

# 3

ISSN 0233-7673

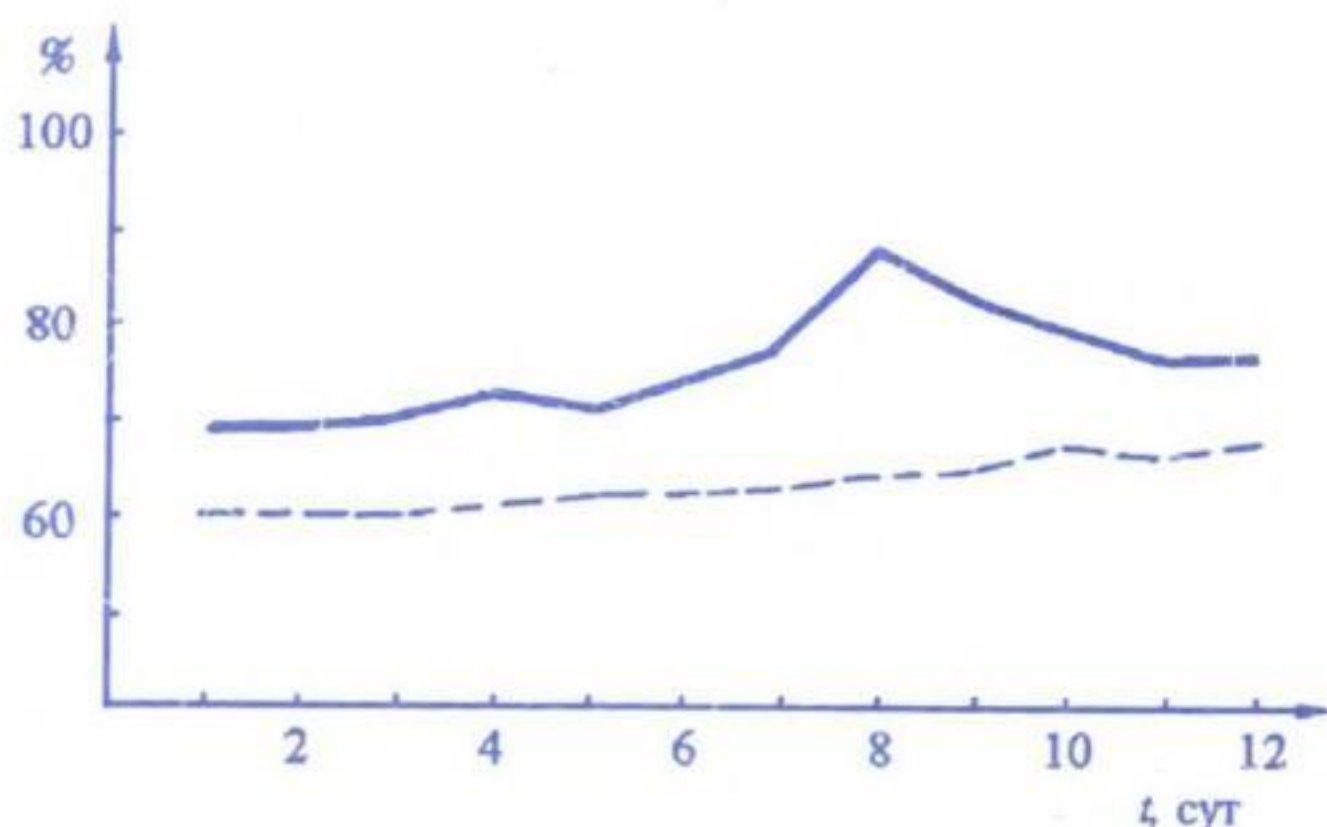
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,  
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ  
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ  
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1993

## ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



СВЕРХБЫСТРЫЕ СКОРОСТИ ОХЛАЖДЕНИЯ И ВИТРИФИЦИРУЮЩИЕ РАСТВОРЫ В КРИОБИОЛОГИИ *В.И.Грищенко, Ю.В.Калугин, Н.А.Лучко*

ОБРАТИМАЯ КРИОАКТИВАЦИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЛКОВОЙ ПОРЫ КАК ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ КРИОРАЗОБЩЕНИЯ И РЕПАРАЦИИ СИСТЕМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ *В.В.Лемешко, Н.Г.Миронова*

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ОРГАНОВ ЗОЛОТИСТЫХ ХОМЯЧКОВ И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ВОДНОМУ ОХЛАЖДЕНИЮ В РАЗЛИЧНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА *С.А.Забелинский, Е.Л.Поляков, М.А.Чеботарева*

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ВИРУС ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА *И.Ю.Дранов, Ш.У.Янгулов, А.Н.Терентьев, С.Р.Саямов*

Главный редактор **В.И.Грищенко**

## **РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

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

## **РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ**

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

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

## **EDITORIAL BOARD**

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

## **EDITORIAL COUNCIL**

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

# 3

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,  
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ  
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ  
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ  
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1993

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

## СОДЕРЖАНИЕ

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А.* Сверхбыстрые скорости охлаждения и витрифицирующие растворы в криобиологии . . . . . 3
- Лемешко В.В., Миронова Н.Г.* Обратимая криоактивация неспецифической белковой поры как один из возможных механизмов криоразобщения и репарации системы окислительного фосфорилирования митохондрий . . . . . 14
- Жегунов Г.Ф.* Особенности адаптации сердца зимоспящих животных . . . . . 21
- Забелинский С.А., Поляков Е.Л., Чеботарева М.А.* Липидный состав органов золотистых хомячков и их устойчивость к водному охлаждению в различные сезоны года . . . . . 33
- Зинченко А.В., Мусатова И.Б.* Электрические явления в водных растворах низкомолекулярных полиэтиленгликолей при охлаждении-нагреве . . . . . 40
- Чередниченко В.М., Бездетко П.А., Барсуков В.В., Губина-Вакулик Г.И., Самосудова Л.В.* Морфологические изменения тканей глаза кролика при трансконъюнктивально-склеральной циклокриопексии . . . . . 44

### КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Дранов И.Ю., Янгулов Ш.У., Терентьев А.Н., Саямов С.Р.* Криоконсервация клеток, продуцирующих вирус иммунодефицита человека . . . . . 49

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Карпенко Л.Г., Чуйко В.А.* Активность аденилатциклазы в мембранах клеток адренокортикальной ткани при замораживании с димексидом и 1,2-пропандиолом . . . . . 54
- Пересецкая Н.М.* Ультрабыстрое замораживание *Saccharomycetes vini* под защитой 1,2-пропандиола . . . . . 56

### ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

This One



44BY-S5S-K003

## CONTENTS

### THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

|                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Grishchenko V.I., Kalugin Yu.V., Luchko N.A.</i> Ultrarapid cooling and vitrification solutions in cryobiology                                                                                              | 3  |
| <i>Lemeshko V.V., Mironova N.G.</i> The reversible cryoactivation of unspecific protein pore as a possible mechanism of cryocoupling and reparation of the system of oxidative phosphorylation in mitochondria | 14 |
| <i>Zhegunov G.F.</i> Adaptation peculiarities of the heart of hibernators                                                                                                                                      | 21 |
| <i>Zabelinsky S.A., Polyakov E.L., Chebotareva M.A.</i> The organ lipid composition of golden hamsters and their resistance to water cooling in different seasons                                              | 33 |
| <i>Zinchenko A.V., Musatova I.B.</i> Electric phenomena in aqueous solutions of low molecular polyethylene glycols upon freezing-rewarming                                                                     | 40 |
| <i>Cherednichenko V.M., Bezdetko P.A., Barsukov V.V., Gubina-Vakultsk G.I., Samosudova L.V.</i> Morphological changes in rabbit eye tissues during transconjunctival-scleral cyclocryopexia                    | 44 |

### CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Dranov I.Yu., Yangulov Sh.U., Terentyev A.N., Sayamov S.R.</i> Cryopreservation of human immunodeficiency virus producers brief communications | 49 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### BRIEF COMMUNICATIONS

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Karpenko L.G., Churyko V.A.</i> The activity of adenylate cyclase in membranes of adrenocortical cells frozen with dimethylsulfoxide and 1,2-propanediol | 54 |
| <i>Peresetskaya N.M.</i> Ultrarapid freezing of <i>Saccharomyces vini</i> under protection of 1,2-propanediol                                               | 56 |

### DEFENSE OF THESES

Адрес редакции:  
310015 Харьков, 15,  
ул. Переяславская, 23,  
тел. (0572) 72-10-39

Научный редактор *А.М.Белоус*  
Редактор *З.В.Линевич*  
Компьютерный набор и верстка: *И.А.Жутченко, З.В.Линевич, Л.В.Смык*

Подп. в печ. 27.07.93. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.  
Тираж 500 экз. Цена 50 крб. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

---

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК [532.782+536.421.4]:57.043

**В.И.Грищенко, Ю.В.Калугин, Н.А.Лучко**

### **СВЕРХБЫСТРЫЕ СКОРОСТИ ОХЛАЖДЕНИЯ И ВИТРИФИЦИРУЮЩИЕ РАСТВОРЫ В КРИОБИОЛОГИИ**

В работе представлены литературные данные об использовании сверхбыстрого охлаждения и витрифицирующих растворов в криобиологии. Акцентируется внимание на техническом решении проблемы реализации сверхбыстрых скоростей снижения температуры биологических образцов с целью как криофиксации, так и криоконсервации, а также проанализированы особенности механизма их криозащиты в связи с развитием процесса вне- и внутриклеточной кристаллизации. Эти же аспекты криозащиты биоструктур рассмотрены в контексте применения витрифицирующих растворов, освещения вопросов их витрификации и девитрификации, что позволило оценить роль скоростей охлаждения и химических факторов в реализации криозащиты.

Применение сверхбыстрых скоростей охлаждения биологических объектов обусловлено, прежде всего, возможностью развития витрификации, которую можно рассматривать как общее свойство всех жидкостей при условии достаточно быстрого снижения температуры и небольших размеров образца [29]. Трудности, возникающие при витрификации биологических суспензий, не говоря уже о плотных тканях, можно оценить, приняв во внимание, что чистая вода переходит в аморфное состояние, минуя кристаллическую фазу, при скоростях охлаждения  $10^{10}$  °C/мин [14], в то время как для биологических образцов, содержащих значительное количество воды, скорость охлаждения должна быть  $5 \cdot 10^3$  °C/с [28].

Попытки криоконсервировать биологические суспензии были предприняты в 1937 г. Льюйе, который вызывал очень быстрое замораживание тонких пленок крови барана в металлических петлях или на металлической решетке путем погружения их в жидкий воздух. После оттаивания пленок крови при погружении их в изотоническую среду сохранялось 2/3 клеток. Аналогичные результаты были получены при быстром погружении покровных стекол с мазками крови в жидкий азот. Пытаясь увеличить скорость охлаждения, Льюйе и Гехенио покровные стекла заменили алюминиевой пластиной, что позволило снизить гемолиз до 8% при скорости охлаждения 130 °C/с. Стремление приблизить принцип витрификации применительно к практическим целям привело к попыткам охлаждать эритроциты путем разбрызгивания их в виде капелек в жидком азоте. Суммируя свои наблюдения над попытками витрифицировать эритроциты, эти авторы пришли к выводу о том, что развить этот процесс удастся не во всех случаях применения больших скоростей охлаждения. Электронно-микроскопические исследования замороженных образцов позволили зафиксировать в ряде случаев, наряду с аморфизацией, наличие в них дендритов, сферулитов. Сферулиты присутствовали в самых удачных вариантах витрификации образцов [19].

Впервые применив сверхбыстрое охлаждение для этой цели, в 1948 г. И.В.Смирнову удалось добиться полной морфофункциональной сохран-

ности спермиев кролика в объеме 0.02–0.05 мл при охлаждении их со скоростью, как полагает автор, 5000 °С/мин, не прибегая к криопротекторам, что позволило сохранить от 10 до 30% жизнеспособных клеток после отогрева. От спермы животных разного вида, криоконсервированной таким образом, было получено нормальное потомство [2]. Однако, ввиду низкой выживаемости спермиев и технических сложностей, такой способ не смог найти практического применения.

Витрификация считается идеальным состоянием льда для морфологических исследований биологических образцов с помощью электронной микроскопии и для их криосохранения, поскольку образование внутриклеточных кристаллов ассоциируется с необратимыми изменениями в ультраструктуре клеток. В силу этого исключительно важно минимизировать либо полностью исключить развитие процесса кристаллизации. Поскольку при сверхбыстром охлаждении чаще всего избежать образования внутриклеточной кристаллизации не удастся, то при изготовлении образцов для электронной микроскопии стремятся к их малой величине по сравнению со структурными элементами клетки [17].

Одним из побудительных мотивов применения сверхвысоких скоростей охлаждения биологических образцов для электронной микроскопии является желание избежать применение криопротектора при криофиксации, поскольку они вносят артефакты за счет расслоения их растворов, что приводит к неправильной интерпретации результатов.

Изучая возможность криофиксации образцов для электронной микроскопии, установили, что охлаждение желатиновых кубиков объемом 0.01–4.0 мм<sup>3</sup>, путем их погружения в хладагент, должно составлять 300–2800 °С/с, а сверхтонких образцов альбумина, расположенных между слоями коллодия в виде сэндвича – 10<sup>5</sup> °С/с. Даже при этой скорости охлаждения в образцах наблюдались кристаллы льда в виде сферулитов.

Для этих же целей было сконструировано специальное устройство с использованием медного диска диаметром 5 мм и толщиной 0.1 мм, на поверхность которого инжестировали 0.25–1.0 мл жидких образцов, после чего его погружали во фреон-12, фреон-22, либо в жидкий азот с температурой ниже точки температуры его кипения, что позволило развить максимальную скорость его охлаждения – 1400 °С/с, в то время как оба фреона дали 2/3 этой величины. Во всех случаях эти скорости далеки от тех, которые необходимы для развития витрификации. Следует отметить, что при погружении диска в обычный жидкий азот или фреон наблюдалось пленочное кипение на его поверхности, способствующее образованию ядер кристаллизации даже в таком микрообъеме биологической жидкости [15].

Для электронной микроскопии сверхбыстрое охлаждение небольших объемов биологической суспензии осуществляют путем ее инжестирования в охлажденный жидким азотом медный цилиндр, заполненный очищенным пропаном, который служит криосредой. Суспензия клеток объемом 0.2 мл диспергируется в криосреду с помощью сжатого воздуха, инжеструемого при давлении 0.5–1.0 атм, через сопло диаметром 0.1 мм, расположенное на расстоянии 5–10 см от ее поверхности. Модификация этого метода заключается в распылении суспензии клеток на охлажденный жидким азотом металлический блок до образования на

го поверхности тонкого слоя замороженных частиц, погружаемых затем в жидкий азот для хранения. Полагают, что для развития витрификации казанным способом в суспензию клеток можно добавлять не более 5% лицерина [5].

Охлаждение биологических образцов для электронно-микроскопических исследований осуществляется с использованием металлического зеркала при погружении его с биологическими образцами в жидкий азот или гелий. Расчеты показали, что наиболее высокие скорости их сверхбыстрого охлаждения порядка сотен градусов в секунду получены при изготовлении зеркала из чистой меди, либо серебра, однако, витрификация чистой воды с помощью этого метода не развивается при толщине ее слоя более 100 мкм. Покрытие металлического зеркала золотом позволяло достичь максимального охлаждения образцов печени крыс объемом 1.0 мм<sup>3</sup>. Однако, при электронной дифракции рентгеновских лучей замороженных криосрезов печени было отмечено, что, наряду с аморфизацией, в объемных образцах встречались кристаллы льда кубической и гексагональной форм, формирование которых объясняется термоизоляционными свойствами биологической ткани. Аморфная зона составляла 5–7 мм, кубическая – 20–25 мм, за которой следовал гексагональный лед [18].

В последние годы наиболее глубокое теоретическое обоснование и широкое практическое применение получает сверхбыстрое охлаждение, достигаемое за счет погружения биологических образцов в хладагенты: жидкий этан (93 К), пропан (88 К) и фреон-22, в исследованиях по охлаждению 20% раствора желатины и крови рыбы, инъецированных между медными пластинками толщиной слоя соответственно 415 и 350 мкм с вмонтированной в образцы термопарой, позволяющей регистрировать режим падения температуры в пределах 50000 К/с. Установили, что если образцы погружали на глубину 430 мм со скоростью 1.9 м/с, то скорость охлаждения составляла 1538 К/с. Если же при достижении глубины 40 мм их движение прекращалось, то скорость падала до 1097 К/с, а при остановке на глубине 20 мм она составляла 1051 К/с. Этан, по сравнению с другими хладагентами, позволял развить самые высокие скорости охлаждения биологических образцов и способствовал образованию наиболее мелких кристаллов льда при наименьшей скорости погружения. Менее эффективен был пропан, скорость охлаждения в котором более медленная, а фреон-22 создавал самые низкие скорости охлаждения, что способствовало образованию наиболее крупных кристаллов льда [26].

Эти экспериментальные данные подтвердили теоретически обоснованную концепцию минимальной глубины погружения биологических образцов при охлаждении указанным способом [7].

На основании подобного рода исследований были также осмыслены теоретические аспекты образования кристаллов льда в зависимости от скорости погружения биологических объектов в различные хладоносители и скоррелированы размеры кристаллов льда в замороженных образцах с диапазоном скоростей [12].

Поскольку ручное погружение образца в жидкий хладагент недостаточно эффективно, была осуществлена оптимизация метода погружения путем создания пружинного устройства, позволяющего развить скорость в пределах 2.30; 3.45; 4.30 и 6.35 мкм/с. При этом скорость охлаждения изменялась линейно входной скорости при значении 6.35 м/с, и скорость

погружения образца на глубину 30 мм составляла 21000 К/с. Считают, что скорость охлаждения биологического образца, заключенного в металлическую фольгу, при его погружении на глубину 20–30 мм с входной скоростью 2.0 м/с будет адекватна  $1 \cdot 10^4$  К/с, что вызовет его аморфизацию, либо образование очень мелких, неповреждающих биоструктуры кристаллов льда. В среднем же при этом методе охлаждения скорость находится в пределах 10000 К/с [25].

Отмечено, что методы быстрого погружения обеспечивают скорость охлаждения того же порядка, что и струйный способ, при котором в качестве хладагента используют исключительно пропан [23].

Преимущества форсированной конвенции хладагента при сверхбыстром охлаждении объектов также, как и предпочтение, отдаваемое в этих случаях пропану, были подтверждены в серии экспериментов по изучению влияния скоростей охлаждения образцов ткани почек крыс толщиной 0,25–0.5 мм на развитие процесса внутриклеточной кристаллизации. Они включали погружение образцов ткани с различной скоростью и на разную глубину в перемешиваемые и неперемешиваемые изопентан, фреон-12, фреон-22 при температуре – 155 °С, пропан – при – 185 °С, жидкий азот. Образцы замораживали в среде жидкого азота и гелия, а также в охлажденном блоке, используя для этой цели поверхности ртути и меди при температуре жидкого азота. Средние значения скоростей охлаждения представлены в таблице.

Наибольшую скорость охлаждения достигали в пропане, а затем она изменялась в убывающей последовательности: фреон-22, фреон-12, изопентан, жидкий азот. Скорость охлаждения тканей в струе жидкого азота была в 6 раз выше, чем в этом же, но неперемешиваемом хладагенте. Перемешиваемая жидкость, так же как и струйное охлаждение, во всех случаях давала более высокую скорость снижения температуры образца по сравнению с перемешиваемым хладагентом. Это связано с тем, что как при перемешивании охлажденной жидкости, так и в струе создаются условия, позволяющие свести до минимума негативные последствия пленочного кипения в случае использования сильно кипящих хладагентов, а

Скорость охлаждения биообъектов в зависимости от вида хладагента и способа его применения [27]

| Метод                        | Скорость, °С/с |
|------------------------------|----------------|
| Жидкий азот неперемешиваемый | 101            |
| Жидкий азот перемешиваемый   | 128            |
| В струе жидкого азота        | 618            |
| В струе жидкого гелия        | 1306           |
| Изопентан неперемешиваемый   | 1534           |
| Изопентан перемешиваемый     | 1661           |
| Фреон-12 неперемешиваемый    | 2321           |
| Фреон-12 перемешиваемый      | 2503           |
| Фреон-22 неперемешиваемый    | 2427           |
| Фреон-22 перемешиваемый      | 2621           |
| Пропан неперемешиваемый      | 3858           |
| Пропан перемешиваемый        | 4116           |
| Поверхность ртути            | 5495           |
| Поверхность меди             | 9150           |

также увеличить отвод тепла от замораживаемого образца за счет быстрой замены охлаждаемых слоев на более холодные при использовании низкокипящих хладагентов. Обращает на себя внимание более высокая скорость охлаждения ткани в среде жидкого азота по сравнению с гелием, что связано с более низкой его теплоемкостью. Электронно-микроскопические исследования замороженных образцов позволили отметить улучшение морфологической сохранности по мере повышения скорости охлаждения в диапазоне от 101 до 4116 °C/с. Клетки ткани почки при ее охлаждении со скоростью 1161 °C/с содержат крупные кристаллы льда, внутренняя структура клеток утрачена. При скорости охлаждения 2503 °C/с они содержат очень небольшие кристаллы льда и структура клеток близка к норме. В перемещиваемом жидком пропане при скорости охлаждения 4116 °C/с клетки содержали лед тончайшей структуры, что минимально отражается на их ультраструктуре. Дальнейшее увеличение скоростей охлаждения, достигаемое на поверхности металлов, охлажденных до температуры жидкого азота, не приводило к уменьшению размеров кристаллов льда и общего его количества в клетках по сравнению с их охлаждением в жидком пропане, однако увеличивала на 50% глубину залегания клеток с минимальными по размеру кристаллами льда. Практически отсутствие разницы в морфологии кристаллов внутриклеточного льда и в ультраструктуре клеток при увеличении их скорости охлаждения от 4116 до 9150 °C/с связывают с низкой теплопроводностью ткани, которая становится ограничительным фактором теплопереноса при этих скоростях охлаждения [27].

В серии работ по быстрому погружению биоматериала, либо его аналогов в хладагент было подтверждено сформировавшееся мнение о том, что форсированная конвенция является более эффективным видом охлаждения методом погружения, а непрерывный режим этого процесса, по сравнению с его приостановкой на различной глубине, позволяет достичь более высокой скорости охлаждения [6]. Сверхбыстрое охлаждение путем быстрого погружения в хладагент явилось первой успешной попыткой подавления пленочного кипения на поверхности теплого образца при его контакте с пропаном, что способствовало увеличению скорости снижения температуры в нем.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины проведен большой цикл исследований (1985–1993) по изучению действия сверхвысоких скоростей охлаждения на репродуктивные клетки (В.И.Грищенко, Ю.В.Калугин, Н.А.Лучко), что было развито в последующем применительно к другим видам биообъектов. Изучены общие закономерности влияния сверхбыстрых скоростей замораживания, достигнутых путем охлаждения в жидком азоте дюралевых блоков, позволивших достичь 17000 °C/мин, медных блоков с теплоизолирующими прокладками из фторопласта, при толщине которого 300, 200, 100 и 0 мкм развивалась скорость соответственно 1000, 2800, 8400 и 83000 °C/мин, и твердых хладоносителей, дававших 3000 и 9000 °C/мин, на сохранность некоторых видов биообъектов.

При замораживании гепатоцитов минимум их повреждения, оцененного по скорости эндогенного дыхания и коэффициенту стимулирования дыхания сукцинатом, наблюдался при охлаждении со скоростью 8400 °C/мин, уменьшение или увеличение которой приводило к росту

числа погибших клеток. Применение криопротектора повышало сохранность гепатоцитов за исключением случаев, когда их замораживали с максимальной скоростью.

Охлаждение кожи и амниотических оболочек с большими скоростями позволило отметить, что возможен подбор условий криоконсервации, при которых показатель жизнеспособности деконсервированных тканей оставался близким к показателям, характерным для нативных образцов [1].

Наибольшее число работ, посвященных изучению влияния сверхбыстрых режимов охлаждения и отогрева, выполнено на эритроцитах, дрожжах и некоторых видах бактерий. В частности, 85% *S. cerevisiae* удалось сохранить жизнеспособными после их суспендирования в дистиллированной воде и быстрого погружения в виде тонких пленок на проволочных петлях в охлажденный до  $-160^{\circ}\text{C}$  изопентан [16]. При охлаждении дрожжей этого же вида выживаемость резко падала, если скорость замораживания увеличивали до  $10^3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  [21]. Вместе с тем, при капельном методе охлаждения в жидком азоте *E. coli* и *Staphylococcus aureus* выживаемость была 100% [10].

С целью криоконсервации суспензий эритроцитов и дрожжей предложено устройство для сверхбыстрого непрерывного охлаждения больших количеств суспензий клеток, замораживаемых в виде тонких, толщиной 15–30 мкм сегментов. Это достигается инжектированием биологической суспензии под давлением на поверхность медного диска, имеющего эллиптическую форму в поперечном сечении, покрытого алюминием или серебром, помещенного в криостат, охлаждаемый жидким гелием, вращаемый со скоростью 1500 об/мин. Высокая скорость охлаждения достигается с помощью центробежного усилия, которое увеличивает контакт охлажденного металла с охлажденным образцом. Замороженная в виде ленты суспензия сбрасывается с поверхности диска в осаждающую емкость, откуда ее переносили для хранения в жидкий азот. На формирование ленты толщиной 30 мкм не оказывал влияния вид покрытия диска. При образовании 15 мкм слоя ленты более высокая скорость ее охлаждения отмечалась при алюминиевом покрытии диска и составляла  $1.3 \cdot 10^4 \text{K}/\text{с}$ .

Наивысшей, хотя и весьма невысокой выживаемостью ( $70 \pm 5\%$ ), обладали дрожжи, размороженные в теплой воде, наименьшей — эритроциты ( $7 \pm 3\%$ ). Аналогичные результаты были получены при толщине слоя 10–20 мкм и скорости вращения диска 3000 об/мин [4].

Попытка разработать способ сверхбыстрого замораживания суспензии клеток, который можно было бы использовать в практических целях, убедила в чрезвычайной сложности решаемой проблемы.

