

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

4 | 87



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Грищенко (главный редактор), А. М. Белоус (зам. гл. редактора), Ю. П. Благой, Р. Г. Бутенко, Б. Н. Вепринцев, В. И. Гольданский, В. И. Луговой, Ф. И. Осташко, Е. Я. Панков, Л. А. Пирузян, Н. С. Пушкар, Б. П. Сандомирский, А. С. Снурников, К. М. Сытник, А. М. Утевский, А. Г. Федотенков, А. А. Цуцаева, В. И. Шумаков, Т. Н. Юрченко

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

С. И. Аксенов (Москва), Н. Г. Бакрадзе (Тбилиси), М. Е. Бекер (Рига), П. В. Белошицкий (Киев), Д. М. Гродзинский (Киев), В. Н. Запорожан (Одесса), Л. В. Калакуцкий (Пушино, Моск. обл.), А. Д. Курбатов (Ленинград), В. А. Наер (Одесса), В. А. Никитин (Харьков), Г. П. Пинаев (Ленинград), Г. Б. Сергеев (Москва), М. А. Соловьева (Киев), Н. Г. Соломонов (Якутск), Н. Н. Тимофеев (Москва), В. М. Чередниченко (Харьков), В. В. Шенталь (Москва), Э. З. Эмирбеков (Махачкала)

EDITORIAL BOARD

V. I. Grishchenko (Editor-in-Chief), A. M. Belous (Associated Editor), Yu. P. Blagoj, R. G. Butenko, B. N. Veprintsev, V. I. Goldansky, V. I. Lugovoj, F. I. Ostashko, E. Ya. Pankov, L. A. Piruzyan, N. S. Pushkar, B. P. Sandomirsky, A. S. Snurnikov, K. M. Sytnik, A. M. Utevsky, A. G. Fedotenko, A. A. Tsutsayeva, V. I. Shumakov, T. N. Yurchenko

EDITORIAL COUNCIL

S. I. Aksenov (Moscow), N. G. Bakradze (Tbilisi), M. E. Beker (Riga), P. V. Beloshitsky (Kiev), D. M. Grodzinsky (Kiev), V. N. Zaporozhan (Odessa), L. V. Kalakutsky (Pushchino, Moscow region), A. D. Kurbatov (Leningrad), V. A. Naer (Odessa), V. A. Nikitin (Kharkov), G. P. Pinayev (Leningrad), G. B. Sergeyev (Moscow), M. A. Solovyeva (Kiev), N. G. Solomonov (Yakutsk), N. N. Timofeyev (Moscow), V. M. Cherednichenko (Kharkov), V. V. Shental (Moscow), E. Z. Emirbekov (Makhachkala)

Адрес редакции:

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

Ответственный секретарь редакции *Ф. А. Приходько*

Научный редактор *В. И. Вишневский*

Редактор *Л. А. Рябинина*

Технический редактор *В. Н. Волкова*

Корректор *Н. П. Спичак*

Сдано в набор 17.07.87. Подп. в печ. 28.09.87. БЦ 22751. Формат 70×108/16. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Усл. кр.-отт. 5,6. Уч.-изд. л. 5,48. Тираж 1000 экз. Зак. 7-314.

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. № 1458.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

4 1987

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1987

СОДЕРЖАНИЕ

- Нардид О. А., Дюбко Т. С. Применение спектроскопии комбинационного рассеяния света в криобиологии 3
- Цуцаева А. А., Гольцев А. Н. «Хоминг» и пролиферация кроветворных клеток (КОЕ_с) криоконсервированного костного мозга в селезенке и костном мозге реципиентов 9
- Суббота Н. П., Сукач А. Н. Криочувствительность митохондрий печени кроликов в онтогенезе 15
- Унсов М. Е., Шпиченецкий Б. Я., Онищенко Н. А. Применение акустического метода оценки защитных свойств консервирующих растворов 20
- Булатов И. С., Нарышкина Е. П., Волков В. Я. Изменение внутриклеточного рН в *Escherichia coli* после замораживания-оттаивания 25
- Панзнер М., Хэнсен Х., Кнёнер Р., Спюрль Э. Математическое моделирование процессов переноса тепла в биологических тканях 30
- Гучок В. М., Карташов В. Ф., Верховская Л. З., Мазалов В. К., Григорашенко А. И. Влияние полиэтиленоксида-1500 на функциональное состояние организма животных 33
- Георгадзе Д. А., Рязанцев В. В., Мхитарьянц А. М., Васильевский В. Ю. Деструктивно-метаболические и репаративные изменения костной ткани после криовоздействия 36
- Акуниц К. Б., Демин Ю. М., Саркисян Р. Г., Авакян Г. С., Ботоян Ц. Р. Влияние локальной (ректальной) гипотермии на обмен катехоламинов при лечении ювенильных маточных кровотечений 38
- Кадетов В. В., Наталич Л. А., Терентьев А. Н. Лиофилизация чумного микроба 42

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Чередниченко В. М., Бездетко П. А., Зинченко В. Д. Исследование методом ЯМР дегидратации стекловидного тела, вызванной криопротектором ПЭО-400 45
- Холодный Г. А., Иванова Р. П., Борисова Р. Г., Левочкин Ю. В. Измерение некоторых теплофизических характеристик эритроцитов 46

© Издательство «Наукова думка», «Криобиология», 1987

This One



7L46-SCX-3N8R

Матеріал, захищений авторським правом

<i>Копейка Е. Ф., Чепурнов А. В., Дрокин С. И., Владимирцев В. Б., Александров Ю. Г.</i> Низкотемпературное консервирование молок рыб Черного моря камбалы-калкан (<i>Psetta macolica Pallas</i>) и бычка-кругляка (<i>Neogobius melanostomus Pallas</i>)	48
<i>Межидов С. Х., Моисеев В. А.</i> Влияние температуры на вязкость вне- и внутри- клеточных растворов	49
<i>Руденко С. В.</i> Особенности структурной модификации липидных бислоев под влиянием глицерина	51
ХРОНИКА	52
ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ	52

CONTENTS

<i>Nardid O. A., Dubko T. C.</i> Spectroscopy of combined light scattering in cryobiology	3
<i>Tsutsayeva A. A., Goltsev A. N.</i> Homing and proliferation of haemopoietic cells (CFU _e) of cryopreserved bone marrow in recipient spleen and bone marrow	9
<i>Subbota N. P., Sukach A. N.</i> Cold sensitivity of rabbit liver mitochondria in onto- genesis	15
<i>Unksov M. E., Shpichenetsky B. Ya., Onishchenko N. A.</i> Using the acoustic method for evaluation of the protective efficiency of preservation solutions	20
<i>Bulatov I. S., Naryshkina E. P., Volkov V. Ya.</i> Changes in intracellular pH of <i>Esche- richia coli</i> after freeze-thawing	25
<i>Panzner M., Hänsen H., Knörer R., Spörl E.</i> Mathematic modelling of heat transfer processes in biological tissues	30
<i>Guchok V. M., Kartashov V. F., Verkhovskaya L. Z., Mazalov V. K., Grigorashchenko A. I.</i> The effect of polyethylene oxide-1500 on the functional state of animal body	33
<i>Georgadze D. A., Ryazantsev V. V., Mkhitaryants A. M., Vasilovsky V. Yu.</i> Destruc- tive, metabolic and reparative changes in bone tissue after cryoapplication	36
<i>Akunts K. B., Demin Yu. M., Sarkisyan R. G., Avakyan G. S., Botyan Ts. R.</i> The effect of local (rectal) hypothermia on the catecholamine exchange during juvenile uterine bleeding	38
<i>Kadetov V. V., Natalych L. A., Terentyev A. N.</i> Lyophilization of plaque microbes	42

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Cherednichenko V. M., Bezdetko P. A., Zinchenko V. D.</i> Investigation of vitreous body dehydration induced by cryoprotectant PEO-400 using NMR	45
<i>Kholodny G. A., Ivanova R. P., Borisova R. G., Levochkin Yu. V.</i> Measurement of some heat parameters of erythrocytes	46
<i>Kopeyka E. F., Chepurnov A. V., Drokin S. I., Vladimirtsev V. B., Alexandrov Yu. G.</i> Low temperature preservation of milt of Black Sea fishes <i>Psetta macolica Pallas</i> and bullhead <i>Neogobius melanostomus Pallas</i>	48
<i>Mezhydov S. Kh., Moiseyev V. A.</i> The effect of temperature on the viscosity of extra- and intracellular solutions	49
<i>Rudenko S. V.</i> Peculiarities of structural changes in lipid bilayers induced by glycerol	51
CHRONICLE	52
DEFENSE OF THESES	52

О. А. Нардид, Т. С. Дюбко

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА В КРИОБИОЛОГИИ

Для разработки практических методов криоконсервирования и создания общей теории криоповреждений и криозащиты необходимы знания механизмов действия низких температур и сопутствующих факторов на биологические объекты на субклеточном и молекулярном уровнях [1]. Однако, несмотря на все многообразие используемых в этих целях методов исследований, в настоящее время нет полного понимания и однозначной трактовки процессов, происходящих с биологическими объектами при действии низких температур. В связи с этим возникает необходимость поисков методов исследований, способных обеспечить дополнительную информацию о происходящих процессах. Одним из таких методов является спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС).

Комбинационное рассеяние представляет собой неупругое рассеяние света, при котором спектр излучения содержит набор комбинаций частоты возбуждающего света ν_0 с частотами собственных нормальных колебаний атомов в молекуле ν_k [13] и является источником информации о структуре молекул и межмолекулярных взаимодействиях [4]. В общем случае, когда поведение молекулы подчиняется свойствам симметрии, спектроскопия КРС дополняет ИК-спектроскопию, так как спектры КРС обусловлены изменением поляризуемости молекулы, а спектры ИК — изменением дипольного момента, в связи с чем колебания, запрещенные правилами отбора в спектрах КРС, могут проявиться в ИК-спектрах и наоборот.

Метод КРС дает возможность изучать биообъекты без введения молекул зонда, позволяет изучать водные растворы, что затруднительно при использовании ИК-спектроскопии. При использовании соответствующей регистрирующей аппаратуры весь спектр КРС ($\sim 10\text{--}3000\text{ см}^{-1}$) может быть зарегистрирован за короткое время ($\sim 1\text{ с}$), что существенно при изучении фотолabile образцов [4].

Наличие в спектрах КРС биомакромолекул характеристических колебаний групп C—H , C=C , N—H , —S—S— , $\text{—C}\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \text{N—H} \end{smallmatrix}$ и др. [7, 10] дает воз-

можность получать информацию о степени α -спиральности, присутствии β -структуры и неупорядоченной конформации в белках, характеризовать связи цистеин- SH , конформацию дисульфидных связей —S—S— , определять гидрофобность или гидрофильность окружения боковых цепей триптофана. При исследовании липидов и мембран возможно получение информации о межцепочечных взаимодействиях и плавлении алифатических цепей липидов, конформации их главных групп, а также о влиянии различных пертурбантов (белков, холестерина, криопротекторов и т. п.) на структурное состояние липидов.

Значительный интерес представляет эффект резонансного комбинационного рассеяния (РКР), не имеющий аналога в ИК-спектроскопии и наблюдаемый в случае, если молекула содержит собственную или введенную искусственно хромофорную группу, область собственного поглощения которой совпадает с длиной волны возбуждающего лазерного излучения. Явление РКР дает возможность изучать непосредственно колебательный спектр хромофора, даже если он является составной частью сложной биоло-

гической системы. Его с успехом используют при изучении природы лигандов, окружающих хромофорный центр металла в металлопротеинах, состояния окисленности и спинового состояния гемопротеинов, фермент-субстратных комплексов и т. п. [7].

Возможности применения метода КРС в криобиологии

Сохранность клеток в процессе замораживания-оттаивания определяется в первую очередь целостностью их мембран, которые являются чувствительными к охлаждению в силу своей гетерогенности. Сложный комплекс составляющих биомембраны белков и липидов поддерживается электростатическими, водородными и гидрофобными взаимодействиями и находится в определенном стерическом соответствии, обеспечивающем выполнение мембраной ее специфических функций. Действие низких температур и сопутствующих факторов (дегидратации, изменения ионной силы и pH среды, кристаллизации и др.) вызывает дальнейшее повышение гетерогенности мембраны, ее структурную и биохимическую модификацию, завершающуюся потерей мембраной функциональных свойств и гибелью клетки [2].

В спектрах КРС липидов преобладают линии, обусловленные колебаниями их углеводородных цепей. Это позволило успешно применить метод КРС к изучению термоиндуцированных фазово-структурных перестроек липидов, являющихся одним из основных иницирующих факторов криоповреждений [1]. Наиболее информативны области валентных колебаний $C—C$ ($1000—1200\text{ см}^{-1}$) и $C—H$ ($2800—3000\text{ см}^{-1}$), которые содержат данные о конформации углеводородных цепей и о взаимодействиях между цепями [4].

Методом КРС выполнены работы по исследованию термотропного поведения модельных липидных систем [4], в которых установлено, что на фазовые переходы липидов мембран оказывает влияние степень смешиваемости различных фосфолипидов, во многом определяемая длиной и насыщенностью их углеводородных цепей. Вследствие различий температур плавления входящих в состав мембран липидов имеет место одновременное сосуществование в биомембранах участков в гелеобразном и жидкокристаллическом состояниях еще в зоне положительных температур. При достаточно хорошей смешиваемости липидов они способны образовывать фазу, свойства которой отличаются от свойств составляющих компонент.

Присутствие в нативных мембранах белков и холестерина значительно осложняет предсказание их термотропного поведения. Исследование методом КРС модельных систем, содержащих встроенные в липидные бислои белки и полипептиды, показало, что степень липид-белковых взаимодействий в мембранах в значительной степени зависит от фазового состояния бислоя, его заряда и гидрофильно-гидрофобной природы белка. При этом характер взаимодействия липидных и белковых компонент тесно связан с их конформационным состоянием [8, 12].

При электростатическом связывании, преобладающем у поверхностных и периферических белков и носящем кооперативный характер [3], происходит некоторая стабилизация бислоя, выражающаяся в повышении фазового перехода липида [8, 16]. Если бислой сформирован из смеси липидов, электростатическое взаимодействие с белком может приводить к их фазовому разделению [12]. Внедрение периферического белка в бислой наиболее выражено выше температуры фазового перехода липидов. При $T < T_{пл}$ протеины и периферические белки оказываются существенно исключенными из гидрофобных областей бислоя [9, 12]. Внедрение белка в бислой сопровождается изменением конформации липидного и белкового компонент.

Интегральные белки, гидрофобно взаимодействующие с мембраной, способны иммобилизовать часть липидов, непосредственно входящих в микроокружение белка. Существование «липидных колец» вокруг внутримембранных белков обнаружено в модельных и природных мембранах методом КРС и другими физическими методами [3, 9, 16, 19]. При этом, по данным

ДСК, не обнаружено значительных отличий в температурах фазового перехода остальной части липидов в присутствии и в отсутствие интегрального белка [3]. Однако, по данным КРС, влияние интегральных белков на бислой не всегда ограничивается зоной иммобилизованных липидов. Так, при связывании интегрального гидрофобного белка апопротеида протеолипида миелина с яичным лецитином фазовый переход оказывается более широким ($-26 \div 15^\circ\text{C}$ по сравнению с переходом чистого яичного лецитина $-15 \div -5^\circ\text{C}$) и в его области наблюдается еще один кооперативный переход около 12°C , обусловленный плавлением иммобилизованного белком липида [4].

При взаимодействии «миелинового протеолипидного белка» с липосомами, сформированными из дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), установлено, что белок несколько иммобилизует бислой при температурах выше $T_{\text{пл}}$ на 12°C .

Однако интегральные белки не всегда оказывают на бислой иммобилизующее действие. Связывание трансмембранного белка эритроцитов гликофорина с ДПФХ (и его D_{62} -аналогом) в соотношении белок : липид 1 : 125 понижает основной переход ДПФХ на 15°C и снижает его кооперативность. При изучении взаимодействия с фосфатидилхолинами грамицидина А обнаружено, что выше $T_{\text{пл}}$ грамицидин А стабилизирует бислой, уменьшая количество гош-изомеров, а ниже $T_{\text{пл}}$ неупорядоченность цепей возрастает [4].

Значительное влияние на неоднородность мембраны оказывает также холестерин. Методом КРС установлено, что при введении холестерина в искусственные фосфолипидные мембраны происходит снижение кооперативности фазового перехода. Присутствие холестерина в дипальмитоиллецитинмоногидрате при мольном отношении компонент 1 : 1 повышает жидкость системы при $T < T_{\text{пл}}$ из-за гош-трансизомеризации. При $T > T_{\text{пл}}$ возрастает жесткость системы, так как добавки холестерина препятствуют образованию гош-изомеров [4, 19]. Способность холестерина регулировать жидкость бислоя аналогична в данном случае действию криопротекторов. Однако в нативных мембранах, гетерогенных по липидному и белковому составу, наличие холестерина не устраняет фазовые переходы. В мембранах клеточных органелл с пониженным уровнем холестерина он распределен неравномерно из-за неодинакового связывания с различными липидами. В плазматических мембранах, обогащенных холестерином, фазовые переходы наблюдаются в основном в микродоменах, окружающих белки [2, 18].

Метод КРС позволяет обнаружить наличие термотропных структурно-фазовых перестроек в плазматических мембранах тимоцитов и эритроцитов, имеющих высокое отношение холестерин : липиды, которые не обнаруживаются методом ДСК [18, 19, 20]. Анализ спектров КРС мембран эритроцитов в области СН-валентных и акустических колебаний липидов обнаруживает ряд особенностей в области температур от -30 до 25°C (рис. 1) [19]. Зависимость относительной интенсивности J_{2880}/J_{2850} от температуры обнаруживает два излома с центрами -4 и 17°C , в то время как температурная зависимость отношения J_{2932}/J_{2850} обнаруживает переход между -20 и 10°C с центром -8°C . Анализ колебаний ацильных цепей липидов аккордеонного типа в акустической области позволяет отнести излом при -4°C , по крайней мере частично, к переходу типа порядок-беспорядок мембранных

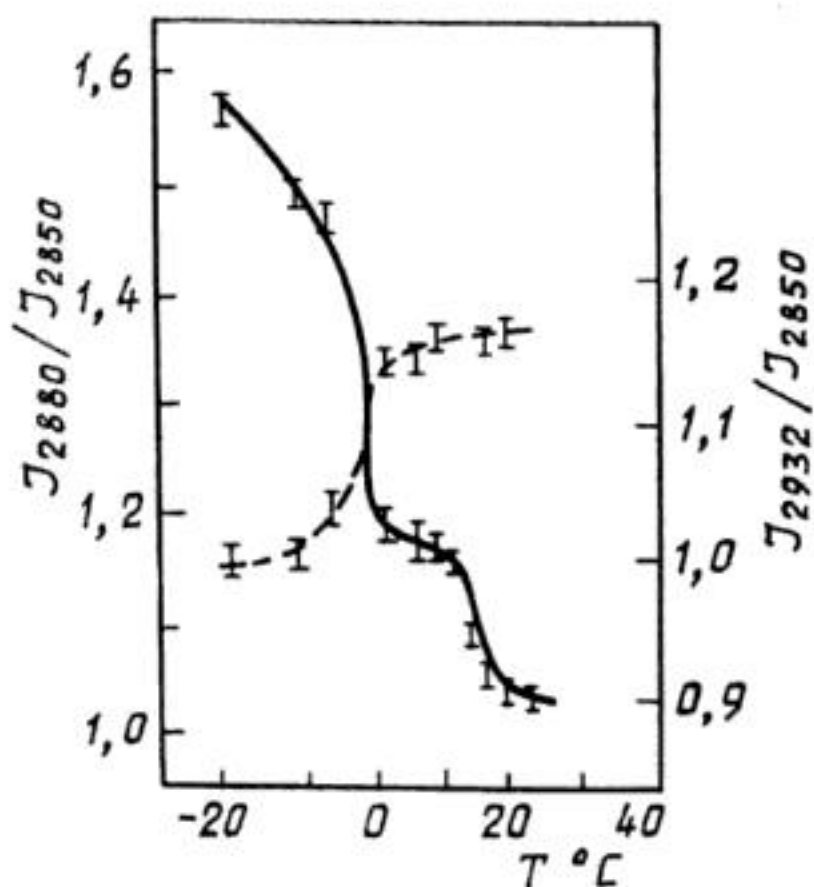


Рис. 1. Температурная зависимость относительных интенсивностей линий J_{2880}/J_{2850} и J_{2932}/J_{2850} мембран эритроцитов [19].

липидов [19]. Однозначная интерпретация спонтанных спектров КРС в СН-валентной области затруднена из-за диффузионного вклада протеинов, однако при исследовании термотропного поведения ЭПР-спинмеченого аналога насыщенной жирной кислоты в мембранах эритроцитов показано [11], что при -8°C происходит генерализованный фазовый переход и латеральное разделение насыщенных и ненасыщенных липидов. Данные КРС позволяют охарактеризовать переход при 17°C как фазовый переход типа порядок-беспорядок в липидных доменах с низким содержанием холестерина (~ 6 мол. %). Существует также мнение, что переходы белков в области $17-20^{\circ}\text{C}$ объясняются изменением структуры воды, связанной с белками и липидами [2]. Есть определенные основания считать также, что в высокотемпературную область перехода могут давать вклад липид-белковые взаимодействия. Известно, что в белках и липид-белковых комплексах наблюдаются обратимые предденатурационные переходы при температурах, ниже

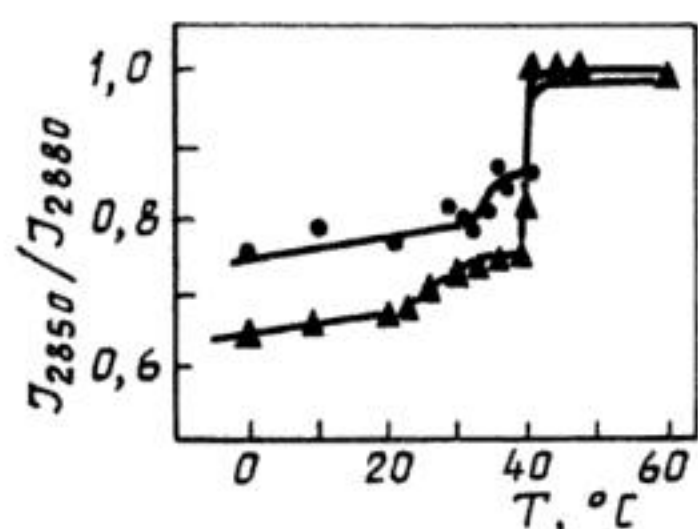


Рис. 2. Температурная зависимость относительной интенсивности линий J_{2850}/J_{2880} дисперсий ДПФХ/дейтерированный глицерин (▲) и ДПФХ/вода (●) [17]

физиологической. Предденатурационные переходы в области 17°C считаются характерными для структур, поддерживаемых гидрофобными взаимодействиями.

Некоторые мембранные белки претерпевают температурозависимые кооперативные переходы в области 20°C при изменении pH , отсутствующие при более низких температурах [19]. Методом КРС по изменению температурной зависимости отношения J_{2930}/J_{2850} в СН-валентной области показано, что изменение pH среды в физиологической области может оказывать значительное модифицирующее действие на мембраны эритроцитов даже в изотермических условиях [20]. В интервале pH

$7,0-7,4$ изменения незначительны, в то же время понижение и повышение pH резко изменяло конформационное состояние липидных и белковых компонент мембран. При этом понижение pH от $7,0$ до $6,5$ аналогично эффекту снижения температуры перехода на 16°C . Эти данные хорошо совпадают с результатами парамагнитного тушения флуоресценции и дают основание предполагать, что неполярные участки расположенных в мембране протеинов находятся в непосредственном взаимодействии с ацильными цепями фосфолипидов и образуют с ними отдельную фазу, которая способна претерпевать кооперативный фазовый переход при изменении pH [20].

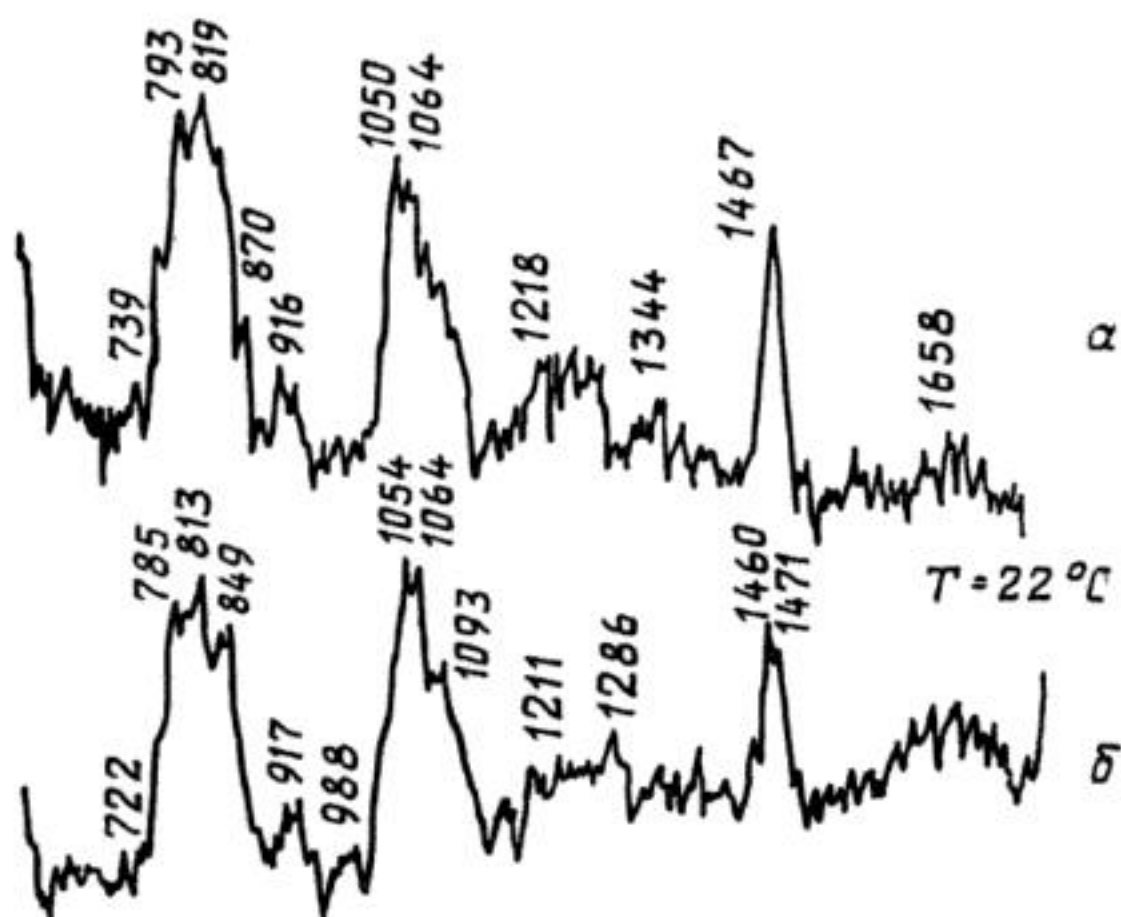
Различными физическими методами (ЭПР, ЯМР, дифракции рентгеновских лучей, УФ-спектроскопии и др.) установлено, что криопротекторы предохраняют биообъекты от повреждений при замораживании-оттаивании путем образования комплексов с биологически важными ионами, частичного замещения гидратной воды вокруг биомакромолекул и биомембран, сдвига в сторону низких температур, увеличения температурного диапазона или подавления температурных структурных переходов [6]. Тем не менее механизм защитного действия криопротекторов на молекулярном уровне остается все еще до конца не выясненным.

Использование дейтерированных соединений в бинарных системах липид-криопротектор представляет возможность детального изучения механизма действия криопротекторов методом КРС. В опытах по дифракции рентгеновских лучей в системе ДПФХ/глицерин обнаружена способность криопротектора существенно влиять на параметры липидного бислоя, в частности изменять его толщину, что приводит к взаимопроникновению ацильных цепочек противоположных монослоев [15]. Эффект взаимопроникновения монослоев проявляется на спектрах КРС ДПФХ (30 мас. %), диспергированного в пердейтерированном глицерине, снижением относительной интенсивности отражающих межцепочечные взаимодействия соответственно симметричных и асимметричных СН-валентных мод метилена

J_{2850}/J_{2880} в области температур от 0 °С до температуры фазового перехода ДПФХ (41 °С), в сравнении с системой ДПФХ/вода, в которой взаимопроникновение отсутствует [17] (рис. 2). Падение этого отношения свидетельствует о возрастании степени межцепочечного взаимодействия ацильных цепей ДПФХ в гель-фазе. При этом происходит снижение температуры предперехода ДПФХ с 35,5 до 22 °С. Падение отношения J_{2935}/J_{2880} при температуре фазового перехода порядок-беспорядок для дисперсии ДПФХ/глицерин свидетельствует об увеличении энтропии перехода в сравнении с системой ДПФХ/вода. На мультислоях ДПФГ обнаружено, что эффект взаимопроникновения монослоев может также индуцироваться различными примесями, в частности холином [17]. Таким образом, способность определения эффекта взаимопроникновения ацильных цепей липидов методом КРС показывает целесообразность его применения при исследовании влияния на бислой пертурбантов липидной и нелипидной природы.

Рис. 3. Влияние различных концентраций глицерина на спектр КРС саркоплазматического ретикула из мышц кролика:

а — саркоплазматический ретикулум в среде хранения: гистидин — 10 мМ, ЭДТА — 0,1 мМ, CaCl_2 — 0,2 мМ, глицерин — 25 мМ; рН 7,2 при 4 °С; б — саркоплазматический ретикулум в той же среде хранения + 25 %-ный глицерин (1 : 1). Спектры КРС записывались на спектрометре ВМ-100 (ФРГ) с использованием для накопления и обработки информации программируемого многоканального анализатора НОКИА LP 4900 В (Финляндия). Длина волны возбуждающего излучения 488 нм, мощность — 50 мВт, разрешение $\pm 1 \text{ см}^{-1}$, скорость счета фотонов $3 \cdot 10^4$ имп/с



В наших экспериментах, выполненных совместно с отделом физики плазмы НИИ ЯФ МГУ установлено, что метод КРС позволяет выявить эффект модифицирующего влияния криопротекторов на нативные мембраны. Как видно из рис. 3, повышение концентрации глицерина приводит к существенной модификации спектра КРС мембран саркоплазматического ретикула мышц кролика в области валентных колебаний С—С ($1000\text{—}1200 \text{ см}^{-1}$), асимметричных CH_3 -деформационных ($1440\text{—}1447 \text{ см}^{-1}$), а также в области $760\text{—}870 \text{ см}^{-1}$, в которую дают вклад колебания тирозиновых и триптофановых остатков мембраносвязанных белков и О—Р—О валентные моды полярных голов липидов [19].

