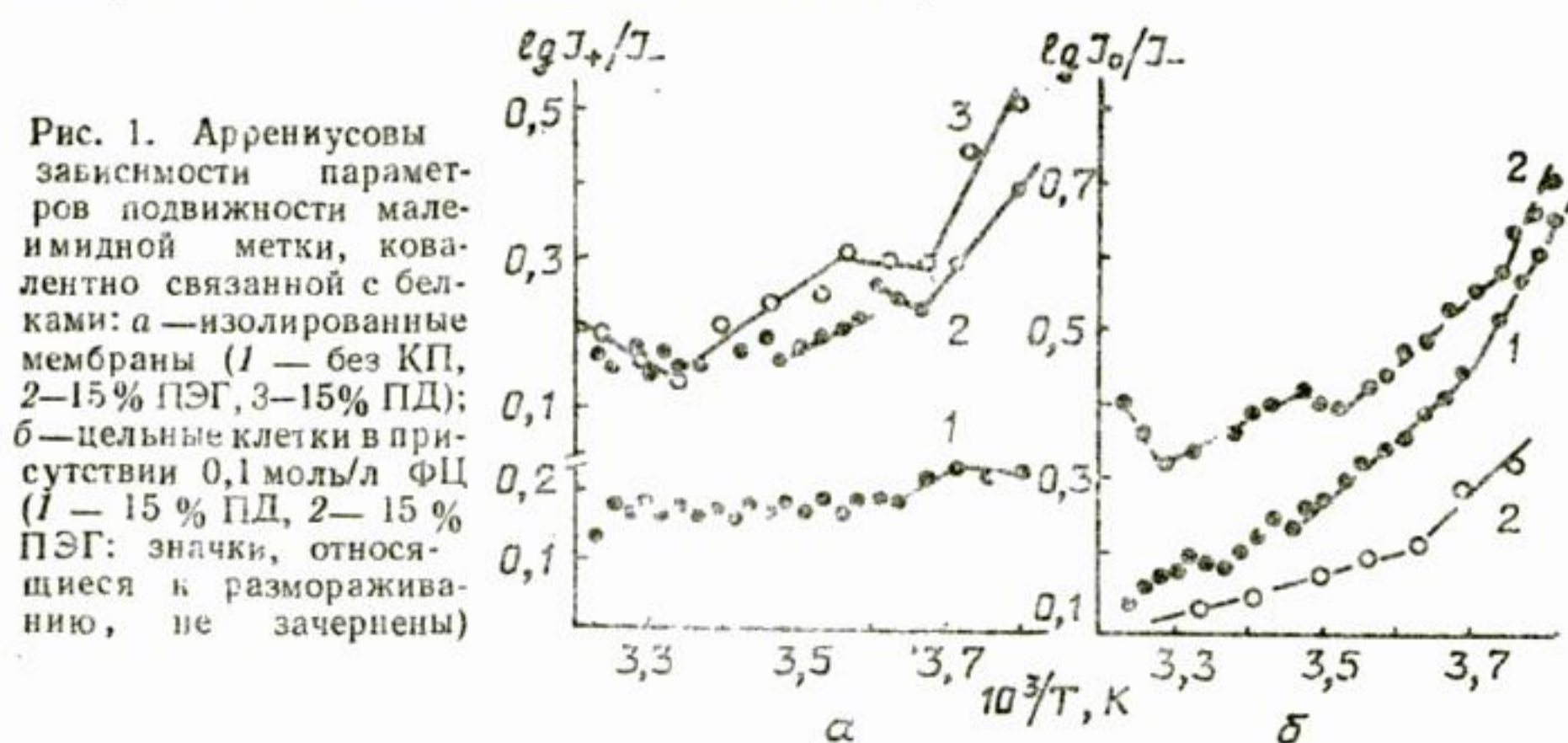
Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре ЭПР ЕР-100 Д «Брукер» со стандартной термоприставкой. Для характеристики подвижности слабо связанных ковалентных меток использовали отношения интенсивностей индивидуальных «узких» линий спектров (J_+/J_- , J_0/J_-), в качестве параметра подвижности иммобилизованных меток и зондов служили максимальное расщепление спектров ЭПР ($2A_{\text{макс}}$), а также эмпирический параметр $J_{1/2}$ (полувысота «иммобилизованного» сигнала в слабом поле) [6]. По интенсивности центральной компоненты спектра ЭПР меток судили также о динамике проникновения меток через мембраны, оценивая кинетику восстановления (потери парамагнетизма) радикалов внутриклеточными восстановительными агентами, а также доступность нитроксидов уширяющему и окисляющему восстановленные радикалы ФЦ.

Регистрация спектров ЭПР в динамике показала, что метки заметно восстанавливаются, по-видимому, в основном в цитозоле и на внутренней поверхности мембран. Сравнительный анализ влияния парамагнитных ионов на спектры ковалентных меток, присоединенных к белкам цельных эритроцитов и изолированных мембран, позволил заключить, что нитроксильные радикалы модифицируют активные группы белков во внешнем и внутреннем монослоях мембран, а также SH и NH₂-группы растворенных в цитозоле белков. Действительно, добавление ионов в суспензию нативных эритроцитов приводило к уменьшению интенсивности сигнала ЭПР ковалентных меток в результате вычитания из спектра сигнала от доступных внеклеточным ионам спин-меченых фрагментов белков. Видимое из разностного спектра уменьшение подвижности нитроксидов примерно в три раза объясняется экспонированием их в цитозоль, микровязкость которого выше, чем этот параметр для внеклеточной среды. «Проявление» в присутствии ионов суперпозиции спектров от меток, сравнительно быстро вращающихся (частота вращательной подвижности, $\nu_{\pm} \sim 10^{10}$ с), а также от меток, более жестко связанных с белками ($\nu_{\pm} \sim 10^8$ с), свидетельствует о присоединении меток к боковым группам и гидратированным полостям белков с цитозольной локализацией. В случае белых теней, проницаемых для ионов, обнаружено, что ФЦ слабо влияет на спектры маленимидной метки, в то время как ионы хлористого никеля полностью уширяют сигнал от расторможенных меток. Это согласуется с данными об отрицательном заряде внутренней поверхности мембран эритроцитов и преимущественном мечении белков спектрин-актинового комплекса.

Спектр ЭПР гидрофобного зонда в отсутствие уширителей соответствует перераспределению молекул радикала между полярной средой ($\nu_{\pm} \sim 10^{10}$ с) и гидрофобной зоной ($\nu_{\pm} \sim 10^8$ с). Добавление в суспензию эритроцитов парамагнитных ионов приводит к уменьшению сигнала за счет полной доступности уширителю «расторможенных» радикалов и «проявлению» суперпозиции сигналов от зондов, вращающихся с частотами 10^9 и 10^8 с и локализованных, вероятно, в анизотропной зоне липидов и белковых полостях, слабо доступных растворителю.

Таким образом, применение спиновых меток и зондов позволяет получать информацию о состоянии внешней и внутренней водно-белковой поверхности мембран, а также информацию о динамической структуре белковых полостей, слабо доступных объемной воде.

Известно, что слабые полярные и гидрофобные взаимодействия, определяющие конформацию биомакромолекул, растворенных в воде или объединенных в надмолекулярные комплексы с компонентами биомембран, зависят от температуры и состава растворителя. Применение спектроскопических методов для изучения термотропного поведения водорастворимых белков позволило установить, что биомакромолекулы претерпевают конформационные перестройки при температурах, далеких от денатурационных [3]. Были высказаны предположения о физиологической роли этих переходов, обусловленных водно-белковыми взаимодействиями и обеспечивающих баланс стабильности-лабильности макромолекул, а также гипотеза о сопряженной с этими взаимодействиями регуляции внутриклеточных процессов [1, 2]. В частности, в мембранах также могут иметь место механизмы, обеспечивающие нативные структурно-функциональные взаимоотношения компонентов, в основе которых лежат их взаимодействия с водой. Изменение структуры растворителя при замене молекул воды на неводные добавки может поэтому существенно влиять на реакцию биомакромолекул, мембран и клеток в целом на температуру.



Для выяснения механизмов модифицирующего действия КП на конформационную динамику белков нами были исследованы термоиндуцированные перестройки мембраносвязанных и растворенных в цитозоле биомакромолекул в интервале температур $40 \div -130$ °С. При изучении влияния охлаждения на динамическую структуру белков в зоне гипотермии было обнаружено, что температуры, при которых наблюдаются особенности на аррениусовых кривых параметров подвижности меток и гидрофобного зонда, согласуются с данными, полученными при изучении липидного матрикса (рис. 1, 2; [8]). Обращают на себя внимание участки аномального хода кривых температурных зависимостей подвижности радикалов при субфизиологических температурах (рис. 2). Подобные эффекты были обнаружены при изучении конформационных переходов водорастворимых глобулярных белков. Корреляция этих перестроек с температурозависимым изме-

нением прочности водородных связей в растворителе позволила авторам [7] предположить механизм стабилизации структуры белков за счет термоиндуцированного изменения водно-белковых взаимодействий. Необратимые изменения структуры биомакромолекул, например при денатурации, приводят к утрате способности стабилизировать конформацию белков в физиологическом интервале температур [3]. Нами было обнаружено, что замораживание эритроцитов также приводит к необратимости температурных перестроек белков, которая может быть связана с разрыхлением поверхности макромолекул (рис. 2, б).

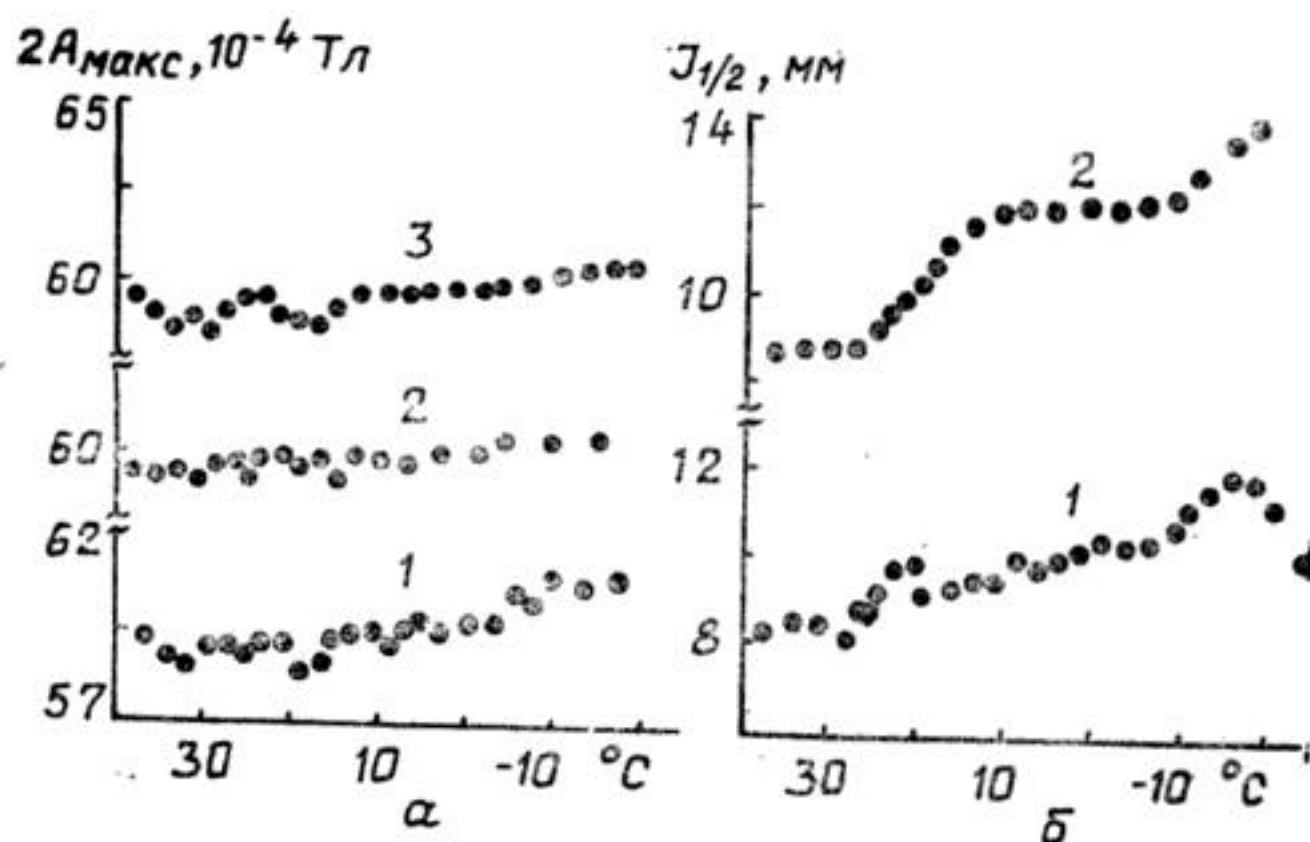


Рис. 2. Температурные зависимости параметров спектров ЭПР гидрофобного зонда, встроенного в мембраны цельных эритроцитов: а, 1 — в отсутствие КП, а, 2 — 3 % ГЛ, а, 3 — 3 % ПЭГ; б, 1 — замораживание, б, 2 — охлаждение после размораживания

Для изучения внутриклеточных водно-белковых взаимодействий был проведен сравнительный анализ термопереходов в цитозоле цельных эритроцитов и внутренней среде розовых теней, замкнутых для парамагнитных ионов. На аррениусовых кривых подвижности цитозольного зонда были отмечены слабые изломы при 27 и 17 °С (рис. 3, а), коррелирующие с мембранными переходами. Слабая температурная зависимость зонда в тенях обусловлена, по-видимому, существенным увеличением доли объемной воды вследствие удаления гемоглобина, однако водорастворимый зонд в тенях также регистрировал переходы, при которых изменялась жесткость полостей белков, экспонированных в цитозоль.

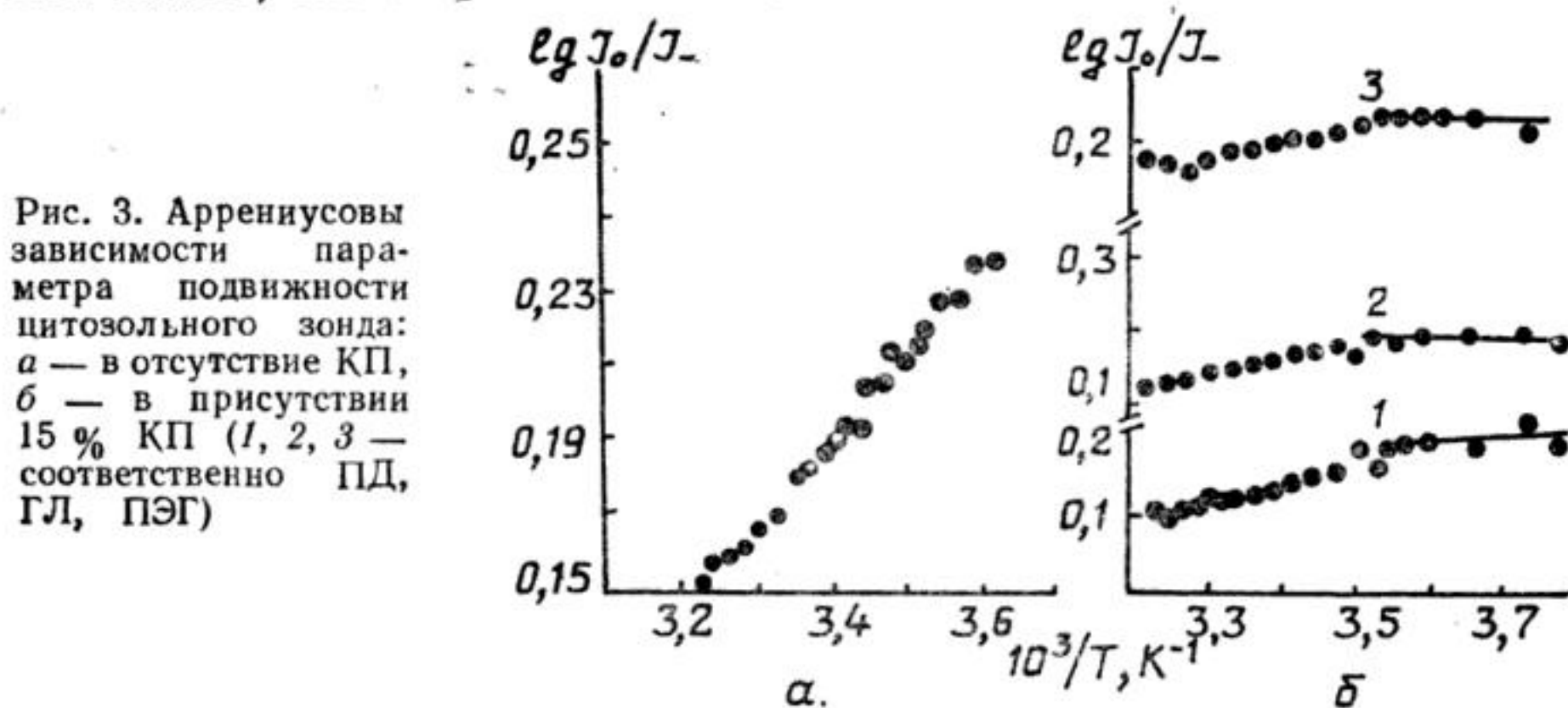


Рис. 3. Аррениусовы зависимости параметра подвижности цитозольного зонда: а — в отсутствие КП, б — в присутствии 15 % КП (1, 2, 3 — соответственно ПД, ГЛ, ПЭГ)

Полученные данные, по нашему мнению, являются свидетельством кооперативных термоиндуцированных изменений водно-белковых взаимодействий, а также, опосредованно через воду, взаимодействий между мембрано-связанными белками и растворенными в цитозоле биомакромолекулами. Согласно [1], лабильность биоструктур обусловлена модификацией слабо-связанной воды, которая легко обменивается со свободной, что может обеспечить опосредованные через растворитель белок-белковые взаимодействия [4, 5]. Поэтому можно предположить, что модификационные адаптации

клеточных структур [2], обуславливающие, по-видимому, обратимость действия факторов криоконсервирования, связаны с влиянием криопротекторов на конформационную гибкость биомакромолекул.

Варьирование концентраций неводных добавок в суспензии эритроцитов позволило выявить некоторые особенности в действии КП, обладающих различной проникающей способностью. Было обнаружено, что небольшие концентрации веществ (1—3 %) вызывают разрыхление цитозольной водно-белковой поверхности мембран при 37 °С (рис. 4) и изменение профиля температурной зависимости подвижности гидрофобного зонда (рис. 2). Сглаживание термопереходов в полостях белков в присутствии ГЛ объясняется, по-видимому, более эффективным взаимодействием проникающего неэлектролита с областями мембран, слабо доступными воде. Результаты, полученные нами с помощью ковалентной метки, согласуются с данными работы [5], где показана корреляция между изменением активности воды в присутствии малых концентраций высокомолекулярных ПЭГ и конформационной гибкостью водорастворимых белков. Поскольку не было обнаружено существенных различий в концентрационных зависимостях влияния КП на липидный бислой при 37 °С [8], можно предположить, что трансмембранное действие ПЭГ обусловлено модификацией водно-белковых взаимодействий.

Сравнение влияния веществ на области белков, по-разному доступных растворителю, показало, что наибольший эффект достигается на водно-белковой поверхности, о чем свидетельствует резкое изменение термотропного поведения боковых групп белков, модифицированных ковалентными метками (рис. 1, 3). Подобные изменения были обнаружены и в реакции цитозоля на охлаждение в присутствии КП, что выражалось в появлении переходов, не регистрируемых в отсутствие неэлектролитов (рис. 3, б). При увеличении концентрации КП в суспензии эритроцитов происходило некоторое обезвоживание клеток под действием ПЭГ, сопровождаемое увеличением микровязкости цитозоля и внутриклеточной поверхности мембран (рис. 1, 4). В то же время параметр микровязкости цитозоля в присутствии ПД и ГЛ был даже несколько ниже, чем таковой для образцов, не содержащих данных веществ. Обращает на себя внимание аномальное изменение микровязкости при охлаждении в субфизиологической области температур, наблюдаемое в присутствии ПЭГ в цитозоле и на внутриклеточной водно-белковой поверхности мембран (рис. 1, б; 3, б).

Сопоставление влияния КП на подвижность водорастворимых зондов и ковалентно связанных меток в цитозоле эритроцитов показывает, что при околонулевых температурах резко уменьшается энергия активации вращательной подвижности зондов и увеличивается этот параметр для меток (рис. 1, 3, 4). При субнулевых температурах наблюдается даже увеличение частоты вращательной подвижности зондов до уровня, сравнимого с параметрами при высоких температурах. Предположение о набухании клеток в присутствии КП в зоне около 0 °С мы проверили в экспериментах по изучению диффузии зонда через мембрану, регистрируемой по изменению амплитуды сигнала ЭПР при охлаждении клеток. Увеличение этого параметра не было обнаружено вплоть до 0 °С, однако изломы на его температурной зависимости были отмечены при температурах мембранных переходов. В присутствии ГЛ и ПЭГ увеличение входа молекул зонда в эритроциты было

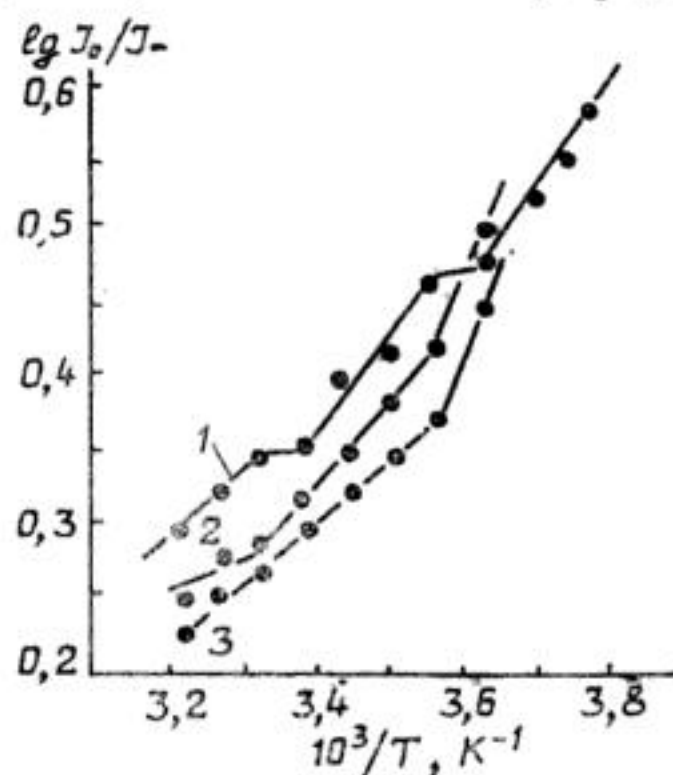


Рис. 4. Аррениусовы зависимости параметра подвижности йодацетамидной метки, ковалентно связанной с белками эритроцитов, в присутствии 0,1 моль/л ФЦ: 1 — без КП, 2 — 3 % ПД, 3 — 3 % ПЭГ

зарегистрировано при отрицательных температурах, в то время как в случае ПД это изменение было пренебрежимо малым.

Таким образом, видимое уменьшение энергии активации вращательной подвижности цитозольного зонда может быть результатом структурного перехода в цитозоле при температурах 5—3 °С вследствие конформационной перестройки экспонированных в цитозоль белков и сжатия молекул зонда в микрообласти свободной воды, где подвижность радикалов будет слабо отражать динамику цитозольных структур при дальнейшем охлаждении [6]. Структурные переходы, регистрируемые в присутствии КП водорастворимыми зондами и белковыми метками, свидетельствуют об увеличении «чувствительности» структуры объемной воды к мембранным переходам. Можно предположить, что в результате растворения в клетках веществ, образующих водородные связи с водой, происходит увеличение областей кооперативности в системе мембрана — цитозоль. Возможно также, что подобное действие оказывает внеклеточный ПЭГ, вызывая частичное обезвоживание, т. е. удаляя из клеток свободную воду и увеличивая долю связанной воды.