Более успешной была криоконсервация 9 видов микроорганизмов при их охлаждении со скоростью  $10^5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Это достигалось быстрым погружением миллипоровых фильтров с осажденными на них микроорганизмами в жидкий азот. Последующий их быстрый отогрев в 15 М растворе  $\text{KNO}_3$  позволил добиться 100% выживаемости клеток лишь в том случае, если они до замораживания суспендировались в комплексных суспензионных средах, а не в дистиллированной воде. Причем, при сверхбыстром охлаждении в жидком азоте *S. cerevisiae*, *Z. casai* и *Z. mesenteroides*, как показали электронно-микроскопические исследования, в клетках

присутствовали мелкие кристаллы льда, что не отразилось негативно на выживаемости клеток. При той же скорости охлаждения *S. aureus*, *E. coli* и *S. marcescens* были уменьшены в размере, в них не развивалась внутриклеточная кристаллизация, что связано, по-видимому, с большей проницаемостью их мембран для воды. Для криосохранения грамм отрицательных бактерий необходимо было их суспендировать в среде, содержащей криопротектор [3].

Таким образом, достижение витрифицированного состояния биологических образцов за счет применения лишь сверхбыстрого охлаждения если и возможно, то в случае лишь малого их размера и трудно достижимых скоростей его замораживания, что мало пригодно для практических целей. Поэтому возникло альтернативное решение проблемы витрификации путем применения витрифицирующих сред, насыщение которыми биообъектов как в виде суспензий, так и плотных тканей и охлаждаемых с реалистичной скоростью, позволило реализовать ее преимущества перед традиционными способами замораживания в практической криобиологии. Если чистая вода может быть витрифицирована при охлаждении со скоростью не менее  $10^6$  °C/мин, то для достижения такого же состояния 35%-го раствора 1,2-пропандиола достаточно ее снизить до 300 °C/мин. Высокими витрифицирующими свойствами обладает смесь 1,2-пропандиола и 1,3-бутандиола при скорости ее охлаждения 1500 °C/мин [22]. Полагают, что он перспективен как при криоконсервации биообъектов, так и при витрификации, несмотря на то, что диапазон витрифицирующего действия ограничен лишь эритроцитами, в отношении которых он обладает низкой токсичностью, хотя и более высокой, чем 1,2-пропандиол. Наиболее выраженными витрифицирующими свойствами обладает 1,2-пропандиол, за которым в убывающей последовательности располагаются 1,3- и 1,2,3-бутандиол, в наименьшей мере указанные свойства относятся к глицерину [8].

Проведенный анализ состава применяемых витрифицирующих растворов показал, что моноалкоголи, по сравнению с полиалкоголями, не перспективны в целях витрификации. Менее эффективны в этом отношении симметричные молекулы 1,4- и 2,3-бутандиола и эритрола, образующие гидраты по сравнению с дисимметричными молекулами 1,2-, 1,3- и 1,2,3-бутандиола, способствующие витрификации. Развитие этого процесса более свойственно растворам тех соединений, у которых среднее количество алкогольных функций, при соотношении атомов углерода с группами -ОН, для всех атомов углерода примерно равно от 1/2 до 2/3 [9].

Существенным моментом криоконсервации биообъектов с помощью витрифицирующих растворов является необходимость, во избежание образования кристаллической структуры, прибегать к критической скорости как охлаждения, так и нагрева, причем абсолютное значение последнего обычно более высокое, чем первого. При отогреве витрифицированных эмбрионов мышей и эритроцитов человека со скоростью меньше критической, образуется сначала внутриклеточный кубический лед, находящийся в метастабильном состоянии, безвредный для биоструктур, при более высокой температуре трансформирующийся в гексагональный, с появлением которого связывают их криоповреждение. В связи с этим существенно то обстоятельство, что 1,2-бутандиол с его двумя липофильными цепочками способствует образованию

кубического льда, и так же как 1,4-бутандиол, стабилизирует его структуру [24].

Применение витрифицирующих растворов снизило остроту проблемы реализации необходимых скоростей охлаждения и нагрева для развития витрификации и девитрификации, но выдвинуло на первый план вопросы токсичности и осмолярности криоконсервантов. Их высокий осмотический потенциал, необходимый для реализации криозащитных механизмов, связанный с дегидратацией биоструктур в силу осмотического градиента между вне- и внутриклеточной средой, а также с экстремальным повышением вязкости во время охлаждения, в то же время служит причиной их повреждения во время процедур добавления и удаления раствора. Токсичность и осмотический эффект витрифицирующих растворов зависят как от вида включаемых в его состав криопротекторов, так и от их концентрации. Полагают, что для подавления токсичности высоких концентраций ДМСО его необходимо сочетать с ацетамидом [13]. Другим путем снижения токсичности криопротекторов, входящих в состав витрифицирующего раствора, является применение их смесей, что позволяет так скомбинировать его состав, что он будет обладать минимальной общей концентрацией ( $C_v$ ), необходимой для витрификации и девитрификации. Отклонение от оптимума осмотического давления среды замораживания как в сторону уменьшения, так и повышения негативно влияет на результат замораживания [30].

Идеальным раствором для витрификации является тот, который можно назвать нетоксичным, способствующим аморфизации среды и не образующим любой кристаллической фазы, в том числе, и кубического льда, безвредного для биоструктур при нагреве. Однако сочетание этих свойств практически нереально и разработка конкретных способов витрификации состоит из ряда компромиссов, заключающихся в допущении образования при охлаждении небольшого количества очень мелких кристаллов льда и формирования кубических кристаллов при отогреве за счет предельно допустимого снижения концентрации криопротекторов в витрифицирующем растворе, что достижимо лишь при использовании сверхбыстрого охлаждения замораживаемых образцов. Тем более, что наличие в них кристаллов льда является характерной особенностью любых используемых в криобиологии способов витрификации [20]. Поэтому, один из путей их оптимизации должен быть сведен к поиску возможностей снижения количества образовавшегося внутриклеточного льда при охлаждении, другой – к поиску оптимального режима размораживания.

В сообщениях о способах криоконсервации с применением сверхвысоких скоростей охлаждения очень мало информации о режимах размораживания, несмотря на то, что они играют исключительную роль в сохранении биологических объектов. По существу, проблема криосохранения данного вида криобиологического объекта связана с поиском оптимальных скоростей охлаждения и нагрева. При сверхбыстром охлаждении биообъектов отогрев является критическим фактором, определяющим результат криофиксации либо криоконсервации, поскольку при скорости охлаждения, достаточной для витрификации биологических сред, присутствие этих кристаллоидов, даже не видимых при электронной микроскопии, является характерным. При сильном переохлаждении

ждения и неспособности достичь более крупных размеров прежде, чем раствор достигнет равновесия, имеют большую площадь поверхности на единицу объема, а, следовательно, обладают тенденцией к кристаллизации при нагреве либо при хранении при температуре выше температуры витрификации. Однако образовавшиеся кристаллы будут безвредными, если нагрев будет достаточно быстрым, способным предотвратить изменения их форм и размера до расплавления. В связи с этим, сохранение высокой выживаемости биообъектов, охлажденных со сверхвысокой скоростью, сопряжено с поиском возможности настолько быстро осуществить нагрев, чтобы предотвратить кристаллизацию до их расплавления, поскольку лед кристаллизуется более легко при нагреве, чем при охлаждении [11]. Хорошо известно, что полная дегидратация эмбрионов млекопитающих, предупреждающая развитие внутриклеточной кристаллизации, достигается их охлаждением со скоростью 0.3 °C/мин до -60+ -70 °C. Если же эти клетки охлаждать с указанной скоростью до -30 + -40 °C, что наиболее часто практикуется, то при последующем быстром охлаждении развивается внутриклеточная кристаллизация, не представляющая опасности для жизнеспособности эмбрионов при условии их быстрого размораживания.

Таким образом, образование внутриклеточного льда не обязательно является вредным. Если кристаллы небольшие и имеют форму, совпадающую с внутриклеточной архитектурой клетки, то, несмотря на большую их поверхностную энергию, являющуюся механизмом запуска процесса рекристаллизации при быстром отогреве, они расплавляются с переходом в жидкую фазу. Если скорость нагрева недостаточна для девитрификации, то, как было показано дифракцией рентгеновских лучей, вначале образуется метастабильный кубический лед, безвредный для биоструктур, который трансформируется в обычный гексагональный лед, приводящий их гибели. Технические сложности реализации сверхбыстрых скоростей охлаждения делают нереалистичными стремления разработать способы криоконсервации биообъектов лишь на этой основе, а нежелательное сочетание высокого осмотического давления витрифицирующих растворов с низкой температурой, так же как постоянное, но не всегда выполнимое стремление к их нетоксичности диктуют необходимость поиска новых путей достижения цели. Наиболее перспективным из них, как показали наши исследования, является сочетание действия криоконсерванта, содержащего низкие концентрации компонентов, с достижимыми скоростями сверхбыстрого охлаждения, что допускает образование внутриклеточного льда, не повреждающего биоструктуры как при охлаждении, так и при нагреве. Разработанные на этом принципе способы криоконсервации репродуктивных клеток являются высокоэффективными и простыми в реализации, в силу чего они нашли широкое применение в криомедицине.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гальченко С.Е. Особенности криоконсервирования биологических объектов с использованием больших скоростей охлаждения // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1990. – 15 с.
2. Смирнов И.В. Сохранение спермы сельскохозяйственных животных посредством глубокого охлаждения // Советская зоотехнология. – 1949. – N 4. – С. 93–98.
3. Albrecht, R.M., Orndorff, C.R., McKenzie, A.P. Survival of certain microorganisms subjected to rapid and very rapid freezing on membrane filters // Cryobiology. – 1973. – 10, N 3. – P. 233–239.

4. *Aurich, F., Peterson, B.* Cooling rate measurement and continuous rapid freezing of cell suspensions by a cryospinning wheel method // *Cryo-Lett.* – 1983. – 6, N 6. – P. 35–42.
5. *Bachmann, B., Schmidt, W.* Improved cryofixation applicable to freeze-etching // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1971. – 68, N 9. – P. 2149–2152.
6. *Bald, W.B.* The relative efficiency of cryogenic fluids used in the rapid quench cooling of biological samples // *J. Microsc.* – 1984. – 134, part 2. – P. 261–270.
7. *Bald, W.B.* The relative merits of different cooling methods // *J. Microsc.* – 1985. – 140, part 1. – P. 17–40.
8. *Boutron, P.* Non-equilibrium formation of ice in aqueous solutions for vitrification // *The Biophysics of Organ Cryopreservation.* – New York, London: Plenum Press, 1987. – P. 201–236.
9. *Boutron, P., Menhi, P., Kautman, A., Angibaud, P.* Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohol with four carbons // *Cryobiology.* – 1986. – 28, N 5. – P. 453–469.
10. *Doebbler, G.F., Rinfret, A.P.* Survival of microorganisms after ultrarapid freezing and thawing // *J. Bacteriol.* – 1963. – 85, N 5. – P. 485–490.
11. *Dowell, L.G., Rinfert, A.P.* Low temperature forms of ice as studied by X-ray diffraction // *Nature.* – 1960, N 188, N 1378 – P. 1144–1149.
12. *Elder, H.Y., Gray, C.C., Jardine, A.G., Chapman, J.N.* Optimum conditions for cryoquenching of small tissue blocks in liquid cooling // *J. Microsc.* – 1982. – 126, part 1. – P. 45–61.
13. *Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., Meryman, H.T.* Vitrification as an approach to cryopreservation // *Cryobiology.* – 1984. – 21, N 4. – P. 407–426.
14. *Fletcher, W.H.* Structural aspects of the ice-water system // *Rep. Prof. Phys.* – 1971. – 34, N 6. – P. 913–993.
15. *Glover, A.J., Garith, L.S.* The freezing rate of freeze-etch specimens for electron microscopy // *Cryobiology.* – 1974. – 11, N 3. – P. 248–254.
16. *Goetz, A., Goetz, S.* Death by vitrification in yeast cells // *Biodynamics.* – 1938. – 2, N 1. – P. 1–8.
17. *Korber, C., English, S., Rau, G.* Intracellular ice formation: cryomicroscopical observation and calorimetric measurement // *J. Microsc.* – 1990. – 161, part 2. – P. 313–325.
18. *Livesey, A., Del Campo, A.A., Dowall, A.W.C., Stasny, J.T.* Cryofixation and ultralow-temperature freeze-drying as a preparative technique for TEM // *J. Microsc.* – 1991. – 16, part 2. – P. 205–215.
19. *Luyet, B., Rapatz, A.* Basic research on red cells // *Cryobiology.* – 1971. – 6, N 5. – P. 425–482.
20. *MacFarlane, D.R., Forsyth, M.* Devitrification and recrystallization of glass-forming aqueous solutions // *The Biophysics of Organ Cryopreservation* / Ed. by D.E. Pegg, A.M. Karow. – New York, London: Plenum Press, 1987. – P. 237–263.
21. *Mazur, P., Schmidt, J.J.* Interactions of cooling velocity, temperature and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeasts // *Cryobiology.* – 1968. – 5, N 1. – P. 1–17.
22. *Mehl, P., Boutron, P.* Ternary system with 65% (w/w) water, 1,2-propanediol and 1,2-butanediol glass-forming tendency and stability of the amorphous state // *Cryo-Lett.* – 1987. – 8, N 2. – P. 64–73.
23. *Pseheid, P., Schudt, C., Plattner, N.* Cryofixation of monolayer cell cultures for freeze-fracturing without chemical pre-treatments // *J. Microsc.* – 1981. – 121, part 1. – P. 149–167.
24. *Rall, W.F., Reid, D.S., Farrant, J.* Innocuous biological freezing during warming // *Nature (London)* – 1980. – 286, N 4383 – P. 511–516.
25. *Robards, A.W., Crosby, P.* Optimization of plunge freezing: linear relationship between cooling rate and entry velocity into liquid program // *Cryo-Lett.* – 1983. – 4, N 1. – P. 23–32.
26. *Ryan, W.B., Bald, P., Neumann, K. et al.* Cooling rate and ice-crystal measurement in biological specimens plunged into liquid ethane, propane, and Freon 22 // *J. Microsc.* – 1990. – 158, part 3. – P. 365–378.
27. *Schwabe, K.G., Terracio, Z.* Ultrastructural and thermocouple evaluation of rapid freezing technique // *Cryobiology.* – 1980. – 17, N 6. – P. 571–584.
28. *Stephenson, J.L.* Fundamental physical problems in the freezing and drying of biological materials // *Recent Researches in Freezing Materials.* – Oxford: Blackwell. – 1960. – P. 121–124.
29. *Stephenson, J.L.* Ice crystal growth during the rapid freezing of tissues // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* – 1956. – 2, N 1. – P. 45.
30. *Zangis, R., Steponkus, P.Z.* The toxicity of vitrification as determined by their osmotic potentials // *Proc. Cryogenic Soc. of American Symposium Plant Cold Hardiness.* – New York, Binghamton, 1990. – P. 320.

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

Поступила 13.03.93

**В.І.ГРИЩЕНКО, Ю.В.КАЛУГІН, Н.А.ЛУЧКО**

**ПОНАДШВИДКІСНЕ ОХОЛОДЖЕННЯ І ВІТРИФІКУЮЧІ РОЗЧИНИ У КРІОБІОЛОГІЇ**

**Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, Харків**

У роботі наводяться дані про використання понадшвидкісного охолодження і вітрифікуючих розчинів у кріобіології. Акцентована увага на технічному вирішенні проблеми реалізації понадшвидкісного зниження температури біологічних зразків з метою як кріофіксації, так і кріоконсервації, а також проаналізовані особливості механізму їх кріозахисту у зв'язку з розвитком процесу поза- і внутріклітинної кристалізації. Ці ж аспекти кріозахисту біоструктур розглянуті в контексті застосування вітрифікуючих розчинів, висвітлення питань їх вітрифікації і девітрифікації, що дозволило оцінити роль швидкостей охолодження і хімічних факторів у реалізації кріозахисту.

**V.I.GRISHCHENKO, YU.V.KALUGIN, N.A.LUCHKO**

**ULTRARAPID COOLING AND VITRIFICATION SOLUTIONS IN CRYOBIOLOGY**

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

The literature data on the use of ultrarapid cooling and vitrification solutions in cryobiology are reviewed. The attention is drawn to the technical solution of the problem of ultrarapid lowering the temperature in biological samples for the purpose of both cryofixation and cryopreservation. Peculiarities of the cryoprotective mechanism are discussed in detail as regards to the development of intra- and extracellular crystallization. To elucidate the role of cooling rates and chemical factors, the same aspects of cryoprotection of biological systems have been analyzed in experiments using vitrification solutions with respect to their vitrification and devitrification.

## ОБРАТИМАЯ КРИОАКТИВАЦИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЛКОВОЙ ПОРЫ КАК ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ КРИОРАЗБОЩЕНИЯ И РЕПАРАЦИИ СИСТЕМЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ

Исследовали влияние замораживания–оттаивания на  $K^+$ -проницаемость мембран, уровень восстановленности пиридиннуклеотидов и дыхание митохондрий печени крыс. Наблюдали увеличение дыхания митохондрий в состоянии 4 по Чаусу и снижение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов. В процессе шестиминутной инкубации при 30 °C замороженно–оттаянных митохондрий отмечено повышение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов, которое предшествовало уменьшению дыхания в состоянии 4 и увеличению дыхательного контроля. Предполагается, что одной из причин криоразобщения окислительного фосфорилирования и последующей репарации может быть обратимая криоактивация неспецифической белковой поры внутренней мембраны.

Наиболее ярким проявлением повреждающего действия замораживания–оттаивания на митохондрии является разобщение окислительного фосфорилирования, которое обусловлено повышением проницаемости внутренней мембраны для протонов и других ионов [1, 2]. Нарушение барьерной функции внутренней мембраны митохондрий при замораживании–оттаивании объясняют воздействием на нее различных физико-химических факторов, в том числе, собственно пониженной температуры, гиперконцентрированных растворов солей, изменением pH и механическим повреждением кристаллами льда [1]. С другой стороны, известно, что повышение концентрации солей фосфата и  $Ca^{2+}$ , снижение pH среды инкубации, добавление продуктов фосфолипазного гидролиза и перекисного окисления липидов вызывают увеличение проницаемости внутренней мембраны митохондрий для одно- и двухвалентных катионов, хотя нарушение барьерных свойств мембран при понижении температуры связывают, в основном, с фазовым разделением липидов и образованием трансмембранных дефектов в липидном бислое [4].

Мы предполагаем [3], что в случае сопрягающей мембраны митохондрий увеличение ионной проницаемости при действии низких температур может быть в значительной мере обусловлено и активацией неспецифической белковой поры. Известно, что проницаемость этой поры зависит от ряда метаболических факторов, в т. ч. от АДФ,  $Ca^{2+}$ , гидроперекисей липидов, уровня восстановленности пиридиннуклеотидов и др. [6, 7]. Начальная стадия открывания поры характеризуется увеличением проницаемости для ионов  $K^+$  [8].

Целью настоящей работы явилось исследование роли неспецифической белковой поры в механизме увеличения  $K^+$ -проницаемости внутренней мембраны после замораживания–оттаивания митохондрий.

В опытах использовали крыс (самцов) линии Вистар в возрасте 1, 3, 12 и 24 мес. Митохондрии из 4 г печени выделяли методом дифференциального центрифугирования. Среда выделения содержала 300 мМ сахарозу, 1,0 мМ трилон Б, 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4. Промывку митохондрий проводили средой выделения, не содержащей трилона Б. Осадок промытых митохондрий суспендировали в 0,4 мл среды промывания.

Образцы для замораживания готовили следующим образом. К 250 мкл суспензии митохондрий добавляли 90 мкл среды промывания (контроль) или среды промывания, содержащей различные добавки таким образом, что конечная концентрация их в суспензии митохондрий составляла либо 250 мкМ АДФ, либо 5 мМ  $Mg^{2+}$ , либо 100 мкМ ЭГТА, а также некоторые комбинации этих компонентов. Затем суспензию митохондрий тщательно перемешивали и делили на три равных части. Одну часть использовали в качестве незамороженного контроля, а две других замораживали до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , путем погружения ампул в жидкий азот. Оттаивание проводили либо на водяной бане при  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (быстрое), либо при комнатной температуре (медленное).

Концентрацию белка в суспензии митохондрий определяли по методу Лоури и соавт. в модификации Миллера.

Проницаемость внутренней мембраны митохондрий для  $K^{+}$  оценивали по набуханию органелл в изотоническом растворе нитрата калия (0,12 М  $KNO_3$ , 5 мМ *трис*-HCl, pH 7,4), регистрируемой по изменению оптической плотности при длине волны 610 нм в термостатируемой при  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  кювете объемом 1 мл с магнитной мешалкой на фотоэлектрокалориметре КФ 77 с дополнительным логарифмическим усилителем и самопишущим потенциометром. Содержание белка в ячейке 0,5 мг/мл. В отдельных опытах в среду инкубации вносили дополнительно 250 мкМ АДФ, 1 мМ ЭГТА или 5 мМ  $MgSO_4$ .

Дыхание митохондрий печени регистрировали с помощью закрытого платинового электрода Кларка в среде следующего состава: 100 мМ сахара, 75 мМ KCl, 10 мМ  $KH_2PO_4$ , 2 мМ  $MgSO_4$ , 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4, 5 мМ глутамат и 5 мМ малат. Белок митохондрий в ячейке 1,0–1,5 мг/мл.

Интенсивность синей флуоресценции, как отражение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов, измеряли при 450 нм и возбуждении 330–360 нм в среде того же состава, что и для полярографических измерений. Содержание белка в кювете флуориметра 1,0–1,5 мг/мл. Конечная концентрация FCCP – 2,7 мкМ. Чувствительность флуориметра стандартизовали хининсульфатом 0,1 мкг в 1 мл 0,1  $H_2SO_4$ . Уровень восстановленности пиридиннуклеотидов, за который принимали интенсивность флуоресценции, чувствительной к FCCP, выражали в относительных единицах. Все измерения проводили при  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

В изотоническом растворе  $KNO_3$  интактные митохондрии практически не набухают из-за низкой проницаемости внутренней мембраны для ионов  $K^{+}$  (рис. 1). Поэтому изменение скорости набухания в этой среде под действием различных факторов обычно рассматривается как отражение изменения  $K^{+}$ -проницаемости [5]. Замораживание–оттаивание вызывает увеличение скорости набухания митохондрий как в случае быстрого, так и в случае медленного оттаивания (рис. 1, кривая 2, рис. 2, кривая 4) по сравнению с интактными митохондриями. Кроме того, после низкотемпературного воздействия митохондрии характеризуются меньшей величиной оптической плотности уже в начальный момент времени после внесения их в изотоническую среду – соответственно на 8 и 30% по сравнению с контролем после быстрого и медленного оттаивания. Этот факт свидетельствует о набухании органелл еще в процессе замораживания–оттаивания.

Как видно из данных, приведенных на рис. 1 (кривые 3 и 4), добавление АДФ к суспензии митохондрий при замораживании-оттаивании и (или) в среду инкубации приводило к существенному уменьшению скорости набухания. Сходный результат наблюдали при использовании

ЭГТА (рис.1, кривые 5 и 6). Наличие магния при замораживании-оттаивании и (или) в инкубационной среде уменьшало набухание митохондрий (рис.2). Наиболее выраженный эффект наблюдался при совместном использовании  $Mg^{2+}$  и АДФ, даже в случае медленного оттаивания.

После замораживания митохондрий с ЭГТА и АДФ и быстрого оттаивания скорость начального набухания в среде  $KNO_3$  была меньше, чем в контроле (замораживание без ЭГТА и АДФ), тогда как после медленного оттаивания — наоборот, значительно больше соответствующего кон-

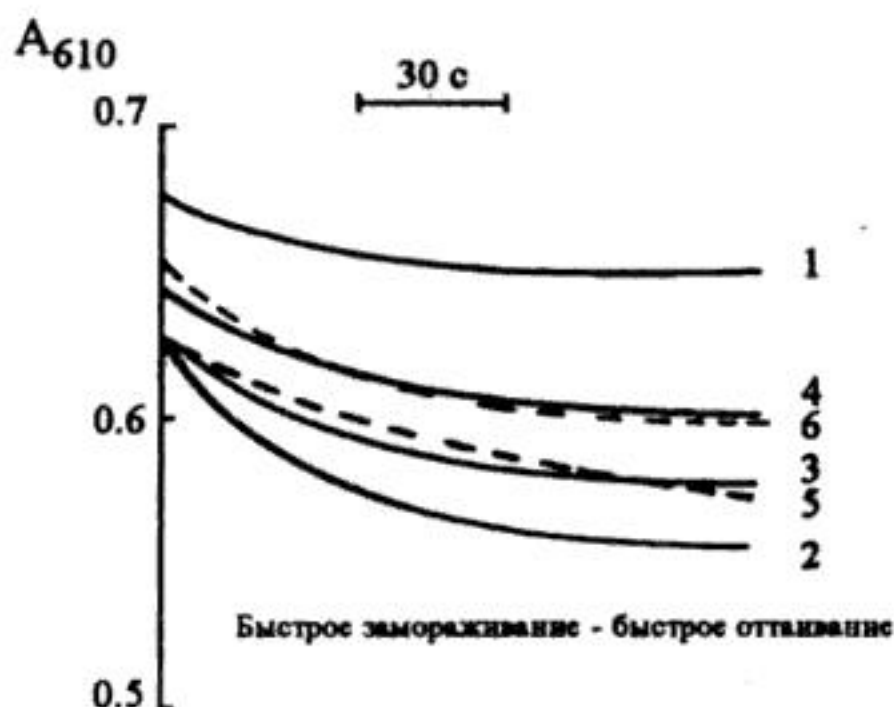


Рис.1. Влияние АДФ (3, 4) и ЭГТА (5, 6) на набухание в изотоническом растворе нитрата калия митохондрий печени крыс после замораживания-оттаивания с АДФ (4), с ЭГТА (6) и без добавок (2, 3, 5), 1 - контроль

троля (рис. 3). Как известно, значительную роль в регуляции  $K^+$ -проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени крыс играют ионы  $Mg^{2+}$  и поэтому полученные данные (рис. 3, кривая 5) можно трактовать как результат проникновения (захвата) ЭГТА в матрикс в процессе медленного оттаивания и связывания эндогенного  $Mg^{2+}$ . Косвенным подтверждением такого предположения может быть тот факт, что измеряемая в среде без экзогенного  $Mg$  ДНФ-стимулируемая АТФазная активность митохондрий, замороженных со 100 мкМ ЭГТА и 250 мкМ АДФ была на 40% (при быстром оттаивании) и на 70% (при медленном оттаивании) ниже по сравнению с митохондриями, подвергнутыми замораживанию без АДФ и ЭГТА. Как известно, истинным субстратом для  $H^3$ -АТФазы является комплекс  $Mg^{2+}$ -АТФ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что инкубация в изотонической  $K^+$ -содержащей среде митохондрий, подвергнутых низкотемпературному воздействию, характеризуется повышенной скоростью набухания, которая существенно зависит от режима оттаивания. ЭГТА,  $Mg$  и, особенно АДФ, значительно



Рис.2. Влияние  $Mg^{2+}$  (6, 7) и АДФ (7) на набухание в изотоническом растворе нитрата калия митохондрий печени крыс после замораживания-оттаивания с  $Mg^{2+}$  (3, 6, 7) и без  $Mg^{2+}$  (2, 4), 1 - контроль

снижают эту скорость, обусловленную увеличением  $K^+$ -проницаемости внутренней мембраны.

