

4

ISSN 0233-7673

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

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1998

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

80
РОКІВ



Главный редактор **В.И.Грищенко**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

4

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

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1998

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

Президенту Національної Академії наук України Борису Євгеновичу Патону 80 років	3
70-летие Валентина Ивановича Грищенко	4
Грищенко В.И., Юрченко Г.Г. Влияние факторов низкотемпературного консервирования на репродуктивные, эмбриональные и фетальные клетки	7

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Гулевский А.К., Рязанцев В.В., Зюченко А.В., Релана Л.И., Грищенко Е.А. Способность к переохлаждению на различных стадиях онтогенеза большого мучного хрущака <i>Tenebrio molitor</i>	14
Грищенко В.И., Межидов С.Х., Нардид О.А., Розанова Е.Д., Моисеев В.А., Кулешиова Л.Г. О 6 экстинкции хромофорной группы белка в биологических системах	18
Кудожко Е.В., Рамазанов В.В., Тимченко Л.Н., Семенченко А.Ю., Щегленко Ю.В., Бондаренко В.А. Влияние модификаторов на структурный спектр белков цитоскелета эритроцитов человека	22
Пателарос С.В. Влияние моновалентных катионов Na^+ , K^+ , H^+ на развитие осмотических мембранных повреждений эритроцитов, активируемых ионами Ca^{++} и Zn^{++}	26
Сергеева Л.А. Роль ферментов репарации ДНК в реализации генетических повреждений и гибели клеток	31
Безуглый Н.Д., Медведевский А.В. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих в растворах криопротекторов. IV. Прямая регидратация эмбрионов коровы	37
Парченко Т.А., Бондаренко В.А., Никит Е.Е. Тестирование целостности мембраны регидратированных эритроцитов с помощью яд-индуцированного гемолиза	41

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Грищенко В.И., Геродес А.Г., Никитченко Ю.В. Влияние низкотемпературного хранения на перекисное окисление липидов и антиоксидантную активность фолликулярной жидкости человека	44
Лучко Н.А., Кучков И.Н. Влияние производных метилксантина на некоторые биоэнергетические параметры спермиев человека до и после криоконсервации	48
Суббота Н.П., Пацавский П.П. Флуоресценция 4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния в гепатоцитах при гипотермическом и низкотемпературном хранении	53
Гальченко С.Е., Мамонтова А.В., Сандомирский Б.П. Сохранность тканевых лимфоцитов после криоконсервирования фрагментов селезенки	57

КРИОМЕДИЦИНА

Рибберг А.Б., Трушана В.А., Есьман С.С., Роганова В.В., Верхогляд Ю.П., Катвас Е.И., Ковалева Т.В., Перский Е.Е. Изучение накопления хлорина c_6 в мозге кролика после криовоздействия	60
---	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Грищенко В.И., Чуб Н.Н., Крамар М.И., Терпячая И.В., Тодоров П.Т., Черепанова Т.А., Кучков И.Н. Морфофункциональные характеристики спермиев человека, хранившихся при низких положительных температурах	63
Загойко В.И. Гипометаболическое влияние плазмы крови суслика <i>Sundulatus</i> , взятой в различные периоды баута, на потребление кислорода у белых мышей	65

Исаченко В.В. Сверхбыстрое насыщение и выведение проникающих криопротекторов при витрификации эмбрионов крыс	67
Легач Е.И., Чуйко В.А. Криозащитная эффективность димексида и 1,2-пропандиола при замораживании адренкортикальной ткани	68
Парченко Т.А., Бондаренко В.А. К механизму индукции трансмембранной поры при сочетанной химической и осмотической модификации	69
Спиженко Н.Ю. Эффективность криодеструкции шейки матки в лечении иммунологического бесплодия	70
Рамазанов В.В., Лупилова Н.А., Бондаренко Т.П. Транспорт протонов в эритроцитах при гипертоническом воздействии	71

CONTENTS

80 years to the President of the National Academy of Sciences of the Ukraine Boris Evgenievich Paton	3
70-th Anniversary of Valentin Ivanovich Grischenko	4
Grischenko V. I., Yurchenko G. G. The effect of low temperature factors of preservation on reproductive, emryonic and fetal cells	7

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

Gulevsky A. K., Ryazantsev V. V., Zinchenko A. V., Relina L. I., Grischenkova E. A. The ability to supercooling at various stages of ontogenesis of a <i>Tenebrio molitor</i> beetle	14
Grischenko V.I., Mezhdov S.Kh., Nardid O.A., Rozanova E.D., Moiseyev V.A., Kuleshova L.G. On the extinction of a chromophore group of the protein in biological systems	18
Kudokotseva E. V., Ramazanov V. V., Timchenko L. N., Semenchenko A. Yu., Scheglenko Yu. V., Bondarenko V. A. Action of modifiers on the structural spectrum of the cytoskeletal proteins of human red cells	22
Patelaros S.V. Effect of monovalent cations Na^+ , K^+ , H^+ on the development of osmotic membrane injuries in red cells, activated by ions of Ca^{2+} and Zn^{2+}	26
Sergeyeva L. A. Role of the DNA reparation enzymes in realization of genetic impairments and death of cells	31
Bezugly N.D., Medvedovsky A.V. Osmotic reaction of mammalian oocytes and embryos in the solutions of cryoprotectants. IV. Direct rehydration of cow embryos	37
Parchenko T. A., Bondarenko V. A., Nipot E. E. Bee venom-induced hemolysis as a test of integrity of the rehydrated red cell membrane	41

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

Grischenko V. I., Gerodes A. G., Nikitchenko Yu. V. Effect of low temperature storage on lipid peroxidation and antioxidative activity of human follicular fluid	44
Luchko N. A., Kuchkov I. N. Effect of methyl xanthine derivatives upon some bioenergetic parameters of human spermatozoa prior to and after cryopreservation	48
Subbota N. P., Pashinsky P. P. Fluorescence of 4-(n-dimethyl aminostiryl)-1-methyl pyridinium in hepatocytes during hypothermic and low temperature storage	53
Galchenko S.E., Mamontova A.V., Sandomirsky B.P. Integrity of tissue lymphocytes after cryopreservation of spleen fragments	57

CRYOMEDICINE

Rikberg A. B., Trushina V. A., Yesman S. S., Roganova V. V., Verkhoglyadov Yu. P., Kapinys E. I., Kovaleva T. V., Perskiy E. E. A study of chlorine c_κ accumulation in the rabbit brain after cryopreservation	60
---	----

BRIEF COMMUNICATIONS

Grischenko V.I., Chub N.N., Kramar M.I., Terpyachaya I.V., Todorov P.T., Cherepanova T.A., Kuchkov I.N. Morphofunctional characteristics of human spermatozoa stored at low positive temperatures	63
Zagnoiko V. I. Hypometabolic effect of blood plasm of ground squirrel <i>C. Undulatus</i> , taken in different bout periods for the oxygen consumption of white mice	65
Isachenko V.V. Ultrarapid saturation and removal of penetrating cryoprotectants during rat's embryos vitrification	67
Legach E.I., Chuiko V.A. Cryoprotective efficiency of dimexide and 1,2-propanediol during freezing of adrenocortical tissue	68
Parchenko T.A., Bondarenko V.A. To the mechanism of induction of transmembrane pore at combined chemical and osmotic modification	69
Spizhenko N.Yu. Efficiency of uterus neck cryodestruction during the treatment of immunological infertility	70
Ramazanov V.V., Lupilova N.A., Bondarenko T.P. Proton transport in erythrocytes during hypertonic effect	71

Свидетельство о государственной регистрации: Серия КВ, № 98 от 23. 09. 93

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

Научный редактор В. И. Луговой

Редактор Л. А. Рябина

Компьютерный набор и верстка: И. Г. Пятигорская

Подп. в печ. 23. 11. 98. Формат 70×108¹/₁₆. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 7,2. Тираж 300 экз. Цена договорная. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

Президенту Національної Академії наук України Борису Євгеновичу ПАТОНУ 80 років

Вельмишановний Борисе Євгеновичу!

Колектив Інституту проблем кріобіології і кріомедицини вітає Вас зі славним ювілеєм!

Ми цінуємо Вас як видатного вченого, талановитого організатора науки, визначного фахівця у галузі зварювання, спеціальної електрометалургії та технології металів, громадського і політичного діяча.

З 1962 року Ви як визнаний лідер вітчизняної науки на посаді Президента Національної Академії наук зробили значний внесок у створення сучасної інфраструктури вітчизняної науки. Завдяки Вашій прозорливості було втілено в життя інтеграцію науки, освіти і виробництва, розв'язані принципові питання екологічної безпеки, збереження інтелектуального потенціалу нації як надії на успішну розбудову нашої держави.

Дорогий Борисе Євгеновичу! Ми завжди пам'ятаємо, що Ви підтримали у самому зародженні науковий напрямок "кріобіологія і кріомедицина" і при Вашій участі було створено Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії наук України.

З Вашим ім'ям пов'язано втілення в життя нових принципів діяльності Академії, які максимально відповідають зростаючим вимогам до науки в умовах перебудови і оновлення всіх сфер життя суспільства. Цілком підтримуючи Вас як свого визнаного лідера, ми пов'язуємо з Вашою подальшою діяльністю на посаді Президента Національної Академії наук України не тільки розквіт вітчизняної науки, але й поліпшення нашого життя.

Бажаємо Вам, дорогий Борисе Євгеновичу, міцного здоров'я, щастя, нових звершень на благо нашої рідної України.



5
70-летие
Валентина Ивановича
ГРИЩЕНКО



2003
27 ноября 1998 г. исполняется 70 лет выдающемуся ученому, директору Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины **Валентину Ивановичу Грищенко**, заведующему отделом криобиологии системы репродукции, академику Национальной Академии наук Украины, Академии наук технологической кибернетики Украины и Нью-Йоркской Академии наук, почетному академику Украинской стоматологической академии, почетному члену Ассоциации репродуктологов "Семья", почетному члену Индийского криогенного общества.

В. И. Грищенко родился в г. Харькове, и вся его жизнь и деятельность неразрывно связаны с нашим городом. В 1951 г. он закончил Харьковский медицинский институт, в 1954 г. защитил кандидатскую диссертацию, в 1964 г. — докторскую, а в 1966 г. утвержден в ученом звании профессора, и с этого года вся его профессиональная деятельность посвящена одной из важнейших отраслей медицины — акушерству и гинекологии. Валентин Иванович одним из первых в этой специальности применил криохирургические методы и гипотермию, в связи с чем был в 1977 г. удостоен Государственной премии УССР в области науки и техники, в 1979 г. избран чл.-корреспондентом, а в 1988 г. — академиком Академии наук Украины. За успехи в работе в эти же годы награжден юбилейной медалью "За доблестный труд" и орденом "Знак почета", а в 1981 г. удостоен премии им. В. Ф. Снегирева АМН СССР. Наиболее ярко талант В. И. Грищенко как научного работника и организатора науки проявился после того, как в 1983 г. он возглавил Институт проблем криобиологии и криомедицины. Широко известны проводимые под его руководством многогранные фундаментальные исследования, обогатившие науку трудами первостепенного значения. Это работы по изучению влияния низких температур на организм, органы, ткани, клетки и субклеточные структуры, исследование характера действия различных криопротекторов, скоростей охлаждения, процессов кристаллизации в замораживаемых объектах.

Валентин Иванович — создатель и руководитель нового актуального направления в криобиологии, посвященного криоконсервированию половых клеток, что, в свою очередь, позволило организовать на Украине службу экстракорпорального оплодотворения, которое является средоточием передовых направлений современной биологии и медицины. Методы криоконсервации репродуктивных клеток, разработанные под руководством и непосредственном участии В. И. Грищенко, запатентованы в США, Великобритании, Германии и других передовых странах.

Широкий кругозор и понимание тенденций развития современной науки побудили его инициировать широкомасштабный подход к консервации различных биологических объектов, что в итоге позволило создать возглавляемый Валентином Ивановичем Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины НАН Украины, АМН Украины, МОЗ Украины при Институте проблем криобиологии и криомедицины, в рамках которого функционирует Украинский Банк биологических объектов, обеспечивающий трансплантационным материалом лечебные учреждения.

За годы руководства институтом Валентин Иванович внес большой вклад в развитие работ по клеточной и тканевой терапии, что позволило коллективу института завоевать твердые позиции в мировой трансплантологии.

Криоконсервированные препараты плаценты, пуповинная и плацентарная кровь, клетки эмбриональной печени и эндокринных органов широко используются в качестве альтернативного метода в лечении различных заболеваний, а работа в качестве члена Президиума Правления общества транспланто-

гов Украины позволяет придать этому направлению общегосударственное значение.

4 На базе института по инициативе и под руководством В. И. Грищенко проводятся исследования по криоконсервации семян редких и исчезающих видов лекарственных растений с целью сохранения их генофонда, создаются препараты, повышающие морозостойкость и урожайность сельскохозяйственных культур.

Научные разработки В. И. Грищенко и руководимого им коллектива легли в основу аппаратуры и технических средств, обеспечивающих криобиологические технологии.

За плодотворную работу в области криобиологии и криомедицины Валентин Иванович в 1986 г. удостоен Государственной премии СССР, а в 1992 г. — звания “Заслуженный деятель науки и техники Украины”, а Академия наук отметила его выдающиеся заслуги присуждением звания лауреата премии им. А. А. Богомольца. Осенью 1997 г. его труд был отмечен наградой президента — орденом “За відзнаку” III степени. О международном признании ученого свидетельствует его работа с 1974 г. в качестве эксперта ВОЗ, а с 1976 г. — советника ВОЗ по программе “Репродукция человека”. Валентин Иванович является членом Международного общества криохирургов и Международного общества криобиологов, Международного комитета по материнской смертности, а Нью-Йоркская Академия наук удостоила его звания “Активный член Академии” в 1996 г.

Общественная деятельность В. И. Грищенко также многогранна и свидетельствует о его высоком понимании роли ученого в формирующемся новом обществе, его активной жизненной позиции и необыкновенной трудоспособности. Он избирался депутатом городского Совета, является членом правления Украинского общества акушеров-гинекологов, зам. председателя Центральной проблемной учебно-методической комиссии при Министерстве охраны здоровья, членом консультативного Совета по акушерству и гинекологии, членом Главного Совета и Президиума ВАК Украины, Координационного Совета “Научные проблемы государственности Украины” при президенте.