В связи с полученными данными о влиянии неэлектролитов на взаимодействия внутриклеточных компонентов представляло интерес выяснить особенности воздействия КП на конформационную динамику белков при низких температурах. Сравнение наклонов кривых температурных зависимостей параметров подвижности меток, сравнительно жестко связанных с белками, при субфизиологических температурах позволило выявить увеличение зависимости от температуры структуры гидратированных полостей

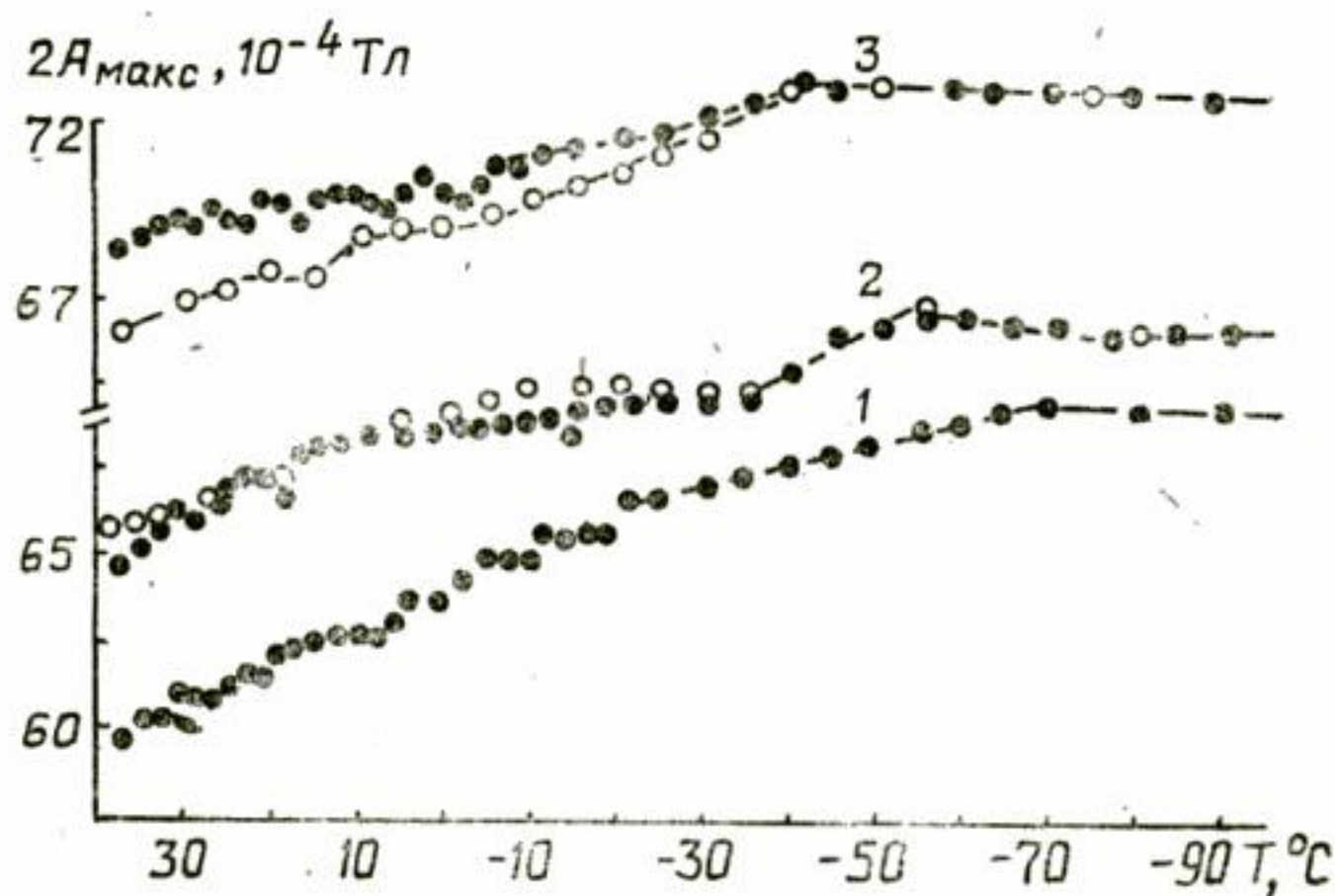


Рис. 5. Влияние КП на подвижность ковалентной малеимидной метки, связанной с полостями белков эритроцитов, в присутствии 0,1 моль/л ФЦ: 1 — без КП, 2 — 15 % ПД, 3 — 15 % ПЭГ; значки, относящиеся к размораживанию, не зачерплены

под действием ПД и уменьшение — в присутствии ПЭГ (рис. 5). При этом вещества практически не влияли на температуры переходов, лишь изменяя их характер. Увеличение структурной «жесткости» полостей белков под действием ПЭГ обусловлено, по-видимому, иммобилизацией водно-белковой поверхности вследствие частичного обезвоживания клеток. Действительно, проникающий в клетки ПД, не вызывающий увеличения вязкости цитозоля, не приводил также к увеличению «жесткости» слабо доступных растворителю полостей белков. Вместе с тем было обнаружено, что ПД сглаживает структурные перестройки при температурах ниже 20 °С (рис. 5, 2), аналогично действуя на липидный бислой [8]. Эти результаты могут свидетельствовать об инициации мембранных переходов вблизи 10 и 0 °С в гидра-

тированных полостях белков, а также об увеличении взаимодействия неэлектролита с мембрановстроенными белками, например, за счет перекрывания их гидратных оболочек [4].

Принимая во внимание обнаруженные отличия в действии веществ на температурозависимые конформационные перестройки белков, мы исследовали также влияние КП на обратимость эффектов замораживания клеток, механизмы криоповреждения которых включают изменение динамики поверхности внутриклеточных белков. Увеличение, например, экспонированности в растворитель боковых групп или доступности воде полостей белков может приводить к изменению функциональной активности ферментов и нарушению взаимодействия субклеточных структур. Было обнаружено, что ПЭГ не предотвращает разрыхления белков при плавлении связанной с полостями и неполярными поверхностями воды (рис. 5,3), в то время как в присутствии ПД не наблюдается существенных изменений конформационной динамики мембраносвязанных белков.

Таким образом, наши исследования позволили установить, что замещение молекул воды в суспензии клеток на молекулы неэлектролита приводит к модификации термотропного поведения мембраносвязанных и цитозольных белков, характер которой свидетельствует о роли слабосвязанной воды в кооперативных белок-белковых и белок-липидных взаимодействиях. Одним из механизмов модификационных адаптаций субклеточных структур к факторам криоконсервирования может быть поддержание определенной лабильности биомакромолекул при стабилизации проникающими криопротекторами структуры гидратированных поверхностей и полостей белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксенов С. И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. — М. : Наука, 1990. — 117 с.
2. Браун А. М., Моженок Т. П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. — Л. : Наука, 1987. — 232 с.
3. Жуковский А. П., Халоимов А. И., Ровнов Н. В., Раев А. Н. Термостабильность структуры белков в нативном состоянии и механизм ее поддержания // Биофизика. — 1987. — 32, № 4. — С. 583—587.
4. Кяйвярайнен А. И. Динамическое поведение белков в водной среде и их функции. — Л. : Наука, 1980. — 272 с.
5. Кяйвярайнен А. И., Рожков С. П., Суханова Г. А., Франек Ф. Изменение гибкости антител и их взаимодействие с водой при реакции с гаптенем и неспецифических воздействиях // Молек. биология. — 1982. — 33. — С. 55—58.
6. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. — М. : Наука, 1974. — 256 с.
7. Халоимов А. И., Жуковский А. П., Шутько С. В., Сидорова А. И. Влияние температуры на характер взаимодействия сократительных белков с водой // Молекулярная физика и биофизика водных систем. — 1976. — № 3. — С. 46—53.
8. Цымбал Л. В., Гаврилова И. И., Моисеев В. А. Исследование влияния полиспиртов на динамическую структуру биологических мембран методом спиновых зондов // Криобиология. — 1985. — № 3. — С. 20—24.
9. А. с. 1049808 СССР, МКИ³G 01 N 33/48. Способ определения степени деструкции клеток / Л. В. Иванов, И. И. Гаврилова, В. А. Моисеев и др. — Опубл. 23.10.83. Бюл. № 39.
10. Adams D., Markess M. E., Leivo W. J., Carraway K. L. Electron spin resonance analysis of irreversible changes induced by calcium perturbation of erythrocyte membranes // Biochim. Biophys. Acta. — 1976. — 426, № 1. — P. 38—45.
11. Aldwinckle T., Ahkony Q., Bangham A. et al. Effect of poly (ethylene glycol) on liposome and erythrocytes permeability changes and membrane fusion // Biochim. Biophys. Acta. — 1982. — 689, N 3. — P. 548—560.
12. Barber M. J., Solomonson L. P., Eichler D. C. Spin-labeled erythrocyte membrane: direct identification of nitroxyde-conjugated proteins // Biochem. and biophys. res. commun. — 1985. — 127, N 3. — P. 793—798.
13. Soderman O., Aroldson G., Lindblom G., Foutell K. The interaction between monovalent ions and phosphatidylcholines in aqueous bilayers // Eur. J. Biochem. — 1983. — 139, N 2. — P. 309—314.

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

Поступила 24.06.91

L. V. TSYMBAL, V. A. MOISEYEV

THE EFFECT OF CRYOPROTECTANTS ON ERYTHROCYTE MEMBRANE-BOUND AND CYTOZOL PROTEINS

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

The conformational dynamics of erythrocyte proteins has been studied in the temperature range 40 to -130°C using EPR spin labels and probes. Freezing has been shown to change irreversibly the structure of water-protein surface and hydrophobic interactions of biomacromolecules. The substitution of water molecules by nonelectrolyte molecules modified the water-protein interactions and thermotropic behavior of erythrocyte proteins and cytozol. It has been supposed that the cooperativeness of water-protein and protein-porein interactions increases, including that between membrane and cytozol structures, under the effect of cryoprotectants.

Л. В. ЦИМБАЛ, В. А. МОЙСЕЕВ

ВПЛИВ КРІОПРОТЕКТОРІВ НА МЕМБРАНОЗВ'ЯЗАНІ І ЦИТОЗОЛЬНІ БІЛКИ ЕРИТРОЦИТІВ

Ін-т проблем кріобіології
і кріомедицини АН України,
м. Харків

Методом ЕПР спинових міток і зондів досліджена конформаційна динаміка білків еритроцитів в інтервалі температур $40 \div -130^{\circ}\text{C}$. Показано, що заморожування клітин призводить до необоротних змін структури водно-білкової поверхні і гідрофобних порожнин біомакромолекул. Заміщення молекул води на молекули неелектролітів викликає модифікацію водно-білкових взаємодій і термотропної поведінки білків та цитозоля еритроцитів. Зроблено висновок про збільшення кооперативності водно-білкових і білок-білкових взаємодій, в тому числі між мембраною і цитозольними структурами, під дією кріопротекторів.

УДК 53.082.7:57.043

А. Н. Новиков, Ю. И. Пичугин, Т. П. Линник

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ И РЯДА ОРГАНИЧЕСКИХ ДОБАВОК НА ПРОЦЕСС РЕКРИСТАЛЛИЗАЦИИ ЛЬДА В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Исследованы криопротекторы: этиленгликоль, 1,2-пропандиол, глицерин, формамид, ацетамид, диметилсульфоксид, диэтилсульфоксид, полиэтиленоксиды с молекулярными массами 100-1500 и поливинилпирролидон-12000. Показано, что все вещества пассивируют скорость рекристаллизационного укрупнения кристаллов льда, при этом высокомолекулярные — наиболее значительно. Получены уравнения зависимости скорости укрупнения кристаллов льда в присутствии криопротекторов от их физико-химических свойств, предложен механизм их влияния на этот процесс.

В практике криобиологии необходимость исследования процесса рекристаллизационного укрупнения кристаллов льда во внеклеточной среде обусловлена возможностью деформационного влияния структуры льда на замораживаемые клетки [2, 3]. Поэтому представляет интерес изучение влияния на этот процесс ряда криопротекторов и некоторых органических добавок, которые могут найти применение как перспективные компоненты криозащитных сред.

Исследованы криопротекторы: этиленгликоль, 1,2-пропандиол, глицерин, формамид, ацетамид, диметилсульфоксид (ДМСО), диэтилсульфоксид (ДЭСО), полиэтиленоксиды (ПЭО) молекулярной массы 100, 400, 1500 и поливинилпирролидон молекулярной массы 12000 (ПВП-12000). Концентрация криопротекторов в среде составляла 10 %.

Для изучения влияния криопротекторов и физико-химических свойств их водных растворов на рекристаллизационное укрупнение кристаллов льда были измерены температура плавления 10 %-х водных растворов криопротекторов, вязкость этих растворов при 0 °С и поверхностная активность 0,1 %-х растворов криопротекторов при 25 °С. Методы определения физико-химических показателей приведены в работе [4].

Процесс рекристаллизации кристаллов льда изучался методом криоскопии: плазма крови человека с добавками определенных компонентов охлаждалась в криоприставке микроскопа, начальный размер образующихся кристаллов льда регулировался скоростью охлаждения и иницированием начала кристаллизации. Дисперсность кристаллов льда оценивалась методом секущих по изображению препарата на телеэкране [5]. Характеристикой процесса являлась скорость увеличения кристаллов льда за 9 мин при постоянной температуре экспозиции —6,8 °С. Погрешность оценки характеристики процесса составляла $\pm 6,3\%$ при $r = 0,95$.

Таблица 1

Влияние физико-химических свойств водных растворов криопротекторов на скорость укрупнения кристаллов льда

Криопротектор	Температура плавления 10 %-го раствора, °С	Вязкость 10 %-го раствора, спз	Поверхностная активность 0,1 %-го раствора, 10 ⁻³ Н/м·моль	Скорость* укрупнения кристаллов льда 10 %-го раствора, мк/мин
Этиленгликоль	—3,30	2,46	7,4	1,61
1,2-пропандиол	—2,90	2,83	16,5	2,84
Глицерин	—2,05	2,50	13,9	1,85
Формамид	—4,65	1,85	11,2	3,98
Ацетамид	—3,20	2,24	14,7	2,46
ДМСО	—2,85	3,02	26,4	1,72
ДЭСО	—1,70	2,77	26,5	1,31
ПЭО-100	—1,95	2,58	30,0	2,01
ПЭО-400	—0,60	2,89	115,0	0,45
ПЭО-1500	—0,25	4,00	176,0	0,22
ПВП-12000	—0,10	5,21	159,0	0,34

* — Скорость укрупнения кристаллов льда в плазме крови человека без добавления криопротекторов равна 5,34 мк/мин.

Результаты экспериментальных исследований приведены в табл. 1. Полученные данные свидетельствуют о существенном снижении (до 24 раз) скорости укрупнения кристаллов льда в присутствии криопротекторов, при этом высокомолекулярные ПЭО-400, ПЭО-1500, ПВП-12000 обладают большим пассивирующим действием. Используя метод многофакторного регрессионного анализа [6], получили зависимость скорости укрупнения кристаллов льда от физико-химических свойств криопротекторов:

$$Y = 5,34 - 0,07 X_1 - 6,10 X_2 - 0,23 X_3, \quad (1)$$

где Y — скорость укрупнения кристаллов льда; X_1 — температура плавления 10 %-го раствора криопротектора; X_2 — вязкость 10 %-го раствора криопротектора; X_3 — поверхностная активность криопротектора. Коэффициенты регрессии полученного уравнения значимы при $p = 0,1$, уравнение адекватно при $p = 0,01$, $F = 0,21$. Из уравнения видно, что все исследованные физико-химические свойства криопротекторов влияют одинаково — снижают скорость рекристаллизационного укрупнения кристаллов льда. При этом по степени влияния рассмотренные свойства располагаются в ряд: вязкость ($-6,10$) > поверхностная активность ($-0,23$) > температура плавления ($-0,07$). Полученные данные противоречат общепринятым представлениям о механизме этого процесса [1, 8]. Так, повышение вязкости системы и поверхностной активности вещества, находящегося в кристаллизующемся растворе, пассивирует как скорость растворения, так и, возможно,

рост кристаллов. Причиной данного эффекта является снижение скорости массообмена в растворе и на грани растворяющегося или растущего кристалла. Пассивирующее влияние на изучаемый процесс температуры плавления водного раствора криопротектора можно попытаться объяснить повышением количества связанной воды в растворе. Последнее также отразится на скорости массообмена при росте кристаллов льда и, следовательно, на самой скорости рекристаллизационного укрупнения кристаллов. В общем, процесс рекристаллизации пассивируется тем больше, чем выше вязкость раствора криопротектора и его поверхностная активность. Влияние характера взаимодействия криопротектора с водой, описываемого температурой плавления раствор, на данный процесс проявляется незначительно.

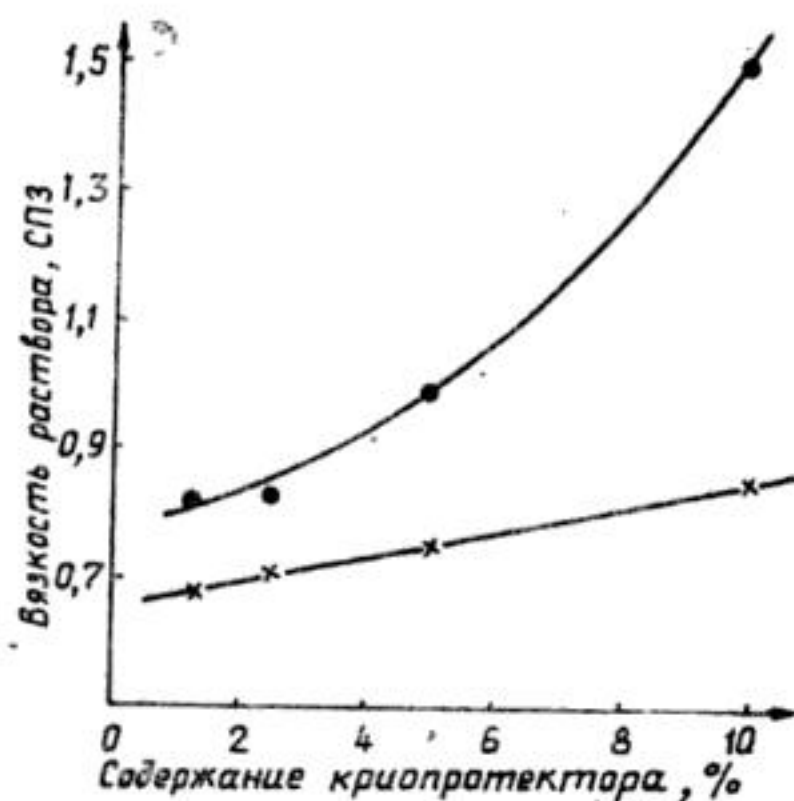
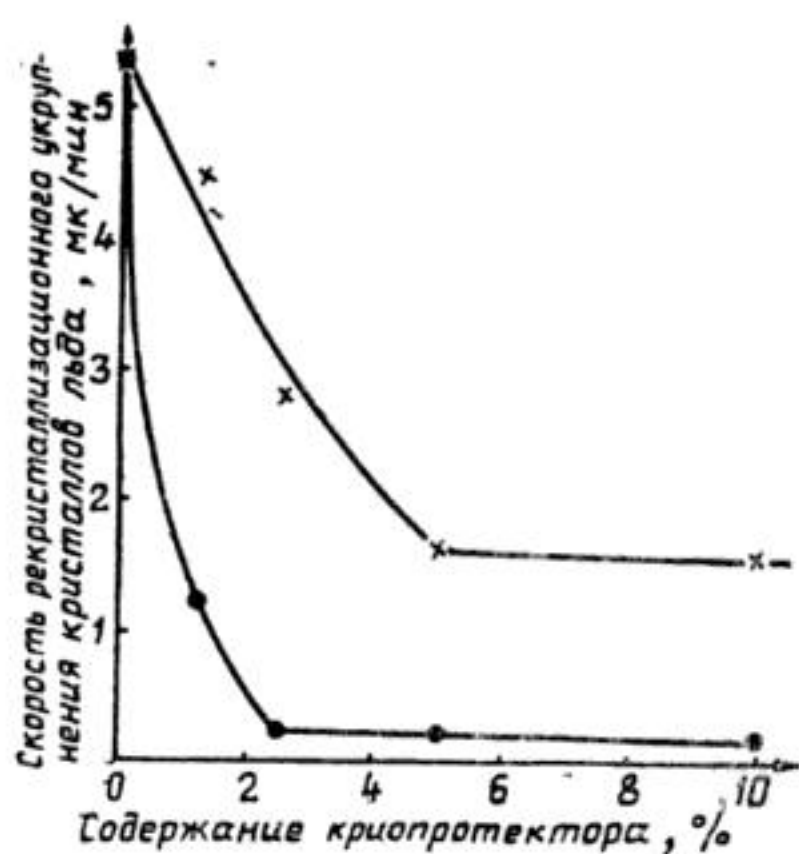


Рис. 1. Зависимость скорости укрупнения кристаллов льда от концентрации этиленгликоля и ПЭО-1500: x — этиленгликоль, ● — ПЭО-1500

Рис. 2. Зависимость вязкости водных растворов этиленгликоля и ПЭО-1500 от их концентрации: x — этиленгликоль, ● — ПЭО-1500

Полученные на рис. 1 и 2 зависимости позволяют предположить, что скорость рекристаллизационного укрупнения кристаллов льда определяется прежде всего повышением вязкости системы. Методом регрессионного анализа получены адекватные уравнения зависимости скорости укрупнения кристаллов льда (V) от вязкости (η) водных растворов, содержащих различное количество этиленгликоля (2) и ПЭО-1500 (3):

$$V = 153 - 383\eta + 242\eta^2, \quad (2)$$

$$V = 6,5 - 10,4\eta + 4,1\eta^2. \quad (3)$$

Анализ полученных зависимостей показывает, что пассивация исследуемого процесса происходит только при повышении вязкости растворов этиленгликоля и ПЭО-1500 до величин 1,58 и 2,53 спз соответственно. Видимо, определяющими в этих условиях становятся концентрированный слой раствора криопротектора и наличие в нем свободных молекул воды, диффузия которых зависит от характера связи вода — криопротектор (энергия гидратации, число гидратации).

Отдельно изучено влияние глюкозы и сахарозы на процесс рекристаллизационного роста кристаллов льда при концентрации их в среде плазмы крови человека 5 % мас. Оба вещества вызвали значительную пассивацию процесса (до 20 раз). Механизм действия этих веществ неясен, так как нельзя объяснить столь существенное замедление процесса вязкостью их растворов. Присутствие в среде желатина и агара (концентрация 2,0 и 0,025 % соответственно) на скорость рекристаллизационного процесса не влияло.

В табл. 2 представлены результаты исследования влияния добавок некоторых органических веществ в плазму крови человека на скорость укрупнения кристаллов льда в присутствии 10 %-го этиленгликоля. Наблюдается незначительное увеличение скорости укрупнения кристаллов льда (в 1,2 раза) при добавке триа-мона, поливинилового спирта, окта-глицеридов алкениллантарных кислот (СВ-133) и снижение ее в присутствии гидролизованного полиакрилонитрила и карбоксиметилцеллюлозы. Механизм пассивирующего влияния указанных органических добавок, вероятно, обусловлен сорбцией их молекул на границе раздела кристалл-расплав [7], приводящей к замедлению скорости массообмена. Однако механизм повышения скорости исследуемого процесса под влиянием триа-мона, поливинилового спирта и СВ-133 остался неясным. Можно только предположить, что данные добавки частично связывают этиленгликоль, нейтрализуя пассивирующее действие последнего на рекристаллизационный процесс.

Таблица 2

Влияние добавок некоторых органических веществ на скорость укрупнения кристаллов льда

Органическое вещество	Скорость укрупнения кристаллов льда, мк/мин
Этиленгликоль без добавок	2,11
Этиленгликоль с добавками:	
Триа-мон	2,56
Гидролизированный поли-акрилонитрил	1,64
СВ-133	2,61
Карбоксиметилцеллюлоза	1,61
Поливиниловый спирт	2,45

Примечание. Концентрация веществ в среде 0,5 % мас.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вода и водные растворы при температурах ниже 0 °С/ Под ред. Ф. Франкса.— Киев : Наук. думка, 1985.— 388 с.
2. Кулешова Л. Г., Худяков Г. А. Повреждение клеток почек сирийского хомячка при замораживании // Криобиология и криомедицина.— 1983.— Вып. 12.— С. 24—28.
3. Лозина-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии.— Л. : Наука, 1972.— 288 с.
4. Пичугин Ю. И. Зависимость цитотоксичности и криопротекторной активности диолов от их структуры и физико-химических свойств : Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1988.— 18 с.
5. Приборы и методы физического металловедения / Под ред. Ф. Вейнберга.— М. : Мир, 1973.— Вып. 1.— С. 276—331.
6. Стьюпер Э., Брюгер У., Джурс П. Машинный анализ связи химической структуры и биологической активности.— М. : Мир, 1982.— 235 с.
7. Уманский Я. С., Скаков Ю. А. Физика металлов.— М. : Атомиздат, 1978.— 352 с.
8. Френкель Я. И. Кинетическая теория жидкостей.— Л. : Наука, 1975.— 592 с.

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

Поступила 31.01.90

A. N. NOVIKOV, Yu. I. PICHUGIN, T. P. LINNIK

THE EFFECT OF CRYOPROTECTANTS AND SOME ORGANIC ADDITIVES ON THE RECRYSTALLIZATION IN MODEL SYSTEMS

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

The cryoprotectants ethylene glycol, 1,2-propane diol, glycerol, formamide, acetamide, dimethyl sulfoxide, diethyl sulfoxide, polyethylene oxides of molecular weight 100 — 1500 and polyvinyl pyrrolidone were studied. It has been shown that all the compounds delay the rate of largening of ice crystals during recrystallization, the effect of cryoprotectants of higher molecular weight is more pronounced. The equations of the dependence of the rate of largening of ice crystals in the presence of cryoprotectants on their physico-chemical properties have been obtained.

О. М. НОВІКОВ, Ю. І. ПІЧУГІН, Т. П. ЛИННИК

ВПЛИВ КРІОПРОТЕКТОРІВ І РЯДУ ОРГАНІЧНИХ ДОБАВОК НА ПРОЦЕС РЕКРИСТАЛІЗАЦІЇ ЛЬОДУ В МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМАХ

Ін-т проблем кріобіології
і кріомедицини АН України,
м. Харків

Досліджені кріопротектори: етиленгліколь, 1,2-пропандіол, гліцерин, формамід, ацетамід, діметилсульфоксид, поліетиленоксиди з молекулярними масами 100-1500 і полівінілпірролідон І200. Показано, що всі речовини пасивують швидкість рекристалізаційного укрупнення кристалів льоду, при цьому високомолекулярні найбільше. Одержані урівняння залежності швидкості укрупнення кристалів льоду у присутності кріопротекторів від їх фізично-хімічних властивостей, запропоновано механізм їх впливу на цей процес.