Весьма вероятно, что увеличение  $K^+$ -проницаемости связано с активацией  $Ca$ -зависимой поры [6, 7]. Имеющиеся в литературе данные указывают на причастность АДФ/АТФ антипортера к формированию этого типа проводимости [8, 9]. Согласно [8], обратимое открывание поры вызывается увеличением концентрации  $Ca^{2+}$  в матриксе митохондрий, приводящим, в свою очередь, к активации образования пирофосфата. Пирофосфат и фосфат обладают сродством к адениннуклеотидтранслоказе и в условиях истощения митохондриальных адениннуклеотидов успешно конкурируют с ними за места связывания на переносчике, переводя его в состояние  $K^+$ -канала. Стабилизация АДФ/АТФ антипортера в "м" конформации бонгтрековой кислотой или АДФ, так же как и добавление хелаторов ионов  $Ca^{2+}$  – ЭГТА обеспечивает восстановление исходной низкой проницаемости внутренней мембраны [7].

Сопоставляя полученные нами результаты с имеющимися в литературе данными о гормонально-метаболической регуляции ионной проницаемости внутренней мембраны митохондрий [7, 8], можно предположить, что одним из наиболее криочувствительных участков в структуре митохондрий является адениннуклеотидтранслоказа из-за ее свойства переходить в состояние  $K^+$ -канала, или даже неспецифической поры, в определенных условиях. В соответствии с этим криоактивация такой поры (канала) замораживанием–оттаиванием может быть, наряду с



Рис. 3. Влияние АДФ + ЭГТА на набухание в изотоническом растворе нитрата калия митохондрий печени крыс после замораживания–оттаивания с АДФ + ЭГТА (4, 5) и без добавки (2, 3), 1 - контроль

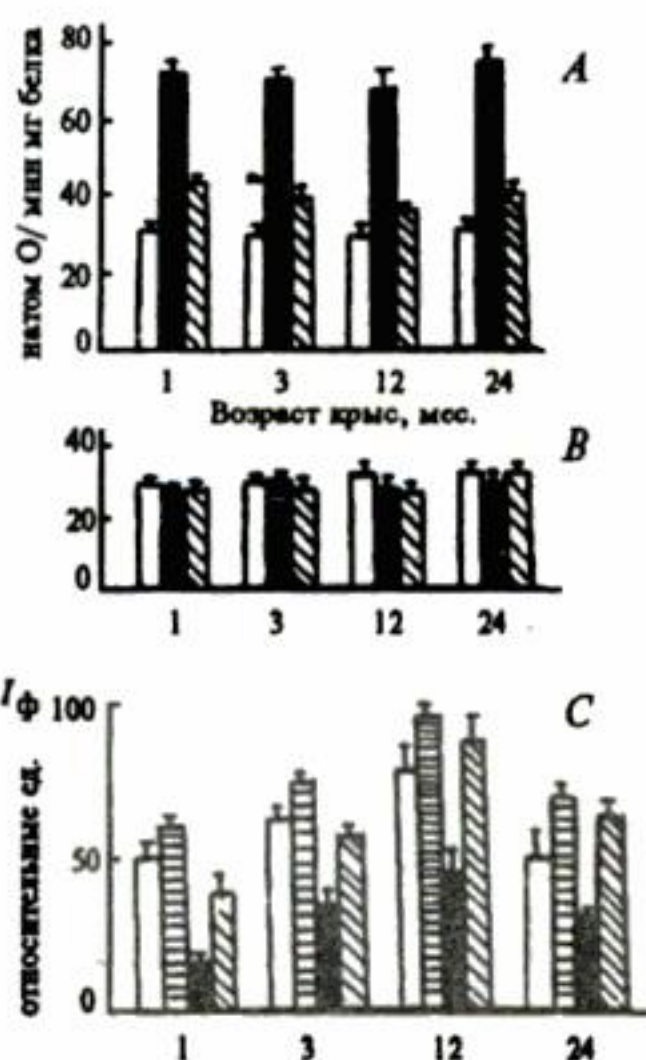


Рис. 4. Дыхательная активность в состоянии 4 (глутамат + малат) митохондрий печени крыс после замораживания–оттаивания на 1-й (■) и 6-й (▨) минутах инкубации в полярографической ячейке в среде с фосфатом неорганическим (А) и в среде без фосфата неорганического ( $\Phi_n$ ) с добавлением олигомицина и АДФ (В) и интенсивность флуоресценции пиридиннуклеотидов митохондрий печени крыс (С) после замораживания–оттаивания на 1-й минуте инкубации в среде с  $\Phi_n$  (■) и в среде без  $\Phi_n$  с добавлением олигомицина и АДФ (▨). Контроль в среде с  $\Phi_n$  (□) и в среде без фосфата с добавлением олигомицина и АДФ (▤)

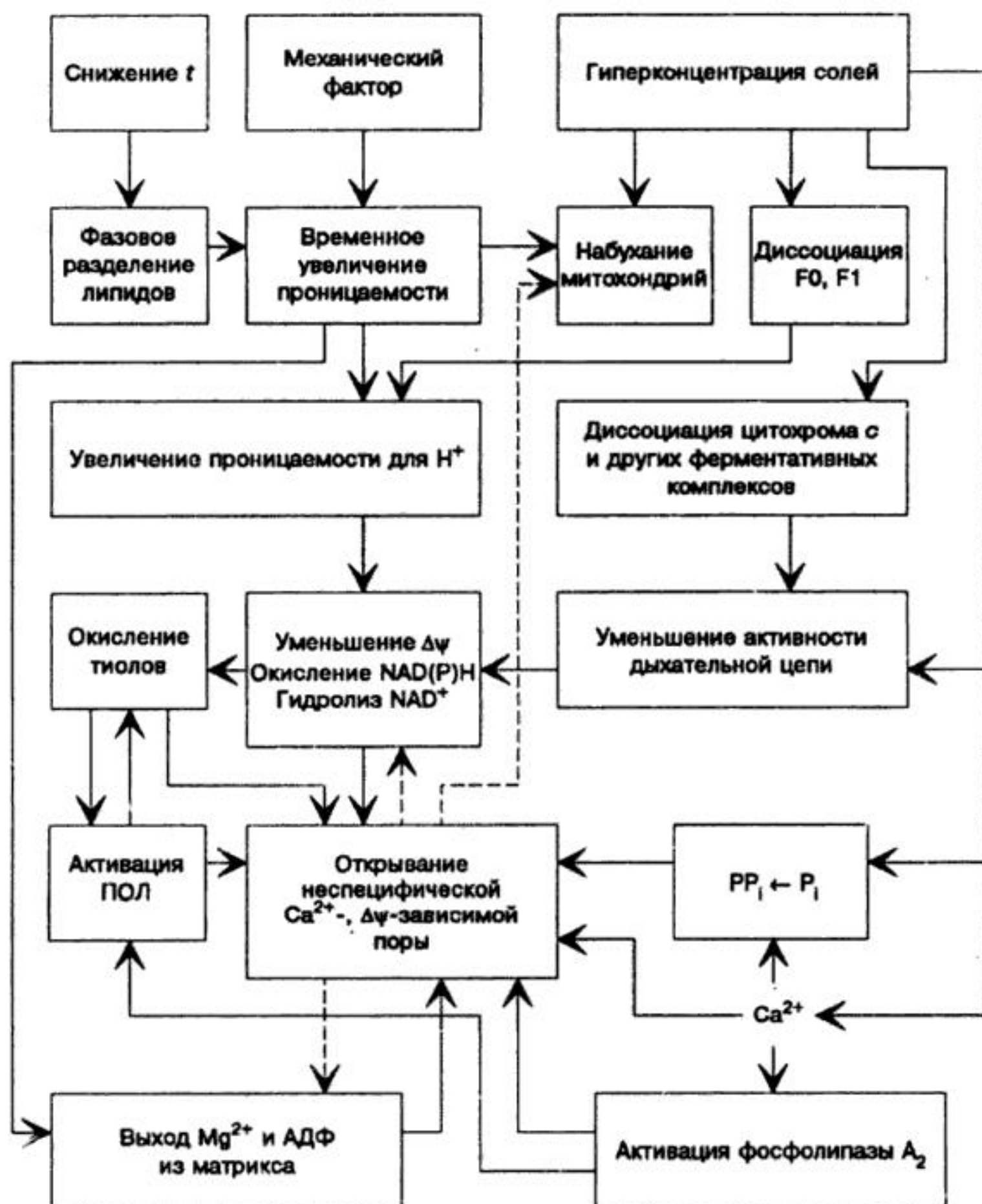


Рис. 5. Гипотетическая схема криоактивации неспецифической белковой поры внутренней мембраны митохондрий

другими факторами, причиной криоразобщения окислительного фосфорилирования. Согласно рис. 4А, после замораживания–оттаивания митохондрий наблюдалось значительное увеличение дыхания в состоянии 4 на первой минуте инкубации в полярографической ячейке. Инкубация в течение 5 мин приводила к замедлению дыхания в этом состоянии. Если предположить, что высокая скорость дыхания в состоянии 4 на первой минуте инкубации обусловлена криоактивацией неспецифической белковой поры, то исключение неорганического фосфата, включение олигомицина и АДФ должно, как известно, способствовать закрыванию этой поры. Действительно, согласно рис. 4В, такой состав инкубационной среды обеспечивает снижение скорости дыхания в состоянии 4 до уровня незамороженного контроля.

Хорошо известно, что окисление НАДН и гидролиз НАД<sup>+</sup> в матриксе является одним из необходимых условий активации неспецифической белковой поры внутренней мембраны митохондрий [6]. С другой стороны, замораживание–оттаивание сопровождается резким снижением уровня восстановленности пиридиннуклеотидов. Поэтому

представляло интерес исследование интенсивности синей флуоресценции как отражение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов до и после замораживания–оттаивания митохондрий и в зависимости от указанного изменения состава среды инкубации. Как видно из данных, приведенных на рис. 4С, замораживание–оттаивание митохондрий печени крыс разного возраста приводит к резкому уменьшению интенсивности флуоресценции, что согласуется с ранее полученными данными [2, 3]. Причем, как было показано в работе [2] интенсивность флуоресценции значительно повышается в процессе инкубации органелл при комнатной температуре. Подобная закономерность наблюдалась и в наших опытах. Указанное выше изменение состава среды инкубации также приводило к повышению уровня флуоресценции даже незамороженных митохондрий, хотя после замораживания–оттаивания эффект от изменения состава среды был значительно выше. При этом наблюдались возрастные особенности, которые состояли в том, что для митохондрий взрослых и старых крыс интенсивность флуоресценции в среде без неорганического фосфата с добавлением олигомицина и АДФ практически не отличалась после замораживания–оттаивания от незамороженного контроля. Лишь для митохондрий одномесячных крыс интенсивность флуоресценции оставалась значительно ниже контроля. Необходимо отметить, что указанные уровни восстановленности пиридиннуклеотидов достигались уже к концу первой минуты инкубации органелл в ячейке, когда существенно уменьшается и  $K^+$ -проницаемость внутренней мембраны митохондрий. Условия, которые обеспечивают повышение уровня восстановленности митохондриальных пиридиннуклеотидов, окисленных в результате замораживания–оттаивания, предотвращают возможность развития процесса дальнейшего открывания неспецифической поры внутренней мембраны, по-видимому, смещая равновесие этого процесса в сторону закрывания открытой поры. Таким образом, повышение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов после замораживания–оттаивания может служить как отражением, так и причиной репарации митохондрий по механизму закрывания неспецифической криоактивированной поры.

Некоторые факторы, которые могут оказывать влияние на открывание неспецифической  $Ca^{2+}$  и  $\Delta\psi$ -зависимой белковой поры внутренней мембраны митохондрий при замораживании–оттаивании показаны на рис. 5. Среди них: увеличение протонной проводимости внутренней мембраны из-за временного фазового разделения липидов, механических повреждений, гиперконцентрирования солей и диссоциации факторов  $F_0$ ,  $F_1$   $H^+$ -АТФазы, гиперконцентрирование  $Ca^{2+}$  в митохондриях, снижение  $\Delta\psi$ , окисление пиридиннуклеотидов, выход  $Mg^{2+}$  и АДФ из матрикса и др. Вместе с тем, роль неспецифической белковой поры в механизмах криоразобщения окислительного фосфорилирования требует более глубокого изучения, а приведенная на рис. 5 схема нуждается в количественной оценке значимости каждого из указанных процессов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства мембран при низких температурах. – Киев: Наук. думка. – 1988. – 208 с.
2. Лемешко В.В. Сохранение функциональной активности митохондрий при глубоком замораживании // Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. – М.: Наука. – 1977. – С. 5–11.

3. Лемешко В.В., Миронова Н.Г., Белостоцкая Л.Н., Удовикова Е.А. Механизмы криповреждения, репарации и криопротекции митохондрий печени крыс // Успехи современной криобиологии: Тез. 2-й Международ. конф. 21-25 апреля 1992. – Харьков. – 1992. – С. 94-95.
4. Петренко А.Ю., Радченко С.В. Изучение кинетики «замыкания» мембран митохондрий после замораживания-отогрева // Моделирование криобиологических процессов. – Киев: Наук. думка. – 1988. – С. 95-104.
5. Brierley G.P. Energy-linked alteration of permeability of heart mitochondria to chloride and other anions // Biochemistry. – 1970. – 9, N 1. – P. 697-707.
6. Crompton M., Costi A., Hayat L. Evidence for the presence of reversible  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria // Biochem. J. – 1987. – 245, N 3. – P. 915-918.
7. Davidson A.M., Halestrap A.P. Liver mitochondrial pyrophosphate contraction is increased by  $\text{Ca}^{2+}$  and regulates the intramitochondrial volume and adenine nucleotides content // Biochem. J. – 1987. – 246, N 3. – P. 715-723.
8. Halestrap A.P., Davidson A.M. Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondrial matrix peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase // Biochem. J. – 1990. – 268, N 1. – P. 153-160.
9. Panov A., Filippova S., Lyakhovich V. Adenine nucleotide translocase as a site of regulation by ADP of the rat liver mitochondria permeability to  $\text{H}^{+}$  and  $\text{K}^{+}$  ions // Arch. Biochem. Bio phys. – 1980. – 1999, N 2. – P.420-426

Харьковский гос. ун-т

Поступила 04.06.92

В.В.ЛЕМЕШКО, Н.Г.МИРОНОВА

# ОБОРОТНА КРІОАКТИВАЦІЯ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ БІЛКОВОЇ ПОРИ ЯК ОДИН З МОЖЛИВИХ МЕХАНІЗМІВ КРІОРОЗ'ЄДНАННЯ ТА РЕПАРАЦІЇ СИСТЕМИ ОКИСЛЮВАНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ МІТОХОНДРІЙ

Харківський державний університет

Досліджували вплив заморожування-відтаювання на проникність мембран для  $\text{K}^{+}$ , рівень відновленості піридиннуклеотидів та дихання мітохондрій печінки щурів. Спостерігали збільшення дихання мітохондрій у стану 4 по Чансу та зниження рівня відновленості піридиннуклеотидів. У процесі шестихвилинної інкубації при 30 °C заморожено-відталіх мітохондрій визначено збільшення рівня відновленості піридиннуклеотидів, яке попереджувало зниження дихання у стану 4 та збільшення дихального контролю. Можливо, що однією з причин кріороз'єднання окислюваного фосфорилювання та наступної репарації є оборотна кріоактивація неспецифічної білкової пори внутрішньої мембрани.

V.V.LEMESHKO, N.G.MIRONOVA

# THE REVERSIBLE CRYOACTIVATION OF UNSPECIFIC PROTEIN PORE AS A POSSIBLE MECHANISM OF CRYOUNCOUPLING AND REPARATION OF THE SYSTEM OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN MITOCHONDRIA

State University of Kharkov

The effect of freeze-thawing on the membrane permeability for  $\text{K}^{+}$  was studied as well as the reduction of pyridine nucleotides and respiration of rat liver mitochondria. An increase in mitochondrial state 4 respiration by Chance and a decrease in reduction of pyridine nucleotides were observed. An increase in reduction of pyridine nucleotides followed by a decrease in state 4 respiration and increase in respiratory control was noted during 6 min incubation of frozen-thawed mitochondria at 30 °C. It can be suggested that the reversible cryoactivation of unspecific protein pore in the inner membrane may be a cause of cryouncoupling of oxidative phosphorylation and further reparation.

## ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИИ СЕРДЦА ЗИМОСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ

Проведено комплексное исследование миокарда зимоспящих животных на физиологическом, биохимическом и морфологическом уровнях. Установлено, что сердце гетеротермных животных способно функционировать в широком диапазоне температур (0+38 °C), причем за короткий промежуток времени сердце зимоспящих способно существенно снижать или повышать уровень функционирования. Показано, что активность Na,K-АТФазы сарколеммы и Са-насоса мембран саркоплазматического ретикулума периодически изменяется в зависимости от функционального состояния животных, причем активность ионных насосов связана с изменением числа переносчиков в мембранах. Установлено, что во время оцепенения зимоспящих синтез и обмен белков, нуклеиновых кислот, а также липидов полностью не останавливается, хотя снижается на 2 порядка. При пробуждении животных наблюдаются гиперактивация синтеза белков, существенно активизируется обмен липидов и нуклеиновых кислот. Показано, что структурно-функциональные свойства кардиомиоцитов зимоспящих животных при переходе из одного стационарного состояния в другое находятся под контролем ядерного и белок- синтезирующего аппаратов клеток.

В настоящее время к явлению гибернации проявляется повышенный интерес как в нашей стране, так и за рубежом. В 50 – 70-е годы в основном велись исследования феноменологических явлений зимней спячки [26, 29, 51, 55]. Были изучены вопросы поведения животных [3, 26], скорость и глубина охлаждения тела и органов [55], состав крови и мочи [41, 54], гормональный спектр организма [40, 50, 53], некоторые эколого-физиологические параметры [3, 26, 35]. В 80-х годах внимание исследователей все больше сосредотачивается на клетках гетеротермных животных. Изучаются вопросы окислительного фосфорилирования в митохондриях [2, 5, 30, 31, 34], активность ключевых ферментов метаболизма [25, 28, 36, 37, 44], механизмы нейрохимической регуляции [4, 27, 33, 38, 39]. В указанных областях получены интересные данные, которые свидетельствуют об оригинальных явлениях, характерных только для гетеротермов. Однако проблемы ключевых механизмов гибернации, а также управляемой гипотермии остаются до сих пор нерешенными.

Одной из основных причин гибели теплокровных животных в состоянии гипотермии являются фибрилляция и остановка сердца [32]. Однако сердце зимоспящих животных продолжает сокращаться длительное время при околонулевых температурах [6, 32]. Работами последних лет установлено, что во время гибернации существенно модифицируется работа миокарда: уменьшается частота сердечных сокращений (ЧСС) [7, 48], изменяется вид электрокардиограммы [48, 51], модифицируется длительность и структура потенциала действия [49], изменяется липидный состав мембран [42]. Клеточные и молекулярные механизмы приспособления миокарда к низким температурам остаются все еще малоизученными.

Особый интерес исследователей в области гипобиоза вызывают клеточные мембраны, которые играют значительную роль в обеспечении жизнедеятельности клеток. Обнаружена способность гетеротермных животных при подготовке к зимней спячке изменять липидный состав мембран клеток и клеточных органелл [46], вследствие чего мембраны сохраняют свои жидкостные свойства и функциональную активность при

очень низких температурах [52]. Но не все ткани обладают такой способностью [43]. Видимо существуют другие механизмы жизнеобеспечения и адаптации клеток.

В последнее время расширяются исследования в области клеточной регуляции на мембранном уровне. При этом особое значение придается ионным каналам [46, 49], переносчикам физиологически активных ионов [45, 47], рецепторам [47]. Однако до сих пор остается до конца неясным тонкий механизм регуляции мембраносвязанных ферментов, в первую очередь ионных переносчиков, а также особенности структурной организации биомембран и их физико-химических свойств. Не выяснено до сих пор, что является биохимической и ультраструктурной основой обеспечения функциональной активности сердца зимоспящих животных в широком диапазоне температур.

В связи с вышеизложенным, целью работы являлось изучение биохимических и ультраструктурных особенностей клеток миокарда гибернирующих животных при зимней спячке, пробуждении и бодрствовании; выяснение основ структурно-функциональных перестроек в кардиомиоцитах, обеспечивающих физиологическую активность и адекватное функционирование сердца в широком диапазоне температур.

Нами впервые проведено комплексное исследование миокарда зимоспящих на физиологическом, биохимическом и морфологическом уровнях. Показано, что во время зимней спячки существенно изменяются электрофизиологические характеристики сердца, в результате значительного снижения активности миокарда. ЧСС во время спячки составляет лишь 1/35 нормы, время электрической систолы желудочков увеличивается в 5 раз, а время диастолы — в 4–5 раз. Существенно удлиняется время диастолы предсердий и общей диастолы миокарда. Таким образом, удлинение сердечного цикла при гибернации является, в первую очередь, результатом увеличения времени расслабления миокарда. По кривым ЭКГ рассчитано, что у зимоспящих значительно замедляются процессы деполяризации и особенно реполяризации клеточных мембран кардиомиоцитов [6, 7].

Сердце зимоспящих обладает уникальной способностью очень быстро перестраивать функциональную активность при пробуждении. В процессе пробуждения и повышения температуры тела животного от 2 до 10 °C происходит резкое увеличение скорости всех электрофизиологических процессов и уже при температуре 12+15 °C параметры функционирования миокарда практически достигают величин, характерных для нормотермных животных: число сокращений достигает 200–300 ударов в минуту. Это свидетельствует о способности “холодного” сердца функционировать на уровне нормотермного органа независимо от температуры организма. Учащение пульса во время пробуждения связано, в первую очередь, со значительным сокращением времени электрической диастолы предсердий и желудочков в 12–26 раз, общей диастолы сердца в 50 раз, а также времени проведения возбуждения от предсердий к желудочкам в 14 раз. При этом значительно увеличиваются скорости процессов деполяризации клеточных мембран миоцитов [6, 12].

Измерение температуры органов сусликов на различных этапах разогрева показало, что наиболее высокая температура определяется в бурой жировой ткани, покрывающей сердце. Только у непробудившихся млекопитающих, у которых температура тела не повышалась в течение

нескольких часов, несмотря на усилия с нашей стороны, температура указанной области не была выше температуры других органов. Отмечено, что сердце пробуждающихся сусликов лишь на  $1 : 1,5$  °C “холоднее” бурого жира, но температура миокарда все-таки выше, чем других органов. Установлена также корреляция между повышением частоты сокращений сердца и повышением скорости разогрева тела сусликов, что свидетельствует о зависимости скорости пробуждения от интенсивности работы сердца [19].

Таким образом, зимоспящие животные координируют работу сердца на протяжении всего цикла зимней спячки в широком диапазоне температур от 0 до 38 °C. Деятельность миокарда во время зимней спячки характеризуется существенным изменением электрофизиологических характеристик. При пробуждении сердце зимоспящих млекопитающих обладает способностью быстро, в течение 1–2 ч, практически полностью восстанавливать функциональную активность. Восстановление сердечной деятельности происходит еще при пониженных температурах тела, и при  $12+15$  °C “холодное” сердце сусликов уже способно функционировать на уровне нормотермного органа. Сердце гетеротермных животных играет важную роль в восстановлении температуры тела при пробуждении: температура тела сусликов повышается одновременно с увеличением ЧСС, при этом скорость разогрева зависит от интенсивности работы сердца. Животные, которые оказываются не в состоянии “разогнать” сердце до высокой частоты сокращений, не выходят из состояния гибернации [19].

Приведенные результаты свидетельствуют о существенных физиологических возможностях сердца гетеротермных животных. В то время как сердце теплокровных животных не выдерживает даже незначительного охлаждения и останавливается в результате фибрилляции при температурах  $15+20$  °C, зимоспящие животные способны координировать работу своего миокарда на протяжении всего цикла спячки независимо от температуры тела.

Миокард – возбудимая ткань, основой функционирования которой являются ионные токи через мембраны. В связи с этим актуальным было изучение свойств ионных переносчиков сарколеммы и саркоплазматического ретикулума.

Было установлено, что активность Na, K-АТФазы сарколеммы сердца гибернирующих сусликов примерно в 1,5 раза ниже, чем у активных животных. Величины  $Q_{10}$  и  $E_a$  для различных препаратов практически не отличаются для мембранных АТФаз гибернирующих или активных сусликов [17,21]. Это может свидетельствовать о том, что формы ферментов в препаратах из спящих и активных животных не отличаются. Дальнейшими исследованиями было установлено, что сродство изучаемого фермента к оуабаину, специфическому маркеру Na, K-АТФаз, одинаково как для препаратов мембран из сердца гибернирующих, так и активных сусликов, что подтверждается данными, свидетельствующими о единой форме фермента в разных физиологических состояниях [17, 21]. Однако количество мест связывания оуабаина почти в 1,5 раза больше в препаратах сарколеммы активных животных, что соответствует отличиям в скорости гидролиза АТФ препаратами микросом из сердца разных групп грызунов. Таким образом, при переходе сусликов из гибернации в

активное состояние происходит увеличение количества транспортных АТФаз.

Одним из механизмов регуляции функциональной активности миокарда при гибернации может быть изменение рецепторов физиологически активных соединений, в частности их числа и свойств. Нами показано [4], что специфическое связывание  $^3\text{H}$ -дигидроальprenола с мембранами миокарда сусликов при 37 °С характеризовалось как быстрый, обратимый и насыщенный процесс. Анализ кривых связывания в координатах Скетчарда показал, что клетки сердца гибернирующего суслика обладают значительным числом мест связывания, а также высоким сродством к лиганду. При пробуждении зимоспящих происходит увеличение мест связывания гормона на мембранах. При этом сродство рецепторов к лиганду несколько уменьшается, о чем свидетельствует увеличение константы диссоциации ( $K_d$ ) у активных животных. Спустя сутки после пробуждения сродство лиганда к рецептору не изменяется по сравнению с просыпающимися животными, однако количество мест связывания уменьшается. При изменении кинетики связывания лиганда с рецепторами при 5 °С установлено, что при пониженных температурах несколько уменьшается  $K_d$  и  $V_{\text{max}}$  для всех групп животных. Это свидетельствует о непосредственном влиянии на кинетику связывания низких температур. При этом у гибернирующих и пробуждающихся сусликов происходит повышение сродства  $^3\text{H}$ -дигидроальprenола к  $\beta$ -адренорецепторам.