Исследования, выполненные методом спектроскопии КРС на модельных системах и нативных мембранах, наглядно демонстрируют, что данный метод способен предоставлять информацию об изменении конформационного состояния изолированных и входящих в состав мембран белков, липидов, а также липид-белковых взаимодействий под влиянием физико-химических факторов среды. Он является достаточно чувствительным и может использоваться в комплексе с другими методами для расшифровки молекулярных механизмов действия на биообъекты низких температур и криопротекторов. Приведем некоторые примеры возможного применения спектроскопии КРС.

Наличие в спектрах РКР гемопротеинов (цитохромов, гемоглобина, миоглобина) линий, чувствительных к спиновому состоянию и степени окисленности атомов металлов, позволяющих исследовать биохимию металлопорфиринового ядра и влияние белковой матрицы на структуру порфиринов [4], даст возможность оценивать последствия влияния замораживания-оттаивания на структурное и функциональное состояние изолированных и входящих в состав мембран гемопротеинов.

Естественные и введенные в мембрану искусственно хромофоры могут использоваться как в качестве теста на нативность мембран, так и для изучения ее структурных перестроек. Естественными хромофорами мембран являются, в частности, конъюгированные полиены, резонанс-повышенные линии которых наблюдаются в спектрах мембран эритроцитов [19], мембранах эндоплазматического ретикулума [18] и др. Интенсивность их РКР-линий изменяется при охлаждении, изменении pH , под действием лизолецитина, додецилсульфата Na [21], они также чувствительны к изменению трансмембранного потенциала [4, 5]. В качестве искусственных хромофоров можно использовать амфотерицин В, краситель хиральдиновый красный [4], зеаксантин [14] и др.

Сочетание спектрометра КРС с микроскопом [4] можно использовать для изучения биологических процессов *in vivo*. При этом чувствительность метода очень высока ($\sim 10^{-11}$ г детектируемого вещества), а применение микроскопической оптики дает возможность проводить исследования на уровне отдельных клеток. Современный методический уровень исследований позволяет проводить анализ накопления некоторых продуктов метаболизма, сорбированных на поверхности клеток веществ, в частности, криопротекторов.

Используя перестраиваемые лазеры на органических красителях, можно последовательно возбуждать спектры РКР цитохромов, входящих в состав целых митохондрий, что представляет определенный интерес при оценке их функциональной полноценности.

1. Актуальные проблемы криобиологии / Под общей ред. Н. С. Пушкаря и А. М. Белоуса.— Киев : Наук. думка, 1981.— 608 с.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев : Наук. думка, 1982.— 255 с.
3. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Липидный бислой биологических мембран.— М. : Наука, 1982.— 224 с.
4. Кэри П. Применения спектроскопии КР и РКР в биохимии.— М. : Мир, 1985.— 272 с.
5. Максимов Г. В., Чуринов А. А., Пащенко В. З., Рубин А. В. Исследование протекания регуляции потенциалозависимых каналов методом спектроскопии комбинационного рассеяния // Биофизика.— 1985.— XXX.— Вып. 4.— С. 620—624.
6. Моисеев В. А. Молекулярные механизмы криозащиты биологических систем // Тез. докл. II-ой Всесоюз. конф. «Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов», 9—11 окт. 1984 г.— Харьков, 1984.— 1.— С. 58.
7. Carey P. Raman spectroscopy for the analysis of biomolecules.— *TrAC: Trends. Anal. Chem.*— 1983.— 2, N 12.— P. 275—277.
8. Carrier D., Pezolet M. Raman spectroscopic study of the interaction of poly-L-lysine with dipalmitoylphosphatidylglycerol bilayers // *Biophys. J.*— 1984.— 46, N 4.— P. 497—506.
9. Dasseux J.— L., Faucon M., Lafleur M. et al. A restatement of melittin-induced effects on the thermotropism of zwitterionic phospholipids // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1984.— 775.— P. 37—50.
10. Gaber B. P., Petricolas W. L. On the quantitative interpretation of biomembrane structure by Raman spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1977.— 465, N 2.— P. 260—274.
11. Gavrilova I. I., Ivanov L. V., Moiseyev V. A. Investigation of the membrane integrity of human erythrocytes at low temperatures using spin-probes // *Cryoletters.*— 1981.— N 7.— P. 197—200.
12. Lippert J. L., Lindsay R. M., Schultz R. Laser Raman investigation of lysozyme — phospholipid interactions // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1980.— 599.— P. 32—41.
13. Long D. A. Raman spectroscopy, McGraw—Hill, New—York, 1977.
14. Mendelsohn R., Van Holten R. W. Zeaxanthin (3R, 3'R — β , β —Carotene—3—3' — Diol) as a resonance Raman and visible absorption probe of membrane structure/ *Biophys. J.*— 1979.— 27, N 2.— P. 221—235.
15. McDaniel R. V., McIntosh T. J., Simon S. A.— *Biochim. Biophys. Acta.*— 1983.— 731.— P. 97—188.
16. Mushayakarara E., Levin I. W. Effects of polypeptide-phospholipid interactions on bilayer reorganizations. Raman spectroscopic study of the binding of polymyxin B to dimyristoylphosphatidic acid and dimyristoylphosphatidylcholine dispersions // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1984.— 769.— P. 585—595.
17. O'Leary T. J., Levin I. W. Raman spectroscopic study of an interdigitated lipid bilayer, dipalmitoylphosphatidylcholine dispersed in dlycerol // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1984.— 776.— P. 185—189.

18. Verma S. P., Wallach D. F. N., Schmidt—Ullrich R. The structure and thermotropism of thymocyte plasma membranes as revealed by laser Raman spectroscopy // Biochim. Biophys. Acta.— 1975.— 394.— P. 633—645.
19. Verma S. P., Wallach D. F. H. Multiple thermotropic state transitions in erythrocyte membranes // Biochim. Biophys. Acta.— 1976.— 436.— P. 307—318.
20. Verma S. P., Wallach D. F. H. Erythrocyte membranes undergo cooperative, pH-sensitive state transitions in the physiological temperature range : Evidence from Raman spectroscopy.— Proc. Natl. Acad. Sci. — 1976, 73, N 10.— P. 3558—3561.
21. Wallach D. F. H., Verma S. P. Raman and Resonance Raman scattering by erythrocyte ghosts // Biochim. Biophys. Acta.— 1975.— 382.— P. 542—551.

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

Поступила 09.07.86

УДК 51.015.615.387 : 547

А. А. Цуцаева, А. Н. Гольцев

«ХОМИНГ» И ПРОЛИФЕРАЦИЯ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК (КОЕ_с) КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА В СЕЛЕЗЕНКЕ И КОСТНОМ МОЗГЕ РЕЦИПИЕНТОВ

Основной целью перевода биологической системы в состояние глубокого холодового анабиоза является возможность ее долгосрочного хранения с последующим использованием в народном хозяйстве и для решения научных задач. И в том, и в другом случае эффективность и использование криоконсервированных клеток зависит от полноты сохранения их исходных свойств, которые, как было показано ранее [2, 4, 6], могут обратимо изменяться за счет развития нелетальных повреждений. В этой связи важно не только выяснить характер изменения свойств клеток после криоконсервирования, но также изучить динамику восстановления их исходного состояния. Знание этих вопросов позволит оптимизировать и повысить эффективность применения криоконсервированных клеток и тканей, особенно в медицинской практике.

Развитие нелетальных повреждений в различных биологических объектах после криоконсервирования наблюдается также и в кроветворных клетках, что проявляется в обратимой ингибции процесса пролиферации и дифференцировки [4]. Вместе с тем одним из важных свойств кроветворных клеток, от сохранности которых зависит эффективность миелотрансплантации при лечении гемо- и иммунодепрессий, является способность распознавать родственное микроокружение и расселяться в кроветворных органах.

Целью данного исследования было сравнительное изучение динамики расселения («хоминг») нативных и криоконсервированных КОЕ_с в костном мозге и селезенке летально облученных сингенных реципиентов, а также динамики накопления КОЕ_с в указанных органах в различные сроки посттрансплантационного периода.

Эксперименты выполнены на мышах (СВА × С57В1)F₁ 8—10-недельного возраста, полученных из питомника лабораторных животных АМН СССР, ст. Столбовая. Для определения содержания КОЕ_с в донорском костном мозге, а также для установления процента гибели КОЕ_с после криоконсервирования контрольным мышам вводили $1 \cdot 10^5$ нативных или криоконсервированных сингенных миелокариоцитов. Количество колоний в селезенках мышей-реципиентов, облученных в летальной дозе, определяли на 9—10-е сут. Криоконсервирование костного мозга проводили под защитой криопротектора ПЭО-400 по ранее описанному методу [4]. В контрольной серии экспериментов были получены результаты, свидетельствующие о том, что при данных условиях криоконсервирования в суспензии костного мозга сохраняется 68—71 % КОЕ_с, что согласуется с данными, полученными ранее [2, 6].

«Первичным» реципиентам, облученным в летальной дозе, трансплантировали $5 \cdot 10^6$ ядерных клеток сингенного нативного или криоконсервированного костного мозга. В различные сроки посттрансплантационного периода (с 2 ч и до 100-х сут) у 3—4 «первичных» реципиентов с трансплантатом нативного (Н) или криоконсервированного (К) костного мозга извлекали и одновременно диспергировали селезенки и вымывали костный мозг 6—8 бедренных косточек. В зависимости от срока посттрансплантационного периода определенный эквивалент органов вводили летально облученным «вторичным» тест-мышам (10—12 мышей в каждой группе), в селезенках которых на 9-е сут определяли общее количество колоний. Определение фактора распределения КОЕ_c (f) проводили в соответствии с методом, подробно описанным Чертковым, Гуревич [8]. Показатель динамики восстановления количества КОЕ_c в селезенке и костном мозге «первичных» реципиентов определяли как соотношение колоний в селезенке «вторичных» тест-мышей после введения определенного эквивалента органа «первичных» реципиентов к этому эквиваленту. Все полученные результаты обработаны статистически по методу Стьюдента-Фишера.

Полученные данные свидетельствуют о том, что «хоминг» криоконсервированных КОЕ_c как в селезенке, так и в костном мозге «первичных» реципиентов существенно отличался от нативных КОЕ_c . Через 2 ч значение величины f для нативных клеток составляло в селезенке 15 %, снижалось к 20-му ч и достигало минимальных значений к 48-му ч (табл. 1, 2). У мышей группы К данный показатель через 2 ч составлял менее 50 % величины, определяемой у животных группы Н. Причем различия в содержании КОЕ_c в селезенке реципиентов групп Н и К в это время достоверно превышали различия, обусловленные гибелью кроветворных клеток в процессе криоконсервирования (51 и 30,3 % соответственно, $P < 0,05$). Примерно с одинаковой интенсивностью снижалась величина f в селезенке реципиентов обеих групп в интервале между 2 и 20 ч (в 1,4—1,5 раза). Значение показателя продолжало снижаться к 48-му ч, однако более интенсивно у животных группы Н.

Еще большие различия в содержании КОЕ_c наблюдались в костном мозге «первичных» реципиентов обеих групп спустя 2 ч после трансплантации. Однако в отличие от динамики изменения содержания КОЕ_c в селезенке, в костном мозге к 20-му ч количество КОЕ_c у мышей обеих групп увеличивалось. Вероятно, такая особенность накопления КОЕ_c в костном мозге мышей может объясняться рядом причин, в частности спецификой микроокружения органов и особенностями путей проникновения в них КОЕ_c , временным поступлением в костный мозг КОЕ_c в условиях повышенного выброса кортикостероидов при стрессе [1, 5] и др. Через 2 сут величина f снова снижалась, достигая минимальных значений, причем как и в селезенке, различия в содержании КОЕ_c у животных обеих групп в это время не превышали показателей гибели кроветворных клеток после криоконсервирования.

Как было сказано выше, после криоконсервирования обратимо ингибируется пролиферативная активность кроветворных клеток. Этим, очевидно, объясняется и снижение скорости образования КОЕ_c криоконсервированными предшественниками в селезенке и костном мозге «первичных» реципиентов начиная с 3-х сут посттрансплантационного периода. Так, у мышей группы Н количество КОЕ_c в селезенке в течение 3-х сут увеличивалось в 2 раза, а в следующие 2 сут — в 4 раза (время удвоения около 24 ч). После снижения темпа накопления в период с 5-х по 7-е сут отмечался новый подъем насыщения селезенки КОЕ_c , что обусловлено, очевидно, активной их пролиферацией в этот период [3]. К 11-м сут (фаза «овершута») содержание КОЕ_c в селезенке достигало максимума, превышая в два раза норму (интактные мыши, 2765 ± 342). В дальнейшем содержание КОЕ_c снижалось, приближаясь к норме к 30-м сут и оставалось на таком уровне во все последующие сроки наблюдения.

Динамика накопления КОЕ_c в костном мозге реципиентов группы Н

Таблица 1

Содержание КОЕ_с и ядерных клеток в селезенке реципиентов в различные сроки после трансплантации костного мозга

Время после трансплантации костного мозга		Кол-во ядерных клеток на орган (× 10 ⁶), абсол. ед.**				Кол-во КОЕ _с на орган, абсол. ед.***				Концентрация КОЕ _с в органе****		Фактор f, %	
		Н		К		Н		К		Н	К	Н	К
		x ± Sx		x ± Sx		x ± Sx		x ± Sx					
2-й	Часы	110,6	16,8	100,8	13,6	87,7*	6,9	43,1*	5,6	—	—	15,0*	7,4*
20-й		12,8	1,9	12,1	2,8	64,0*	14,7	27,2*	7,6	—	—	10,9*	4,6*
48-й		12,1	2,7	9,9	2,1	33,8	6,4	22,9	5,1	2,8 ⁻⁴	2,3 ⁻⁴	5,8	3,9
3-й	Сутки	10,5	2,0	8,2	1,1	76,4*	12,7	34,4*	7,9	7,3 ⁻⁴	4,2 ⁻⁴		
5-е		19,3*	1,7	11,8*	1,9	365	76	252	42	1,9 ⁻³	2,1 ⁻³		
7-е		80,0*	11,2	50,0*	7,9	442*	59	289*	49	5,3 ⁻⁴	5,5 ⁻⁴		
9-е		138	17,9	115	14,3	1475*	306	401*	96	1,1 ⁻³	3,5 ⁻⁴		
11-е		139	19,6	121	17,4	5560*	847	3146*	597	4,0 ⁻³	2,6 ⁻³		
20-е		122	17,8	136	19,6	3746*	507	2698*	355	3,1 ⁻³	2,0 ⁻³		
30-е		121	14,3	108	12,7	2804	476	2896	301	2,3 ⁻³	2,7 ⁻³		
40-е		132	20,8	102	16,4	3062	512	3002	462	2,3 ⁻³	2,9 ⁻³		
50-е		137	18,6	122	17,1	2604	378	2412	609	1,9 ⁻³	2,0 ⁻³		
100-е	131	11,9	121	21,1	2347	406	1924	511	1,8 ⁻³	1,6 ⁻³			

Примечание. * — в указанный срок сравнимые показатели имеют достоверные различия ($p < 0,05$); ** — количество ядерных клеток в селезенке интактных животных составляет $141,9 \pm 9,2 \cdot 10^6$; *** — количество КОЕ_с в селезенке интактных животных составляет 2765 ± 342 ; **** — концентрация КОЕ_с в селезенке интактных животных составляет 2^{-3} ; Н — показатели в группе животных с трансплантатом нативного костного мозга, К — криоконсервированного.

Таблица 2

Содержание КОЕ_с и ядерных клеток в костном мозге реципиентов в различные сроки после трансплантации костного мозга

Время после трансплантации костного мозга	Кол-во ядерных клеток на орган ($\times 10^6$), абсол. ед. **				Кол-во КОЕ _с на орган, абсол. ед.***				Концентрация КОЕ _с в органе****		Фактор f, %		
	Н		К		Н		К		Н	К	Н	К	
	$x \pm Sx$		$x \pm Sx$		$x \pm Sx$		$x \pm Sx$						
2-й	Часы	14,2	2,1	12,1	1,7	13,8*	2,2	5,5*	1,5	—	—	2,4*	0,9*
20-й		2,5	0,8	1,9	0,6	32,5*	9,2	13,2*	4,2	—	—	5,6*	2,3*
48-й		1,0	0,3	0,7	0,1	10,5	1,8	7,4	1,4	1,0 ⁻³	1,0 ⁻³	1,8	1,3
3-й	Сутки	1,1	0,4	0,7	0,4	16,8*	8,1	7,6*	2,5	1,5 ⁻³	1,1 ⁻³		
5-е		1,4*	0,2	0,8*	0,2	73,5*	15,0	20,8*	5,5	3,7 ⁻³	2,6 ⁻³		
7-е		4,0*	0,5	1,1*	0,2	97,3*	17,6	52,2*	12,3	2,4 ⁻³	2,5 ⁻³		
9-е		8,8*	1,9	5,3*	1,1	326*	26,7	134,7*	19,0	3,7 ⁻³	2,5 ⁻³		
11-е		9,3	1,9	7,1	1,6	607	96	411	71	6,5 ⁻³	5,8 ⁻³		
20-е		10,4	1,7	8,9	1,7	853*	155	460*	37	8,2 ⁻³	5,2 ⁻³		
30-е		14,7	2,0	15,2	2,8	1396	326	1178	108	9,5 ⁻³	7,8 ⁻³		
40-е		12,7	1,1	14,7	2,4	1508	263	1387	211	1,2 ⁻²	9,4 ⁻³		
50-е		14,3	1,9	14,5	2,1	1688	307	1596	237	1,1 ⁻²	1,1 ⁻³		
100-е	13,0	1,7	12,3	1,9	1670	296	1415	198	1,3 ⁻²	1,1 ⁻²			

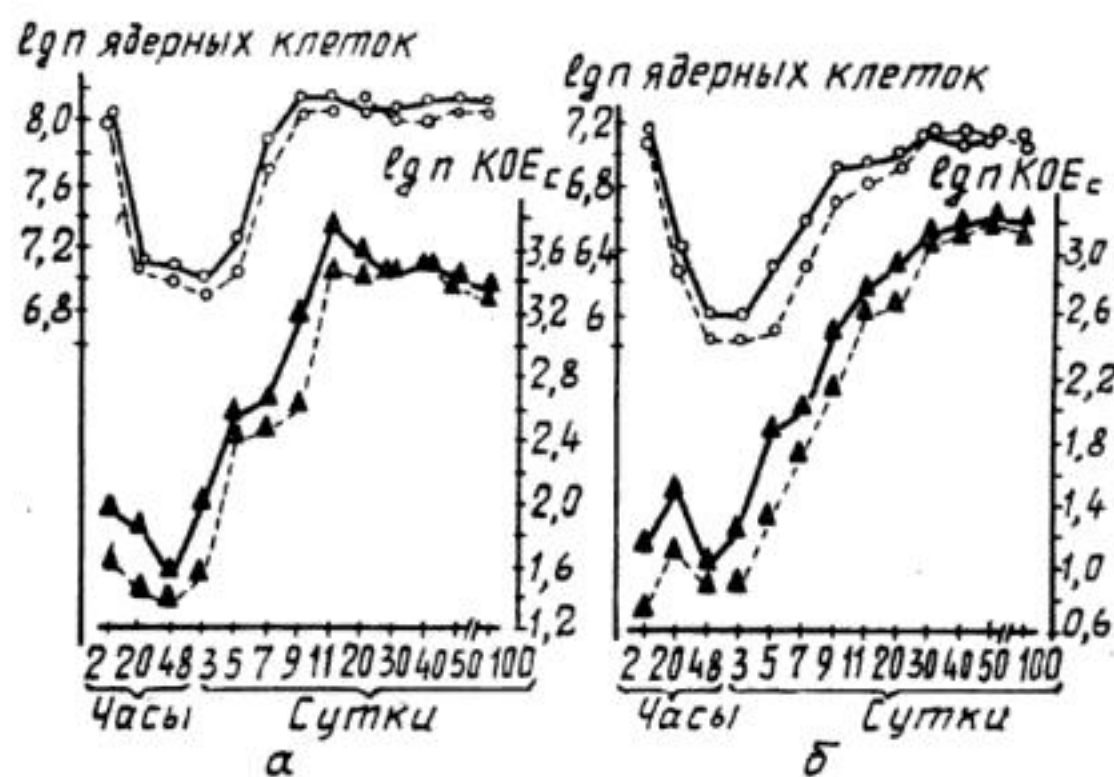
Примечание. * — в указанный срок сравнительные показатели имеют достоверные различия ($p < 0,05$); ** — количество ядерных клеток в костном мозге (бедре) интактных животных составляет $14,8 \pm 0,8 \cdot 10^6$; *** — количество КОЕ_с в костном мозге (бедре) интактных животных составляет 1735 ± 206 ; **** — концентрация КОЕ_с в костном мозге интактных животных составляет $1,2^{-2}$; Н — показатели в группе животных с трансплантатом нативного костного мозга, К — криоконсервированного.

в период со 2-х по 9-е сут в значительной степени совпадала с динамикой формирования КОЕ_с в селезенке. Однако в отличие от селезенки в костном мозге отсутствовала фаза «овершута». К 11-м сут содержание КОЕ_с составляло около 35 % нормы (1735 ± 206), продолжая постепенно увеличиваться в дальнейшем, достигая нормального уровня к 30-м сут.

Процесс мультипликации криоконсервированных КОЕ_с существенно отличался от нативных кроветворных клеток, причем характер его в значительной степени определялся местом кроветворения. В течение 3-х сут у животных с криоконсервированным миелотрансплантатом содержание КОЕ_с незначительно увеличивалось в селезенке и практически не изменялось в костном мозге (табл. 1,2). Однако с 3-х по 5-е сут темп насыщения КОЕ_с в селезенке животных данной группы был значительно выше (время

удвоения около 12 ч), чем у мышей группы Н. В результате у животных группы К за период со 2-х по 5-е сут наблюдалось такое же увеличение количества КОЕ_с, как у мышей группы Н (примерно в 11 раз).

Аналогичная ситуация повторялась и в более поздние сроки. Выраженное запаздывание начала второго подъема интенсивной мультипликации до 9-х сут (в сравнении с 7-ми в группе Н) сменялось более интенсивным накоплением КОЕ_с (время удвоения около 12 ч) в период с 9-х до 11-х сут; кратность увеличения КОЕ_с с 7-х по 11-е сут была аналогична у мышей обеих групп.



Динамика накопления КОЕ_с и ядерных клеток в селезенке (а) и костном мозге (бедре) (б) мышей-реципиентов, защищенных нативным (—) или криоконсервированным (---) костным мозгом. Содержание ядерных клеток — ○, кроветворных клеток (КОЕ_с) — ▲

Динамика формирования пула кроветворных клеток (КОЕ_с) в костном мозге животных группы К в течение длительного времени имела выраженные отличия не только в сравнении с селезенкой мышей обеих групп, но существенно отличалась и от динамики их накопления в костном мозге мышей группы Н. Начиная увеличиваться лишь с 3-х сут, процесс накопления КОЕ_с носил монотонный характер вплоть до 11-х сут. После заметного снижения темпа накопления в период с 11-х по 20-е сут наблюдается новый подъем насыщения костного мозга кроветворными клетками. Оставаясь на протяжении периода с 3-х по 20-е сут на достоверно более низком уровне, показатель содержания КОЕ_с только с 30-х сут не имел существенных различий в сравнении с их количеством у мышей группы Н. Тем не менее к концу месяца он составлял около 70 % нормального уровня.

Подобные различия отмечались и при определении концентрации КОЕ_с в костном мозге мышей групп Н и К (табл. 2). У животных группы Н данный показатель фактически с 30-х сут не имел достоверных различий в сравнении с нормой, тогда как у мышей группы К — только с 40-х сут.

Анализируя динамику накопления КОЕ_с и ядерных элементов в кроветворных органах реципиентов костного мозга, необходимо отметить следующий факт. Время активного «насыщения» КОЕ_с в селезенке не всегда совпадало с аналогичным процессом формирования ядерных клеток (рис. 1). В начальный период выраженного накопления КОЕ_с (со 2-х по 5-е сут) отмечалось лишь незначительное увеличение (причем с 3-х по 5-е сут) ядерных элементов. С 5-х по 7-е сут интенсивность накопления КОЕ_с существенно снижалась (увеличение лишь в 1,2 раза), но в этот же период наблю-

дался резкий подъем содержания ядерных элементов (увеличение в 4,3—4,4 раза). Замедление скорости накопления ядерных клеток с 7-х по 11-е сут (увеличение в 1,7-2,3 раза) снова сменялось интенсивным увеличением содержания КОЕ_с (увеличение в 11—12,6 раза). В определенной степени аналогично протекала и динамика обоих процессов в костном мозге реципиентов, но только с трансплантатом нативного костного мозга. У животных группы К в костном мозге, как уже упоминалось выше, процесс накопления КОЕ_с на первых этапах посттрансплантационного периода носил монотонный характер.

Эффективность криоконсервирования кроветворных клеток костного мозга определяется не только степенью сохранности ими таких свойств, как пролиферативная активность, направленность и скорость дифференцировки, но также способностью распознавать соответствующее микроокружение в кроветворных органах.

Динамика расселения кроветворных клеток в гемопоэтических органах довольно разнообразна и зависит от условий эксперимента. Так, по данным различных авторов [13, 15], через 2 ч после введения костного мозга летально облученным мышам в селезенке оседает от 6 до 20 % КОЕ_с. Через 24 и 48 ч количество КОЕ_с в селезенке снижается, отражая, очевидно, истинный процент осевших в этом органе КОЕ_с [15]. В костном мозге мышей спустя 2 ч оседает примерно такое же количество КОЕ_с. По данным [10], через 2 ч после трансплантации в одном бедре оседает 0,5—1 % введенных КОЕ_с. Если допустить, что кроветворные клетки расселяются аналогичным образом в остальной медуллярной ткани, а также учесть тот факт, что одно бедро составляет примерно 6—8,5 % всего костного мозга [7], во всем костном мозге животного расселяется от 7 до 17 % КОЕ_с. Причины тропизма, который обнаруживается у кроветворных клеток, введенных в организм реципиента, требуют дальнейшего изучения. Остается до конца не выясненным вопрос — все ли введенные КОЕ_с обладают способностью расселяться в кроветворных органах или определенная их фракция. В обоих случаях от этого свойства в последующем будет, вероятно, зависеть эффективность миелотрансплантации облученным реципиентам. Было показано, что кроветворные клетки мышей, подвергнутые воздействию экстремальных факторов, изменяют способность расселяться в кроветворных органах (по Черткову, Фриденштейну [7]). Однако работы по изучению характера изменения указанных свойств КОЕ_с после воздействия факторов криоконсервирования в литературе отсутствуют.

Полученные результаты свидетельствуют о различной динамике расселения нативных клеток в селезенке и костном мозге в раннем посттрансплантационном периоде. До начала интенсивного нарастания количества КОЕ_с с 3-х сут, максимум содержания этих клеток в селезенке определяли через 2 ч, тогда как в костном мозге — спустя 20 ч после трансплантации костного мозга. К 48-му ч их содержание в обоих органах снижалось и, вероятно, это количество осевших кроветворных клеток и будет в дальнейшем определять содержание кроветворных колоний в указанных органах облученных реципиентов. Применительно к криоконсервированным миелокариотам содержание КОЕ_с через 48 ч после трансплантации характеризует величину функционально активных кроветворных клеток в суспензии, сохранивших способность распознавать родственное микроокружение. Эта величина характеризует ту часть КОЕ_с, которая формирует колонии, идентифицируемые методом Тилла и Мак-Каллоха [14] на 10—11-е сут в селезенках реципиентов с трансплантатом криоконсервированного костного мозга и составляет 60—70 % от нативного контроля [2,4].

Однако часть выживших КОЕ_с в силу определенных причин не попадает в кроветворное микроокружение в первые часы после трансплантации, о чем свидетельствует факт более низкого их содержания в селезенке и костном мозге через 2 и 20 ч. Со временем эти различия нивелировались и к 48-му ч как в костном мозге, так и в селезенке они не превышали процента

гибели КОЕ_c в процессе криоконсервирования. Данный факт свидетельствует, вероятно, о восстановлении потенции указанной части кроветворных клеток расселяться в кроветворных органах, что находит свое отражение в замедлении темпа снижения содержания КОЕ_c в период с 20-го по 48-й ч у животных группы К в сравнении с группой Н.

Складывается впечатление, что определенная часть КОЕ_c после криоконсервирования временно теряет способность расселяться в соответствующем микроокружении реципиента. При этом большая часть сохранных КОЕ_c все же расселяется в кроветворных органах реципиентов подобно нативным клеткам, и, следовательно, криоконсервирование не изменяет их «хоминг». Данный факт еще раз подтверждает ранее высказанное предположение, согласующееся с результатами экспериментальных работ, о том, что среди кроветворных клеток с определенными потенциями (9-суточные КОЕ_c) проявляется гетерогенность в отношении чувствительности к действию факторов криоконсервирования [4].

Изменение свойств кроветворных клеток, обуславливающих их тропизм и оседание в кроветворном микроокружении, после криоконсервирования происходит, вероятно, в результате изменения свойств мембраны клеток и, в частности, экспрессируемых структур, ответственных за проявление «хоминга». Восстановление «хоминг»-активности криоконсервированными кроветворными клетками свидетельствует о способности выживших клеток «нарабатывать» эти структуры, которые, как и весь рецепторный аппарат клетки в норме, не являются постоянными и подвержены обновлению.

Развитие в кроветворных клетках нелетальных повреждений, репарируемых, но обуславливающих изменение целого ряда их свойств [4], может оказывать влияние и на динамику процесса такой «наработки». Необходимо отметить, что при снятии мембранных структур типа Н-2, Thy-1,2 антигенов, полная их экспрессия наступает через 6—18 ч [8,11]. Еще более длительное время (18—48 ч) восстанавливаются мембранные структуры КОЕ_c, содержащие сialовую кислоту и в определенной степени ответственные за «хоминг» этих клеток [9,12]. Если криоконсервирование «модифицирует» эти структуры, лишая способности определенную часть КОЕ_c своевременно заселять кроветворные органы, следует ожидать восстановления способности криоконсервированных КОЕ_c расселяться аналогично нативным клеткам через этот промежуток времени.

Под влиянием криоконсервирования ингибируется также пролиферативная активность кроветворных клеток. Этим, по всей видимости, объясняется особенность динамики мультипликации КОЕ_c в течение 3-х сут как в костном мозге, так и в селезенке реципиентов с трансплантатом криоконсервированного костного мозга. Тем не менее остается пока неясным повторное запаздывание начала активной пролиферации криоконсервированных КОЕ_c в селезенке в интервале 7—9 сут. Можно лишь высказать предположение об особенностях влияния на них формирующейся популяции зрелых клеточных элементов. О возможном существовании такого влияния говорит, вероятно, факт «противофазного» волнообразного изменения содержания КОЕ_c и зрелых клеточных элементов в селезенке и костном мозге. На определенных этапах посттрансплантационного периода активная мультипликация КОЕ_c сменяется периодом активного нарастания количества ядерных клеток, когда пролиферация КОЕ_c значительно снижается. Исключение составляет медулярное кроветворение у животных группы К. Данный факт может рассматриваться как одна из особенностей специфического влияния соответствующего кроветворного микроокружения на процессы пролиферации КОЕ_c, подвергавшихся воздействию экстремальных факторов, в частности криоконсервированию.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием криоконсервирования у части кроветворных клеток временно снижается способность распознавать кроветворное микроокружение и расселяться в нем. Данные изменения нивелируются к 48-му ч после введения

костного мозга. Такая особенность расселения криоконсервированных КОЕ_c обусловлена, очевидно, изменением состояния мембранных структур, ответственных за проявление данного феномена. В целом процесс накопления КОЕ_c носит волнообразный характер как в селезенке, так и в костном мозге независимо от вида трансплантата.