В качестве Председателя Украинского научного общества криобиологии и криомедицины, Председателя медико-биологической секции Северо-восточного центра Национальной Академии наук Украины и Миннауки Украины и члена Бюро отделения НАН Украины Валентин Иванович Грищенко возглавляет в стране передовое направление современной науки, координирует проводимые работы и определяет перспективность проводимых исследований.

Являясь автором более 600 научных работ, включая 23 монографии, 40 патентов, Валентин Иванович состоит членом редакционной коллегии журналов “Акушерство и гинекология”, ^{Харьковского} ~~Харьковского~~ “Медицинского журнала”, зам. главного редактора журнала “Педиатрия, акушерство и гинекология” (Киев), “Cryobiology”, главным редактором журнала “Проблемы криобиологии”, редактором и автором Большой медицинской энциклопедии.

3 Валентин Иванович уделяет много внимания работе с молодежью, формируя научную элиту Украины. Под его руководством защищено 87 кандидатских и 16 докторских диссертаций. Он является председателем Специализированного докторского Совета при Институте проблем криобиологии и криомедицины и Специализированного Совета при Харьковском медицинском университете.

Научная общественность, многочисленные ученики и последователи сердечно поздравляют юбиляра и желают ему здоровья, счастья и творческих успехов!

В.И.Грищенко, Г.Г.Юрченко**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО
КОНСЕРВИРОВАНИЯ НА РЕПРОДУКТИВНЫЕ,
ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ И ФЕТАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ**

В 1984 г. в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины был создан отдел криобиологии системы репродукции. Предпосылкой для создания отдела послужили ранее проводившиеся совместные исследования ИПКиК НАНУ и Харьковского медицинского института, посвященные изучению действия экстремальных факторов, в том числе криопротекторов и низких температур, на спермии, клетки и ткани яичника человека.

Основными направлениями научной работы отдела в области репродуктологии являются следующие: изучение механизмов действия факторов криоконсервирования и гипотермии на гаметы, гонады, эмбрионы и эмбриональные клетки человека и животных с целью установления общебиологических закономерностей действия низких температур как положительных, так и отрицательных на указанные биообъекты, разработка новых высокоэффективных методов криоконсервации гамет, эмбрионов и эмбриональных клеток человека и животных и создание на их основе криобанков этих биообъектов, поиск путей повышения фертильности гамет человека и животных, а также выяснение роли низких температур как фактора "селекции" при замораживании клеточной суспензии.

В процессе комплексных исследований, начатых сразу же после создания отдела (зав. отделом академик НАНУ В. И. Грищенко, 1984), были выяснены общие закономерности криоповреждения и криозащиты спермиев человека и эмбрионов мышей в условиях сверхбыстрого охлаждения и действия многокомпонентного криоконсерванта с включением в его состав мембраностабилизирующих веществ (Н. А. Лучко, Ю. В. Калугин, 1984–1998). Это расширило существующее представление о роли физических и химических факторов в реализации криозащиты репродуктивных клеток и эмбрионов и позволило обосновать новые подходы к разработке способов улучшения их сохранности в условиях глубокого замораживания. На примере включения в криоконсервант алкилпроизводных глицерина показано влияние изменения гидрофильно-липофильного баланса в криобиологической системе на эффективность криозащиты. Установлены предельные показатели, до которых возможно увеличение гидрофобности криопротекторов в отношении репродуктивных клеток без снижения их криозащитных свойств.

Установлено, что при криоконсервации гамет местом приложения осмотических сил в криобиологической системе в условиях ее сверхбыстрого охлаждения прежде всего является цитоплазматическая мембрана репродуктивных клеток. Изучение влияния на цитоплазматическую мембрану спермиев мембраностабилизирующих веществ (холинов) дало возможность определить пути направленной коррекции морфофункционального состояния клеток в условиях их сверхбыстрого замораживания.

Исследована зависимость сохранности спермиев, определяемой комплексом морфофункциональных тестов (определение целостности мембраны с помощью флюоресцентных зондов, активности ряда локализованных в ней фер-

ментов, активности акрозина и Г-6-ФДГ, биосинтеза РНК, ДНК и белка) от состава криоконсерванта и режима сверхбыстрого охлаждения.

Впервые установлено, что при переводе спермиев человека в состояние глубокого холодового анабиоза с помощью сверхвысоких скоростей охлаждения (3 000 – 5 000 °С/мин) и применения многокомпонентных криоконсервантов с низким содержанием криопротекторов и с включением в их состав мембранотропного соединения из группы холинов максимально снижается отрицательное влияние физико-химических факторов криоконсервирования на гамету.

Обнаруженные закономерности действия на репродуктивные клетки сверхбыстрого охлаждения и композиционного криоконсерванта позволили разработать высокоэффективный способ низкотемпературной консервации спермиев человека, который отличается простотой реализации, экономичностью, позволяет сохранить биологическую полноценность гамет на уровне нативных клеток и полностью удовлетворяет запрос клинической практики на репродуктивный материал в настоящее время. Способ криоконсервации спермиев со сверхбыстрым охлаждением внедрен в клиническую практику на Украине и в России. Эффективность его подтверждается высокой частотой беременностей, которые заканчивались рождением здоровых детей после использования криоконсервированных спермиев во вспомогательных репродуктивных технологиях (при искусственной внутриматочной инсеминации криоконсервированной спермой мужа или донора, а также в программе экстракорпорального оплодотворения). Лечебным учреждениям была оказана практическая помощь в организации криобанков репродуктивных клеток для лечения бесплодия разной этиологии. Разработанный способ криоконсервации спермы человека является оригинальным, по своей эффективности и простоте реализации не имеет аналогов в мировой науке и практике, защищен патентами ведущих стран мира (США, Великобритании, Германии, Франции, Японии, России, Украины).

С 1985 г. в отделе проводятся исследования, направленные на изучение действия низких температур на ооциты, эмбрионы и эмбриональные клетки человека и животных, а также на клетки и ткань яичника человека (В. И. Грищенко, Л. И. Луцкая, В. И. Пиняев, М. П. Петрушко, К. Н. Хромушкин, Н. Н. Чуб, В. Е. Чадаев). Было показано, что сохранение морфофункциональных свойств криоконсервированных ооцитов человека находится в прямой зависимости от степени зрелости клеток. Зрелые преовуляторные яйцеклетки характеризуются более выраженной криоустойчивостью по сравнению с незрелыми недифференцированными гаметами, в связи с чем рекомендуется перед криоконсервацией культивировать незрелые ооциты до достижения ими IV-й степени зрелости. Кроме того, криорезистентность ооцитов зависит от гормонального профиля организма женщины. Наиболее устойчивые к криоповреждениям яйцеклетки получены у пациенток с нормальным преовуляторным гормональным фоном. На основе проведенных исследований разработан двухэтапный режим замораживания ооцитов человека под защитой 1,5 М ДМСО для долгосрочного хранения в криобанке. Показано, что гаметы после отогрева сохраняют свои морфофункциональные свойства и могут быть использованы в программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

Отдел криобиологии системы репродукции ИПКиК НАНУ явился инициатором освоения и внедрения в нашей стране метода оплодотворения яйцеклетки человека вне организма (В. И. Грищенко, В. Ф. Дахно, 1984).

Благодаря усилиям научных сотрудников отдела впервые на Украине 19 февраля 1991 г. в Харькове родился ребенок (девочка), зачатие которого произошло *in vitro*. К настоящему времени в результате применения нами на клинической базе института (Харьковский 5-й специализированный клинический родильный дом) для лечения бесплодия метода ЭКО родилось более 200 детей, в том числе 18 двоен и 13 троен. При этом наряду с нативными спермиями используются также гаметы, хранившиеся в условиях низких температур как отрицательных (-196°C), так и положительных ($8-10^{\circ}\text{C}$) с применением режимов хранения, разработанных сотрудниками отдела, что способствует повышению результативности метода ЭКО, которая сейчас составляет 40% и соответствует уровню ведущих центров ЭКО в мире (В. И. Пиняев, Л. И. Луцкая, И. В. Терпячая, М. П. Петрушко, 1996–1998).

Разработка методов гипотермического хранения гамет и эмбрионов человека является одним из важных направлений разработок отдела и характеризуется мировым уровнем научной новизны (В. И. Грищенко, М. И. Крамар, Г. Г. Юрченко, Н. Н. Чуб, И. В. Терпячая, 1990–1996). Предложен режим хранения спермиев человека в условиях гипотермии, включающий скорость ($0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) охлаждения суспензии клеток от комнатной температуры до температуры хранения ($8-10^{\circ}\text{C}$), среду хранения (Ham F-10, Эрла), контейнеры для осуществления метода. Метод гипотермического хранения спермиев позволяет использовать клетки одного эякулята в течение нескольких суток, что важно при лечении бесплодия методами вспомогательной репродуктивной технологии: ЭКО (для реинсеминации неоплодотворившихся ооцитов), инсеминации спермой мужа (для повторной инсеминации), а также для постановки диагностических реакций с целью выявления иммунологического бесплодия.

Изучена возможность гипотермического хранения яйцеклеток и эмбрионов человека (Н. Н. Чуб, М. П. Петрушко, 1994–1997). Оказалось, что в связи с возможностью партеногенеза, вызванного действием гипотермии, целесообразно в условиях гипотермии хранить только оплодотворенные яйцеклетки после 72 ч культивирования в CO_2 -инкубаторе.

Один случай применения программы ЭКО был уникальным не только в нашей, но и в мировой практике (В. И. Грищенко, В. И. Пиняев, 1993–1994). В роли “суррогатной” матери была бабушка ребенка. Ооциты дочери, у которой до этого было создано искусственное влагалище и не было анатомо-физиологической возможности вынашивания ребенка, *in vitro* были оплодотворены спермиями мужа и получены эмбрионы. Гормональные фоны матери и дочери были синхронизированы. Эмбрионы трансплантировали в матку “суррогатной” матери (бабушке будущего ребенка), которая в срок родила здоровую девочку.

Оригинальными, привлечшими внимание исследователей к этапу отогрева криоконсервированных биообъектов, являются работы (П. Т. Тодоров, 1992–1994), в которых изучалась эффективность использования при отогреве ультразвука и СВЧ-электромагнитной энергии. При этом было показано, что ультразвук, применяемый на этапе отогрева криоконсервированной спермы в зоне фазовых переходов лед–вода и положительных температур, способствует повышению сохранности морфологических и функциональных свойств спермиев. При этом в клетках сохраняется активность ферментов на уровне, соответствующем уровню до замораживания, снижается агрегация клеток в жидкой фазе.

Сохранность криоконсервированной спермы можно повысить с помощью СВЧ-отогрева, если применять его после предварительного переноса материала в низкотемпературную баню и использовать импульсные режимы СВЧ-облучения.

Существенный вклад внесен отделом в решение проблемы лечения бесплодия, обусловленного патоспермией мужа (В. И. Грищенко, Н. П. Скидан, Г. Г. Юрченко, М. И. Крамар, Л. И. Луцкая, 1992–1998). В частности, предложена модификация метода выделения из эякулята активно-подвижных спермиев, позволяющая существенно увеличить содержание функционально полноценных гамет в подвижной фракции, выделяемой из спермы для искусственной внутриматочной инсеминации. С целью повышения биологической полноценности спермиев предложено использовать цитохром С (Э. И. Обозная, М. И. Крамар, 1989), ультразвук (В. И. Вишневский, 1986), дополнительное постоянное магнитное поле (В. И. Грищенко, М. М. Ахмад, Г. Г. Юрченко, 1995), низкоинтенсивное гелий-неоновое лазерное излучение (Т. Л. Весич, 1994). Установлено, что в механизме стимулирующего действия фармакологических и физических факторов на биологическую активность спермиев существенную роль играет влияние этих факторов на активность некоторых ферментов (АТФ-азы, каталазы, сукцинатдегидрогеназы).

Важное место в работе отдела занимает изучение патогенеза криповреждений и криозащиты эмбриональных и плодовых клеток человека.

В частности, детально исследованы функция генетического аппарата и системы энергопродукции клеток, их иммунологические и биологические свойства. Выяснилось, что эмбриональные клетки-предшественники эритроидного ростка после криоконсервирования способны восстанавливать гемопоэз у летально облученных животных, т.е. могут приживаться и функционировать в организме реципиента.

Было показано (В. И. Грищенко, О. С. Прокопюк, 1997), что различные по своей природе эмбриональные и фетоплацентарные ткани человека могут служить трансплантационным материалом с большим спектром биологического воздействия на организм человека. Применение этих клеток и тканей оказалось эффективным в лечении акушерской патологии, бесплодия, климакса, сахарного диабета, эндокринных нарушений. Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что эмбриональные ткани, обладая низкой иммунологической активностью, в связи с чем они являются новыми, высокоэффективными биологическими клеточными препаратами и могут выступать как средства для лечения различного рода патологических процессов, включая неопластический рост.

Получены данные, отличающиеся новизной в теоретическом и прикладном аспекте (В. И. Пиняев, 1989), о различной степени чувствительности первичных половых клеток ранних зародышей человека к низкотемпературному воздействию в зависимости от характера и взаимосвязей с соматическими клетками гонады. По мере установления более тесных взаимосвязей с микроокружением криоустойчивость гоноцитов возрастает.

Впервые показана возможность эффективного криоконсервирования фетовариальных клеток человека (В. И. Грищенко, К. Н. Хромушкин, 1996). При этом получены данные, свидетельствующие о том, что для клинического использования клетки предпочтительнее замораживать под защитой 1,2-пропандиола, так как данный криопротектор малотоксичен *in vivo*, что исключает необходимость отмывки его перед трансплантацией.

Выполнен большой объем исследований по криоконсервированию гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека (В. И. Грищенко, Г. С. Лобынцева, И. А. Вотякова, 1987–1997). При этом установлен ряд важных в теоретическом и прикладном аспекте данных. Так, установлено, что среди популяции гемопоэтических клеток, выделенных из эмбриональной печени 5–12-недельных эмбрионов и представленных клетками всех ростков кроветворения, находящихся на разной стадии дифференцировки, самой высокой пролиферативной активностью обладают кроветворные клетки на 5-й неделе эмбриогенеза. Переключение эритропоэза с примитивного на дефинитивный в конце 8-й и начале 9-й недели сопровождается снижением количества бластных и лимфоцитоподобных клеток, моноцитарно-макрофагального ростка и увеличением количества дефинитивных эритробластов. Клетки-предшественники грануломоноцитопоза, составляющие в популяции 0,06–0,12%, обладают высокой пролиферативной активностью и способны образовывать в культуре на 7-е сут все виды колоний и кластеров, характерных для данного ростка кроветворения.