УДК 57.043:612.111:536.54

А. И. Осецкий, Т. М. Гурина

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАЗОВЫХ СОСТОЯНИЙ ЗАМОРОЖЕННЫХ РАСТВОРОВ И БИОСИСТЕМ МЕТОДОМ ТЕРМОПЛАСТИЧЕСКОЙ ДЕФОРМАЦИИ

Рассмотрен новый метод фазового анализа замороженных растворов криопротекторов, клеточных суспензий и тканей, основанный на их пластической деформации в режиме непрерывно повышающейся температуры в интервале $-196 \div 20^\circ\text{C}$ при постоянной внешней нагрузке. Полученные термопластические кривые позволяют не только анализировать кинетику таких процессов, как кристаллизация, рекристаллизация, расстеклование, плавление, гелеобразование, но и определять изменения упруго-пластических свойств биообъектов, связанные с этими процессами. Эффективность метода в криобиологическом эксперименте показана на примерах изучения фазовых и структурных превращений в замороженных растворах криопротекторов.

Данные о фазовых состояниях охлаждаемых биологических систем входят в число параметров, определяющих основные технологические этапы их криоконсервирования. К наиболее важным из них относятся температура начала кристаллизации в биообъектах ($T_{\text{кр}}$), температурный интервал ($\Delta T_{\text{кр}}$), в котором развиваются кристаллизационные процессы или процессы плавления при отогреве, температура стеклования (расстеклования) системы (T_g), ее фазовый состав в интервале температур ($T_{\text{кр}}$, T_g), упругопластические свойства системы в этом интервале, а также интервалы температур, соответствующие рекристаллизационным процессам ($T_{\text{рекр}}$).

Перечисленные параметры позволяют оценить вклад различных механизмов повреждения в изменение структурно-функциональных характеристик биообъектов и оптимизировать технологию их криоконсервирования. Вместе с тем получение ряда из них связано с серьезными экспериментальными трудностями. Особенно это относится к параметрам, описывающим кинетику таких процессов, как расстеклование и рекристаллизация, а также упругопластическую деформацию замороженных растворов криопротекторов, клеточных суспензий и тканей. В связи с этим предлагается новый метод фазового анализа замороженных растворов и биосистем, основанный на их термопластической деформации. Суть его состоит в том, что растворы криопротекторов, клеточные суспензии или ткани помещаются в специальное деформационное устройство, описание и принцип работы которого приводятся ниже, охлаждаются в нем до температуры жидкого азота, с последующей стабилизацией температуры в течение определенного промежутка времени, после чего к ним прикладываются внешние напряжения и начинается отогрев исследуемого образца с заданной скоростью.

Конструкция устройства для изучения механических свойств замороженных растворов и биологических систем показана на рис. 1. Основным элементом устройства является плунжерный деформационный нож. Он состоит из неподвижно закрепленного на опорной колонне 1 плунжерного штока 2 и скользящих по нему внутренней 3, подвижной средней 4 и внешней 5 плунжерных втулок. При сборке устройства внутренняя втулка 3 с помощью гайки 6 и распорного фторопластового кольца 7 крепится неподвижно относительно плунжерного штока 2. В свою очередь подвижная средняя втулка 4 с помощью прижимного фонаря 8 и фиксатора мембраны 9 крепится неподвижно относительно внешней втулки 5. Прижимной фонарь 8 с помощью силовой тяги 10 связан с механизмом нагружения 11, который обеспечивает вертикальное перемещение втулок 4 и 5 относительно штока 2 и втулки 3 и служит для приложения внешней нагрузки F к исследуемому образцу. Для предотвращения соскальзывания втулок 4 и 5 вниз в момент сборки устройства в нем предусмотрен упор 12, фиксируемый винтами 13.

Для изучения охлаждаемых растворов и клеточных суспензий, изначально находящихся в жидкофазном состоянии, в устройстве предусмотрены две тонкие резиновые ограничительные мембраны 14 и 15. Мембрана 14 натягивается на втулку 4 и крепится на ней при помощи фиксатора мембраны 9. Резиновая мембрана 15 натягивается на тонкий металлический каркас 16 и крепится на нем при помощи фиксатора мембраны 17. На плунжерном штоке 2 мембрана 15 фиксируется распорным кольцом 7. Исследуемый жидкофазный образец 18 заливается в образованную мембраной 15, распорным кольцом 7 и каркасом 16 форму до верхнего края распорного кольца 7. Для удаления излишка раствора, образующегося при его кристаллизации, в каркасе 16 предусмотрены технологические отверстия 19.

При исследовании плотных биологических тканей или полимерных материалов резиновые мембраны 14 и 15, каркас 16, распорное кольцо 7, фиксаторы мембраны 9 и 17 удаляются. В этом случае втулки 3 и 4 прижимаются непосредственно к исследуемому материалу 18, который помещается между втулкой 3 и плунжерным штоком 2 с одной стороны плоскости сдвига $X-X$ и втулками 4 и 5 с другой стороны этой плоскости.

Температура образца измеряется термометром сопротивления 20 и изменяется с помощью нагревателя 21 и криогенной жидкости 22, омывающей корпус камеры, в которой расположено устройство. Для контроля температурного режима чувствительный элемент термометра сопротивления 20 устанавливается в непосредственной близости от исследуемого образца 18,

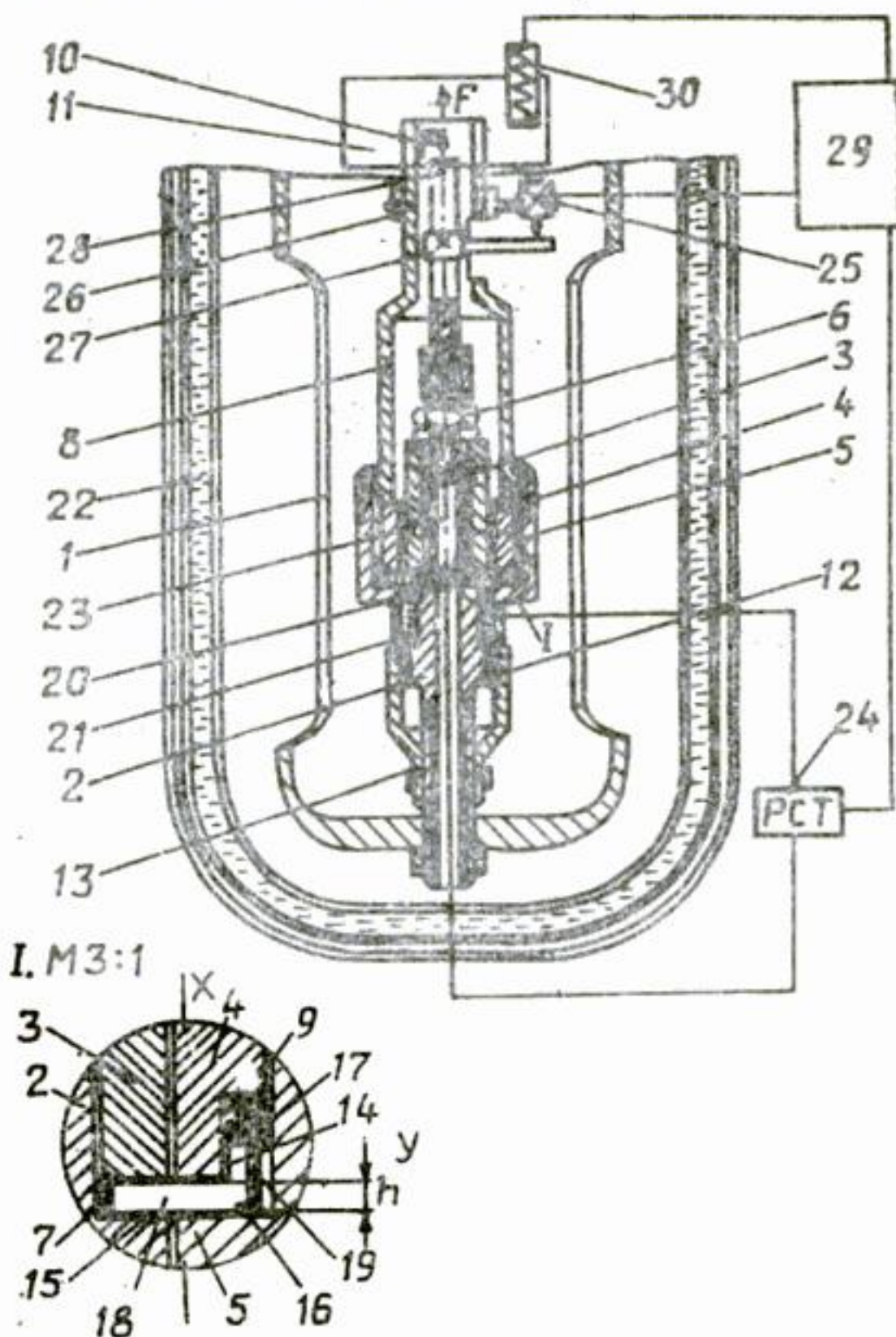


Рис. 1. Устройство для изучения механических свойств замороженных растворов и биологических систем.

для чего в плунжерном штоке 2 выполнено вдоль его оси отверстие 23. Программа охлаждения или нагрева образца при этом задается и контролируется с помощью автоматического регулятора-стабилизатора температуры (РСТ) 24.

Измерение деформации ε замороженного образца осуществляется с помощью дифференциально включенного датчика линейных перемещений 25. Корпус этого датчика с помощью кронштейна 26 связан с силовой тягой 10, а его сердечник с помощью кронштейна 27 с эталонной тягой 28. Приложение нагрузки F к этой тяге производится с помощью дополнительной и независимой ступени общего механизма нагружения 11. Сигнал от датчика перемещений 25 подается на двухкоординатный графопостроитель 29. При регистрации деформационных кривых $\varepsilon = \varepsilon(\sigma)$, где σ — приложенное к образцу внешнее сдвиговое напряжение, на вторую координату этого графопостроителя подается сигнал от тензодатчиков, укрепленных на динамометре 30, связанном с механизмом нагружения 11. При регистрации термопластических кривых $\varepsilon = \varepsilon(T)$, где T — температура исследуемого образца, на вторую координату графопостроителя 29 подается сигнал от датчика температуры 20.

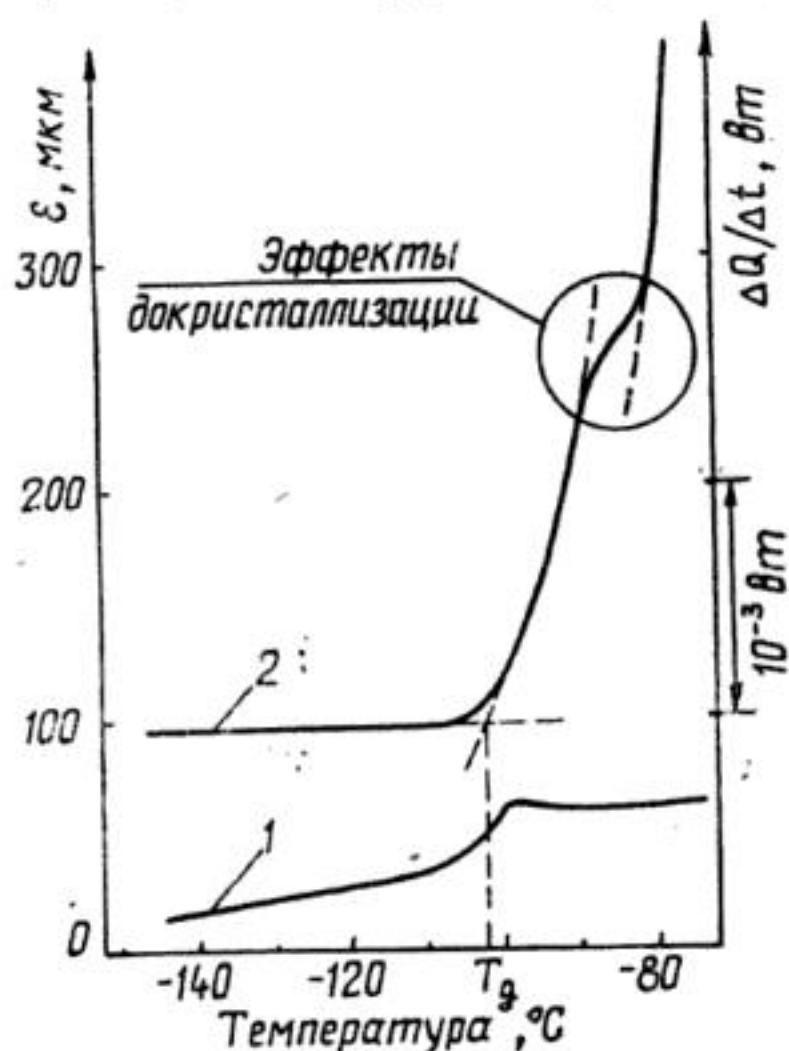


Рис. 2. Термограмма (1) и термопластическая кривая (2) замороженных образцов водного раствора глицерина доэвтектической концентрации

Типичная термопластическая кривая $\varepsilon = \varepsilon(T)$, полученная в режиме отогрева замороженного раствора глицерина доэвтектической концентрации представлена на рис. 2, позиция 2. Для сравнения на этом же рисунке представлена термограмма процесса расстеклования того же раствора глицерина (позиция 1), полученная с помощью сканирующего калориметра. Из анализа приведенных графиков видны преимущества термопластических кривых перед термограммами. Термопластические кривые позволяют определить не только температуру расстеклования раствора T_g , но и проследить кинетику процессов, развивающихся в образце выше этой температуры и приводящих к изменению его структуры. В основном это связано с тем обстоятельством, что теплоемкость образцов при их переходе через температуру T_g

в лучшем случае меняется на десятки процентов, в то время как их модули упругости и сдвига претерпевают изменения на несколько порядков.

Проанализируем вид термопластических кривых на примере замороженных 5 %-го и 90 %-го водных растворов глицерина (рис. 3). Из представленных графиков видно, что экспериментальные кривые имеют несколько стадий, каждая из которых отражает определенный процесс, происходящий в образце при отогреве в данном интервале температур. Так, согласно кривой 1, в интервале температур $-196 \div -155^\circ\text{C}$ в закристаллизованном 5 %-ом водном растворе глицерина все диффузионные процессы практически подавлены. Приложенного напряжения $\sigma = 400 \text{ г/мм}^2$ также недостаточно, чтобы при этих температурах вызвать термоактивируемое дислокационное пластическое течение образца с заметной скоростью. Поэтому деформация образца в этом интервале температур не изменяется по мере повышения температуры. При дальнейшем нагреве наблюдается специфическое разупрочнение замороженного раствора в интервале температур $-150 \div -120^\circ\text{C}$, связанное с его рекристаллизацией. Этот факт подтверждается

и другими экспериментальными данными [1], однако кинетика процесса рекристаллизации и его зависимость от типа и концентрации раствора значительно лучше просматривается с помощью термопластических кривых. Наконец, с температуры порядка -100°C в образце начинается процесс расстеклования аморфных прослоек, что резко снижает его сопротивляемость внешним напряжениям и приводит к непрерывно возрастающей скорости крипповой деформации. С помощью термопластических кривых очень удобно исследовать кинетику расстеклования и изменение физико-механических характеристик образца в ходе этого процесса. Существенное различие этих кривых при изменении фазового состава образцов и скорости

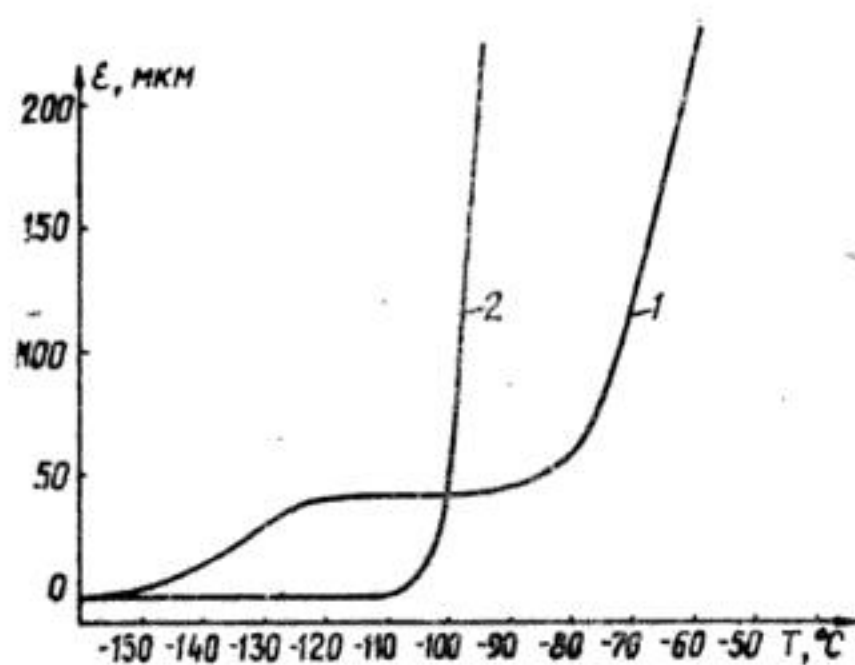


Рис. 3. Термопластические кривые замороженных водных растворов глицерина различной концентрации ($C_{\text{гл}} = 5,02\%$ и $C_{\text{гл}} = 90,4\%$) при одинаковых внешних нагрузках ($\sigma = 400 \text{ г/мм}^2$). 1 — $C_{\text{гл}} = 5,02\%$, $\sigma = 400 \text{ г/мм}^2$; 2 — $C_{\text{гл}} = 90,4\%$, $\sigma = 400 \text{ г/мм}^2$

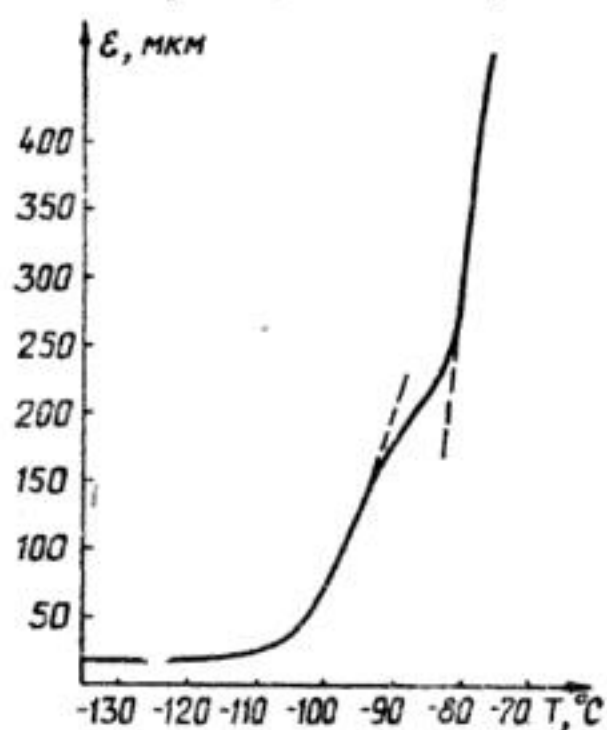


Рис. 4. Термопластическая кривая замороженного 58 %-го водного раствора глицерина. Скорость охлаждения образца $V_{\text{охл}} \approx 200$ град/мин., скорость отогрева $V_{\text{нагр}} \approx 1$ град/мин. $\sigma = 19,9 \text{ г/мм}^2$; $C_{\text{гл}} = 58,2\%$

происходящих в них процессов наглядно демонстрирует сопоставление кривой 1 и кривой 2 (рис. 3), на которой, в частности, полностью отсутствует рекристаллизационный участок.

С помощью термопластических кривых можно исследовать кинетику различных процессов, протекающих в растворах сразу после их расстеклования, т. е. обладающих чрезвычайно высокой вязкостью. Так, на рис. 4 показана термопластическая кривая 58 %-го водного раствора глицерина, замороженного погружением в жидкий азот ($V_{\text{охл}} \approx 200$ град/мин), которая получена в режиме отогрева со скоростью $V_{\text{нагр}} \approx 1$ град/мин. Согласно этой кривой, после расстеклования образца в интервале температур $-95 \div -85^{\circ}\text{C}$ наблюдается уменьшение скорости пластического течения образца с повышением температуры. Это обусловлено процессом низкотемпературной ассоциации молекул глицерина, резко повышающим вязкость жидкофазных фракций в образце. При доэвтектических концентрациях наблюдаемый эффект ассоциации сопровождается явлением докристаллизации тех молекул воды, которые освобождаются в результате уменьшения гидратационного числа входящих в ассоциаты молекул криопротекторов. В связи с тем, что оба эти процесса дают свой специфический вклад в изменение вязкости жидких фракций, метод термопластической деформации, основанный на контроле этой вязкости, является наиболее эффективным для изучения кинетики рассматриваемых процессов.

Термопластические кривые были получены для целого ряда растворов криопротекторов, клеточных суспензий и тканей. Для примера на рис. 5 показаны термопластические кривые замороженных образцов суспензии нативных эритроцитов человека (кривая 1) и головного мозга крысы (кривая 2). Изменение структуры и фазового состава этих образцов приводит

к изменению скорости их термопластического течения, в результате чего на кривых $\varepsilon = \varepsilon(T)$ хорошо регистрируются температурные интервалы, соответствующие определенным состояниям образцов. Так, согласно рис. 5, ткань головного мозга крысы переходит полностью в твердофазное состояние с высокими значениями модулей упругости только ниже температуры $T'_g \approx -75^\circ\text{C}$. Данные результаты необходимы при разработке или оптимизации методов криодеструкции тканей.

Таким образом, рассмотренный экспериментальный метод крайне упрощает фазовый анализ исследуемых объектов. Анализ показывает, что в настоящее время его техническая реализация не представляет сложности.

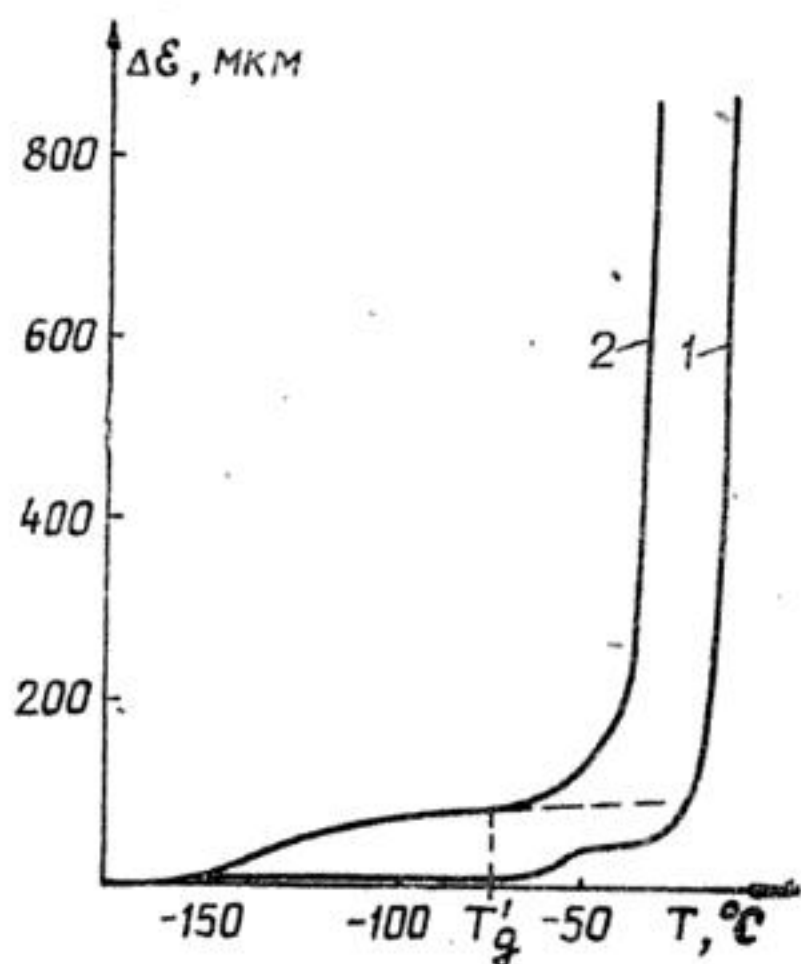


Рис. 5. Термопластические кривые замороженных образцов суспензии нативных эритроцитов человека (1) и ткани головного мозга крысы (2)

Имеется широкий набор прецизионных систем измерения малых перемещений. Создана эффективная техника сканирования температуры исследуемых образцов в области криогенных температур и отработаны принципы компенсации тепловых инструментальных погрешностей [2, 3]. В настоящей работе предложена конструкция деформационного устройства, позволяющего не только кристаллизовать образец непосредственно в измерительной ячейке, но и деформировать его в этой же ячейке в режиме сдвига.

Таким образом, существуют все технические возможности для создания удобных и относительно простых приборов, позволяющих с высокой разрешающей способностью регистрировать традиционные для криобиологии процессы, а кроме того, получать принципиально новую информацию о замороженных биологических системах.

Естественно, что для объективной трактовки результатов при изучении достаточно сложных явлений, сопровождающих охлаждение или нагрев биологических систем, необходима детальная разработка теории термопластической деформации замороженных биообъектов. Однако при исследовании таких процессов, как кристаллизация, рекристаллизация, расстеклование, плавление, гелеобразование метод позволяет разработать простые тесты для определения основных кинетических параметров. Но что особенно важно, метод термопластической деформации позволяет не только регистрировать кинетику различных структурных превращений, но и сразу же определять изменение упругопластических свойств образца, вызванное этими превращениями. При этом разрешающая способность метода практически не зависит от вязкости системы в представляющих интерес для криобиологии интервалах температур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Иткин Ю. А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. — Киев : Наук. думка, 1977. — 243 с.
2. А. с. 712731 СССР МКИ³ G 01 N 3/18. Устройство для исследования механических свойств материалов / Е. М. Медведев, А. И. Осецкий, В. И. Аненко — Оpubл. 30.01.80. Бюл. № 4.
3. А. с. 1017958 СССР МКИ³ G 01 N 3/18. Способ измерения деформации материалов / А. И. Осецкий, Ю. И. Шумаков, В. И. Аненко — Оpubл. 15.05.83. Бюл. № 18.