1. Безин Г. И., Мороз Б. В. Факторы, контролирующие рециркуляцию стволовых клеток. Модификация эффектов эндогенных глюкокортикоидов на миграцию КОЕ_c у Т-дефицитных мышей // Радиобиология.— 1983.— 23. № 3.— С. 323—328.
2. Гольцев А. Н. Сравнительное изучение функциональных свойств деконсервированных и нативных миелокариоцитов в организме облученных реципиентов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 1978.— 27 с.
3. Дризе Н. И., Чертков И. Л. Возможность артефакта при определении пролиферации стволовых кроветворных клеток методами «самоубийства» КОЕ_c // Иммунология.— 1983.— № 12.— С. 81—83.
4. Криоконсервирование клеточных суспензий. / Под ред. А. А. Цуцаевой — Киев : Наук. думка, 1983.— 240 с.
5. Патологическая физиология экстремальных состояний. / Под ред. П. Д. Горизонтова, Н. Н. Сиротининой.— М. : Медицина, 1973.— 383 с.
6. Цуцаева А. А., Гольцев А. Н., Дроздова О. А. и др. Сравнительное изучение пролиферативной активности нативных и криоконсервированных колониеобразующих единиц человека и мышей // Цитология и генетика.— 1982.— 16, № 1.— С. 14—18.
7. Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворения.— М. : Медицина, 1977.— 272 с.
8. Чертков И. Л., Гуревич О. А. Стволовая кроветворная клетка и её микроокружение.— М. : Медицина, 1984.— 238 с.
9. Boettiger D., Dexter T. M. Altered stem cell (CFU-S) function of hematopoietic cells with a virus carrying V-src // Blood.— 1986.— 67, N 2.— P. 398—406.
10. Burrman W. A., Van Brugger J., Vos O. The influence of genetic resistance of CFU growth kinetics in spleen and femur // Cell Tissue Kinet.— 1975.— 8.— P. 111—118.
11. Mulder A., Visser J., van den Engh G. Thymus regeneration by bone marrow cell suspensions differing in the potential to form early and late spleen colonies // Exp. Hematol.— 1985.— 13.— N 8.— P. 768—775.
12. Ploemacher R. E., Brons N. H. C., Loest P. L. van. Colony formation by bone marrow cells after incubation with neuraminidase // Exp. Hematol.— 1981.— 9.— P. 169—178.
13. Siminovitch L., McCulloch E., Till J. The distribution of colony forming cells among spleen colony // J. Cell Physiol.— 1963.— 62, N 2.— P. 327—336.
14. Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells / Rad. Res.— 1961.— 14, N 12.— P. 213—222.
15. Vos O., Luiten F., Plorniacher R. Logging of CFU_s under various circumstances in bone marrow, spleen and liver // Exp. Hematol.— 1980.— 8, N 7.— P. 860—866.

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

Поступила 05.03.87

УДК 57.043 : 611 — 013 : 577.3

Н. П. Суббота, А. Н. Сукач

КРИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Выяснение возрастных изменений криочувствительности митохондрий необходимо для исследования механизмов холодовых повреждений мембранных систем в зависимости от естественного изменения их структурного состояния в онтогенезе [4]. Характер изменений биоэнергетических параметров митохондрий печени в эмбриональном и постэмбриональном развитии при низкотемпературном воздействии практически не изучен.

Целью настоящей работы было выяснение изменений биоэнергетических параметров митохондрий печени кроликов при холодовом воздействии в онтогенезе.

Исследования проводили на митохондриях печени кроликов в разные сроки онтогенеза: 19-й и 23-й день эмбрионального развития, новорожден-

ные, 1-месячные и 5-месячные животные. Митохондрии получали посредством дифференциального центрифугирования в среде, содержащей в конечной концентрации: сахарозы — 300 мМ, *трис*-HCl — 10 мМ, ЭДТА — 0,25 мМ. Содержание белка определяли по Лоури [11]. Уровень восстановления пиридиннуклеотидов (НАД/Ф/Н) митохондрий определяли на СФ «Хитахи» MPF-2 [10] в среде, содержащей в (мМ): сахарозы — 100, KCl — 75, KH_2PO_4 — 10, MgCl_2 — 2, *трис*-HCl — 20, ротенона — 1 мкМ. Дыхательную активность измеряли полярографически по скорости поглощения кислорода в среде (в мМ): сахароза — 250, *трис*-HCl — 30, KH_2PO_4 — 10, MgCl_2 — 6, ЭДТА — 0,5. При этом дыхательная активность при окислении субстратов обозначалась как V_4 (четвертое метаболическое состояние), а при окислении субстратов и добавке АДФ — V_3 (третье метаболическое состояние) по Чансу. Активность цитохромоксидазы определяли полярографически по скорости окисления аскорбата в присутствии тетраметилпарафенилендиамина (ТМФД), осуществляющего перенос электронов с аскорбата на цитохром *c*, и разобшителя 3-фторметоксикарбонилцианидфенилгидразона (ФКФ). Активность сукцинат- и НАДН-оксидазы определяли полярографически в стандартной среде инкубации с ФКФ. Скорость окисления НАДН по ротенон-антимизин А нечувствительному пути определяли в присутствии ингибиторов I-го и II-го пунктов сопряжения: ротенона и антимизина А.

Концентрации добавок: сукцинат — 10 мМ, глутамат + малат — 10 мМ, аскорбат — 5 мМ, ТМФД — 0,6 мМ, цитохром *c* — 30 мкМ, АДФ — 250 мкМ, антимизин — 1 мкМ, олигомицин — 1 мкМ, ФКФ — 1 мкМ, НАДН — 1 мМ, ротенон — 1 мкМ.

Суспензию митохондрий объемом 1,0 мл замораживали погружением полиэтиленовых ампул в жидкий азот (-196°C), отогревали на водяной бане при температуре 37°C .

Митохондрии, полученные из печени эмбрионов 19-го дня развития, имели низкий дыхательный контроль при окислении сукцината: $1,7 \pm 0,06$, который после замораживания-отогрева оставался на таком же уровне. Скорость окисления сукцината и активность дыхания в 3-м метаболическом состоянии была значительно выше (на 300 и 600 % соответственно), чем у митохондрий половозрелых животных, но после действия холода не изменялась.

Митохондрии печени 23-го дня развития имели высокие скорости окисления субстратов, однако процессы дыхания и окислительного фосфорилирования в таких митохондриях были разобщены: дыхательный контроль равен $1,0 \pm 0,01$. По исследованным параметрам митохондрии после замораживания-отогрева не отличались от нативных, т. е. не реагировали изменением в работе системы на повреждающее действие низких температур.

Скорость окисления сукцината митохондриями печени новорожденных животных была ниже, чем у эмбриональных, и выше, чем у митохондрий 1-месячных животных, т. е. в онтогенезе происходило снижение скорости окисления субстрата. Митохондрии новорожденных животных реагировали на действие низких температур иначе, чем митохондрии эмбриональной печени: происходило увеличение дыхательной активности в состоянии 4 в среднем на 23 %. В онтогенезе этот параметр после замораживания-отогрева увеличивался: у 1-месячных животных — на 70 %, у половозрелых — на 300 %. Дыхание митохондрий печени в состоянии 3 при окислении сукцината митохондриями было более чем в 2 раза выше в группе новорожденных и 1-месячных животных по сравнению с половозрелыми. Наибольшее угнетение дыхания (на 47 %) после замораживания-отогрева было характерно для митохондрий 1-месячных животных.

Степень сопряжения процессов дыхания и окислительного фосфорилирования зависела от возраста животных (табл.). Если, как мы показали выше, в последнюю неделю эмбрионального развития величина дыхательного контроля была минимальной, то в постэмбриональном развитии степень сопряженности была более высокой. После замораживания-отогрева

Функциональное состояние митохондрий печени в онтогенезе и их криочувствительность
(скорости даны в мкМолях O_2 /мг мх белка мин), $n = 5-7$

Субстрат окисления	Измеряемый параметр	Нативные митохондрии			Замороженно-отогретые митохондрии		
		новорожденные	1-месячные	5-месячные	новорожденные	1-месячные	5-месячные
Глутамат + малат	V_4	$7,2 \pm 1,50$	$7,7 \pm 1,60$	$3,1 \pm 0,71$	$18,4 \pm 1,40$ $p < 0,05$	$21,2 \pm 2,84$ $p < 0,05$	$7,7 \pm 0,90$ $p < 0,05$
	V_3	$38,9 \pm 4,06$	$45,6 \pm 4,30$	$13,9 \pm 0,57$	$37,7 \pm 4,10$ $p > 0,05$	$29,0 \pm 3,80$ $p < 0,05$	$15,0 \pm 1,30$ $p > 0,05$
	ДК _{Ларди}	$4,4 \pm 0,10$	$6,5 \pm 1,20$	$4,3 \pm 0,24$	$2,2 \pm 0,50$ $p < 0,05$	$1,8 \pm 0,29$ $p < 0,05$	$2,3 \pm 0,17$ $p < 0,05$
	АДФ/О	$1,3 \pm 0,10$	$1,7 \pm 0,19$	$2,3 \pm 0,20$	$1,1 \pm 0,20$	$1,3 \pm 0,20$	$2,0 \pm 0,30$
	V_4	$24,7 \pm 2,31$	$13,2 \pm 2,60$	$6,3 \pm 0,57$	$34,5 \pm 3,21$ $p < 0,05$	$25,5 \pm 3,30$ $p < 0,05$	$18,0 \pm 1,66$ $p < 0,05$
	V_3	$44,3 \pm 3,10$	$59,8 \pm 4,60$	$22,1 \pm 2,49$	$55,8 \pm 4,23$ $p > 0,05$	$30,6 \pm 4,21$ $p < 0,05$	$26,2 \pm 2,84$ $p > 0,05$
Сукцинат	ДК _{Ларди}	$2,5 \pm 0,18$	$4,5 \pm 1,10$	$3,3 \pm 0,17$	$1,8 \pm 0,14$ $p < 0,05$	$1,4 \pm 0,19$ $p < 0,05$	$1,8 \pm 0,10$ $p > 0,05$
	АДФ/О	$1,2 \pm 0,07$	$1,4 \pm 0,10$	$1,6 \pm 0,17$	$1,1 \pm 0,10$ $p > 0,05$	$1,4 \pm 0,06$ $p > 0,05$	$1,8 \pm 0,07$ $p > 0,05$

Примечание. ДК — дыхательный контроль, отношение V_3/V_4 , V_4 — дыхательная активность при окислении субстратов, V_3 — дыхательная активность при окислении субстратов и АДФ.

этот параметр в эмбриональных митохондриях не изменялся, в то время как в группе новорожденных — снижался на 20 %, а в группе половозрелых животных — на 50 %. Таким образом, в постэмбриональном развитии животных наибольшее снижение дыхательного контроля после замораживания-отогрева показано для митохондрий 1-месячных кроликов (31 % от величины этого параметра в нативных органеллах печени животных этого же возраста).



В процессе развития отмечено многократное усиление чувствительности дыхания к олигомицину. Наиболее чувствительны к нему были митохондрии 1-месячных животных. При этом олигомицин тормозил дыхание митохондрий, активированное замораживанием-отогревом.

НАДН-оксидазная активность митохондрий (окисление добавленного НАДН в присутствии ФКФ) печени в онтогенезе снижалась. У новорожденных животных она была в 3 раза выше, чем у половозрелых и не изменялась после замораживания-отогрева органелл, в то время как в группе половозрелых увеличивалась на 60 % (рис. 1).

Окисление экзогенного НАДН митохондриями разного возраста животных чувствительно к антимицину А, т. е. окисление идет по пути, шунтирующему два первых пункта сопряжения. Ингибирование антимицином скорости окисления НАДН в одинаковой степени в контроле и опыте говорит о том, что активация окисления НАДН митохондриями после замора-

живания связана с проникновением НАДН в матрикс и окислением его по ротенон-антимидин-чувствительному пути. При этом следует отметить, что чувствительность к антимидину митохондрий печени возрастает в течение 1 месяца развития, увеличиваясь в ряду: новорожденные < 1-месячные = половозрелые животные.

Сукцинатоксидазная активность (рис. 1) была максимальной в группе 1-месячных животных (почти в 4 раза выше, чем у новорожденных, и в 3 раза, чем у половозрелых животных.) Значительное увеличение (в 3,7 раза) активности фермента было отмечено в замороженно-отогретых митохондриях новорожденных животных, в то время как в группе 1-месячных и половозрелых животных этот параметр после действия холода увеличивался лишь незначительно.

Окисление НАД-зависимых субстратов глутамата и малата происходило с большими скоростями, но снижалось в онтогенезе: у новорожденных оно было в 2 раза выше, чем у половозрелых и 1-месячных. После замораживания митохондрий, независимо от возраста животных, скорость окисления глутамат + малат увеличивалась в среднем в 2,5 раза (табл.).

У половозрелых животных по сравнению с месячными и новорожденными интенсивность дыхания в 3-м метаболическом состоянии при окислении НАД-зависимых субстратов снижается.

Добавка ФКФ (максимальная активность дыхательной цепи) увеличивала дыхательную активность митохондрий половозрелых животных на 64 %, 1-месячных — на 28 % и не изменяла — в митохондриях новорожденных животных при окислении НАД-зависимых субстратов. Максимальная активность дыхательной цепи при окислении сукцината практически не зависела от возраста животных — увеличение по сравнению со стимуляцией дыхательной активности АДФ в среднем на 70 %. После замораживания органелл угнетенная скорость дыхания в состоянии 3 при окислении глутамат + малат стимулировалась добавкой ФКФ лишь в группе половозрелых животных. Однако в отличие от активности цепи при окислении глутамат + малат, при окислении сукцината замороженно-отогретыми митохондриями наибольшая скорость дыхания в разобленном состоянии была показана для 1-месячных животных. Вместе с тем следует отметить, что угнетение дыхательной активности в состоянии 3 после замораживания-отогрева было более выражено у митохондрий 1-месячных животных, независимо от используемого субстрата окисления, т. е. наибольшее угнетение активности электронтранспортной цепи митохондрий наблюдалось в группе 1-месячных животных (табл.).

По имеющимся в литературе единичным данным [6, 8] на ранних стадиях эмбриогенеза в митохондриях хотя и преобладают реакции сопряженного фосфорилирования, в последующем эти процессы снижаются, и повышается уровень свободного окисления, особенно — у новорожденных животных, обеспечивающий поступление энергии для поддержания температуры тела.

Известно, что по мере развития животных изменяется проницаемость митохондриальных мембран для сахарозы [3]. Возможно, это является одной из причин, связанной с тем, что митохондрии эмбриональных и новорожденных животных после замораживания-отогрева захватывают в матрикс больше сахарозы, чем половозрелые, поэтому и меньше повреждаются холодом [4].

В онтогенезе нарастает удельная активность окислительных ферментов. Подъем окислительного метаболизма после рождения, особенно резкий при выходе из гнезда и переходе к активному образу жизни (рис. 1), тесно связан со становлением терморегуляционных функций и проявляется в расширении температурного диапазона, в пределах которого поддерживается температура тела [5]. Это связано прежде всего с развитием механизмов химической регуляции.

Интенсивные окислительные процессы требуют адекватного снабжения восстановительными эквивалентами [2, 7, 9]. Уровень интенсивности синей

флуоресценции митохондрий был различен в исследованные сроки развития животных, что может свидетельствовать об изменениях редокс-состояния НАД. Уровень восстановленности после замораживания-отогрева снижался в большей мере в группе 1-месячных и половозрелых животных (рис. 2).

Данные ряда авторов свидетельствуют о том, что митохондрии новорожденных кроликов уже содержат полный набор ферментов переноса электронов и окислительного фосфорилирования [9], однако в мембранах морфологически развитой эндоплазматической сети отсутствуют активные ферменты системы транспорта электронов. В течение первой недели жизни после рождения происходит развитие этой системы, причем включение различных компонентов системы транспорта электронов в мембрану происходит асинхронно. Таким образом, есть основания полагать, что отдельные компоненты включаются в мембрану независимо друг от друга, а не в виде структурно организованных мультиферментных комплексов. Например, известно, что плоды перед рождением и однодневные крысы имеют самое низкое соотношение цитохромов *c/a* в гомогенате печени [5]. По мере развития механизмов несократительного термогенеза соотношение цитохромов *c/a* — увеличивается, особенно к 20—30-му дню — периоду максимальной активности в постэмбриональном развитии, и затем вновь снижается у молодых и взрослых животных. Ко взрослому состоянию возникает возможность длительного поддержания обмена на высоком уровне.

В наших экспериментах, как видно из рис. 1, активность терминального участка дыхательной цепи митохондрий была максимальной в группе 1-месячных животных, а затем снижалась: у половозрелых — в 3 раза ниже, чем у 1-месячных, а у новорожденных — незначительно выше, чем у половозрелых, что согласуется с данными других авторов [5]. Активность цитохромоксидазы после замораживания-отогрева органелл, независимо от возраста животных, практически не изменялась.

Вместе с тем в литературе отмечена независимость изменений показателей функционального состояния митохондрий в эмбриогенезе [1,5]. Действительно, в период, характеризующийся, как известно, совершенствованием клеточного строения и усилением синтеза гликогена и многих белков-ферментов, падение интенсивности дыхания, окислительного фосфорилирования выглядит неожиданным и на данном этапе исследований трудно объяснимым.

Немаловажное значение при изучении криочувствительности митохондрий развивающихся тканей имеет наличие структурных возрастных изменений их мембран. Например, известно, что в ходе развития выраженные изменения претерпевает липидный и жирокислотный состав мембран [4]. Жиры и липиды плодов и новорожденных животных более восстановлены, так как содержат меньшее число двойных связей, чем у взрослых.

Возможно также, что микродефекты мембран митохондрий, образующиеся в результате фазового разделения липидов при охлаждении, при отогреве лучше «затекают липидами» у молодых кроликов, чем у взрослых. Это подтверждено данными о том, что в процессе онтогенеза «текучесть» липидного бислоя уменьшается. Показано также, что наружная мембрана раньше разрывается в митохондриях половозрелых животных и лишь при более жесткой гипотонической обработке — у 1-месячных животных [4].

Что касается наблюдавшейся в наших экспериментах разной степени крионарушений митохондрий печени, то она определяется, очевидно,

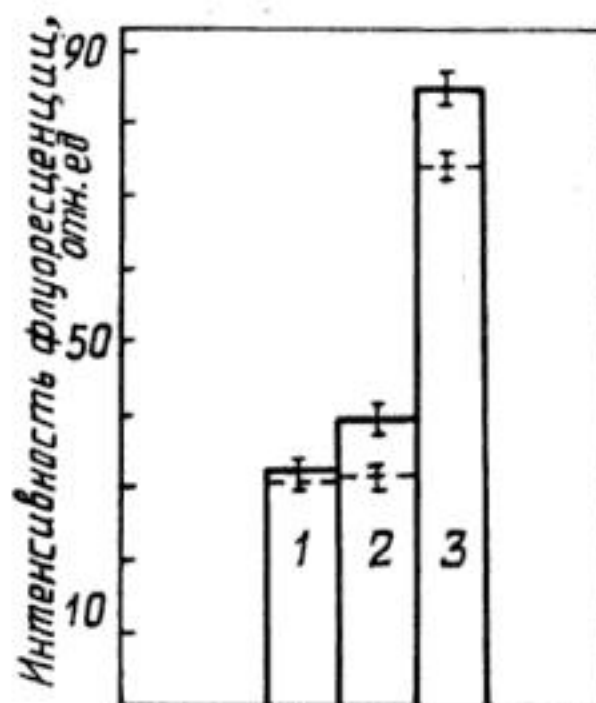


Рис. 2. Уровень восстановленности НАД в митохондриях печени новорожденных (1), 1-месячных (2), 5-месячных (3) животных после замораживания-отогрева: — — — контроль, — — — быстрое замораживание

структурно-функциональной активностью исследованных систем в разные сроки онтогенеза.

1. Аршавский И. А., Розанова В. Д., Немец М. Г. Особенности продукции АТФ в разные возрастные периоды — их корреляция с потреблением кислорода на уровне целостного организма и другими биохимическими показателями // Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена.— Пущино, 1986.— С. 115.
2. Карлсон Б. Основы эмбриологии по Пэттену.— М.: Мир, 1983.— Т. 2.— 298 с.
3. Кафиани К. А., Маленков А. Г. Роль ионного гомеостаза клетки в явлениях роста и развития // Усп. совр. биол.— 1976.— 81, № 3.— С. 445—463.
4. Лемешко В. В. Возрастные перестройки структурно-функционального состояния мембранных редокс-систем : Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук.— Харьков, 1983.— 34 с.
5. Маслова Г. М. Особенности тканевого дыхания, определяющие теплопродукцию на различных этапах онтогенеза и при адаптации к холоду взрослых животных : Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1971.— 19 с.
6. Парина Е. В., Калиман П. А. Механизмы регуляции ферментов в онтогенезе.— Харьков, Изд-во ХГУ, 1978.— 204 с.
7. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах.— М.: Наука 1972.— 198 с.
8. Стрелер Б. Время, клетки и старение.— М.: Наука.— 1964.— 272 с.
9. Финейан Д., Колмэн Р., Мичелл Р. Мембраны и их функции в клетке.— М.: Мир, 1977.— С. 188—189.
10. Boyer P. D., Theorell H. The change in reduced diphosphopyridine nucleosides (DPN-H) fluorescence upon combination with liver alcohol dehydrogenase // Acta Chem. Scand.— 1956, 10.— P. 447—450.
11. Lowry O., Rosenbrough H., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.— 1951, 193.— P. 265—275.

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

Поступила 03.07.86

УДК 53.082.4 : 615.012.41

М. Е. Унксов, Б. Я. Шпиченецкий, Н. А. Онищенко

ПРИМЕНЕНИЕ АКУСТИЧЕСКОГО МЕТОДА ОЦЕНКИ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ КОНСЕРВИРУЮЩИХ РАСТВОРОВ

Одними из первых в ишемизированном органе начинаются процессы уменьшения мембранного потенциала и перераспределения концентраций ионов K^+ и Na^+ между клеткой и межклеточным пространством. В живой клетке концентрация ионов K^+ много больше, чем в межклеточном пространстве, ионов Na^+ — наоборот. При снижении мембранного потенциала начинается встречная диффузия ионов через мембрану, приводящая к выравниванию концентраций ионов во внутриклеточном и внеклеточном пространстве. Известно, что скорость распространения ультразвука в среде зависит от температуры и концентрации электролитов [1].

С целью выяснения причин изменения скорости ультразвука в ишемизированном органе, помещенном в консервирующий раствор при постоянной температуре, проведен следующий модельный эксперимент. В разделенную перегородкой акустическую ячейку, расположенную перпендикулярно направлению ультразвука, были налиты растворы солей калия и натрия, соответствующие по составу клеточной и внеклеточной жидкостям. Была измерена скорость ультразвука в ячейке, после чего в перегородке открыли диафрагму, дали жидкостям смешаться и вновь замерили скорость ультразвука. Скорость увеличилась на 8 м/с, т. е. на величину, близкую к изменению скорости ультразвука в органе, помещенном в консервирующий раствор [2]. На основании этого сделан вывод, что изменение скорости ультразвука в органе, помещенном в консервирующий раствор с постоянной температурой, связано в основном с перераспределением концентраций K^+ и Na^+ .

Необходимым условием чувствительности скорости ультразвука к указанным процессам является аддитивность частей среды. Скорость

ультразвука линейна относительно концентрации катионов; анионный состав клетки и межклеточного пространства неизменен. Таким образом, время стабилизации ультразвука в ишемизированном органе соответствует времени выравнивания концентраций катионов, после которого в тканях органа начинаются необратимые изменения, связанные с разрушением клеточных мембран и перестройкой белков.

Целью настоящей работы является разработка неразрушающего метода оценки защитных свойств консервирующих растворов, основанного на зависимости изменения скорости звука в ишемизированном органе от интенсивности диффузных процессов, связанных с перераспределением веществ между клетками и внеклеточным пространством.

Оценка изменений скорости ультразвука при выравнивании концентраций ионов K^+ и Na^+ показала, что эти изменения составляют несколько метров в секунду (0,5%).

Для экспериментальных исследований была разработана установка для измерения скорости ультразвука с точностью до 0,5 % при размерах исследуемого органа 5–10 мм. В установку входит система термостабилизации температуры с точностью $\pm 0,05$ К.

Для обеспечения требуемого уровня термостатирования применяется интегрирующий контейнер, связанный с ультратермостатом УТ-15. Контейнер состоит из системы цилиндрических стаканов с герметичными полостями между ними. Во внешней полости объемом $5 \cdot 10^{-6}$ м³ циркулирует жидкость, подаваемая от термостата. В следующей полости объемом $5 \cdot 10^{-5}$ м³ находится дистиллированная вода, служащая температурным демпфером. Внутренняя полость представляет собой объем порядка $5 \cdot 10^{-6}$ м³ с исследуемой жидкостью. При постоянстве температуры в ультратермостате УТ-15 в пределах $\pm 0,5$ К такая система обеспечивает в исследуемом объеме колебания температуры, не превышающие $\pm 0,05$ К.

Структурная схема устройства для определения скорости ультразвука в изолированных органах, помещенных в консервирующий раствор, приведена на рис. 1. Задающий генератор, собранный по схеме с автотрансформаторной связью, генерирует синусоидальные колебания, частота которых изменяется от 200 до 300 кГц с помощью конденсатора переменной емкости. Формирователь меандра из синусоидальных колебаний формирует меандр, частота которого измеряется цифровым частотомером-хронометром Ф5034. Далее меандр подается на формирователь импульсов запуска декады, который из меандра формирует положительные импульсы амплитудой 7 В, длительностью 0,7 мкс, поступающие на вход декады и вход формирователя измерительных меток. Формирователь измерительных меток дает метки с фронтом 0,5 нс, которые подаются на один из входов двухлучевого осциллографа. Декада делит частоту водных импульсов на 10 и осуществляет задержку поделенных импульсов, которые подаются на формирователь. Он вырабатывает импульсы синхронизации длительностью 50 нс, в 10 раз меньшей, чем частота измерительных меток, которые используются при синхронизации осциллографа.

Импульсы с последнего выхода декады поступают на вход формирователя модулирующих импульсов, который формирует положительные импульсы амплитудой 12 В с изменяющейся длительностью импульсов (1, 5, 10 мкс).

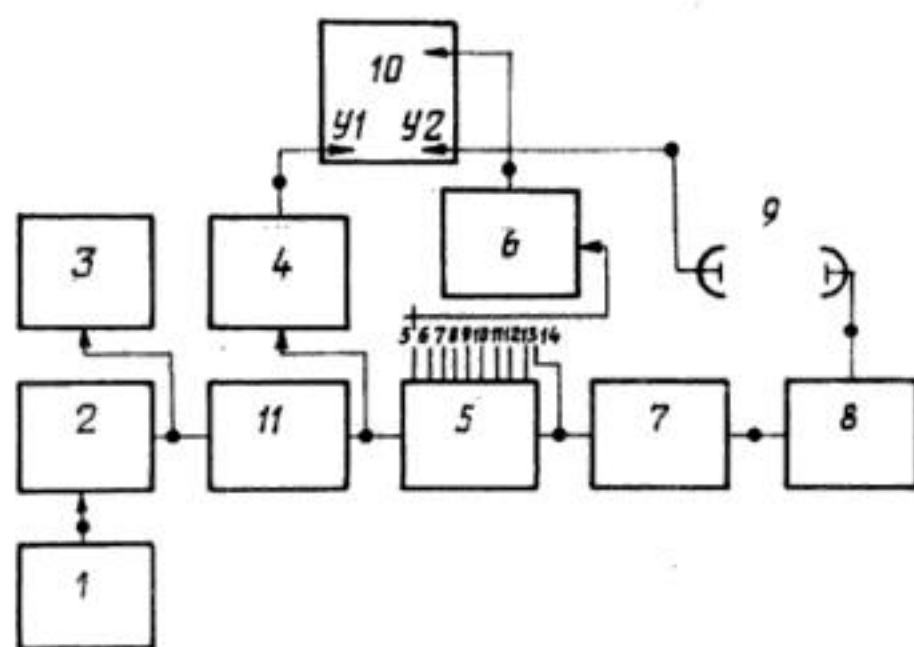


Рис. 1. Структурная схема устройства для определения скорости ультразвука в изолированных органах:

1 — задающий генератор, 2 — формирователь меандра, 3 — частотомер, 4 — формирователь измерительных меток, 5 — декада, 6 — формирователь импульсов синхронизации, 7 — формирователь модулирующих импульсов, 8 — генератор высокой частоты, 9 — датчик-пьезопреобразователь, 10 — двухлучевой осциллограф, 11 — формирователь импульсов запуска декады

Генератор высокой частоты вырабатывает радиоимпульсы амплитудой 10 В. Частота высокочастотных колебаний изменяется ступенчато с помощью переключателя (10, 20, 30 МГц). Эти радиоимпульсы преобразуются передающим пьезопреобразователем в ультразвуковые колебания, которые распространяются в камере с исследуемой средой. Приемный пьезопреобразователь преобразует ультразвуковые колебания, прошедшие через камеру в радиоимпульсы. В качестве ультразвуковых датчиков использовались пьезообразователи из керамики цирконата титаната бария. С приемного пьезообразователя радиоимпульсы поступают на второй вход осцилло-

графа. Наиболее полно отвечает указанным требованиям широкополосный двухлучевой осциллограф С1-79.

Интенсивность излучения оценивалась следующим образом. При амплитуде напряжения 20 В, токе 1 мА и скважности импульса 5 средняя мощность электрического импульса не превышала $2 \cdot 10^{-2}$ Вт, КПД преобразователя из пьезокерамики с невысокой добротностью был равен приблизительно 40 %. Таким образом, при площади пьезообразователя $\sim 10^{-5}$ м² интенсивность ультразвука — 10^2 Вт/м². Измерения мощности калориметрическим методом дают интенсивность $5 \cdot 10^2$ — 8×10^2 Вт/м², что значительно ниже уровней ультразвука, применяемых при терапии (до 2×10^4 Вт/м²).