Хотя экзо- и эндоцеллюлярные криопротекторы в зависимости от концентрации вещества в растворе могут вызывать изменение скорости пролиферации, стимулируя или угнетая образование колоний и кластеров в культуре, направленность дифференцировки при этом сохраняется.

Основными факторами, оказывающими существенное влияние на сохранность клеток-предшественников грануломоноцитопоза, являются вид и концентрация криопротектора, скорость охлаждения до точки кристаллизации, скорость замораживания от -10 до -40 °C.

Процесс переохлаждения, возникающий при замораживании этих клеточных суспензий с медленной скоростью до точки кристаллизации, является одним из важнейших факторов повреждения клеток-предшественников, так как вызывает образование внутриклеточных кристаллов и приводит к гибели 100% КОЕ-ГМ. Для повышения сохранности гемопоэтических клеток эмбриональной печени необходимо инициировать процесс кристаллизации на этапе фазового перехода вода–лед.

Разработанный режим криоконсервирования гемопоэтических клеток эмбриональной печени с проникающим криопротектором и включающий поэтапное замораживание клеток в контейнере с инициатором позволяет сохранять высокие показатели их жизнеспособности.

Результаты проведенных клинических испытаний в 5 клиниках Украины, а также за рубежом свидетельствуют о восстановлении гемопоэза после трансфузии криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека у больных с анемическими и апластическими состояниями различного генеза.

На основании результатов экспериментальных исследований и клинических наблюдений для лечения анемий беременных, вызванных гестационным процессом, предложена трансплантация криоконсервированной эмбриональной печени в криоконсервированной амниотической оболочке (В. И. Грищенко, Г. В. Герасименко, 1986–1988). Трансплантация наиболее целесообразна при тяжелых формах анемий беременных, когда оказывается малоэффективной консервативная гемостимулирующая терапия. Пересадка эмбриональной печени приводит к улучшению общего состояния больных, уменьшению внутриутробной гипоксии плода, стимуляции кроветворения, что выражается в появлении юных форм красного кровяного ростка, повышении содержания гемоглобина, количества тромбоцитов, усилении обменных процессов в эритроцитах.

Совместно с отделами низкотемпературного консервирования и криоморфологии разработан способ криоконсервации овариальной ткани человека и на его основе создан и функционирует криобанк для клинических целей (В. И. Грищенко, Г. С. Лобынцева, И. А. Вотякова, В. Е. Чадаев, Н. Н. Чуб, 1987–1998). В процессе разработки способа получен ряд важных морфологических и культуральных данных, касающихся перестройки овариального трансплантата в процессе его гипотермического хранения. Установлено, что фрагменты яичника человека сохраняют биологическую полноценность в условиях гипотермии (4°C) на протяжении 24 ч.

Инкубация овариальной ткани в течение 30–40 мин с 0,3 моль/л раствором ПЭО-400 и последующее ступенчатое охлаждение до -196°C не влияет на морфологическую целостность, пролиферативную активность и продукцию клетками яичника стероидных гормонов в условиях последующего культивирования (Н. Н. Чуб, 1987). Метод низкотемпературного консервирования обеспечивает сохранение овариальной ткани в биологически полноценном состоянии при -196°C длительное время, что позволяет всесторонне обследовать трансплантационный материал, проводить плановые пересадки в клинике.

Накопленные клинические данные (В. Е. Чадаев, 1985–1988) свидетельствуют о том, что аллотрансплантация фрагментов криоконсервированной овариальной ткани и желтых тел в амниотической оболочке является эффективным методом коррекции генеративной функции женщин при эндокринном бесплодии и не вызывает существенного изменения иммунной системы организма реципиенток (Г. Г. Юрченко, В. Е. Чадаев, 1989).

Учитывая, что диагностика иммунологического бесплодия предполагает исследование сыворотки крови, секретов репродуктивного тракта в динамике, а также то обстоятельство, что все образцы диагностического материала от одной пациентки или пациента необходимо исследовать в одинаковых условиях эксперимента, то есть иметь “парные пробы”, в отделе разработан метод низкотемпературного хранения указанного выше биоматериала (Г. Г. Юрченко, 1986–1990) без применения криопротекторов.

Одним из важных направлений работы отдела является изучение механизма криоповреждения и криозащиты спермы редких, исчезающих и промысловых видов рыб (Е. Ф. Копейка с соавт., 1986–1998). Так, исследовано влияние защитных сред на сперму осетровых рыб при низкотемпературной консервации, изучена динамика изменения клеточного объема и содержания макроэргических фосфатов в спермиях рыб до и после криоконсервации (Б. Б. Дзюба, 1996–1998), изучена зависимость криорезистентности спермиев от интенсивности метаболизма (В. В. Черепанов, 1993–1996).

В результате проведенных исследований определены факторы, влияющие на исходную криоустойчивость спермиев рыб, в частности условия обитания, характер пищи. Выявлены криозащитные свойства некоторых фосфолипидов спермиев рыб. Получены данные, свидетельствующие о возможном влиянии криопротекторов на генетический аппарат спермиев рыб (О. В. Бибенко, 1993). Полученные в эксперименте сравнительные данные о более высоком уровне молекулярного отношения холестерина к фосфолипидам в спермиях морских и пресноводных рыб позволяют сделать вывод о клеточно-мембранной основе устойчивости спермиев морских видов рыб к осмотическим градиентам среды (С. И. Дрокин, 1989–1992).

В результате исследований криобиологии системы репродукции человека и животных, а также изучения влияния факторов криоконсервирования на эмб-

риональные, плодовые клетки и клетки гонад человека сложилась научная школа, итогом работы которой является ряд важных в теоретическом и практическом аспекте данных, описанных выше. На базе этих данных выдвинута (В. И. Грищенко, Е. Я. Панков, Э. И. Обозная-Печенежская, 1984) гипотеза “криообновления”. Она постулирует, что биологические объекты, в частности животные и растительные клетки, пережившие криоконсервирование, образуют качественно новую, функционально более полноценную клеточную популяцию, что связано со свойствами живых организмов переходить при преодолении экстремальных условий существования в более адаптированное состояние путем изменения регуляции клеточного генома. Новое явление состоит в генетически запрограммированной благоприятной перестройке (изменении) метаболизма криоконсервированных биообъектов.

Важные в прикладном плане результаты исследований сотрудники отдела внедряют в практическое здравоохранение и народное хозяйство:

- разработанный метод сверхбыстрого замораживания спермы человека применяется в криобанках, созданных сотрудниками отдела (В. И. Грищенко, Н. А. Лучко, Ю. В. Калугин) на базе Харьковского центра планирования семьи и в ИПКиК НАН Украины;

- на основе результатов исследований криобиологии спермы рыб и разработанных при этом режимов криоконсервации гамет создан первый на Украине криобанк спермы рыб, в котором хранится около 2 000 образцов;

- разработанные методы криоконсервации ткани яичника, плодовых, фетальных тканей и эмбриональных клеток человека позволили создать в межведомственном центре ИПКиК НАН Украины их криобанки для клинических и исследовательских целей.

Существенную помощь в практической реализации результатов научных исследований сотрудников отдела оказывают созданные по их инициативе коммерческие структуры, в частности центр по лечению бесплодия АО “Имплант” и АО “Криоспектр”.

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

Поступила 07.10.98

**А.К.Гулевский, В.В.Рязанцев, А.В.Зинченко, Л.И.Релина,
Е.А.Грищенко**

**СПОСОБНОСТЬ К ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЮ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ
ОНТОГЕНЕЗА БОЛЬШОГО МУЧНОГО ХРУЩАКА *Tenebrio molitor***

Проведены исследования способности к переохлаждению на различных стадиях онтогенеза избегающего замерзания жука *Tenebrio molitor*. Установлено, что все изученные стадии развития (личинки, куколки и имаго) переохлаждаются. Показано, что способность к переохлаждению растет после предварительной акклимации при околонулевых температурах у личинок и имаго. Температура кристаллизации у акклимированных личинок на $7,5^{\circ}\text{C}$ ниже по сравнению с контролем, а у акклимированных имаго — на $3,5^{\circ}\text{C}$.

Насекомые — наиболее многочисленные представители артропод, обладающие способностью выживать при низких температурах. В процессе эволюции у них выработались две основные стратегии выживания: устойчивость к замерзанию и избегание замерзания путем переохлаждения. И для насекомых, устойчивых к замерзанию, и для насекомых, избегающих замерзания, степень переохлаждения жидкостей их тела является важнейшей характеристикой их холодоустойчивости. Для переохлаждающихся насекомых способность к переохлаждению — необходимое условие их выживания зимой.

С целью оценки способности избегающего замерзания большого мучного хрущака из семейства чернотелок *Tenebrio molitor* выживать при низких температурах на различных стадиях онтогенеза нами была исследована степень переохлаждения у личинок 8–10 возрастов, куколок и имаго. Акклимацию насекомых проводили при $5\text{--}7^{\circ}\text{C}$ в течение 2–3 недель. Для исследования фазовых переходов жидкостей тела насекомых был использован метод дифференциальной сканирующей калориметрии. Эксперименты проводились на дифференциальном сканирующем калориметре, разработанном в отделе биофизики ИПКиК НАНУ [2], который согласно классификации Уэндланда [1] можно отнести к приборам типа ДСК (ДТА). Принцип работы такого калориметра основан на регистрации тепловых потоков. Главными элементами калориметра являются ячейки с термочувствительными датчиками, устройства для регулирования температуры по заданной программе нагрева и регистрирующие устройства для усиления и регистрации сигнала теплопоглощения. Два независимых канала позволяют одновременно исследовать два образца. Охлаждение и нагрев проводили со скоростью $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

На рис. 1 представлены в качестве примера типичные термограммы, на которых пики в диапазоне $-7 \div 25^{\circ}\text{C}$ отображают экзотермический процесс кристаллизации, пики в диапазоне $0 \div -3^{\circ}\text{C}$ — эндотермический процесс плавления жидкостей тела неакклимированных и акклимированных личинок, куколок и имаго.

Температурный диапазон, в котором происходит кристаллизация жидкости, сдвинут в область более низких температур (в контрольной выборке температура кристаллизации находится в диапазоне $-7,0 \div -15,5^{\circ}\text{C}$, тогда как у акклимированных личинок эта величина лежит в пределах от $-15,0$ до $-25,5^{\circ}\text{C}$). Средние значения температур кристаллизации для контрольных и акклимированных личинок $(-10,8 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ и $(-18,3 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ соответственно

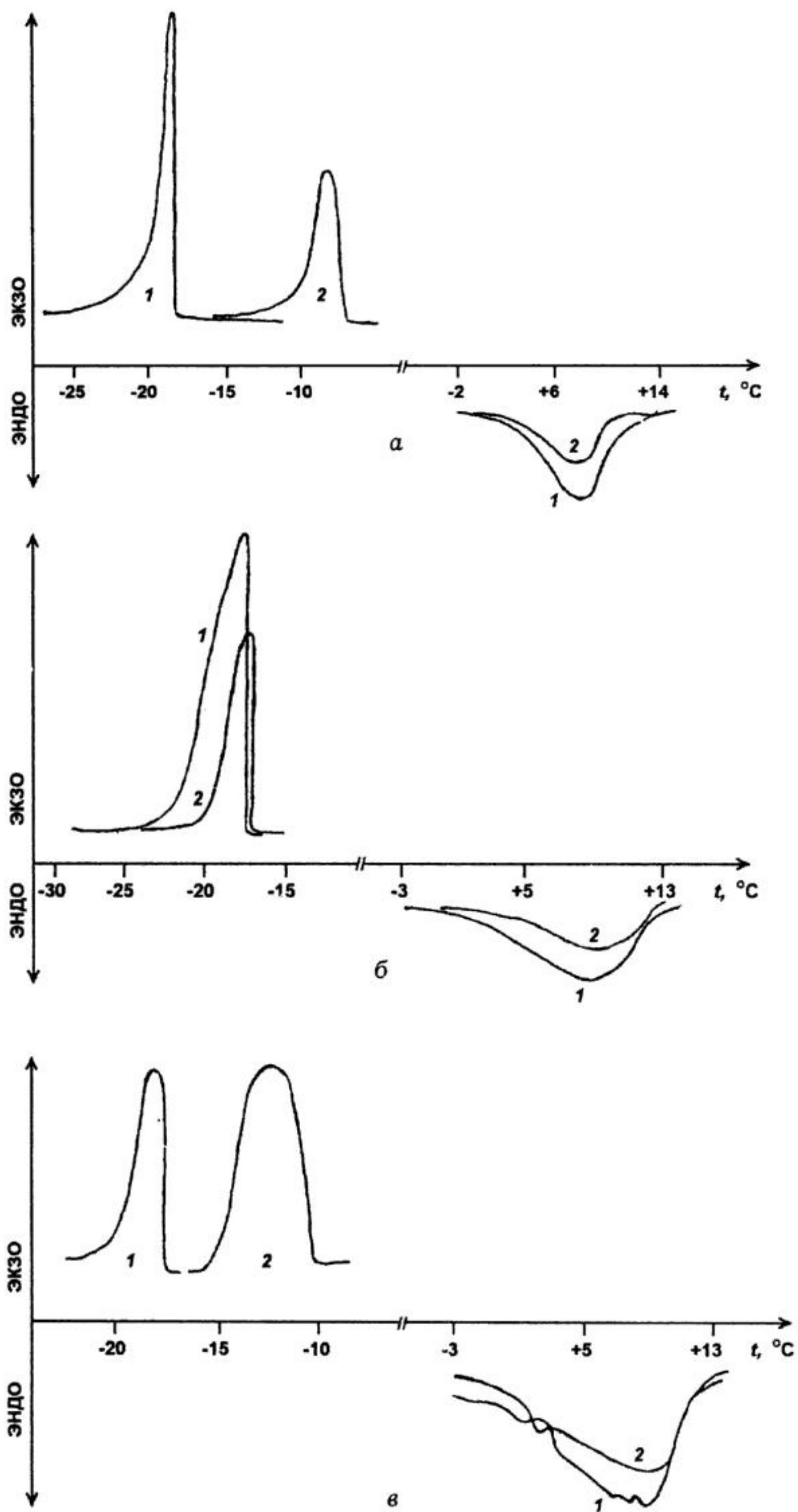


Рис. 1. Термограммы фазовых переходов жидкостей тела большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* на стадиях личинки (*a*), куколки (*б*) и имаго (*в*): 1 — неакклимированные особи, 2 — акклимированные особи