Представленные данные [4] свидетельствуют о том, что во время баута происходят циклические, в соответствии с периодами гибернации, пробуждения и бодрствования, изменения количества рецепторов на мембранах и их сродства к аналогу гормона.

В следующей серии экспериментов установлено, что активность Са-АТФазы препаратов саркоплазматического ретикулума из сердца активных и зимоспящих сусликов не изменяется [20]. Однако скорость аккумуляции ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в 2 раза выше в препаратах гибернирующих животных. Особенно велика разница в активности Са-насоса при пониженных температурах [20]. Видимо способность миокарда зимоспящих животных функционировать при низких температурах может быть обусловлена способностью Са-насоса сохранять высокую активность при пониженных температурах.

Для выяснения возможной роли Са-насоса в обеспечении устойчивости миокарда к холоду исследовали свойства Са-АТФазы, а также скорости аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  мембранами СР из сердец искусственно охлажденных крыс и активных сусликов [23, 24]. Было установлено, что Са-транспортирующая система мембран СР сусликов не изменяет своих функциональных характеристик в результате гипотермии животных. Причем не наблюдается каких-либо изменений в течение 96 ч эксперимента, что свидетельствует о высокой стабильности Са-насоса сусликов независимо от их функционального состояния.

Несмотря на то, что крысы охлаждались только до 19 °С, уже спустя 2 ч гипотермии наблюдались существенные нарушения в работе как Са-АТФазы, так и изменение  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующих свойств мембраны СР. Скорость аккумуляции ионов кальция спустя 2 ч гипотермии снижается в 2 раза, но скорость гидролиза АТФ при этом существенно возрастает. Отмеченные факты являются доказательством значительного повреж-

дения Са- транспортирующей системы мембран сердца крыс в условиях гипотермии [24].

Таким образом, эти данные [24] свидетельствуют о том, что устойчивость сердца зимоспящих животных к низким температурам может быть обусловлена высокой стабильностью Са-насоса мембран СР и, наоборот, одной из причин остановки сердца крыс при гипотермии является нарушение функционирования Са-транспортирующей системы сердца.

С целью выяснения причин изменения активности транспортных АТФаз в зависимости от физиологического состояния животных исследовали липидный и белковый состав, а также физико-химические свойства биомембран. При исследовании липидного состава микросомальных фракций сердца установлено, что соотношение фракций нейтральных липидов и фосфолипидов в мембранах кардиомиоцитов не изменяется у сусликов в различных физиологических состояниях [18]. Проведение электрофореза белков сарколеммы и саркоплазматического ретикулума также не выявило качественных отличий в белковом составе мембран сердца сусликов в различных физиологических состояниях. Полученные данные свидетельствуют о том, что во время периодических пробуждений существенного изменения качественного белкового и липидного состава мембран не происходит.

С целью выяснения механизмов перестройки физиологической активности кардиомиоцитов мы применили новый подход к изучаемой проблеме: сосредоточили свое внимание на изучении особенностей переходного состояния животных – периода пробуждения от зимней спячки. Этот период характерен тем, что именно за этот короткий промежуток времени происходят те биохимические модификации, которые потом обеспечивают жизнь в температурном диапазоне на  $37+35^{\circ}\text{C}$  выше предыдущего периода. Известно, что основой физиологической активности клеток является ферментативная активность, которая, в свою очередь, зависит от количественного и качественного состава энзимов в клетке. В связи с этим мы изучили некоторые стороны обмена белков у зимоспящих животных в разных периодах баута [8, 11, 13, 14, 15, 16]. Было установлено, что во время зимней спячки интенсивность синтеза белка снижается более чем на 2 порядка по сравнению с активными животными. Во время пробуждения наблюдается гиперактивация этого процесса. При этом скорость образования новых белков в 1,5–2 раза превышает тот же процесс у активных сусликов. Показано, что синтез белков начинается уже на начальных этапах пробуждения еще при пониженных температурах тела животных. По мере повышения температуры тела интенсивность синтеза белков увеличивается. Наибольший прирост вновь синтезированных белков наблюдается на более поздних этапах пробуждения [14]. Приведенные данные показывают, что интенсификация синтеза протеинов, а значит и белковые перестройки начинаются на начальных этапах пробуждения еще при пониженных температурах тела млекопитающих. Указанный факт свидетельствует о наличии у зимоспящих животных механизма, обеспечивающего синтез белков при пониженных температурах. Во время разогрева зимоспящих животных происходит интенсификация замены белков в мембранах митохондрий, саркоплазматического ретикулума и сарколеммы. Кроме этого показано, что во время гибернации, и особенно при пробуждении сусликов, в

миоцитах сердца, наряду с основными белками индуцируется синтез некоторых протеинов, характерных только для определенного физиологического состояния [16]. Полученные результаты дают основание считать, что в состоянии гибернации клетки миокарда могут иметь несколько другой набор протеинов. Видимо, специфический состав энзимов может обуславливать способность миокарда функционировать при околонулевых температурах, так как хорошо известно, что вполне достаточно изменить свойства ключевых ферментов, чтобы модифицировать метаболические пути [1, 16]. При пробуждении происходит синтез белков, необходимых уже при активном состоянии животных. Это может происходить путем синтеза специфических полипептидов, изоформ ферментов или же просто синтезом большего количества определенных энзимов. На основании представленных [14, 15, 16] экспериментальных фактов можно говорить о синтезе специфических белков как об адаптивной реакции клеток в ответ на необходимость изменения физиологического состояния животных.

Далее нами показано, что отмеченные адаптивные перестройки находятся под контролем генетического и синтетического аппаратов клетки [11, 16]. В частности, во время оцепенения синтез нуклеиновых кислот не прекращается полностью, хотя его интенсивность снижается очень значительно. При пробуждении сусликов происходит активация процесса синтеза и обновление нуклеиновых кислот, но уровень синтеза не достигает значений, характерных для ткани активных животных. Это свидетельствует о том, что в клетках зимоспящих имеется достаточное количество рибосом и матриц синтеза белка, необходимых для начального периода пробуждения, после чего уже начинается массивный синтез нуклеиновых кислот и белков.

Вышеизложенный материал свидетельствует о том, что во время баута каждый раз циклически меняются свойства многих систем клеток. Однако все изменения активности ферментов и их числа, количества и сродства рецепторов и т.д. можно объяснить белковыми перестройками в клетках. Эти перестройки могут быть связаны с ковалентной модификацией белков, влиянием изменившегося липидного окружения, но основным механизмом перестройки структуры и функции клеток зимоспящих является синтез и интенсивный обмен белковых молекул.

Электронномикроскопические исследования [9, 10] показали, что кардиомиоциты гибернирующих сусликов содержат крупные ядра с сильно извитыми границами и большим количеством глубоких инвагинаций ядерной оболочки, благодаря чему цитоплазма клеток проникает глубоко в область ядра и через многочисленные поры контактирует с ядерным содержимым. Хроматин ядра представлен в основном в диффузной форме, а небольшое количество конденсированного хроматина расположено на периферии ядра. В каждом ядре встречается крупное ядрышко, имеющее гранулярную структуру. Околоядерная зона клеток сердца содержит комплекс органелл, ответственных за синтез белка: свободные рибосомы, аппарат Гольджи (АГ), митохондрии, эндоплазматический ретикулум, липидные включения. Отмеченные особенности организации ядра и пренуклеарного пространства клеток миокарда гибернирующих сусликов свидетельствуют о потенциальных возможностях белок-синтезирующего аппарата изучаемых клеток к синтетической активности.

Клетки миокарда пробуждающихся сусликов имеют также крупные ядра. Хроматин в основном находится в диффузионном состоянии, а ядрышки имеют гранулярную структуру. В кардиомиоцитах хорошо и полностью представлен белок-синтезирующий комплекс органелл. В приядерном пространстве обнаруживается большое количество свободных рибосом, наблюдается скопление митохондрий, лизосом, липидных капель и везикул. Около ядра хорошо выявляется АГ и шероховатый эндоплазматический ретикулум. Особенности ультраструктуры свидетельствуют о высокой синтетической активности клеток миокарда пробуждающихся сусликов. Представленные [9, 10] данные согласуются с фактом гиперактивации синтеза белков при пробуждении зимоспящих животных. Очевидно, что структурно-функциональные свойства кардиомиоцитов зимоспящих животных при переходе из одного функционального состояния в другое находятся под контролем ядерного и белок-синтезирующего аппаратов клеток.

Зимоспящие животные на протяжении всей зимы не питаются. И если перед зимней спячкой они “запасаются” жиром, то запасов белка они не имеют. Оставалось не выясненным, каким образом гибернаторы на протяжении нескольких месяцев обходятся без экзогенного белка, не испытывая на протяжении полугода бескормицы “белкового голода”. Наши исследования свидетельствуют о том, что механизм сохранения азота в организме гетеротермных животных может осуществляться путем рециклизации молекул протеинов в течение каждого баута [22]. Электронномикроскопические исследования позволили установить наличие значительного количества лизосом в клетках сердца сусликов, что совершенно не характерно для гомойотермных животных. Лизосомы обычно расположены в районе ядра, в зоне, где расположен аппарат белкового синтеза. Особенно много лизосом обнаруживается у пробуждающихся сусликов, когда интенсифицируется белковый синтез. Так как основной функцией лизосом является “внутриклеточное пищеварение”, то естественно сделать заключение, что во время пробуждения существенно интенсифицируется процесс гидролиза отслуживших белковых молекул. При этом перевариваются в первую очередь измененные при зимней спячке энзимы, необходимость в которых уже отпала, некоторые малозначимые структурные протеины. Можно говорить о рециклизации белковых молекул, об экономном их использовании во время спячки. Это заключение подтверждается также нашими данными об очень низкой продукции мочевины зимоспящими во время гибернации. Азот в виде мочевины практически не выводится из организма на протяжении полугода [37].

Электронномикроскопические исследования позволили увидеть путь обновления структуры и функции сарколеммы клетки сердца зимоспящих животных при пробуждении [10,13]. Было отмечено, что кардиомиоциты гибернирующих животных имеют хорошо развитую везикулярную систему. Значительная часть везикул располагается под сарколеммой. Отмечено, что во время пробуждения везикулы сливаются с плазматической мембраной кардиомиоцитов. При этом от сарколеммы отщепляются окаймленные пузырьки, содержащие “отработанный” материал, поступают в цитоплазму, где затем утилизируются. Можно думать, что отщепляющиеся от сарколеммы окаймленные пузырьки содержат рецепторы и АТФазы, которые уже не пригодны для

функционирования в новых условиях. Эти белки транспортируются в виде везикул и окаймленных пузырьков к лизосомам, где и происходит их модификация или же гидролиз до аминокислот. Модифицированные молекулы белков поступают в аппарат Гольджи, встраиваются в везикулы и вновь транспортируются к сарколемме. Сливаясь с ней, изменяют ее функциональные свойства. Аминокислоты из полностью разрушенных белков поступают в цитоплазму как субстраты для синтеза новых протеинов.

На основании исследования ультраструктуры кардиомиоцитов можно сделать заключение, что клетки сердца зимоспящих животных имеют особенности организации на разных этапах баута. Однако принципиальных отличий ультраструктуры не обнаружено, как в различных физиологических состояниях животных, так и по отношению к гомеотермным животным. Особенностью кардиомиоцитов зимоспящих животных следует считать их структурную организацию, способствующую быстрой реорганизации клетки путем реализации процесса синтеза белков. Эта особенность проявляется в наличии значительного количества инвагинаций ядерной оболочки и большого числа ядерных пор, что позволяет ядру быстро реагировать на необходимость реорганизации метаболизма клетки путем образования матриц синтеза белков, а также рибосом. Наличие в околядерной зоне всего комплекса белоксинтезирующего аппарата позволяет в любой момент ответить на необходимость реорганизации путем массивного синтеза протеинов. Лизосомальный аппарат снабжает клетку субстратами синтеза, обеспечивает экономное, многократное использование функционально важных макромолекул.

Таким образом, ультраструктура кардиомиоцитов зимоспящих животных, находящихся в различных физиологических состояниях, не имеет принципиальных различий, хотя имеет некоторые особенности. Следовательно, свойство сердца гетеротермных животных функционировать в широком диапазоне температур обусловлено способностью кардиомиоцитов к быстрой реорганизации интенсивности и направленности метаболизма, что обеспечивается высокоподвижным геномом и белок-синтезирующей системой.

Ряд экспериментальных данных, полученных нами при исследовании молекулярных механизмов приспособления кардиомиоцитов, являются характерными также и для клеток других органов и тканей. В частности, явление экстремального снижения во время спячки, а затем гиперактивация синтеза белков при пробуждении характерны практически для всех органов и тканей [13, 15]. При этом уровень синтеза во время оцепенения составляет лишь 0,13–0,5 % от такового в тканях активного суслика. В большей степени синтетические процессы в тканях гибернирующего грызуна сохраняются в коре почки, в поджелудочной железе и печени.

При пробуждении сусликов на 3 порядка возрастает интенсивность включения метки в белки клеток тканей сердца, надпочечника, печени и поджелудочной железы по сравнению с гибернирующими животными. Спустя несколько часов после пробуждения показатель синтеза белков в клетках млекопитающих постепенно снижается и спустя сутки стабилизируется. Отмеченная закономерность характерна для всех исследованных органов. Скорость включения меченых аминокислот в белки во

всех тканях (за исключением мышц) превышала уровни, отмеченные у активных сусликов в 1,5–2,0 раза. Следует учесть при этом то, что синтез белка во всех тканях пробуждающихся сусликов идет на протяжении 3 ч при пониженных температурах тела. Поэтому тем более очевиден факт гиперактивации процессов на заключительном этапе разогрева. Нами показано также, что во время гибернации и при пробуждении зимоспящих животных, наряду с основными белками клеток, в различных органах и тканях индуцируется синтез специфических протеинов [22], что является, по-видимому, полифункциональной адаптивной реакцией клеток в ответ на необходимость функционировать в различных температурных условиях. Эти данные указывают также на участие генетического аппарата в процессах адаптации клеток.

Прямые доказательства участия генома в регуляции белкового синтеза у гетеротермных животных в различных физиологических состояниях нами получены при изучении белкового состава хроматина клеток печени [20]. Показано, что белковый состав хроматина существенно меняется в зависимости от состояния животных. На денситограммах гелелектрофореза белков активного хроматина видно, что во время гибернации выделяется ряд как высоко-, так и низкомолекулярных белков, характерных для этого состояния, а ряд белков, характерных для активных животных, исчезает. При пробуждении исчезает ряд белков, характерных для гибернации, специфических протеинов не появляется, хотя ряд протеинов синтезируется в больших количествах. Представленные [11, 20] результаты свидетельствуют о непосредственном участии генома в регуляции белкового синтеза и адаптации клеток при изменении физиологического состояния зимоспящих. Как видно, регуляция происходит путем присоединения или исчезновения специфических белковых молекул, регулирующих активность определенных генов. Видимо, существуют специфические белки-регуляторы генома, наличие или отсутствие которых обуславливает физиологический статус гетеротермов. На основании этих исследований можно говорить о существовании генетических программ, обеспечивающих различные функциональные состояния зимоспящих животных, не только стационарные (бодрствование и гибернация), но и переходные (пробуждение и впадение в спячку). Из вышеизложенного следует также, что наряду с сезонными изменениями функциональной активности разных органов и тканей зимоспящих животных существуют неоднократные модификации их клеток в течение каждого баута.

Таким образом, можно сделать заключение, что закономерности приспособления клеток путем циклического обновления своей структуры и функции, реализующегося через белковый синтез, запрограммированный специальными генетическими программами, являются общими для всех видов клеток и тканей. Однако эта закономерность не является единственным путем приспособления клеток млекопитающих. Несомненно, существуют и другие пути регуляции клеточного метаболизма, например ковалентная модификация белков, изменение величин pH, концентрации АТФ или  $\text{Ca}^{2+}$ . Однако указанные адаптивные реакции носят, скорее всего, "тактический" характер, благодаря чему может происходить быстрое, но не долговременное приспособление клеток. Описанные нами в настоящей статье циклические белковые перестройки, связанные с синтезом специфических протеинов в клетках зимоспящих,

можно назвать “стратегическими”, обуславливающими изменения интенсивности и направленности метаболизма и, таким образом, длительное адекватное функционирование органов и тканей в различных температурных условиях.

Синхронное повышение активности синтеза и обновления белков в клетках различных органов свидетельствует о том, что существует единый регуляторный физиологический механизм, запускающий реакции, приводящие к одновременному изменению интенсивности и направленности метаболизма во всех органах и тканях зимоспящих млекопитающих. Такими регуляторами могут быть пептиды, гормоны, комплекс физиологически активных веществ или медиаторы нервной системы. Но все возможные эффекторы, скорее всего, осуществляют свое действие, влияя на геном клетки, регулируя синтез специфических нуклеиновых кислот и протеинов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. – М.: Мир, 1986. – Т.3. – 230 с.
2. Брустовецкий Н.Н., Маевский Е.И., Гогвадзе В.Г. Возможные биохимические механизмы подавления окислительного метаболизма у зимоспящих животных // Механизмы зимней спячки. – Пушино, 1987. – С. 32–39.
3. Винокуров В.Н., Ахременко А.К. Популяционная экология длиннохвостых сусликов Якутии. – Якутск: Якутск. филиал СО АН СССР, 1982. – 164 с.
4. Губина Н.Ф., Беркало Л.В., Жегунов Г.Ф., Утевский А.М. Связывание Н-дигидроальпренола плазматическими мембранами клеток сердца зимоспящих животных // ДАН УССР. – 1988. – № 3. – С. 72–74.
5. Демин Н.Н., Шортанова Т.Х., Эмирбеков Э.З. Нейрохимия зимней спячки. – Л.: Наука, 1988. – 136 с.
6. Жегунов Г.Ф. Электрофизиологические параметры функционирования сердца сусликов в процессе пробуждения от зимней спячки // Криобиология. – 1986. – № 1. – С. 31–34.
7. Жегунов Г.Ф. Электрофизиологические показатели деятельности сердца гетеротермных и гомойотермных млекопитающих при наркозе и охлаждении // Тез. докл. III Всесоюз. симпозиума по электрофизиологии сердца. – Сыктывкар, 1986. – С. 83.
8. Жегунов Г.Ф., Микулинский Ю.Е. Активация синтеза белка в тканях сусликов при пробуждении после зимней спячки // Укр. биохим. журн. – 1987. 59, № 3. – С. 69–73.
9. Жегунов Г.Ф. Особенности ультраструктурной организации сарколеммы кардиомиоцитов зимоспящих животных // Цитология. – 1987. – 24, № 5. – С. 596–599.
10. Жегунов Г.Ф. Возможный механизм перестройки сарколеммы кардиомиоцитов зимоспящих животных в цикле спячка – пробуждение // Журн. эвол.биох. и физиол. – 1987. – 23, № 5. – С. 7647–651.
11. Жегунов Г.Ф., Микулинский Ю.Е. Особенности обмена нуклеиновых кислот и белков в тканях зимоспящих // Тез.докл. Всесоюз. конф. “Биология клетки”. – Тбилиси, 1987. – С. 487–488.
12. Жегунов Г.Ф. Электрофизиологические характеристики функционирования сердца и интенсивность синтеза белков кардиомиоцитов при пробуждении сусликов от зимней спячки // Журн.эвол.биох. и физиол. – 1988. – 24, № 1. – С. 31–35.
13. Жегунов Г.Ф. Синтез белка в клетках сердца и динамика ультраструктуры кардиомиоцитов зимоспящих животных в цикле гибернации // Цитология. – 1988. – 30, № 2. – С. 157–162.
14. Жегунов Г.Ф. Активация синтеза белка в тканях сусликов на начальном этапе пробуждения от спячки // Криобиология. – 1988. – № 1. – С. 45–46.
15. Жегунов Г.Ф., Микулинский Ю.Е. Периодическое обновление белков мембран кардиомиоцитов сусликов в цикле гибернация – пробуждение // Криобиология. – 1988. – № 2. – С. 19–24.
16. Жегунов Г.Ф., Белоус А.М., Котляров А.О. Индукция синтеза специфических белков у зимоспящих животных при гибернации и пробуждении // ДАН УССР. сер. “Б”. – 1988. – № 11. – С. 59–61.
17. Жегунов Г.Ф., Рязанцев В.В. Активность Na,K-АТФазы сарколеммы клеток сердца гибернирующих и активных сусликов // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем. – Харьков, 1989. – С. 126–128.

18. Жегунов Г.Ф., Кудогоцева Е.В. Особенности липидного обмена у сусликов при периодических пробуждениях от зимней спячки // Криобиология. – 1989. – N 1. – С. 36–39.
19. Жегунов Г.Ф. Роль сердца в разогреве тела зимоспящих при пробуждении // Физиол. журн. СССР. – 1989. – 75, N 1. – С. 105–109.
20. Жегунов Г.Ф. Биохимические и ультраструктурные основы функциональной активности сердца зимоспящих животных // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков., 1990. – 36 с.
21. Жегунов Г.Ф., Рязанцев В.В. Везикулярный механизм регуляции активности Na, K-АТФазы сарколеммы сердца // Цитология. – 1990. – 32, N 9. – С. 929–930.
22. 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.
23. Жегунов Г.Ф., Джордан М., Вонг Л. Синтез белков при искусственной гипотермии сусликов // Биохимические аспекты холодовых адаптаций. – Харьков, 1991. – С. 50–57.
24. Жегунов Г.Ф., Вонг Л., Белке Д., Джордан М. Эффект искусственного охлаждения сусликов и крыс на работу Са-насоса мембран саркоплазматического ретикулаума сердца // Биохимические аспекты холодовых адаптаций. – Харьков, 1991. – С. 57–62.
25. Иванов В.П. Биоэнергетика и температурный гомеостаз. – Л.: Наука, 1972. – 169 с.
26. Калабухов Н.И. Спячка животных. – Харьков: Изд-во Харьковского ун-та, 1956. – 267 с.
27. Карманова Н.Г. Эволюционный аспект проблемы естественного сна, зимней спячки и сноподобных состояний // Механизмы зимней спячки. – Пушино, 1987. – С. 5–16.
28. Львова С.П., Чубуркова С.С. Содержание гликогена и фосфоорилазная активность в различных мышцах крыс и сусликов при гипотермии, самосогревании и зимней спячке // Укр.биохим.журн. – 1983. – 55, N 1. – С. 39–44.
29. Майстрах В.В. Гипотермия и анабиоз. – М.: Наука, 1964. – 226 с.
30. Миронова Г.Д., Федотчева Н.И., Скарга Ю.Ю. и др. Транспорт калия и дыхание митохондрий при выходе суслика из состояния зимней спячки // Механизмы зимней спячки. – Пушино, 1987. – С. 39–47.
31. Пантелеев П.А. Биоэнергетика мелких млекопитающих. Адаптация грызунов и насекомых к температурным условиям среды. – М.: Наука, 1983. – 269 с.
32. Покровский В.М., Шейх-Заде Ю.Р., Воверейт В.Б. Сердце при гипотермии. – Л.: Наука, 1984. – 141 с.
33. Цопова Н.К. Участие серотонина мозга в сноподобных состояниях // Механизмы зимней спячки. – Пушино, 1987. – С. 17–23.
34. Соломонов Н.Г., Ахременко А.К., Ануфриев А.И. Динамика энергетических субстратов в тканях пробуждающихся сусликов // Механизмы зимней спячки. – Пушино, 1987. – С. 48–56.
35. Слоим А.Д. Учение о физиологических адаптациях // Руководство по физиологии: Экологическая физиология животных. – Л.: Наука, 1979. – С. 79–182.
36. Хочачка П., Самеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. – М.: Мир, 1977. – 398 с.
37. Хочачка П., Самеро Дж. Биохимическая адаптация. – М.: Мир, 1988. – 568 с.
38. Штарк М.Б. Мозгоспецифические белки (антигены) и функции нейрона. – М.: Медицина, 1985. – 320 с.
39. Эмирбеков Э.З., Львова С.П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. – Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского ун-та, 1985. – 80 с.
40. Agid R., Ambid Z., Sable-Amplis R., Sicart R. Aspects of metabolic and endocrine changes in hibernation // Strategies in cold / Eds. L.Wang, J. Hudson. – N. York, San Francisco, London: Acad. Press. – 1978. – P. 499–540.
41. Al-Bardy K.S., Taha H.M. Hibernation-hypothermia and metabolism in hedgehogs. Changes in some organic components // Comp. Biochem. Physiol. – 1983. – 74 A, N 1. – P. 143–148.
42. Aloia R.C., Pengelly E.T. Lipid composition of cellular membranes of hibernating mammals // Chem. Zool. – 1979. – XI. – P. 1–47.
43. Aloia R.C., Angee M.L., Ozz G.R., Raison Y.K. A critical role for membranes in hibernation // Living in the cold / Eds. H.Heller, X. Mussaccia, L.Wang. – New York, Amsterdam, London: Elsevier – 1986. – P. 19–26.
44. Behrlich H.W. Metabolic economy at the biochemical level: the hibernator // Strategies in the cold / Eds. L.Wang, J. Hudson. – New York, San Francisco, London: Acad Press. – 1978. – P. 461–498.
45. Belke D.D., Pehpwich D.J., Wang L. Seasonal variation in calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum in a hibernator, the Richardson's ground squirrel // J. Therm. Biol. – 1987. – 12, N 2. – P. 53–56.
46. Charnock J.S., Gibson R.A., McMurchie E.J., Raison J.K. Changes in the fluidity of myocardial membranes during hibernation: relationship to myocardial Adenosine triphosphatase activity // Mol. Pharmacol. – 1980. – 18, N 3. – P. 476–482.