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

Поступила 04.04.91

A. I. OSETSKY, T. M. GURINA

THE INVESTIGATION OF PHASE STATES OF FROZEN SOLUTIONS AND BIOLOGICAL SYSTEMS BY THE METHOD OF THERMOPLASTIC DEFORMATION

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

A new method is presented for phase analysis of frozen solutions of cryoprotectants, cellular suspensions and tissues based on their plastic deformation at continuously rising temperature in a range of -196 to 20°C under constant external load. The obtained thermoplastic curves allow not only to analyze the kinetics of such processes as crystallization, recrystallization, devitrification, melting, gel-formation but also to determine changes in elastic and plastic properties of biological systems related to these processes. The efficiency of the method has been demonstrated in cryobiological experiments on phase and structural transformations in frozen solutions of cryoprotectants.

О. І. ОСЕЦЬКИЙ, Т. М. ГУРИНА

ДОСЛІДЖЕННЯ ФАЗОВИХ СТАНІВ ЗАМОРОЖЕНИХ РОЗЧИНІВ І БІОСИСТЕМ МЕТОДОМ ТЕРМОПЛАСТИЧНОЇ ДЕФОРМАЦІЇ

Ін-т проблем кріобіології
і кріомедицини АН України,
м. Харків

Розглянуто новий метод фазового аналізу заморожених розчинів кріопротекторів, клітинних суспензій і тканин, який заснований на їх пластичній деформації в режимі температури, що безперервно підвищується, в інтервалі $-196 \div 20^{\circ}\text{C}$ при постійному зовнішньому навантаженні. Одержані термопластичні криві дозволяють не лише аналізувати кінетику таких процесів, як кристалізація, рекристалізація, плавлення, гелюутворення, але і визначати зміни пружнопластичних якостей біооб'єктів, зв'язані із цими процесами. Ефективність методу в кріобіологічному експерименті показана на прикладах вивчення фазових і структурних перетворень в заморожених розчинах кріопротектора.

УДК 577.122.5

Г. Ф. Жегунов, Е. А. Гогитидзе

ОСОБЕННОСТИ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ У СУСЛИКОВ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ БАУТА

Показано, что процесс деградации белков у зимоспящих животных находится под контролем организма и в зимний период значительно подавлен (в 3—5 раз) по сравнению с тем же процессом у летних сусликов и крыс. Однако это свойство не обнаруживается у изолированных тканей, когда интенсивность процесса деградации протеинов одинакова независимо от физиологического состояния сусликов, сезона года и соответствует скорости аналогичного процесса у гомойотермных животных.

Известно, что уровень и направленность метаболизма в тканях животных регулируется качественным и количественным составом клеточных ферментов [1, 7]. Показано, что регуляция белкового состава клеток различных органов обуславливает их приспособление к различным экстремальным условиям [7, 10]. Этот же процесс характерен и для процессов приспособления клеток зимоспящих животных. В частности, показано, что во время гибернации сусликов происходит снижение скорости синтеза белков почти на 3 порядка по сравнению с активными животными, а при пробуждении наблюдается гиперактивация этого процесса, скорость которого возрастает в 1,5—2,0 раза по сравнению с животными в активном состоянии [11]. При этом в клетках сердца и печени сусликов в разных состояниях наблюдается синтез специфических белков [3], которые, видимо, участвуют в обеспечении процессов приспособления органов к различным условиям функцио-

нирования. Однако обмен белков характеризуется не только этапом синтеза, но и процессом деградации протеинов [1], что не было исследовано у гибернирующих животных. В связи с этим, целью представленной работы явилось изучение (*in vivo* и *in vitro*) скорости деградации белков в органах сусликов, находящихся в различных физиологических состояниях.

Опыты проводились на длиннохвостых сусликах (*Citellus undulatus*) зимой. С целью мечения белков, сусликам во время бодрствования внутрибрюшинно вводили ^{14}C -гидролизат белков хлореллы из расчета 1 мБК на 100 г массы животного. Спустя 5, 20, 48 ч, а также 9 и 30 суток животных декапитировали и измеряли уровень радиоактивности белков, что позволяло судить об интенсивности деградации белков *in vivo*. Для исследования *in vitro* спустя 5 или 20 ч (когда наблюдался пик включения меченых аминокислот в белки) из изолированных органов (печень, сердце, почки кора) сусликов в различных состояниях готовили срезы тканей массой 20 мг и помещали в стеклянные флаконы, содержащие 5 мл питательной среды 199 с добавлением антибиотика канамицина в количестве 100 ЕД в 1 мл и циклогексимида 0,35 мМ. Часть флаконов помещали в холодильник и хранили при температуре 5 °С, другую часть оставляли для хранения при комнатной температуре 25 °С. Среда хранения во флаконах меняли каждые 12 ч. Исходную радиоактивность протеинов определяли сразу после декапитации сусликов. Радиоактивность кусочков тканей исследовали на протяжении нескольких дней хранения.

Для определения радиоактивности кусочки тканей измельчали в стеклянном ручном гомогенизаторе в 1 мл физиологического раствора, добавляли равный объем 10 %-й трихлоруксусной кислоты и через 20 мин фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры [6]. Далее промывали 5 % раствором трихлоруксусной кислоты, этанолом и хлороформом, после чего фильтры высушивали и помещали во флаконы с сцинтилляционной жидкостью и просчитывали на счетчике «Бекман».

Установлено, что скорость включения меченых аминокислот в белки у зимних активных сусликов в 1,5—2,0 раза выше, чем у летних сусликов и крыс (рис. 1), что говорит о повышенном уровне обмена белков во время бодрствования между баутами.

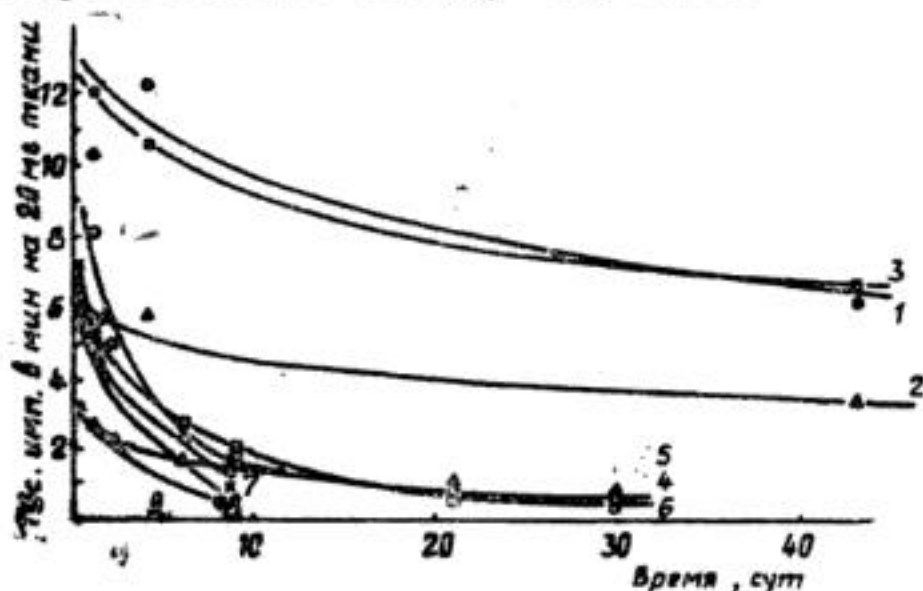


Рис. 1. Уровень радиоактивности белков печени (1, 5, 7), сердца (2, 4, 9) и коры почки (3, 6, 8) у зимних сусликов (1, 2, 3), летних сусликов (7, 8, 9) и крыс (4, 5, 6) во времени при исследовании *in vivo*

Показано, что уровень деградации белков *in vivo* у зимних сусликов в 3—5 раз ниже, чем у крыс и летних сусликов (рис. 1). Следует отметить, что зимние суслики при этом в течение 30 сут. содержались в условиях холода, и сохраняли исходную периодичность и длительность баутов. Такая экономия белков может объяснять способность сусликов не питаться на протяжении полугода. Однако летние суслики уже характеризуются высокой скоростью деградации белков, сравнимой с таковым процессом у крыс (рис. 1).

В следующей серии экспериментов изучали скорость деградации белков *in vitro* (рис. 2, 3, 4, 5, 6). Отмечено, что в печени и почках белки разрушаются намного быстрее, чем в сердце. Оказалось, что вне организма скорость деградации не зависела от того, от каких животных была взята ткань. Во всех случаях гибернации, пробуждения, бодрствования, впадения в спячку, а также у летних сусликов скорость деградации была одинакова, сравни-

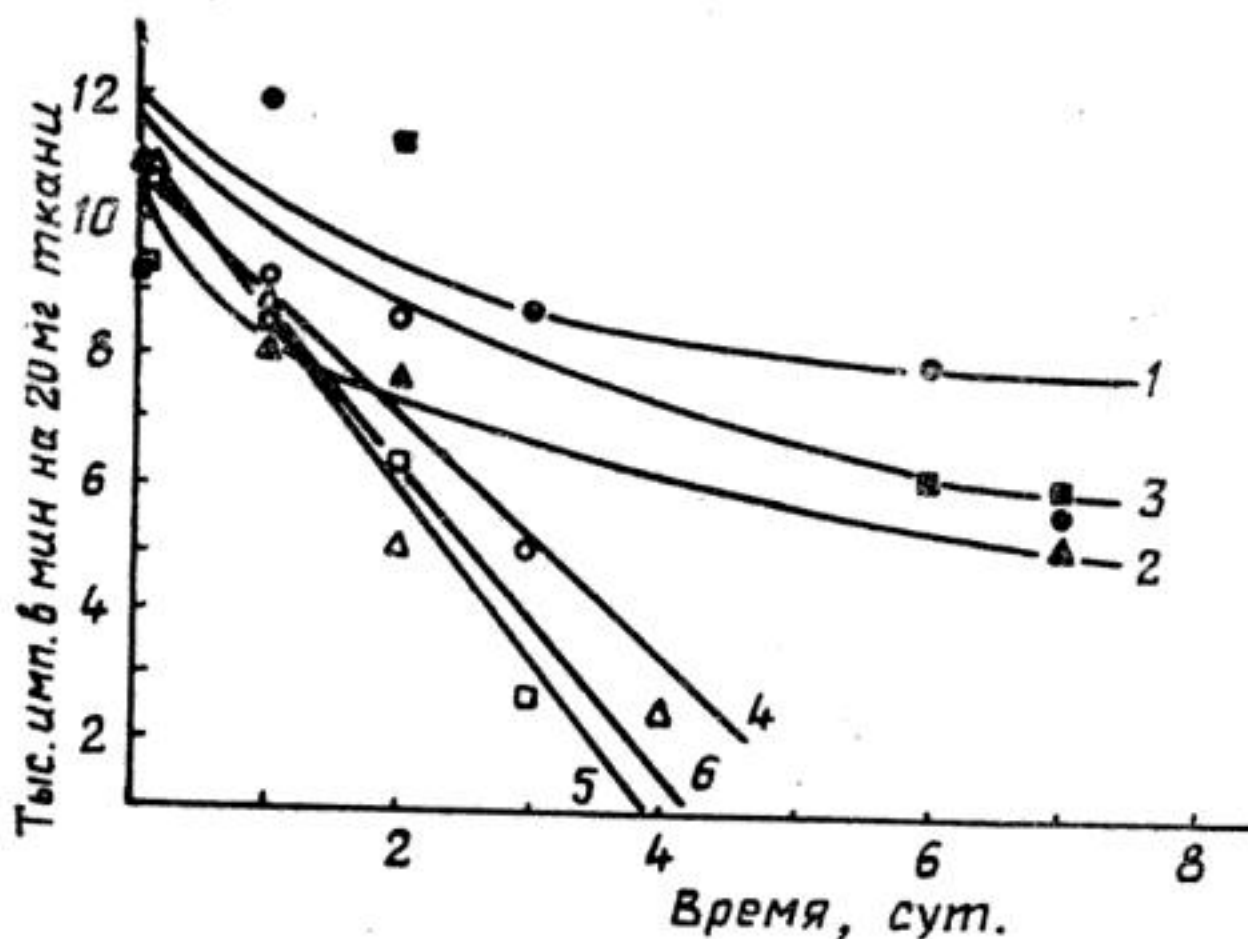


Рис. 2. Динамика снижения уровня радиоактивности белков печени зимних сусликов при исследовании *in vitro* при различных температурах: 1, 2, 3 — изучение деградации белков при 5 °С; 4, 5, 6 — изучение деградации белков при 25 °С; 1, 4 — ткань гибернирующих сусликов; 2, 5 — ткань пробуждающихся сусликов; 3, 6 — ткань активных зимних сусликов

Рис. 3. Динамика снижения уровня радиоактивности белков коры почки зимних сусликов при исследовании *in vitro*. Обозначения как под рис. 2

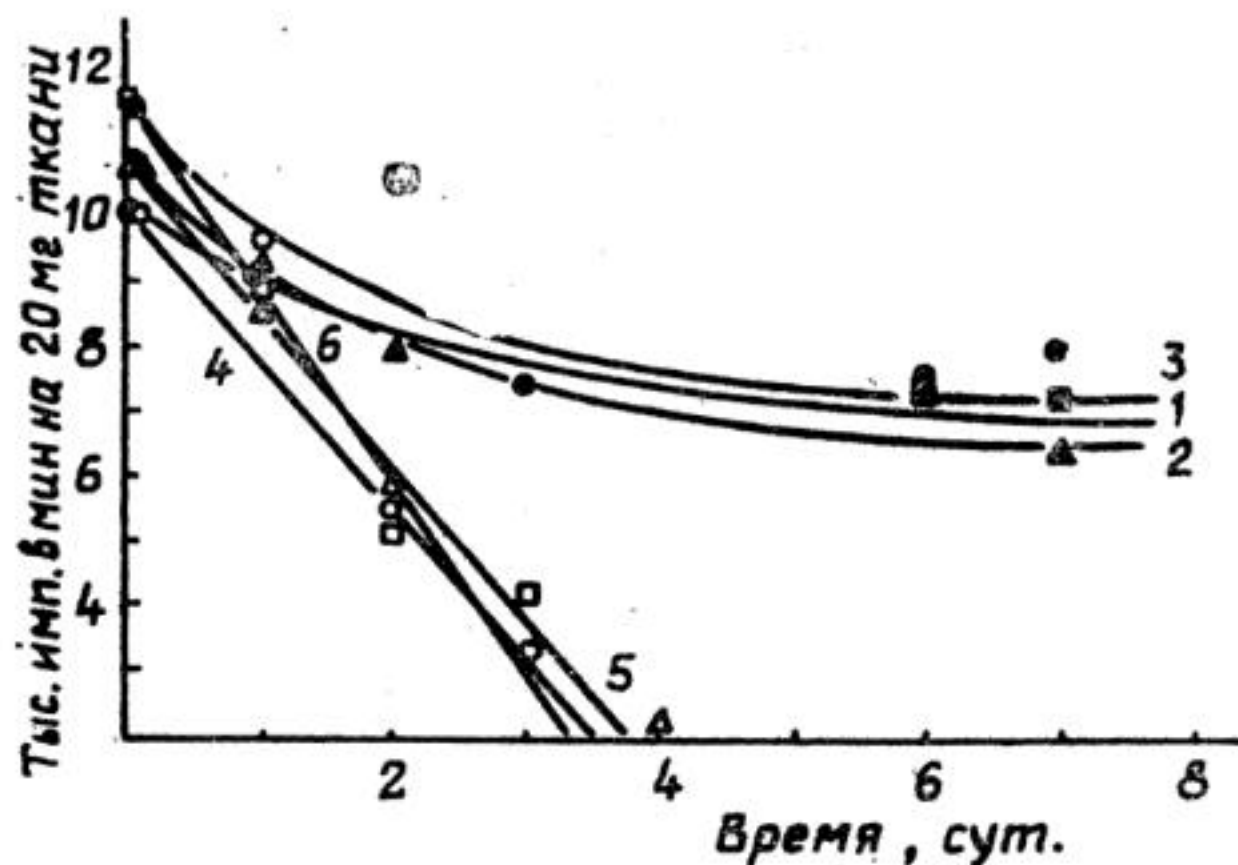


Рис. 4. Динамика снижения уровня радиоактивности белков сердца зимних сусликов *in vitro*. Обозначения как под рис. 2



ма с аналогичным процессом у гомойотермных животных. Вместе с тем следует отметить, что при 25 °С скорость деградации в 3 раза выше, чем при 5 °С.

Представленные выше данные свидетельствуют о том, что ткань, изъятая из организма, теряет свою индивидуальность в отношении скорости деградации белков и, видимо, теряет свою индивидуальность в отношении интенсив-

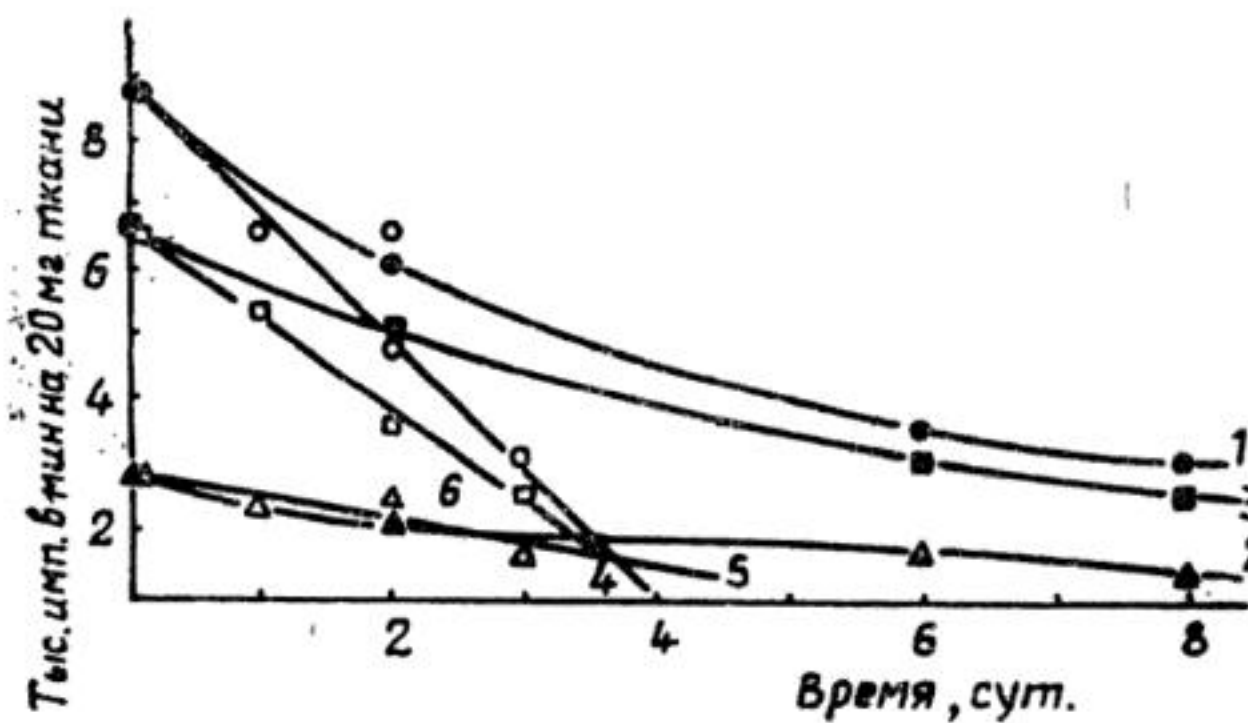
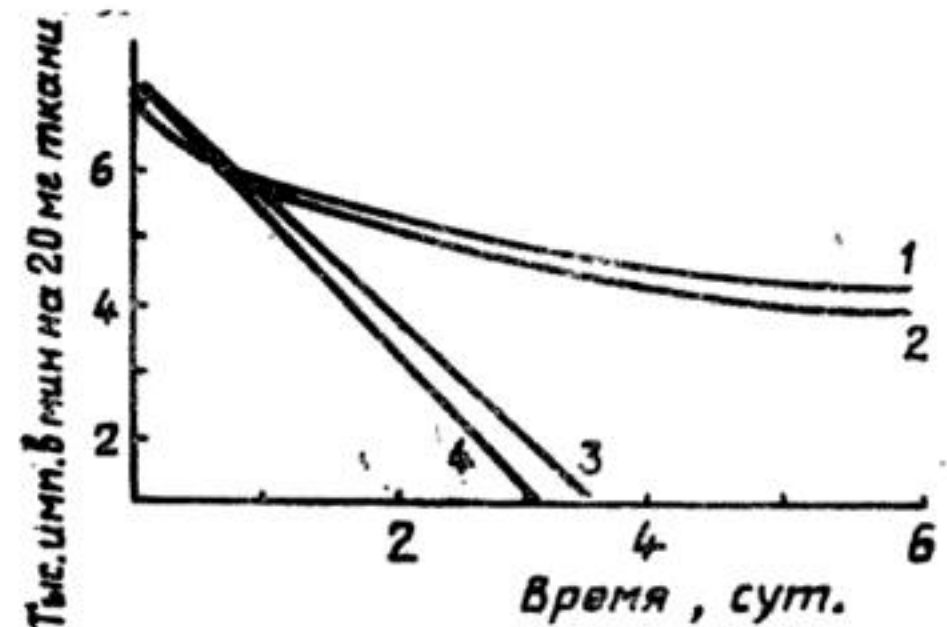


Рис. 5. Динамика снижения уровня радиоактивности белков печени (1, 4), сердца (2, 5), коры почки (3, 6) у крыс при исследовании *in vitro*: 1, 2, 3 — исследование при 5 °С; 4, 5, 6 — исследование при 25 °С

Рис. 6. Динамика снижения уровня радиоактивности белков печени (1, 3) и коры почки (2, 4) летних активных сусликов при исследовании *in vitro*: 1, 2 — при 5 °С; 3, 4 — при 25 °С



ности и направленности метаболизма. Об этом же свидетельствуют полученные нами ранее результаты по исследованию интенсивности синтеза белка *in vitro* [4], где показано, что кусочки тканей спящих, пробуждающихся и активных сусликов включали меченые аминокислоты с одинаковой скоростью. Эти данные свидетельствуют, что процессы обмена белков находятся под постоянным контролем организма.

Таким образом, установлено, что у зимних сусликов процесс деградации белков *in vivo* протекает в 3—5 раз медленнее, чем у летних сусликов или крыс, несмотря на краткосрочные периоды пробуждения и бодрствования, когда активность белок-синтезирующего аппарата существенно возрастает [11]. Механизм этого явления может быть прояснен с учетом наших предыдущих работ. Ранее нами установлено, что в плазме крови сусликов, независимо от функционального состояния животных, концентрация белка поддерживается на постоянном уровне [5]. Это свидетельствует о том, что в организме гетеротермных животных действуют физиологические механизмы, обеспечивающие белковый гомеостаз. Вероятно, зимние суслики обладают способностью очень экономно расходовать азотсодержащие вещества во время зимней спячки. Существенную роль в деградации белков и реутилизации аминокислот, видимо, играет лизосомальная система клеток. Ранее нами показано, что ультраструктура этой системы отличается у зимоспящих животных определенной динамикой во время баута, свидетельствующей о ее непосредственном участии в поддержании белкового гомеостаза [5]. Эта система участвует в процессах распада и ресинтеза белков [2], и таким образом может обеспечивать превращение определенной части внутриклеточных структур, что обеспечивает экономное многократное использование функционально важных макромолекул. Это объясняет уникальную способность зимних сусликов поддерживать белковый гомеостаз клеток и целого организма на протяжении длительного периода на фоне белкового голода, так как в этот период суслики не принимают никакой пищи в течение 6—8 мес.

Однако изолированные кусочки тканей теряют свойства, присущие этим тканям в составе организма. Как нами показано, при этом скорость деградации не отличается в ряду сусликов в разных физиологических со-

стояниях и крыс, и не зависит от сезона года. Следовательно, в организме зимоспящих животных существует постоянный контроль за интенсивностью белкового метаболизма, и разрыв связей с организмом и органом тут же приводит к потере этого контроля и свойств белкового гомеостаза.

Известно, что эритроциты [9], изолированное сердце [8], некоторые другие органы способны намного дольше сохранять свои функциональные свойства в изолированном виде. Проводя эксперименты *in vitro*, мы предполагали, что возможной причиной повышенной устойчивости к долгосрочному хранению изолированных тканей и органов зимоспящих животных по сравнению с тканями незимоспящих могут быть разные скорости деградации белков в этих же условиях. Однако оказалось, что скорость разрушения протеинов была одинаковой во всех исследованных случаях. Следовательно, этот факт можно интерпретировать таким образом, что скорость деградации белков *in vitro* все же не является лимитирующим фактором долгосрочного хранения изолированных тканей и органов зимоспящих.