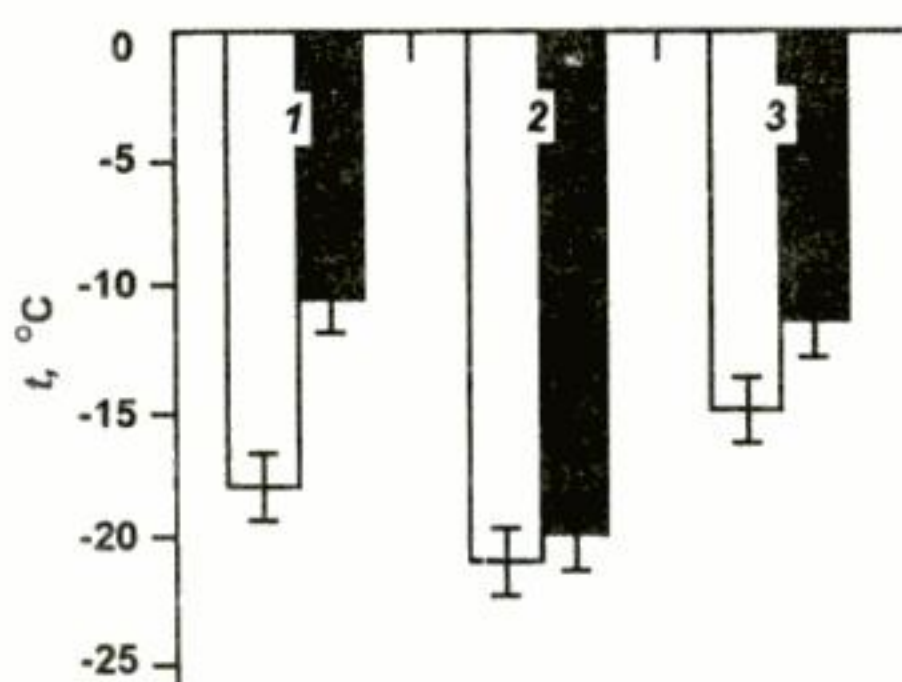


Рис. 2. Температуры кристаллизации большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* на различных стадиях онтогенеза: 1 — личинки, $p < 0,001$, $n = 10$; 2 — куколки, $p > 0,05$, $n = 8$; 3 — имаго, $p < 0,01$, $n = 8$; светлые столбики — акклимированные, темные — неакклимированные

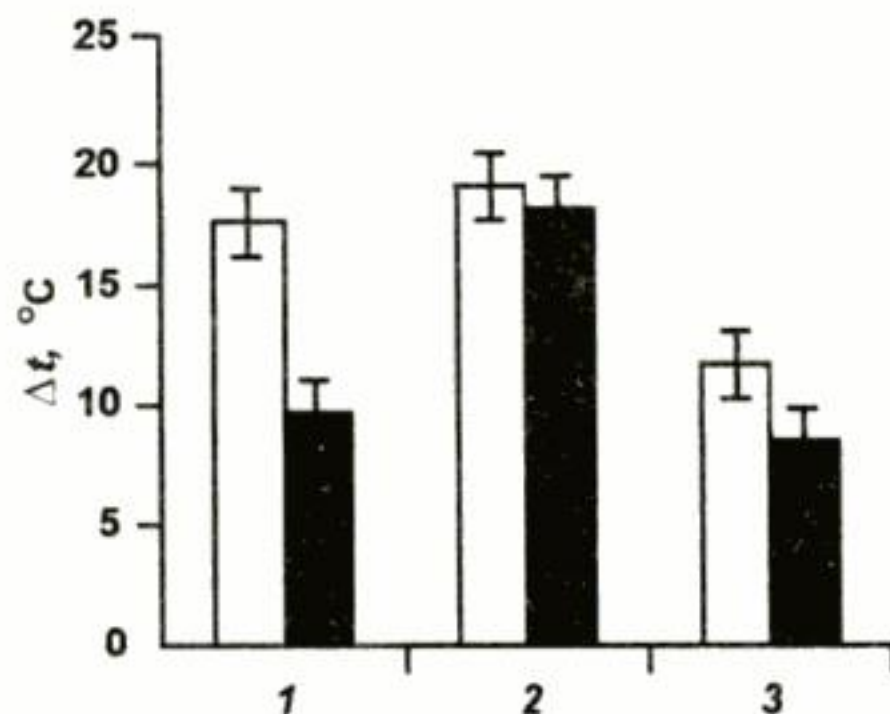


Рис. 3. Термогистерезис на различных стадиях онтогенеза большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*: 1 — личинки, $p < 0,001$, $n = 10$; 2 — куколки, $p > 0,05$, $n = 8$; 3 — имаго, $p < 0,01$, $n = 8$; светлые столбики — акклимированные, темные — неакклимированные

(рис. 2). При исследовании куколок *T. molitor* отмечена тенденция к снижению температуры кристаллизации после 3-недельной акклимации при 5–7 °С. Средняя температура кристаллизации ($-21,3 \pm 0,9$) °С у акклимированных куколок и ($-20,3 \pm 1,1$) °С у неакклимированных (рис. 2). Однако наблюдаемые различия недостоверны. Имаго *T. molitor* обладают определенными механизмами акклимации, так как у акклимированных предварительно при 5–7 °С жуков температура кристаллизации несколько ниже по сравнению с контролем. Диапазон температур, в котором происходит кристаллизация жидкостей тела у акклимированных особей $-13,5 \div -18,0$ °С, тогда как у неакклимированных жуков кристаллизация происходит при более высоких температурах ($-9,0 \div -14,2$ °С). Средние значения температур кристаллизации для акклимированных и неакклимированных жуков составляют ($-15,3 \pm 0,6$) °С и ($-11,8 \pm 0,8$) °С соответственно (рис. 2). В то же время температура плавления жидкостей тела контрольных и акклимированных особей оставалась постоянной.

Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными различных авторов [3, 4]. Известно, что состояние переохлаждения у *T. molitor* обеспечивается термогистерезисными белками, которые, как предполагают, снижая температуру кристаллизации, не влияют на температуру плавления [3, 5, 7]. Определенная нами разница между температурами кристаллизации и плавления, называемая термогистерезисом, на различных стадиях онтогенеза представлена на рис. 3.

Джонстон [4] при изучении переохлаждения у личинок *T. molitor* отмечал сильную вариабельность этого признака по сравнению с аналогичными исследованиями на других видах. Часть особей их популяции после акклимации демонстрировали аномально высокие температуры кристаллизации, например $-1,5$ °С. Авторы предполагают наличие неких факторов, побочным действием которых является инициация кристаллизации воды. Принимая во внимание работы Ксу и Нэвен [8], можно предположить, что этими факторами являются липофорины (переносчики липидов) гемолимфы насекомых, которые по своей структурной организации близки к белкам-нуклеаторам.

Наши экспериментальные данные по переохлаждению тоже характеризуются значительной вариабельностью. Часть акклимированных личинок демонстрировали температуры кристаллизации до величин $-10 \div -11$ °С. Этот факт можно объяснить тем, что *T. molitor*, являясь синантропным видом, под-

вержен менее жесткому давлению естественного отбора по сравнению с другими насекомыми, обитающими в естественных условиях. Далеко не каждое поколение этих жуков сталкивается с низкими температурами, поскольку их жизненный цикл не имеет жесткой связи с сезонными изменениями. Это могло привести к тому, что в популяции сохранились носители генотипов, в которых отсутствует информация для синтеза и накопления факторов, обеспечивающих переохлаждение.

В отдельных случаях (10% выборки) неакклиматизированные особи имели очень низкую температуру кристаллизации ($-20,0 \div -21,0$ °C. Это можно объяснить тем, что часть особей обладает достаточным количеством антифризных белков изначально. В [3, 6, 7] авторы уже высказывали предположение бифункциональности антифризных белков и их участия в регуляции водного баланса.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о наличии определенных механизмов адаптации к низким температурам, увеличивающих способность к переохлаждению, у большого мучного хрущака *T. molitor*, которые, однако, функционируют с различной эффективностью на разных стадиях онтогенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уэндланд У. Термические методы анализа. – Москва: Мир, 1978. – С. 145–260.
2. А. с. 1434341 СССР, МКИ⁴ G01N25/20. Устройство дифференциального термического анализа / А. В. Зинченко, В. Д. Зинченко, Л. П. Подопригора, В. А. Моисеев. – Опубл. 30.10.88, Бюл. № 40.
3. Duman J., Horwarth K. The role of hemolymph proteins in the tolerance of insects // Annu. Rev. Physiol. – 1983. – 45, № 3. – P. 261–270.
4. Jonston S. L., Lee R. E. Jr. Regulation of supercooling and nucleation in a freeze intolerant beetle (*Tenebrio molitor*) // Cryobiology. – 1990. – 27, № 5. – P. 562–568.
5. Patterson J. L., Duman J. G. The role of the thermal hysteresis factor in *Tenebrio molitor* larvae // J. Exp. Biol. – 1978. – 74, № 1. – P. 37–45.
6. Ramsay J. A. The rectal complex of the mealworm *Tenebrio molitor*, L. (Coleoptera, Tenebrionidae) // Philos. Trans. R. Soc. London, B. – 1964. – 248, № 4. – P. 279–314.
7. Shneppenheim R., Theede H. Isolation and characterization of freezing point depressing peptides from larvae of *Tenebrio molitor* // Comp. Biochem. Physiol. – 1980. – 67B, № 11. – P. 561–568.
8. Xu Lei, Neven L. G., Duman J. G. Hormonal control of hemolymph lipoprotein ice nucleators in overwintering freeze-susceptible larvae of the stag beetle *Cerichus piceus*: adipokinetic hormone and juvenile hormone // J. Comp. Physiol. – 1990. – B160, № 1. – P. 51–59.

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

Поступила 11.05.98

О. К. ГУЛЕВСЬКИЙ, В. В. РЯЗАНЦЕВ, О. В. ЗИНЧЕНКО, Л. І. РЕЛІНА, О. А. ГРИЩЕНКОВА

ЗДАТНІСТЬ ДО ПЕРЕОХОЛОДЖЕННЯ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ РОЗВИТКУ ВЕЛИКОГО БОРОНЯШНОГО ХРУЩАКА *TENEBRIO MOLITOR*

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Проведені дослідження здатності до переохолодження на різних стадіях розвитку унікального заморожування жука *Tenebrio molitor*. Встановлено, що усі досліджені стадії розвитку (лічинки, лялечки та імаго) переохолоджуються. Показано, що здатність до переохолодження зростає після попередньої акліматії при навколонульових температурах у лічинок та імаго. Температура кристалізації у акліматованих лічинок на 7,5 °C нижче в порівнянні з контролем, а у акліматованих імаго — на 3,5 °C.

A. K. GULEVSKY, V. V. RYAZANTSEV, A. V. ZINCHENKO, L. I. RELINA, Y. A. GRISCHENKOVA THE ABILITY TO SUPERCOOLING AT VARIOUS STAGES OF ONTOGENESIS OF A *TENEBRIO MOLITOR* BEETLE

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

The authors investigated the ability to supercooling at various stages of ontogenesis of a *Tenebrio molitor* freeze-avoiding beetle. It was found that all the studied stages of development (larva, chrysalis, imago) are getting supercooled. The ability to supercooling was shown to increase following pre-acclimation at subzero temperatures in the larvae and imagos. The temperature of crystallization in the acclimated larvae is by 7.5 °C lower as compared with control, and in the acclimated imagos — by 3.5 °C.

**В.И.Грищенко, С.Х.Межидов, О.А.Нардид, Е.Д.Розанова,
В.А.Моисеев, Л.Г.Кулешова**

ОБ ЭКСТИНКЦИИ ХРОМОФОРНОЙ ГРУППЫ БЕЛКА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Исследовано влияние концентрации эритроцитов и состава среды, в которой они находятся, на экстинкцию (A) метгемоглобина, находящегося во внеклеточной среде. Установлено, что при увеличении концентрации эритроцитов A метгемоглобина увеличивается. При помещении эритроцитов в гипертонические растворы натрия хлорида происходит дальнейшее увеличение экстинкции (δA) метгемоглобина, в то время как в растворах 1,2-пропандиола, глицерина и ПВП-12 600 она начинает уменьшаться с определенной их концентрацией.

Часто приходится проводить исследования механизмов криповреждения и криозащиты суспензии клеток, когда часть клеток повреждена. При спектрофотометрическом исследовании таких систем спектр является суперпозицией спектров вне- и внутриклеточных компонентов клеток. Поэтому важно знать, является ли в таком случае спектр простой суммой спектров внутриклеточных компонентов и компонентов клеток, которые оказались во внеклеточном растворе в результате разрушения клеток.

Для выяснения этого вопроса нами проведено исследование экстинкции (A) содержащего хромофор белка в присутствии клеток. Для исследования выбран белок, содержащий хромофор, что позволяет проводить исследование в широком диапазоне длин волн. Кроме того, изучена зависимость A белка, содержащего хромофор, в присутствии клеток от концентрации различных веществ.

Исследования проведены на эритроцитах и гемоглобине, полученном из них. Для исследования использованы эритроциты донорской крови человека 3–4 сут хранения при 4 °С, которые перед экспериментом отмывали 3 раза физиологическим раствором натрия хлорида, приготовленным на натрий-фосфатном буфере $pH = 7,2$. Образцы центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 15 мин. Количество клеток определяли путем подсчета клеток в камере Горяева по известной методике после разведения в 500 раз [3].

Гемоглобин получали разрушением эритроцитов дистиллированной водой, которая содержала также натрий-фосфатный буфер, $pH = 7,2$. После разрушения эритроцитов к гемолизату добавляли раствор натрия хлорида 4 моль/л до его конечной концентрации 0,15 моль/л, центрифугировали для осаждения стромы при 3 000 об/мин в течение 15 мин и отбирали надосажок. Из гемоглобина получали также метгемоглобин путем добавления ферроцианида калия. При этом концентрация ферроцианида калия была 0,10 моль/л и по осмолярности соответствовала осмолярности физиологического раствора натрия хлорида. Конечная концентрация ферроцианида калия была $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Так как при высоких концентрациях клеток происходит сильное рассеяние света, что не позволяет проводить исследования на одной кювете, то нами применен метод дифференциальной спектрофотометрии. Для получения одинаковой концентрации клеток в обеих кюветах эритроциты сначала разводили до нужной их концентрации и затем делили на 2 образца. После этого добавляли необходимое количество гемоглобина (метгемоглобина), а в другую кювету такой же объем соответствующего раствора. Результаты экспериментов обработаны статистически с учетом коэффициентов Стьюдента для $n \geq 5$ при доверительной вероятности $P = 0,95$.