47. Charnock J.S., Simonson L.P., Dryden W.F. Seasonal variation in myocardial Na, K-ATPase activity and (H)-ouabaine binding in a hibernating mammals: positive correlation with the pharmacological effects of ouabaine // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1980. – 65B, N 4. – P. 681–686.
48. Dawe A.R., Morrison P.R. Characteristic of the hibernating heart // *Am. Heart J.* – 1955. – 45, N 3. – P. 367–384.
49. Jacobs K., South F. Effect of temperature on cardiac transmembrane potentials in hibernation // *Am. J. Physiol.* – 1976. – 230, N 2. – P. 403–409.
50. Jansky L. Gonads and hibernation // *Living in the Cold* / Eds. H.Heller, X. Mussaccia, L.Wang. – New York, Amsterdam, London: Elsevier. – 1986. – P. 331–340.
51. Kayser Ch. The physiology of natural hibernation. – New York: Pergamon Press, 1961. – 356 pp.
52. Raison J.K., McMurchie M., Charnock J.S., Gibson R.A. Differences in the thermal behavior of myocardial membranes relative to hibernation // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1981. – 69 B, N 2. – P. 169–174.
53. Saboureaux M. Hibernation in the hedgehog: influence of external and internal factors // *Living in the cold* / Eds. H.Heller, X. Mussaccia, L. Wang. – New York, Amsterdam, London: Elsevier. – 1986. – P. 253–264.
54. Tempel G.E., Mussaccia X.J. Renal function in the hibernating and hypothermic hamster *Mesocricetus auratus* // *Amer. J. Physiol.* – 1975. – 228, N 2. – P. 602–607.
55. Wang L. Circadian body temperature of Richardson's ground squirrel under field and laboratory conditions: a comparative radiotelemetric study // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1972. – 43 A. – P. 503–510.

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

Поступила 13.02.92

Г.Ф.ЖЕГУНОВ

## ОСОБЛИВОСТІ АДАПТАЦІЇ СЕРЦЯ ЗИМОСПЛЯЧИХ ТВАРИН

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, Харків

Проведено комплексне дослідження міокарда зимосплячих тварин на фізіологічному, біохімічному і морфологічному рівнях. Встановлено, що серце гетеротермних тварин здатне функціонувати у широкому діапазоні температур (0–38 °C), при чому за короткий проміжок часу серце зимосплячих здатне істотно знижувати або підвищувати рівень функціонування. Показано, що активність Na, K-АТФази сарколеми і Са-насосу мембран саркоплазматичного ретикулуму періодично змінюється залежно від функціонального стану тварин, при чому активність йонних насосів пов'язана із зміною числа переносників у мембранах. Встановлено, що під час оцепеніння зимосплячих синтез і обмін білків, нуклеїнових кислот, а також ліпідів повністю не зупиняється, хоча знижується на два порядки. При пробудженні тварин спостерігається гіперактивація синтезу білків, істотно активується обмін ліпідів і нуклеїнових кислот. Показано, що структурно-функціональні якості кардіоміоцитів зимосплячих тварин при переході з одного стаціонарного стану в другий знаходяться під контролем ядерного та білок-синтезуючих апаратів клітини.

G.F.ZHEGUNOV

## ADAPTATION PECULIARITIES OF THE HEART OF HIBERNATORS

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

A complex study has been performed on the myocardium of hibernating animals at the physiological, biochemical and morphological levels. It has been found that the heart of heterothermic animals is able to function in a wide temperature range (from 0 to 38 °C) and the heart of hibernators is capable of decreasing or increasing markedly the level of function in a short period of time. It has been demonstrated that the activities of Na, K-ATPase of sarcolemma and Ca-pump of sarcoplasmic reticulum membranes change periodically depending on the functional state of animals, the activity of ionic pumps being related to changes in number of membrane carriers. It has been found that synthesis and exchange of proteins, nucleic acids and lipids are not arrested completely in torpor although they decrease by two orders of magnitude. In arousal, an increase in protein synthesis is observed, the exchange of lipids and nucleic acids is markedly intensified. It has been shown that the structure-functional properties of cardiomyocytes of hibernators are controlled by the nuclear and protein synthesizing apparatus of the cell with changing the body condition.

С.А.Забелинский, Е.Л.Поляков, М.А.Чеботарева

**ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ОРГАНОВ ЗОЛОТИСТЫХ ХОМЯЧКОВ И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ВОДНОМУ ОХЛАЖДЕНИЮ В РАЗЛИЧНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА**

Среди 78 особей сирийского хомячка *Mesocricetus auratus* выявлены две контрастные группы животных по устойчивости к водному охлаждению при плавании (+15 °С). Группы различались по поведенческим реакциям, скорости остывания тела и длительности периода восстановления поведенческих реакций. В сердце, легких, почках, мозгу и крови двух контрастных групп были изучены мембраносвязанные липиды. В исследованных органах не обнаружено различий в относительном содержании фосфолипидов и в их жирнокислотном составе ни между контрастными группами животных, ни на протяжении годового цикла. Высказывается предположение, что липидный спектр органов гибернаторов приспособлен в процессе эволюции к обеспечению жизнедеятельности клеток в широком диапазоне температур.

Молекулярные механизмы адаптации мембран, которые обеспечивают продолжительное их функционирование при низких температурах, до сих пор являются основным вопросом феномена гибернации [6,12]. При этих адаптациях, как отмечает Е.М.Крепс [2], решающее значение могут иметь мембранные липиды, главным образом определяющие такой важный для нормального функционирования клетки параметр, как жидкостность мембраны. Хотя вопрос о модификации липидов и их жирнокислотного состава в условиях пониженных температур исследовался у различных гибернирующих животных, но эти исследования фрагментарны и довольно противоречивы [1,3,8,10,13].

Задачей данной работы было выявить контрастные группы по физиологическим параметрам и проследить изменения мембранных липидов органов золотистых хомячков как в различные сезоны года, так и в группах животных с разной устойчивостью к иммерсионному охлаждению при плавании. Исследование выполнено на 78 самцах сирийского (золотистого) хомячка (*Mesocricetus auratus*) массой 80–120 г в зимний (декабрь–февраль) и летний (апрель–июнь) сезоны. Животные, предварительно обученные навыку плавать (30 мин, 22 °С) в специальном бассейне (0.35×0.16×0.18 м), исследовались на следующий день в этом же бассейне при температуре воды 15 °С. Изучались изменения поведенческих реакций у животных при плавании, регистрировалось время выживания в воде при 15 °С (ВВ<sub>15</sub>), скорость остывания тела (СОТ) и длительность периода восстановления поведенческих реакций (ДВП) (начало “чистки”). Для регистрации температуры “ядра” (толстого кишечника) использовали медно-константановые термопары. Животных двух контрастных групп по устойчивости к охлаждению при плавании (“высоко” и “низкоустойчивые”) в дальнейшем использовали для биохимических исследований.

Животных декапитировали, извлекали мозг, почки, легкие, сердце и осуществляли забор крови. Органы взвешивали и гомогенизировали в смеси хлороформ-метанол (1:1) и затем экстрагировали мембранные липиды по методу Фолча [7]. Разделение фосфолипидов проводили двумерной тонкослойной хроматографией [11]. Фосфор определяли по методу Лоури [9]. Отдельные фосфолипиды подвергали щелочному

метилованию и определяли их жирнокислотный состав на газовом хроматографе фирмы "Пай". Холестерин из суммарного липидного экстракта выделяли с помощью одномерной тонкослойной хроматографии и определяли количественно по цветной реакции с хлорным железом [4,14].

В результате проведенных исследований показано, что длительность плавания хомячков в холодной воде (15 °С) варьирует в широких пределах (от 4 до 39 мин) и составляет в среднем  $15.9 \pm 1.0$  мин. Выявлено существование трех групп ("высоко"-, "средне"- и "низкоустойчивых") животных, различающихся по  $ВВ_{15}$ , СОТ и ДВП (табл. 1).

При помещении в холодную воду у большинства животных наблюдалась однотипная динамика поведенческих реакций. В первый период (2–3) мин отмечалась повышенная двигательная активность (с частотой гребков 140–160 и более в минуту), сопровождавшаяся у многих животных дефекацией. Во второй период (3–8 мин) движения становились более спокойными, координированными; многие хомячки раздували один или оба защечных мешка. В последующие 10 мин движения у всех хомячков сильно замедлялись, наблюдались периоды "зависания" (2–3 мин) – животные в это время "лежали" на воде с закрытыми глазами, – сменявшиеся резкой двигательной активностью на 30–60 с. При дальнейшем пребывании в воде наблюдалось появление генерализованной дрожи; отмечалась заметная дискоординация движений, склонение на один бок и невозможность поднять голову из воды для последующего вдоха. Обычно при появлении этих признаков животное вынимали из воды, помещали в индивидуальную клетку для саморазогрева при комнатной температуре или проводили комплекс реанимационных мероприятий при остановке дыхания.

У разных групп животных обнаружены характерные различия в плавании. Так, для большинства хомячков высокоустойчивой группы особенностью было горизонтальное положение тела в воде. При этом животным удавалось оставлять сухой большую часть дорсальной поверхности тела (область головы и спины). У хомячков низкоустойчивой группы положение тела при плавании, как правило, было под определенным углом к поверхности воды, так что часть или вся спина и голова были погружены.

При изучении динамики устойчивости к иммерсионному охлаждению при плавании в сезон гибернации и сезон активности показано достоверное снижение среднего  $ВВ_{15}$  всех животных от зимы к лету и тенденция к падению  $ВВ_{15}$  отдельно для высоко- и низкоустойчивой группы (табл. 2). Отмечено также снижение процента высокоустойчивых и нарастание доли низкоустойчивых к охлаждению хомячков в исследованных партиях животных от зимы к лету.

Таким образом, подобраны две контрастные группы хомячков по  $ВВ_{15}$  и СОТ (табл. 1 и 2), органы которых, вероятно, отличаются по продолжительности функционирования при низких температурах тела. С одной стороны, на продолжительность функционирования органов при низких температурах тела влияет жидкостность мембран. С другой стороны, молекулярный механизм приспособления мембран осуществляется либо модификацией липидов и их жирнокислотного состава, либо увеличением количества воды в бислое, а также совместным их действием. Как видно из табл. 3, содержание общих фосфолипидов (ФЛ) в сердце, легких и почках довольно близкое и почти не зависит от ус-

**Т а б л и ц а 1**  
Средние значения  $BB_{15}$ ,  $COT$  и  $ДВП$  у групп золотистых хомячков ( $M \pm m$ )

| Группа                     | $BB_{15}$ ,<br>мин | $COT$ ,<br>$^{\circ}C/мин$ | $ДВП$ ,<br>мин |
|----------------------------|--------------------|----------------------------|----------------|
| Высокоустойчивые<br>$n=19$ | $29.5 \pm 1.5$     | $0.44 \pm 0.07$            | $26.8 \pm 0.9$ |
| Среднеустойчивые<br>$n=23$ | $17.2 \pm 0.4$     | $0.77 \pm 0.04$            | $43.8 \pm 0.9$ |
| Низкоустойчивые<br>$n=35$  | $9.6 \pm 0.4$      | $1.17 \pm 0.08$            | $55.0 \pm 1.5$ |

тойчивости к водному охлаждению. Оно колеблется от 726 до 937 мкг/г влажной ткани в сердце, 719–927 в легких и от 791 до 1045 в почках. Мозг обогащен фосфолипидами по сравнению с висцеральными органами в 1.5–2 раза, тогда как в крови их содержание в 10 раз меньше. В летний период содержание фосфолипидов во всех изученных органах хомячков больше, чем в

другие сезоны года, но это различие, по нашему мнению, недостоверно из-за малой выборки (малого количества животных (5 штук), взятых совместно в один опыт). Более того, при определении общего содержания фосфолипидов в сердечной ткани у одиннадцати индивидуальных особей в летний (июль –  $739 \pm 18$  мкг/г влажной ткани) и зимний (декабрь –  $710 \pm 21$ ) периоды достоверные различия также не обнаруживаются. Это согласуется с данными Элойа [5], который не обнаружил различий в содержании липидного фосфора в почках у активных и гибернирующих животных.

Изучение содержания холестерина (ХС) показало, что сердце отличается от всех других изученных органов наименьшим его содержанием (около 1000 мкг/г влажной ткани), причем, последнее имеет тенденцию возрастать в летний период. Различия в содержании ХС между высоко- и низкоустойчивыми группами животных в сердце не обнаружено. Легкие и почки в 2.5 раза обогащены холестерином по сравнению с сердцем. При этом в легких не обнаруживаются сезонные изменения в содержании ХС, но выступает тенденция к некоторому снижению его содержания у низкоустойчивых к водному охлаждению животных, тогда как в почках, наоборот, наблюдается увеличение содержания холестерина в летний период, но нет различий между высоко- и низкоустойчивыми

**Т а б л и ц а 2**  
Средние значения  $BB_{15}$  и соотношение высоко- и низкоустойчивых животных в зимний и летний сезоны ( $M \pm m$ )

| Сезон           | $BB_{15}$ для<br>всех групп,<br>мин | $BB_{15}$ высокоус-<br>тойчивых жи-<br>вотных, мин | $BB_{15}$ низкоус-<br>тойчивых живот-<br>ных, мин | Высокоустой-<br>чивые живот-<br>ные, % | Низкоустой-<br>чивые живот-<br>ные, % |
|-----------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|
| Зима XII–<br>II | $19.1 \pm 1.2^*$<br>$n=49$          | $29.1 \pm 1.7^{**}$<br>$n=16$                      | $10.5 \pm 0.7^{**}$<br>$n=15$                     | $32.6 \pm 2.0^*$                       | $30.6 \pm 4.1^*$                      |
| Лето IV–VI      | $12.1 \pm 1.2$<br>$n=28$            | $26.3 \pm 1.1$<br>$n=3$                            | $8.8 \pm 0.6$<br>$n=20$                           | $10.7 \pm 2.0$                         | $71.4 \pm 1.0$                        |

Примечание. \*Достоверность различий по отношению к лету,  $p < 0.001$ . \*\*Различия не достоверны,  $p < 0.05$ .

Содержание ФЛ и ХС (мкг/г влажной ткани) в различных органах у высоко- и низкоустойчивых хомячков на протяжении годового цикла

| Сердце         |           |         | Легкие  |           |         | Почки     |           |         | Мозг      |             |         | Кровь  |         |
|----------------|-----------|---------|---------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|-------------|---------|--------|---------|
| ФЛ             | ХС        | ФЛ/ХС   | ФЛ      | ХС        | ФЛ/ХС   | ФЛ        | ХС        | ФЛ/ХС   | ФЛ        | ХС          | ФЛ/ХС   | ФЛ     | ХС      |
| Январь-февраль |           |         |         |           |         |           |           |         |           |             |         |        |         |
| 734**/737      | 978/978   | 9.5/8.4 | 877/719 | 3742/3235 | 3.6/2.7 | 791/826   | 2644/2698 | 3.8/3.7 | 1702/1777 | 13262/12825 | 1.7/1.7 | 93/88  | 742/645 |
| Апрель         |           |         |         |           |         |           |           |         |           |             |         |        |         |
| 726/806        | 1189/1436 | 7.6/7.0 | 796/759 | 3508/3065 | 2.8/3.1 | 907/920   | 3153/3202 | 3.5/3.6 | 1701/1762 | 12548/19229 | 1.7/1.1 | 96/94  | 605/601 |
| Июнь           |           |         |         |           |         |           |           |         |           |             |         |        |         |
| 937/927        | 1349/1396 | 8.7/8.3 | 927/845 | 3813/3138 | 3.0/3.3 | 1045/1028 | 3616/3461 | 2.6/3.7 | 2331/2190 | 17143/17386 | 1.7/1.6 | 116/86 | 673/555 |

П р и м е ч а н и е. \* Среднее значение для двух месяцев; \*\* цифра в числителе – данные по высокоустойчивым хомячкам, цифра в знаменателе – по низкоустойчивым; ФЛ – фосфолипидный фосфор; ФЛ/ХС – молярное отношение.

Фосфолипидный состав органов хомячка (% от суммы фосфолипидов)

| Ткань       |          |             |          |             |          |             |          |             |          |             |  |             |  |
|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|--|-------------|--|
| Сердце      |          |             |          | Легкие      |          |             |          | Почки       |          |             |  | Мозг        |  |
| 1           |          | 2           |          | 1           |          | 2           |          | 1           |          | 2           |  | 1           |  |
| Фосфолипиды |          | Фосфолипиды |          | Фосфолипиды |          | Фосфолипиды |          | Фосфолипиды |          | Фосфолипиды |  | Фосфолипиды |  |
| ФХ          | 41.5±1.3 | 41.6±1.4    | 49.8±0.8 | 50.2±0.7    | 37.2±0.7 | 37.9±0.4    | 36.6±1.2 | 35.1±2.1    | 54.4±1.1 | 53.1±0.5    |  |             |  |
| Д-ФЭА       | 30.1±0.8 | 27.9±1.5    | 14.1±1.3 | 14.1±1.3    | 24.1±0.3 | 24.3±0.2    | 20.0±0.4 | 19.1±1.0    | 11.8±1.0 | 13.0±1.1    |  |             |  |
| П-ФЭА       | 6.5±0.4  | 6.6±0.3     | 11.4±0.4 | 11.6±0.5    | 6.6±0.2  | 7.4±0.8     | 18.0±1.3 | 19.3±1.4    | 4.4±0.2  | 3.7±0.4     |  |             |  |
| ФС          | 2.1±0.3  | 2.5±0.2     | 9.0±0.5  | 8.5±0.2     | 6.5±0.2  | 6.2±0.3     | 12.9±1.3 | 14.0±1.1    | 7.5±0.5  | 6.6±0.4     |  |             |  |
| СФМ         | 3.5±0.4  | 4.4±0.3     | 8.4±0.3  | 8.6±0.6     | 12.0±0.5 | 11.4±1.0    | 6.0±0.3  | 5.9±0.2     | 11.7±0.8 | 12.9±0.9    |  |             |  |
| МФ          | 5.0±0.2  | 5.2±0.1     | 5.2±0.3  | 5.0±0.4     | 7.0±0.2  | 6.7±0.3     | 4.0±0.3  | 4.3±0.4     | 8.9±0.9  | 9.8±1.0     |  |             |  |
| ДФГ         | 11.3±0.4 | 11.8±0.5    | 2.1±0.1  | 2.0±0.2     | 6.6±0.6  | 6.0±0.4     | 2.5±0.3  | 2.3±0.2     | сл       | сл          |  |             |  |
| ФК          | сл       | сл          | сл       | сл          | сл       | сл          | сл       | сл          | 1.3±0.2  | 0.9±0.4     |  |             |  |

П р и м е ч а н и е. 1 – Высокоустойчивые хомячки; 2 – низкоустойчивые хомячки; ФХ – фосфатидилхолин; Д-ФЭА – фосфатидилэтаноламин; П-ФЭА – плазмалогенная форма фосфатидилэтаноламина; ФС – фосфатидилсерин; СФМ – сфингомиелин; МФ – монофосфатидилинозитол; ДФГ – дифосфатидилглицерин; ФК – фосфатидная кислота; сл – содержание кислоты менее 0.5%.

Т а б л и ц а 5

Жирнокислотный состав фосфатидилхолина различных органов хомячка (% основных от суммы всех жирных кислот)

| Кислота      | Орган (ткань) |          |          |          |          |
|--------------|---------------|----------|----------|----------|----------|
|              | Сердце        | Легкие   | Почки    | Мозг     | Кровь    |
| 16:0         | 32.7±2.1      | 52.1±2.3 | 31.1±1.1 | 45.8±1.3 | 34.8±1.1 |
| 16:1         | 1.3±0.1       | 6.6±0.5  | 1.2±0.1  | 2.0±0.1  | 1.6±0.1  |
| 18:0         | 10.9±0.5      | 4.8±0.4  | 12.5±0.3 | 8.1±0.3  | 14.4±0.3 |
| 18:1         | 11.3±0.6      | 16.7±1.2 | 16.9±0.5 | 30.7±0.8 | 14.8±0.5 |
| 18:2         | 21.9±1.3      | 8.4±0.4  | 12.9±0.6 | 1.0±0.1  | 15.2±1.0 |
| 20:4ω6       | 13.0±1.2      | 7.0±0.5  | 14.6±0.7 | 4.7±0.2  | 9.2±0.5  |
| 22:4ω6       | 0.5±0.1       | 0.9±0.1  | сл       | 0.6±0.1  | 0.6±0.2  |
| 22:5ω6       | 0.6±0.1       | 0.7±0.2  | 0.9±0.1  | сл       | 1.5±0.2  |
| 22:5ω3       | 0.6±0.1       | сл       | 0.5±0.1  | сл       | сл       |
| 22:6ω3       | 4.9±0.4       | 0.7±0.2  | 6.4±0.6  | 2.9±0.3  | 3.9±0.3  |
| Насыщенные   | 43.6          | 56.9     | 43.6     | 53.9     | 49.2     |
| Ненасыщенные | 54.1          | 41.0     | 53.4     | 41.9     | 46.8     |

П р и м е ч а н и е . сл – содержание кислоты менее 0.5%.

животными. Особенно высоко содержание ХС в мозгу (12548–19230); оно на порядок выше, чем в сердце и в 3–4 раза выше, чем в легких и почках. К лету наблюдается некоторое увеличение ХС в мозгу подобно тому, как это было в сердце и почках, что удивительно для этой столь консервативной и оберегаемой ткани организма. Высоко- и низкоустойчивые животные по этому показателю не различаются. В крови содержание ХС оказалось намного ниже, чем в других органах и не обнаруживает корреляции ни с сезоном, ни с устойчивостью к охлаждению.

Таким образом, обращает на себя внимание довольно близкое содержание фосфолипидов во всех висцеральных органах, тогда как содер-

Т а б л и ц а 6

Жирнокислотный состав фосфатидилэтаноламина различных органов хомячка (% основных от суммы всех жирных кислот)

| Кислота      | Орган (ткань) |          |          |          |          |
|--------------|---------------|----------|----------|----------|----------|
|              | Сердце        | Легкие   | Почки    | Мозг     | Кровь    |
| 16:0         | 7.6±0.3       | 18.5±0.3 | 9.0±0.3  | 9.4±0.2  | 13.7±0.3 |
| 16:1         | сл            | 1.8±0.1  | 0.6±0.1  | 0.7±0.1  | 1.8±0.1  |
| 18:0         | 29.5±1.0      | 19.2±0.4 | 21.8±0.8 | 24.0±0.7 | 8.6±0.4  |
| 18:1         | 11.8±0.3      | 24.8±0.3 | 16.3±0.5 | 17.7±0.6 | 31.4±1.0 |
| 18:2         | 7.3±0.5       | 7.5±0.4  | 6.0±0.3  | 0.5±0.1  | 10.3±0.3 |
| 20:4ω6       | 14.7±0.8      | 17.5±0.5 | 37.0±0.5 | 14.7±0.7 | 19.4±0.5 |
| 22:4ω6       | 0.6±0.1       | 3.0±0.1  | 0.5±0.05 | 3.8±0.2  | 3.9±0.2  |
| 22:5ω6       | 2.8±0.3       | 1.3±0.3  | 1.8±0.1  | 0.6±0.1  | 1.4±0.1  |
| 22:5ω3       | 0.5±0.1       | 0.7±0.1  | сл       | сл       | 1.0±0.1  |
| 22:6ω3       | 19.7±0.8      | 4.2±0.2  | 4.4±0.3  | 25.2±0.4 | 4.1±0.2  |
| Насыщенные   | 37.1          | 37.7     | 30.8     | 33.4     | 22.3     |
| Ненасыщенные | 57.4          | 60.8     | 66.6     | 63.2     | 73.3     |

П р и м е ч а н и е . сл – содержание кислоты менее 0.5%.

Т а б л и ц а 7

Жирнокислотный состав фосфатидилинозитола различных органов хомячка (% основных от суммы всех жирных кислот)

| Кислота      | Орган (ткань) |          |          |          |          |
|--------------|---------------|----------|----------|----------|----------|
|              | Сердце        | Легкие   | Почки    | Мозг     | Кровь    |
| 16:0         | 5.8±0.3       | 17.5±0.3 | 9.8±0.3  | 12.2±0.4 | 31.6±1.8 |
| 16:1         | 0.5±0.1       | 1.4±0.1  | 0.7±0.1  | 1.0±0.1  | 1.3±0.1  |
| 18:0         | 42.7±1.8      | 30.9±1.1 | 38.2±0.9 | 30.0±0.4 | 27.2±1.5 |
| 18:1         | 7.4±0.3       | 12.4±0.6 | 6.4±0.3  | 12.0±0.5 | 10.5±0.3 |
| 18:2         | 11.2±0.4      | 3.8±0.1  | 3.8±0.2  | сл       | 10.5±0.4 |
| 20:4ω6       | 28.7±0.8      | 24.4±0.5 | 31.6±0.7 | 32.9±0.6 | 11.2±0.8 |
| 22:4ω6       | сл            | 2.3±0.1  | 1.0±0.1  | 5.2±0.2  | 2.1±0.1  |
| 22:5ω6       | 2.1±0.2       | 1.8±0.1  | 0.9±0.1  | сл       | сл       |
| 22:5ω3       | сл            | сл       | сл       | сл       | сл       |
| 22:6ω3       | 0.5±0.1       | 1.7±0.1  | 2.0±0.1  | 2.3±0.2  | 1.4±0.1  |
| Насыщенные   | 48.5          | 48.4     | 48.0     | 42.2     | 58.8     |
| Ненасыщенные | 50.4          | 47.8     | 46.4     | 53.4     | 37.0     |

П р и м е ч а н и е . сл — содержание кислоты менее 0.5%

жение холестерина является величиной гораздо более органоспецифичной и имеющей тенденцию к увеличению в летний период в сердце, почках и мозге. В легких и крови не происходит изменений в содержании холестерина в летний период. Из всех изученных органов только в легких обнаружена корреляция с устойчивостью к охлаждению.

Наиболее постоянным на протяжении годового цикла, но резко различным между органами, является молярное отношение ФЛ и ХС. Так, в сердце на каждую молекулу ХС приходится 7–8 молекул ФЛ, тогда как в легких — около 3, в почках — 3.5, а в мозгу — около 2. Возможное значение этого постоянства и состоит в поддержании необходимой для жизнедеятельности клетки жидкости мембраны на протяжении всего годового цикла, определяемой как полярными "головками" ФЛ, так и содержанием ХС и жирнокислотным спектром ФЛ.

Из табл. 4 видно, что относительное содержание отдельных ФЛ существенно не изменяется ни в одном органе как у высоко-, так и у низкоустойчивых хомячков. Следует отметить четкую органную специфичность фосфолипидных параметров. Так, для ФЛ сердца хомячка характерно пятикратное преобладание диацильной формы фосфатидилэтаноламина (Д-ФЭА) над плазмалогенной, высокое содержание дифосфатидилглицерина (ДФГ) (11,6–11,8%), в то время как в легких диацильная и плазмалогенная форма ФЭА присутствуют почти в одинаковых количествах, очень мало ДФГ — 2.0–2.1%, но достаточно высоко содержание сфингомиелина (СФМ) — 8.4–8,6%. Высоко содержание СФМ (11.4–12.0) и ДФГ (5.9–6.0) в почке. Очень специфично содержание ФЛ и в мозгу.