Таким образом, в работе показано, что деградация белков у зимоспящих животных находится под контролем организма и в зимний период значительно подавлена по сравнению с тем же процессом у летних сусликов и крыс. Однако это свойство не обнаруживается у изолированных тканей из ряда органов, когда интенсивность процесса деградации белков одинакова, независимо от физиологического состояния сусликов, сезона года и соответствует этому процессу у гомойотермных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. — М.: Мир, 1986. — 3. — 230 с.
2. Глебов Р. Н. Эндцитоз и экзоцитоз. — М.: Высшая школа, 1987. — 92 с.
3. Жегунов Г., Белоус А., Котляров А. Индукция синтеза специфических белков у зимоспящих животных при гибернации и пробуждении. // Докл. АН УССР. — 1988. — № 11, серия «Б». — С. 55—61.
4. Жегунов Г. Ф., Микулинский Ю. Е. Периодическое обновление белков мембран кардиомиоцитов сусликов в цикле гибернация-пробуждение // Криобиология. — № 2. — 1988. — С. 19—24.
5. Жегунов Г. Ф., Загоруйко Г. Е. Возможная роль лизосом в поддержании белкового гомеостаза кардиомиоцитов сусликов в период зимней спячки // Влияние охлаждения на биологические объекты. — Харьков. — 1990. — С. 55—59.
6. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. — М.: Наука, 1983. — 304 с.
7. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 398 с.
8. Burlington R. F., Meininger G. A., Thurston J. T. Effect of low temperature on high energy phosphate compounds in isolated hearts from a hibernator and a non-hibernator // Comp. Biochem. Physiol. — 55B, N 2. — P. 403—407.
9. Kimzey S. L., Wills J. S. Resistance of erythrocytes of hibernating mammals to loss of potassium during hibernation and during cold storage // J. Gen. Physiol. — 1971. — 58 — P. 620—633.
10. Sidell B. D. Cellular acclimation to environmental change by quantitative alterations in enzymes and organelles // Cellular acclimatization to environmental change. Edited by A. R. Cossins and P. Shetlerline. Symp. Soc. Exp. Biol., N 17. — P. 103—120.
11. Znegunov G., Mikulinsky Y., Kudokotseva E. Hyperactivation of protein synthesis in tissues of hibernating animals on arousal // Cryo.-Lett. — 1988. — N 9, P. 236—245.

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

Поступила 18.06.91

G. F. ZHEGUNOV, E. A. GOGITIDZE

PECULIARITIES OF PROTEIN DEGRADATION IN GROUND SQUIRRELS IN DIFFERENT PERIODS OF BAUT

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

The protein degradation in hibernating animals has been demonstrated to be controlled by the body and inhibited markedly (by 3 $\frac{1}{2}$ —5) fold in Winter as compared to active ground squirrels in Summer and rats. However this property was not found in isolated

tissues when the protein degradation was the same independently of the physiological condition of ground squirrel, season and corresponded to the rate of similar process in homeothermic animals.

Г. Ф. ЖЕГУНОВ, О. О. ГОГІТІДЗЕ
ОСОБЛИВОСТІ ДЕГРАДАЦІЇ БІЛКІВ У ХОВРАХІВ
НА РІЗНИХ ЕТАПАХ БАУТУ

Ін-т проблем кріобіології
і кріомедицини АН України, м. Харків

Показано, що процес деградації білків у зимосплячих тварин знаходиться під контролем організму і у зимовий період значно приглушений (менший у 3—5 разів) порівняно з тим же процесом у літніх ховрахів і пацюків. Однак ця якість не спостерігається в ізольованих тканинах, коли інтенсивність процесу деградації протеїнів однакова, незалежно від фізіологічного стану ховрахів, сезону року і відповідає швидкості аналогічного процесу у гомойотермних тварин.

УДК 615.47:616—089:621.59

Д. И. Цыганов, Н. К. Кочиева

МЕТОДИКА РАСЧЕТА И ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ
РЕЖИМА ЛОКАЛЬНОЙ КРИОТЕРАПИИ

Представлено теоретическое решение задачи теплообмена поверхности тела с низкотемпературной струей криоагента, предназначенной для лечения различных ревматических заболеваний. Определены значения и характер изменения тепло физических свойств биоткани в состоянии «*in vivo*» и «*in vitro*». Получены расчетные и опытные данные о распределении температуры, скорости и коэффициента теплоотдачи вдоль оси струи в зависимости от расстояния до среза сопла криоинструмента от поверхности тела. Даны пороговые значения безопасных режимов криотерапии, позволяющие получить необходимую температуру поверхности тела за данное время воздействия и избежать при этом неблагоприятных последствий криопроцедуры.

Новый метод лечения ревматических заболеваний, таких как артроз, артрит, люмбагия, проводится с помощью воздействия на ткани низкотемпературной струи газообразного азота. Лечебный эффект от применения локальной криотерапии связан с воздействием низких температур на механизмы терморегуляции организма через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему, а также с увеличением периферического кровообращения [3]. При проведении такой процедуры важно не допустить снижения температуры кожи ниже криоскопической, чтобы не вызвать некроз ткани. Поэтому разработка методики расчета оптимальных режимов воздействия и научно обоснованных рекомендаций для проектирования криотерапевтической техники является актуальной задачей.

Участок тела 4, обдуваемого струей газа 2 (рис. 1), можно представить в виде полуограниченного цилиндра с постоянно действующими внутренними источниками тепла q_m за счет клеточного метаболизма. В начальный момент времени температура поверхности T_n равна температуре тела T_t . Распределение температуры в ткани T в зависимости от времени воздействия τ описывается уравнением:

$$c\rho \frac{\partial T}{\partial \tau} = \lambda_{эф} \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + q_m, \quad (1)$$

где c , ρ , $\lambda_{эф}$ — соответственно теплоемкость, плотность и эффективная теплопроводность биоткани.

В уравнении (1) тепло, переносимое за счет кровотока, учтено с помощью введения эффективной теплопроводности, которая отличается от удельной теплопроводности λ тем, что при одном и том же температурном

градиенте через единицу площади ткани будет переноситься большее количество тепла за счет кровотока и метаболизма, т. е. теплопроводность биоткани «видимо» возрастает.

Теплообмен при взаимодействии струи газа с поверхностью тела определяется граничными условиями III рода, а в глубине ткани — I рода, так как задача теплопроводности биоткани, описываемая уравнением Фурье:

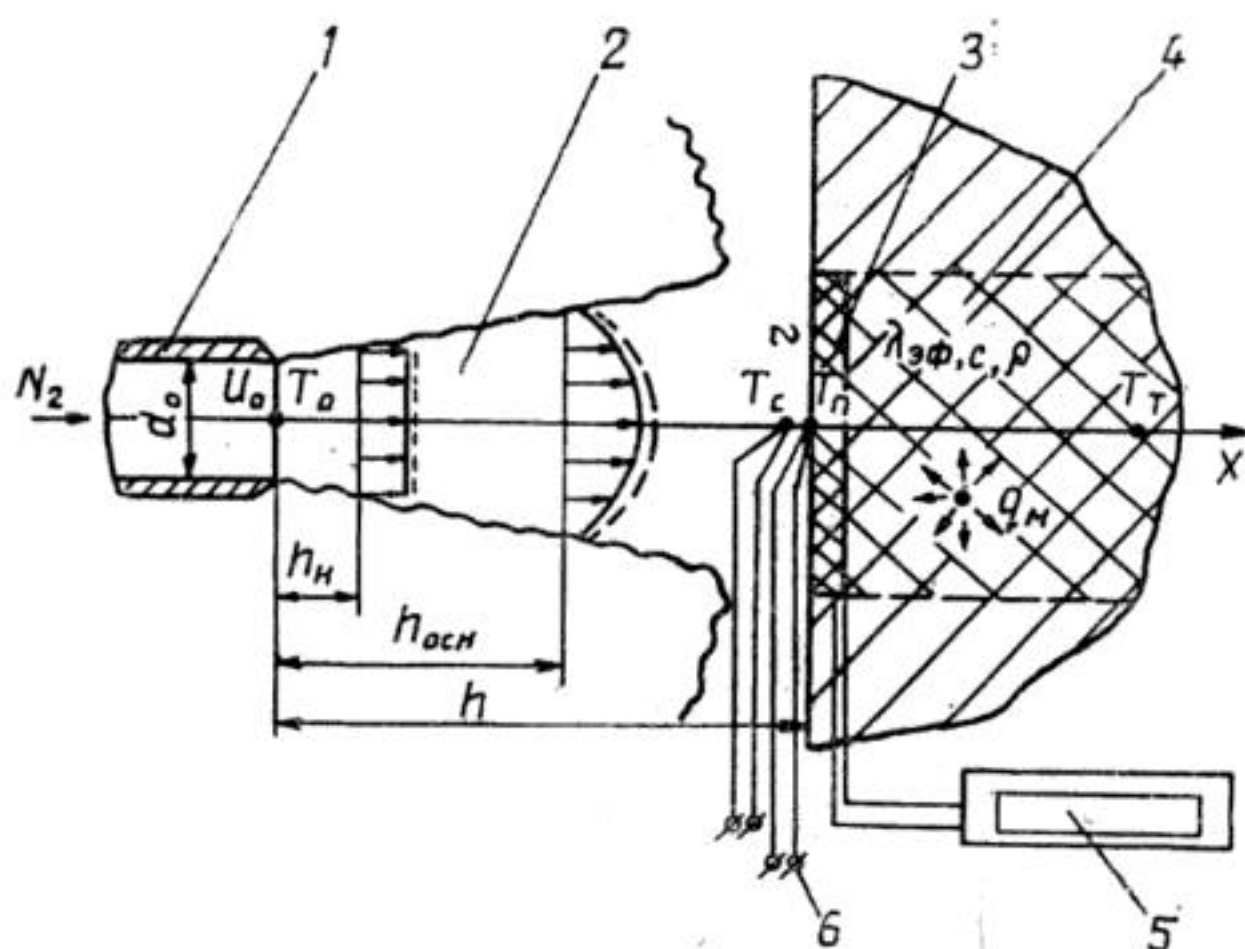


Рис. 1. Модель теплообмена и схема измерения взаимодействия струи газа с поверхностью тела: 1 — сопло криоинструмента, 2 — струя газа, 3 — датчик теплового потока, 4 — участок тела, 5 — цифровой милливольтметр типа Ш-300, 6 — термопары. Универсальные профили: — U_c/U_0 — скорости газа, — $\Delta T_c/\Delta T_0$ — температуры

$q = -\lambda \text{ grad } T$, является сопряженной с задачей конвективного теплообмена Ньютона $q = \alpha (T_c - T_n)$, где T_c — температура газа, α — коэффициент теплоотдачи.

Решение уравнения (1), полученное с помощью метода преобразования Лапласа и известных выражений для перевода изображения функции в ее оригинал, имеет вид [2]:

$$T_n(\tau) = T_c + (T_t - T_c) \left\{ e^{H^2 a \tau} \left[\frac{1}{V \pi} e^{-(H V a \tau)^2} \times \left(\frac{1}{H V a \tau} - \frac{1}{2 (H V a \tau)^3} \right) \right] + \frac{q_m \tau}{c p (T_t - T_c)} \right\}, \quad (2)$$

где $H = \frac{\alpha}{\lambda_{эф}}$.

Таким образом, чтобы определить необходимое время воздействия и получить заданную температуру кожного покрова, необходимо иметь информацию по целому массиву исходных данных: по теплофизическим свойствам (ТФС) биоткани, интенсивности внутренних источников тепла q_m , а также термодинамическим характеристикам струи, определяемым температурой T_c и коэффициентом теплоотдачи α на расстоянии h от среза сопла до поверхности тела.

Для расчета ТФС биоткани *in vivo* использованы данные работы [5]. Величина эффективной теплопроводности $\lambda_{эф}$ определяется безразмерным параметром β , аналогичным критерию теплового подобия — числу Пекле Pe , и служит мерой отношения конвективного переноса тепла вследствие кровотока к кондуктивной теплопроводности и параметром γ , который является мерой отношения полного количества внутренней теплоты метаболизма к предельному значению конвективного переноса тепла за счет кровотока:

$$\frac{\lambda_{эф}}{\lambda} = \frac{\beta e^{\beta/6}}{6 (e^{\beta/6} - 1)} \left\{ 1 + \gamma \left[1 - \frac{6 (e^{\beta/6} - 1)}{\beta e^{\beta/6}} \right] \right\}, \quad (3)$$

где γ и β — безразмерные параметры, равные:

$$\gamma = \frac{q_m}{(T_r - T_n) m}; \quad \beta = Pe = \frac{n l}{\lambda},$$

где $m = V_k \cdot \rho_k \cdot c_k$, V_k , ρ_k , c_k — скорость, плотность и теплоемкость крови. Следовательно, значение эффективной теплопроводности биоткани «*in vivo*» прямо пропорционально скорости кровотока V_k , толщине рассматриваемой ткани l и обратно пропорционально удельной теплопроводности «*in vitro*».

Измерение $\lambda_{эф}$ биоткани «*in vivo*» проводилось методом квазистационарного теплового режима на экспериментальном стенде, принцип работы которого и методика измерений описаны в работе [1]. Определение λ биоткани «*in vitro*» проводилось по комплексной методике двумя независимыми методами — стационарного теплового потока и квазистационарным сравнительным методом. Методика эксперимента включала также измерение плотности и влагосодержания биоткани [1].

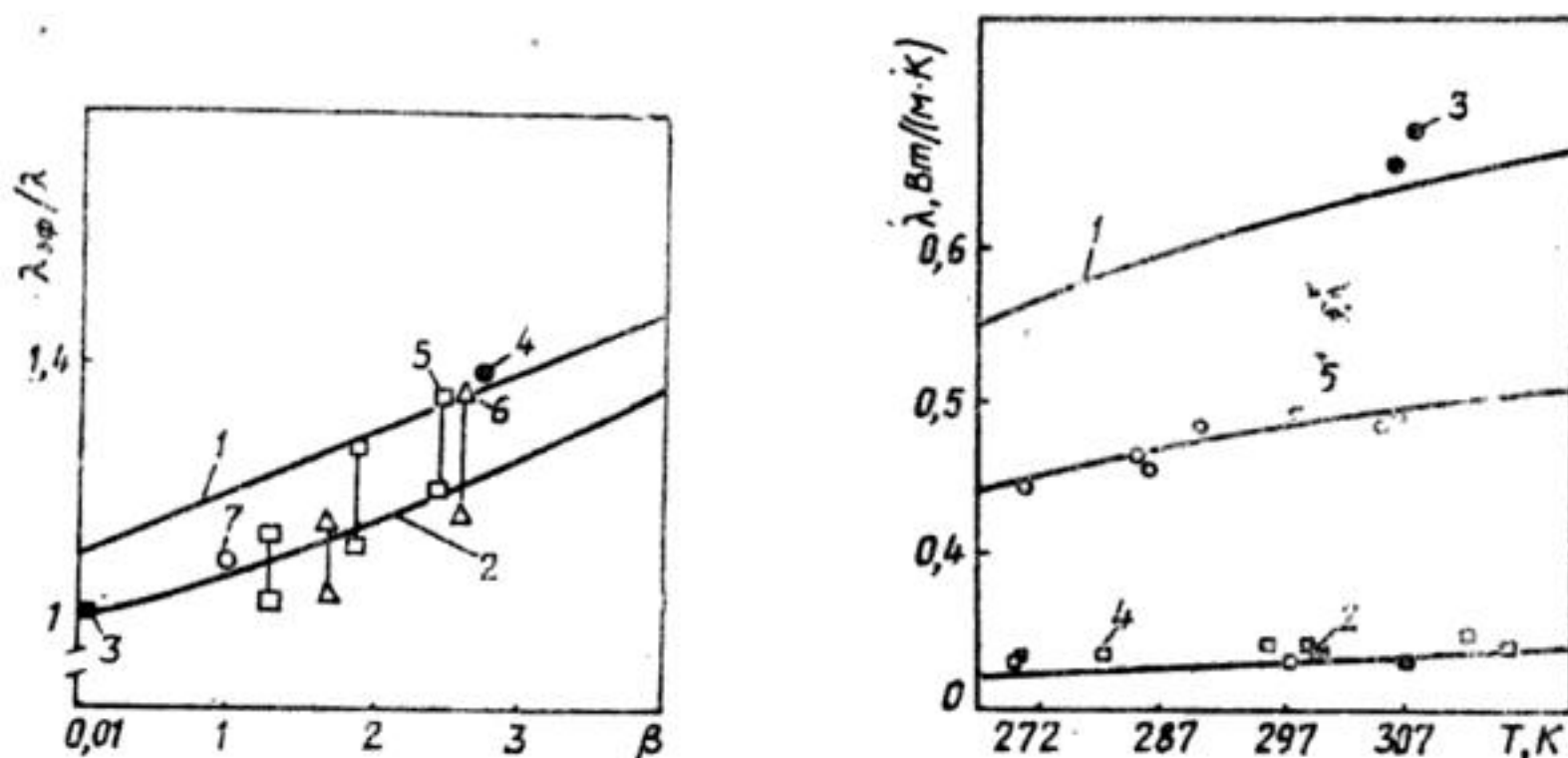


Рис. 2. Зависимости отношения эффективной теплопроводности $\lambda_{эф}$ к кондуктивной теплопроводности λ биоткани от безразмерного параметра β : 1, 2 — расчет по формуле (3), соответственно, при $q_m = \max$ ($\gamma = \beta^{-1}$) и $q_m = 0$. Опыт: 3, 4 — соответственно кожа и мышца кролика; 5, 6, 7 — подкожная жировая клетчатка человека, по данным [5]

Рис. 3. Температурная зависимость эффективной и кондуктивной теплопроводности λ : 1 — H_2O ; 2, 3 — кожа и мышца кролика «*in vivo*»; 4, 5 — кожа (влагосодержание $W = 68\%$) и мышца ($W = 76\%$) «*in vitro*»

На рис. 2 представлена зависимость отношения эффективной $\lambda_{эф}$ к кондуктивной теплопроводности λ от безразмерного параметра β при максимальном и минимальном уровнях метаболизма. На рис. 3 представлена температурная зависимость λ и $\lambda_{эф}$ для кожи и поперечнополосатой мышцы для случая, когда тепловой поток направлен перпендикулярно волокнам. Анализ экспериментальных и расчетных данных показал, что чем выше уровень кровотока, тем выше значение эффективной теплопроводности. В поверхностных слоях кожи (эпидермисе), где отсутствует развитая капиллярная сеть, параметр $\beta \rightarrow 0$, поэтому величина $\lambda_{эф}$ соответствует теплопроводности кожи «*in vitro*»: $\lambda_{эф}/\lambda = 1,00 - 1,04$. Для более глубоких слоев ткани с изотропным кровотоком это отношение, например для мышцы, изменяется в пределах 1,2—1,6. Уровень метаболизма не оказывает существенного влияния на величину $\lambda_{эф}$.

Таким образом, если теплофизическую модель биоткани представить как трехслойную, плоскоперпендикулярную к оси струи преграду, состоящую из кожи, подкожной жировой клетчатки и мышцы, то осреднение значения ТФС, например для эффективной теплопроводности, можно определить по принципу аддитивности.

Расчет термодинамических характеристик газовой струи позволяет определить распределение температуры T_c вдоль оси свободного потока газа, вытекающего из сопла диаметром d_0 со скоростью U_0 и температурой T_0 по нормали к поверхности тела, расположенного на расстоянии h от среза сопла (см. рис. 1).

В соответствии с полуэмпирической теорией для затопленной осесимметричной струи сначала необходимо определить ее геометрические параметры (начальный, переходный и основной участки), распределение скорости U_c вдоль оси потока, а затем через поправочные коэффициенты функцию $T_c(h)$ [4]:

$$\frac{U_c}{U_0} = 6,2 \frac{d_0}{h}; \quad (4)$$

$$T_c = T_{o.c} - T_0 \cdot 0,86 \frac{U_c}{U_0}, \quad (5)$$

где $T_{o.c}$ — температура окружающей среды.

На рис. 4 представлены расчетные и экспериментальные данные температуры газовой струи T_c в зависимости от расстояния до среза сопла h . Анализ этих данных показывает, что на начальном участке струи, равном $4,5 d_0$, $T_c = T_0$, а затем при $4,5 d_0 < h < 15 d_0$ функция $T_c(h)$ резко возрастает тем больше, чем ниже значение T_0 , причем характер ее изменения соответствует функции скорости $U_c(h)$ и при $h \geq 25 d_0$ по оси струи ее температура повышается в 1,3—2,2 раза.

Теория теплообменного турбулентного осесимметричного струйного потока газообразного криоагента позволяет с достаточной точностью рассчитать основные параметры газовой струи, так как расхождение расчетных и опытных данных $T_c(h)$ не превышает 10 %.

Следующая задача — аналитическое определение коэффициента теплоотдачи — является одной из наиболее сложных в газодинамике, так как механизм переноса тепла в пограничном слое на пластине при обдуве ее турбулентной осесимметричной струей изучен недостаточно. Методы расчета теплообмена при взаимодействии струи с преградой основаны на гипотезе, что интенсивность теплоотдачи обусловлена высокой интенсивностью турбулентности натекающего струйного потока. При соприкосновении струи с преградой образуется пограничный слой, который монотонно возрастает с увеличением радиуса пятна контакта r . В лобовой точке (критической) при $r = 0$ скорость потока $U_c = 0$, давление имеет максимальное значение и коэффициент теплоотдачи определяется соотношениями [6]:

$$\text{при } h \leq 6,2 \quad \alpha = 1,6 \frac{\lambda_r}{d_0} Pr^{1/3} Re^{1/2} \bar{h}^{0,11}; \quad (6)$$

$$h > 6,2 \quad \alpha = 5,25 \frac{\lambda_r}{d_0} Pr^{1/3} Re^{1/2} \bar{h}^{0,77}, \quad (7)$$

где $\bar{h} = \frac{h}{d_0}$ — безразмерное расстояние от среза сопла до поверхности тела, λ_r — теплопроводность газообразного криагента. Экспериментальное определение коэффициента теплоотдачи проводилось с помощью датчика

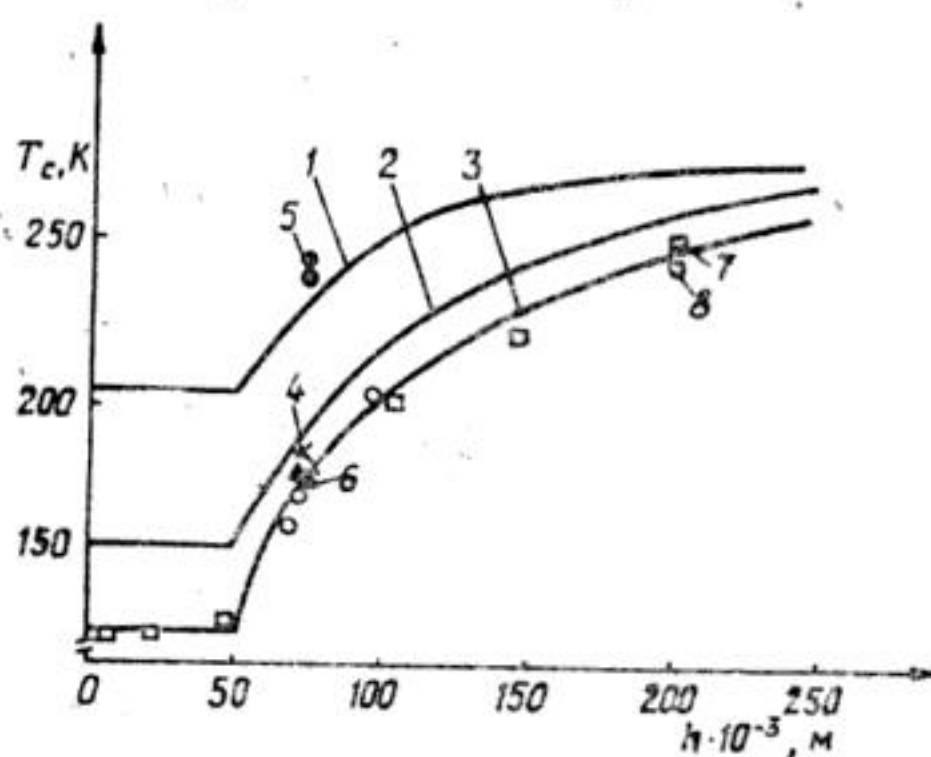


Рис. 4. Температура T_c по оси струи газа в зависимости от расстояния до среза сопла h (расчет, К): 1 — 208, 2 — 150, 3 — 120; (опыт, К): 4 — 115, 5 — 213, 6 — 143, 7 — 118, 8 — 113

теплового потока 3 со встроенной медь-константановой термопарой 6 (см. рис. 1). Показания термопары фиксировались с помощью цифрового милливольтметра 5.

Расчетная зависимость и опытные значения коэффициента теплоотдачи α от безразмерного параметра $\bar{h}$, характеризующего расстояние от среза сопла до поверхности тела в любой точке, представлена на рис. 5. Величина α имеет максимальное значение на начальном участке струи, а затем резко убывает почти в 3 раза при $h \geq 25d_0$.