На рис. 1 представлены спектры метгемоглобина в исходном растворе (2), в присутствии эритроцитов (1) и в надосадке после осаждения эритроцитов (3). Видно, что экстинкция метгемоглобина увеличивается в присутствии эритроцитов. Причинами такого увеличения могут быть:

1 — проникновение ферроцианида калия в эритроциты и образование там дополнительно метгемоглобина;

2 — оптические эффекты, связанные с различными формами клеток в силу различий сред (наличие метгемоглобина в одной из кювет);

3 — передача энергии метгемоглобином компонентам клетки без или путем излучения [2].

Для выяснения возможности увеличения экстинкции метгемоглобина за счет его образования внутри клетки из-за проникновения в них ферроцианида калия последние были отмыты физиологическим раствором натрия хлорида, содержащим ферроцианид калия и натрий-фосфатный буфер, $pH = 7,2$. После отмывки спектр метгемоглобина в суспензии эритроцитов отсутствовал. Кроме того, эксперимент с чистым метгемоглобином, полученным путем хроматографирования, показал, что экстинкция метгемоглобина увеличивается в присутствии эритроцитов.

Изучение формы клеток в обеих кюветах показало, что она у разных доноров меняется от эхиноцитов до сфероцитов. Причем в кювете с метгемоглобином эритроциты в зависимости от донора имели форму то сфероцитов, то эхиноцитов, а в противоположной кювете, наоборот, что указывает на отсутствие связи с формой клетки.

Эксперименты, при проведении которых кюветы, содержащие метгемоглобин, помещали то спереди, то сзади по отношению к кювете с суспензией эритроцитов (по отношению к источнику света), показали, что экстинкция метгемоглобина не увеличивается. Это указывает на связь увеличения экстинкции именно с наличием эритроцитов в среде, где находится метгемоглобин. Таким образом, надо полагать, что увеличение экстинкции метгемоглобина связано с передачей энергии метгемоглобином компонентам клетки без или путем излучения.

Исследование зависимости экстинкции (δA) метгемоглобина от концентрации клеток для различных доноров показало (рис. 2), что она у разных доноров носит линейный характер, и при уменьшении концентрации клеток до определенного значения экстинкция метгемоглобина соответствует его величине в физиологическом растворе без эритроцитов. Результаты экспериментов на крови 2 различных доноров хорошо согласуются между собой (рис. 2). То же можно сказать о пуповинной крови различных доноров (рис. 3). Однако при одинаковой экстинкции метгемоглобина в растворе, полученного из крови взрослого донора и пуповинной крови плода ($0,294 \pm 0,007$ и $0,286 \pm 0,006$ ед.опт.пл. соответственно), экстинкция была больше в присутствии клеток пуповинной крови ($0,143 \pm 0,006$ и $0,192 \pm 0,013$ ед.опт.пл. соответственно).

Исследование зависимости δA от концентрации натрия хлорида до 1,2 моль/л показало, что она увеличивается с увеличением концентрации

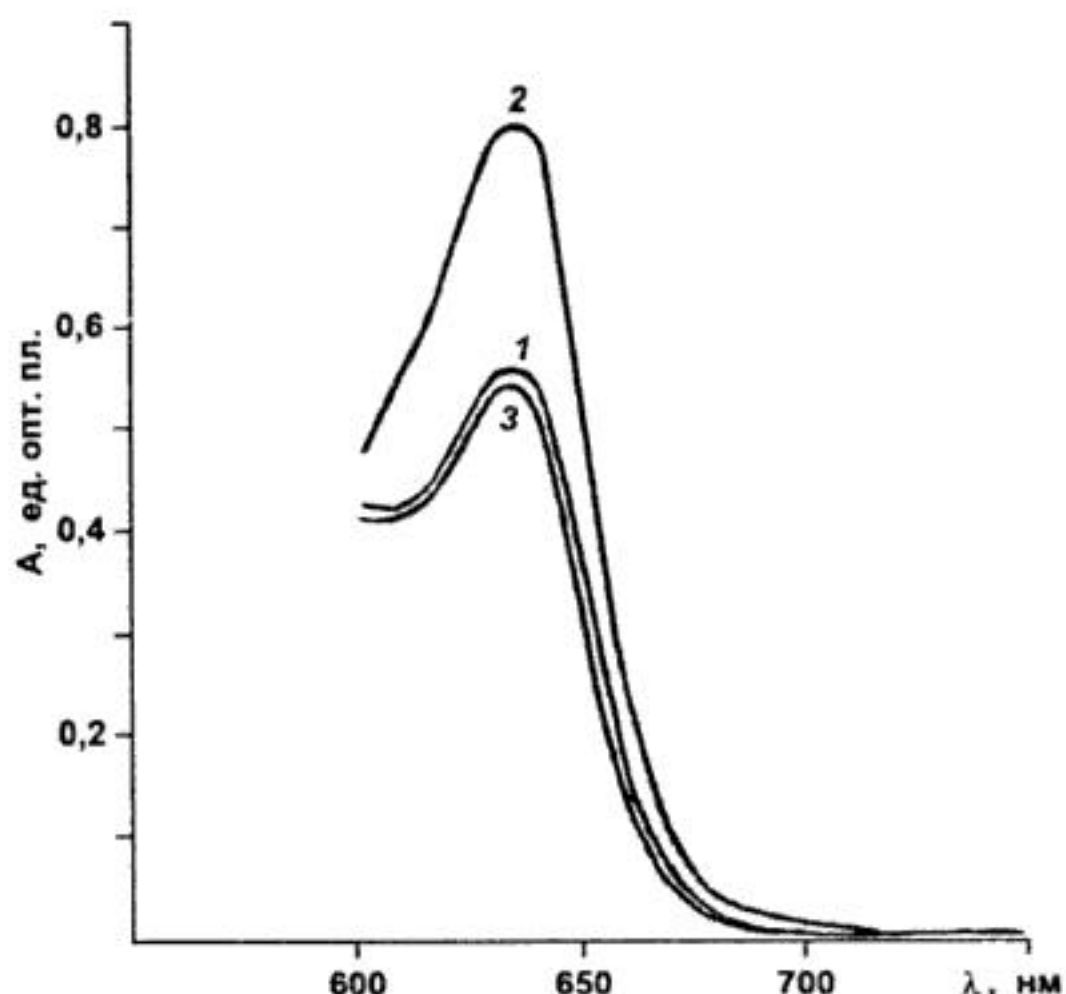


Рис. 1. Экстинкция хромофорной группы белка в физиологическом растворе натрия хлорида, содержащем ферроцианид калия $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л и натрий-фосфатный буфер 5 ммоль/л, $pH = 7,2$: 1 — в исходном растворе до добавления клеток, 2 — в присутствии клеток в исходном растворе, 3 — в надосадке после удаления клеток путем центрифугирования

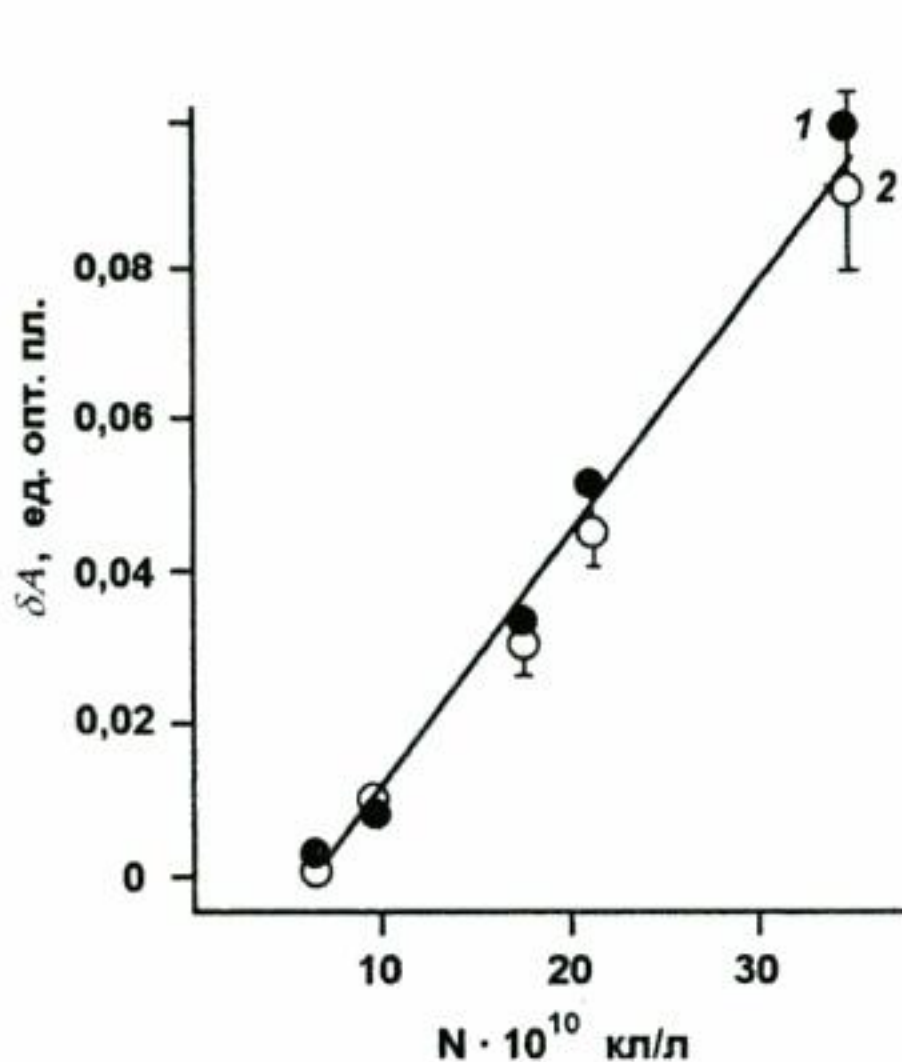


Рис. 2. Зависимость экстинкции (δA) от концентрации эритроцитов: 1 — донор I, 2 — донор II

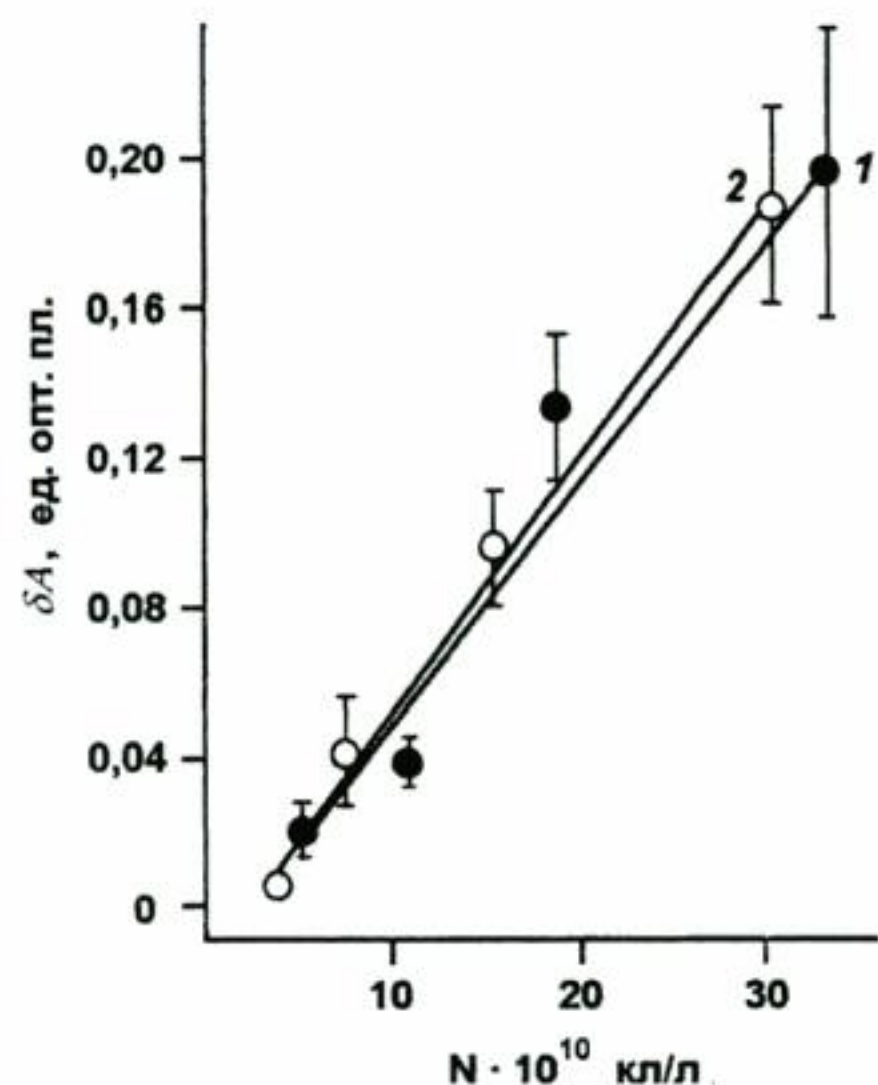


Рис. 3. Зависимость экстинкции (δA) от концентрации эритроцитов пуповинной крови плода человека: 1 — донор I, 2 — донор II

натрия хлорида (табл. 1). Из табл. 1 видно, что повышение концентрации натрия хлорида до 0,40 моль/л приводит к увеличению экстинкции (δA) более чем в 3 раза. У другого донора повышение концентрации натрия хлорида до 0,40 моль/л привело к увеличению экстинкции (δA) метгемоглобина почти в 2 раза.

Т а б л и ц а 1

Зависимость экстинкции метгемоглобина (δA) от концентрации натрия хлорида в присутствии эритроцитов

Натрия хлорид, моль/л	0,15	0,40	0,80	1,20
δA , ед. опт. пл.	$0,050 \pm 0,024$	$0,168 \pm 0,034$	$0,188 \pm 0,025$	$0,200 \pm 0,044$

Дальнейшее увеличение экстинкции метгемоглобина, по-видимому, связано с сжатием двойного электрического слоя мембраны, уменьшением расстояния между донором (молекула метгемоглобина) и акцептором (компонента мембраны), что приводит к увеличению эффективности передачи энергии и соответственно к дальнейшему увеличению экстинкции [2]. Если это предположение верно, то наличие в растворе криопротекторов должно привести к уменьшению δA .