Третьим параметром, определяющим жидкость мембран являются жирные кислоты ФЛ. Согласно нашим данным, на протяжении годового цикла и у групп высоко- и низкоустойчивых хомячков не обнаружены изменения в жирнокислотном составе отдельных липидов изученных органов, поэтому в табл. 5, 6 и 7 представлены усредненные данные. Из таблиц видно, что каждый орган характеризуется своим

специфическим содержанием основных жирных кислот. Так, ФХ сердца содержит 32.7% C<sub>16:0</sub> и 21.9% C<sub>18:2</sub>, тогда как в легких их содержание составляет соответственно 52.1 и 8.4%. То же можно сказать о любых других кислотах любого ФЛ каждого органа. Эти данные нам кажутся особенно важными, так как показывают, что значительное изменение жирнокислотного состава данного ФЛ какого-либо органа маловероятно, так как это привело бы к трансформации данного ФЛ в ФЛ другого органа, другими словами, мембрана данного органа приобрела бы совсем иные чужеродные свойства и оказалась бы неспособной выполнять присущую только ей функцию. Поэтому-то и не происходит на протяжении годового цикла изменения ни фосфолипидного, ни жирнокислотного состава данного органа (чтобы сохранить специфические свойства этого органа, необходимые для жизнедеятельности всего организма).

Полученные данные, свидетельствующие об отсутствии изменений липидных параметров (например, относительное содержание индивидуальных фосфолипидов и их жирных кислот) данного органа как на протяжении годового цикла, так и при холодовых нагрузках, позволяют высказать предположение, что липидный спектр органов гибернаторов приспособлен в процессе эволюции к обеспечению жизнедеятельности клеток в широком диапазоне температур. Это предположение подтверждается данными других исследователей [3], показавших изменения при низких температурах липидного спектра мембран животных не впадающих в спячку, т.е. животных, от природы не приспособленных к перенесению низких температур, но не согласуется с точкой зрения Элойа [5,6], исследовавшего липиды разных органов одного из представителей гибернирующих млекопитающих – суслика (*Citellus lateralis*), и обнаружившего сезонные изменения липидов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жегунов Г.Ф., Кудокочева Е.В. Особенности липидного обмена у сусликов при периодических пробуждениях от зимней спячки // Криобиология. – 1989. – N 1. – С. 36–39.
2. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. – Л.: Наука, 1981. – 339 с.
3. Серебренникова Э.Г., Мамаев А.Т., Ахмедов И.Г. Участие липидов в адаптации различных органов крыс к глубокому переохлаждению // Биохимические аспекты холодовых адаптаций. – Харьков, 1991. – С. 130–137.
4. Чеботарева М.А. Холестерин в мозгу хрящевых и костистых рыб // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 1979. – 15, N 3. – С. 303–306.
5. Aloia R.C. Phospholipid composition of the hibernating ground squirrel (*Citellus lateralis*) kidney and low temperature membrane function // Comp. Biochem. Physiol. – 1978. – N 1. – P. 19–26.
6. Aloia R.C. The role of membrane fatty acids in mammalian hibernation // Feder. Proc. – 1980. – 39, N 12. – P. 2974–2979.
7. Folch P.J., Lees M., Sloane-Stenley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – 226, N 1. – P. 497–509.
8. Goldman S.S. Cold resistance of lipid adaptation // Am. J. Physiol. – 1975. – 228, N. 3. – P. 834–838.
9. Lowry R.R., Tinsley I.I. A simple, sensitive method for lipid phosphorus // Lipids. – 1974. – 9, N 7. P. 491–492.
10. Lyons J.M., Raison J.K. A temperature-induced transition in mitochondrial oxidation: contrast between cold and warm-blooded animals // Comp. Biochem. Physiol. – 1970. – 37, N 3. – P. 405–411.
11. Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots // Lipids. – 1970. – 5, N 5. – P. 494–496.
12. Wang L.C. Live at low temperature: mammalian hibernation // Cryo-Lett. – 1985. – 6, N 4. – P. 257–274.

13. Wang L.C.H. Mammalian hibernation: an escape from the cold // *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. 2. – Berlin: Springer, 1988. – P. 361–401.
14. Zlatkin A., Zak B., Boyle A.J. A new method for the direct determination of serum cholesterol // *J. Lab. Clin. Med.* – 1953. – 41, N 3. – P. 486–492.

Ин-т эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М.Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург

Поступила 24.02.93

С.А.ЗАБЕЛІНСЬКИЙ, Є.Л.ПОЛЯКОВ, М.А.ЧЕБОТАРЬОВА

## ЛІПІДНИЙ СКЛАД ОРГАНІВ ЗОЛОТАВИХ ХОМ'ЯЧКІВ І ЇХ СТІЙКІСТЬ ДО ВОДНОГО ОХОЛОДЖЕННЯ У РІЗНІ СЕЗОНИ РОКУ

Інститут еволюційної фізіології і біохімії ім. І.М.Сеченова РАН,  
м. Санкт-Петербург

Серед 78 сірійських хом'ячків *Mesocricetus auratus* виявлені дві контрастні групи тварин по стійкості до водного охолодження під час плавання (15 °C). Групи розрізнялись по реакціях у поведінці, швидкості охолодження тіла і тривалості періоду відновлення реакцій у поведінці. У серці, легенях, нирках, мозку і крові двох контрастних груп були вивчені мембранозв'язані ліпіди. У досліджуваних органах не виявлено відмінностей між відносним вмістом фосфоліпідів та у їх жирнокислотному стані ані між контрастними групами тварин, ані протягом річного циклу. Висловлено припущення, що ліпідний спектр органів гібернаторів у процесі еволюції пристосований для забезпечення життєдіяльності клітин у широкому діапазоні температур.

S.A.ZABELINSKY, E.L.POLYAKOV, M.A.CHEBOTAREVA

## THE ORGAN LIPID COMPOSITION OF GOLDEN HAMSTERS AND THEIR RESISTANCE TO WATER COOLING IN DIFFERENT SEASONS

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

Seventy eight male golden hamsters *Mesocricetus auratus* were subdivided into two contrast groups according to their resistance to swimming in cold water (15 °C). The groups differed by behavior, rate of body cooling and time of recovery of behavior reactions. Membrane bound lipids were studied in the heart, lungs, kidneys, and brain. No difference has been found in the phospholipid content and fatty acid composition both between the contrast animal groups and in different seasons. It has been supposed that the lipid spectrum of hibernator organs has been adapted during evolution to provide for the vital activity of cells in a wide temperature range.

УДК 57.043

А.В.Зинченко, И.Б.Мусатова

## ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕЙ ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ – НАГРЕВЕ

С помощью зондовой методики исследовалось генерирование электрических полей в водных растворах низкомолекулярных полиэтиленгликолей молекулярных масс 300, 400 и 600 (ПЭГ-300, ПЭГ-400, ПЭГ-600) в ходе охлаждения до температуры жидкого азота и последующего нагрева. Скорость охлаждения – 100 °C/мин, нагрева – 70 °C/мин. Показано, что с ростом концентрации водного раствора ПЭГ и с ростом молекулярной массы ПЭГ интенсивность генерации нескомпенсированных электрических полей увеличивается как на стадии охлаждения, так и нагрева. В системе вода–ПЭГ-600 наблюдаются максимумы интенсивности генерации электрических полей в областях концентраций 40 и 75%. Наблюдаемые экспериментальные факты объясняются в предположении, что генерирование электрических полей в растворах ПЭГ при охлаждении и нагреве, обусловлено возникновением двойного электрического слоя в процессе кристаллизации льда или неэлектролита, а также при растрескивании твердофазной матрицы в результате развития термомеханических напряжений.

В настоящей работе исследовалась генерация электрических полей в водных растворах низкомолекулярных полиэтиленгликолей при охлаждении от комнатной температуры до  $-196^{\circ}\text{C}$  и последующем нагреве. Эксперименты проведены на специальной установке, разработанной и изготовленной в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины, позволяющей регистрировать с помощью зонда электрические импульсы в материале в процессе его охлаждения и нагрева [3].

Растворы готовили из полиэтиленгликолей молекулярных масс 300 (ПЭГ-300), 400 (ПЭГ-400), 600 (ПЭГ-600) и бидистиллята весовым методом. Образец с погруженным в него зондом охлаждали жидким азотом со скоростью  $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , затем нагревали со скоростью  $70^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Импульсы регистрировали с помощью частотомера ЧЗ - 32, включенного в режиме счета импульсов или на самописце после интегрирования на RC-цепочке и усиления.

В качестве примера на рис. 1 приведена огибающая импульсных сигналов, полученная интегрированием импульсов на RC-цепочке, в зависимости от температуры для 90%-го водного раствора ПЭГ-300 при охлаждении. Эта величина может служить показателем интенсивности генерации электрических полей в материале в ходе изменения его температуры.

Огибающая (рис. 1) имеет два температурных диапазона возникновения интенсивной генерации электрических импульсов: первый (а) — от  $-33^{\circ}\text{C}$  до  $-78^{\circ}\text{C}$ , второй (б) — от  $-97^{\circ}\text{C}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$ , причем интегральная интенсивность электрических импульсов во втором диапазоне значительно выше, чем в первом. Как водные растворы ПЭГ-300, так и ПЭГ-400, обнаруживают указанную особенность, начиная с концентрации 75% и выше, до 100 % включительно, а ПЭГ-600 — от 33% до 100%.

Известно, что во многих веществах в ходе изменения их температуры при фазовом переходе могут генерироваться электрические поля в результате образования двойного электрического слоя (эффект Коста Рибейро [5]). Процесс разделения зарядов развивается на границе между двумя фазами, если граница движется. Таким образом, двойной слой существует до тех пор, пока происходит рост кристаллов. Если обе фазы находя в равновесии, то граница между ними стационарна, и электрические явления не наблюдаются. Другим механизмом генерирования электрических импульсов является разделение зарядов при растрескивании материала [1]. В связи с этим можно предположить, что появление двух температурных областей возникновения электрических импульсов обусловлено разными механизмами. В первой температурной области это явление, по-видимому, связано с образованием двойно-

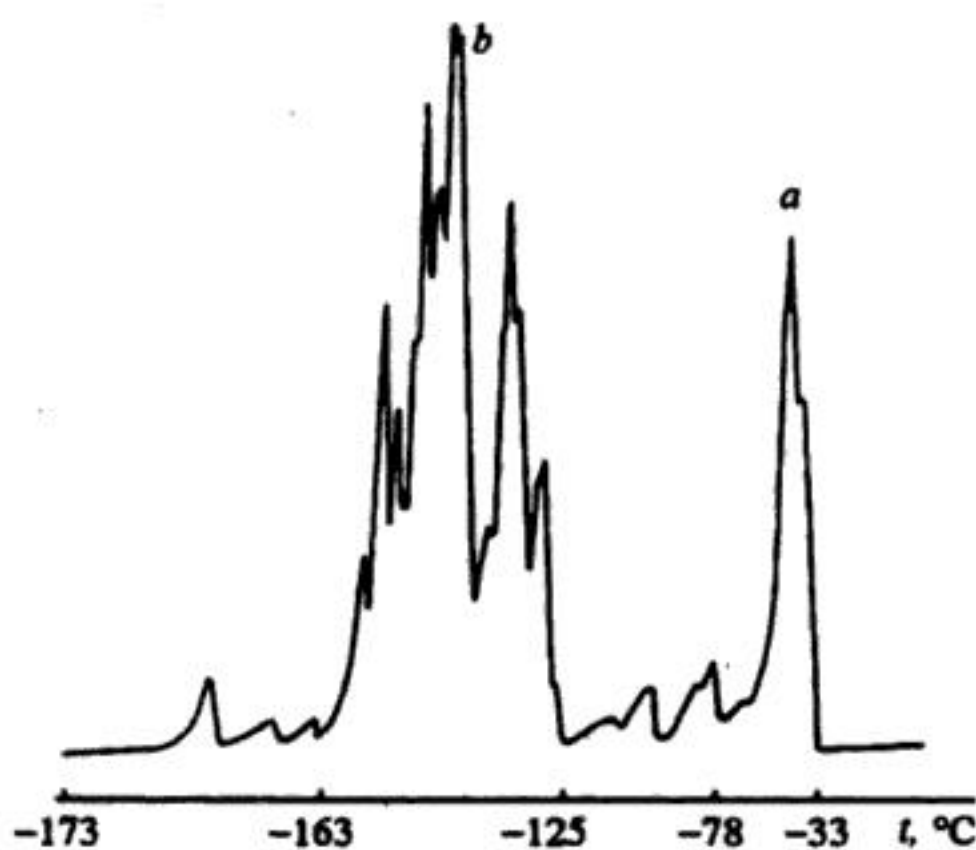


Рис. 1. Огибающая импульсных сигналов на зонде в температурном интервале их генерирования для 90%-го водного раствора ПЭГ-300

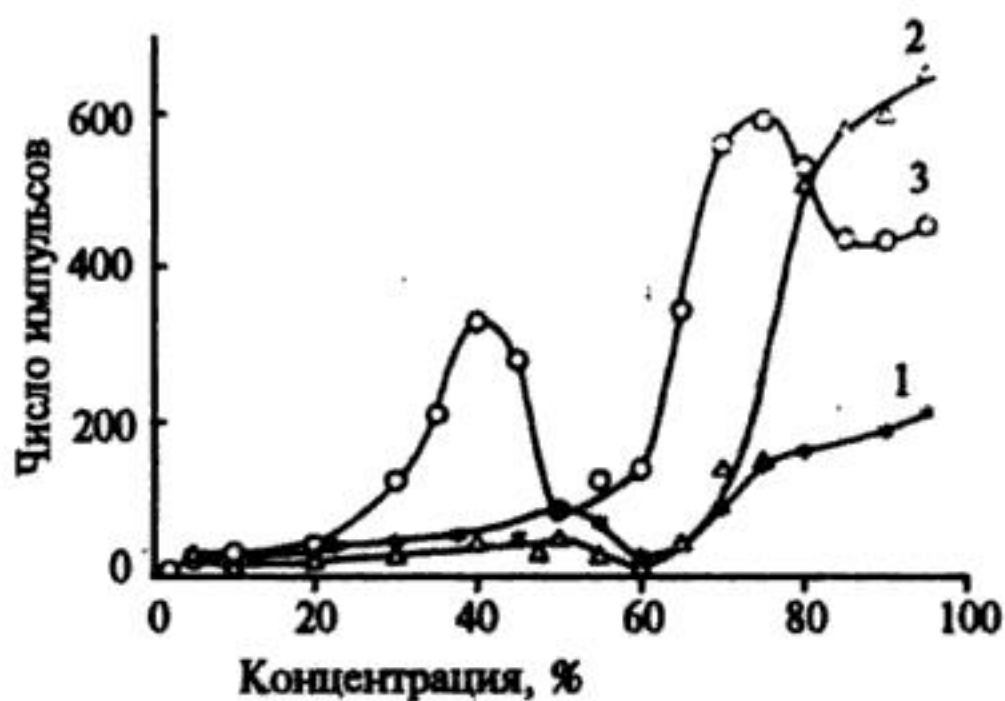


Рис. 2. Зависимость интегральной интенсивности электрических импульсов на зонде для водных растворов ПЭГ-300, ПЭГ-400 и ПЭГ-600 при охлаждении: 1, ПЭГ-300; 2, ПЭГ-400; 3, ПЭГ-600

стоящее время концепции [1], вновь образованные поверхности (края трещины) рассматриваются как неравновесные образования. Появление новых поверхностей сопровождается электрическими явлениями, к которым относятся газовый разряд и эмиссия электронов. Механическая энергия разрушения тратится на разрыв когезионных связей и разделение противоположных зарядов [4]. Таким образом, края трещины можно рассматривать, как обкладки заряженного конденсатора. При достаточно большой разности потенциалов может наступить пробой межэлектродного промежутка.

На рис. 2 приведены зависимости количества электрических импульсов от концентрации  $N = f(C)$  для водных растворов ПЭГ-300, ПЭГ-400 и ПЭГ-600 при охлаждении, а на рис. 3 – при нагреве. Для всех трех систем наблюдается рост количества импульсов с увеличением концентрации неэлектролита. Естественно предположить, что эта закономерность связана с особенностями фазовых превращений в системе вода – ПЭГ. Анализируя диаграммы физических состояний систем вода – ПЭГ-300 и вода – ПЭГ-400 [2], можно видеть, что в диапазоне концентраций 62 – 85% ПЭГ-300 и 65 – 75% ПЭГ-400 при охлаждении полностью стеклуются. Кристаллизация неэлектролитов развивается только в растворах, содержащих более 85% и 75% ПЭГ-300 и ПЭГ-400 соответственно.

Как видно из рис. 2 и 3 для вышеуказанных диапазонов концентраций, где растворы при охлаждении полностью стеклуются, количество генерируемых импульсов значительно больше, чем для других концентраций. Отмеченные выше представления о разделении зарядов на вновь образованных поверхностях [3] дают основание думать,

го электрического слоя между кристаллами льда или неэлектролита (в зависимости от концентрации) и переохлажденными аморфными включениями эвтектического состава. После окончательного затвердевания образца (стеклование аморфных включений) двойной слой исчезает, и вклад в генерацию электрических импульсов вносит растрескивание образца. Согласно существующей в на-

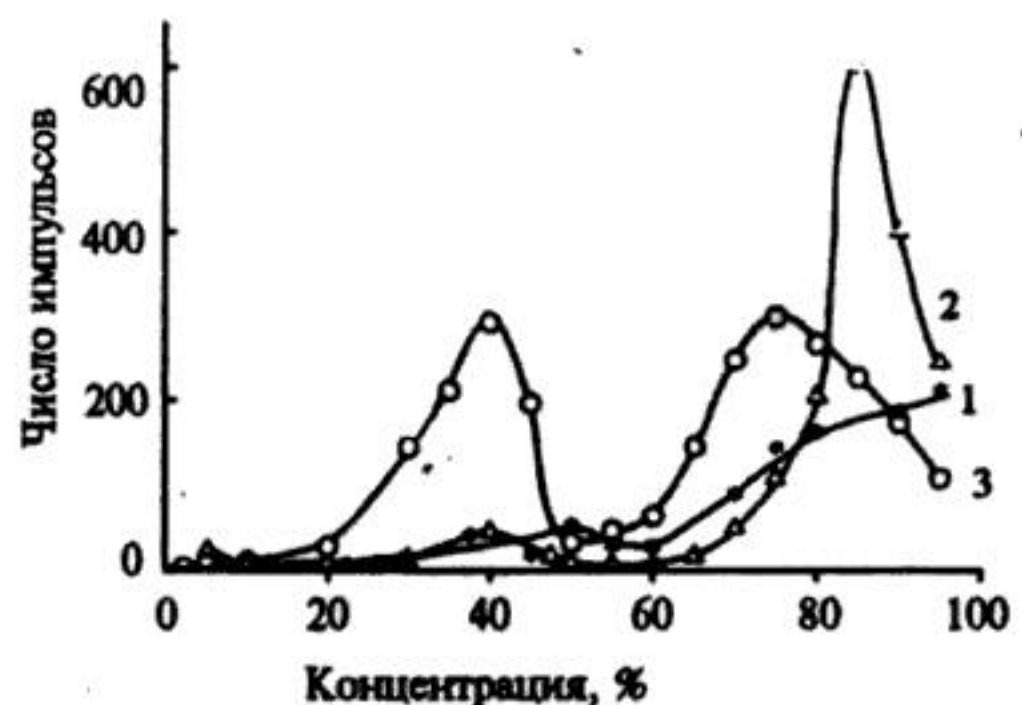


Рис. 3. Зависимость интегральной интенсивности электрических импульсов на зонде для водных растворов ПЭГ-300, ПЭГ-400 и ПЭГ-600 при нагреве: 1, ПЭГ-300; 2, ПЭГ-400; 3, ПЭГ-600

[3] дают основание думать, что в этом концентрационном диапазоне генерация электрических полей связана с растрескиванием стеклообразной матрицы. При еще более высоких концентрациях ПЭГ вклад в количество электрических импульсов вносят как стеклообразные, так и кристаллические формы образца.

Концентрационная зависимость электрических импульсов для системы вода – ПЭГ–600 отличается от других исследованных нами систем наличием двух явно выраженных максимумов в областях концентраций 40 и 75% (рис. 2, 3). Такое отличие можно связать со структурными изменениями растворов: именно на этот диапазон молекулярных масс приходится структурный переход молекул ПЭГ от линейной конформации к спиральной. В результате этого при охлаждении растворов ПЭГ–600 остается значительное количество переохлажденной воды в меандрических структурах ПЭГ–600, происходит частичная кристаллизация эвтектических составов, а также кристаллизация ПЭГ–600 в области высоких концентраций неэлектролита.

Сопоставление концентрационной зависимости количества электрических импульсов для растворов ПЭГ–600 (рис. 2, 3) и диаграммы физических состояний системы вода – ПЭГ–600 [2] позволяет дать следующие объяснения некоторых особенностей указанной зависимости: 1. Существование первого максимума обусловлено, вероятно, как растрескиванием матрицы, так и образованием двойного электрического слоя между кристаллической фазой (растущим льдом) и жидкостью. В состав последней входят и свободная вода, и переохлажденные аморфные включения, стеклующиеся при  $-84 + -85^{\circ}\text{C}$ . 2. Резкий подъем на кривой в области концентраций 60 – 70% ПЭГ–600 связан с макроразрушениями стеклообразных фаз в образце. 3. Уменьшение количества импульсов при концентрации более 75% ПЭГ–600 связано с тем, что в этой области составов кристаллизуется ПЭГ–600 из стеклообразного состояния, и генерация электрических полей происходит по механизму двойного слоя на границах растущих кристаллов. Вклад этого механизма в генерацию электрических полей меньше, чем растрескивание стеклообразных фаз той же массы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Барамбойм Н.К. Механохимия высокомолекулярных соединений. – М.: Химия, 1978 – 384 с.
2. Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Моисеев В.А. О низкотемпературных фазовых переходах в водных растворах полиэтиленгликолей // Рук. деп. в ВИНТИ 29.04.87 N3021 – В87.
3. Зинченко А.В., Моисеев В.А. Механоэлектрические явления в растворах криопротекторов при замораживании – нагреве // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. – Харьков. – 1990. – С. 50–56.
4. Мамбетов Д.М. Электроразрядные и эмиссионные явления при адгезионном и когезионном разрушении твердых тел // Материалы 2-го Всесоюз. симпозиума по механоэмиссии и механохимии твердых тел, 1969 г. – Фрунзе: Илим, 1974. – С. 20–26.
5. Dias Tavares A. The Costa Ribeiro effect and allied phenomena // J. Molec. Liquids. – 1988. – P. 171–197.

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

Поступила 22.06.92

О.В.ЗИНЧЕНКО, І.Б.МУСАТОВА

## ЕЛЕКТРИЧНІ ЯВИЩА В ВОДНИХ РОЗЧИНАХ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛІВ ПІД ЧАС ОХОЛОДЖЕННЯ-НАГРІВАННЯ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, Харків

За допомогою зондової методики досліджувалось генерування електричних полів в водних розчинах низькомолекулярних поліетиленгліколів молекулярних мас 300, 400 і 600 (ПЕГ-300, ПЕГ-400, ПЕГ-600) в процесі охолодження до температури рідкого азоту і наступного нагрівання. Швидкість охолодження 100 °С/хв, нагрівання – 70 °С/хв. Показано, що із збільшенням концентрації водного розчину ПЕГ і збільшенням молекулярної маси ПЕГ інтенсивність генерації некомпенсованих електричних полів збільшується як на стадії охолодження, так і нагрівання. В системі вода-ПЕГ-600 спостерігаються максимуми інтенсивності генерації електричних полів в областях концентрації 40% і 75%. Факти, що спостерігаються експериментально, пояснюються в допущенні, що генерування електричних полів в розчинах ПЕГ під час охолодження і нагрівання зумовлене виникненням подвійного електричного шару в процесі кристалізації льоду або неелектроліту, а також при розтріскуванні твердофазної матриці внаслідок розвитку термомеханічних напружень.

A.V.ZINCHENKO, I.B.MUSATOVA

## ELECTRIC PHENOMENA IN AQUEOUS SOLUTIONS OF LOW MOLECULAR POLYETHYLENE GLYCOLS UPON COOLING-REWARMING

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

Electric fields were generated in aqueous solutions of polyethylene glycols of molecular weights 300, 400, and 600 (PEG-300, PEG-400, PEG-600) upon cooling to liquid nitrogen temperature and further rewarming using the probe method. Cooling was carried out at a rate of 100 °C/min, rewarming at 70 °C/min. It has been shown that the intensity of generation of non-compensated electric fields increases with increasing the concentration and molecular weight of PEG both upon cooling and rewarming. Generation intensity peaks of electric fields are observed in the water – PEG-600 systems in the range of concentrations of 40 and 75%. The observed experimental events may be explained by the fact that the generation of electric fields in PEG solutions upon freezing and rewarming is due to the appearance of a double electric layer during crystallization of ice or non-electrolyte as well as during cracking of the solid matrix due to thermomechanical tensions.

УДК 617.7-08:53.648

В.М.Чередниченко, П.А.Бездетко, В.В.Барсуков,  
Г.И.Губина-Вакулик, Л.В.Самосудова

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТКАНЕЙ ГЛАЗА КРОЛИКА ПРИ ТРАНСКОНЪЮНКТИВАЛЬНО-СКЛЕРАЛЬНОЙ ЦИКЛОКРИОПЕКСИИ

В эксперименте на глазах кроликов (50 глаз) проводилась криопексия трансконъюнктивно-склерально в области проекции цилиарного тела. Для криопексии использовался наконечник диаметром 2 мм и температурой –80 °С. По длительности криовоздействия экспериментальные животные были разделены на две группы: 1, криовоздействие осуществлялось в течение 20 с; 2, криовоздействие выполнялось двухэтапно: после криопексии длительностью 20 с повторно с интервалом в 1 мин проводилась криопексия длительностью 20 с в месте прежнего криовоздействия. Установлено, что локальное криовоздействие в области проекции цилиарного тела вызывает морфологические изменения тканей глаз не только в очаге криопексии, но и в соседних тканях, в частности, в оболочках заднего отрезка глаза, в парамакулярной и макулярной областях. Выраженность морфологических изменений зависит от длительности криовоздействия.