В устройстве использован метод измерения скорости ультразвука (c) по времени прохождения ультразвукового импульса (τ) через изолированный орган, находящийся в консервирующем растворе: $c = l/\tau$, где l —

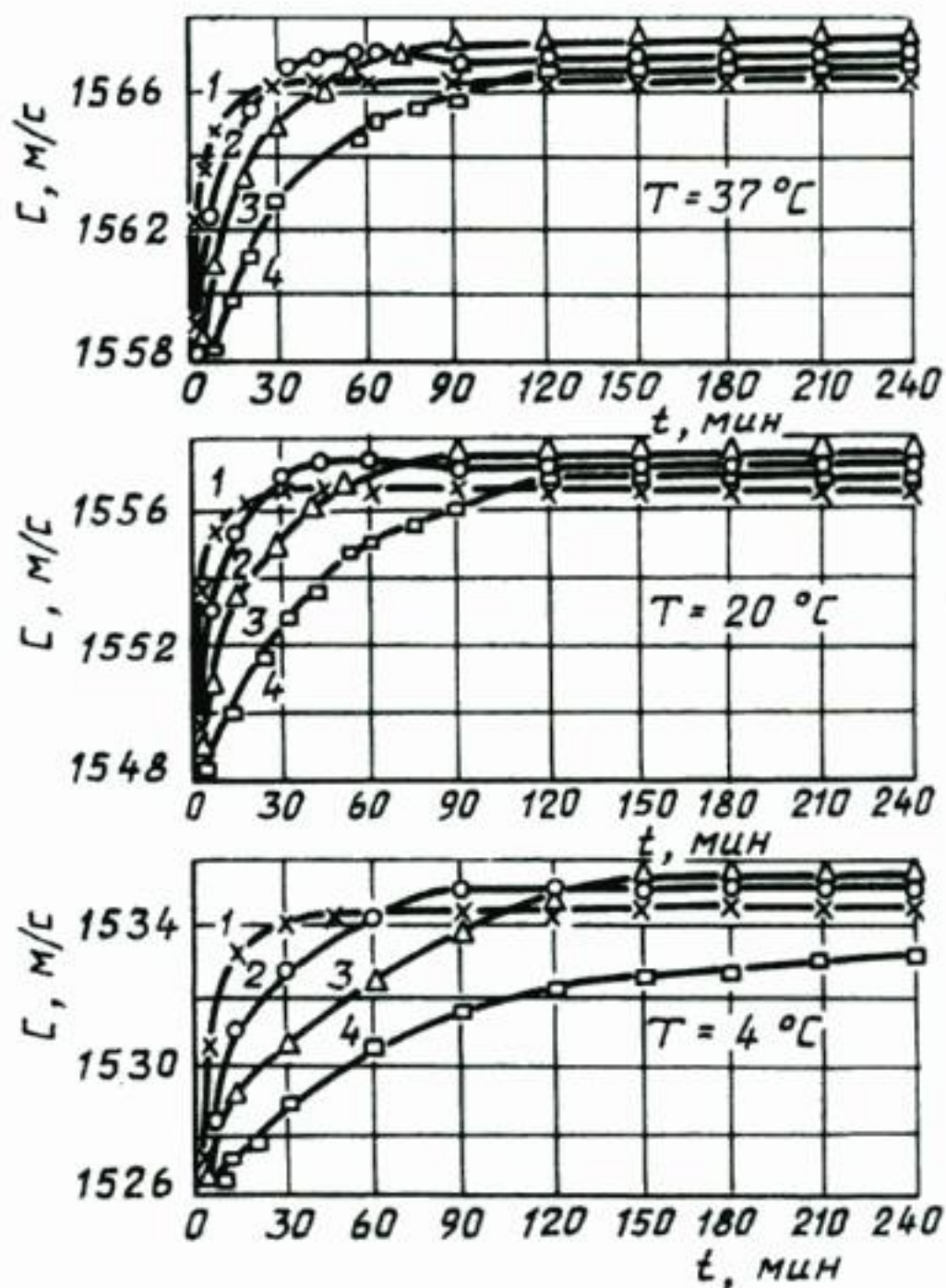


Рис. 2. Зависимость скорости ультразвука в почках белых крыс от времени их консервации. Консервирующие растворы: 1 — физраствор; 2 — НИИТиО-1; 3 — Коллинза; 4 — НИИТиО-2

расстояние между пьезообразователями, которые имеют акустический контакт с исследуемым органом. Время (τ) измерялось путем совмещения измерительной метки с первым максимумом заполнения импульса, прошедшего через среду.

На установке проводили измерения τ на почках белых крыс, которые сразу после их отнятия у животного помещались в термостатированный контейнер с консервирующим раствором. Были проведены серии экспериментов с различными консервирующими растворами при разных температурах. В каждой серии экспериментов ультразвуковым методом исследовался процесс консервации на 20 почках белых крыс. На рис. 2 приведены зависимости скорости ультразвука в почках белых крыс от времени их консервации для различных растворов при температурах 4, 20 и 37 °С. На кривых можно отметить характерную точку, после которой скорость ультразвука перестает изменяться — точку стабилизации.

Из полученных кривых видно, что при помещении почек белых крыс в физраствор при температуре 37 °С точка стабилизации соответствует времени умирания 40 мин. С этими данными можно сравнить данные опытов [3] на почках белых крыс, в которых вызывали ишемию путем прекращения кровоснабжения и измеряли окислительно-восстановительный потен-

циал (ОВП). Эти опыты показали, что динамика ОВП прекращалась через 40—45 мин. Время, в течение которого происходят изменения ОВП, соответствует периоду обратимых изменений в консервируемом органе. Таким образом, время стабилизации скорости ультразвука в органе в процессе его консервации можно считать временем, в течение которого в организме происходят обратимые изменения.

Из рис. 2 видно, что для различных температур время стабилизации процесса скорости ультразвука различно для разных консервирующих растворов, причем, чем меньше наклон кривой, тем позднее наступает стабилизация. Проведенные измерения показывают, что при консервации почки в растворах внутриклеточного типа стабилизация скорости ультразвука происходит позже, чем в растворах внеклеточного типа. Это значит, что первые больше способствуют поддержанию разности концентраций K^+ и Na^+ , а следовательно, и поддержанию мембранного потенциала.

Проанализируем теперь физические процессы, приводящие к изменению скорости ультразвука в изолированном органе при его умирании. Известно, что в живом органе концентрация ионов K^+ в клетке на порядок выше, чем в межклеточном пространстве, а ионов Na^+ — наоборот. При умирании органа концентрации выравниваются. Оценим влияние этого процесса на скорость ультразвука.

Решим эту задачу в первом приближении, сделав следующие допущения: 1) среда является аддитивной и замкнутой, 2) среда состоит лишь из двух типов слоев: клеточного и межклеточного, 3) начальная концентрация Na^+ в клеточном и K^+ во внеклеточном пространстве равна нулю, 4) при ишемии коэффициенты диффузии ионов каждого вида через мембрану постоянны. Исходя из этого, можно рассматривать одномерную модель клеточной ткани как две среды, разделенные перегородкой, через которую происходит диффузия ионов, направленных на выравнивание их концентраций.

Тогда концентрации K_1 и K_2 соответственно Na^+ и K^+ в первой и второй среде в зависимости от времени t изменяются по закону:

$$\begin{aligned} K_1(t) &= \frac{K_0}{2} [1 + \exp(-\lambda_1 \cdot t)], \\ K_2(t) &= \frac{K_0}{2} [1 + \exp(-\lambda_2 \cdot t)], \end{aligned} \quad (1)$$

где K_0 — начальная концентрация компонента в первой среде при условии, что его концентрация во второй среде равна нулю; λ_1 , λ_2 — коэффициенты диффузии ионов соответственно Na^+ , K^+ .

Известно [1], что адиабатическая сжимаемость раствора β при малых концентрациях линейно зависит от концентрации компонента в этом растворе:

$$\beta(t) = \beta_0 - A \cdot K(t), \quad (2)$$

где β_0 — адиабатическая сжимаемость в дистиллированной воде, A — коэффициент пропорциональности.

Так как скорость ультразвука в растворе c зависит от β следующим образом [1]

$$c = \sqrt{\frac{1}{\rho\beta}}, \quad (3)$$

где ρ — плотность раствора, то для малых концентраций получим:

$$c = \sqrt{\frac{1}{\rho[\beta_0 - AK(t)]}} \simeq \frac{1}{\sqrt{\rho\beta_0}} \left[1 + \frac{A}{2} K(t) \right] = c_0 \left[1 + \frac{A}{2} K(t) \right]. \quad (4)$$

Используя соотношения (1) и выражение (4), учитывая, что средняя скорость ультразвука при прохождении сред $c = \frac{C_1 \cdot C_2}{C_1 + C_2}$, и пренебрегая членами второго порядка малости, получим

$$c(t) = \frac{c_\infty^2}{c_\infty + [\alpha_1 \cdot \exp(-\lambda_1 \cdot t) + \alpha_2 \cdot \exp(-\lambda_2 \cdot t)]}, \quad (5)$$

где $c(t)$ — скорость ультразвука в органе, помещенном в консервирующий раствор при постоянной температуре в момент времени t , в течение которого в органе происходят обратимые изменения, c_∞ — скорость ультразвука в органе после окончания ионообмена, определяемая по формуле $c_\infty = c_0 + \alpha_1 + \alpha_2$, где $\alpha_1 = \frac{A_1 K_{01}}{4}$, $\alpha_2 = \frac{A_2 K_{02}}{4}$, K_{01} — начальная концентрация натрия в первой среде (межклеточном пространстве), K_{02} — начальная концентрация калия во второй среде (в клетках).

Расчеты показывают, что для почек белых крыс $\alpha_1 = 57$ м/с, $\alpha_2 = 35$ м/с.

Из формулы (5) видно, что, чем меньше коэффициенты диффузии λ_1 и λ_2 , тем медленнее идет процесс выравнивания концентраций ионов Na^+ и K^+ и тем сильнее пролонгирующее действие раствора. Определение коэффициентов λ_1 и λ_2 для каждого конкретного консервирующего раствора позволяет оценить его защитные свойства. Для расчета этих коэффициентов необходимо снять зависимость скорости ультразвука в органе, помещенном в исследуемый консервирующий раствор при заданной температуре, от времени умирания. Используя формулу (5), на ЭВМ производится расчет коэффициентов λ_1 и λ_2 .

В таблице приведены значения коэффициентов λ_1 и λ_2 для физиологического раствора и применяемых для консервации почек растворов Коллинза, НИИТиО-1, НИИТиО-2.

Значения коэффициентов диффузии λ_1 для Na^+ и λ_2 для K^+ в различных растворах

Раствор	Коэф. диффузии	Температура, °C					
		5	10	15	20	30	37
Физиологический	λ_1	4,5	4,5	4,6	4,8	5,6	5,8
	λ_2	2,6	2,7	2,9	2,9	3,3	3,2
Коллинза	λ_1	1,9	2,0	2,4	3,0	3,5	3,7
	λ_2	0,9	1,2	1,4	1,6	1,9	2,3
НИИТиО-1	λ_1	3,0	3,1	3,2	3,4	3,8	3,9
	λ_2	0,1	0,3	0,4	0,6	0,8	0,9
НИИТиО-2	λ_1	1,9	2,1	2,4	2,9	3,2	3,6
	λ_2	1,8	2,0	2,3	2,7	2,9	3,1

Сравнение данных, приведенных в таблице, с результатами, полученными при оценке эффективности по биологическим тестам [4], показывают, что растворы, имеющие меньшие значения коэффициентов диффузии λ_1 и λ_2 , обладают большими допустимыми сроками хранения. Применение ультразвукового метода для оценки защитных свойств консервирующих растворов дает также возможность оценивать скорость диффузии каждого из компонентов. Из таблицы видно, что в гипернатриевом физиологическом растворе скорость диффузии натрия выше, чем в остальных. Напротив, в гиперкалиевом растворе НИИТиО-1 диффузия калия замедлена. Раствор НИИТиО-2 обладает наиболее выравненными коэффициентами диффузии, что препятствует осмотическому шоку.

В заключение можно сделать следующие выводы:

— время стабилизации ультразвука в органе, помещенном в консервирующий раствор при постоянной температуре, соответствует периоду обратимых изменений в органе;

— скорость ультразвука в органе, помещенном в консервирующий раствор, связана со значениями коэффициентов диффузии ионов K^+ и Na^+ ;

— по значениям коэффициентов диффузии можно оценивать защитные свойства консервирующего раствора при фиксированной температуре.

1. Ноздрев В. Ф., Федорищенко Н. В. Молекулярная акустика.— М. : Высшая школа, 1974.— 288 с.
2. Унксов М. Е. Применение ультразвука для исследования физико-химических параметров биологических сред // Медикотехнические аспекты сохранения изолированных органов.— М. : СНИИМИ, 1980.— С. 41—54.
3. Шумаков В. И., Штенгольд Е. Ш., Онищенко Н. А. Консервация органов.— М. : Медицина, 1975.— 252 с.
4. Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Кирпатовский В. И. Фармакологическая защита трансплантата.— М. : Медицина, 1983.— 234 с.

Всесоюзный заочный машино-
строительный ин-т,
Научно-исследовательский
ин-т трансплантологии и
искусственных органов,
г. Москва

Поступила 02.01.86

УДК 539.143.43 : (536.48 : 576.851.48)

И. С. Булатов, Е. П. Нарышкина, В. Я. Волков

ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО pH В *ESCHERICHIA COLI* ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ

Замораживание является одним из эффективных методов консервирования биопрепаратов на основе живых микроорганизмов. Однако их сохранность в замороженном состоянии и выживаемость после отогрева зависят от большого числа факторов, роль которых в повреждении и гибели клеток до настоящего времени продолжает интенсивно исследоваться. Целью данной работы является измерение методом ^{31}P -ЯМР спектроскопии значений внутриклеточного pH (pH_{in}) клеток *E. coli* до и после замораживания-отогрева в зависимости от скорости замораживания и при введении защитной среды.

Метод определения *in vivo* pH_{in} основан на зависимости химических сдвигов δ сигналов ЯМР ядер фосфора ^{31}P от pH среды, в которой находятся неорганический фосфат и некоторые фосфорсодержащие соединения. При существовании различий в значениях pH во вне- и внутриклеточной среде (т. е. при наличии трансмембранного градиента ΔpH) на спектре ^{31}P -ЯМР определяются два отдельных сигнала от вне- и внутриклеточного неорганического фосфата (рис. 1, А). Определение положения этих сигналов и кривой титрования неорганического фосфата (т. е. зависимости хим. сдвига δ от pH среды) при определенной температуре (рис. 2) позволяет с точностью не менее $\pm 0,1$ ед. pH измерять значения внутри- и внеклеточного pH (pH_{ex}), а также величину градиента pH ($pH = pH_{in} - pH_{ex}$)

На рис. 1 представлены ^{31}P -ЯМР спектры исходной суспензии нативных клеток *E. coli* стационарной фазы (без защитной среды — А) и после замораживания (при $-50^\circ C$) и последующего оттаивания (Б). Сдвиг сигналов вне- и внутриклеточного неорганического фосфата на спектре Б свидетельствует о происшедшем в результате замораживания-отогрева закислении как внутриклеточного пространства (от pH 6,9 до 5,8), так и внеклеточной среды (от pH 5,8 до 4,0).

Метод ^{31}P -ЯМР спектроскопии отличается быстротой определения pH (при наличии градуировочной кривой $\sigma = f(pH)$ достаточно нескольких минут). Кроме того, данный метод не является возмущающим и исключает искажение результатов за счет воздействия на физиологическое состояние клетки, поскольку поглощаемая ядрами фосфора радиочастотная энергия пренебрежимо мала даже по сравнению с энергией теплового движения. Недостатком этого метода является низкая чувствительность, что приводит к необходимости использовать концентрированные клеточные суспензии ($\geq 10^{11}$ кл/мл). Тем не менее метод ^{31}P -ЯМР спектроскопического исследования внутриклеточного pH и процессов метаболизма *in vivo* занимает в

настоящее время достойное место среди других методов, применяемых при изучении физиологии микробной клетки [5, 12].

Клетки *E. coli* выращивали аэробно при 37 °С на синтетической питательной среде М9 (с 1 % глюкозы) до середины логарифмической фазы или до начала стационарной стадии роста. Для замедления процессов метаболизма клетки охлаждали при 4 °С в течение 1 ч. Удаление остатков питательной среды и продуктов метаболизма проводили промыванием средой М9 (без глюкозы). Осадок разводили до концентрации $\sim (1,6 \pm 0,3) 10^{11}$ кл/мл 30 мМ трис-фосфатным буфером, рН 7,5 и тяжелой водой (D_2O), добавка

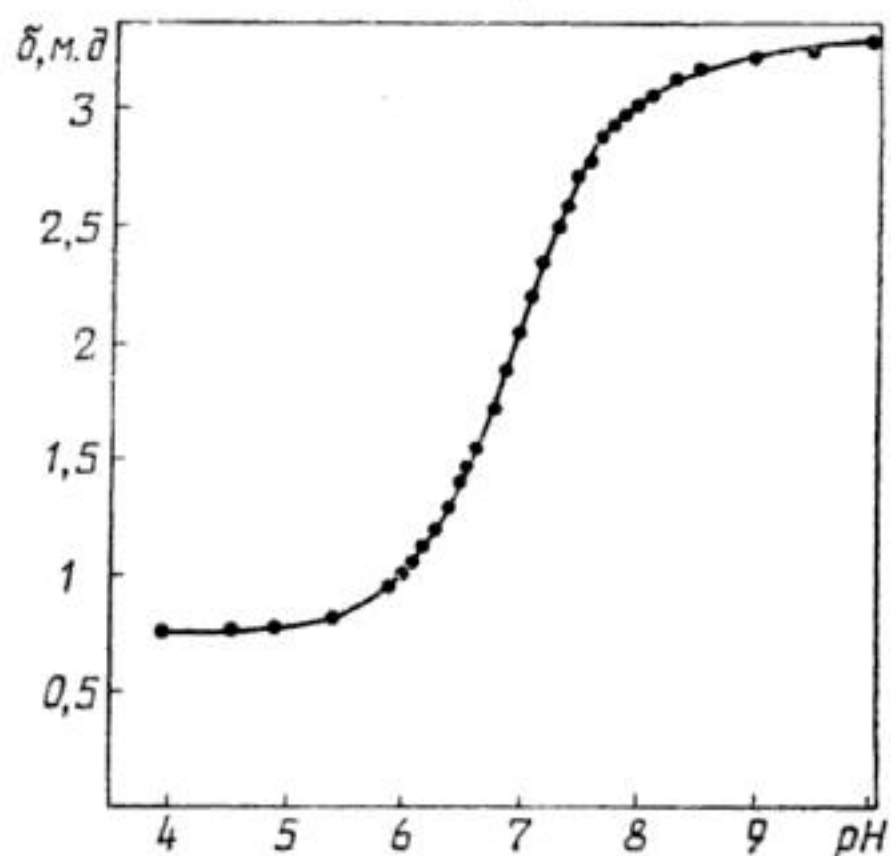
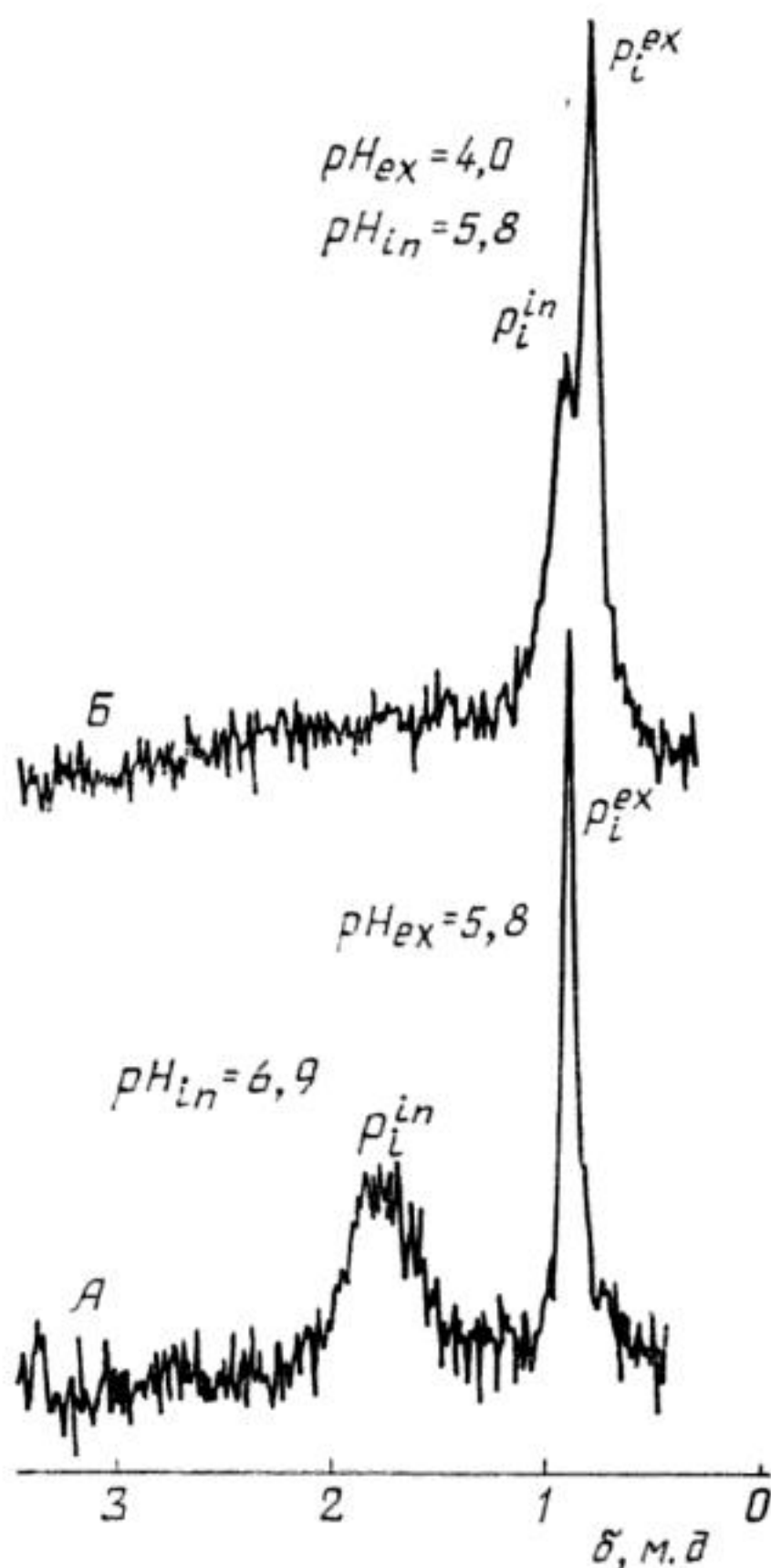


Рис. 1. ^{31}P -ЯМР спектры концентрированной суспензии выращенных до стационарной фазы роста клеток *E. coli* ($\sim 1,5 \cdot 10^{11}$ кл/мл) при температуре 4 °С, снятые до (А) и после замораживания (в режиме 2) — оттаивания (Б); P_i^{in} и P_i^{ex} — сигналы внутри- и внеклеточного неорганического фосфата соответственно

Рис. 2. Зависимость химического сдвига δ сигнала неорганического фосфата от рН среды (при температуре 4 °С)

которой необходима для стабилизации поля внутри образца. Полученную суспензию помещали в ампулу для ЯМР-исследований с внешним диаметром 10 мм. В образцах с защитной средой (10 % сахарозы + 1 % желатина) ее доля составляла ~ 20 % от объема образца. Спектры ^{31}P -ЯМР высокого разрешения регистрировали на частоте 109,3 МГц на спектрометре WH-270 («Брукер», ФРГ). Химические сдвиги δ оценивали относительно внешнего эталона (85% ортофосфорной кислоты). Все измерения проводили при температуре 4 °С, которая поддерживалась в датчике с точностью ± 1 °С. Спектры получали путем накопления 1000 спадов индуцированных сигналов. Значения рН вне- и внутриклеточной среды определяли по положению сигналов вне- и внутриклеточного неорганического фосфата по калибровочной зависимости $\delta = f(pH)$, полученной при температуре 4 °С путем титрования среды М9 (без глюкозы) растворами 1 М NaOH или 1 М HCl (рис. 2).

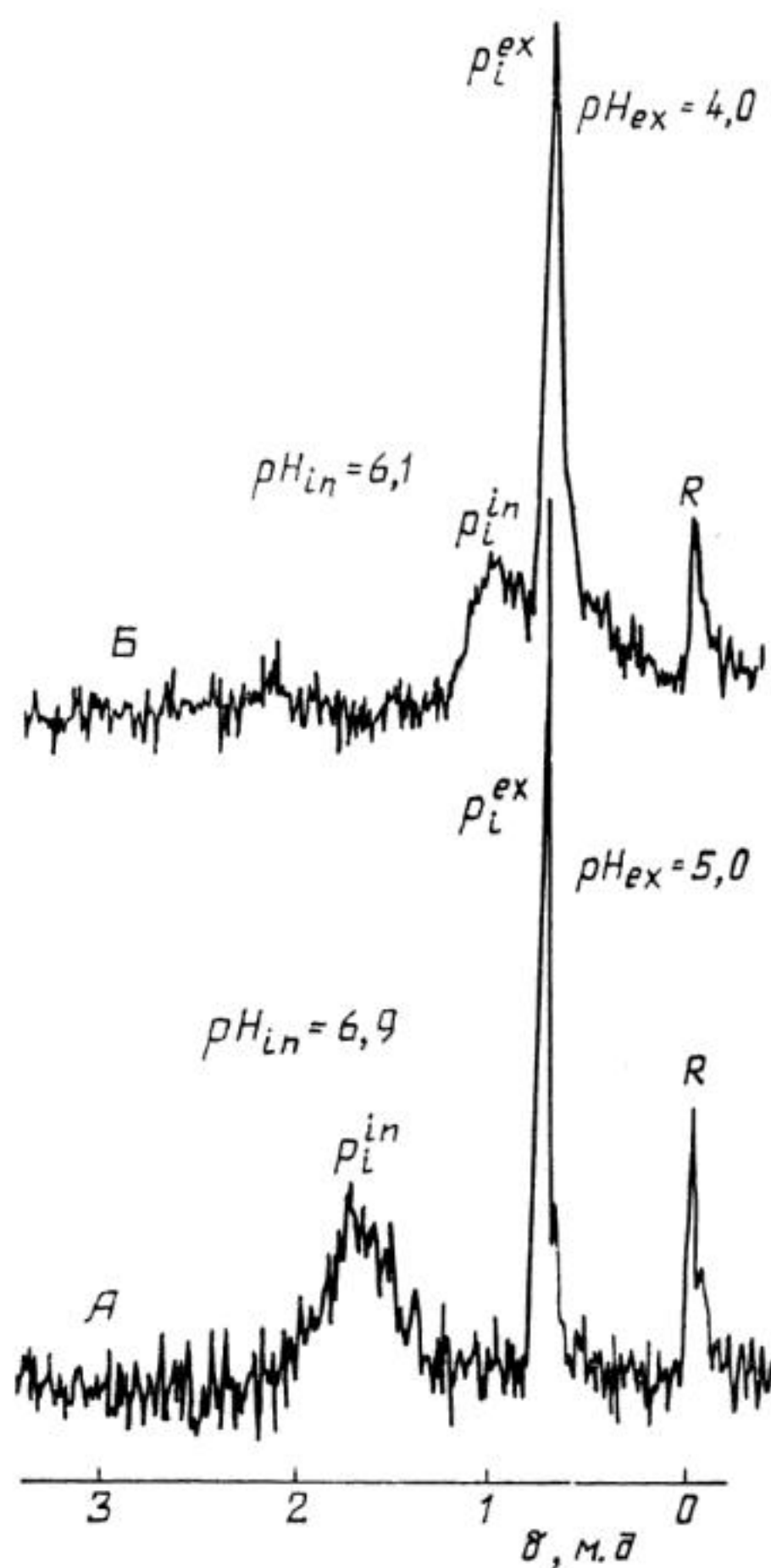
В работе использовали два режима замораживания клеточных суспензий: 1 — при температуре -196 °С в течение 10 мин путем погружения образца объемом ~ 2 мл в жидкий азот с последующим оттаиванием в водян-

ной бане при температуре 37 °С в течение 10 мин; 2 — при температуре — 50 °С в течение 1 ч с последующим оттаиванием в течение 10 мин при температуре 37 °С.

При добавке защитной среды конечное значение pH_{in} (после оттаивания) повышается на 0,3 ед. (рис. 3) и в результате замораживания-оттаивания в режиме 2 pH_{in} изменяется от того же исходного значения 6,9 до 6,1 (при снижении pH_{ex} от 5,0 до 4,0). Кроме того, если исходить из формы и ширины сигнала внутриклеточного неорганического фосфата P_i^{in} после оттаивания клеточной суспензии, то можно заключить, что применение защитной среды способствует сохранению исходного распределения клеток в суспензии по значениям внутриклеточного pH . При исследовании суспензий клеток *E. coli* после замораживания-оттаивания в режиме 1 выявлен такой же характер изменений величин pH и pH_{ex} . В таблице обобщены результаты определения pH_{in} , pH_{ex} , ΔpH и выживаемости клеток стационарной фазы до и после низкотемпературного замораживания-оттаивания в обоих режимах. Таким образом, процесс замораживания-оттаивания клеток *E. coli* приводит к закислению как внутри-, так и внеклеточной среды.

Известно, что клетки микроорганизмов способны поддерживать величину pH_{in} на постоянном уровне.

Рис. 3. Спектры ^{31}P -ЯМР концентрированной суспензии (с добавкой защитной среды) клеток *E. coli* стационарной фазы ($\sim 1,5 \cdot 10^{11}$ кл/мл) при температуре 4 °С до (А) и после замораживания (в режиме 2)-оттаивания (Б). Условия регистрации спектров и обозначения такие же, как и на рис. 1. R — сигнал внешнего эталона (85 % фосфорная кислота)



не, причем основная роль в регуляции внутриклеточного pH принадлежит системам транспорта неорганических катионов [3, 8—10]. Однако при действии экстремальных факторов внешней среды механизм pH -гомеостаза, по-видимому, не функционирует. При замораживании-оттаивании клеток *E. coli* возможно повреждение барьера проницаемости плазматической мембраны, что фиксируется по выходу из клеток ионов K^+ [4, 7], указывается также на снижение активности АТФаз [6]. Подобные изменения способны сместить состояние равновесия между протонными потоками, протекающими через мембрану и обеспечивающими поддержание внутриклеточного pH на постоянном уровне. Таким образом, закисление внутриклеточного пространства является следствием того, что буферная емкость цитоплазмы в результате совокупности изменений, происшедших в клетке при замораживании-оттаивании, не справляется с поступающим извне потоком протонов. Причем снижение pH_{in} продолжается до тех пор, пока не достигает определенного уровня, при котором срабатывает «запорный» механизм, ограничивающий проникновение протонов в клетку и препятствующий, таким образом, дальнейшему закислению цитоплазматического

Значения внутриклеточного pH (pH_{in}), pH внеклеточной среды (pH_{ex}), градиента ΔpH ($\Delta pH = pH_{in} - pH_{ex}$) и выживаемости клеток *E. coli*, выращенных до начала стационарной фазы роста, до (А) и после (Б) замораживания-оттаивания в двух режимах

Параметры	Режим 1		Режим 2	
	А	Б	А	Б
Суспензии без защитной среды				
pH_{in}	$6,9 \pm 0,4$	$5,9 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,2$
pH_{ex}	$6,1 \pm 0,8$	$5,0 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,6$
ΔpH	$0,8 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,5$
Выживаемость, %	100	96 ± 10	100	93 ± 6
Суспензии с защитной средой				
pH_{in}	$7,1 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,3$
pH_{ex}	$5,9 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,6$
ΔpH	$1,2 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,8$
Выживаемость, %	100	100 ± 1	100	97 ± 9

Примечание. Режимы: 1 — замораживание при -196°C и оттаивание при 37°C , 2 — замораживание при -50°C и оттаивание при 37°C . Для суспензии без защитной среды результаты представляют собой среднее $\pm$ среднее квадратичное отклонение из 9 (режим 1) и 14 (режим 2) образцов; для суспензии с защитной средой из 5 и 9 образцов соответственно.