Исследование влияния 1,2-пропандиола (1,2-ПД) показало, что экстинкция метгемоглобина (δA) постепенно уменьшается и при его концентрации 30% это уменьшение составляет $34 \pm 6,6\%$ (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Зависимость экстинкции метгемоглобина (δA) от концентрации 1,2-ПД в присутствии эритроцитов

1,2-ПД, %	0	5	10	20	30
δA , ед. опт. пл.	$0,150 \pm 0,013$	$0,146 \pm 0,010$	$0,139 \pm 0,010$	$0,121 \pm 0,008$	$0,099 \pm 0,010$

Обращает на себя внимание тот факт, что достоверные отличия от данных для физиологического раствора натрия хлорида появляются при концентрации 1,2-ПД 20% и более. Это может быть связано как с влиянием 1,2-пропандиола непосредственно на метгемоглобин и акцептор в составе мембраны, так

и с увеличением расстояния между ними за счет образования 1,2-ПД и водой сольватной оболочки вокруг донора и акцептора при таких его концентрациях. Известно, что свойства растворов криопротекторов претерпевают существенные изменения при концентрациях криопротекторов выше 10% [1].

Аналогичное уменьшение экстинкции (δA) отмечается и в присутствии глицерина. Однако уже при 20%-й концентрации глицерина отмечается такое же уменьшение δA ($29,8 \pm 3,3\%$), как и при 30%-й концентрации 1,2-ПД. Причиной более сильного влияния глицерина может быть влияние вязкости раствора, которая больше у растворов глицерина.

В 5-процентном растворе ПВП-12 600 ± 2 600 уменьшение экстинкции метгемоглобина (δA) было $32,3 \pm 8,3\%$. Такой эффект малых концентраций ПВП-12 600 можно объяснить его адсорбцией на поверхности эритроцитов, увеличением толщины сольватной оболочки мембраны, с одной стороны, а с другой, — возникновением стерических препятствий для взаимодействия метгемоглобина с акцептором и донором или специфическим взаимодействием ПВП-12 600 с акцептором и донором. При более высоких концентрациях ПВП-12 600 происходило образование метгемоглобина в самих эритроцитах.

Следует отметить, что отсутствовало поглощение в области полосы Соре, хотя концентрация клеток была уменьшена так, чтобы экстинкция метгемоглобина была такой же, как в надосадке (без клеток). Возможно, это связано с влиянием ансамбля клеток на метгемоглобин.

Таким образом, проведенные исследования дают основание для вывода, что в присутствии эритроцитов происходит увеличение экстинкции метгемоглобина, которое связано с передачей энергии компонентам клеточной мембраны. Увеличение концентрации натрия хлорида в присутствии клеток приводит к дальнейшему увеличению экстинкции, в то время как увеличение концентрации 1,2-ПД, глицерина и ПВП-12 600 приводит к ее уменьшению, начиная с определенной концентрации этих криопротекторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкар Н. С. Криоконсерванты. — Киев: Наук. думка, 1979. — 198 с.
2. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. — М.: Мир, 1986. — 496 с.
3. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Кост. Е. А. — М.: Медицина, 1975. — 383 с.

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

Поступила 20.07.98

В. І. ГРИЩЕНКО, С. Х. МЕЖИДОВ, О. А. НАРДІД, О. Д. РОЗАНОВА, В. О. МОЇСЄЄВ,
Л. Г. КУЛЕШОВА

ПРО ЕКСТИНКЦІЮ ХРОМОФОРНОЇ ГРУПИ БІЛКА В БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ

Досліджено вплив концентрації еритроцитів та складу середовища, в якому вони знаходяться, на екстинкцію (A) метгемоглобіну, який перебував у внутриклітинному середовищі. Встановлено, що при підвищенні концентрації еритроцитів A метгемоглобіну збільшується. При вміщенні еритроцитів у гіпертонічні розчини натрію хлориду відбувається подальше збільшення екстинкції (δA) метгемоглобіну, тоді як у розчинах 1,2-пропандіолу, гліцерину і ПВП-12 600 вона починає зменшуватися з визначеної їх концентрації.

V.I.GRISHCHENKO, S.KH.MEZHIDOV, O.A.NARDID, E.D.ROZANOVA, V.A.MOISEYEV,
L.G.KULESHOVA

ON THE EXTINCTION OF A CHROMOPHORE GROUP OF THE PROTEIN IN BIOLOGICAL SYSTEMS

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

The effect of the concentration of red cells and the composition of the medium, in which they stay, on the extinction (A) of hemoglobin in the intercellular medium was studied. A rise in the concentration of red cells was found to increase the A of methemoglobin. A transfer of red cells into the hypertonic solutions of sodium chloride triggers further increase in the extinction (δA) of methemoglobin, while in the solutions of 1,2-propanediol, glycerol and PVP-12 600 it is reduced starting from a certain concentration.

**Е.В.Кудокоцева, В.В.Рамазанов, Л.Н.Тимченко, А.Ю.Семенченко,
Ю.В.Щегленко, В.А.Бондаренко**

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАТОРОВ НА СТРУКТУРНЫЙ СПЕКТР БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Методом электрофореза изучалось влияние модификаторов белка полосы 3 (ИАА, N-ЭМИ, ПХМБ) и белка полосы 4.1 (гемин) на структурный спектр белков цитоскелета эритроцитов. Высказывается предположение, что действие сульфгидрильных реагентов, в отличие от гемина, усиливает ассоциацию компонентов цитоскелета с мембраной.

Одной из причин, приводящих к повреждению эритроцитов при замораживании, является нарушение структуры цитоскелет-бислой вследствие нарастания осмотического градиента на мембране [1]. Изменение осмотического состояния клеток после их переноса в гипертоническую среду контролируется, прежде всего, потоками воды и соответствующим перераспределением ионов хлора. Эти процессы имеют общую структурную основу, представленную белком полосы 3, который обеспечивает контроль движения воды и хлора через мембрану эритроцитов. Развитие чувствительности эритроцитов к холодовому и гипертоническому шоку должно определяться основными специфическими контактами цитоскелета с мембраной. Использование реактивов (модификаторов), способных дифференциально модифицировать указанные контакты, позволит приблизиться к пониманию механизмов холодовой и осмогической чувствительности клеток. Прежде всего такой подход должен выявить основные структурные звенья, ответственные за развитие холодового и гипертонического шока эритроцитов. Решение этой задачи позволит более целенаправленно осуществлять подбор химических соединений, способных оказывать криозащитное действие. С учетом этого целью данной работы было изучение особенностей модификации белков цитоскелета (белки полосы 3 и 4.1) специфическими реагентами: йодацетамидом (ИАА), параклормеркурийбензоатом (ПХМБ), N-этилмалеимидом (N-ЭМИ), геминем.

В опытах использовали донорскую кровь II-й группы. Осадок эритроцитов трижды отмывали пятикратным объемом раствора, содержащего 150 ммоль/л NaCl и 20 ммоль/л Na-фосфатного буфера ($pH = 7,4$). Для обработки модификаторами цитоскелета эритроциты с 20%-м гематокритом суспендировали в среде, содержащей: KCl — 90, NaCl — 45, фосфат — 10 (в ммоль/л, $pH = 7,4$). Первая пробирка являлась контрольной. Эритроциты во второй пробирке обрабатывали ИАА (концентрация 40 ммоль/л) и инкубировали 60 мин при 37 °C; эритроциты в третьей пробирке обрабатывали N-ЭМИ (концентрация 40 ммоль/л) в течение 60 мин при 37 °C, в четвертой пробирке — ПХМБ (концентрация 1 ммоль/л) в течение 60 мин при 37 °C. В пятой пробирке обработку эритроцитов ПХМБ производили после предварительной обработки ИАА, в шестую пробирку добавляли гемин (концентрация 300 мкмоль/л) и инкубировали 10 мин при 37 °C.

Для получения мембранных белков эритроциты лизировали на ледяной бане в растворе, содержащем: NaCl — 7, фосфат — 5, фенилметилсульфонил флуорид — 0,3, ЭДТА — 1 ммоль/л в течение 10 мин. Лизат центрифугировали при 13 000 об/мин 15 мин при 2 °C. Осадок мембран отмывали лизирующим буфером. Электрофорез проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) [2]. В работе были использованы специфические модификаторы, которые способны взаимодействовать с SH-группами белка полосы 3: ИАА, ПХМБ, N-

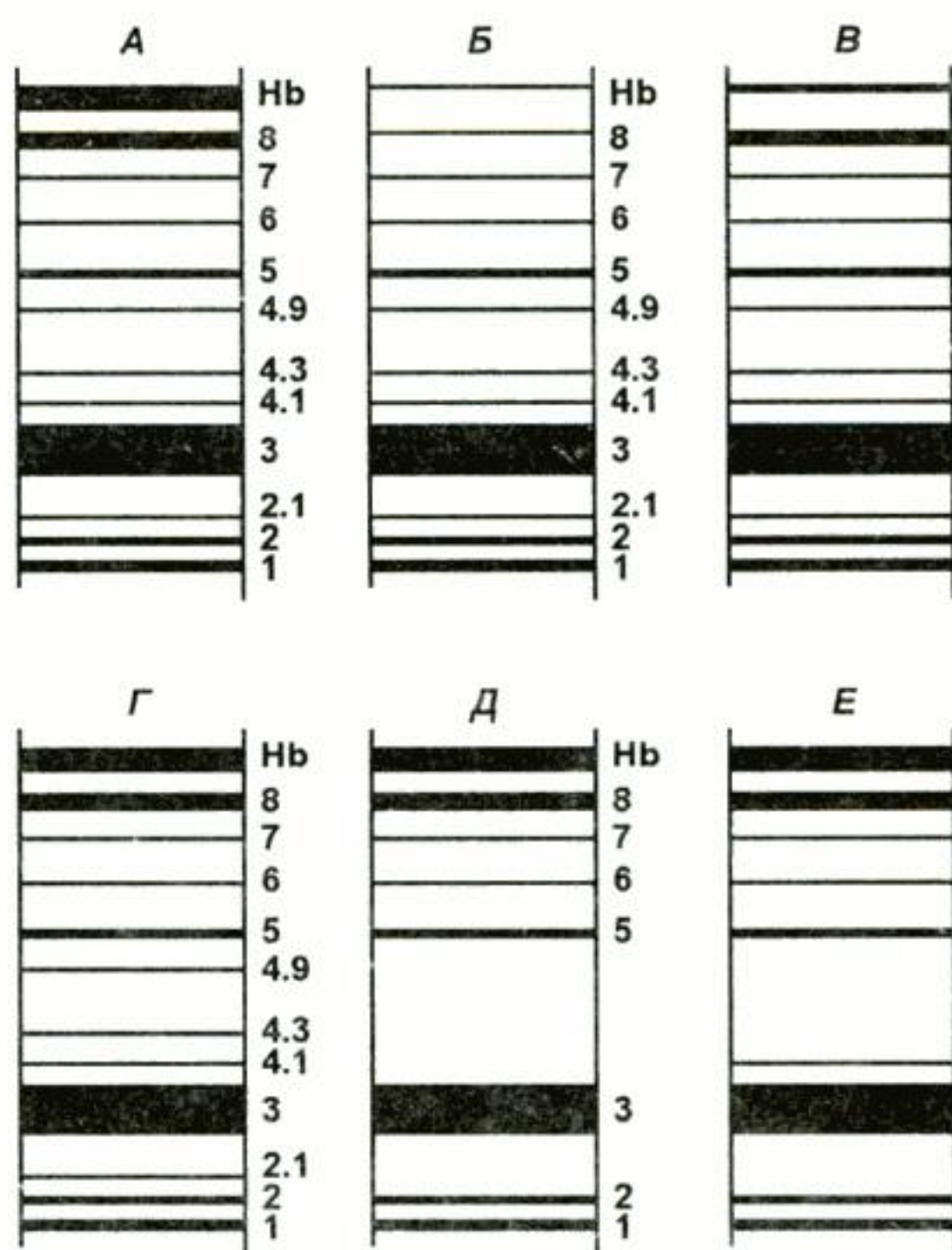
ЭМИ и модификатор белка полосы 4.1 — гемин. В результате анализа электрофореграмм были прослежены изменения в белковом спектре мембран при этих воздействиях. ИАА — сульфгидрильный ацетилирующий реагент, который блокирует цитоплазматический пул SH-групп и до 50% SH-групп в мембране, но не взаимодействует с ПХМБ-специфической SH-группой, локализованной на 17 кДа химотриптическом фрагменте белка полосы 3, который локализуется в липидном бислое мембраны [7].

Результаты электрофоретического анализа свидетельствуют о том, что белковый спектр мембран эритроцитов, обработанных ИАА, качественно не меняется (не происходит выпадения или образования новых полос (рис., Б)). Количественный состав полос визуально изменяется. Происходит значительное ослабление полосы гемоглобина и ослабление полосы 8.

Это объясняется уменьшением связи гемоглобина с белками цитоскелета. При блокировании мембранных SH-групп и SH-групп глутатиона снижается способность гемоглобина удерживаться в мембране.

Механизм действия N-ЭМИ сходен с действием ИАА. Он также является сульфгидрильным реагентом, который блокирует 80% SH-групп мембраны [10]. При исследовании электрофореза мембранных белков после обработки N-ЭМИ существенных качественных и количественных изменений не выявлено. Однако по аналогии с ИАА (что объясняется сходным механизмом действия) заметно ослабление полосы гемоглобина. Но это изменение по сравнению с контролем не настолько значительно, как при воздействии ИАА (рис., В). Для выяснения структурной основы механизма, контролирующего развитие холодового и гипертонического шока в условиях осмотического стресса, нами была использована обработка эритроцитов SH-реагентом ПХМБ, действие которого в определенных условиях приводит к нарушению связи мембрана-цитоскелет в области белка полосы 3-анкирин-спектрин. Действие указанного реагента проявляется при связывании его ковалентно с SH-группой, локализованной на 17 кДа гидрофобном фрагменте белка полосы 3.

ПХМБ, являясь по природе своей заряженной молекулой, при действии на эритроциты вызывает нарушение структурных взаимодействий белков в мембране этих клеток [6]. Однако без предобработки ИАА, который блокирует



Электрофореграмма мембранных белков эритроцитов после обработки модификаторами: А — контроль, Б — ИАА, В — N-ЭМИ, Г — ПХМБ, Д — ИАА+ПХМБ, Е — гемин; 1, 2 — спектрины, 2.1 — анкирин, 3 — белок полосы 3, 4.1 — белок полосы 4.1, 4.3 — белок полосы 4.3, 4.9 — белок полосы 4.9, 5 — актин, 6 — белок полосы 6, 7 — белок полосы 7 (тропомиозин), 8 — белок полосы 8, Hb — гемоглобин

цитоплазматический пул и 50% мембранных белков, ПХМБ не достигает ПХМБ-специфической SH-группы, а расходуется на связывание с другими мембранными SH-группами (с SH-группами белка полосы 3 в том числе). Поэтому в данном случае полный эффект действия меркуриата на белок не прослеживается. По результатам электрофореза особых изменений в белковом спектре при действии ПХМБ не наблюдается, однако заметно небольшое уменьшение белка полосы 4.1 (рис., Г).