К настоящему времени в литературе накопилось много данных о ценности криотерапии и расширении показаний к ее применению в офтальмологии [1-3, 5-8]. К сожалению, в большинстве исследований, посвященных изучению морфологических изменений тканей глаза после криокоагуляции, авторы описывают изменения тканей, которые возникают непосредственно в очаге поражения, часто без уточнения динамики процесса, без учета деструктивных и регенераторно-гиперпластических изменений в других отделах глаза. В то же время эти данные важны, так как "реактивные изменения" могут способствовать возникновению стойких патологических изменений глаза.

Мы предприняли собственные экспериментальные исследования с целью уточнения морфологических изменений тканей оболочек глаза, возникающих при трансконъюнктивально-склеральной циклокриопексии, и их корреляции с деструктивными и регенераторно-гиперпластическими изменениями в оболочках заднего отрезка глаза.

Экспериментальные исследования выполнены на кроликах породы шиншилла весом от 2,5 до 4,0 кг. Всего в эксперименте было использовано 25 животных (50 глаз). Эксперимент проводили в летнее время. Все животные находились в одинаковых условиях содержания и питания.

В эксперименте использована криоустановка офтальмологическая УМ-14, созданная в Физико-техническом институте низких температур АН Украины Б.Н.Муринец-Маркевичем, В.Я.Осиповым и В.М.Чердниченко. В криоустановке в качестве хладагента использовалась закись азота. Криопексия проводилась традиционным ретинальным криозондом диаметром 2 мм с температурой наконечника  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Всем экспериментальным животным до операции для обезболивания вводился внутримышечно 1%-й раствор гексенала из расчета

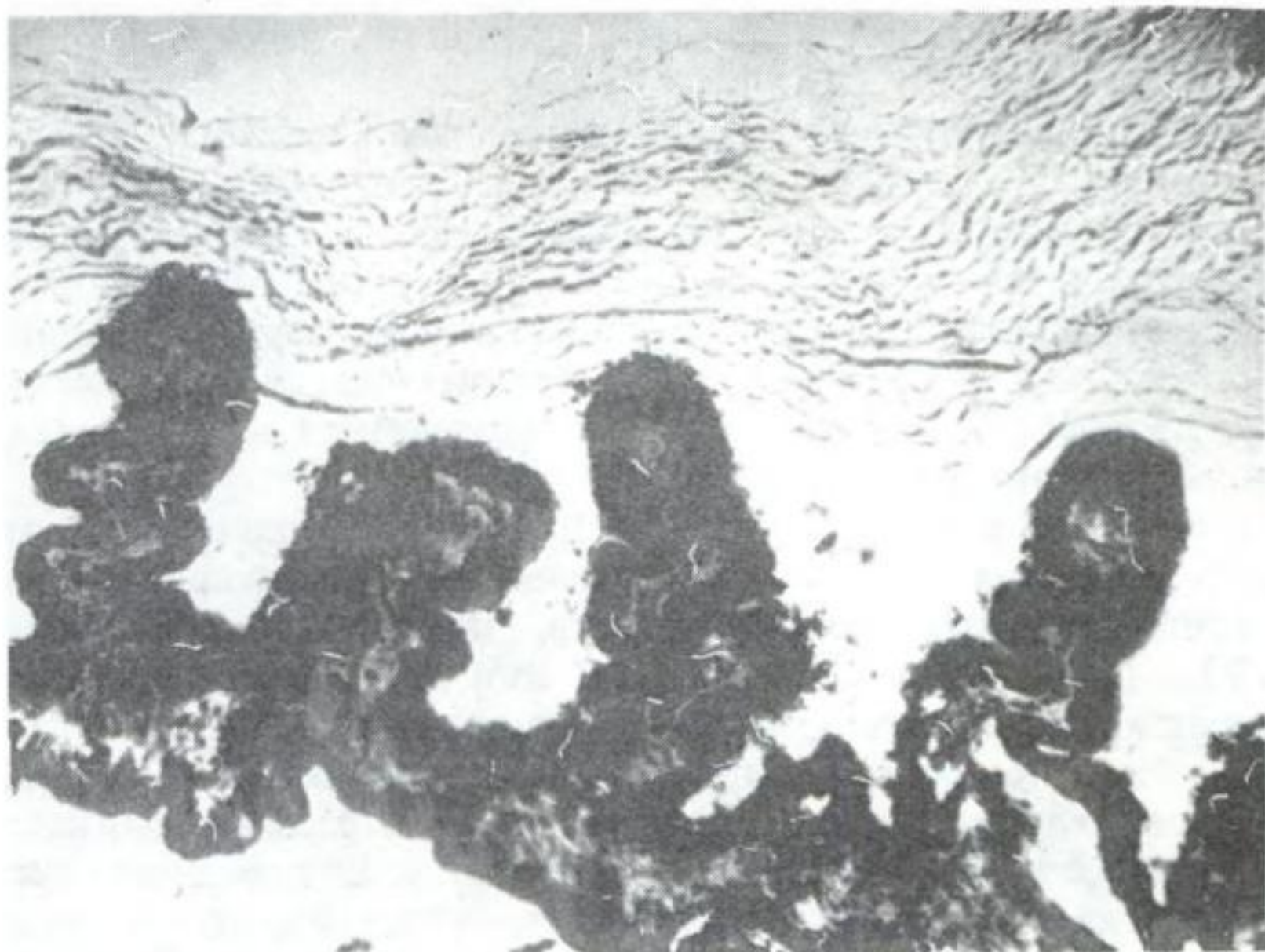


Рис. 1. Цилиарные отростки через 1 сут после двухэтапной криопексии. Разрушение беспигментного эпителия. Выход пигментных зерен из меланоцитов пигментного эпителия. Ядра фиброцитов стромы пикнотичны и гиперхромны. Гематоксилин-эозин  $\times 400$

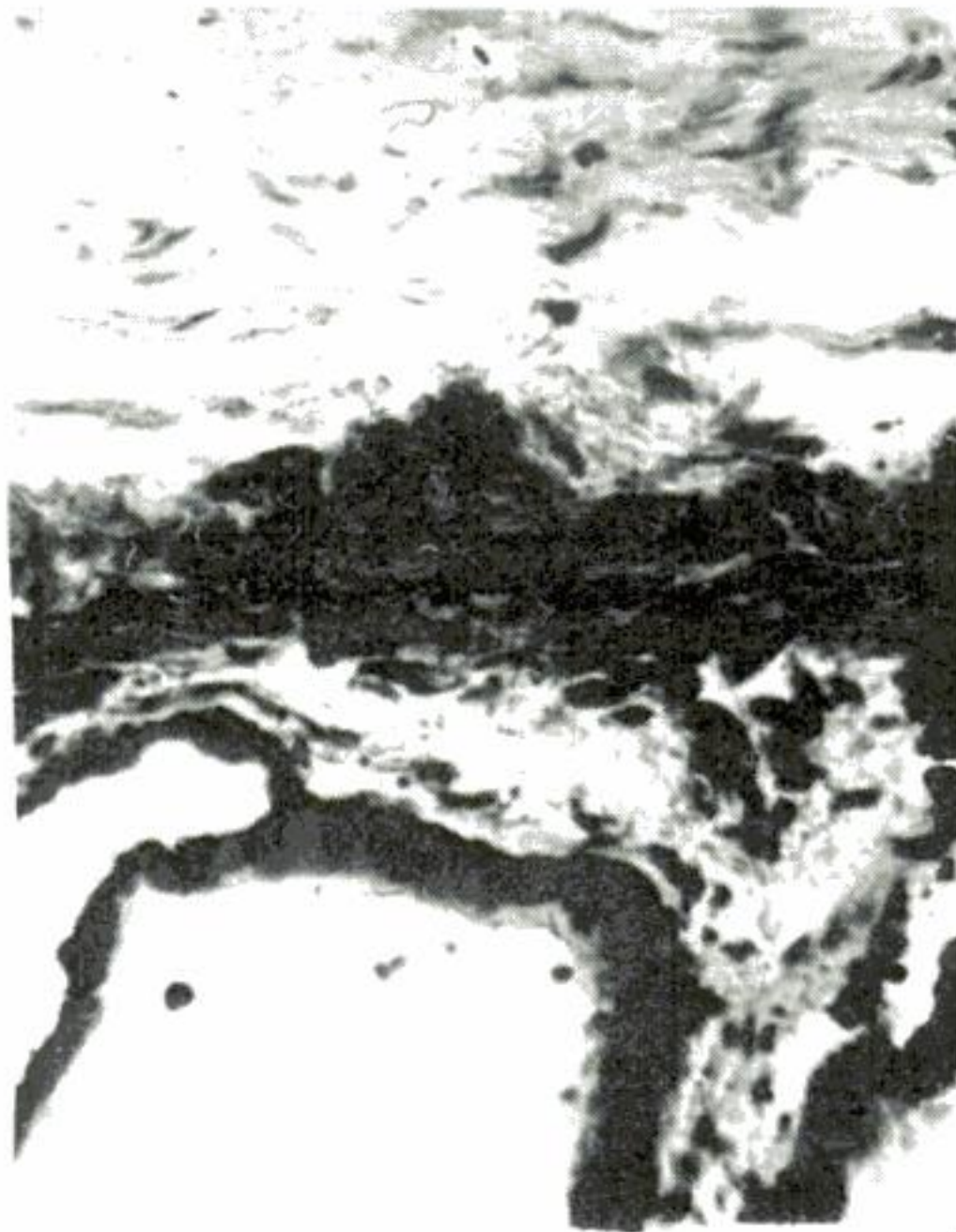


Рис. 2. Цилиарное тело через 3 сут после двухэтапной криопексии. Восстановление цилиарного эпителия. В строме много пигментных клеток и фибробластов. Гематоксилин-эозин  $\times 600$

10 мл раствора на 1 кг массы животного. Общее обезболивание дополнялось инстилляциями 1%-го раствора дикаина в конъюнктивальную полость.

Криопексия проводилась трансконъюнктивально-склерально в области проекции цилиарного тела в меридиане 12 часов в 3-6 мм от лимба.

В первой части эксперимента на 3 кроликах (6 глаз) произведена криоретинопексия под офтальмологическим контролем зоны замораживания. Криоретинопексия проводилась до появления ледяного шарика в области криовоздействия (II степень повреждения). Проведенные экспериментальные исследования показали, что такая степень повреждения достигается в среднем за 20 с. Поэтому в дальнейших исследованиях на кроликах контроль степени криовоздействия осуществляли по времени экспозиции холода.

Экспериментальные животные по длительности криовоздействия были разделены на две группы: 1, длительность криопексии составила 20 с; 2, криопексия проводилась двухэтапно: после криопексии длительностью 20 с повторно с интервалом в 1 мин проводилась криопексия длительностью 20 с в месте прежнего криовоздействия.

Клинически послеоперационный период у кроликов протекал гладко. В течение первой недели глаза были умеренно раздражены, наблюдался умеренный локальный отек в верхней половине переднего отрезка глазного яблока. Животные выводились из эксперимента воздушной эмболией через 1 сут, 3 сут, 7 сут, 14 сут после криопексии. Глаза после энуклеации фиксировали в 10%-м нейтральном растворе формалина. После фиксации с двух сторон глазных яблок удаляли полусферы, оставшийся кольцевидный фрагмент тканей толщиной 5-6 мм, включа-

ющий очаг криовоздействия и макулярную область, ориентировали в горизонтальной плоскости и заливали целлоидин-парафином. Затем готовились гистологические срезы толщиной 10 мкм, которые окрашивали по Ван-Гизону и гематоксилин-эозином. Контролем служили глаза кроликов, не подвергшихся криовоздействию (интактные животные). В ряде случаев контролем служили глаза, не подвергнутые криовоздействию, морфологическая структура тканей которых не отличалась от морфологической структуры тканей глаз интактных животных.

Для просмотра использовали микроскоп МБИ-3, отдельные участки фотографировались на микроустановке Д-16 "Rathenow".

*Результаты однократного криовоздействия.* Микроскопические исследования глаз, энуклеированных через 1 сут после криопексии выявили отек конъюнктивы. Сосуды склеры, стромы цилиарного тела и цилиарных отростков, сосудистой оболочки полнокровны во всех отделах глазного яблока. Беспигментный эпителий цилиарных отростков частично разрушен. Слой пигментного эпителия значительно утолщен. Много пигмента вне клеток, из-за чего строма цилиарных отростков почти не определяется. Между склерой и основанием цилиарного тела в области очага криовоздействия отмечается скопление отечной жидкости. Сосудистая и сетчатая оболочки задних отделов глаза отечны. В сетчатой оболочке на всем ее протяжении ядерные слои сближены, нарушена структура сетчатых слоев.

Через 3 сут после криовоздействия отек конъюнктивы уменьшился. Сосуды оболочек менее полнокровны, чем в предыдущем сроке. Беспигментный эпителий определяется на всем протяжении цилиарных отростков. Слой пигментного эпителия утолщен за счет переполнения клеток пигментом. Ядра клеток соединительной ткани пикнотичны. В области очага криовоздействия определяются молодые клетки со светлыми ядрами. Структура сосудистой и сетчатой оболочек в заднем отрезке глазного яблока почти не отличается от предыдущего срока.

Через 7 сут после криовоздействия сосуды оболочек полнокровны на всем протяжении, тинкториальные свойства тканей глаза не нарушены. В стромах цилиарного тела и цилиарных отростков много молодых клеток со светлыми ядрами. Определяются вытянутые отростчатые клетки с пигментом в цитоплазме. Клетки пигментных слоев, по сравнению с контролем, переполнены пигментом, вне клеток пигмент не определяется. В области очага криовоздействия соединительная ткань оболочек выглядит более зрелой. В задних отделах глазного яблока в стромах оболочек и вокруг сосудов определяется большее количество молодых клеток. Ядра клеток зернистых слоев сетчатой оболочки нормохромны, сохранена структура сетчатых слоев.

*Результаты двухэтапного криовоздействия.* Через одни сутки после криовоздействия отмечается отечность и утолщение конъюнктивы и склеры. В области очага криовоздействия сосуды цилиарного тела и цилиарных отростков расширены, строма многоклеточна, ядра фибробластов гиперхромны и пикнотичны, отмечается скопление зерен пигмента в межклеточном веществе. На всем протяжении цилиарных отростков отсутствует беспигментный и значительно утолщен пигментный эпителиальный слой. Определяется обилие зерен пигмента вне меланоцитов (рис. 1).

В заднем отрезке глазного яблока сосудистая оболочка отечна, перихориоидальное пространство расширено, сосуды собственного вещества полнокровны. В сетчатой оболочке наружный и внутренний зернистые слои почти сливаются, ядра клеток гиперхромны, на отдельных участках частично фрагментированы, сетчатые слои выглядят гомогенными, слой нервных волокон слабо окрашивается эозином.

Через 3 сут в очаге криовоздействия сохраняется умеренный отек конъюнктивы. В склере и в строме сосудистой оболочки ядра клеток пикнотичны, межклеточное вещество отечно, коллагеновые волокна частично фрагментированы. Отмечается отек, утолщение и расслоение оболочек. В цилиарном теле выражен эпителиальный слой, насыщенный меланином. Скопление свободного меланина отмечается вблизи эпителиального слоя, а также в строме цилиарных отростков. Почти везде хорошо просматривается беспигментный цилиарный эпителий (рис. 2). В строме цилиарного тела, в собственно сосудистой оболочке и в радужке значительно больше пигментных клеток, по сравнению с контролем. Через 3 сут после криовоздействия сохраняются выраженные нарушения морфологической структуры сетчатой и сосудистой оболочек в парамакулярной и макулярной областях. Отмечается расширение зернистых слоев, по сравнению с интактным глазом. Ядра клеток пикнотичны, гиперхромны. Нарушена структура сетчатых слоев. В слое нейроэпителия определяются скопления серозного экссудата. В сосудистой оболочке сохраняется отек и полнокровие сосудов. Через 7 сут в области очага криовоздействия в склере и в строме цилиарного тела появляются молодые клетки со светлыми ядрами. Уменьшается полнокровие сосудов. Определяются отростчатые клетки с зернами пигмента в цитоплазме. Пигментный эпителий цилиарных отростков становится более узким по сравнению с предыдущим сроком. В заднем отрезке глазного яблока отмечается восстановление морфологической структуры сетчатых слоев, слоя нейроэпителия, слоя нервных волокон. Много ядер клеток зернистых слоев имеют правильную форму. Через 14 сут после криовоздействия определяется нормализация морфологической структуры тканей глазных яблок. Молодые клетки со светлыми ядрами появляются в строме заднего отрезка глазного яблока. В сетчатой оболочке хорошо различаются все слои. Ядра клеток нормохромны, правильной формы. В слое нервных волокон определяется правильная их ориентация.

Таким образом, локальное криовоздействие в области проекции цилиарного тела вызывает морфологические изменения во всем отделах оболочек глазного яблока, которые можно охарактеризовать как асептическое воспаление. Патологические изменения наблюдаются не только в очаге криовоздействия, но и в соседних с очагом тканях, а также в оболочках заднего отрезка глазного яблока, в парамакулярной и макулярной областях глазного дна. Наиболее выраженные патологические изменения наблюдаются через сутки после криовоздействия. Через 3 сут после криовоздействия появляются признаки регенерации, через 14 сут морфологическая структура тканей глазных яблок приближается к морфологической картине тканей контрольных глаз. Выраженность морфологических изменений в тканях глазных яблок зависит от длительности криовоздействия.

Харьковский ин-т усовершенствования врачей;  
Харьковский медицинский ин-т

Поступила 05.05.92

В.М.ЧЕРЕДНИЧЕНКО, П.А.БЕЗДІТКО, В.В.БАРСУКОВ, Г.І.ГУБІНА-ВАКУЛИК, Л.В.САМО-  
СУДОВА

## МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТКАНИН ОКА КРОЛЯ ПРИ ТРАНСКОН'ЮНКТИВАЛЬНО-СКЛЕРАЛЬНІЙ ЦИКЛОКРІОПЕКСІЇ

Харківський інститут вдосконалення лікарів; Харківський медичний  
інститут

В експерименті на очах кролів (50 очей) проводилась кріопексія транскон'юнктиваль-  
но-склерально в галузі проєкції циліарного тіла. Для кріопексії використовувався нако-  
нечник діаметром 2 мм і температурою  $-80^{\circ}\text{C}$ . По тривалості кріовпливу експериментальні  
тварини були розділені на дві групи: 1, кріовплив здійснювався протягом 20 с; 2, кріовплив  
виконувався у два етапи: після кріопексії тривалістю 20 с повторно з інтервалом у 1 хв  
проводилась кріопексія тривалістю 20 с у місці попереднього кріовпливу. Установлено, що  
локальний кріовплив у галузі проєкції циліарного тіла викликає морфологічні зміни тканин  
очей не лише в осередку кріопексії, але і в сусідніх тканинах, зокрема, в оболонках заднього  
відрізку ока, у парамакулярній і макулярній ділянках. Вираженість морфологічних змін  
залежить від тривалості кріовпливу.

V.M.CHEREDNICHENKO, P.A.BEZDETOKO, V.V.BARSUKOV, G.I.GUBINA-VAKULIK, L.V.SA-  
MOSUDOVA

## MORPHOLOGICAL CHANGES IN RABBIT EYE TISSUES DURING TRANSCONJUNCTIVAL-SCLERAL CYCLOCRYOPEXIA

Kharkov Advanced Training Institute for Doctors; Medical Institute of  
Kharkov

Experiments were carried out on 50 rabbit eyes. Transconjunctival-scleral cryopexy was per-  
formed in the region of ciliary body projection. Cryopexy was performed by a usual retinal cryoprobe  
of 2 mm with the applicant temperature of  $-80^{\circ}\text{C}$ . Experimental animals were subdivided into two  
groups by the duration of cryoapplication: 1, the duration of cryopexy was 20 s; 2, cryoretinopexy  
was carried out in two steps, after 20 s cryopexy the procedure was repeated with 1 min interval for  
20 s at the same region. The local cryoapplication in the region of ciliary body projection induces  
morphological changes not only in the focus of cryoapplication but in the neighboring tissues and  
membranes of the posterior eyeball segment, in paramacular and macular regions. The extent of  
morphological changes in eyeball tissues depends on the duration of cryoapplication.

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 57.086.13:576.828

И.Ю.Дранов, Ш.У.Янгулов, А.Н.Терентьев, С.Р.Саямов

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ВИРУС ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

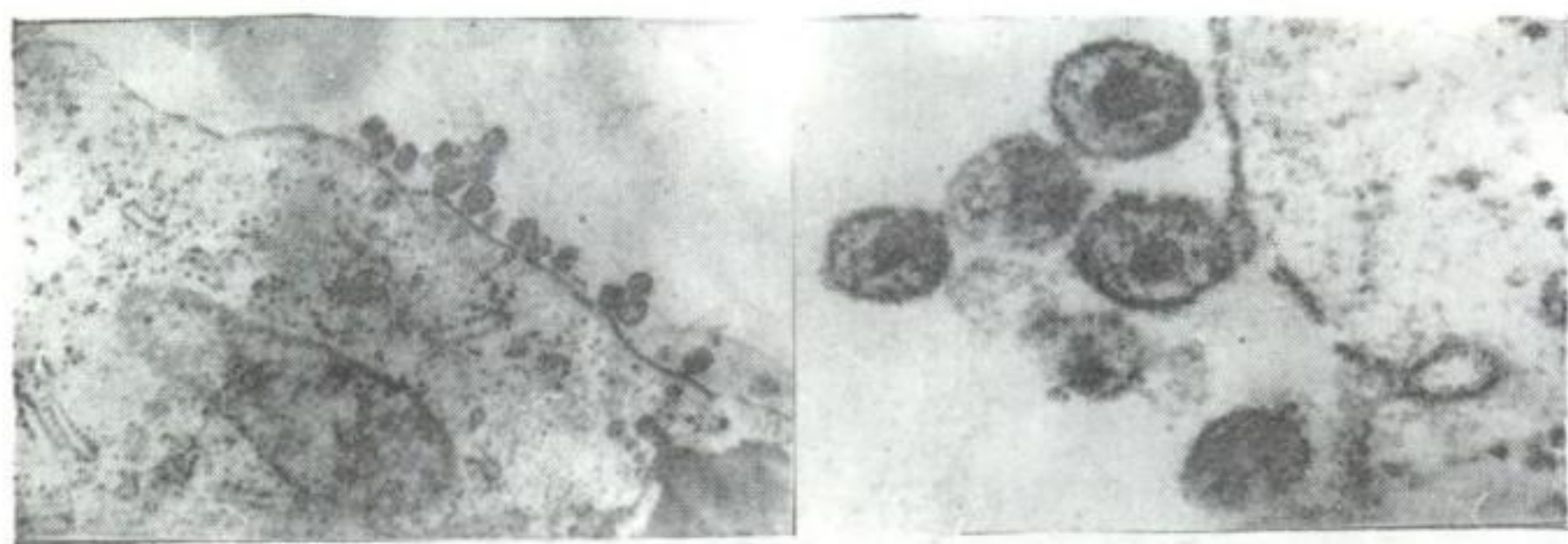
Исследовано влияние различных криопротекторов, режимов замораживания и кон-  
центрации замораживаемых клеток-продуцентов на их выживаемость при длительном сох-  
ранении в жидком азоте и последующую способность к продукции вируса ВИЧ-1.

Изучение вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) является в насто-  
ящее время одной из самых острых проблем в вирусологии. Многие ас-  
пекты проблемы, такие как изучение взаимодействия вирус-клетка,  
изучение протективных свойств различных химических соединений, а  
также создание новых диагностических препаратов требуют работы не-

посредственно с вирусом. Разворачивающиеся работы по вирусологической диагностике СПИДа привели к появлению большого количества изолятов ВИЧ, отдельные представители которых имеют различные антигенные свойства. Все это диктует необходимость разработки надежных и доступных большинству лабораторий методов хранения инфицированных клеток, а также клеток продуцентов ВИЧ. Одним из них является лиофилизация, используемая для сохранения вирусов, которая не нашла довольно большого применения ввиду сложности оборудования и изменения биологических свойств объектов [4]. Другим является метод криоконсервирования. Известно, что этот метод используется для сохранения вирусов многих таксономических групп [5].

Целью настоящей работы являются отработка условий замораживания клеток, зараженных или продуцирующих ВИЧ, изучение их жизнеспособности и экспрессии вирусных антигенов на поверхности клетки в процессе хранения в жидком азоте, а также сохранение типичной морфологии вновь образующихся вирионов.

В работе использовали перевиваемую клеточную линию Н-9/Ш-В, инфицированную ВИЧ-1 (Болгария). Клетки культивировались в виде суспензии в среде RPMI-1640 ("Флоу", Англия) с 15% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мМ буфера Хепес ("Серва", ФРГ), 2 мМ глутамина и 50 мг гентамицина в 1 мл. Жизнеспособность клеток определяли окраской трипановым синим. Для замораживания использовали концентрации  $2 \cdot 10^6$  –  $4 \cdot 10^6$  в 1 мл среды, состоящей из RPMI-1640, 50% эмбриональной сыворотки и 10% криопротектора. В качестве криопротектора использовали наиболее часто применяемые глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО) [1]. Клеточную массу осаждали центрифугированием, доводили плотность до одной из указанных выше величин средой замораживания и вносили в объеме 1 мл в ампулы для замораживания ("Нунк", Дания). После предварительной эквilibрации



*a*

*б*

Рис. 1. Электронограмма ВИЧ в культуре Н-9/Ш-В: *a* – от плазмолеммы клетки линии Н-9/Ш-В, инфицированной ВИЧ, деконсервированной после хранения в жидком азоте, отпочковываются многочисленные вирусные частицы.  $\times 48000$ ; *б* – на увеличенном фрагменте хорошо различима характерная для ВИЧ структура вириона, имеющая плотную сердцевину, содержащую нуклеотид.  $\times 232000$

Т а б л и ц а 1

Жизнеспособность клеток и экспрессия антигенов ВИЧ при использовании различных криопротекторов при разных скоростях замораживания

| Криопротектор            | Скорость замораживания, °С/мин |                     |                     |                     |                     |                     |
|--------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                          | 1                              |                     | 3                   |                     | 5                   |                     |
|                          | Жизнеспособность, %            | Экспрессия антигена | Жизнеспособность, % | Экспрессия антигена | Жизнеспособность, % | Экспрессия антигена |
| Глицерин 10%-й           | 70.2 ± 2.7                     | 62.0 ± 0.4          | 68.3 ± 0.3          | 60.0 ± 3.2          | 64.1 ± 2.1          | 59.0 ± 1.5          |
| Диметилсульф-оксид 10%-й | 67.1 ± 4.1                     | 60.1 ± 1.2          | 66.1 ± 1.4          | 58.2 ± 1.5          | 64.2 ± 1.1          | 57.3 ± 2.2          |

при 4 °С в течение 30 мин использовали двухэтапный режим замораживания. Первый этап осуществляли в низкотемпературном холодильнике ("Санио", Япония), при этом образцы помещались в пенопластовый контейнер. Скорость замораживания составляла 1, 3 °С/мин, а при использовании смеси сухого льда и спирта – 5 °С/мин и контролировалась с помощью датчика ТСМ-6-22 и самописца КСП-4. После достижения температуры –70 °С на втором этапе пробы переносили в сосуд Дьюара с жидким азотом и хранили в течение 1 года (срок наблюдения). Для определения оптимальной скорости замораживания и необходимого криопротектора пробы извлекались через 3–5 дней. Клетки размораживали в течение 3 мин при 37 °С и после отмывки ресуспендировали в ростовой среде. Исследовалась жизнеспособность клеток с помощью трипанового синего, а также способность экспрессировать на их поверхности антигены ВИЧ с помощью метода иммунофлуоресценции с использованием сыворотки больного СПИД, содержащей антитела ВИЧ [6]. В последующем после выбора необходимых условий клетки извлекались через 1, 3, 6 и 12 мес и исследовались, как описано выше.