пространства и возникновению критических (с точки зрения жизнеспособности клеток) градиентов pH . Известно, что в некоторых случаях резкое, грозящее клетке гибелью возрастание pH (для ацидофилов при $pH_{ex} = 1$ градиент pH достигает 5,5 ед. pH) может сопровождаться появлением диффузионного потенциала протонов, направленного внутрь клетки (положительный внутри). Последний отводит избыток протонов из клетки и тем самым противодействует губительному закислению цитоплазмы в отсутствие источника энергии [9].

Получены доказательства сохранения градиента pH на мембране по завершении полного цикла замораживания-оттаивания (табл. и рис. 1,3). Сохранение градиента pH говорит об эффективности протекающих при оттаивании клеток процессов репарации возможных повреждений. Факт сохранения градиента pH после замораживания-оттаивания имеет принципиальное значение, поскольку он свидетельствует о поддержании клетками цитоплазматической мембраны не только в целостном, но и достаточно энергизированном состоянии. Таким образом, исследование процессов замораживания-оттаивания концентрированных клеток *E. coli* выявило закисление внутри- и внеклеточной среды без существенных изменений величины градиента pH . При этом величина внутриклеточного pH (независимо от режима замораживания-оттаивания и добавок защитной среды) изменяется в среднем на $\sim 1,0$ ед. pH (табл.). Такое закисление внутриклеточного пространства не сказывается на выживаемости клеток, которая во всех случаях составляет более 90 % (табл.). Последнее может быть связано также с действием «популяционного» эффекта [1, 2]. По-видимому, для клеток более существенным является сохранение трансмембранного градиента pH , а не поддержание на постоянном уровне величины pH_{in} .

Клетки ряда бактерий, в том числе и *E. coli*, в логарифмической фазе роста более чувствительны к замораживанию-оттаиванию, чем в стационарной [11]. В наших экспериментах выживаемость клеток *E. coli*, взятых в логарифмической фазе роста, составила ~ 85 — 87 % при замораживании в обоих режимах. Сузу [11] объясняет различный характер повреждений цитоплазматической мембраны *E. coli* при замораживании у клеток разного

возраста тем, что мембраны клеток в стационарной фазе содержат меньше фосфолипидов и больше белков по сравнению с мембранами клеток в логарифмической фазе роста. Установлено [11], что замораживание клеток в логарифмической фазе роста значительно увеличивает проницаемость как наружной, так и цитоплазматической мембраны. Для клеток в стационарной фазе роста указанный эффект не наблюдался. Следовало ожидать и более сильного закисления внутриклеточного пространства при замораживании-оттаивании клеток *E. coli*, собранных с середины логарифмической фазы роста. Действительно, закисление внутриклеточного пространства было настолько существенным, что в ряде случаев сигнал от внутриклеточного фосфата сливался с более интенсивным сигналом от внеклеточного фосфата, что затрудняло измерения pH внутри клеток логарифмической фазы после замораживания-оттаивания (рис. 4). Закисления внеклеточного пространства, напротив, не наблюдалось. В ряде случаев (рис. 4) происходило слабое защелачивание внеклеточной среды. Особенностью ^{31}P -ЯМР спектров клеток *E. coli*, взятых из логарифмической фазы роста, было появление в области $\sim 2,3$ — $2,5$ м. д. сигнала, относящегося к одному из основных метаболитов — фруктозо-1,6-дифосфату. Поскольку положение сигналов сахарофосфатов (СФ) также является pH -зависимым, существенный сдвиг сигнала СФ в область более сильных полей (на $\sim 1,5$ — 2 м. д.) служит косвенным доказательством значительного закисления внутриклеточного пространства.

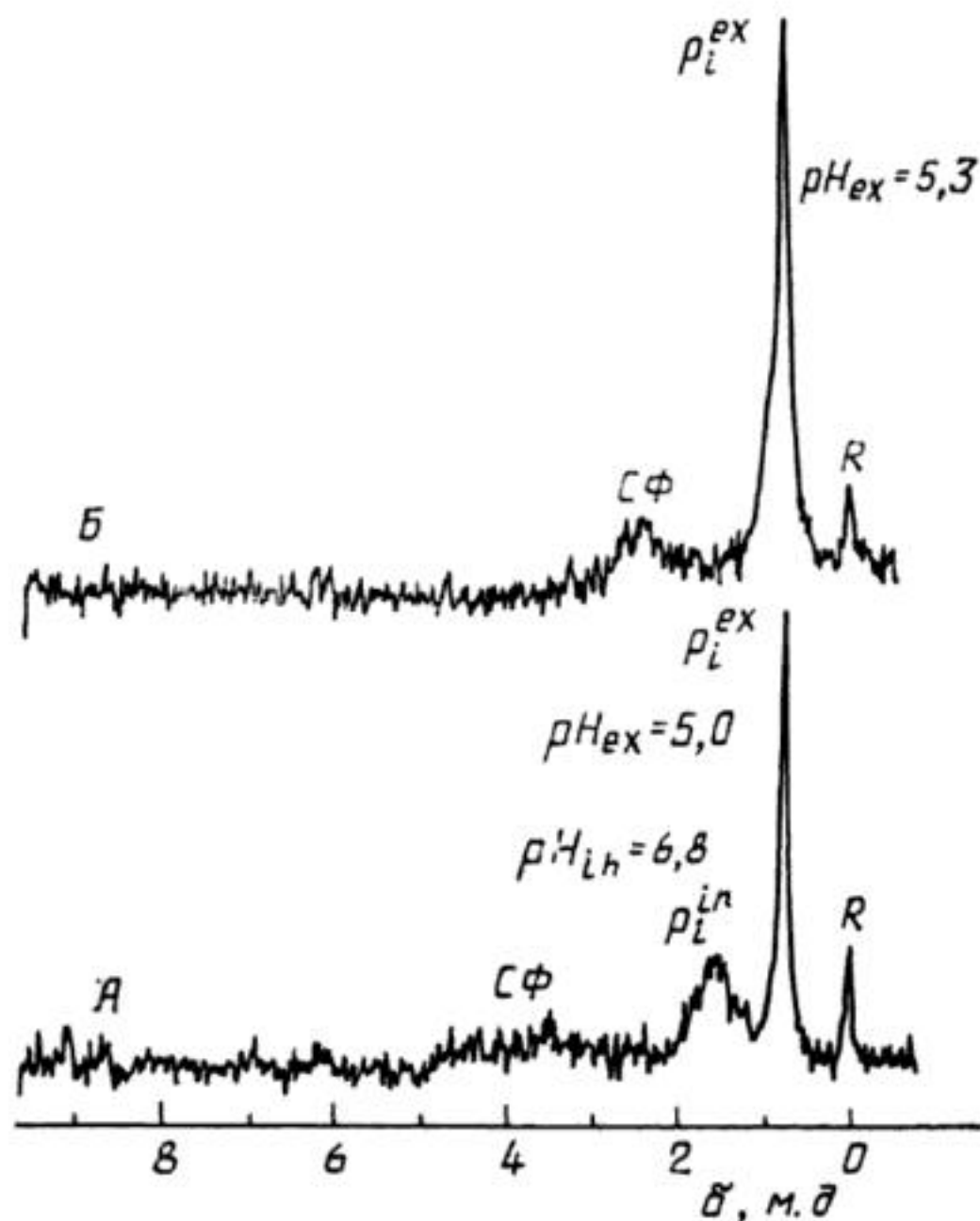


Рис. 4. ^{31}P -ЯМР спектры концентрированной ($\sim 1,5 \cdot 10^{11}$ кл/мл), с добавкой защитной среды суспензии клеток *E. coli*, выращенных до середины логарифмической фазы роста при температуре $4^\circ C$ до (А) и после замораживания (в режиме 1)-оттаивания (Б). Условия регистрации спектров и обозначения такие же, как на рис. 1. СФ — сигнал от сахарофосфатов

1. Аркадьева З. А. Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных методах хранения // Биологич. науки.— 1983.— № 4.— С. 93—105.
2. Иткин Ю. А., Бронштейн В. Л., Высеканцев И. П. и др. Повреждение гидростатическим давлением *Escherichia coli* при замораживании клеток // Микробиол.— 1983.— 52. № 2.— С. 268—271.
3. Пучков Е. О., Пинчукова В. А. Транспорт неорганических катионов и регуляция внутриклеточного pH у бактерий // Регуляция микробного метаболизма факторами внешней среды: Тез. докл. и сообщ. междунар. симпоз. ФЕМО—Пушино,— Б. и., 1983.— С. 174—175.
4. Пучков Е. О., Говорунов И. Г., Евтодченко Ю. В., Косарев Н. В. Действие шока, вызванного низкой температурой, и внеклеточного образования льда на внешнюю и цитоплазматическую мембраны клеток *Escherichia coli* // Микробиол.— 1983.— 52, № 1.— С. 136—139.
5. Шульман Р. Г. Исследование живых организмов методами ЯМР // В мире науки.— 1983, № 3.— С. 50—58.
6. Anderson Y. O., Nei T. The effect of freezing and freeze-drying of ATPase and acetylcholinesterase of the human red blood cell // Freeze-drying of biological materials.— Sapporo.— 1973.— P. 109—117.
7. Calcott P. H., McLeod R. A. The survival of *E. coli* from freezethaw damage: the relative importance of wall and membrane damage // Can. J. Microbiol.— 1975.— 21, N 12.— P. 1960—1968.

8. Kroll R. G., Booth I. R. The role of potassium transport in generation of a pH gradient in *Escherichia coli* // Biochem. J.— 1981.— 198, N 3.— P. 691—698.
9. Padan E., Zilberstein D., Schuldiner S. pH homeostasis in bacteria // Biochim. et biophys. acta.— 1981.— 650, N 2—3.— P. 151—166.
10. Schuldiner S., Padan E. How does *Escherichia coli* regulate internal pH // Membranes and Transport. Vol. 2.— New York, London.— 1982.— P. 65—73.
11. Souzu H. *Escherichia coli* B membrane stability related to cell growth phase : measurement of temperature dependent physical state change of membrane over a wide range // Biochim. et biophys. acta.— 1982.— 691, N 1.— P. 161—170.
12. Ugurbil K., Shulman R. G., Boron T. R. High-resolution ^{31}P and ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of *E. coli* cells *in vivo* // Biol. Appl. of Magn. Reason.— New York : Academic Press.— 1979.— P. 537—589.

ВНИИ прикладной микробиологии,
п. Оболенск, Моск. обл.

Поступила 10.09.85

УДК 577.31 : 51 — 7

М. Панзнер, Х. Хэнсген, Р. Кнёнер, Э. Споерль

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕНОСА ТЕПЛА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ

При использовании в медицине низких температур для разрушения тканей необходимо знать нестационарные температурные поля в зоне воздействия, а также характер фронта замораживания как функции времени. Криовоздействие может производиться путем аппликаций зондом, охлажденным жидким азотом или путем распыления жидкого азота. В процессе

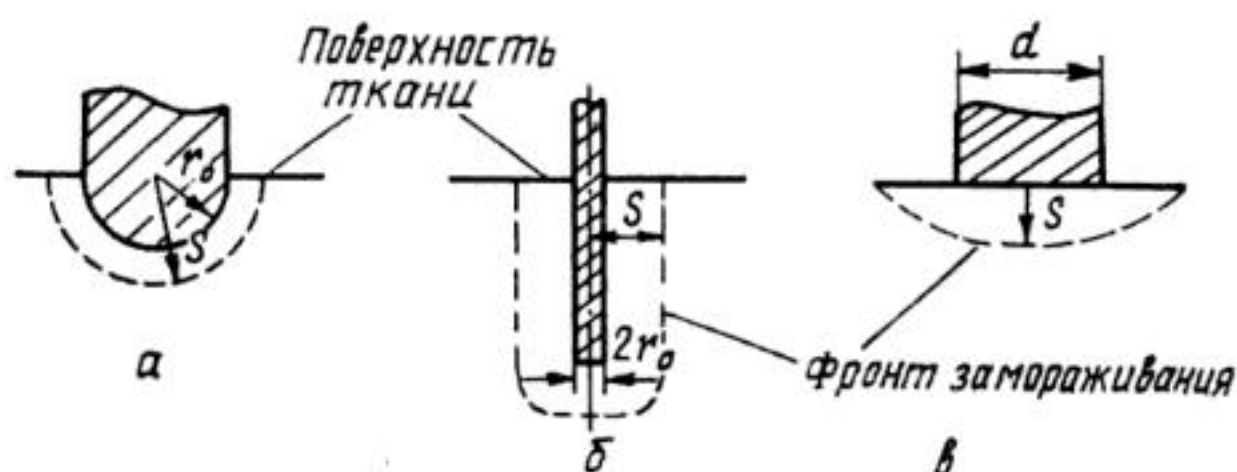


Рис. 1. Схемы идеализированных геометрий зонда:
а — сферический зонд, б — цилиндрический зонд, в — плоский зонд

Схема в демонстрирует систему плоского зонда. Такую же схему можно использовать для замораживания распылением. В предельном случае ($d \gg S_\infty$), когда диаметр зонда намного больше максимально достигаемой глубины замораживания, можно в декартовых координатах рассматривать температурное поле в средней части как одномерное, поскольку линии теплового потока проходят почти параллельно. Математическое решение задачи требует составления соответствующих уравнений теплопроводности (WGL) с относящимися к ним граничными и начальными условиями (RB, AB). Это двухфазовая задача. Между замороженной и незамороженной областями возникает нелинейное условие перехода, учитывающее возникновение латентного тепла в процессе замораживания. Из баланса теплового потока на фронте замораживания без учета теплового расширения $\rho_1 \approx \rho_2$ для одномерного варианта получаем:

$$\rho L \dot{s} = \lambda_1 T'_1|_{x=s} - \lambda_2 T'_2|_{x=s}; \quad T' = \frac{dT}{dx}, \quad (1)$$

где $\dot{s}$ — скорость движения границы льдообразования, $T_1(x, t)$, $T_2(x, t)$ — температуры обеих фаз, λ_1 , λ_2 — теплопроводности, L — теплота фазового

преобразования. Неучтенным остается то, что замораживаемая в тканях вода представляет собой многокомпонентную систему и замерзает в определенном интервале температур при непрерывной отдаче латентного тепла. Возникающие при этом градиенты концентраций отдельных составляющих требуют решения сопряженных задач теплопроводности и диффузии масс, что при точности, требуемой в настоящее время в медицине, может не учитываться.

В качестве пограничного условия на краях зонда ($x = x_0$) представляются верными условия первого типа, но если коэффициенты теплообмена известны, верными будут граничные условия V_3 рода. В обоих случаях в расчет входит только температура как экспериментально выявленная величина. V_α граничные условия:

$$T(x = x_0, t) = f(t), \quad (2)$$

$$\alpha(T_u(t) - T(x = x_0)) = -\lambda T'|_{x=x_0}. \quad (3)$$

При граничных условиях второго рода для выявления теплового потока, идущего через зонд, необходимо измерять две температуры. При замораживании распылением температуру окружающей среды T_u можно считать не зависящей от времени.

Внутри ткани область термических изменений ограничивается площадью поверхности, через которую проходит небольшое количество теплоты (4), и температура которой соответствует (5) температуре тела T_k . Граничные условия могут быть выражены:

$$\frac{dT}{dx} \Big|_{x=\delta(t)} = 0, \quad (4)$$

$$T(x = \delta(t), t) = T_k. \quad (5)$$

Оба граничных условия требуют учета второй свободной границы $\delta(t)$, которая меняется во времени, как и фронт замораживания $s(t)$. Модель учитывает латентное тепло, возникающее в процессе замораживания, а также источники тепла в области $s < x < \delta$.

Если бы не учитывалось требование (4), тогда при $x = \delta$ в выводе T_2 получали прерывность, что равнозначно внезапному вводу теплового потока при $x = \delta$ (рис. 2). Сложной оказалась задача математического охвата источников теплоты, связанных с теплотой, выделяющейся при протекании крови через охлажденные участки ткани, а также с экзотермическими химическими реакциями в результате обмена веществ. В общем, можно заключить, что в незамороженной ткани не происходит выделения теплоты. При замораживании капилляров химические реакции с продуцированием тепла не происходят.

В работе [1] применили следующую запись величины выделения тепла кровью:

$$\dot{m}_b c_b (T_2 - T_b) = n_b, \quad (6)$$

где $\dot{m}_b$ — интенсивность протекания крови, c_b — теплоемкость крови, T_b — температура крови. Здесь необходимо предположить, что кровь охлаждается до температуры окружающей среды. Но это гарантируется только при условии малой скорости протекания крови и при хорошем теплопереходе. Точный математический учет всех источников теплоты невозможен из-за сложной структуры кровеносных сосудов, поэтому работать приходится со средними величинами. Для общей плотности источников теплоты применили следующую запись:

$$n = -A(T_2 - T_k) + B(T_2 - T_s), \quad (7)$$

$$T_s < T_2 < T_k.$$

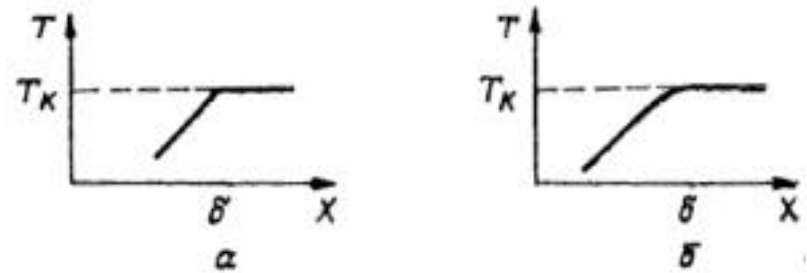


Рис. 2. Температурные режимы в незамороженной ткани:

а — при устойчивой границе, б — при подвижной границе

Предварительные факторы, как будет показано дальше, определяются экспериментом и представляют адаптационные параметры модели. В наших расчетах не учитывается зависимость теплопроводности λ , плотности ρ и теплоемкости c ткани от температуры.

С учетом указанных выше предположений для стационарного состояния получаем следующую математическую модель:

$$\begin{aligned} &\text{замороженная область} && \text{незамороженная область} \\ WLG: T_1'' = 0, &&& a_2 T_2'' - A(T_2 - T_k) + B(T_2 - T_s) = 0, \quad (8) \\ RB: \alpha(T_u - T_1(x=0)) = -\frac{dT_1}{dx}\bigg|_{x=0} \cdot \lambda_1, &&& T_2(x=s) = T_s, \quad T_2(x=\delta) = T_k, \\ T_1(x=s) = T_s, &&& T_2'|_{x=\delta} = 0, \\ \lambda_1 T_1' = \lambda_2 T_2' = 0; &&& a = \frac{\lambda}{\rho \cdot c}; \end{aligned}$$

с аналитическим решением:

$$\begin{aligned} T_1(x) &= T_s + \frac{T_s - T_u}{\lambda_1/\alpha + s}(x - s), \\ T_2(x) &= \frac{1}{B-A} B \cdot T_k - A \cdot T_s + (T_s - T_k) \frac{B \sin \gamma (\delta - x) + A \sinh \gamma (x - s)}{\sin h \gamma (\delta - s)}, \\ s_\infty &= \frac{\lambda_1 (T_s - T_u)}{\sqrt{\lambda_2 (T_s - T_k)}} \frac{\sqrt{\frac{1}{B} \left(1 - \frac{A}{B}\right)}}{\frac{A}{B} - \frac{B}{A}} \sin h \operatorname{arccos} h \frac{B}{A} - \frac{\lambda_1}{\alpha}, \\ \delta_\infty &= \frac{1}{\gamma} \operatorname{arccos} h \frac{B}{A} + s_\infty, \quad \mu_\infty = \lambda_2 T_2'|_{x=s} = \frac{\lambda_1 (T_s - T_u)}{s_\infty}, \\ \gamma &= \sqrt{\frac{B-A}{\lambda_2}}, \end{aligned} \quad (9)$$

где s_∞ — глубина замораживания в стационарном состоянии, δ_∞ — глубина термического изменения в стационарном состоянии.

Определив из эксперимента свободные границы δ_∞ и s_∞ в стационарном состоянии, можно получить предварительные факторы A и B . Для того, чтобы определить нестационарное температурное поле, а также временной режим фронта замораживания как функцию времени, были предприняты следующие упрощения: 1) временной режим рассматривается только после образования фронта замораживания на краю зонда, 2) рассчитывается температурное поле только в замороженной части, 3) необходимый для расчета температурный градиент $\lambda_2 T_2'$ заменяется аппроксимирующей функцией $\mu(t)$.

Таким образом, получаем нестационарную однофазовую задачу:

$$\begin{aligned} WLG: T_1 &= a_1 T_1'', & AB: T(x, t=0) &= T_s, \\ RB: \alpha(T_u - T_1(x=0)) &= -\lambda_1 T_1|_{x=0}, & s(t=0) &= 0, \\ T_1(x=s) &= T_s, & s(t \rightarrow \infty) &= s_\infty, \\ \rho L \dot{s} &= \lambda_1 T_1 - \mu(t), & \mu(t=0) &= (T_u - T_s), \\ & & \mu(t \rightarrow \infty) &= \mu_\infty. \end{aligned} \quad (10)$$

В стационарном состоянии однофазовую задачу можно приравнять к соответствующей однофазовой задаче через следующее отношение: s_∞ однофазовая задача = s_∞ двухфазовая задача

$$\Rightarrow \mu_\infty = f(n \text{ двухфазовая задача}). \quad (11)$$

Первые расчеты модели при помощи математической записи ряда

$$T(x, t) = \sum_{i=0}^N c_i(t) (x - s(t))^i, \quad (12)$$

использованной [2] для подобных задач, дали $\mu(t) = \text{const}$ для средних параметров ткани (рис. 3, 4, 5). При помощи математической записи ряда

удалось обойти непосредственную численную оценку уравнения теплопроводности. Как результат во втором приближении ($N = 2$) возникает дифференциальное уравнение первого порядка, которое можно решить путем разделения переменных. Сравнение результатов с решением адаптивной двухфазовой системы дало хорошее согласование в области параметров ткани.

В итоге были получены качественно достоверные результаты. Улучшение теплообмена на зонде обуславливает рост глубины проникновения фронта замораживания, а также повышение скорости замораживания. Увеличивая теплоотдачу в незамороженную область (μ растет), получаем минимальную глубину проникновения. Стационарное состояние, однако, устанавливается быстрее. При сильном противотоке тепла достаточно

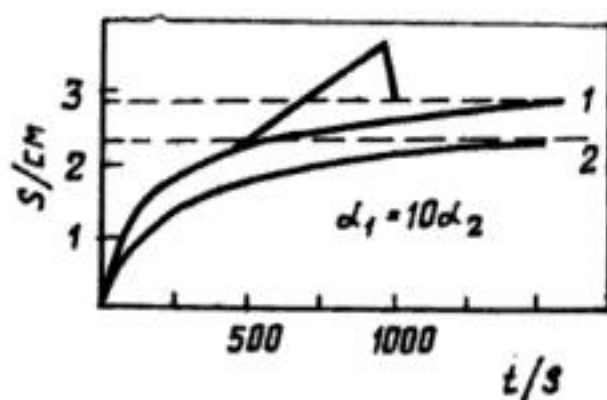
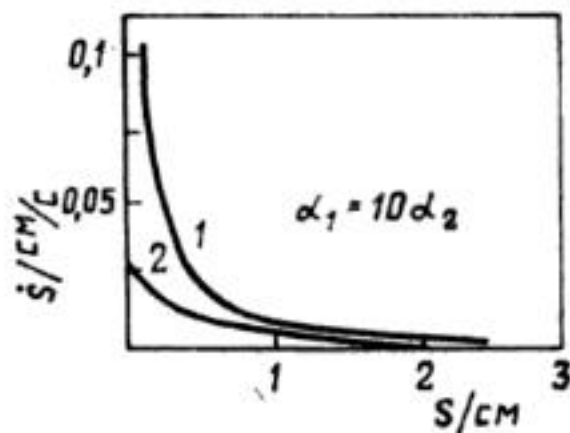


Рис. 3

Рис. 3. Глубина замораживания как функция времени для различных коэффициентов теплообмена $\alpha/\text{Вт}/\text{см}^2 \text{ К}$ зонд-ткань



ис. 4

Рис. 4. Скорость замораживания $\dot{s}$ как функция глубины замораживания для различных коэффициентов теплообмена $\alpha/\text{Вт}/\text{см}^2 \text{ К}$

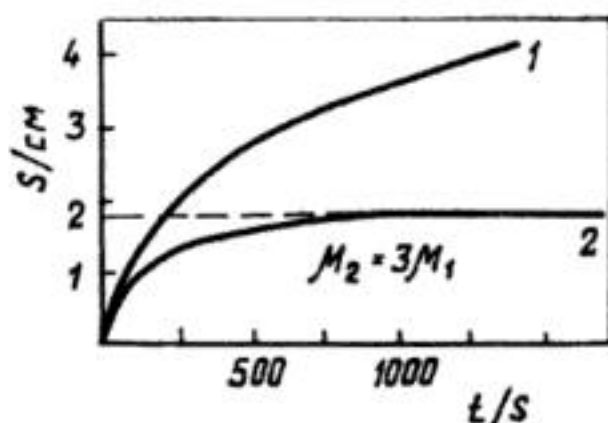


Рис. 5

Рис. 5. Глубина замораживания s как функция времени t для различного противотока тепла $\mu/\text{Вт}/\text{см}^2$

минимальной продолжительности криовоздействия для того, чтобы получить максимальное разрушение ткани.

1. Cooper T. E., Trezek G. J. // Cryobiology.— 1971.— 7.— S. 183—190
2. Megerlin F. // Forsch. Ing. Wes.— 1968.— 34, N 2.

Технический университет,
Медицинская академия,
г. Дрезден

Поступила 16.04.85

УДК 57 : 536.48.047.615.9.06

**В. М. Гучок, В. Ф. Карташов, Л. З. Верховская, В. К. Мазалов,
А. И. Григорашенко**

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА-1500 НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ

Перспектива использования полиэтиленоксида молекулярной массы 1500 (ПЭО-1500) в медико-биологической практике в качестве криопротектора, не требующего отмывания, и осмодиуретического гипотензивного средства требует всестороннего изучения его действия на организм. Ранее было установлено [4], что ПЭО-1500 является малотоксичным веществом,

среднесмертельная доза (ЛД-50) которого при однократном внутривенном введении кроликам составила 8,0 г/кг. Изучено [4, 5] также влияние на организм некоторых малых доз (1/20—1/30 ЛД-50) ПЭО-1500 в условиях многократного продолжительного парентерального введения. Целью работы явилось изучение допустимых доз и концентраций ПЭО-1500 для парентерального введения в организм.

Опыты проведены на половозрелых кроликах обоего пола породы шинилла. ПЭО-1500 вводили внутривенно в дозе 1,0 г/кг (1/10 ЛД-50) ежедневно: в первой серии опытов — в 15 %-ной концентрации в течение 21 дня, во второй — в 30 %-ной концентрации (на 0,9 %-ном водном растворе хлорида натрия) в течение 10 дней. Контрольным животным вводились соответствующие объемы 0,9 %-ного хлорида натрия. В динамике (до введения, после введения 30 %-ного раствора — через 4 дня, 15 %-ного —

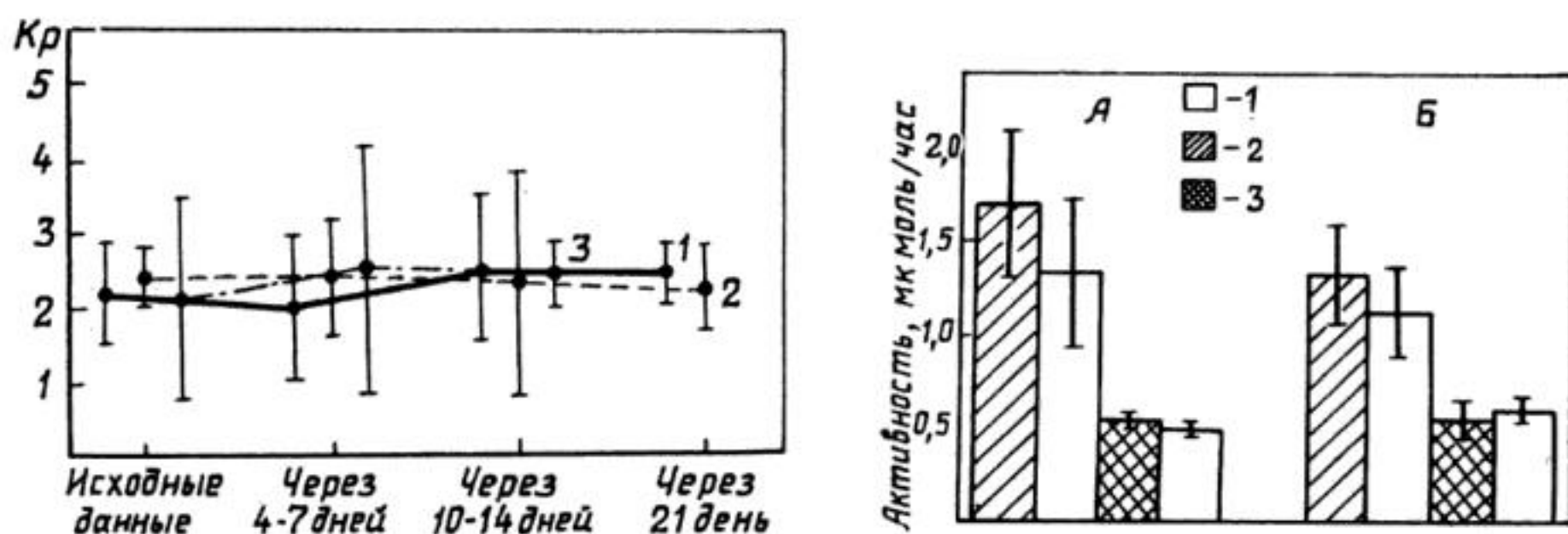


Рис. 1. Коэффициенты ретенции БСФ пробы у кроликов после внутривенного введения 15 %-ного и 30 %-ного растворов ПЭО-1500:

1 — контроль, 2 — после введения ПЭО-1500 в 15 %-ном растворе, 3 — после введения ПЭО-1500 в 30 %-ном растворе

Рис. 2. Активность АЛТ и АСТ сыворотки крови кроликов при внутривенном введении 15 %-ного (А) и 30 %-ного (Б) растворов ПЭО-1500 в конце опыта:

1 — контроль, 2 — АЛТ, опыт, 3 — АСТ, опыт

через 7 и 14 дней и в обеих сериях в конце опыта) определялись ранее использованными нами методами [1] показатели массы тела животных, периферической крови (концентрации гемоглобина, эритроцитов, тромбоцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов, лейкограмма), общего белка (рефрактометрически) и белковых фракций сыворотки крови (электрофорез на бумаге), бромсульфалеиновой (БСФ) пробы, аланин- и аспарагинтрансаминазы, холинэстеразы и щелочной фосфатазы сыворотки крови, pH , pO_2 , pCO_2 крови с помощью биологического микроанализатора типа ОР-210/3 фирмы «Радэлкис» (ВНР), массовые коэффициенты внутренних органов. Экспериментальные группы состояли из 6—7 животных. Полученные данные обработаны статистически по Стьюденту.