Для повышения эффективности действия ПХМБ эритроциты были предобработаны сульфгидрильным реагентом ИАА, который блокирует цитоплазматический пул SH-групп и до 50% SH-групп в мембране (кроме ПХМБ-специфической группы) [5]. В ходе эксперимента вследствие распада цитоскелета при действии ПХМБ на предобработанные ИАА клетки происходит значительное изменение электрофореграммы (рис., Д). Наблюдается полное или частичное отсутствие ряда полос. Происходит потеря белка полос 4.1 и 4.3, полосы 4.9, потеря анкирина — белка полосы 2.1, связывающего спектрин с белком полосы 3. Происходит также частичная потеря белка полосы 7. Следовательно, ПХМБ с ИАА оказывают большое повреждающее действие на мембрану эритроцитов, полностью нарушая структуру и функцию.

Изменение характера ассоциации цитоскелета с липидным бислоем мембраны во многом определяет направленность изменения формы клетки. Данный процесс может контролироваться на участке связи цитоскелет–анкирин–белок полосы 3; он может нарушаться вследствие модификации связи белка полосы 4.1 в цитоскелете. Термотропные структурные преобразования в мембранах эритроцитов, происходящие при температурах 6,5–9,5 °С, связаны с изменениями структурного взаимодействия белка полосы 4.1 в мембране. В то же время трансформация в сфероциты эритроцитов, инкубируемых в гипертонических средах, также происходит в указанной области температур [3]. Можно предположить, что белок полосы 4.1, включенный в мембранный комплекс цитоскелет–бислой, является одним из сайтов, воздействие на который косвенно или непосредственно приводит к ингибированию развития холодовой и осмотической чувствительности эритроцитов.

В нашей работе был использован специфический модификатор гемин, который нарушает взаимодействие белков цитоскелета между собой. Гемин свободно проникает через липидный бислой мембраны эритроцитов, связывается с белком полос 4.1, актином, спектринном [9]. Учитывая то, что первичным сайтом взаимодействия гемина с цитоскелетом является белок полосы 4.1, обработка клеток данным реагентом позволяет модифицировать участки, в которых осуществляется прикрепление цитоскелета к бислою, посредством указанного белка без значительного гемолиза эритроцитов [8].

После обработки эритроцитов геминном электрофорез теней эритроцитов в ПААГ указывает на изменение количественного состава белков (рис., Е). Происходит полная потеря белка полос 2.1 (анкирина), 4.3, 4.9 и 6. Диссоциирует из мембраны значительное количество белка полосы 7, включающей белок, связанный с белками цитоскелета и по своим характеристикам соответствующий тропомиозину. Диссоциация указанного белка из цитоскелета при получении теней эритроцитов приводит к значительному ингибированию транспорта мочевины и к потере способности ПХМБ ингибировать осмотический отток воды [4]. В то же время не обнаруживается значительной потери белка полосы 4.1 из мембраны после обработки эритроцитов геминном (рис., Е). Это можно объяснить тем, что данный белок также связывается на внутренней поверхности мембраны с гликофорином С, гликофорином А, фос-

фатидилсерином и белком полосы 3. Электрофоретический анализ на выявил потери белка полосы 4.1 в мембранах, однако разрыв связи на уровне белок 4.1–спектрин также должен привести к ограничению регуляторного влияния цитоскелета на липидный бислой мембраны в условиях осмотического стресса.

Таким образом, модификация эритроцитов специфическими реагентами (N-ЭМИ, ИАА, ПХМБ, гемин) приводит к нарушению белковых взаимодействий в цитоскелете, а следовательно, к изменению белкового спектра при электрофорезе. Особенно значительные изменения происходят при обработке ПХМБ+ИАА (модификация белка полосы 3) и гемин (модификация белка полосы 4.1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М. Роль белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток // Криобиология. – 1990. – № 3. – С. 3–12.
2. Gorg A., Postel W., Weser J. et. al. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of urinary proteins // Science tools. – 1985. – 32, № 1. – P. 5–9.
3. Minetti M., Ceccarini M., Stasi A. M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // J. Cell. Biochem. – 1984. – 25, № 2. – P. 61–72.
4. Ojcius D. M., Toon M. R., Solomon A. K. Is intact cytoskeleton required for red cell urea and water transport // Biochim. Biophys. Acta. – 1988. – 944. – P. 19–28.
5. Plishker G. A. Iodoacetic acid inhibition of calcium-dependent potassium efflux in red blood cells // Am. J. Physiol. – 1985. – 248. – P. c419–c424.
6. Ralston G. B., Crisp E. A. The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta. – 1981. – 649. – P. 98–104.
7. Ramjeesingh M., Gaarn A., Rothstein A. The location of the three cysteine residues in the primary structure of the intrinsic segments of band 3 proteins, and implications concerning the arrangement of band 3 protein in the bilayer // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – 729. – P. 150–160.
8. Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // Biochem Internat. – 1986. – 13, № 3. – P. 467–477.
9. Solar I., Shaklai N. Association of hemin with protein 4.1 as compared to spectrin and actin // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – 983. – P. 199–204.
10. Toon M. R., Solomon A. K. Control of red cell urea and water permeability by sulfhydryl reagents // Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – 860. – P. 361–375.

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

Поступила 30.01.98

О. В. КУДОКОЦЕВА, В. В. РАМАЗАНОВ, Л. М. ТИМЧЕНКО, О. Ю. СЕМЕНЧЕНКО,
Ю. В. ЩЕГЛЕНКО, В. А. БОНДАРЕНКО

ВПЛИВ МОДИФІКАТОРІВ НА СТРУКТУРНИЙ СПЕКТР БІЛКІВ ЦИТОСКЕЛЕТУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

За допомогою методу електрофорезу вивчався вплив модифікаторів білка полоси 3 (ІАА, N-ЕМІ, ПХМБ) та білка полоси 4.1 (гемін) на структурний спектр білків цитоскелету еритроцитів. Дія сульфгідрильних реагентів, на відміну від геміну, посилює асоціацію компонентів цитоскелету з мембраною.

E. V. KUDOKOTSEVA, V. V. RAMAZANOV, L. N. TIMCHENKO, A. YU. SEMENCHENKO,
YU. V. SCHENGLLENKO, V. A. BONDARENKO

ACTION OF MODIFIATORS ON THE STRUCTURAL SPECTRUM OF THE CYTOSKELETAL PROTEINS OF HUMAN RED CELLS

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

A method of electrophoresis was applied for studying the action of modifiers of a band 3 protein (IAA, N-EMI, PCMB) and band 4.1 protein (hemin) on the structural spectrum of the red cell cytoskeletal proteins. It is speculated that the action of sulfhydryl reagents, in contrast to hemine, increases association of the cytoskeletal components with the membrane.

С.В.Пателарос

ВЛИЯНИЕ МОНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ Na^+ , K^+ , H^+ НА РАЗВИТИЕ ОСМОТИЧЕСКИХ МЕМБРАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЭРИТРОЦИТОВ, АКТИВИРУЕМЫХ ИОНАМИ Ca^{++} И Zn^{++}

Установлено, что катионы Ca^{++} и Zn^{++} способны активировать гемолиз регидратированных эритроцитов в результате связывания с двумя активирующими сайтами, входящими в структуру мембранных повреждений, специфичных для этих катионов. Эти компоненты не наблюдаются в случае лизиса, индуцированного экзогенными агентами. При гемолизе регидратированных клеток экранирующий эффект катионов Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} имеет место только на этапе предварительной дегидратации и приводит к блокированию лизиса в изотонической среде. Данный эффект устраняется при наличии катионов в среде регидратации. Ионы H^+ способны ингибировать этот тип лизиса лишь при больших концентрациях и не взаимодействует с сайтами, усиливающими мембранные повреждения.

Известно, что перенос эритроцитов из гипертонических условий в изотонические приводит к регидратации клеток и к формированию мембранных дефектов [14]. Изменения в цитоплазме, которые ведут к утрате мембраной свойств избирательной проницаемости на этапе регидратации, происходят уже на этапе экспозиции клеток в гипертоническом растворе до их переноса в изотонический раствор и по-разному проявляются в солевых и неэлектролитных гипертонических средах [5]. Образование мембранных дефектов может как активироваться, так и ингибироваться дивалентными катионами Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} [2, 4], модифицирующими постгипертонический лизис (ПЛ). Если эти катионы находятся в изотонической среде регидратации изначально, то они взаимодействуют с разными группами (сайтами), входящими в структуру гемолитических пор, и способствуют активированию гемолиза [2, 4]. Другие данные свидетельствуют о том, что катионы Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} с помощью экранирующего эффекта ингибируют лизис, индуцированный некоторыми гемолитическими агентами (а-токсин, мелиттин, тритон X-100) [6–8, 10], в то время как при ПЛ катионы Ca^{++} , Zn^{++} способны не только блокировать, но и активировать повреждение клеток.

Цель настоящей работы — исследовать активирующий эффект катионов Ca^{++} и Zn^{++} на ПЛ в зависимости от условий экспозиции в гипертонической среде (время экспозиции, ионная сила) и от параметров среды, в которую помещаются клетки после экспозиции в гипертоническом растворе. Кроме того, рассматривается влияние моновалентных катионов (Na^+ , K^+ , H^+) на ПЛ эритроцитов.

В исследовании использованы донорские эритроциты второй группы (А), заготовленные на консерванте глюцир, со сроком хранения не более пяти дней. Отмывание клеток осуществлялось трижды физиологическим раствором (150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl буфер, pH 7,4) центрифугированием (3 000 об/мин) с последующим удалением надосадочной жидкости. Полученный осадок эритроцитов хранили при 0 °С не более 1 ч. Уровень гемолиза определяли спектрофотометрическим методом с применением монохроматора СФ-4А [9, 12].

После отмывания 100 мкл осадка эритроцитов переносили в 0,9 мл гипертонических сред 1,5 М NaCl или 1,2 М сахарозы (5 мМ фосфатный буфер, pH 7,4), в которых клетки выдерживались при 37 °С в течение 1–60 мин. Затем 10 мкл суспензии переносили в 1 мл изотонических сред 0,15 М NaCl или 0,27 М сахарозы (буфер 10 мМ трис-HCl, pH 7,4), в состав которых входили

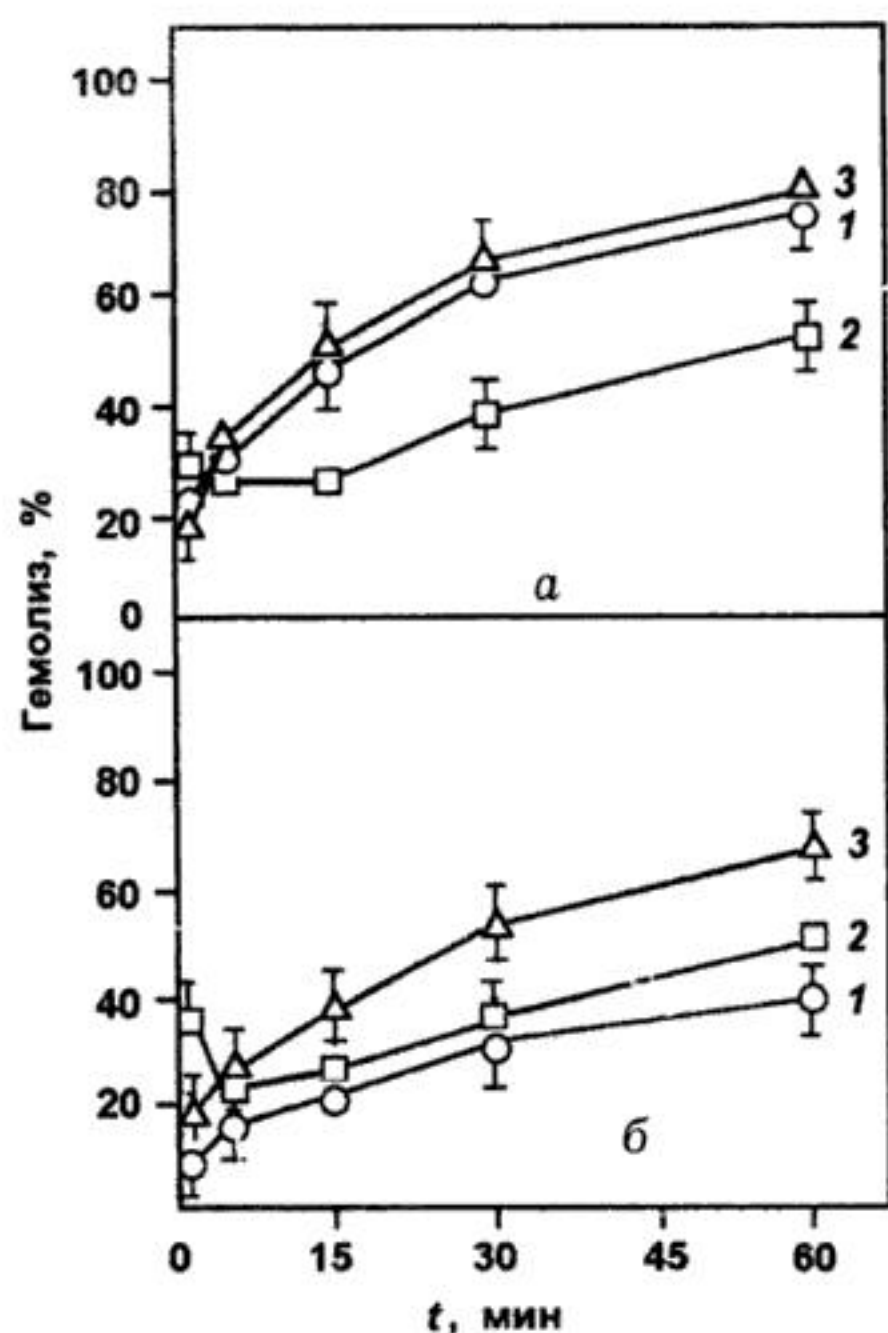


Рис. 1. Уровень ПЛ эритроцитов, индуцированных различное время в гипертонических средах 1,5 М NaCl при температуре 37 °С с последующей регидратацией в изотонические растворы NaCl (а) и сахарозы (б) в отсутствие (1) или в присутствии 100 мМ Са (2) или 0,1 мМ Zn (3)