С целью подтверждения способности использованной в работе клеточной линии продуцировать типичные в морфологическом отношении частицы ВИЧ было проведено электронно-микроскопическое исследование культуры клеток после ее месячного хранения в жидком азоте. Материал подвергался фиксации альдегидным и осмиевым фиксаторами с последующей дегидратацией этиловым спиртом, заключением в заливочную среду и получением ультратонких срезов. Препараты просматривали и фотографировали с помощью электронного микроскопа JEM-100 В.

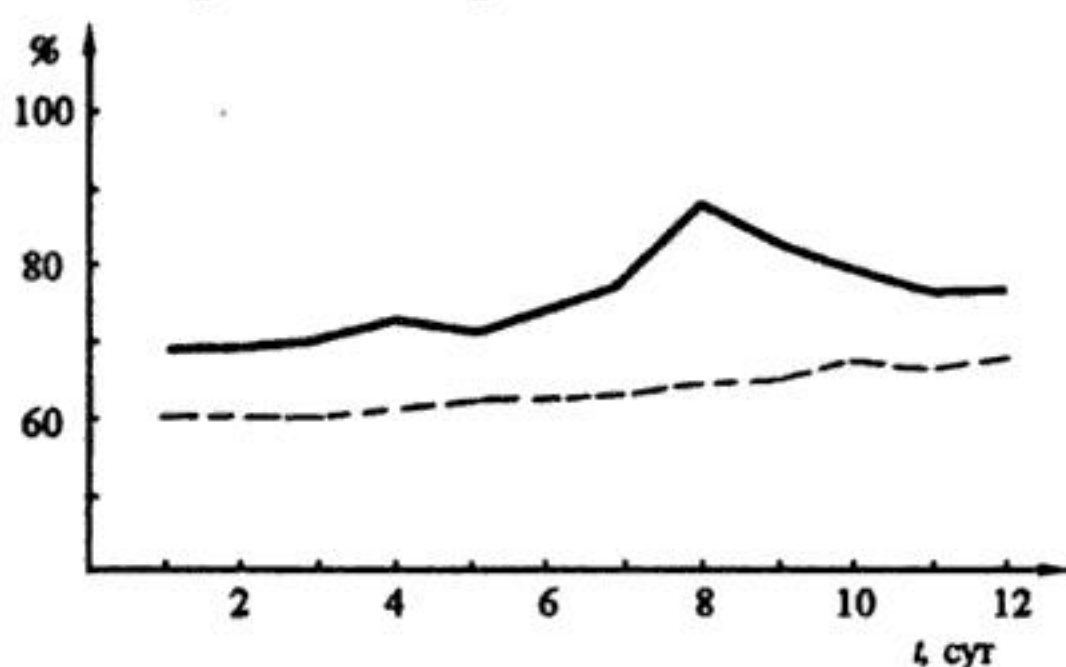


Рис. 2. Динамика восстановления популяции клеток, продуцирующих вирус после криоконсервации: — — жизнеспособность клеток, - - - экспрессии клетками вирусного антигена

Т а б л и ц а 2

Исследование жизнеспособности клеток и экспрессии антигенов ВИЧ в различные сроки хранения

| Срок хранения, мес  |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1                   |                     | 3                   |                     | 6                   |                     | 12                  |                     |
| Жизнеспособность, % | Экспрессия антигена | Жизнеспособность, % | Экспрессия антигена | Жизнеспособность, % | Экспрессия антигена | Жизнеспособность, % | Экспрессия антигена |
| 69.9 ± 3.2          | 66.8 ± 1.2          | 68.8 ± 2.4          | 66.1 ± 1.2          | 69.4 ± 1.5          | 65.8 ± 1.8          | 65.7 ± 2.7          | 64.9 ± 2.0          |

П р и м е ч а н и е. Пробы заморожены со скоростью 1 °С/мин с использованием 10%-го глицерина

В процессе работы изучалось влияние различных криопротекторов, режимов замораживания и концентрации замораживаемых клеток-продукторов на длительность сохранения их в жидком азоте и последующую способность к продукции вируса. Клетки исходной культуры обладали жизнеспособностью 86%, что связано с проявлением цитопатического эффекта вируса. При этом наблюдалось около 1% многоядерных клеток-симпластов. Иммунофлуоресцентное исследование показало, что 70–72% клеток экспрессирует на своей поверхности антигены ВИЧ. С этими данными коррелируют и результаты электронно-микроскопического исследования, свидетельствующие как о структурных повреждениях у части клеток исходной культуры, так и об активной продукции отдельными клетками вирусных частиц с типичной для ВИЧ морфологией (рис. 1). При отсутствии низкотемпературного холодильника процесс замораживания возможно осуществлять в смеси сухого льда и спирта (температура смеси –72 °С) при тех же условиях [2, 3].

При исследовании клеток на 3–5-е сут отмечено, что максимальная жизнеспособность клеток получена при скорости 1 °С/мин. Отмечено незначительное преимущество замораживания суспензии с использованием глицерина. Данные представлены в табл. 1.

Установлено, что концентрация замораживаемых клеток не влияет на их последующую жизнеспособность, поэтому в дальнейшем использовали концентрацию  $2 \cdot 10^6$  клеток в 1 мл. Жизнеспособность клеток восстанавливалась с 5-х сут, достигая более высоких значений по сравнению с исходной культурой, в то же время процент инфицированных клеток оставался на более низком уровне, достигая исходных значений только на 11–12-е сут (рис. 2). На 8–9-е сут появлялись единичные многоядерные клетки, которые исчезали при замораживании, очевидно, разрушаясь. Сравнение данных при использовании в качестве криопротектора глицерина и ДМСО показало, что ДМСО менее пригоден для данной процедуры криоконсервирования, так как восстановление клеточной популяции происходит менее интенсивно, и экспрессия вирусных антигенов иногда не отмечается. Это, вероятно, связано с токсическим эффектом ДМСО на биохимические процессы клетки, обеспечивающие репликацию вируса.

Из табл. 2 видно, что на протяжении 12 мес хранения в жидком азоте не произошло снижения жизнеспособности криоконсервированных клеток. Динамика восстановления популяции клеток в различные сроки хра-

нения практически совпадала с определенной ранее. Электронно-микроскопическое исследование хранившихся инфицированных клеток показало, что почкование вирионов морфологически не отличалось от исходной культуры (рис. 1).

Таким образом, наибольшая выживаемость клеток линии Н-9/III, инфицированных ВИЧ-1, наблюдалась при их замораживании в 10%-м глицерине со скоростью 1 °С/мин до -70 °С с последующим помещением образцов в жидкий азот. При длительном хранении (срок наблюдения 12 мес) криоконсервированных проб в жидком азоте клетки сохраняли свою исходную жизнеспособность и способность экспрессировать антигены ВИЧ.

Описанный метод позволяет сохранить длительное время изоляты ВИЧ, а также клетки-продуценты ВИЧ в условиях лабораторий, имеющих минимальный набор криогенного оборудования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А.А.Пуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
2. Культура животных клеток: Методы / Пер. с англ.: Под ред. Р.Фрешни. – М.: Мир, 1989. – 333 с.
3. Новые методы культуры животных тканей / Под ред. Ю.М.Оленова. – М.: Мир, 1976. – 255 с.
4. Селезнева А.Ю., Николаева О.В., Фадеева Л.Л. Методические рекомендации по лиофилизации различных групп вирусов для целей длительного хранения. – М.: Б.и., 1982. – 39 с.
5. Пуцаева А.А., Петренко Т.Ф. Криоконсервация культивируемых клеток животных. Методы культивирования клеток. – Л.: Наука, 1987. – с. 63–69.
6. Gallo, D., Diggs, J.L., Shell, G.R. et al. Comparison of detection of antibody to the acquired immune deficiency syndrome virus by enzyme immunoassay, immunofluorescence and western blot methods // Clin. Microbiol. – 1986. – 23, N 6. – P. 1049–1051.

Научно-исслед. противочумный ин-т,  
г. Ростов-на-Дону

Поступила 22.01.91

І.Ю.ДРАНОВ, Ш.У.ЯНГУЛОВ, О.М.ТЕРЕНТ'ЄВ, С.Р.САЯМОВ  
КРІОКОНСЕРВАЦІЯ КЛІТИН, ЩО ПРОДУКУЮТЬ ВІРУС  
ІМУНОДЕФІЦИТУ ЛЮДИНИ

Науково-дослідний протичумний інститут, м. Ростов-на-Дону

Досліджено вплив різних кріопротекторів, режимів заморожування і концентрації заморожуваних клітин-продуцентів на їх виживаність при тривалому збереженні у рідкому азоті і наступну здатність продукування віруса ВІІІ-1.

I.Yu.DRANOV, SH.U.YANGULOV, A.N.TERENTYEV, S.R.SAYAMOV  
CRYOPRESERVATION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS  
PRODUCERS

Antiplague Research Institute of Rostov-on-Don

The effect of different cryoprotectants, freezing regimes and concentrations of frozen cell producers on their viability has been studied during prolonged storage in liquid nitrogen and on their ability to produce HIV-1.

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043:612.44/45

Л.Г.Карпенко, В.А.Чуйко

### АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В МЕМБРАНАХ КЛЕТОК АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ ЕЕ ЗАМОРАЖИВАНИИ С ДИМЕКСИДОМ И 1,2-ПРОПАНДИОЛОМ

Проведенные ранее исследования показали, что активность аденилатциклазной системы в адренокортикальной ткани после ее замораживания существенно изменяется. В меньшей мере это касается базальной и стимулируемой фторидом аденилатциклазной системы, в то время как стимулируемая синактеном аденилатциклаза оказалась более чувствительной к замораживанию [2]. Целью работы являлось изучение действия при замораживании двух криопротекторов: димексида и 1,2-пропандиола.

Ткань надпочечников замораживалась в специальных контейнерах со скоростью 1–3 °С/мин до –70 °С с последующим погружением в жидкий азот. Перед замораживанием ткань инкубировалась в растворах криопротекторов в течение 15 мин. Оттаивание образцов производилось на водяной бане при 37 °С. Образцы отмывались от криопротекторов физиологическим раствором. Контролем служила незамороженная ткань.

Для определения активности аденилатциклазы использовались аликвоты плазматических мембран, выделение которых производилось по методу [4,5]. Инкубация мембран производилась в АТФ буфере следующего состава: 0.02М трис-НCl буфер, 6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 мМ АТФ, 0.5 мМ теofilлин, 5 мМ фосфонолпируват, 100 мкг/мл пируваткиназа, 0.1 альбумин человека. Инкубация производилась на водяной бане при 37 °С в течение 15 мин. Исследование активности аденилатциклазы производилось в условиях стимуляции ее NaF и синактеном. Об активности данного фермента судили по приросту содержания цАМФ после инкубации мембран в АТФ буфере как при добавлении стимуляторов, так и в их отсутствии. Количество цАМФ определялось радиохимическим методом с использованием наборов цАМФ ("Amersham" – Англия). Подсчет радиоактивности проб производился методом сцинтилляционной радиометрии на β-счетчике "Beckman".

В табл. 1 приведены данные, полученные при замораживании ткани с димексидом. При медленном замораживании с добавлением димексида отмечается увеличение базальной активности во всех сериях экспериментов. Наиболее значительное увеличение вызывает добавление 1%-го раствора димексида. Увеличение активности фермента, стимулируемого фторидом также вызывает замораживание со всеми концентрациями димексида. Аналогичным образом действует замораживание с димексидом на активность аденилатциклазы

Т а б л и ц а 1

Влияние замораживания (1–3 °С/мин) с димексидом на активность аденилатциклазы в мембранах клеток коры надпочечника свиньи

| Условия эксперимента                           | нмоль цАМФ/мг белка·мин |               |                 |
|------------------------------------------------|-------------------------|---------------|-----------------|
|                                                | Базальная активность    | 40 мМ NaF     | Синактен, 1 мкМ |
| Интактная ткань                                | 0.06 ± 0.01             | 0.66 ± 0.19 * | 0.19 ± 0.04 *   |
| Замораживание (1–3 °С/мин) с 1%-м димексидом   | 0.41 ± 0.05             | 0.76 ± 0.32 * | 0.15 ± 0.04 *   |
| Замораживание (1–3 °С/мин) с 5%-м димексидом   | 0.19 ± 0.03             | 1.01 ± 0.33 * | 0.46 ± 0.08 *   |
| Замораживание (1–3 °С/мин) с 7.5%-м димексидом | 0.15 ± 0.05             | 0.55 ± 0.19 * | 0.10 ± 0.04     |
| Замораживание (1–3 °С/мин) с 10%-м димексидом  | 0.21 ± 0.09             | 1.79 ± 0.47 * | 0.14 ± 0.01     |

П р и м е ч а н и е . \* Достоверно к базальной активности.

Т а б л и ц а 2

Влияние замораживания (1–3 °С/мин) с 1,2-пропандиолом на активность аденилатциклазы в мембранах клеток коры надпочечников свиньи

| Условия эксперимента                                 | нмоль цАМФ/мг белка·мин |               |                 |
|------------------------------------------------------|-------------------------|---------------|-----------------|
|                                                      | Базальная активность    | 40 мМ NaF     | Синактен, 1 мкМ |
| Интактная ткань                                      | 0.06 ± 0.01             | 0.66 ± 0.19 * | 0.19 ± 0.04 *   |
| Замораживание (1–3 °С/мин) с 1%-м 1,2-пропандиолом   | 0.14 ± 0.05             | 1.25 ± 0.39 * | 0.46 ± 0.16 *   |
| Замораживание (1–3 °С/мин) с 5%-м 1,2-пропандиолом   | 0.34 ± 0.15             | 1.32 ± 0.36 * | 0.27 ± 0.13 *   |
| Замораживание (1–3 °С/мин) с 7.5%-м 1,2-пропандиолом | 0.19 ± 0.08             | 2.49 ± 0.44 * | 0.18 ± 0.04 *   |
| Замораживание (1–3 °С/мин) с 10%-м 1,2-пропандиолом  | 0.11 ± 0.02             | 1.41 ± 0.52 * | 0.07 ± 0.02 *   |

Примечание. \* Достоверно к базальной активности

в щитовидной железе [3]. В отличие от базальной и стимулированной фторидом аденилатциклазы, чувствительная к синактену система под влиянием замораживания с 1%-м димексидом утрачивает свою активность. Сохранение чувствительности к синактену отмечалось только при использовании 5%-го димексида. Применение 7.5% и 10%-х растворов димексида не сохраняло чувствительность исследуемой системы к синактену. Увеличение чувствительности базальной активности как и стимулируемой фторидом аденилатциклазы при замораживании, очевидно, связано с увеличением проницаемости мембран и изменением фазового состояния липидов [1].

При медленном замораживании с использованием 1,2-пропандиола, было установлено, что применение 1%-го раствора сопровождалось 2-х кратным увеличением базальной активности аденилатциклазы (табл. 2). При этом отмечено сохранение ее чувствительности к NaF и синактену. При дальнейшем увеличении концентрации пропандиола до 5%, увеличение активности аденилатциклазы отмечается только в отношении базальной и стимулируемой фторидом активности, в то время как при добавлении синактена такой эффект отсутствует. Замораживание адренокортикальной ткани с 7.5% и 10%-м пропандиолом сопровождается увеличением базальной активности и сохранением чувствительности к фториду, чувствительность аденилатциклазы к синактену резко снижена.

Таким образом, замораживание с димексидом и пропандиолом сопровождается увеличением базальной активности аденилатциклазы при всех используемых их концентрациях. Аналогичным образом влияет замораживание с криопротектором на аденилатциклазу, чувствительную к фториду, что согласуется с данными, полученными при исследовании активности аденилатциклазы в щитовидной железе [3].

На основании представленных данных следует заключить, что стимулирующим действием в адренокортикальной ткани при замораживании обладает 1,2-пропандиол в концентрации 1% и димексид в концентрации 5%.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Функциональные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 255 с.
2. Карпенко Л.Г. Влияние замораживания до – 196 °С на активность аденилатциклазы в клетках коры надпочечников и щитовидной железы // Криобиология. – 1989, № 4. – С. 21–23.
3. Чуйко В.А., Утевский А.М. Биохимия криоконсервированной щитовидной железы. – Киев: Наук. думка. – 1985. – 253 с.
4. Bech K., Madsen S.N. Human thyroid adenylate cyclase in nontoxic goitre: sensitivity to TSH, fluoride and thyroid stimulating immunoglobulines // J. Clin. Endocrinol. – 1978. – 8. – P. 457–466.
5. Dazord A., Morera A.M., Pertran J., Saez J.M. Prostaglandin receptors in human and ovine adrenal glands: binding and stimulation of adenylyl cyclase in subcellular preparations // Endocrinology. – 1974. – 95, N 3. – P. 352.

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

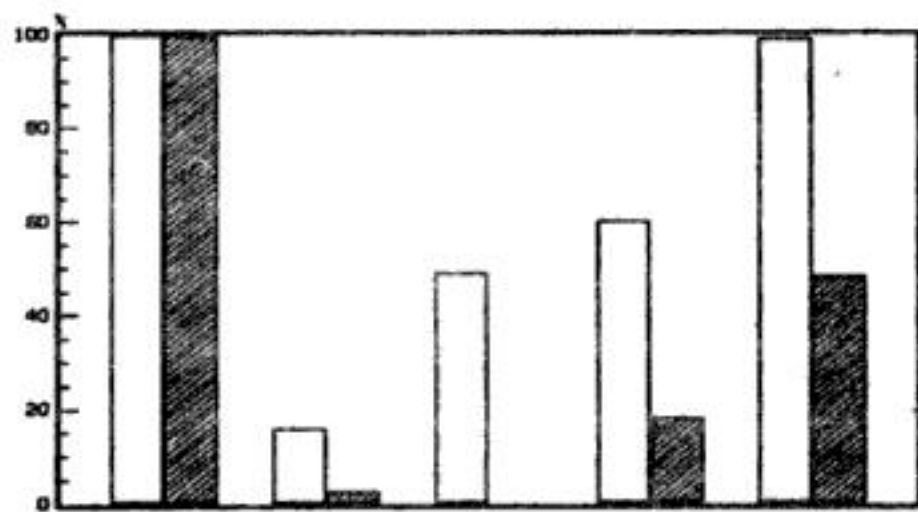
Поступило 03.12.92

Н.М.Пересецкая

УЛЬТРАБЫСТРОЕ ЗАМОРАЖИВАНИЕ *SACCHAROMYCES VINI* ПОД ЗАЩИТОЙ 1,2-ПРОПАНДИОЛА

Для длительного поддержания свойств культур дрожжей *S. vini* необходимы эффективные способы консервации. В настоящее время предложены различные методы консервации дрожжей с использованием в качестве защитных сред растворов сахарозы, глицерина [2]. Наиболее изученными остаются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, для которых предложены режимы консервации с использованием медленных скоростей (0,4 – 4 °С/мин) или двухэтапных программ [3]. В случае *Saccharomyces vini* в настоящее время разработаны методы криоконсервации при –196 °С, при которых клетки замораживают со скоростями 1 – 10 °С/мин под защитой глицерина [2]. В литературе имеются единичные указания на эффективность быстрого замораживания *Saccharomyces cerevisiae* [4]. Целью настоящей работы явилась разработка способа замораживания производственных штаммов *Saccharomyces vini*.

Исследовали два штамма дрожжей: Феодосия-1-19 и Кахури-7, которые выращивали в полноценной питательной среде УЕРД (рН = 4,5) в течение 20 ч с аэрацией до стационарной фазы роста. Суспензию клеток в УЕРД и в растворе криопротектора 7,5, 10 и 20% 1,2-пропандиола (1,2-ПД) в концентрации  $10^7$ – $10^8$  кл/мл разливали по 10 мл в ме-



Жизнеспособность винных дрожжей Феодосия-1-19 (Ф-1-19) и Кахури-7 (К-7) при ультрабыстром замораживании: 1 – контроль; 2 – УЕРД; 3 – 7,5% 1,2-ПД; 4 – 10% 1,2-ПД; 5 – 20% 1,2-ПД

таллические контейнеры из нержавеющей стали и замораживали со скоростью 400 °С/мин путем непосредственного погружения контейнеров в жидкий азот. Размораживание осуществляли на водяной бане при 30 °С. Жизнеспособность дрожжей после консервации определяли методом подсчета микроколоний. Результаты исследования сохранности штаммов после ультрабыстрого замораживания свидетельствуют о том, что их жизнеспособность при консервации в среде роста сильно варьирует: 3,4% для штамма Кахури-7 и 11,2% для штамма Феодосия-1-19 в зависимости от чувствительности штамма. Применение

раствора 1,2-ПД в качестве криопротектора позволило повысить сохранность клеток после замораживания на 12 – 37%. Наиболее эффективным оказалось применение 20%-го раствора 1,2-ПД. В этих условиях выживаемость штаммов возросла в 8–14 раз по сравнению с их сохранностью при замораживании в среде роста, причем жизнеспособность штамма Феодосия-1-19 достигла контрольной величины (рисунок). Причины положительного действия 1,2-ПД на культуры *Saccharomyces vini* в процессе ультрабыстрой консервации остаются во многом не ясными и требуют дальнейших исследований.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что применение 1,2-пропандиола соответствующей концентрации позволяет значительно повысить эффективность режима ультрабыстрого замораживания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лоевский М.М., Белоус А.М. Биологическое и криозащитное действие 1,2-пропандиола // Криобиология. – 1986. – N 2. – С. 20–23.
2. Сидякина Т.М., Кузнецова Е.В., Чумакова М.Д. Жизнеспособность и биохимическая активность дрожжей *Saccharomyces vini* при сублимационном высушивании и криоконсервации // Криобиология. – 1986. – N 1. – С. 23–27.
3. Пуцаева А.А., Казанская Л.Н., Бальбердина Л.М. и др. Влияние условий криоконсервирования на морфофункциональные свойства *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. – 1987. – 56, N 2. – С. 338–340.
4. Albrecht R.M., Orndorff G.R., MacKenzie A.P. Survival of certain microorganisms subjected to rapid and very rapid freezing on membrane filters // Cryobiology. – 1973. – 10, N 3. – P. 233–239.

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

Поступила 21.10.92

## ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины в декабре 1992 г. Л.Л.Кулешовой защищена диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему: "Закономерности стеклования, кристаллизации и плавления в некоторых системах криопротекторов". Цель работы – исследование закономерностей явлений стеклования, расстеклования, возникновения и роста кристаллов льда на этапе нагрева в двух- и трехкомпонентных растворах криопротекторов методами калориметрии и криомикроскопии в интервале температур (273–87) К.

Было установлено, что увеличение доли поливинилипирролидона либо хлорида натрия в тройных водных системах  $H_2O - 1,2\text{-ПД} - \text{ПВП}$  и  $H_2O - 1,2\text{-ПД} - NaCl$  приводит к появлению дополнительных фазовых переходов при температурах ниже 273 К. Величина переохлаждения ( $\Delta T$ ) исследуемых объектов при скоростях (0,067–0,267)  $K \cdot c^{-1}$  пропорциональна скорости охлаждения в тех случаях, когда имеет место кристаллизация при охлаждении. Автором показано, что при постоянной скорости охлаждения величина  $\Delta T$  слабо зависит от концентрации в области малых содержаний неводного компонента и значительно возрастает с увеличением доли застекловавшейся фазы. Одной из причин механического повреждения ткани ранних эмбрионов человека после криоконсервирования является ее растрескивание при охлаждении. Индикатором неполноценности тканей является присутствие газовых пузырьков после нагрева.

Влияние холода на организм и его функциональные системы, в частности, на систему кровообращения, исследовано в диссертационной работе О.В.Липиной "Реологические свойства крови при охлаждении и действии веществ из ряда полиэтиленоксида", защищенной в том же спецсовете на соискание ученой степени кандидата биологических наук. На основе экспериментов, проведенных на белых беспородных крысах-самцах (176 животных), автором сделаны следующие выводы: острое общее охлаждение крыс в холодной воде вызывает повышение вязкости крови и плазмы, особенно при малых напряжениях сдвига, увеличивает предельное напряжение сдвига и гематокрит, причем наиболее существенное изменение указанных параметров происходит при понижении температуры ниже 25 °С; введение животным перед охлаждением растворов полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) и ПЭО-1500 предупреждает возникновение в процессе охлаждения животных гемореологических расстройств, уменьшая степень подъема вязкости крови и плазмы, предельное напряжение сдвига и величину гематокрита; полиэтиленоксиды способствуют сохранению кровотока в микрососудах брыжейки крыс, охлажденных в течение 9–12 мин, тогда как при охлаждении без премедикации кровоток прекращается через 5 мин; влияние ПЭО-1500 на вязкость крови и плазмы при охлаждении *in vitro* в интервале температур 0–40 °С зависит от его концентрации.

50 крб.

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

3 1993

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. — "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском языках. Объем 5,6 печ. л., периодичность четыре номера в год. В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

Подписная цена: на 3 мес. — 50 крб., на 6 мес. — 100 крб., на 9 мес. — 150 крб., на 12 мес. — 200 крб.

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

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

ИНДЕКС 70474

ISSN 0233-7673. ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1993. №3. 1-56