Установлено, что по внешнему виду, общему состоянию, поведению, отношению к корму и динамике массы тела животные, подвергавшиеся воздействию ПЭО-1500, не отличались от животных контрольных групп. Состояние экскреторной функции печени оценивалось по данным БСФ-пробы. Коэффициенты ретенции колебались после введения 15 %-ного раствора ПЭО-1500 в пределах $2,24 \pm 0,22 \div 2,43 \pm 0,15$ ($p > 0,05$), а после введения 30 %-ного раствора — в пределах $2,15 \pm 0,43 \div 2,53 \pm 0,54$ ($p > 0,05$) (рис. 1).

Достоверных изменений активности ферментов сыворотки крови не было обнаружено ни в один из периодов наблюдения (рис. 2).

При изучении белоксинтезирующей функции печени по состоянию сывороточных белков обнаружено, что содержание общего белка колебалось после введения 15 %-ного ПЭО-1500 в диапазоне $4,96 \pm 0,13 \div 5,75 \pm 0,23$ г %; 30 %-ного ПЭО-1500 — от $5,28 \pm 0,24$ до $6,44 \pm 0,40$ г %. Различия данного показателя у животных подопытных и конт-

рольных групп во все периоды наблюдения были статистически недостоверны. Однако некоторые параметры фракционного состава белков сыворотки крови подопытных кроликов претерпели значимые изменения в ходе эксперимента. Так, после введения 15 %-ного раствора криопротектора на 7-й день наблюдалось некоторое уменьшение относительного содержания альбуминов (на 14 %) и увеличение фракций β - и γ -глобулинов (на 31 и 28 % соответственно), вследствие чего отмечено достоверное уменьшение (на 32 %) альбумино-глобулинового (А/Г) коэффициента. Однако с 14-го дня эксперимента эти показатели возвращались к исходному уровню. При введении 30 %-ного ПЭО-1500 на 4-й день эксперимента относительное количество альбуминов уменьшалось на 23 % ($p < 0,05$), β -глобулинов повышалось на 49 % ($p < 0,05$), А/Г коэффициент уменьшался на 47 % ($p < 0,05$). К концу эксперимента количество альбуминов и глобулинов у подопытных животных статистически значимо не отличалось от контроля, однако А/Г коэффициент оставался на 20 % ниже по сравнению с исходными данными.

Исследование периферической крови показало, что некоторые колебания данных лейкограмм, содержания гемоглобина, количества эритроцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов, pH , pO_2 , pCO_2 не выходили за пределы физиологических [2]. Многократное длительное введение ПЭО-1500 в дозах 1/30 и 1/20 ЛД-50 не нарушало основных функций печени и не приводило к изменению гематологических показателей [4].

Сравнительное исследование относительной массы надпочечников, почек, печени, селезенки, сердца, легких при введении ПЭО-1500 в 15 %-ной концентрации не выявило достоверных отличий от контроля. При введении ПЭО-1500 в 30 %-ной концентрации найдено достоверное увеличение относительной массы почек (левой почки на 27 % и правой — на 25 %).

Результаты исследования позволяют считать, что многократное внутривенное введение ПЭО-1500 в дозе 1 г/кг (1/10 ЛД-50) в 15 и 30 %-ной концентрациях не нарушает состава периферической крови кроликов, а также экскреторной функции печени, но вызывает определенную диспротеинемию (кратковременную при введении криопротектора в 15 %-ной концентрации и более выраженную при увеличении концентрации до 30 %). Данный эффект может быть следствием некоторого нарушения белоксинтезирующей функции печени. Полученные данные о зависимости эффекта одинаковых доз ПЭО-1500 от концентрации вводимого в организм раствора согласуются с результатами других исследователей. В опытах на крысах и кроликах отмечено [3], что в отличие от 10 %-ной концентрации ПЭО-1500, вводимый в дозе 0,4 г/кг в 20 %-ной концентрации ежедневно в течение месяца, вызывал ряд морфологических изменений в эпителиальной и соединительной тканях печени, а также повышение уровня синтеза ДНК в клетках печени и их митотической активности. После введения 15 %-ного ПЭО-1500 в дозе 1,0 г/кг отмеченные изменения протекали по типу первичной декомпенсации, свидетельствующей о том, что изучаемая доза и концентрация близки к пороговым [6]. Этот вывод согласуется с данными [3] о том, что трехкратное введение ПЭО-1500 в дозе 1/5 ЛД-50 (1,6 г/кг) приводило к развитию зернистой дистрофии гепатоцитов, чего не отмечалось при воздействии в дозе 1/10 ЛД-50 (0,8 г/кг). Характерно, что через 14 дней после прекращения введения полимера все изученные показатели возвращались к исходному уровню.

Полученные экспериментальные результаты следует учитывать при решении вопроса о подборе доз и концентраций ПЭО-1500 при клиническом применении.

1. Верховская Л. З., Сигал Н. С., Карташов В. Ф. и др. Воздействие оксиэтилированных полиолов на организм лабораторных животных // Криобиология. — 1986. — № 2. — С. 26—29.
2. Гольдберг Д. И., Гольдберг Е. Д., Шубин Н. Г. Гематология животных. — Томск: Изд-во Томского ун-та, 1973. — 351 с.
3. Козлова В. Ф., Сигал Н. С. Морфологическая характеристика эпителиальной и соединительной ткани печени животных при введении в организм криопротекторов // Криобиология и криомедицина. — 1984. — Вып. 15. — С. 13—19.

4. Гучок М. М., Верховский Б. А., Козлова В. Ф. и др. О токсичности полиэтиленоксида-1500 // Тез. докл. III съезда фармакологов УССР.— Винница, 1977.— С. 52—54.
5. Козлова В. Ф., Гучок М. М., Щетинский И. М., Верховский Б. А. Патоморфологическая оценка влияния криопротектора — полиэтиленоксида молекулярного веса 1500 — на организм животных // Криобиология и криомедицина.— 1978.— Вып. 4.— С. 68—71.
6. Саноцкий И. В., Уланова И. П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений.— М. : Медицина, 1975.— 327 с.

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

Поступила 10.07.85

УДК 612.75 : 57.043.001.6

**Д. А. Георгадзе, В. В. Рязанцев, А. М. Мхитарьянц,
В. Ю. Васильевский**

ДЕСТРУКТИВНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И РЕПАРАТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ

Поиски оптимальных вариантов терапии бактериальных очагов в костной ткани, приводящих к различной степени ее повреждения и разрушения, определяют использование комплексных подходов лечения.

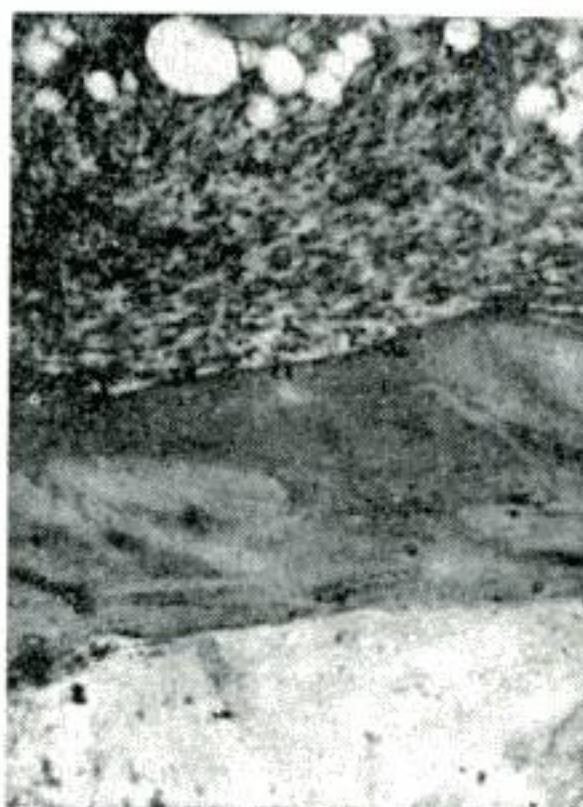
В ортопедо-травматологическую практику активно внедряется метод низкотемпературного воздействия. Этот метод реализуется либо с помощью криоаппликаторов, либо орошением парожидкостной струей хладагента. Наиболее приемлемым хладопроизводителем служит жидкий азот, позволяющий достичь в области криовоздействия температуры —196 °С. Механизмы структурно-метаболических модификаций костной ткани в зависимости от распространения в ней зон охлаждения изучены крайне недостаточно, сообщения по данному вопросу в соответствующей литературе носят отрывочный характер [1, 2].

Целью данной работы явилось изучение морфологических перестроек кости, синтеза белков и нуклеиновых кислот в зависимости от распределения температурных полей в бедренной кости крыс после криовоздействия методом орошения жидким азотом.

Эксперименты выполнены на 45 самцах беспородных белых крыс массой 300—400 г. Контролем служили животные той же группы, содержащиеся в обычных условиях вивария. Воздействие выполнялось криохирургическим инструментом КАС-01 в различных режимах работы, позволяющих использовать температуры от —50 до —196 °С. Площадь и время контакта хладагента с костной поверхностью составляли соответственно 0,2 см² и 4 мин. Такой временной интервал при температуре —175 °С вызывает формирование зоны замораживания около 0,8 см² и при дальнейшем увеличении экспозиции не приводит к росту зоны охлаждения тканей. Для установки и фиксации термодатчиков в области дистального отдела вдоль бедренной кости крыс формировались четыре фрезевых отверстия диаметром 1 мм на расстоянии 2 мм друг от друга. Регистрация параметров осуществлялась по мере удаления от зоны замораживания расположенными в фрезевых отверстиях кости медь-константановыми термопарами марки ПЭВК-М-1Р996, подключенными к самописцу ЛКС-4. Наконечник форсунки подводился к высверленному в кости отверстию, куда подавалась парожидкостная струя азота, имеющая температуру —196 °С. Отогрев осуществлялся спонтанно. Скорости естественного отогрева в зависимости от времени составляли от 185 до 10 °С/мин, на расстоянии 2—4 мм от зоны криовоздействия — от 40—60 до 5—10 °С/мин. Забор материала для морфологического изучения препаратов осуществляли на 1-е, 7-е, 16-е сут после криовоздействия. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином,

а также по Ван-Гизону. Для исследования биосинтеза белков и нуклеиновых кислот в регенерате крысам «импульсно» вводили ^{14}C -гидролизат белков хлореллы (ЧССР) и ^3H -тимидин (СССР) в дозе 0,5 мкКи/г живой массы животных. Через 3 ч с момента введения радиоактивных меток животное декапировали, выделяли костный регенерат из дистального отдела бедренной кости. Экстракцию фракций из измельченной костной ткани проводили 5%-ной трихлоруксусной кислотой на холоде. В надосадке (кислотораство-

Участок некроза компактной костной ткани и формирующаяся грануляционная ткань (а), поля остеогенеза на поверхности фрагментов костных баночек (б). Гематоксин и эозин X120



а



б

римая фракция белков) и осадке (кислотонерастворимая фракция белков и ДНК), нанесенном на фильтр «Сынпор», определяли радиоактивность на счетчике фирмы «Бекман». Белок определяли по методу Лоури [4], нуклеиновые кислоты — по методу Спирина [3].

Выполненные морфологические исследования показали, что через сутки в бедренной кости четко определялась зона криовоздействия в виде участка некротически измененных клеток; в них, клеточных органоидах и ядре выявлялись деструктивные нарушения, межклеточное вещество разрыхлено (рис. а). На 7-е сут в зоне криовоздействия регистрировались клетки, находящиеся на различных стадиях развития. Наряду с деструктивно-дистрофическими изменениями клеток и межклеточного вещества в участке криоконтакта отмечено появление двоядерных хондроцитов с тонкодисперсным хроматином и равномерно базофильной цитоплазмой. К 16-м сут в зоне промораживания увеличивалось количество клеток с нормальным ядром, но нечетко определенными границами, встречались хондро- и остеобластические элементы, структура которых свидетельствовала об активной биосинтетической деятельности (рис. б).

Исследование процессов восстановления с помощью ^{14}C -гидролизата белков хлореллы и ^3H -тимидина показало начинающееся на 7-е и, особенно, 16-е сут возрастание включения меченых аминокислот в кислотонерастворимую фракцию белков (табл.), что указывает на усиливающиеся процессы регенерации костной ткани.

Включение ^{14}C -гидролизата белков хлореллы и ^3H -тимидина в белки и ДНК регенерата кости соответственно

Фракции белков и ДНК	Сроки наблюдения, сут		
	1	7	16
Кислоторастворимая фракция белков	0,74	0,97	1,00
Кислотонерастворимая фракция белков	0,13	0,19	0,29
Включение в ДНК	0,92	1,00	1,44

Примечание. Данные представлены в виде отношения включения меток в опыте к контролю. Включение меченых аминокислот в контроль кислоторастворимой и кислотонерастворимой фракций белков регенерата составляло в среднем 241 и 518 расп./мин на мг белка соответственно. Включение ^3H -тимидина в ДНК контроля — 22 расп./мин на мкг ДНК. Представлены данные типичного эксперимента.

Вместе с тем, фиксация этой же метки в кислоторастворимую фракцию белков регенерата существенно не изменялась, это служило доказательством затухания процессов деградации компонентов основного вещества кости к этому сроку репарации. Прогрессивный рост процессов восстановления в зоне крионекроза к 16-м сут хорошо подтверждается динамикой включения ^3H -тимидина в нуклеиновые кислоты клеток регенерата. Из таблицы видно, что через 16 сут меченый нуклеотид в субстрат включается почти в два раза интенсивнее, чем в предыдущие сроки.

Таким образом, за исследуемый период, наряду с деструктивно-дистрофическими изменениями костной ткани после криовоздействия, возникают и прогрессируют процессы восстановления, достигая, по данным микроскопии и включения меток в костный регенерат, максимума к 16-м сут. Появление активносинтезирующих клеточных популяций свидетельствует об активизации регенерации, что хорошо согласуется с характером включения меченых метаболитов в клетки костной ткани.

1. Жигун А. И. Лечение эпикондилитов плеча методом криовоздействия: Автореферат дис. ... канд. мед. наук. — Харьков, 1984 — 18 с.
2. Малышкина С. В. Структурно-метаболические изменения суставного хряща после локального криовоздействия: Автореф. дис. ... канд. биол. наук — Харьков, 1985 — 22 с.
3. Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. Биохимия. — 1958. — 23. — С. 600—607.
4. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 193. — P. 265—275.

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

Поступила 28.05.86

УДК 618.14 — 005.1 + 547.9] : 616 — 089.583.29

К. Б. Акунц, Ю. М. Демин, Р. Г. Саркисян, Г. С. Авакян, Ц. Р. Ботоян

ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ (РЕКТАЛЬНОЙ) ГИПОТЕРМИИ НА ОБМЕН КАТЕХОЛАМИНОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЮВЕНИЛЬНЫХ МАТОЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЙ

Нарушение менструального цикла по типу ювенильных маточных кровотечений является одной из наиболее распространенных и тяжелых патологий пубертатного возраста. Несмотря на значительные успехи в изучении этиологии и патогенеза ювенильных маточных кровотечений (ЮМК), патогенез этого полиэтиологического заболевания нельзя считать до конца изученным.

Анализ данных литературы показывает, что основная роль в патогенезе ЮМК принадлежит нарушениям систем, регулирующих менструальную функцию [4]. Согласно современным представлениям значительная роль в ее регуляции принадлежит также катехоламинам, особенно норадреналину, которые стимулируют овуляцию и, по всей видимости, поддерживают достаточный уровень гипоталамических либеринов, влияют на секрецию гонадотропных гормонов [1, 3, 8]. Если в литературе достаточно подробно освещены вопросы, связанные с гипоталамо-гипофизарно-яичниковыми взаимоотношениями при ЮМК, то роль симпато-адреналовой системы в патогенезе ЮМК практически не изучена. Между тем этот вопрос представляет определенный теоретический и практический интерес.

Клинические проявления ЮМК (нарушение общего состояния больных, головокружение, головные боли, сердцебиение, неприятное ощущение в области сердца, недомогание, общая слабость, тошнота, анорексия, нарушение сна и плохое настроение, изменение пульса и давления) свидетельствуют о существенном изменении функции симпато-адреналовой системы и ее участии в патогенезе заболевания.

Целью настоящей работы явилось выяснение участия симпато-адреналовой системы в патогенезе ЮМК и влияния локальной (ректальной) гипотермии на ее состояние в процессе лечения холодом.

Нами обследовано 57 девочек и девушек в возрасте от 12 до 18 лет, страдающих ЮМК. 40 из них составили основную группу, получившую лечение локальной гипотермией, а 17 — контрольную группу больных, получавших симптоматическое лечение (витамины, применение сокращающих матку, кровоостанавливающих и антианемических средств).

В литературе возрастные нормативы катехоламинов до 20 лет даются с 3—4-годовалым интервалом: 12—15 и 16—20 лет [2]. Обследуемые больные были распределены по возрасту по тем же группам: основная группа — 12—15 лет — 22 больных (55,0 %) и 16—18 лет — 18 (45,0 %), в контрольной группе 9 больных (52,9 %) в возрасте от 12 до 15 лет и 8 (47,1 %) от 16 до 18 лет. Кроме того было обследовано 11 практически здоровых девочек и девушек: 12—15 лет — 6 и 16—18 лет — 5.

Наряду с этим учитывались характер менструальной функции до первого кровотечения и время появления ЮМК (возникновение первого кровотечения по отношению к менархе). У больных в возрасте 16—18 лет в основном кровотечение возникло на фоне регуляторной менструальной функции от 6 месяцев до 5 лет после менархе. У больных же в возрасте 12—15 лет ЮМК возникло от 6 месяцев до 4 лет после менархе на фоне неустановившейся менструальной функции.

У всех больных изучали анамнез, помимо общеклинического и специального гинекологического исследования проводили исследования по тестам функциональной диагностики. Экскрецию лютеинизирующего гормона гипофиза (ЛГ) определяли по методу Вайда и Гемзел [9] в модификации Е. Т. Котлярской и К. Г. Рогановой [5]; свободных катехоламинов в суточной моче, адреналина (А), норадреналина (НА) и их предшественников — дофамина (ДА), диоксифенилаланина (ДОФА) — флуориметрическими методами Эйлера и Лишайко [7] в модификации Э. Ш. Матлиной и др. [6] с использованием флуоресцентного спектрофотометра МПФ-2А фирмы «Хитахи» (Япония).

С целью гемостаза и регуляции менструальной функции у всех больных основной группы ежедневно проводилась терапия путем орошения прямой кишки водой 4—5 °С в количестве 0,07 л на кг массы самотеком, под давлением 600—700 мм, водян. столба в течение 10—15 мин. Критерием для прекращения процедуры (время экспозиции) служило появление субъективных и объективных симптомов: чувства тяжести и боли внизу живота, легкого озноба, снижения температуры в паховой складке на 0,5 °С. Курс лечения 5—7 процедур.

Экскрецию катехоламинов и ЛГ изучали за 2—3 дня до лечения, в процессе лечения и после остановки кровотечения (1-й, 3-й день). У здоровых — в течение менструального цикла (7-й, 14-й, 21-й, 24-й дни цикла).

Основная (лечение холодом) и контрольная (симптоматическое лечение) группы по инфекционному индексу, физическому и половому развитию, длительности заболевания, степени и частоты анемизации практически не отличались друг от друга. У всех больных кровянистые выделения из гениталий наблюдались с различной интенсивностью и длительностью, причем у 44 больных (77,2 %) обильные и продолжительные кровотечения начались после задержки очередной менструации от 5—10 дней до 2—3 месяцев. Из них у 16 больных (28,1 %) выявлена высокая эстрогенная насыщенность организма, определяемая тестами функциональной диагностики (КПИ от 60 до 85 %, ЭИ 50—75 %, симптом папоротника (+++), монофазная базальная температура до 37 °С) экскреция ЛГ гипофиза монотонно низкая, что, по-видимому, связано с персистенцией зрелого фолликула. У остальных 24 больных (42,1 %) имелась низкая эстрогенная насыщенность: КПИ от 5 до 30 %, ЭИ от 0 до 20 %, симптом папоротника (+), монофазная базальная температура, экскреция ЛГ монотонно низкая, что, наверное, связано с персистенцией незрелого фолликула.

У 17 больных (29,8 %) кровотечение начиналось в различные периоды менструального цикла и носило различную интенсивность. Выявлена низкая и умеренная эстрогенная насыщенность, КПИ от 5 до 40 %, ЭИ от 0 до 30 %, симптом папоротника (+, ++), монофазная базальная температура, экскреция ЛГ беспорядочно высокая, что связано, вероятно, с атрезией зрелого и незрелого фолликула.

Методами функциональной диагностики по экскреции ЛГ у практически здоровых девушек установлены менструальные циклы, характерные для возрастной группы. У них нами впервые выявлены реципрокное взаимоотношение между ДА и ЛГ и положительная коррелятивная связь между экскрецией НА и ЛГ ($r = 3$).

До лечения у всех обследованных больных уровень экскретируемого А и ДОФА почти в два раза ($P < 0,001$) превышал возрастные нормативы. Экскреция НА и ДА была статистически достоверно снижена в 1,5—2 раза (табл. 1).

У 16 больных основной группы в возрасте 16—18 лет после первых двух-трех процедур с низкой и умеренной эстрогенной насыщенностью и низкой экскрецией ЛГ содержание НА достоверно повышалось в 1,5—3 раза ($P < 0,01$) по сравнению с нормой и с показателями, выявленными до лечения, и наблюдался гемостаз. Экскреция А и ДОФА после появления гемостаза в результате лечения холодом уменьшалась (табл. 1), однако это уменьшение было недостоверным ($P > 0,05$). Экскреция ДА увеличивалась, не достигая уровня возрастной нормы, за счет усиленного (почти в 3 раза) превращения ДА в НА (табл. 2). Восстановление соотношения между НА и А сопровождалось повышением экскреции ЛГ на фоне гемостаза.

После 3—5 процедур локальной гипотермии у 18 больных (81,8 %) основной группы в возрасте 12—15 лет наблюдался гемостаз и недостоверное снижение ДА ($P > 0,05$). Выявлено достоверное повышение содержания НА ($P < 0,001$) с последующей нормализацией экскреции ЛГ. По-видимому, повышение экскреции НА обусловлено не столько за счет синтеза из ДА, сколько в результате его высвобождения, возбуждения медиаторного звена симпато-адреналовой системы. Во всех случаях положительный терапевтический эффект локальной гипотермии сопровождался восстановлением нормального реципрокного взаимоотношения между НА и ДА с последующей нормализацией экскреции ЛГ.

Применение локальной (ректальной) гипотермии у больных с ЮМК дало стойкий положительный эффект: у 85 % больных всех возрастных групп уже через 3—5 процедур отмечалось прекращение кровотечения с нормализацией гормональной регуляции менструальной функции. В контрольной же группе симптоматическое лечение в течение 6—9 дней приводило к гемостазу только у 60,6 % (10 больных). У остальных 39,4 % больных (8 девушек) оно было безрезультатным. Необходимо подчеркнуть, что у всех больных этой группы симптоматическое лечение (витамины, применение медикаментов, сокращающих матку, кровоостанавливающих и антианемических средств) обмен катехоламинов не корригировало.

Рецидивы заболевания в раннем периоде реабилитации (от 20 дней до 3 месяцев) при лечении холодом наблюдались только у 2 больных (5,9%). В контрольной же группе получавших симптоматическую терапию рецидив наблюдался у всех больных.

На основании изложенного можно сделать следующие выводы:

- в патогенезе ЮМК значительная роль принадлежит нарушению функционального состояния симпато-адреналовой системы, выражающемуся значительным снижением экскреции НА и ДА и нарушением соотношения между содержанием А, НА, ДА и ДОФА;

- в период кровотечения у всех больных с ЮМК отмечается статистически достоверное увеличение экскреции А и ДОФА, преобладание активности гормонального звена регуляции над медиаторным;

- локальная (ректальная) гипотермия является эффективным патогенетическим методом лечения ЮМК, регулирует менструальную функцию,

Таблица 1

Показатели ($M \pm m$) экскреции катехоламинов (нмоль/сут) у здоровых девушек и у больных с ювенильными кровотечениями

Группа и кол-во обследованных	Адреналин		Норадреналин		Дофамин		Дюксийфенгидрохлорид	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Практически здоровые 12—15 лет (5) 16—18 лет (6)	37,12 $\pm$ 4,1 35,31 $\pm$ 3,9		148,08 $\pm$ 9,7 100,3 $\pm$ 10,1		812,5 $\pm$ 38,4 1644,5 $\pm$ 45,1		87,21 $\pm$ 6,7 272,3 $\pm$ 9,1	
Основная группа больных 12—15 лет (22) 16—18 лет (18)	70,5 $\pm$ 7,1 62,9 $\pm$ 6,4	60,7 $\pm$ 8,9 56,4 $\pm$ 7,4	70,6 $\pm$ 9,3 67,7 $\pm$ 8,4	240,6 $\pm$ 8,4 230,5 $\pm$ 7,6	407,0 $\pm$ 20,5 847,5 $\pm$ 23,9	537,8 $\pm$ 29,7 8974 $\pm$ 31,9	190,7 $\pm$ 10,1 517,8 $\pm$ 14,5	1671 $\pm$ 1,8 478,5 $\pm$ 13,1
Контрольная группа больных 12—15 лет (9) 16—18 лет (8)	69,7 $\pm$ 8,4 64,1 $\pm$ 9,6	61,4 $\pm$ 7,3 57,8 $\pm$ 8,1	78,6 $\pm$ 10,1 69,4 $\pm$ 8,6	75,6 $\pm$ 8,8 67,4 $\pm$ 7,9	420,4 $\pm$ 24,3 850 $\pm$ 31,4	440,7 $\pm$ 26,5 900,4 $\pm$ 41,7	180,6 $\pm$ 21,4 523,4 $\pm$ 31,7	164,7 $\pm$ 34,5 497,6 $\pm$ 29,4

Примечание. Точками отмечены данные, достоверно отличающиеся от исходных при $P < 0,001$ (одна точка) и $P < 0,01$ (две точки).

Таблица 2

Показатели синтеза и превращения катехоламинов у здоровых девушек и у больных с ювенильными кровотечениями

Группа и кол-во обследованных	До лечения						После лечения			
	ДОФА/ДА%	НА/ДА%	(НА + А)/ДА%	НА/А	ДА/ДОФА%	НА/ДА%	(НА + А)/ДА%	НА/А		НА/А
Практически здоровые 12—15 лет (5) 16—18 лет (6)	10,73 16,55	18,22 6,09	22,79 28,2	3,98 : 1 2,84 : 1						
Основная группа 12—15 лет (22) 16—18 лет (18)	46,8 61,09	17,3 6,8	34,66 13,46	1,01 : 1 0,9 : 1	31,10 53,32	44,8 25,68	56,1 31,97		3,96 : 1 4,08 : 1	
Контрольная группа больных 12—15 лет (9) 16—18 лет (8)	42,95 61,57	18,69 8,16	35,27 15,70	1,12 : 1 1,08 : 1	37,37 55,26	17,15 17,48	31,1 13,90		1,23 : 1 1,16 : 1	

корректирует нарушенный обмен катехоламинов, нормализуя их соотношение, повышая активность медиаторного звена с последующим восстановлением гормонального гомеостаза;

— принятое симптоматическое лечение ЮМК менее эффективно, не ведет к нормализации обмена катехоламинов и не устраняет возможность рецидива заболевания.

1. Бабичев В. Н. Нейро-гормональная регуляция овариального цикла.— М.: — Медицина, 1984.— 240 с.
2. Большакова Т. Д., Гугутишвили Ц. К., Зутлер А. С. и др. Лабораторные показатели активности симпато-адреналовой системы у здоровых людей // Лабор. дело.— 1969, № 6.— С. 323—326.
3. Кассиль Г. И. Внутренняя среда организма.— Л.: Наука, 1978.— 224 с.
4. Кобозева Н. В., Кузнецова М. Н., Гуркин Ю. А. Ювенильные маточные кровотечения // Гинекология детей и подростков.— М.: Медицина, 1981.— С. 110—132.
5. Котлярская Е. И., Роганова К. Г. Иммунологический метод определения экскреции лютеинизирующего гормона гипофиза // 2-ая Всесоюз. конф. по вопросу физиол. и патол. эндокр. сист. женщины.— Тбилиси, 1966.— С. 33—34.
6. Матлина Э. Ш., Киселева З. М., Софиева И. Э. Метод определения адреналина, норадреналина, дофамина и дофа в одной порции мочи // Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов.— М.: Б. и., 1969.— С. 52—56.
7. Euler U. S., Lishajko F. Escrimation of catecholamines in urine // Acta Physical. Scand.— 1959.— 27.— P.122—132.
8. Sawyer C. H. Brain amines and pituitary gonadotropin secretion // Can J. Phys. Pharmacol.— 1979.— 57.— P. 667—680.
9. Wide L., Gemzill G. Immunological determination of pituitary luteinizing hormone in the urine of fertile and postmenopausal women and adult men // Acta Endocrin.— 1962.— 39, № 4.— P. 539—548.

Ереванский медицинский ин-т,
Ереванский филиал ВНЦХ АМН СССР

Поступила 28.07.86

УДК 579.842.23 : 57.086.13

В. В. Кадетов, Л. А. Наталич, А. Н. Терентьев

ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ЧУМНОГО МИКРОБА

При консервации штаммов чумного микроба широко применяется метод лиофильного высушивания. Для советского здравоохранения решение проблемы длительной стабилизации биологических свойств чумного микроба данным методом имеет большое научно-практическое значение. Настоящий обзор является анализом литературного материала по проблеме стабилизации чумного микроба лиофилизацией.

Успех лиофилизации прежде всего зависит от физиологического состояния микробной клетки [5, 7], а также от природы штамма [2, 5] и закладывается на этапе культивирования. Выращивание на твердой питательной среде считается оптимальным методом культивирования, повышающим исходную жизнеспособность до сушки, после нее и при хранении [7]. Культуру рекомендуется готовить в холодное время года, что дает повышение процента живых микробных клеток [9]. Полноценность питательной среды значительно влияет на физиологическое состояние микробной клетки [6, 7]. Культура, выращенная на двукратно стерилизованных средах, более устойчива к действию экстремальных факторов [7]. Показательно, что максимально резистентны к лиофилизации клетки *Y. pestis* в стационарной фазе роста [7]. Температура хранения клеточной суспензии перед сушкой может сильно повлиять на качество препарата.