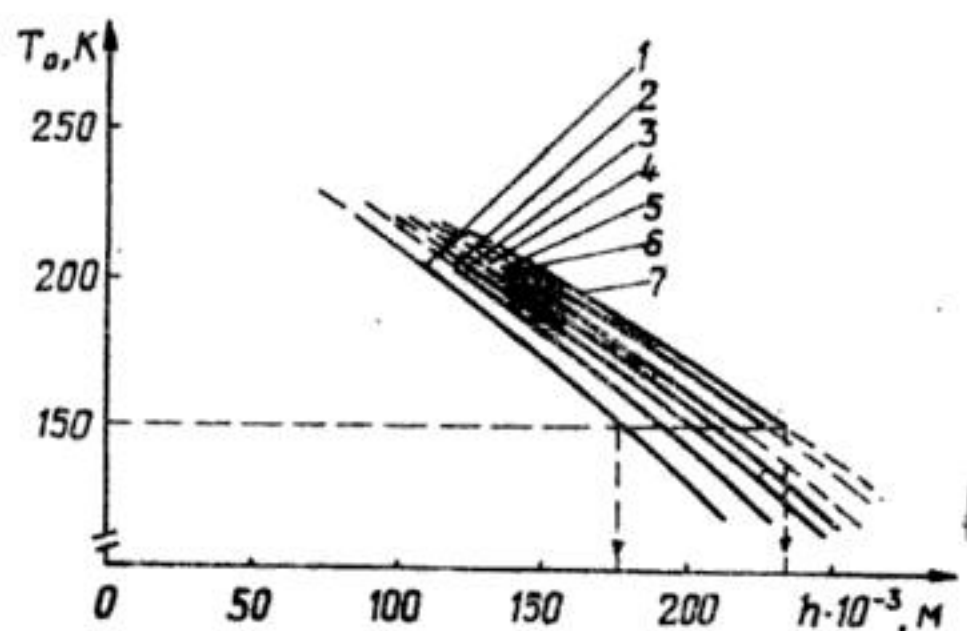
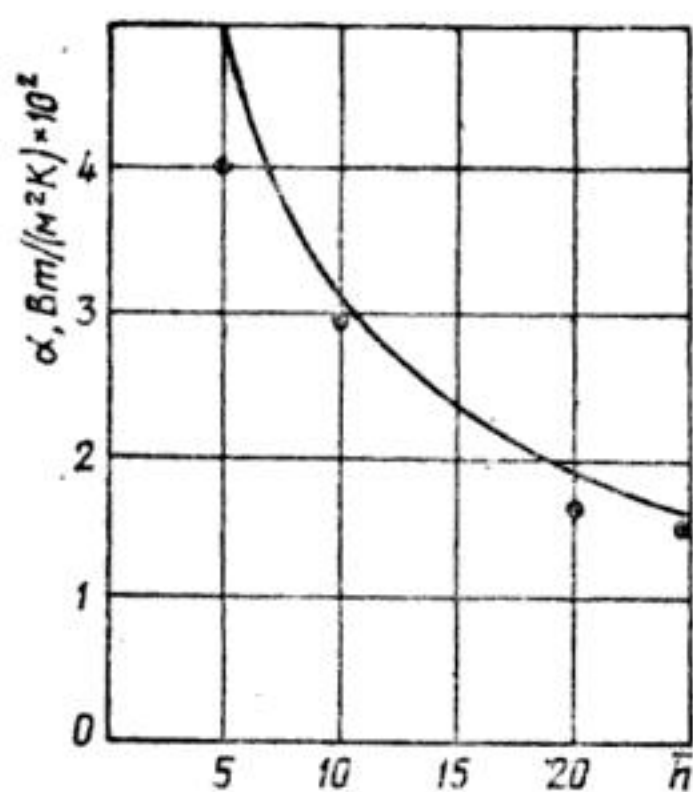


Рис. 5. Зависимость коэффициента теплоотдачи α от безразмерного параметра $\bar{h}$ в критической точке ($r = 0$): — — расчет по формулам (6, 7) при $d_0 = 10^{-2}$ м, $U_0 = 31,4$ м/с, $T_0 = 150$ К, $Re = 80000$, $Pr = 0,7$

Рис. 6. Температура газа на выходе из сопла T_0 в зависимости от расстояния h при данном времени воздействия τ (с) и температуре поверхности тела $T_n = 272,15$ К: 1 — $\tau = 30$, 2 — 60, 3 — 90, 4 — 120, 5 — 180, 6 — 240, 7 — 300

Таким образом, предложенная методика расчета позволяет найти необходимые исходные данные для определения безопасных режимов криооперации. На рис. 6 приведена температура струи на выходе из сопла криоинструмента в зависимости от расстояния h и времени воздействия τ при условии, что поверхность тела не подвергается замораживанию, т. е. $T_n = 272,15$ К. Анализ представленных зависимостей показывает, что при достижении криоскопической температуры за данный промежуток времени между расстоянием от сопла до тела пациента и температурой газа на выходе из криоинструмента существует почти обратно пропорциональная зависимость. Следовательно, можно выделить пороговые значения безопасных режимов криотерапии: например, при направленном локальном охлаждении поверхности тела струей газа при $T_0 = 150$ К в течение 30 с расстояние воздействия должно быть не менее 0,175 м, а в течение 300 с — не менее 0,235 м, в противном случае при меньшем расстоянии или большем времени будет получено обморожение кожи. Исходя из рекомендованного времени от 30 до 300 с и расстояния воздействия от 0,1 до 0,25 м [7], можно предположить оптимальные технические характеристики установки для локальной криотерапии: $T_0 = 120$ — 208 К, при этом скорость выхода газа из сопла должна составлять $U_0 = 31,4$ м/с, диаметр сопла $d_0 = 10^{-3}$, расход газа 15,4 кг/ч, давление на выходе 1,15 МПа.

Расчетные и опытные данные температуры поверхности кожи кролика T_n в зависимости от времени криотерапевтического воздействия при фиксированном расстоянии h до тела животного и температуры T_0 газа на выходе из сопла приведены на рис. 7 [8]. В ходе криопроцедуры значение T_n мгновенно (в пределах 50 с) снижается до криоскопической, причем тем быстрее, чем ниже значение T_0 , так как выбранное расстояние $h = 0,075$ м (кривые 4, 5, 6 рис. 7) меньше его порогового значения (рис. 6). В таких случаях в масштабе реального времени, чтобы не вызвать криповреждения ткани,

необходимо сочетать последовательно циклы охлаждения-отогрева данного участка кожи. Это может быть достигнуто с помощью круговых или возвратно-поступательных движений криоинструмента в пределах необходимого пятна контакта. В области больших значений h полученные зависимости достаточно точно совпадают с опытными данными работы [7].

Проведенные инвариантные расчеты подтвердили теоретическое предположение, что мощность тепла метаболизма не оказывает заметного влияния на величину и характер изменения функции $T_n(\tau)$. При максимальном значении $g_m = 2,2 \times 10^4 \text{ Вт/м}^3$ значение T_n будет выше на 1—3 К, поэтому для практических расчетов последним членом в уравнении (3) можно пренебречь.

Таким образом, разработанная методика расчета и проведенные исследования параметров режима криотерапии позволяют определить пороговые значения процесса — время, расстояние, температуру воздействия, которые могут быть использованы для проектных расчетов криотерапевтических медицинских установок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шафранов В. В., Тен Ю. В., Цыганов Д. И. Комбинированное микроволновое и криовоздействие на биоткани в эксперименте и клинике // Криобиология.— 1988. № 4.— С. 27—32.
2. Лыков А. В. Теория теплопроводности.— М. : Высшая школа, 1967.— 600 с.
3. Всес. конф. Локальная терапия при ревматических заболеваниях : Тез. докл.— М., 7—9 декабря 1988 г.— 139 с.
4. Абрамович Г. Н. Теория турбулентных струй.— М. : Наука, 1984.— 716 с.
5. Цыганов Д. И. Теоретический анализ теплопроводности биоткани // Тр. ВНИИИМТ МЗ СССР.— 1989.— Вып. 11.— С. 186—195.
6. Юдаев Б. Н., Михайлов Н. С., Савин В. К. Теплообмен при взаимодействии струй с преградами.— М. : Машиностроение.— 1977.— 248 с.
7. Jatauchi T. The effects of -170°C whole body cryotherapy on RA // European congress of rheumatology.— 1987.— 5/S — 2.— P. 386.
8. Cyganov D. I., Ptucha T. P., Zolobov H. I. Teoreticeskoe i eksperimentalnye issledovaniya parametrov gazovoj struji, prednaznachenoj dlja krioterapevtičeskogo lečeniya v revmatologii // Sbornik konference kriochirurgie jako aplikace nizkých teplot, 6 května 1990 Benešov.

Всес. науч.-исслед. и
испытательный ин-т мед. техники,
г. Москва

Поступила 25.07.91

D. I. TSYGANOV, N. K. KOCHIYEVA

THE METHOD OF CALCULATION AND INVESTIGATION OF PARAMETERS OF LOCAL CRYOTHERAPY

All-Union Research and Testing Institute for Medical Engineering,
Moscow

Calculations of heat exchange between the body surface and low temperature jet of cold agent for treatment of different rheumatic diseases are presented. The parameters and character of changes in heat properties of biological tissues were determined *in vivo* and *in vitro*. Calculated and experimental data on the temperature distribution, velocity

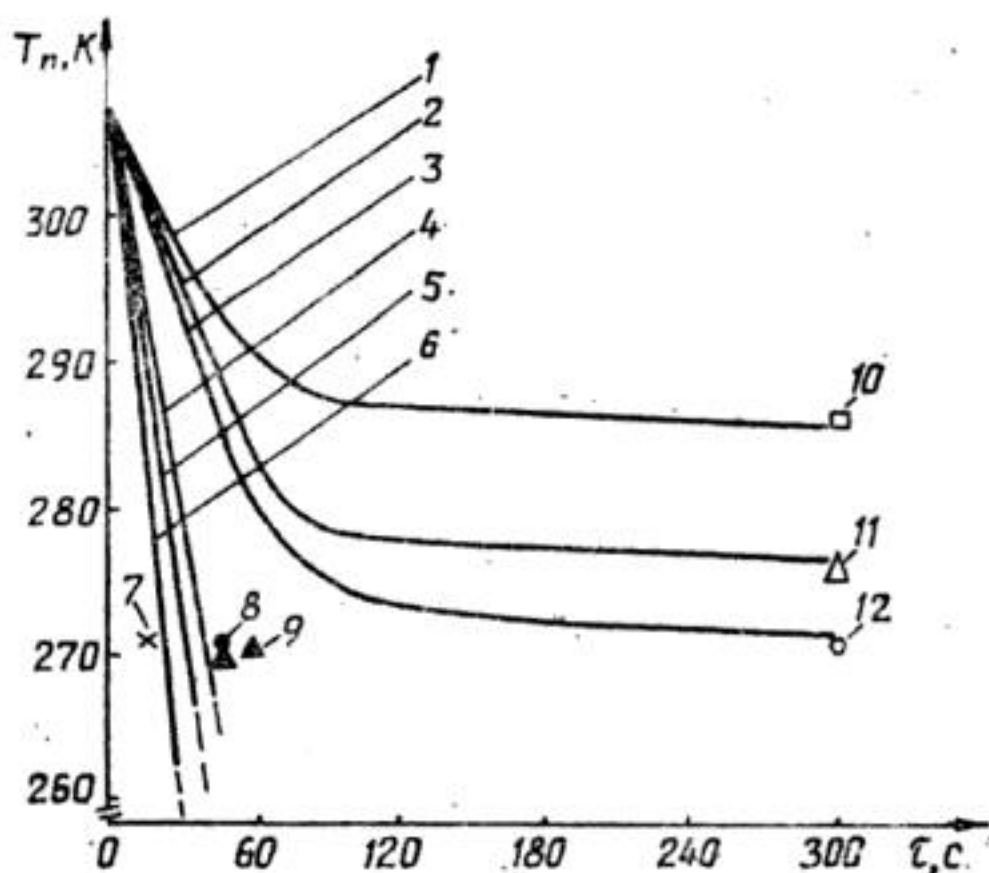


Рис. 7. Зависимость температуры поверхности кожи кролика T_n от времени воздействия τ , с (расчет, К): 1, 4 — $T_0 = 208$; 2, 5 — 150; 3, 6 — 120 соответственно при $h = 0,25$ и $0,075$ м; (опыт, К); 7, 8, 9 — при $h = 0,25$ м, соответственно $T_0 = 115, 213, 143$; 10, 11, 12 — по данным для тела человека, соответственно при $T = 264, 208, 100$ К [7]

and heat transfer coefficient along the flow axis were determined as a function of the distance between the cryoinstrument nozzle and the body surface. The threshold values for safe regimes of cryotherapy are presented which allow to obtain the required body surface temperature at a given time of application and to avoid unfavorable sequences of cryoapplication.

Д. І. ЦИГАНОВ, Н. К. КОЧІЄВА

МЕТОДИКА РОЗРАХУНКУ І ДОСЛІДЖЕННЯ ПАРАМЕТРІВ РЕЖИМУ ЛОКАЛЬНОЇ КРІОТЕРАПІЇ

Всес. науково-дослідний
і випробувальний ін-т медичної техніки,
м. Москва

Подано теоретичне рішення задачі теплообміну поверхні тіла з низькотемпературним струмком кріоагента, призначеним для лікування різних ревматичних захворювань. Названі значення і характер змін теплофізичних якостей біотканини в стані *in vivo* і *in vitro*. Одержано розрахункові і дослідні дані про розподіл температури, швидкості і коефіцієнти тепловіддачі вздовж вісі струмка залежно от віддалі до зрізу сопла безпечних режимів кріотерапії, котрі дозволяють одержати необхідну температуру поверхні тіла в даний час впливу і уникнути при цьому несприятливих наслідків кріопроцедури.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 547.422.22

Л. З. Верховская, В. И. Луговой, С. Т. Олейник

ПРОПАНДИОСАХАРОЛЬ — КРИОКОНСЕРВАНТ ДЛЯ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

На клетках монослойных перевиваемых линий — карцинома гортани (Нер-2) и почка теленка (ПТ) — разработан способ криоконсервирования с использованием пропандиосахароля, отличающийся от общепринятого тем, что скорость замораживания на 1-м этапе составляла 0,3 °С/мин. Применение пропандиосахароля в разведении 1 : 3,5 позволило при культивировании после отогрева не проводить замену среды через сутки. Использование стерильной готовой лекарственной формы криоконсерванта, устойчивой при хранении, позволяет упростить, стандартизировать и стабилизировать технологию криоконсервирования перевиваемых культур.

Ранее была показана перспективность использования 1,2-пропандиола при криоконсервировании перевиваемых клеточных культур [1]. В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР разработана готовая стерильная лекарственная форма криоконсерванта пропандиосахароль на основе 1,2-пропандиола для эритроцитов [2]. Представляет несомненный интерес исследование возможности использования пропандиосахароля в качестве криоконсерванта для перевиваемых культур, так как применение стерильной готовой лекарственной формы, устойчивой при хранении (2 года), позволит стандартизировать и стабилизировать процесс криоконсервирования.

Клетки перевиваемых монослойных культур — почка теленка (ПТ) и карцинома гортани (Нер-2) — в хорошем состоянии (эпителиоподобного типа с четко выраженными границами) культивировали в питательной среде следующего состава: среда 199 — 90 %, сыворотка крупного рогатого скота — 10 %, канамицина сульфат — 100 мкг/мл. Конфлуентный монослой отделяли от стекла смесью растворов версена и трипсина (4 : 1) бесцентрифужным методом. Концентрацию и жизнеспособность полученной клеточной суспензии оценивали методом суправитального окрашивания трипановым синим [3]. К суспензии клеток добавляли криоконсервант пропандиосахароль, разбавленный питательной средой до конечной концентрации клеток $1-3 \times 10^6$ в 1 мл и разведения пропандиосахароля 1 : 1; 1 : 2; 1 : 3,5;

1 : 5. После 15—20 мин эквilibрации клеточную суспензию разливали в полиэтиленовые ампулы на 1,5 мл. Криоконсервирование проводили на охлаждающем устройстве типа УОП 6 000 000 производства СКТБ с ОП ИПКиК АН УССР по следующим режимам охлаждения: I — двухэтапная программа, на 1-м этапе скорость охлаждения до -30°C $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, на 2-м этапе до -70°C $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; II — двухэтапная программа, на 1-м этапе скорость охлаждения до -30°C $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, на 2-м этапе до -70°C $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; III — одноэтапная программа, скорость охлаждения до -70°C $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; IV — одноэтапная программа, скорость охлаждения до -70°C $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; V — непосредственное прямое погружение образцов в жидкий азот. При I, II, III и IV-м режимах производится погружение в жидкий азот по достижении -70°C . Ампулы с криоконсервированной суспензией клеток хранили в жидком азоте.

Отогрев проводили на водяной бане при 37°C . Размороженные клетки переносили в культуральные флаконы и разводили питательной средой до посевной концентрации $1-3 \times 10^5$ кл/мл. Культивирование осуществляли при 37°C без замены среды через сутки. Оценку сохранности клеток после криоконсервирования проводили методом суправитального окрашивания трипановым синим и по способности к образованию монослоя в течение пяти пассажей [3]. Контролем служила сохранность клеток Нер-2 и ПТ после криоконсервирования с 10 %-м диметилсульфоксидом по стандартной программе: I-й этап — $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -30°C ; II-й этап — $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -70°C , погружение в жидкой азот; замена среды — через сутки культивирования после отогрева. Статистическая оценка результатов проводилась с помощью критерия Стьюдента-Фишера для независимых выборок по данным 3—18 опытов на ЭВМ. Различия сравниваемых величин считали существенными при $p < 0,05$.

Жизнеспособность клеточной суспензии в контрольном эксперименте после криоконсервирования с 10 %-м ДМСО составила для клеток Нер-2 и ПТ $(83,2 \pm 1,1) \%$ и $(78,4 \pm 2,0) \%$ соответственно ($n = 8$). После криоконсервирования с использованием режимов замораживания I, II и пропандиосахароля в разведении 1 : 2; 1 : 3,5 жизнеспособность клеток линии Нер-2 была на уровне контроля, причем после криоконсервирования по программе I результаты оказались выше, чем по программе II (табл. 1). Во всех указанных образцах наблюдали при культивировании образование непрерывного конфлуэнтного монослоя на 3-и — 4-е сут, клетки сохраняли

Таблица 1

Жизнеспособность клеток Нер-2 после криоконсервирования с пропандиосахаролем

Режим охлаждения, $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	Разведения пропандиосахароля		
	1 : 1	1 : 2	1 : 3,5
I-й, 0,3; 5	—	$85,4 \pm 0,8$ $n = 11$	$84,2 \pm 1,3$ $n = 10$
II-й, 1; 5	$65,0 \pm 1,0^*$ $n = 8$	$79,2 \pm 2,0$ $n = 6$	—
IV-й, 10	—	$68,3 \pm 1,3^*$ $n = 6$	$75,6 \pm 1,3^*$ $n = 3$
V-й, прямое погружение в жидкий азот	—	$10,0 \pm 2,1^*$ $n = 3$	$6,7 \pm 0,3^*$ $n = 3$

Примечание. * — достоверно к контролю.

Таблица 2

Жизнеспособность клеток ПТ после
криоконсервирования с пропандиосахаролем

Режим охлаждения, °C/мин	Разведения пропандиосахароля		
	1 : 2	1 : 3,5	1 : 5
I-й, 0,3; 5	75,3±0,9 n = 18	75,9±1,4 n = 9	79,4±1,5 n = 9
II-й, 1; 5	64,1±1,3* n = 10	—	—
III-й, 5	48,7±2,1* n = 8	—	—

Примечание. * — достоверно по сравнению с контролем.

отдельных клеток, не способных к дальнейшей пролиферации. Таким образом, увеличение скорости охлаждения на первом этапе криоконсервирования до 1 °C/мин снижало сохранность клеток Нер-2. Из приведенных данных (табл. 1) следует, что оптимальное разведение пропандиосахароля — 1 : 2; 1 : 3,5. Для клеток ПТ было показано целесообразным уменьшение скорости охлаждения на 1-м этапе до 0,3 °C/мин и увеличение разведения пропандиосахароля от 1 : 3,5 до 1 : 5 (табл. 2). Жизнеспособность клеток ПТ, криоконсервированных со скоростью охлаждения на первом этапе 1 °C/мин и разведением пропандиосахароля 1 : 2 была ниже, чем в контроле. После отогрева при культивировании этих образцов монослой не образовывался. Таким образом, оптимальными для исследуемых перевиваемых культур являются следующие условия криоконсервирования: 1) разведение пропандиосахароля 1 : 3,5; 2) двухэтапный режим замораживания — скорость охлаждения на 1-м этапе — до —30 °C 0,3 °C/мин, на 2-м этапе до —70 °C — 5 °C/мин, от —70 °C — погружение в жидкий азот. Культивирование после отогрева без замены среды через сутки не влияло на пролиферативную активность и способность к пассированию клеток Нер-2 и ПТ, что обусловлено применением криоконсерванта пропандиосахароля. Приведенные результаты согласуются с данными, полученными на эритроцитах, где применение криоконсерванта пропандиосахароля позволило упростить технологию криоконсервирования [2].

Для различных перевиваемых клеточных культур применяется единая технология криоконсервирования, что позволяет предложить разработанный способ для других монослойных перевиваемых линий. Использование стерильной готовой лекарственной формы криоконсерванта пропандиосахароля, устойчивой при хранении, позволит упростить стандартизировать и стабилизировать технологию криоконсервирования перевиваемых культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Верховская Л. З., Олейник С. Т. Криоконсервирование постоянных клеточных линий с применением 1,2-пропандиола // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. — Харьков: Б. и., 1990. — С. 21—24.
2. Грищенко В. И., Воротилин А. М., Гучок В. М. и др. Криоконсервирование эритроцитов под защитой криоконсерванта «Пропандиосахароль». Метод. рекомендации. — Харьков : Б. и., 1990. — 11 с.
3. Дьяконов Л. П., Глухов В. Ф., Поздняков А. А. и др. Культура клеток и тканей животных. — Ставрополь : Ставр. с/х. ин-т, 1980. — 110 с.

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

Поступила 22.11.90

L. Z. VERKHOVSKAYA, V. I. LUGOVOY, S. T. OLEYNIK

THE CRYOPRESERVATIVE PROPANDIOSACCHAROL FOR PASSAGED CELL CULTURES

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

A method of cryopreservation with propandiosaccharol has been developed using passaged monolayer cells of larynx carcinoma (Hep-2) and calf kidney (CK). The method differed from the routine method by freezing rate which was $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ at the first stage. Propandiosaccharol diluted 1 : 3.5 allowed to avoid the change of medium in a day of cultivation after thawing. The use of sterile drug form of cryopreservative, stable in storage, allows to simplify, standardize and stabilize the technology of cryopreservation of passaged cultures.

Л. З. ВЕРХОВСЬКА, В. І. ЛУГОВИЙ, С. Т. ОЛІЙНИК

ПРОПАНДИОСАХАРОЛЬ — КРІОКОНСЕРВАНТ ДЛЯ ПЕРЕВИВНИХ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

Ін-т проблем кріобіології
і кріомедицини АН України,
м. Харків

На клітинах моношарових перевивних ліній — карцинома горла (Hep-2) і чирка теляти (НТ) — розроблено спосіб кріоконсервування з використанням пропандіосахароля, який відрізняється від загальноприйнятих тим, що швидкість заморожування на першому етапі складає $0,3^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Застосування пропандіосахароля в розчині 1 : 3,5 дозволило при культивуванні після відігріву не проводити заміну середовища через добу. Використання стерильної готової лікувальної форми кріоконсерванта, стійкої при зберіганні, дозволяє спростити, стандартизувати і стабілізувати технологію кріоконсервування перевивних культур.

УДК 57.043:591.463.11:577.121

С. И. Очкур, Е. Ф. Копейка

ДЕЙСТВИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ С РАЗЛИЧНЫМИ КРИОПРОТЕКТОРАМИ НА ДЫХАНИЕ И АКТИВНОСТЬ СПЕРМИЕВ ПЕТУХОВ

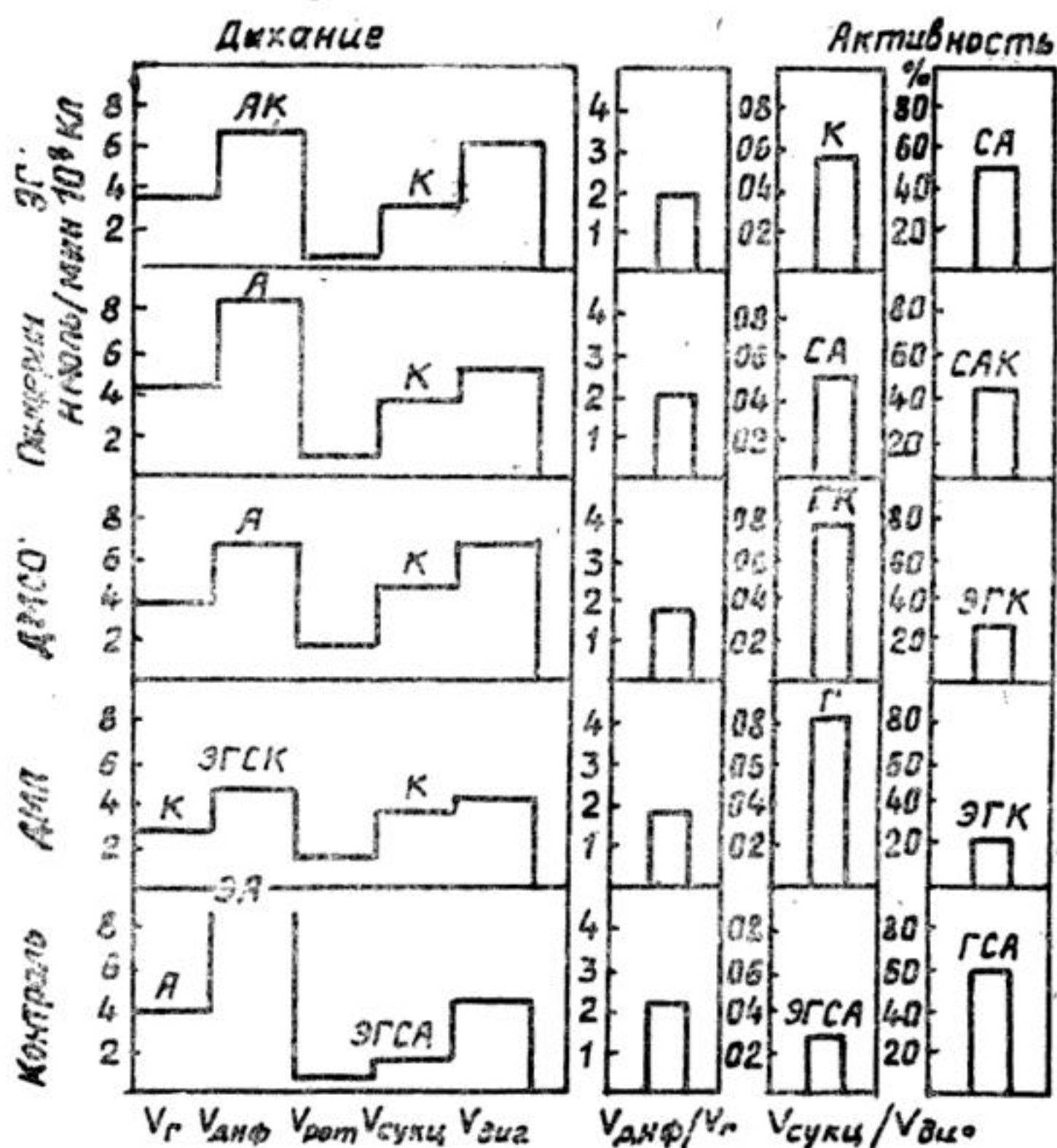
Исследовано дыхание сперматозоидов петухов в присутствии 2,4-динитрофенола, ротенона, сукцината и дигитонина. Обнаружено нарушение целостности плазматических мембран после криоконсервирования. По мере увеличения выраженности криозащитного действия использованные криопротекторы располагаются в следующем ряду: диметилацетамид, диметилсульфоксид, этиленгликоль и глицерин. Обсуждаются возможные причины снижения подвижности и дыхания сперматозоидов петухов после криоконсервирования.