Основным фактором в сохранении жизнеспособности микробных клеток при лиофилизации и хранении является защитная среда. Большое значение для повышения ее защитных свойств имеет присутствие в ней некоторых неорганических катионов (Mg^{2+} , Ca^{2+}), способных, воздействуя на конформационное состояние клеточных структур, изменять их свойства. Содержание электролитов в защитной среде замораживания и особенно их

концентрационные градиенты могут значительно влиять на изменение свойств белковой решетки клеточных мембран и, следовательно, на устойчивость клеток к действию экстремальных факторов лиофилизации [5]. Для смягчения или устранения нежелательных побочных действий криозащитных компонентов среды на клетку при замораживании могут применяться добавки мембранотропных веществ [4, 5]. Защитные среды, служащие для предохранения микробных клеток при лиофилизации и хранении, не должны быть токсичными и обладать антигенной активностью, причем адъювантная их активность рассматривается как положительное свойство, должны иметь относительно высокую температуру замерзания, ингибировать гидролитические ферменты и обладать антиокислительной активностью [5]. Компоненты среды высушивания должны служить структурирующим материалом, поддерживать оптимальную остаточную влагу сухого препарата и не тормозить сублимацию свободной воды. В качестве таких компонентов чаще всего используются: сахароза, лактоза, желатин, агар, глютамат Na, пептон, тиомочевина, аскорбиновая кислота, молибденовокислый Na или аммоний [11]. Показано преимущество сред, включающих в свой состав антиоксиданты [11], особенно при неблагоприятных условиях хранения высушенных микробных клеток. Допустимый диапазон pH защитных сред в пределах от 6,5 до 7,8 с оптимумом в нейтральной и слабощелочной зонах [12].

Проведение процесса замораживания в оптимальном режиме имеет решающее значение для максимальной сохранности живых микробных клеток при сублимационной сушке. Оптимальной скоростью замораживания является скорость, при которой переохлаждение так мало, что внутриклеточные кристаллы не образуются, а повреждение клетки за счет дегидратации не успевает проявиться [5]. Для замораживания микробных клеток *Y. pestis* в основном применяются низкотемпературные холодильники с температурой замораживания от -30 до -55 °C [6]. Высокие скорости охлаждения, достигаемые при контактном замораживании до -78 °C, неблагоприятно влияют на сохранение жизнеспособности клеток *Y. pestis* [12], что является, вероятно, следствием неправильного соотношения защитной среды и микробной массы [6]. При правильно подобранных защитных средах гибель микробных клеток *Y. pestis* и снижение их иммуногенности при сушке не зависят от температуры предварительного замораживания [1]. Непосредственно во время сублимационного высушивания наблюдается сильная элиминация клеточных фракций воды, что ведет к нарушению свойств биополимеров и понижению количества жизнеспособных микробных клеток [5]. При этом наблюдается максимальная потеря влаги в первые часы высушивания, сопровождающаяся значительным отмиранием (30—70 %) микробных клеток в первые 3—5 ч сушки [1]. При чрезмерном высушивании значительно снижается иммуногенная активность микробных клеток [8]. При этом наблюдается корреляция между величиной погибших клеток при сушке и иммуногенностью клеток, сохранивших жизнеспособность [8]. Сокращение времени высушивания при отрицательных температурах через 3 года ведет к снижению жизнеспособности микробных клеток. На вакцинных штаммах показано, что максимально сохраняющим иммуногенную активность микробных клеток считается 30-часовой режим высушивания [10]. Культурально-морфологические свойства независимо от режима сушки остаются в основном без изменений [8]. Досушивание рекомендуется проводить при температуре 30 °C.

При хранении высушенного живого чумного микроба стабильность его определяется температурой содержания препарата [6]. Оптимальными считаются отрицательные температуры хранения, при которых независимо от остаточной влажности и воздушной среды наблюдается длительное сохранение количества живых микробных клеток с поддержанием высокого уровня их иммуногенности. Для практических целей является достаточной температура хранения 0—4 °C при остаточной влажности 1—5 % и хранении в вакууме или в азоте [6, 11]. Жизнеспособность высушенных клеток суще-

ственно зависит от условий регидратации. Растворитель с температурой 4°С способен восстанавливать максимальное количество микробных клеток независимо от их температуры хранения. Допустимо использование растворителя с температурой не выше 18—20 °С [3]. Одномоментное растворение обладает преимуществом перед дробной регидратацией.

В заключение следует отметить, что повышение стабильности культур чумного микроба при его лиофилизации определяется:

- повышением резистентности микробной клетки к экстремальным условиям замораживания-высушивания и хранения за счет оптимизации условий ее культивирования;

- созданием новых эффективных защитных сред с учетом механизмов криоповреждения;

- отработкой оптимального режима замораживания на основе определенной защитной среды и для конкретного штамма;

- выбором режима сублимации с учетом индивидуальной устойчивости штамма и особенностей состава защитной среды, обеспечивающей сохранение в высушенном препарате оптимальной остаточной влажности порядка 1—2 %.

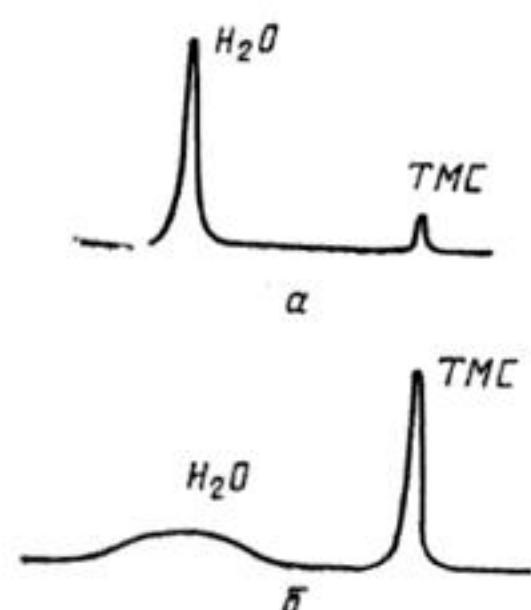
1. Васюхина Л. В., Ефремова М. Ф., Липаева Л. С., Захлебная О. Д. О продолжительности высушивания культур возбудителей чумы и холеры // Докл. Иркутского противочумн. ин-та.— Иркутск, 1971.— Вып. 9.— С. 61—62.
2. Гончарова М. Н., Тинкер А. И., Верховцева Г. Н., Иванова В. Ф. Выживаемость микробов чумных штаммов К-1 и EV в зависимости от различных условий культивирования // Особо опасн. инфекции на Кавказе: Тез. докл. III науч.-практ. конф. противочумн. учрежд. Кавказа.— Ставрополь, 1974.— Вып. 1.— С. 207—209.
3. Красикова М. А. Влияние отдельных этапов производства на качество чумной живой сухой вакцины: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Алма-Ата, 1968.— 20 с.
4. Луговой В. И., Кравченко Л. П. Механизмы лабильности лизосом при замораживании-оттаивании // Криобиология и криомедицина.— 1983.— Вып. 11.— С. 3—16.
5. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цветков Ц. Д. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования.— Киев: Наук. думка, 1984.— 261 с.
6. Тинкер А. И. Влияние сублимационного (лиофилизированного) высушивания на штамм EV чумного микроба: Автореф. дис. ... докт. мед. наук.— Саратов, 1971.— 38 с.
7. Тинкер А. И., Дудакалова Т. Н., Некрасов А. Д. Снижение оптической и биологической концентрации чумной вакцины EV в процессе сублимационного высушивания // Пробл. особо опасн. инфекций.— Саратов, 1973.— Вып. 6.— С. 78—83.
8. Тинкер А. И., Чернова Э. А., Некрасов А. Д. Влияние режима сублимационного высушивания на биологические свойства чумного штамма EV // Особо опасн. инфекции на Кавказе. Матер. III конф.— Ставрополь, 1974.— Вып. 1.— С. 239—242.
9. Филиппов А. Ф. Изучение стабильности иммуногенных свойств противочумной сухой живой вакцины в процессе её длительного хранения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Саратов, 1964.— 18 с.
10. Чернова Э. А., Тинкер А. И., Иванова В. Ф. и др. Об оптимальных условиях высушивания эталонных штаммов К-1 и EV // Пробл. особо опасн. инфекций.— Саратов, 1976.— Вып. 6.— С. 47—49.
11. Чернова Э. А., Верховцева Г. Н., Саркисян И. А. и др. Свойства чумной живой сухой вакцины EV в зависимости от используемой среды высушивания и газовой среды в ампулах и флаконах // Особо опасн. инфекции на Кавказе: Тез. докл. IV конф.— Ставрополь, 1978.— С. 332—335.
12. Hechly R. J., Anderson A. W., Rockenmacher M.— Lyophilization of *Y. pestis* // Appl. Microbiol.— 1958.— 6.— N 4.— P. 255—261.

Ростовский-на-Дону государственный
научно-исследовательский противочумный ин-т

Поступила 10.03.86

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ЯМР ДЕГИДРАТАЦИИ СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА, ВЫЗВАННОЙ КРИОПРОТЕКТОРОМ ПЭО-400

Дегидратацию стекловидного тела под влиянием введенных в организм осмотически активных препаратов ранее изучали с помощью вискозиметрии [1]. Однако между вязкостью стекловидного тела и содержанием в нем воды нет строгой зависимости. Кроме воды, вязкость зависит от количества мукополисахаридов и гиалуроновой кислоты в стекловидном теле, а также от pH [2]. Нами [3] разработан способ определения воды в стекловидном теле с помощью ЯМР. Способ основан на том, что при замора-



Спектр ЯМР стекловидного тела кролика, дегидратированного ПЭО-400:

a — при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,
 b — при температуре $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$

живании биологических объектов в них остается невымороженной вода, молекулы которой непосредственно связаны с гидрофильными центрами биологических макромолекул и других веществ, входящих в состав биологического субстрата. В спектре ЯМР таких объектов при низких температурах молекулы воды дают сигнал, регистрируемый в виде сравнительно узкой полосы, интенсивность которой пропорциональна количеству невымороженной (связанной) воды.

При дегидратации стекловидного тела, вызванной внутривенным или пероральным введением подопытному животному осмотически активного вещества (глицерина, полиэтиленоксида), происходит потеря свободной воды, а количество связанной воды в стекловидном теле остается неизменным. Интенсивность линии ЯМР невымороженной воды относительно линии свободной воды при этом становится больше. Из сравнения интенсивности линий ЯМР воды в замороженных интактных и дегидратированных образцах стекловидного тела можно определить степень его дегидратации.

Мы применили ЯМР для количественной оценки в эксперименте дегидратирующего действия криопротектора полиэтиленоксида молекулярной массы 400 (ПЭО-400) на стекловидное тело глаза.

Опыты проводили на 20 взрослых кроликах породы шиншилла массой от 2500 до 3000 г. 20 %-ный раствор ПЭО-400 вводили внутривенно в дозе 1,5 г чистого вещества на 1 кг массы животного. Через 30—45 мин после введения препарата глазные яблоки энуклеировали под местной анестезией 1 %-ным раствором дикаина и ретробульбарным введением 1 мл 2 %-ного раствора новокаина. Из глазных яблок извлекалось стекловидное тело и помещалось в пробирку спектрометра ЯМР высокого разрешения РЯ2305 с рабочей частотой 60 МГц для протонов. Эталонным веществом служил тетраметилосилан (ТМС), запаянный в стеклянном капилляре. Ампулу со стекловидным телом помещали в датчик спектрометра и снимали спектры ЯМР при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего стекловидное тело охлаждали непосредственно в датчике спектрометра до $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, выдерживали при этой температуре 45 мин и снова снимали спектр ЯМР. Из полученных спектров находили отношение площадей под сигналами поглощения воды и ТМС. Первое из них (h_1) является мерой количества всей воды в образце стекловидного тела в относительных единицах, второе — (h_2) является мерой количества невымерзшей или связанной воды в тех же единицах. Разделив второе отношение на первое можно определить количество связанной воды относительно всей воды в стекловидном теле.

На рис. (а) представлен спектр ЯМР стекловидного тела кролика, дегидратированного ПЭО-400. Отношение площадей сигналов воды и ТМС h_1 в этом спектре равно 17,96 условных единиц. На рис. (б) изображен спектр ЯМР после замораживания стекловидного тела до $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Отношение площадей сигналов поглощения воды и ТМС h_2 здесь равно 0,622. На основании полученных результатов вычисляется количество связанной воды в стекловидном теле глаза кролика после введения ПЭО-400:

$$b_1 = \frac{h_2}{h_1} = \frac{0,62}{17,96} = 0,0346.$$

Аналогичным образом находят количество связанной воды в интактном стекловидном теле: $b_0 = 0,0275$. Полученные величины b_0 и b_1 служат основой для расчета степени дегидратации стекловидного тела под воздействием ПЭО-400:

$$d = \left[1 - \left(\frac{h'_2}{h'_1} \right) / \left(\frac{h_2}{h_1} \right) \right] 100 \% = \left(1 - \frac{b_1}{b_0} \right) 100 \% = \left(1 - \frac{0,0346}{0,0275} \right) 100 \% = 25,7 \ \%.$$

Средний показатель степени дегидратации стекловидного тела в 20 опытах составил $25,73 \pm 0,74 \%$ с высокой статистической достоверностью ($P < 0,01$).

Описанный способ позволяет в условиях эксперимента определять объективно и точно содержание воды в стекловидном теле и может найти применение при разработке и изучении новых дегидратирующих средств.

1. Керова И. К. Некоторые экспериментальные и клинические наблюдения над применением препарата мочевины-уролюк в офтальмологической практике : Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Л., 1966. — 17 с.
2. Пирри А., Ван Гейнингген Р. Биохимия глаза. — М. : Медицина, 1968. — 399 с.
3. А.с. 894507 СССР, МКИ³ G 01 № 24/08. Способ определения степени дегидратации стекловидного тела / В. Н. Чередниченко, П. А. Бездетко, В. Д. Зинченко. — Оpubл. 30.12.81. Бюл. № 48.

Украинский ин-т усовершенствования врачей,
г. Харьков

Поступило 25.03.86

УДК 612.111.117

Г. А. Холодный, Р. П. Иванова, Р. Г. Борисова, Ю. В. Левочкин

ИЗМЕРЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ТЕПЛОФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ

В настоящее время широко применяется консервирование эритроцитов путем их замораживания. Для расчета процесса замораживания необходимы данные о теплофизических свойствах препарата в исходном состоянии.

Целью данной работы являлось экспериментальное изучение теплоемкости и теплопроводности эритроцитарной массы, а также ее смеси с защитным раствором, содержащим глицерин. В качестве консерванта был использован раствор ЦОЛИПК 11₅. Эритроцитарную массу смешивали с защитным раствором в соотношении 1 : 1. Конечная концентрация глицерина в смеси составляла 15, 20, 30 и 40 %.

Измерение теплоемкости эритроцитов проводили на приборе РК-С-20 при нормальных климатических условиях [2]. Работа прибора основана на закономерностях регулярного режима первого рода, метод измерения сравнительный. В качестве образцовой меры теплоемкости использовали технически чистую медь. Исследуемые растворы помещали в ампулу диаметром 10 мм и высотой 25 мм. Перегрев образца относительно термостатированного блока не превышал 5—7 К. Расчетная формула для теплоемкости имеет вид:

$$C = \frac{N (\tau_1 - \tau_2)}{m},$$

где N — постоянная прибора, m — масса исследуемых растворов, τ_1 — время охлаждения на фиксированном участке охлаждения ампулы с образцом, τ_2 — время охлаждения пустой ампулы.

Погрешность измерения теплоемкости составляет 3—5 %. Проверку прибора проводили на дистиллированной воде и глицерине. Расхождения полученных данных от известных из литературы не превышали 3 %.

Измерение теплопроводности проводили на приборе ИТЭМ-1 при комнатной температуре [1]. В основу работы прибора положен стационарный сравнительный метод измерения. Прибор состоит из двух массивных металлических блоков, между которыми помещали испытуемый раствор. Перед началом опыта верхний блок перегревали относительно нижнего на 5—10 К. В опыте регистрировали тепловой поток, проходящий через образец к тепломерам, встроенным в нижний блок, и перепад температуры на образце. Тепловую проводимость тепломера определяли в градуировочных

опытах с образцовыми мерами теплопроводности — кварцем и органическим стеклом. Теплопроводность определяли по формуле:

$$\lambda = \frac{kh}{S} \cdot \frac{E_T}{E_0 - aE_T},$$

где k — тепловая проводимость тепломера, h , S — высота и площадь образца соответственно, E_T , E_0 — сигналы термопар, пропорциональные перепадам температур на

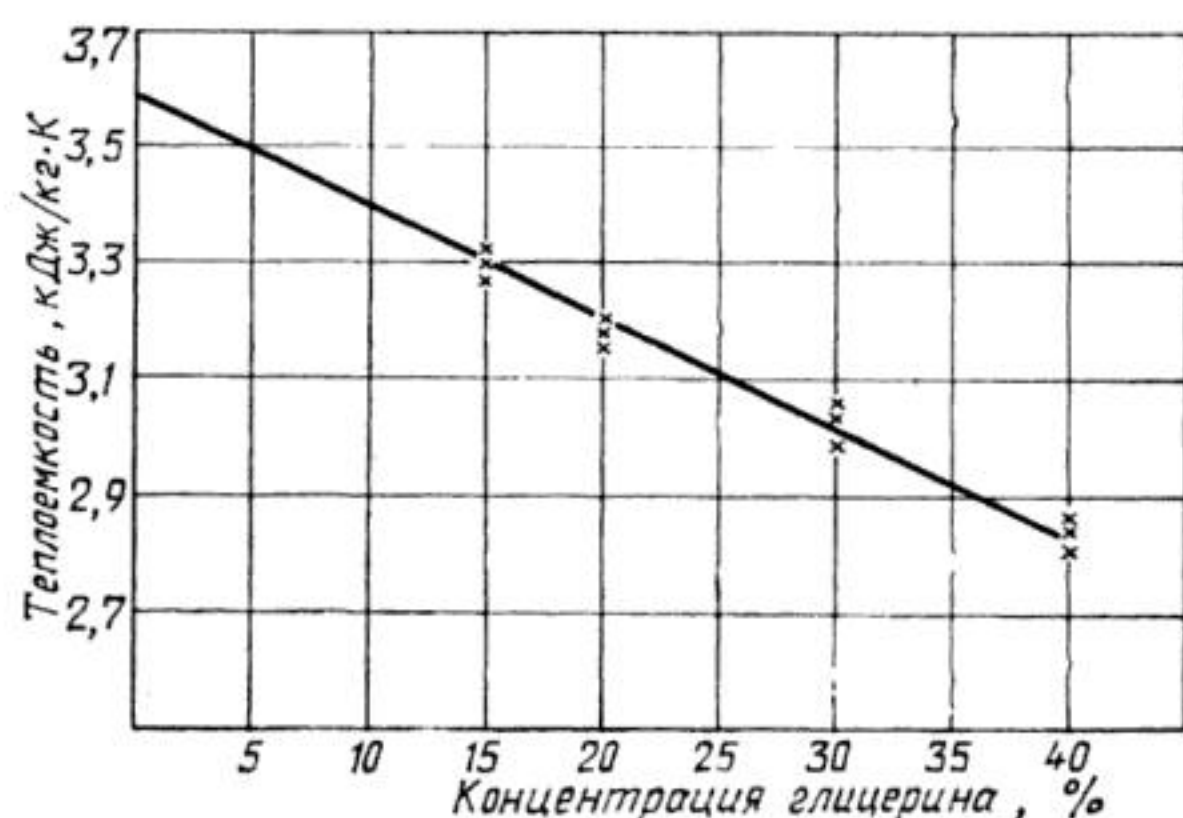


Рис. 1. Изменение теплоемкости эритроцитарной массы в зависимости от концентрации глицерина

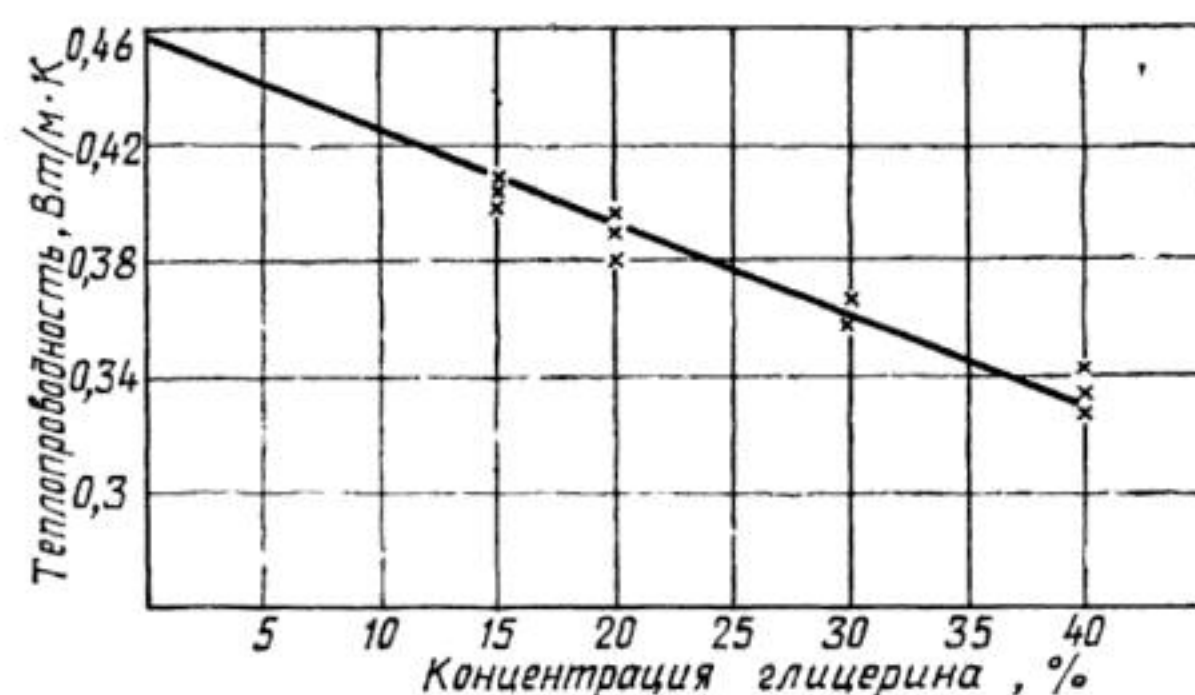


Рис. 2. Изменение теплопроводности эритроцитарной массы в зависимости от концентрации глицерина

тепломере и образце, a — коэффициент, учитывающий влияние контактных тепловых сопротивлений.

Измерение теплопроводности эритроцитарной массы проводили в специальной герметической кювете, причем высота исследуемого слоя для исключения влияния конвекции не превышала 2 мм. Погрешность измерения теплопроводности на приборе не превышала 5—7 %. Измерение теплопроводности дистиллированной воды и глицерина показывали, что отклонения полученных данных от литературных не превышают 5%.

На рис. 1 и 2 приведены результаты измерений теплоемкости и теплопроводности эритроцитарной массы и ее смеси с криопротектором в зависимости от концентрации глицерина. Изменение теплоемкости и теплопроводности эритроцитов от концентрации глицерина аппроксимируется в пределах 1,5—23 % линейной зависимостью.

Полученные данные могут быть использованы для расчета процессов охлаждения и замораживания эритроцитов с указанным защитным раствором с целью оптимизации режимов консервирования этих клеток.

1. Курепин В. В., Козин В. М., Лёвочкин Ю. В. Приборы для теплофизических измерений с прямым отсчетом // Промышленная теплотехника. — 1982. — 4, № 3. — С. 91—97.
2. А.с. 741126 СССР, МКИ² G 01 N 25/18. Способ экспрессного измерения теплофизических свойств материалов и устройство для его осуществления / Е. С. Платунов, В. В. Курепин, В. М. Козин и др. — Оpubл. 15.06.80., Бюл. № 22.

Ленинградский НИИ гематологии
и переливания крови,
Ленинградский технологический
ин-т холодильной промышленности

Поступило 11.02.86

Е. Ф. Копейка, А. В. Чепурнов, С. И. Дрокин, В. Б. Владимирцев, Ю. Г. Александров

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ МОЛОК РЫБ ЧЕРНОГО МОРЯ КАМБАЛЫ-КАЛКАН (*PSETTA MACOTICA PALLAS*) И БЫЧКА-КРУГЛЯКА (*NEOGOBIVUS MELANOSTOMUS PALLAS*)

Для проведения работ по круглогодичному искусственному воспроизводству камбалы-калкан и бычка-кругляка и исследований по гибридизации необходимо обеспечить долгосрочное хранение их половых продуктов, получение которых возможно лишь в мае-июне. Для сохранения половых продуктов некоторых видов рыб эта проблема решена с помощью низкотемпературного консервирования с применением различных криопротекторов [1—3]. Ввиду отсутствия способа хранения сперматозоидов камбалы-калкан и бычка-кругляка целью первого этапа исследований было получение предварительных данных по оценке влияния наиболее широко используемых криопротекторов в процессе криоконсервирования на подвижность и оплодотворяющую способность сперматозоидов бычка-кругляка и камбалы-калкан. Были исследованы функциональные характеристики сперматозоидов камбалы-калкан и бычка-кругляка после их низкотемпературного консервирования в среде, содержащей 0,19 М трис-оксиметил-аминометана, 0,16 М маннита, 10 % одного из криопротекторов (глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО) или этиленгликоль (ЭГ)), pH среды доводили до 0,8 соляной кислотой. У производителей камбалы-калкан и бычка-кругляка сразу после отлова извлекали молоки и, поместив их на лед, доставляли в лабораторию. Через 3—4 ч после взятия их семенники рассекали на части и продавливали через капроновое сито. Полученную сперму разбавляли 1 : 1 защитными средами при 0—5 °С и замораживали до —30 °С со скоростью 1—2 °С/мин, а затем до —70 °С со скоростью 15—20 °С/мин и погружали в жидкий азот. Оттаивание проводили при комнатной температуре на воздухе. Активность оттаянной спермы (отношение числа подвижных клеток к общему количеству всех клеток в поле зрения) определяли под микроскопом в проходящем свете при X 400—600 после предварительной активации морской водой, взятой в десятикратной зоне.

Как следует из полученных данных, максимальное количество клеток камбалы-калкан сохранялось после их консервирования в среде с ЭГ (ЭГ — $43,4 \pm 3,3$ %; глицерин — $33,3 \pm 10,2$ %; ДМСО — $30,0 \pm 5,7$ %; в контроле — 60 %). Аналогичная тенденция сохранялась и при замораживании сперматозоидов бычка-кругляка (ЭГ — 30 %; ДМСО — 20 %; глицерин — 15 %, в контроле — 40 %). Время движения сперматозоидов после их активации коррелировало с количеством подвижных клеток. При замене защитной среды на морскую воду активность спермы камбалы-калкан после оттаивания также была самой высокой с ЭГ — 40 %; ДМСО — 20 %; глицерин — 15 %, в контроле — 60 %). Увеличение скорости охлаждения спермы в интервале температур от 5 до —30 °С с 1 до 5 °С/мин не приводило к падению ее активности.

Для проверки оплодотворяющей способности криоконсервированной спермы была взята сперма, замороженная на указанной среде с ЭГ. После 11 сут хранения и последующего оттаивания она имела 60 % подвижных клеток. Исходная сперма в контроле имела активность 80 %. Для осеменения икры одной самки камбалы-калкан брали 2 мл размороженной спермы. Контрольную икру осеменяли спермой от 5 самцов. Осеменение икры проводили сразу после ее получения и, поместив в термостатированные стаканы емкостью 1 л, доставляли в лабораторию. За это время икра достигала стадии 8 бластомеров. На этой стадии брали по 3000 икринок, переносили в кристаллизаторы объемом 6 л и инкубировали при температуре 19—20 °С. В опыте было оплодотворено 69 % икры. В контроле, вероятно из-за плохого состояния молок выловленных для осеменения самцов, было оплодотворено 25 % икры. Процесс эмбрионального развития длился около 65 ч. В сравнении с контролем в развивающейся икре аномалий не обнаружено. Выклев личинок составил почти 100 % от числа оплодотворенных икринок. Уродов при этом не наблюдалось. Полученные личинки были переведены на внешнее питание молодой коловраток. На стартовый корм они перешли на 3-и сут при живаемости 80 %.

Таким образом, из полученных результатов следует, что ЭГ в сочетании с *трис*-HCl буфером и маннитом лучше предохраняет сперматозоиды камбалы-калкан и бычка-кругляка от криповреждения, чем ДМСО и глицерин. Об этом свидетельствует и высокая оплодотворяющая способность криоконсервированной с ЭГ спермы камбалы-калкан.

1. Копейка Е. Ф., Белоус А. М., Пушкарь Н. С. Криоконсервирование спермы рыб // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. — Киев: Наук. думка, 1981 — С. 281—299.
2. Mounib M. S. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa // J. Reprod. and Fert. — 1978. — 53, N 1. — P. 13—18.
3. Pullin R. S. V. The storage of plaice (*Pleuronectes platessa*) sperm at low temperatures // Aquaculture. — 1972. — 1. — P. 279—283.

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

Поступило 04.07.86

УДК 57.043 + 612.115.38

С. Х. Межидов, В. А. Мусеев

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ВЯЗКОСТЬ ВНЕ- И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ РАСТВОРОВ

Для оценки изменения вязкости растворов использован метод ЭПР спинового зонда, описанный в работе А. В. Лазарева и соавт. [1], который применен до частоты вращения $\nu_{-1} = 10^{10} \text{ с}^{-1}$. Для более высоких значений ν_{-1} радикала оценка относительного ее изменения показала, что в растворе глицерина (30 %) при температуре 25 и -5°C и в дистиллированной воде при 25 и 0°C с точностью до 4 % совпадает с относительным изменением вязкости. Исследование цитозоля эритроцитов проводилось по методу, описанному в работе [2], только вместо никеля для уширения внеклеточного сигнала радикала был применен феррицианид калия 0,10 моль/л, который по осмолярности соответствует физиологическому раствору хлорида натрия.

Полученные результаты представлены на рис. 1, 2. Из рис. 1 видно, что ν_{-1} в физиологическом растворе значительно выше, чем в растворе криопротектора. При снижении температуры вязкость быстрее увеличивается в физиологическом растворе. Однако наклон линии на графике после фазового перехода почти не меняется. Более того, в промежутке времени 2—5 мин после кристаллизации при -10°C ν_{-1} кратковременно увеличивается на $25 \pm 7\%$, указывая на уменьшение вязкости, что соответствует подъему температуры до -5°C . В то же время вязкость цитозоля эритроцитов резко увеличивается после фазового перехода. Так как скорость растворенного вещества зависит от вязкости среды, то можно предположить, что при фазовом переходе в суспензии клеток без криопротектора давление во внеклеточной среде возрастает не только из-за увеличения концентрации соли, но и уменьшения вязкости вследствие повышения температуры. В цитозоле давление повышается за счет концентрирования компонентов и уменьшается из-за повышения вязкости среды, что может увеличивать градиент осмотического давления на мембране и являться одной из причин повреждения клеток при фазовом переходе. При наличии во внеклеточной среде высокомолекулярного криопротектора увеличение вязкости в цитозоле эритроцитов менее выражено, что вызвано как уменьшением концентрации электролитов вне клеток, так и увеличением вязкости во внеклеточной среде.

При наличии в среде проникающего криопротектора вязкость во внеклеточном растворе ниже по сравнению с внутриклеточной, но при фазовом переходе резко увеличивается, приближаясь к внутриклеточной (рис. 2). Повышение давления за счет концентрирования низкомолекулярных компонентов во внеклеточной среде может быть компенсировано увеличением вязкости. Кроме того, имеет значение не только относительная разница в осмотическом давлении вне- и внутриклеточных растворов, но и его абсолютное значение, которое в вязких растворах должно быть ниже.

Сочетание высоко- и низкомолекулярных криопротекторов дает более высокие значения вязкости, чем растворы низкомолекулярных криопротекторов в той же ве-

совой концентрации. Поэтому можно предположить, что сочетание высоко- и низкомолекулярных криопротекторов будет более эффективным криоконсервантом.

Одной из причин повреждения биообъектов при криоконсервировании является перекисное окисление липидов. Однако скорость реакций в вязких растворах при низких температурах значительно уменьшается [3]. В растворе ПВП-11600 и в цитозоле эритроцитов при температуре ниже -30°C , а в растворах глицерина, пропандиола -1,2 и хлорида натрия ниже -40°C из-за высокой вязкости среды ν_{-1} ниже $3 \cdot 10^9 \text{ c}^{-1}$. Ранее было показано, что в цитозоле эритроцитов, находящихся в растворе глицерина, при температуре ниже -78°C параметр $2A_{\parallel}$, показывающий упорядочен-

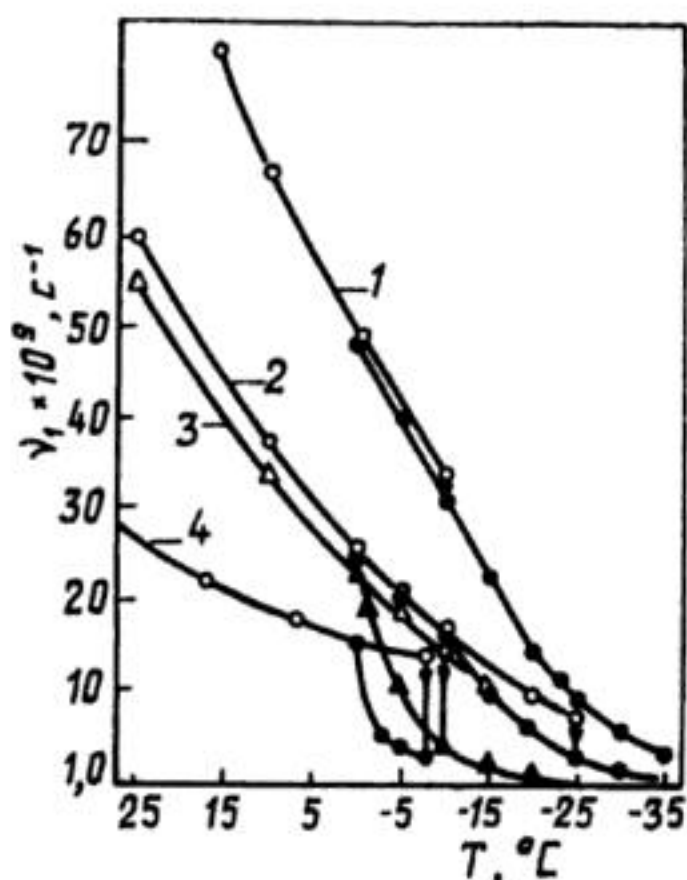


Рис. 1. Зависимость «частоты вращения» иминоксильного радикала от температуры в растворах:

1 — физиологический раствор хлорида натрия, 2 — глицерин 32 % (массовая доля) на физиологическом растворе, 3 — поливинилпирролидон-11600 20 % (массовая доля) на физиологическом растворе, 4 — цитозоль эритроцитов, находящихся в физиологическом растворе. Стрелкой указаны точки фазового перехода, $\blacktriangle$, $\bullet$ — точки линий отогрева после фазового перехода; $\triangle$, $\circ$ — точки линий охлаждения без фазового перехода

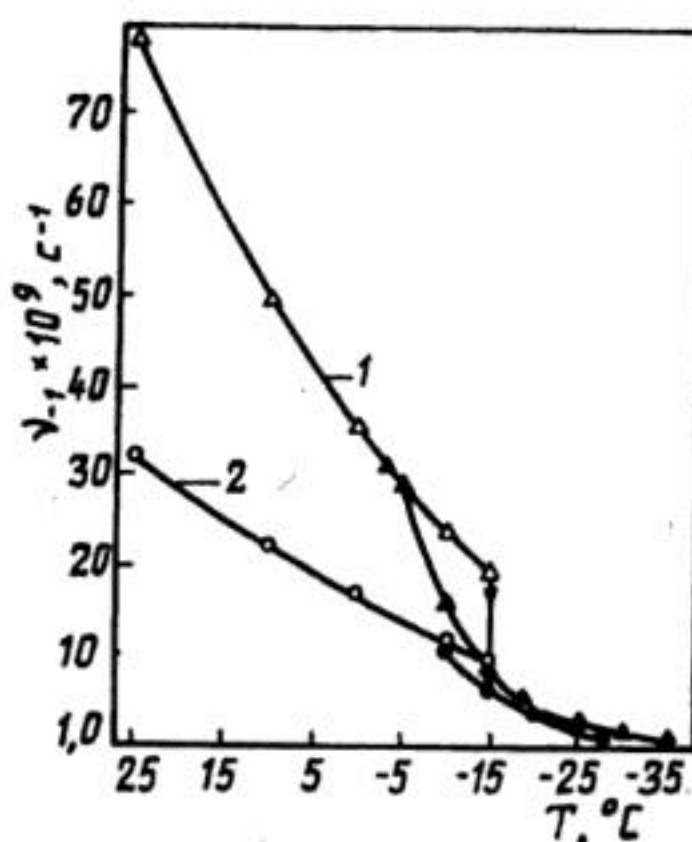


Рис. 2. Зависимость «частоты вращения» иминоксильного радикала от температуры в суспензии эритроцитов, содержащей 35 % (массовая доля) 1, 2-пропандиола:

1 — в супернатанте, 2 — в цитозоле эритроцитов. Точки фазового перехода и линии отогрева отмечены как и на рис. 1

ность микроокружения радикала, не изменяется [2]. Учитывая быстрый рост вязкости после фазового перехода в растворах высокомолекулярных криопротекторов и сочетаний высоко- и низкомолекулярных криопротекторов можно предположить, что температура хранения биообъектов в них будет выше.

Так как давление и вязкость зависят от компонентов, составляющих данную среду, то изучение подвижности компонентов (или времен релаксации) в различных средах и в цитозоле клеток и связи этих параметров с сохранностью биообъектов позволит более целенаправленно проводить поиск состава криоконсервирующей среды и значений температур их хранения.

1. Лазарев А. В., Стрюков В. Б. Медленная вращательная диффузия иминоксильного радикала в вязких средах и полимерах // Докл. АН СССР.— 1971.— 197, № 3.— С. 627—630.
2. Нардид О. А., Моисеев В. А., Межидов С. Х. Исследование влияния низких температур на фазовое состояние цитозоля эритроцитов // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 18—20.
3. Хаштария Д. Э., Гогуадзе Н. Г. Влияние вязкости среды на активность миозиновой АТФ-азы // Биофизика.— 1986.— 31, № 2.— С. 220—222.

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

Поступило 13.11.86

С. В. Руденко

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ МОДИФИКАЦИИ ЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГЛИЦЕРИНА

В работах [3, 4] показано, что глицерин, добавленный с одной стороны плоского липидного бислоя (ПЛБ), содержащего холестерин, приводит к значительному уменьшению удельной емкости бислоя и формированию на его поверхности пузырьковых структур (ПС). Анализ дает возможность сделать вывод, что пузырьковые структуры представляют собой семейство моно- и мультислойных липосом, находящихся в контакте с плоским липидным бислоем. Однако механизм перестройки плоского бислоя в мультислойные комплексы остается неясным.

С целью уточнения характера перестроек, возникающих при взаимодействии глицерина с ПЛБ, мы исследовали влияние этого процесса на характер трансмембранного распределения ионофорной метки амфотерицина Б, в норме не проникающей через бислои, и генерацию высших гармоник трансмембранного тока, несущих информацию о внутримембранном поле ПЛБ и его вязкоупругих свойствах.

Эксперименты проводили на ПЛБ из яичного лецитина и холестерина в различных соотношениях в *n*-декане. В качестве электролита использовался 10 мМ раствор NaCl. Электрические измерения проводили по стандартным методикам [2].

При добавлении с одной стороны ПЛБ глицерина в концентрации 1,7 М емкость бислоя начинала уменьшаться и через 20—25 мин выходила на стационарный уровень, величина которого примерно в 10 раз меньше исходной емкости бислоя. Вся поверхность бислоя при этом была занята пузырьковыми структурами. Если в начале процесса с той стороны ПЛБ, с которой добавлен глицерин, ввести амфотерицин Б в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М, то через определенное время (~ 30 мин) наблюдается изменение знаков потенциала нулевого тока и тока короткого замыкания в условиях десятикратного градиента NaCl (10 и 100 мМ). Кроме этого, возникающая в результате введения амфотерицина Б проводимость блокируется тетраэтиламмонием с той стороны бислоя, с которой его первоначально не было. Эти данные свидетельствуют, что в результате структурных перестроек бислоя при взаимодействии с глицерином наблюдается трансмембранный перенос антибиотика с одной стороны ПЛБ на другую [1].

При исследовании влияния структурных перестроек бислоя на характер генерации второй гармоники трансмембранного тока было обнаружено, что вторая гармоника не может быть полностью скомпенсирована внешним электрическим полем, как в случае немодифицированных мембран [2]. Зависимость некомпенсированной составляющей от амплитуды входного переменного напряжения для различных частот имеет квадратичный вид. Появление некомпенсированной второй гармоники и ее зависимость от приложенного напряжения хорошо согласуются с представлением, согласно которому в бислое в процессе структурных перестроек возникают липидные образования с отличными от основного бислоя вязкоупругими свойствами и измененными параметрами ионного связывания. Таким образом, приведенные данные показывают, что в процессе структурных перестроек липидного бислоя, индуцированных глицерином, могут возникнуть липидные образования, обладающие измененными вязкоупругими свойствами и облегчающие трансмембранный перенос амфотерицина Б. Они могут представлять собой семейство инвертированных мицелл или участков сильно изогнутых бислоев с малым радиусом кривизны. Можно предположить, что эти образования играют роль промежуточных структур в процессе преобразования плоского липидного бислоя в мультислойные комплексы.

1. Бабунашвили И. Н. Структура контактов клеточных и искусственных мембран : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Пущино, 1982. — 20 с.
2. Пасечник В. И. Электрострикционные измерения вязкоупругих свойств бислоевых липидных мембран. — М. : ВИНТИ, 1982. — 2. — С. 267.
3. Руденко С. В., Гапоченко С. Д., Бондаренко В. А. Влияние глицерина на емкость и проводимость бислоевых липидных мембран // Биофизика. — 1984. — 29. — Вып. 2. — С. 223—226.
4. Руденко С. В. Нарушение планарной упаковки плоского липидного бислоя при взаимодействии с глицерином // Криобиология. — 1985. № 3. — С. 30.

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

Поступило 02.04.85

ДЕНЬ НАУКИ НА ВЫСТАВКЕ «КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА В НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ»

С 20 апреля по 20 мая в Харьковском Доме техники НТО проходила выставка «Криобиология и криомедицина в народном хозяйстве», удостоенная Диплома I степени ВДНХ СССР. На выставке демонстрировались стенды, отражающие достижения научных подразделений Института проблем криобиологии и криомедицины АН СССР и ряда других институтов страны, приборы и аппаратура для научных исследований и практического применения низких температур, были представлены авторские свидетельства, научные труды и издания института.

14 мая состоялся День науки, в котором приняли участие специалисты из Харькова, Белгорода, Полтавы и Сум. В представленных сотрудниками ИПКиК АН СССР докладах были отражены результаты исследований, направленные на решение важных народно-хозяйственных задач.

Во вступительном слове директор ИПКиК АН СССР член-корреспондент АН СССР В. И. Грищенко остановился на достижениях и задачах криобиологии и криомедицины в деле решения актуальных проблем медицины и других отраслей народного хозяйства. В докладе проф. А. М. Белоуса были представлены результаты фундаментальных исследований, имеющие важное значение для решения практических задач биологии и медицины. Перспективы развития криоиммунологии отражены в сообщении проф. А. А. Цуцаевой. Обобщены результаты использования криобиологических методов в медицине (проф. Б. П. Сандомирский), рыбоводстве (к. б. н. Е. Ф. Копейка), офтальмологии (д. м. н. Т. Н. Юрченко). Данные о криопротекторах и направлениях разработки новых криозащитных сред представлены в докладе д. б. н. М. И. Шраго. Сообщение к. м. н. Ф. В. Дахно о криоконсервировании репродуктивных клеток сопровождалось демонстрацией видеофильма.

В принятых рекомендациях отмечена важность пропаганды достижений и возможностей криобиологии и криомедицины среди специалистов и населения, способствующей более широкому внедрению разработок института в народное хозяйство.

Ю. И. Исаев

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН СССР в 1987 г. защищены диссертационные работы на соискание ученой степени кандидата биологических наук Т. Г. Дубравой на тему: «Эффективность криоконсервирования кроветворных клеток в зависимости от их исходных свойств». Изучена степень криоустойчивости кроветворных клеток костного мозга в зависимости от их исходного состояния, а также установлены ведущие повреждающие факторы, реализуемые на этапах замораживания-отогрева. Показано, что в процессе криоконсервирования костного мозга под защитой криопротектора полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) происходит гибель 30—40 % кроветворных клеток независимо от уровня дифференциации (KOE_c и KOE_k); данный показатель существенно не менялся при изменении количественного содержания в суспензии кроветворных клеток, находящихся в S-периоде клеточного цикла.

В исследовании Я. С. Игльвичюте «Значение фармакологической подготовки и состава консерванта для сохранения изолированной почки в режиме гипотермической перфузии» изучено влияние фармакологической подготовки и состава консерванта на восстановление функции пересаженных почек собак после их гипотермической перфузии различной продолжительности. Показано, что повышение эффективности метода гипотермической перфузии основывается на комплексном совершенствовании состава консерванта и воздействия фармакологических средств на исходное состояние органа.

В диссертационной работе В. М. Кураксы «Исследование метастабильных состояний водных растворов 1,2-пропандиола и их влияние на повреждение эритроцитов и почки при криоконсервации» предложен способ динамического контроля образования микроразрывов в ткани почки в процессе криоконсервации и показано, что избежать таких повреждений можно путем повышения конечной температуры охлаждения органа, защищенного раствором 1,2-пропандиола, на 10—15 °C выше температуры стекловых перехода.

УДК 57.043:535.375.55

Применение спектроскопии комбинационного рассеяния света в криобиологии / Нардид О. А., Дюбко Т. С. // Криобиология. — 1987. — № 4. — С. 3—9.

Рассмотрены некоторые результаты применения метода КР-спектроскопии к исследованию фазовых переходов в искусственных мембранах, протеолипосомах, нативных мембранах, а также влияния на фазовые переходы рН, холестерина, глицерина. Обсуждается возможность применения метода КР-спектроскопии в криобиологии. Ил. 3. Библиогр.: 21 назв.

УДК 51.043.615.387:547

«Хоминг» и пролиферация кроветворных клеток (КОЕ_с) криоконсервированного костного мозга в селезенке и костном мозге реципиентов / Цуцаева А. А., Гольцев А. Н., // Криобиология. — 1987. — № 4. — С. 9—15.

Изучен «хоминг» криоконсервированных КОЕ_с в костном мозге и селезенке облученных реципиентов, определена интенсивность накопления КОЕ_с и ядерных клеток в указанных органах в различные сроки посттрансплантационного периода. Установлен факт снижения способности определенной части КОЕ_с после криоконсервирования расселяться в кроветворных органах в ранние сроки после трансплантации. Процесс мультипликации КОЕ_с, а также выход их в дифференцировку с последующим накоплением ядерных элементов в селезенке и костном мозге имеют циклический характер. Ил. 1. Табл. 2. Библиогр.: 15 назв.

УДК 57.043:611—013:577.3

Криочувствительность митохондрий печени кроликов в онтогенезе / Суббота Н. П., Сукач А. Н. // Криобиология. — 1987. — № 4. — С. 15—20.

Исследованы возрастные особенности изменений биоэнергетических параметров (дыхательная активность при окислении различных субстратов, сопряженность процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, АДФ/О, активность цитохромоксидазы, сукцинат и НАДН-оксидазы, уровня восстановленности НАДН, активности свободного пути окисления) митохондрий печени кроликов в онтогенезе (19-й и 23-й день эмбрионального развития, новорожденные, 1-месячные и 5-месячные животные), обуславливающие их различную чувствительность к низким температурам. Сделан вывод о том, что степень крионарушений митохондрий определяется структурно-функциональной активностью исследованных систем в разные сроки онтогенеза и связана со становлением общих регуляторно-метаболических процессов. Ил. 2. Табл. 1., Библиогр.: 11 назв.

УДК 53.082.4 : 615.012.41

Применение акустического метода оценки защитных свойств консервирующих растворов / Унксов М. Е., Шпиченецкий Б. Я., Онищенко Н. А. // Криобиология. — 1987. — № 4. — С. 20—25.

Описано устройство для определения скорости ультразвука в изолированных органах, помещенных в консервирующий раствор. Получены зависимости скорости ультразвука в почках крыс от времени их консервации для различных растворов. Показано, что время стабилизации скорости ультразвука в органе, помещенном в консервирующий раствор при постоянной температуре, соответствует периоду обратимых изменений в органе. Установлена связь между скоростью ультразвука в консервируемом органе и коэффициентами, характеризующими диффузию K^+ и Na^+ в нем. Показано, что по значениям коэффициентов диффузии можно оценить защитные свойства консервирующего раствора. Ил. 2. Табл. 1. Библиогр.: 4 назв.

УДК 539.143.43:(536.48:576.851.48)

Изменение внутриклеточного pH в *Escherichia coli* после замораживания-оттаивания / Булатов И. С., Нарышкина Е. П., Волков В. Я. // Криобиология.— 1987.— № 4.— С. 25—30.

С помощью метода ^{31}P -ЯМР спектроскопии исследовано изменение внутриклеточного pH в концентрированных суспензиях клеток *E. coli* (с добавкой и без добавки защитной среды) после воздействия различных по скоростям процессов замораживания (до -196°C и до -50°C) с последующим оттаиванием при 37°C .

Ил. 4. Табл. 1. Библиогр.: 12 назв.

УДК 577.31:51—7

Математическое моделирование процессов переноса тепла в биологических тканях / Панзнер М., Хэнсген Х., Кнёнер Р., Спюрль Э. // Криобиология.— 1987.— № 4.— С. 30—33.

Обсуждаются проблемы математического моделирования и точно определяется стационарное состояние одномерной модели с целью расчета температурных полей в биологической ткани при криовоздействии. Из стационарного решения выводится нестационарная однофазная задача, благодаря которой можно приблизительно вычислить ход фронта замораживания как функцию времени, а также ее скорость. Ил. 5. Библиогр.: 2 назв.

УДК 57:536.48.047.615.9.06

Влияние полиэтиленоксида-1500 на функциональное состояние организма животных / Гучок В. М., Карташов В. Ф., Верховская Л. З., Мазалов В. К., Григоращенко А. И. // Криобиология.— 1987.— № 4.— С. 33—36.

Криопротектор ПЭО-1500 вводили внутривенно половозрелым кроликам породы шиншилла обоего пола в дозе 1,0 г/кг (1/10 ЛД-50) ежедневно в течение 21 дня в 15 %-ной концентрации и в течение 10 дней в 30 %-ной концентрации. Показано, что многократное продолжительное внутривенное введение 15 % ПЭО-1500 не нарушает основных функций печени, состояния свертывающей системы и состава периферической крови кроликов, но вызывает незначительную кратковременную диспротеинемию. Увеличение концентрации до 30 %-ной вызывает усиление нарушения в составе белковых фракций сыворотки крови, что дает основание предположить наличие зависимости выявленных изменений не только от дозы, но и от концентрации криопротектора. Ил. 2. Библиогр.: 6 назв.

УДК 612.75:57.043.001.6

Деструктивно-метаболические и репаративные изменения костной ткани после криовоздействия / Георгадзе Д. А., Рязанцев В. В., Мхитарьянц А. М., Васильевский В. Ю.— Криобиология, 1987.— № 4.— С. 36—38.

Изучался механизм регенерации костной ткани крыс после низкотемпературного воздействия. Показано, что через 16 сут в зоне крионекроза появляются нормальные хондро- и остеобластические элементы, со структурой, свидетельствующей об активной биосинтетической деятельности. Это коррелирует с возрастанием включения меченых аминокислот в кислотонерастворимую фракцию белков и ^3H -тимидина в ДНК костного регенерата. Ил. 1. Табл. 1. Библиогр.: 4 назв.

УДК 618.14—005.1+547.9]:616—089.583.29

Влияние локальной (ректальной) гипотермии на обмен катехоламинов при лечении ювенильных маточных кровотечений // Акунц К. Б., Демин Ю. М., Саркисян Р. Г., Авакян Г. С., Ботоян Ц. Р. / Криобиология.— 1987.— № 4.— С. 38—42.

Представлены результаты применения локальной (ректальной) гипотермии при лечении ювенильных кровотечений у 40 больных. Холодовое орошение прямой кишки (3—5 процедур с экспозицией 10—15 мин водой $4-5^\circ\text{C}$ в количестве 0,07 л на кг массы) у 85 % больных привело к нормализации нарушенной функции симпато-адреналовой системы с последующей регуляцией менструальной функции. Табл. 2. Библиогр.: 9 назв.

УДК 579.842.23:57.086.13

Лиофилизация чумного микроба / Кадетов В. В., Наталич Л. А., Терентьев А. Н. // Криобиология.— 1987.— № 4.— С. 42—44.

На основе литературных данных рассмотрены оптимальные подходы к консервированию штаммов чумного микроба методом лиофилизации. Указаны перспективы разработок в этой области.
Библиогр.: 12 назв.

UDC 57.043:535.375.55

Spectroscopy of combined light scattering in cryobiology / Nardid O. A., Dubko T. C. / Kriobiologiya.— 1987.— N 4.— P. 3—9.

The results of investigation of phase transitions in artificial membranes, proteoliposomes, native membranes and of the effects of pH, cholesterol and glycerol on the phase transitions using CR spectroscopy are considered. The possibility of application of CR spectroscopy in cryobiology is discussed. 3 figs. Refs.: 21 titles

UDC 51.043.615.387.547

Homing and proliferation of haemopoietic cells (CEU_s) of cryopreserved bone marrow in recipient spleen and bone marrow / Tsutsayeva A. A., Goltsev A. N. // Kriobiologiya.— 1987.— N 4.— P. 9—15.

Homing of cryopreserved CFU_s in bone marrow and spleen of irradiated recipients as well as the intensity of CFU_s and other nuclear cell accumulation in different periods after transplantation were studied. The ability of a part of cryopreserved CFU_s to homing in haemopoietic organs immediately after transplantation has been found to decrease. The CFU multiplication and differentiation followed by accumulation of nuclear elements in spleen and bone marrow appeared to be cyclic. 1 fig. 2 tables. Refs.: 15 titles

UDC 57.043:611—013:577.3

Cold sensitivity of rabbit liver mitochondria in ontogenesis / Subbota N. P., Sukach A. N. // Kriobiologiya.— 1987.— N 4.— P. 15—20.

Changes in such bioenergetic parameters as the respiratory activity during substrate oxidation, respiration and oxidative phosphorylation coupling, ADP/O ratio, cytochrome oxidase, succinate oxidase and NADH oxidase activities, NADN reduction and uncoupled oxidation path activity of rabbit liver mitochondria were studied as a function of age. The extent of mitochondrial cryodamage has been concluded to depend on the structural and functional activity of the systems studied in different periods of ontogenesis and on the formation of general regulatory and metabolic processes. 2 figs. 1 table. Refs.: 11 titles

UDC 53.082.4:615.012.41

Using the acoustic method for evaluation of the protective efficiency of preservation solutions / Unksov M. E., Shpichenetsky B. Ya., Onishchenko N. A. // Kriobiologiya.— 1987.— N 4.— P. 20—25.

A devise for the measurement of ultrasound velocity in isolated organs plunged into a preservation solution is described. The dependences of the ultrasound velocity in rat kidneys on the time of preservation in different solutions have been obtained. It has been shown that the time of ultrasound velocity stabilization in the organ located in a preservation solution at constant temperature corresponds to the period of reversible changes in the organ. The ultrasound velocity has been found to be related to the coefficients of K⁺ and Na⁺ diffusion in the preserved organs. The protective efficiency of the preservation solution can be judged by the diffusion coefficients. 2 fig. 1 table. Refs.: 4 titles

UDC 539.143.43 : (536.48:576.851.48)

Changes in intracellular pH of Escherichia coli after freezethawing / Bulatov I. S., Naryshkina E. P., Volkov V. Ya. // Kriobiologiya.— 1987.— N 4.— P. 25—30.

Changes in intracellular pH of concentrated E. coli suspensions (with or without cryoprotectants) were measured using ^{31}P -NMR spectroscopy after freezing at different rates to -196°C and -50°C , and thawing. 4 figs. 1 table. Refs.: 12 titles

UDC 577.31:51—7

Mathematic modelling of heat transfer processes in biological tissues / Panzner M., Hänsen H., Knöner R., Spörl E. // Kriobiologiy.— 1987.— N 4.— P. 30—33.

Problems of mathematic modelling are discussed. The stationary state of one-dimensional model is determined in order to calculate thermal fields in biological tissues subjected to cryoapplication. The non-stationary mono-phase problem is derived from the stationary solution due to which the freezing front motion can be calculated approximately as a function of time. 5 figs. Refs.: 2 titles

UDC 57.536.48.047.615.9.06

The effect of polyethylene oxide—1500 on the functional state of animal body / Guchok V. M., Kartashov V. F., Verkhovskaya L. Z., Mazalov V. K., Grigorashchenko A. I. // Kriobiologiya. 1987.— N 4.— P. 33—36.

It has been shown that the main liver functions, the state of coagulation system and the peripheral blood composition of rabbits remain unchanged during repeated prolonged intravenous injection of 15 % PEO-1500 which induces little transient disproteinemia. Increasing the concentration of PEO to 30 % leads to greater changes in the composition of blood serum protein fractions, thus suggesting the dependence of changes not only upon the dose but upon the concentration of cryoprotectant as well. 2 figs. Refs.: 6 titles

UDC 612.75:57.043.001.6

Destructive, metabolic and reparative changes in bone tissue after cryoapplication / Georgadze D. A., Ryazantsev V. V., Mkhitaryants A. M., Vasilovsky V. Yu. // Kriobiologiya.— 1987.— N 4.— P. 36—38.

The regeneration mechanism of rat bone tissue subjected to cryoapplication was studied. It has been shown that 16 days after cryoapplication normal chondro- and osteoblastic elements whose structure indicates biosynthetic activity appear in the cryonecrosis zone. This correlates with increased incorporation of labelled amino acids into the acid-insoluble protein fraction and ^3H -thymidine into DNA of regenerated bone. 1 fig. 1 table. Refs.: 4 titles

UDC 618.14—005.1.547.9/:616—089.584.29

The effect of local (rectal) hypothermia on the catecholamine exchange during juvenile uterine bleeding / Akunts K. B., Demin Yu. M., Sarkisyan R. G., Avakyan G. S., Botoyan Ts. R. // Kriobiologiya.— 1987.— N 4.— P. 38—42.

Rectal cold irrigation (3 to 5 procedures for 10—15 min with 4 to 5 °C water, 0.07 l per mg of body weight) has been shown to normalize the function of sympatho-adrenal system as well as menstruations in 85 % cases. 2 tables. Refs.: 9 titles

UDC 579.842.23 : 57.086.13

Lyophilization of plaque microbes / Kadetov V. V., Natalych L. A., Terentyev A. N. // Kriobiologiya.— 1987.— N 4.— P. 42—44.

Optimal approaches to preservation of plaque microbe strains by the method of lyophilization are considered basing on literature data. Perspectives in this branch are outlined. Refs.: 12 titles.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА» ГОТОВИТ К ВЫПУСКУ:

Криобиология и биотехнология / А. А. Цуцаева, Ю. А. Иткин, В. Г. Попов и др.— Киев: Наук. думка, 1987 (II).— 20 л.: ил.— (В пер.): 3 р. 20 к.

В монографии излагаются основные достижения в области фундаментальной и прикладной криобиологии; рассматриваются различные биотехнологии, в которых уже применяются или могут применяться методы криоконсервирования и лиофилизация из криоконсервированного состояния. Приводится подробное описание этих технологических процессов, аппаратуры и оборудования для их реализации, методов оценки степени сохранности свойств биологических объектов.

Для биологов, медиков, специалистов в области биотехнологии, прикладной микробиологии, ветеринарии, производства вакцино-сывороточных препаратов.

Барьерные свойства биомембран при низких температурах / А. К. Гулевский, В. А. Бондаренко, А. М. Белоус.— Киев: Наук. думка, 1987 (IV).— 18 л. ил.— (В пер.): 3 р.

В монографии систематизирован и обобщен большой экспериментальный материал о влиянии физико-химических факторов, формирующихся в процессе замораживания-оттаивания на структуру и барьерно-транспортные свойства природных и искусственных мембран. Приведены данные о зависимости структурной организации липидов и белков биомембран от температуры, концентрации соли, содержания воды, криопротекторов. В условиях охлаждения рассмотрены функциональные характеристики биомембран: пассивный и активный транспорт веществ, барьерные свойства, активность мембраносвязанных ферментов. Особое внимание уделено исследованию механизмов образования и репарации дефектов в мембранах. Развиваются представления о ведущей роли понижения температуры и вымерзания воды в инициации структурных перестроек, приводящих к формированию «каналов утечки» веществ и нарушению асимметрии клеток.

Для биофизиков, физиологов и биохимиков.

Проводится подписка на 1988 год на всесоюзный научно-теоретический журнал «КРИОБИОЛОГИЯ». В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

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

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

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

KRIOBIOLOGIYA is published 4 times a year.

Subscription Rates: 65 copecks for 3 months, 1 rouble and 30 copecks for 6 months, 2 roubles and 60 copecks for 12 months. Subscriptions to the journal are taken at SOYUZPECHAT agencies of the USSR Ministry of Communications.

Наукова думка

Криобиология. — 1987. — № 4. — 1—56