В настоящее время интенсивно разрабатываются методы криоконсервирования спермиев петухов: идет поиск лучших составов сред для криоконсервирования, оптимальных режимов замораживания и отогрева, исследуются различные криопротекторы. При этом наиболее часто используют глицерин, диметилсульфоксид, этиленгликоль и диметилацетамид в концентрации 7—10 % [1, 5, 6]. Однако действие этих веществ на спермии петухов исследовано недостаточно. Работы, посвященные влиянию криопротекторов на эти клетки касаются, в основном, их морфологии и ультраструктуры [6]. Практически не изучены особенности влияния криопротекторов на метаболизм клеток и его сохранность после замораживания — оттаивания. В настоящей работе мы пытались оценить влияние криоконсервирования с этиленгликолем, глицерином, диметилсульфоксидом и диметилацетамидом на дыхание и активность спермиев петуха.

Сперматозоиды петуха получали методом Бурроус и Квин [3] от 8—12 птиц для каждого опыта. Объединенные эякуляты разбавляли 1 : 5 средой, содержащей 68 мМ глутамата Na, 9 мМ $MgSO_4$, 10 мМ NaN_2PO_4 , 10 мМ глюкозы, 10 мМ фруктозы, 159 мМ сахарозы; pH 7,5. В эту среду добавляли криопротектор так, чтобы его конечная концентрация составляла 8 %.

Суспензию клеток замораживали в парах азота. Охлаждение проводили по двухэтапной программе: 2—3 °C/мин до —25 °C с остановкой на плато кристаллизации и далее по экспоненте до —196 °C. Оттаивали 5 мин на водяной бане при 0 °C и 5 мин при 25 °C.

Дыхание клеток изучали полярографическим методом с помощью закрытого платинового электрода типа Кларка. При этом оценивали следующие параметры: интенсивность дыхания в присутствии глюкозы (V_r); дыхание после добавки 100 мкМ 2,4-динитрофенола ($V_{днф}$); разобщенное дыхание в присутствии 1 мкМ ротенона ($V_{рот}$); скорость окисления сукцината (10 мМ) на фоне ротенона и 2,4-динитрофенола ($V_{сукц}$); скорость окисления сукцината в присутствии 80 мкМ дигитонина ($V_{диг}$) (26 нмоль на 10^8 клеток). Последовательность добавок показана на рисунке. Концентрации 2,4-динитрофенола, ротенона и дигитонина определяли титрованием.



Дыхание и активность спермиев петухов после криоконсервирования с различными криопротекторами: V_r , $V_{днф}$, $V_{рот}$, $V_{сукц}$, $V_{диг}$ — скорости дыхания в присутствии 10 мМ глюкозы, 100 мкМ, 2,4-динитрофенола, 1 мкМ ротенона, 10 мМ сукцината, 80 мкМ дигитонина. Обозначение над столбиком — достоверность различий ($P < 0,05$) между одинаковыми показателями для различных криопротекторов: Э — этиленгликоль, Г — глицерин, С — диметилсульфоксид, А — диметилацетамид; К — контроль (нативные клетки).

Активность спермиев определялась как отношение поступательно движущихся спермиев, видимых в поле зрения микроскопа к общему их количеству, выраженное в процентах.

Все измерения проводились при температуре 25 °C.

В данной работе использовали следующие реактивы: ротенон, 2,4-динитрофенол, сукцинат фирмы «Серва» (ФРГ), дигитонин фирмы «Мерк» (ФРГ), остальные реактивы — фирмы «Реахим» (СССР) квалификации «ХЧ» и «ОСЧ».

При планировании эксперимента и обработке результатов применяли трехфакторный дисперсионный анализ. I фактор — влияние криопротекторов, II фактор — влияние дня эксперимента, III фактор — изучаемый параметр дыхания: V_r , $V_{диф}$, $V_{рот}$, $V_{сукц}$, $V_{диг}$. Результаты по активности, а также расчетные показатели — $V_{диф}/V_r$, $V_{сукц}/V_{диг}$ — обрабатывались отдельно как двухфакторные комплексы: I фактор — влияние криопротекторов, II фактор — влияние дня эксперимента. Фактор II отражает разное качество материала для разных повторов, поскольку эксперимент проводился раз в день. Оценка случайного фактора II позволяет учесть его влияние с тем, чтобы изучить действие криопротекторов более корректно.

Влияние фактора I, т. е. действие криопротекторов оказалось значимым, а влияние фактора II — незначимым для всех изученных показателей.

Результаты эксперимента представлены на рисунке в виде усредненных диаграмм записи дыхания. Каждую скорость регистрировали 2 мин. Из рисунка видно, что скорость дыхания V_r после криоконсервирования со всеми криопротекторами, кроме диметилацетамида, практически не отличается от контроля.

Интенсивность разобщенного дыхания $V_{диф}$, характеризующая максимальный поток электронов в дыхательной цепи после криоконсервирования спермиев петуха под защитой глицерина и диметилсульфоксида, не отличается от таковой для нативных клеток. По этому параметру криопротекторы в порядке возрастания их защитного действия располагаются в следующем ряду: диметилацетамид, этиленгликоль, диметилсульфоксид и глицерин.

Ротенон, который ингибирует дыхательную цепь перед Q — циклом, во всех случаях сильно угнетал разобщенное дыхание. Это, возможно, указывает на то, что спермии петуха преимущественно окисляют НАД — зависимые субстраты.

Добавка сукцината к суспензии замороженных-оттаянных спермиев значительно стимулирует потребление кислорода. В контроле эта стимуляция не достоверна. Скорость окисления сукцината ($V_{сукц}$) нативными спермиями достоверно отличается от таковой в других вариантах опыта (а, г, с, э). Это указывает на повреждение плазматических мембран спермиев при замораживании-оттаивании, поскольку в норме он практически не проникает через плазматическую мембрану и окисляется незначительно.

Добавка дигитонина приводит к еще большему возрастанию скорости дыхания. Считается, что в малых концентрациях дигитонин, взаимодействуя с холестерином плазматической мембраны, разрушает ее не повреждая митохондрий клеток. Стимуляция дыхания замороженных-оттаянных клеток дигитонином говорит о том, что после криоконсервирования барьерные свойства плазматических мембран для сукцината утрачиваются не полностью. Для того, чтобы оценить степень сохранности плазматических мембран при криоконсервировании сперматозоидов с различными криопротекторами мы ввели показатель $V_{сукц}/V_{диг}$, показывающий вклад скорости окисления сукцината спермиями петуха до добавки дигитонина в максимально возможную скорость его окисления в присутствии дигитонина. По этому показателю большая степень сохранности плазматических мембран была у нативных клеток и спермиев, криоконсервированных под защитой глицерина, а наименьшая — у спермиев, криоконсервированных под защитой диметилацетамида и диметилсульфоксида. Таким образом, сильное снижение скорости разобщенного дыхания $V_{диф}$ после криоконсервирования спермиев петухов в среде с диметилацетамидом может отчасти объясняться выходом эндогенных субстратов окисления в результате значительного нарушения целостности плазматических мембран после замораживания-оттаивания.

Считается, что степень стимуляции дыхания разобщителем отражает сопряженность процессов окисления и фосфорилирования [2]. В данной работе этот показатель оказался неинформативным; однозначная интерпретация его затруднена вследствие того, что и начальная скорость дыхания V_r и скорость дыхания в присутствии разобщителя являются функциями нескольких переменных.

Кроме описанных параметров дыхания нативных и криоконсервированных спермиев петуха, мы оценивали их активность. Наиболее высокой активностью обладали сперматозоиды, криоконсервированные под защитой этиленгликоля и глицерина и меньшей — сперматозоиды, криоконсервированные под защитой диметилацетамида и диметилсульфоксида. Отмеченные различия в активности могут объясняться неодинаковой сохранностью плазматических мембран ($V_{\text{сух}}/V_{\text{диг}}$), в том числе и мембран жгутиков, после криоконсервирования с различными криопротекторами и, в связи с этим, изменением скорости дыхания (особенно после криоконсервирования с диметилацетамидом), а также различным влиянием этих веществ на метаболизм клеток.

Резюмируя приведенные данные, можно сделать следующее заключение. Результаты, полученные в настоящей работе, характеризуют в целом криозащитные и цитотоксические свойства криопротекторов в отношении спермиев. Высокой криозащитной активностью и низкой токсичностью в этом отношении характеризуются глицерин и этиленгликоль. Спермии петухов после криоконсервирования с этими криопротекторами обладают более высокой активностью, имеют менее поврежденные плазматические мембраны и отличаются более высокими значениями максимальной скорости окисления субстратов (в присутствии разобщителя). Низкие значения этой скорости у спермиев, криоконсервированных под защитой диметилацетамида и диметилсульфоксида могут объясняться выходом части эндогенных субстратов через поврежденные участки плазмалеммы. Повреждение плазматических мембран в области жгутиков также могут приводить к падению подвижности вследствие выхода АТФ из клеток.

Литературные данные [1] свидетельствуют о высокой криозащитной эффективности диметилацетамида, что не нашло подтверждения в настоящей работе. Этот факт можно объяснить тем, что в наших экспериментах время контакта спермиев с этим криопротектором после оттаивания достигает 10—15 мин, в то время как в практике [1] оно не превышает 45—60 с. Это указывает на ингибирующее действие диметилацетамида на метаболические процессы в спермиях, т. е. о его цитотоксичности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курбатов А. Д. Низкотемпературное хранение спермы птиц // Криобиология.— 1985.— № 3.— С. 13—15.
2. Мороз Л. Г., Корбан Н. В., Шапиев И. Ш. Оценка спермы хряков для замораживания и прогнозирования ее оплодотворяющей способности // Сельскохозяйственная биология.— 1982 — XVII, № 3.— С. 394—397.
3. Burrous W. H., Quinn J. P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey // Poultry Sci.— 1937.— 16, P. 19—24.
4. Harris G., Thurston R., Cundall J. Changes in the ultrastructure of the fowl spermatozoon due to rapid freeze-thaw // J. Reprod. Fert.— 1973.— 34, N 3.— P. 383—389.
5. Maeda T., Senba H., Terada T., Tsutsumi Y. Studies on morphological frozen injuries of avian spermatozoa: optimum glycerol concentration for freezing fowl spermatozoa // J. Fac. App. Biol. Sci.— Hiroshima Univ., 1985.— N 24.— P. 25—31.
6. Westfall F. D., Harris G. C. The ability of cryopreservatives to prevent motility loss and freeze-thaw damage to the acrosome of chicken spermatozoa // Cryobiology.— 1975.— N 12.— P. 85—95.

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

Поступила 27.02.90

S. I. OCHKUR, E. F. KOPEYKA

THE EFFECT OF FREEZE-THAWING WITH DIFFERENT CRYOPROTECTANTS ON THE RESPIRATION AND MOTILITY OF FOWL SPERMATOOZOA

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

The respiration of fowl spermatozoa in the presence of 2,4-dinitrophenol, rotenone, succinate and digitonin was studied. Disintegration of plasma membranes has been found after cryopreservation. The protective efficiency of cryoprotectants increased in the following sequence: dimethyl acetamide, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol. Probable causes of decreasing in motility and respiration of fowl spermatozoa after cryopreservation are discussed.

С. І. ОЧКУР, Е. Ф. КОПЕЯКА

ДІЯ ЗАМОРОЖУВАННЯ-ВІДТАЮВАННЯ З РІЗНИМИ КРІОПРОТЕКТОРАМИ НА ДИХАННЯ І АКТИВНІСТЬ СПЕРМІІВ ПІВНІВ

**Ін-т проблем кріобіології
і кріомедицини АН України,
м. Харків**

Досліджувалось дихання сперматозоїдів півнів у присутності 2,4-дінітрофенола, ротенона, сукцинату і дігітоніна. Виявлено порушення цілісності плазматичних мембран після кріоконсервування. В міру збільшення вираженості кріозахисної дії використані кріопротектори розташовуються в такому ряді: диметилацетамід, диметилсульфоксид, етиленгліколь і гліцерин. Обговорюються можливі причини зниження рухомості і дихання сперматозоїдів півнів після кріоконсервування.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 57.043

М. М. Дронов, Ю. И. Пирогов

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ РОГОВИЦЫ ПРИ КЕРАТОПЛАСТИКЕ

Изучалась зависимость показателей клеточного гуморального и неспецифического иммунитета при различных видах кератопластики у 115 больных с заболеваниями и травмами роговицы от вида используемого трансплантационного материала — свеже- и криоконсервированного. Установлено, что использование криоконсервированной роговицы наиболее целесообразно при кератопластиках по поводу дистрофии роговицы и посттравматических бельмах. Криоконсервированный и свежий материал может быть с одинаковым успехом применен при сквозных кератопластиках по поводу послеожоговых и поствоспалительных бельмах.

Положительный результат кератопластики во многом зависит от наличия жизнеспособного донорского материала. В настоящее время наиболее широко используются свежее- и криоконсервированные аллороговицы. Однако следует особо подчеркнуть, что срок использования свежееконсервированного материала для операций кератопластики ограничен 1—2 сут. В то же время, разработанный и усовершенствованный рядом авторов метод криоконсервации роговиц [2, 10, 11] обеспечивает длительную и высокую трансплантационную пригодность ткани, причем, если жизнеспособность криоконсервированной и свежей роговицы практически одинаковая [10, 11], то иммуногенность криороговиц значительно ниже, чем у свежего материала [7, 9].

Целью настоящего исследования является изучение зависимости показателей иммунитета при различных видах кератопластики у больных с заболеваниями и травмами роговицы от вида используемого трансплантационного материала: свежее- и криоконсервированного.

Произведено клинико-иммунологическое обследование 115 больных с бельмами после ожогов (37), механических повреждений (15), воспалительных заболеваний (27) с и дистрофиями роговицы (36). Из их числа 26 больным с оптической целью выполнена послойная (табл.) 67-сквозная кератопластика. У 22 больных сквозная кератопластика проводилась одновременно с одним из следующих вмешательств: реконструкцией передней камеры, экстракцией катаракты, синустрабекулэктомией, передней ультразвуковой витрэктомией, т. е. носила оптикореконструктивный характер. Материалом для кератопластики в 59 случаях служили роговицы, консервированные во влажной камере по методу акад. В. П. Филатова, в 56 случаях — криоконсервированные. Криоконсервированные роговицы были любезно предо-

Распределение кератопластик в зависимости от вида и целей операции, характера патологии и способа консервации роговицы

Вид кератопластики	Цель операции	Характер патологии	Количество операций	
			криоконсервированный материал	свежий материал
Сквозная	Лечебная, лечебно-реконструктивная	Глубокая дистрофия роговицы	1	4
		Глубокий герпетический кератит	1	2
		Наружная фистула роговицы	6	2
		Расплавление роговицы	11	2
		Острый кератоконус	2	—
		Стафилома роговицы	—	2
	Оптическая, оптико-реконструктивная	Посттравматические бельма	8	7
		Послеожоговые бельма	6	15
		Послеинфекционные бельма	5	7
		Помутнение трансплантаты	1	2
		Кератоконус	1	2
		Дистрофия роговицы	1	1
		Общее количество	43	46
Послойная	Лечебная	Тяжелые и особо тяжелые ожоги	4	4
		Птеригиум	3	2
	Оптическая	Послеожоговые бельма	1	7
		Дистрофия роговицы	3	—
		Постинфекционные бельма	2	—
		Общее количество	13	13
		ИТОГО:	56	59

ставлены нам Институтом проблем криобиологии и криомедицины АН УССР.

Всем больным до операции и спустя 14 дней после нее исследовали клеточный, гуморальный и неспецифический иммунитет. При изучении клеточного иммунитета определяли количество розеткообразующих Т-лимфоцитов [14], «активных» Т-лимфоцитов [15]. Кроме того использовали реакцию торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) [13] в модификации [8] с фитогемагглютинином (ФГА) — для изучения функции Т-лимфоцитов, с конканавалином А (КонаА) — для определения функции Т-супрессоров, а также РТМЛ с антигеном роговицы (АР). Оценку результатов производили следующим образом: сенсibilизация к АР (процент миграции менее 80, торможение миграции лейкоцитов — ТМЛ) и неадекватная реакция на АР (процент миграции более 100, стимуляция миграции лейкоцитов — СМЛ).

Для изучения состояния гуморального иммунитета определяли количество розеткообразующих В-лимфоцитов [12], уровни иммуноглобулинов сыворотки (Ig) крови классов А, М, G [16]. Из показателей, характеризую-

ющих неспецифический иммунитет, исследовали циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) и титр общего комплемента (ТК) [4, 5]. Результаты пересадки роговицы оценивали по состоянию трансплантата: прозрачный (58), полупрозрачный (38), мутный (17), лизировавшийся (2 больных).

У больных с послеожоговыми бельмами после пересадки свежей роговицы достоверно повышается количество Т-лимфоцитов и уменьшается неадекватная реакция на АР. После пересадки криоконсервированного материала отмечается более значительное увеличение количества «активных» Т-лимфоцитов, Т- и В-лимфоцитов, а также функции Т-супрессоров и уменьшение количества IgA.

В группе больных с посттравматическими бельмами при пересадке криоматериала наблюдалось уменьшение количества «активных» Т-лимфоцитов, функции клеточного иммунитета и уровня IgA, а также повышение количества В-лимфоцитов. В то же время, при использовании свежей роговицы имело место усиление сенсibilизации и неадекватной реакции на АР в РТМЛ.

В группе с дистрофиями роговицы реакция иммунитета на пересадку свежей роговицы заключалась в повышении количества Т- В-лимфоцитов после операции и достоверном усилении сенсibilизации. При использовании криоматериала на фоне снижения функции всех Т-лимфоцитов отмечалось повышение количества Т-лимфоцитов и функции Т-супрессоров.

При прозрачном приживлении криоконсервированных трансплантатов на фоне повышения количества Т-лимфоцитов происходило усиление функции Т-супрессоров и понижение количества IgA. В подгруппе с использованием этого материала имело место увеличение Т-лимфоцитов и понижение их функции.

В группе с полупрозрачным приживлением криоматериала найдено увеличение количества «активных» Т-лимфоцитов и ТК. У больных после пересадки свежекконсервированных роговиц отмечалось достоверное повышение функции Т-супрессоров и усиление неадекватной реакции на АР.

В случаях с неблагоприятным исходом (помутнение и лизис трансплантата) в подгруппе со свежим трансплантационным материалом значительно повышалось число Т- и В-лимфоцитов. В случаях с использованием криороговиц изменения этих показателей были не столь значительными, однако наблюдалось достоверное уменьшение ТК и усиление сенсibilизации к АР.

В подгруппе с послойной кератопластикой криоматериалом повышалось количество Т- и «активных» Т-лимфоцитов. При использовании свежей роговицы имело место увеличение числа Т-лимфоцитов и усиление функции Т-супрессоров, а также повышение количества IgM.

У больных, которым выполнена сквозная кератопластика криороговицей, отмечается повышение функции Т-супрессоров и реакция гуморального иммунитета в виде увеличения количества В-лимфоцитов и понижения уровней IgA и IgG. В случаях, когда использовали свежий материал, наблюдали повышение числа Т-лимфоцитов, ослабление неадекватной реакции на АР, увеличение количества В-лимфоцитов и иммуноглобулина М.

В группе больных со сквозной реконструктивной кератопластикой также использовали роговицу, консервированную различными способами. В случаях с пересаженным криоконсервированным материалом у больных после операции повышалось количество Т- и В-лимфоцитов, развивались сенсibilизация и неадекватная реакция на АР. При использовании роговицы, консервированной во влажной камере, понижалась функция Т-лимфоцитов, уменьшалось количество IgM и ТК.

Рядом авторов [3, 6] установлено, что благоприятными иммунологическими критериями для приживления кератотрансплантата являются: повышение количества Т- и В-лимфоцитов, повышение функции Т-лимфоцитов, понижение ТК, усиление сенсibilизации и неадекватной реакции на АР. С другой стороны, способствующими благоприятному результату пересадки роговицы является понижение количества Т- и В-лимфоцитов и функции Т-лимфоцитов, а также количества иммуноглобулинов, повы-

шение ТК, функции Т-супрессоров и уменьшение сенсibilизаций и неадекватной реакции на АР. Исходя из этого, в зависимости от наличия или отсутствия предрасполагающих к успеху кератопластики факторов в динамике показателей иммунитета, могут быть предложены некоторые рекомендации. Так, у пациентов, оперирующихся по поводу послеожоговых и поствоспалительных бельм можно использовать материал как свежий, так и криоконсервированный. По особенностям воздействия на иммунитет у больных с дистрофиями роговицы и посттравматическими бельмами лучшим оказался криоконсервированный материал.

С иммунологической точки зрения для послойной кератопластики более приемлемым представляется свежий материал, тогда как для сквозной одинаково пригодны консервированные тем и другим способами.

Учитывая возникающую после операции совокупность неблагоприятных иммунологических факторов, мы не рекомендуем использовать криоконсервированную роговицу для сквозной оптико-реконструктивной кератопластики.

Возможно, состояние метаболизма трансплантатов, консервированных тем или иным способом, влияет на соответствующую реакцию иммунитета организма, а состояние иммунной системы, в свою очередь, предопределяет характер приживления кератотрансплантата. Клинико-иммунологический анализ успешности приживления трансплантатов свидетельствует о том, что сочетание благоприятных или неблагоприятных факторов во многом служит причиной приживления или отторжения пересаженной роговицы.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

— использование криоконсервированной роговицы наиболее целесообразно при дистрофиях роговицы и посттравматических бельмах,

— для послойных и сквозных оптико-реконструктивных кератопластик более предпочтительны свежееконсервированные по методу В. П. Филатова роговицы,

— криоконсервированный и свежий материалы могут быть с одинаковым успехом применены при сквозных кератопластиках по поводу послеожоговых и поствоспалительных бельм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ваничкин А. А., Горигиладзе Т. У., Кочкарева О. И., Савчук Л. Н. Изучение изменения количества Т- и В-лимфоцитов периферической крови при кератопластике в динамике послеоперационного периода: Тез. докл. VII съезда офтальмологов СССР. Одесса, 1984. — С. 257—258.
2. Волков В. В., Дронов М. М., Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М. Опыт клинического использования криоконсервированной роговицы // Вест. офтальмол. — 1981. — № 6. — С. 28—30.
3. Волков В. В., Хавинсон В. Х., Пасхина М. Н., Пирогов Ю. И. Иммунологическая диагностика и прогнозирование приживления кератотрансплантатов // Вестн. офтальмол. — 1986. — № 5. — С. 27—31.
4. Гринбаум Н. В., Савельвольф Г. В. Содержание комплемента при некоторых нефропатиях у детей // Ежегодник ин-та эксперим. медицины. — Л., 1967. — 9. — Вып. 4. с. 109—112.
5. Гриневич Ю. Л., Алферов А. Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. — 1981. — № 8. — С. 493—496.
6. Гундорова Р. А., Бордюгова Г. Г., Юровская Н. Н., Тазетдинова Н. Р. Роль субпопуляций Т-лимфоцитов при кератопластике при ожоговых бельмах // Вестн. офтальмол. — 1988. — № 5. — С. 19—23.
7. Илатовская Л. В., Маслова-Хорошилова И. П., Деревянко В. П. Ультраструктура роговицы глаза человека после криоконсервации: Тез. докл. междунар. конф. по кератопластике и кератопротезированию. — Одесса: Чорномор. комуна. — 1978, с. 74—75.
8. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Методические рекомендации по проведению иммунологического обследования. — Л.: Воен.-мед. акад. — 1980. — 44 с.
9. Черняк С. С., Шпак Н. И. Влияние сроков криоконсервации донорского материала на результаты частичной сквозной кератопластики. — Киев: Здоровья. — 1967. — С. 270—272.
10. Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М. Влияние низких температур (—196 °С) на дыхательную функцию роговой оболочки человека. — Криобиология и криомедицина. — 1975. — Вып. 1. — С. 116—117.

11. Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М., Волков В. В. и др. Криоконсервация и трансплантация роговицы. — Киев : Наук. думка, 1986, — 152 с.
12. Bianco C., Patrick R., Nissenzweig V. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. I. Separation and characterization // I. Exp. Med. — 1970. — 132, N 4. — P. 702—704.
13. George M., Vanghan I. N. In vitro cell migrations as a model for delayed hypersensitivity // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1962. — III, N 2. — P. 514—521.
14. Jondal M., Holm G., Wigzell H. Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells // J. Exp. Med. — 1972. — 136, N 1. — P. 207—215.
15. Kerman R. H., Smith R., Stepani S. S., Ezdinli E. Z. Active T-rosette-forming cells in the peripheral blood of cancer patients // Cancer Res. — 1976. — 36, N 9. (Pt. 1). — P. 3274—3278.
16. Maneini G., Carbonara A. O., Heremans J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion // Int. J. Immunochem. — 1965. — N 2. — P. 235—254.

Военно-мед. академия
им. С. М. Кирова, г. Санкт-Петербург

Поступила 23.08.90

M. M. DRONOV, Yu. I. PIROGOV

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL RESULTS OF THE USE OF CRYOPRESERVED CORNEA IN KERATOPLASTY

S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg

The dependence of parameters of cellular humoral and unspecific immunity in different types of keratoplasty were studied in 115 patients with cornea diseases and injury on the type of grafted material — fresh or cryopreserved was studied. It has been found that the use of cryopreserved cornea was more reasonable in keratoplasty due to corneal dystrophy and posttraumatic leukoma. Cryopreserved and fresh material may be used equally for penetrating keratoplasty due to burn and postinflammatory leukoma.

М. М. ДРОНОВ, Ю. И. ПИРОГОВ

КЛІНІКО-ІМУНОЛОГІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ ВИКОРИСТАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ РОГІВКИ ПРИ КЕРАТОПЛАСТИЦІ

Військово-медична академія ім. С. М. Кірова,
м. Санкт-Петербург

Вивчалася залежність показників клітинного гуморального і неспецифічного імунітету при різних видах кератопластики у 115 хворих із захворюваннями і травмами рогівки від виду використовуваного трансплантаційного матеріалу — свіжого і кріоконсервованого. Встановлено, що використання кріоконсервованої рогівки найдоцільніше при кератопластиках з приводу дистрофії рогівки і посттравматичних білм. Кріоконсервованій і свіжий матеріал може бути з однаковим успіхом застосований при наскрізних кератопластиках з приводу післяопікових і постзапальовальних білм.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 541.64

Л. А. Ханина, Л. П. Бредихина, В. В. Чеканова, Л. А. Черникова, В. М. Гучок

ОПТИМИЗАЦИЯ КАЧЕСТВА КРИОПРОТЕКТОРА ПЭО-1500

Одним из перспективных направлений в решении проблемы криоконсервирования эритроцитов остается создание криоконсервантов, не требующих удаления из размороженных клеточных взвесей перед переливанием больному. Применение таких методов позволило бы существенно упростить и удешевить технологию получения гемопрепаратов. Поиск криопротекторов для этих методов ведется среди водорастворимых полимерных соединений: поливинилпирролидона, оксиэтилированного крахмала и др. В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР ведутся исследования по созданию консерванта на основе криопротектора полиэтиленоксида молекулярной массы 1500 (ПЭО-1500). Отметим кстати, что лечебного препарата ПЭО-1500 для внут-

ривенного введения не существует ни в СССР, ни за рубежом. Лекарственные формы, выпускаемые в качестве основы для геморроидальных свечей, мазей, косметических средств (ФС 42 1885-82, Фармакопея США, Франции, Японии) не пригодны для парентерального введения. В этих препаратах при тепловой стерилизации и длительном хранении снижается pH , отмечены различия молекулярно-массового распределения в образцах, накопление продуктов самоокисления, в первую очередь перекисных соединений. При использовании различных серий ПЭО-1500 в качестве криопротектора наблюдается значительный разброс основных показателей, характеризующих сохранность клеток [1].

С целью практического применения криопротектора для эритроцитов ПЭО-1500 необходимо прежде всего создать стабильную форму вещества.

В отделе криопротекторов ИПКиК АН УССР разработана технология получения препарата, пригодного для парентерального введения.

Сырьем для получения препарата ПЭО-1500 для внутривенного введения служит технический продукт, выпускаемый НПО «Оргсинтез» (Казань) в виде 30 %-го водного раствора под товарным знаком ПЭГ-35, который используется на химфармзаводе «Красная Звезда» (Харьков) при изготовлении лечебных препаратов для наружного применения.

Переработка сырья включает стадии доведения pH до заданных значений с помощью двууглекислого натрия, отгонки воды в вакууме и осветления препарата. Полученный таким образом продукт направляется для производства готовых лекарственных форм.

Данная технология имеет ряд существенных недостатков: вследствие неустойчивости водных растворов олигомера, при хранении сырья — водного раствора ПЭГ-35, происходит его разложение, сопровождающееся изменением физико-химических свойств раствора, накоплением продуктов автоокисления [2]. Наиболее чувствительным показателем в этом отношении является изменение pH образцов. Применение же двууглекислого натрия для нейтрализации закисленных образцов ПЭО-1500 с последующим подогревом раствора на стадии удаления воды ведет к образованию дополнительного количества побочных продуктов, значение которых для качества препарата трудно определить. Длительный нагрев раствора препарата при повышенной температуре часто является источником появления цветности препарата.

Таким образом, препарат ПЭО-1500, полученный по существующей технологии не удовлетворяет требованиям на препарат, предназначенный для применения в качестве криозащитной среды.

Разработанный нами метод очистки ПЭО-1500 не допускает химических превращений продукта, исключает условия разложения, окисления продукта. Полученный продукт представляет собой твердое вещество белого цвета, не содержащее окисляющих и восстанавливающих примесей. Исследование фракционного состава образцов препарата показало, что в составе полученного олигомера не содержится низкомолекулярных гомологов с молекулярной массой ниже 400 основное содержание — около 50 % представлено фракцией олигомеров с молекулярной массой 1300—1600, олигомеры с молекулярной массой выше 1750 составляют не более 7—10 %.

Представление о более высоком качестве ПЭО-1500, очищенного по разработанной нами технологии, дает сравнение показателей токсичности заводских и лабораторных образцов, а также биодоступности лекарственных средств, субстанциями которых они являются.

Токсичность 20 %-х растворов ПЭО-1500 определяли на взрослых беспородных мышцах обоего пола. ДЛ-50 заводских образцов составляла 3,55 (3,2—4,0) г/кг. Токсичность ПЭО-1500, очищенного в лабораторных условиях, падает до 7,1 (6,3—7,9) кг/г. Таким образом, очистка ПЭО-1500 по разработанному нами методу снижает его токсичность в 1,7—2,0 раза.

Скорость высвобождения лекарственного вещества из лечебного препарата определяет показатель биодоступности, которая также является важной характеристикой чистоты субстанции. Показано, что диализ лекарственных веществ, основой которых являются лабораторные образцы олигомера, происходил со скоростью, значительно превосходящей скорость диализа лечебных препаратов, приготовленных на образцах завода «Красная звезда». Так, высвобождение анестезина из свечей «Анестезол» за 3,5

Основные физико-химические показатели и общая токсичность полученного ПЭО-1500 до и после двухлетнего хранения ($n = 5$)

	Описание	Цветность и прозрачность	Удельная плотность	pH	Вязкость 5 % раствора при 25 °C	Температура при затвердевании, °C	Молекулярная масса	Влажность	Перекиси	Свободная уксусная кислота	Токсичность ДЛ-50, г/кг
До хранения	Белая твердая масса со слабым запахом	Раствор 1,5 г препарата в 30 мл воды, бесцветен	1,0889—1,0909	5,6—7,2	27—32	45,5—47,0	1234—1260	1,2—1,8	Отсутствуют	Отсутствуют	7,1 (6,32—7,9)
После хранения	Без изменений	Без изменений	1,0900—1,0909	6,4—6,8	31—32	45,0—45,5	1290—1300	1,80—1,95	Отсутствуют	Отсутствуют	8,9 (7,9—10)

происходит на 97 % из препарата, приготовленного на олигомере, очищенном разработанным методом, и только на 73,6 % — из аналогичной лекарственной формы на основе образца, полученного заводским способом. Из палочек с димедролом, приготовленных на основе лабораторного образца ПЭО-1500, за 1 ч высвобождается на 15,6 % больше лекарственного вещества, чем из палочек, содержащих заводской образец. Подобное явление наблюдается и при диализе метилурацила из мазей «Левомиколь» при этом из препаратов на основе лабораторного образца ПЭО-1500 высвобождается лекарственного вещества за одно и то же время на 15,3 % больше.

При испытании стабильности препарата методом ускоренного старения (хранение при $60 \pm 0,1$ °C) установлено, что физико-химические показатели и показатели токсичности препарата остаются постоянными в течение 45 сут, что соответствует двум годам хранения при комнатной температуре (табл.)

Таким образом, ПЭО-1500, полученный путем очистки технического продукта крупнотоннажного производства ПЭГ-35, судя по основным физико-химическим свойствам и показателям токсичности, устойчив при хранении и может применяться в составе криоконсерванта для эритроцитов. Количество вводимой парентерально эритроцитарной массы с ПЭО-1500 требует специального исследования и регламентации.

В биологических экспериментах наряду с криопротекторным отмечено осмотическое действие ПЭО-1500, что обосновывает целесообразность применения препарата в клинике при лечении отека мозга и других заболеваний, сопровождающихся гидроионными нарушениями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бредихина Л. П. Функциональная сохранность эритроцитов при низкотемпературном консервировании в растворах полиэтиленоксида. Дисс. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1983. — 188 с.
2. Гурылева А. А., Гейтельбаум Б. Я., Архиреев Р. П., Гусев В. И. Исследование молекулярно-вещного распределения олигомерных полиэтиленгликолей. — ВМС 1975, XVII, №1. — С. 18.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, г. Харьков
Поступило 18.07.91

**ОЦЕНКА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛИЦЕРИНА
В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПЕРТУРБАЦИОННОЙ
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ**

Центральным в современной криобиологии остается вопрос о зависимости сохранности клеток после криоконсервации от количества проникающего в них криопротектора. Необходимость присутствия криопротектора в клетке связана прежде всего с высокой осмотической активностью веществ, способных на коллигативной основе снижать уровень достигаемых при вымораживании воды концентраций внеклеточных солей [6]. Иными словами, присутствие криопротектора в клетке необходимо главным образом для уменьшения осмотического градиента на клеточной мембране, создаваемого самим криопротектором. Нельзя, однако, исключать и возможность защиты криопротектором внутриклеточного содержимого от повышенных концентраций внутриклеточных солей и от внутриклеточного льда.

Мейзуром и Миллером [5] сделана попытка расчета кинетики насыщения эритроцитов человека глицерином с использованием коэффициентов проницаемости, рассчитанных по кинетике гемолиза, связанного с проникновением в клетки глицерина из 1 и 2М бессолевых растворов. Из полученных авторами данных следует, что время, необходимое для достижения внутриклеточной концентрацией глицерина 90%-го уровня исходной внеклеточной для 2М глицерина, составляет при 20 °С — 0,6 мин, а при 0 °С — 1,2 мин. Из этих же данных можно заключить, что через одну минуту в 1 М глицерине и через две минуты в 2М глицерине вне- и внутриклеточная концентрации при 20 °С практически уравниваются.

Принимая, однако, во внимание наши данные о существенной задержке гемолиза эритроцитов в бессолевых растворах глицерина при концентрациях выше 2М [2], а также тот факт, что концентрация внеклеточного глицерина при замораживании может возрастать более чем до 60 % (~6М), целесообразно было бы определить менее косвенным, чем осмотический гемолиз, методом концентрацию внутриклеточного глицерина в эритроцитах человека, помещенных в растворы криопротектора повышенных концентраций.

Для решения поставленной задачи нами использовались принципы пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии [1]. Как известно, добавление в раствор белков таких веществ, как глицерин, этиленгликоль и димексид, считающихся пертурбантами, в концентрациях, не оказывающих влияния на конформацию белка, вызывает сдвиг спектров поглощения (обычно в длинноволновую область) вследствие изменения диэлектрической проницаемости среды вблизи хромофора. С помощью пертурбантов обычно оценивается доступность поглощающих хромофоров растворителю. При условии неизменности конформации белка сдвиг спектров его поглощения пропорционален концентрации пертурбанта в растворе.

Исследования, проведенные на метгемоглобине [4] в области полосы Соре и в УФ-области, не выявили влияния глицерина в концентрациях до 40 % на конформацию белка, что дает основание использовать эти концентрации в наших исследованиях, тем более, что гемоглобин в эритроцитах и гемолизате представлен преимущественно более стабильной формой — оксигемоглобином. В оксигемоглобине (HbO_2) железо находится в восстановленном состоянии, а в восстановленной форме железо гема в гем-содержащих белках мало доступно пертурбантам [7].

В работе использовалась донорская кровь, суспендированная в физиологическом растворе и ее гемолизат. Гемолизат крови получали методом гипотонического шока в дистиллированной воде с последующим отделением стромы центрифугированием в течение 30 мин при 15000 об/мин. Растворы для исследований в концентрациях 10, 15, 20, 30, 40 и 50 % готовили с использованием глицерина марки ХЧ. Концентрация NaCl во всех этих растворах соответствовала изоосмолярной. Смешение крови и гемолизата с растворами глицерина проводилось в кювете спектрофотометра «Pye Unicam SP8000» при 22 °С, как описано ранее [2]. В связи с высоким уровнем светорассеяния суспензии эритроцитов и малыми величинами концентрационного сдвига спектры поглощения гемоглобина в области полосы Соре дифференцировались.

На рисунке (1) приведена зависимость величины смещения максимума 1-й производной ($\Delta\lambda$) спектра поглощения гемоглобина в гемоллизате от концентрации глицерина, из которой видно, что $\Delta\lambda$ пропорциональна концентрации глицерина в растворе. В отличие от обычно наблюдаемого длинноволнового сдвига спектра, здесь, однако, обнаруживался сдвиг в коротковолновую область.

Для того, чтобы убедиться, что полученные данные не являются результатом изменения состояния различных форм гемоглобина, мы произвели расчет их содержания в гемоллизате, содержащем различные концентрации глицерина, пользуясь методом, приведенным в работе [8], по поглощению в области 500—600 нм и установили, что равновесие различных форм гемоглобина при изменении концентрации глицерина не изменяется. Поскольку в эритроцитах, в

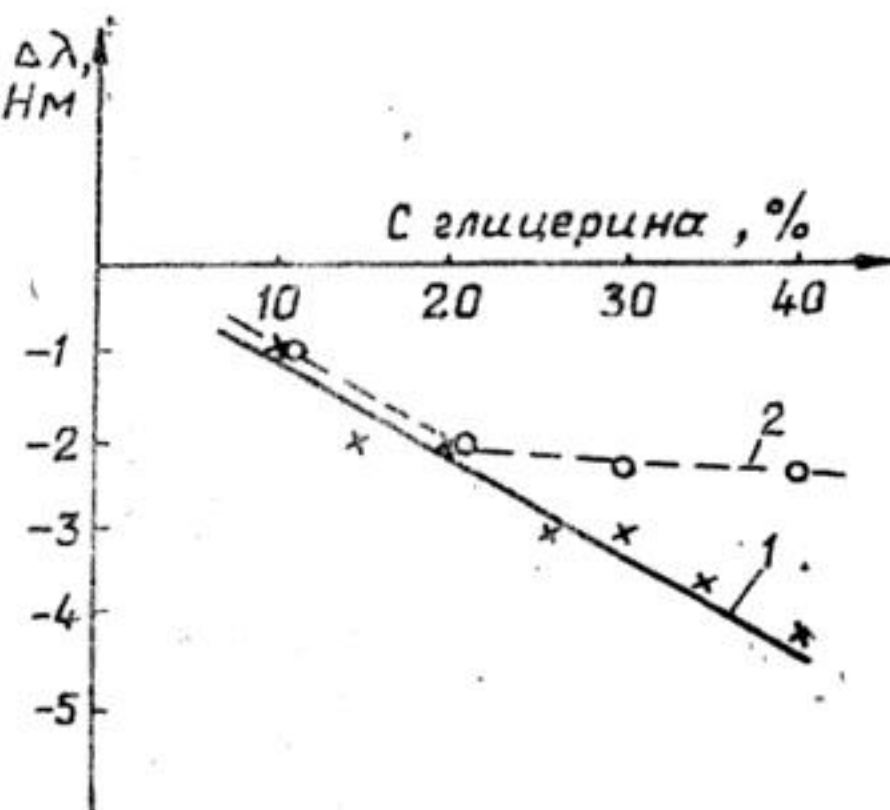
отличие от гемоллизата, заметная часть гемоглобина может находиться в форме дезокси-гемоглобина, были проведены подобные эксперименты с гемоллизатом, в котором часть оксигемоглобина (~ 30 %) с помощью дитионита натрия была переведена в форму дезоксигемоглобина. Результаты на этом гемоллизате были аналогичны предыдущим. По-видимому, коротковолновый сдвиг обусловлен опосредованным действием глицерина на гем через белковую глобулу, которая способна обеспечивать тонкую регуляцию электронной плотности на ионе железа, что в свою очередь сильно сказывается на поглощении в области Соре [3]. Непосредственно гемоглицирин, видимо, недоступен.

Таким образом, есть определенные основания полагать, что проникая в клетку, глицерин будет приводить к сдвигу спектра поглощения внутриклеточного гемоглобина, имеющему ту же связь с концентрацией глицерина, что и гемоллизат.

На рисунке (2) приведена зависимость сдвига максимума спектра поглощения внутриклеточного гемоглобина от внеклеточной концентрации глицерина. Из приведенной зависимости неожиданно следует, что внутриклеточная концентрация глицерина, достигнув уровня 15—20 %, далее не изменяется, несмотря на рост его внеклеточной концентрации.

Для того, чтобы выяснить, не является ли достигнутый уровень концентрации глицерина в клетке простым следствием кинетики поступления глицерина в клетки, запись спектров поглощения проводилась через 0,5, 1, 2, 4, 10 и 40 мин после помещения эритроцитов в растворы глицерина. Полученные результаты приведены в таблице, из которой следует, что для установления постоянной концентрации глицерина в клетках во всех случаях достаточно 10 мин. Более того, небольшой гемолиз, наблюдаемый при помещении эритроцитов в 40 % раствор глицерина, на сдвиге максимума спектров поглощения практически не сказывается.

Полученные данные, если их не удастся объяснить иным образом, чем представленными выше соображениями, могут внести существенные коррективы в анализ криобиологических процессов.



Зависимость сдвига максимума первой производной спектров поглощения НВ от концентрации глицерина в растворе: 1 — гемоллизат, 2 — эритроциты

Время выдержки эритроцитов в растворах глицерина, мин	Концентрация глицерина, %					
	1	10	15	20	30	40
0,5	0	0	0	0	0	0
2,0	0	0	0	1	1	1
4,0	0	1	2	2	2	2
10,0	0	1	2	2	2	2
40,0	0	1	2	2	2	2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коган Г. А. Применение метода дифференциальной спектроскопии для изучения структуры белков // Молекулярная биология. — М. : ВИНТИ, 1973. — Вып. 3. — С. 216—286.
2. Розанов Л. Ф., Розанова Е. Д., Некоз И. А. Кинетика взаимодействия эритроцитов человека с растворами глицерина и 1,2-пропандиола // Криобиология. — 1989. — № 4. — С. 30—34.
3. Степура И. И., Кашко М. Ф. Стабилизация гемоглобина альдегидами в реакциях аутоокисления в метгемоглобин // Биохимия. — 1989. — 54, № 2. — С. 244—249.
4. Herskovits T. T., Greenblatt J. Solvent perturbation studies of heme protein and other colored proteins // Arch. Biochem. Biophys. — 1969. — N 1. — P. 30—38.
5. Mazur P., Miller R. M. Permeability of the human erythrocytes to glycerol in 1 and 2M solutions at 0 or 20 °C // Cryobiology. — 1976. — 13, N 5. — P. 507—522.
6. Meryman H. T., Hornbower M. Changes in Red Cells following rapid freezing with extracellular cryoprotective agents // Cryobiology. — 1972. — 9. — P. 262—267.
7. Schlauder G. G., Kassaner R. J. Comparative solvent perturbation of Horse heart cytochrome C and cytochrome C₂. // J. Biol. Chem. — 1979. — 254, N 10. — P. 4110—4113.
8. Zwart A., Buursma A., van Kampen E. J. A multi-wavelength spectrophotometric method for the simultaneous determination of five haemoglobin derivatives // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. — 1981. — 19. — P. 457—463.

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

Поступило 01.04.91

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИИ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины в 1991 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук Л. Н. Кузьминой «Криочувствительность системы транспорта кальция мембран саркоплазматического ретикулума мышц кролика в процессе развития». Показано, что криочувствительность системы транспорта кальция коррелирует с изменением белкового и липидного состава мембран саркоплазматического ретикулума мышц кролика в процессе постнатального развития, приводятся данные о механизме повышения проницаемости мембран саркоплазматического ретикулума для кальция после быстрого замораживания до -196°C , состоящем в выходе этого иона через каналы, образованные при агрегации молекул Ca^{2+} -зависимой АТФазы. Получена зависимость степени криоповреждения Са-насоса саркоплазматического ретикулума от присутствия криопротекторов и времени хранения препаратов мембран при -20°C . Результаты работы способствуют выбору оптимального состава криозащитных сред и температурных условий при хранении биологических мембран, обладающих ионотранспортирующей функцией.

Диссертационная работа С. П. Мазур «Факторы, регулирующие поглощение и биотрансформацию ксенобиотика р-нитроанизола в свежесыведенных и криоконсервированных гепатоцитах крыс» на соискание ученой степени кандидата биологических наук посвящена изучению влияния криоконсервирования на детоксикационную способность клеток печени, а также исследованию биотрансформации и поглощения ксенобиотика р-нитроанизола изолированными гепатоцитами крыс в зависимости от исходного состояния животного и метода получения клеток. Исследование характера метаболизма ксенобиотика в нативных и деконсервированных гепатоцитах, выяснение причин их различий позволяют выработать ряд рекомендаций по улучшению результатов криоконсервирования суспензии изолированных клеток печени. Обоснована также возможность получения суспензии изолированных гепатоцитов с повышенной детоксикационной активностью в целях их клинического использования.

МЕДИЦИНСКАЯ НАУЧНО-ВНЕДРЕНЧЕСКАЯ ФИРМА «БИОСАН»
РАСПОЛАГАЕТ КОМПЛЕКТОМ СОБСТВЕННЫХ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИХ РАЗРАБОТОК ДЛЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ, КОТОРЫЕ ПОЗВОЛЯЕТ:

- ПРИДАВАТЬ УЖЕ ВЫПУСКАЕМЫМ ПРЕПАРАТАМ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА;
- СУЩЕСТВЕННО СНИЖАТЬ ИХ ПОБОЧНЫЕ ДЕЙСТВИЯ, ВКЛЮЧАЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ;

- ПОТЕНЦИИРОВАТЬ ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ.

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРЕПАРАТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ KNOW—HOW
МЕДИЦИНСКОЙ ФИРМЫ «БИОСАН» ИЗМЕНЯЕТСЯ НЕСУЩЕСТВЕННО И НА СЕБЕСТОИМО-
СТИ ПРОДУКЦИИ ОТРАЖАЕТСЯ НЕЗНАЧИТЕЛЬНО.

МНВФ «БИОСАН» предлагает know-how в технологии производства
лекарств, которое позволит резко снизить алергогенность препаратов,
не снижая положительного эффекта от применения этих препаратов и
не меняя их химическую структуру.

МНВФ «БИОСАН» предлагает know-how в технологии производ-
ства десенсибилизирующих лекарств быстрого действия, чрезвычайно
необходимых для купирования анафилактического шока, отека Квинке
и других острых аллергических состояний.

МНВФ «БИОСАН» предлагает know-how в технологии производства
медикаментов, позволяющее резко снизить указанные фирмой-изготови-
телем отрицательные побочные действия любого препарата.

МНВФ «БИОСАН» предлагает know-how в технологии производ-
ства медикаментов для лечения иммунодефицитных состояний.

ПОМИМО ПРЕДЛОЖЕННЫХ ВЫШЕ РАЗРАБОТОК МЕДИЦИНСКАЯ НАУЧНО-ВНЕДРЕН-
ЧЕСКАЯ ФИРМА «БИОСАН» ГОТОВА СОТРУДНИЧАТЬ В СОЗДАНИИ ИЛИ СОВЕРШЕНСТВО-
ВАНИИ ДРУГИХ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ.

*Н а ш а д р е с: Украина, 310204, г. Харьков, пр. Победы, 66, к. 363, МНВФ «БИОСАН»,
Марута С. Б.*

Ф а к с: (057)-(2)-40-91-13, Терзичн В. Я.

Т е л е ф о н: 057-2-43-86-72, Киятов А. Ю.

Редакция журнала «ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ» принимает к
публикации рекламные объявления о научно-технической продукции в об-
ласти криобиологии и криомедицины.

Цена публикации 1 полосы — 1500 р., 1/2 полосы — 1000 р.

Оплату перечислять г. Харьков 000609226 Ленинское АКБ соотразви-
тия Укрсоцбанка МФО 351339.

Наш адрес: 310015, г. Харьков, ул. Переяславская, 23, Институт проблем
криобиологии и криомедицины АН Украины, редакция журнала «Проб-
лемы криобиологии», телефон для справок 72-10-39.

1 р. 20 к.

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

2 1992

ИНДЕКС 70474

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

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

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

Подписка принимается в агентствах и отделениях "Союзпечати", отделениях связи и общественными распространителями печати.

Our Journal PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY formerly KRIOBIOLOGIYA (CRYOBIOLOGY) is published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences. 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.

ISSN 0233-7673. ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1992. № 2. 1-56.