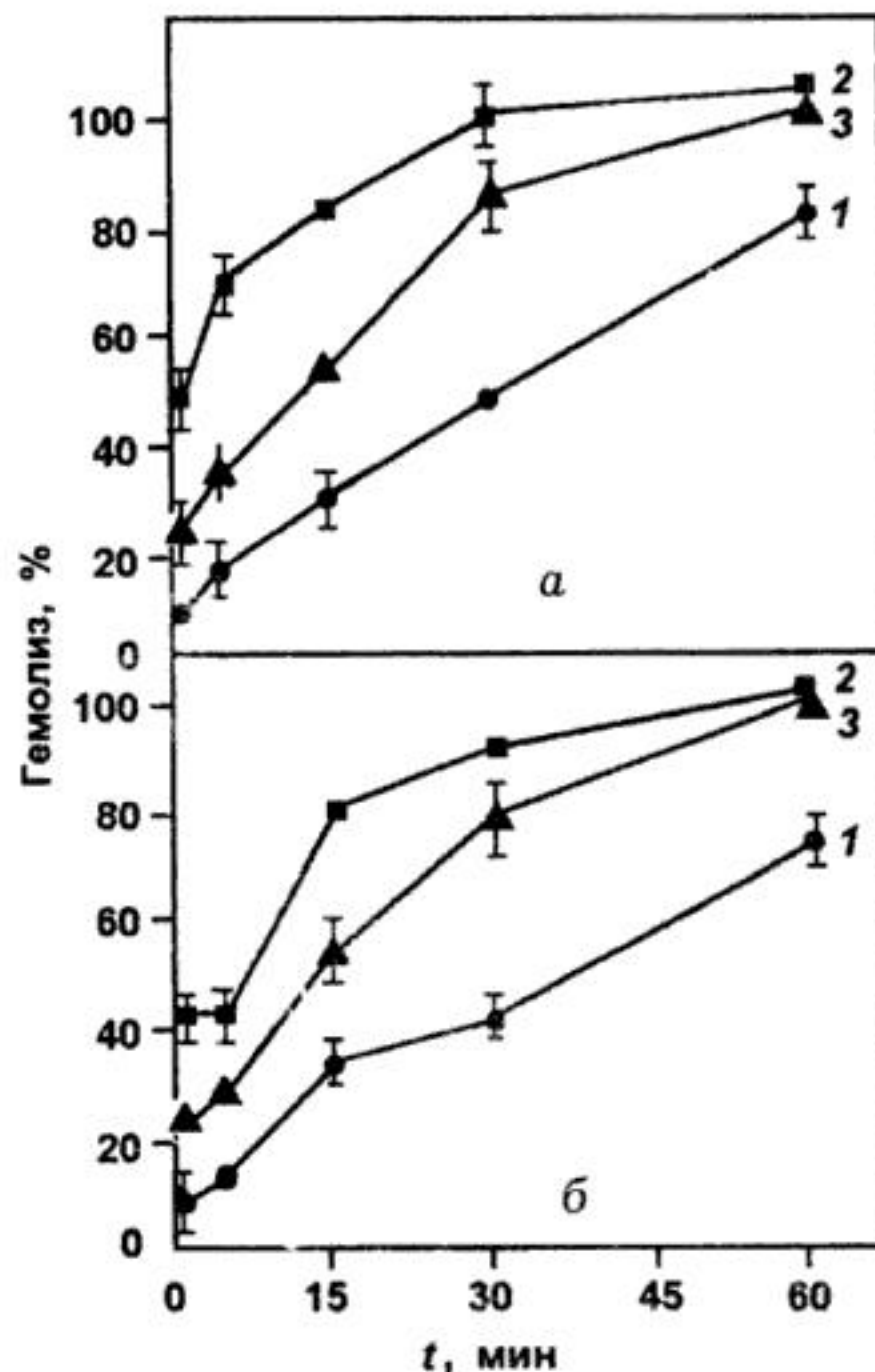


Рис. 2. Уровень ПЛ эритроцитов, индуцированных различное время в гипертонических средах 1,2 М сахарозы при температуре 37 °С с последующей регидратацией в изотонические растворы NaCl (а) и сахарозы (б) в отсутствие (1) или в присутствии 100 мМ Са (2) или 0,1 мМ Zn (3)

ионы Ca^{++} (100 мМ) и Zn^{++} (0,1 мМ) в активирующих для ПЛ концентрациях [9, 12] или ионы H^+ (рН 4–9), при комнатной температуре (18–20 °С). Спустя 5 мин клетки подвергали центрифугированию (3 000 об/мин, 3 мин), после чего в супернатанте определяли уровень гемолиза спектрофотометрическим методом при $\lambda = 415$ нм по отношению к 100%-му лизису того же количества клеток, индуцированному тритоном X-100 (1%).

При изучении влияния моновалентных катионов Na^+ , K^+ на ПЛ и на активирующий эффект ионов Ca^{++} и Zn^{++} эритроциты экспонировали в растворе 1,2 М сахарозы в присутствии Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} в концентрации 100 мМ при 37 °С в течение 30 мин, а затем переносили в изотонические сахарозные среды, содержащие ионы Ca^{++} (100 мМ) или Zn^{++} (0,1 мМ).

На рис. 1, 2 показаны зависимости гемолиза эритроцитов, выдержанных в гипертонических средах NaCl и сахарозы и затем перенесенных в изотонические электролитные (NaCl) и неэлектролитные (сахароза) среды, в которых наряду с указанными компонентами содержались или не содержались дивалентные катионы. Как видно из представленных результатов, более длительная экспозиция клеток в гипертонической среде во всех случаях приводит к монотонному увеличению гемолиза. Характер влияния катионов на ПЛ зависит от состава гипертонической и изотонической сред. В гипертоническом растворе NaCl ионы Zn^{++} не оказывают активирующего влияния при дальнейшем перенесении клеток в изотоническую электролитную среду, а ионы Ca^{++} при этом ингибируют гемолиз (рис. 1, а). В изотонической неэлектро-

литной среде ионы Ca^{++} практически не оказывали влияния на ПЛ за исключением небольшой активизации при малых временах экспозиции клеток в изотоническом растворе, в то время как ионы Zn^{++} стимулировали его (рис. 1, б).

При использовании сахарозной гипертонической среды ситуация существенно меняется. Ионы Zn^{++} независимо от условий регидратации примерно в 2, а ионы Ca^{++} в 3 раза увеличивают постгипертонический лизис по сравнению с контролем во всем временном интервале. При этом видно, что динамика развития чувствительности эритроцитов во времени к ПЛ после инкубации в гипертонической сахарозе коррелирует с активирующим действием катионов Ca^{++} и Zn^{++} (рис. 2). Тот факт, что такая корреляция отсутствует после инкубации эритроцитов в гипертонической среде NaCl , приводит к заключению о возможном существовании двух разных активирующих сайтов в структуре гемолитических пор эритроцитов для ионов Ca^{++} и Zn^{++} .

Активирующее влияние ионов Zn^{++} менее зависит от типа сред дегидратации и регидратации и устраняется лишь в случае, когда эти среды содержат электролиты (рис. 1, а). В отличие от ионов Zn^{++} активирующее действие ионов Ca^{++} наблюдается только после дегидратации клеток в сахарозных средах.

Поскольку ионы Zn^{++} (0,1 мМ) способны оказывать сильное активирующее действие на ПЛ в значительно меньшей концентрации по сравнению с ионами Ca^{++} (100 мМ), можно заключить, что указанные выше сайты обладают большим сродством к ионам Zn^{++} , что, возможно, связано с разным размером этих ионов.

С целью выявления влияния моновалентных катионов на активирование ПЛ катионами Ca^{++} и Zn^{++} , эритроциты дегидратировали в 1,2 М растворе сахарозы в присутствии 100 мМ солей Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} . По данным [13, 14] моновалентные ионы Na^+ , K^+ , Cl^- , присутствуя в среде регидратации, не влияют на ПЛ эритроцитов, как и ионы Mg^{++} [2, 4].

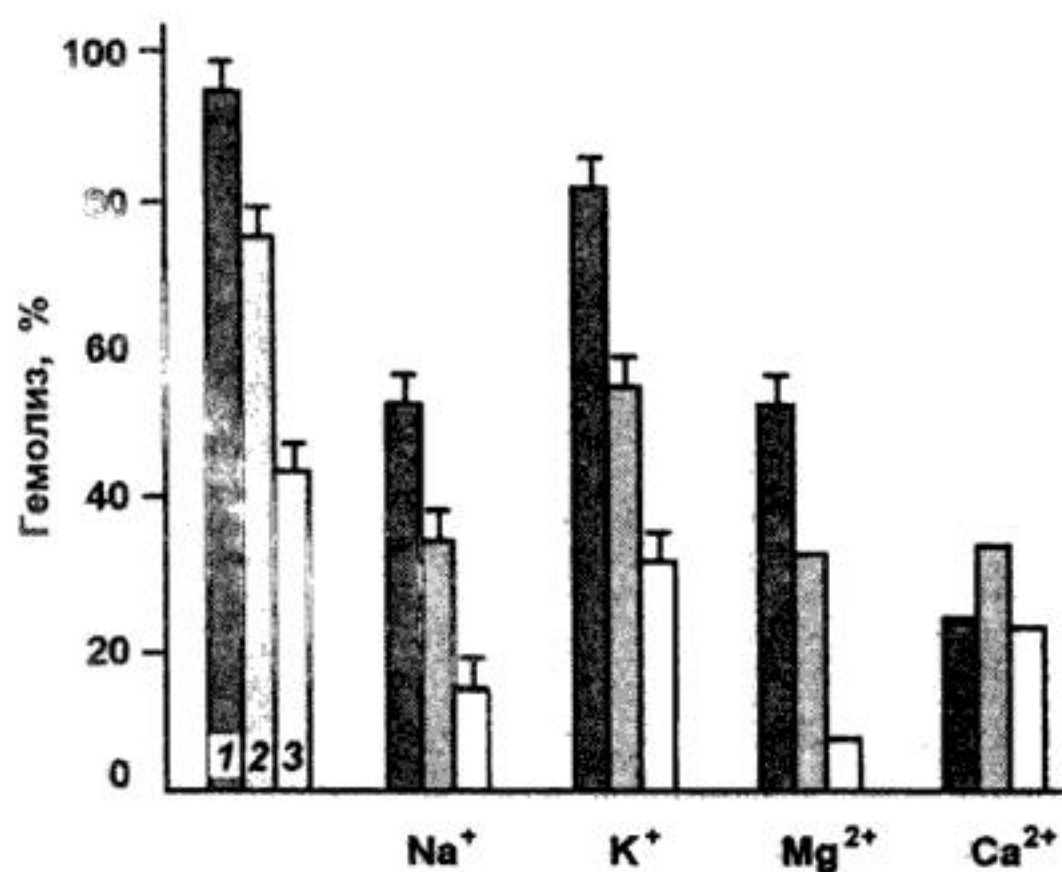


Рис. 3. Влияние гипертонической инкубации эритроцитов в присутствии моно- и дивалентных катионов в концентрации 100 мМ на уровень ПЛ. Эритроциты дегидратировались в 1,2 М сахарозы при 37 °С в течение 30 мин и регидратировались в изотонические сахарозные среды как в отсутствие (3), так и в присутствии 0,1 мМ Zn (2) или 100 мМ Ca (1)

Из данных, представленных на рис. 3, видно, что экспозиция в гипертонической сахарозной среде в присутствии ионов Na^+ , K^+ , Mg^{++} приводит к небольшому уровню ПЛ, но при этом сохраняется способность ионов Ca^{++} и Zn^{++} активировать этот процесс, как и в случае, когда дегидратацию осуществляли в чистой неэлектролитной среде. Ионы Ca^{++} , присутствующие в этой среде, в отличие от остальных ионов, полностью устраняют активирующий эффект как Ca^{++} , так и Zn^{++} . Это доказывает специфичность действия ионов Ca^{++} на мембрану и цитоплазматические структуры, ответственные за активирование или блокирование ПЛ.

Известно, что усиление взаимодействия мембранных белков со спектринном способствует стабилизации клеточной мембраны, предотвращая изменения в структуре или форме клеток под действием разных факторов [11], что, возможно, объясняется тем, что ионы Zn^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} способствуют укреплению связи спектрина с актином и белком полосы 3 [2, 4], восстанавливая таким образом взаимодействие между цитоскелетом и мембраной, нарушенное на стадии экспозиции в гипертоническом растворе [3, 13, 15], и тем самым повышая устойчивость мембраны к повреждениям. При связывании катионов Ca^{++} и Zn^{++} активирующими сайтами, возможно, индуцируются противоположные процессы, вызванные нарушением взаимодействия между белками цитоскелета и ведущие к его откреплению от мембранного бислоя [1], в результате чего мембрана утрачивает устойчивость к ПЛ.

Согласно другим данным [2, 4], модулирующий эффект катионов Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , входящих в состав регидратирующей среды, на ПЛ свидетельствует о том, что в отличие от лизиса, индуцированного гемолитическими агентами [6–8, 10], в случае ПЛ их действие не связано с экранирующим эффектом. Однако ингибирование ПЛ при наличии в гипертонической среде ионов Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} можно объяснить экранирующим действием этих катионов на гемолитическую пору.

На рис. 4 представлено изменение уровня ПЛ в зависимости от pH изотонической среды и от времени предварительной экспозиции эритроцитов в гипертонической среде. Видно, что уровень гемолиза повышается с увеличением продолжительности экспозиции в гипертонической среде, а изменение pH влияет на ПЛ незначительно. Только при значении $pH = 4$ ПЛ блокируется при 30- и 60-минутной экспозиции в гипертонической сахарозной среде, а при $pH = 5$ — активируется после экспозиции в гипертоническом растворе $NaCl$.

Гемолиз, индуцированный литическими агентами, активируется, если сайты, входящие в структуру гемолитической поры, ионизированы (заряжены отрицательно), и ингибируется, если сайты связываются с ионами H^+ или дивалентными катионами [6–8]. Однако при ПЛ такая зависимость не наблюдается. Результаты показывают, что блокирующие сайты, входящие в состав гемолитических пор, формирующихся при ПЛ на стадии регидратации [2, 4], обладают низким сродством к ионам H^+ , а активирующие компоненты не способны взаимодействовать с ними.

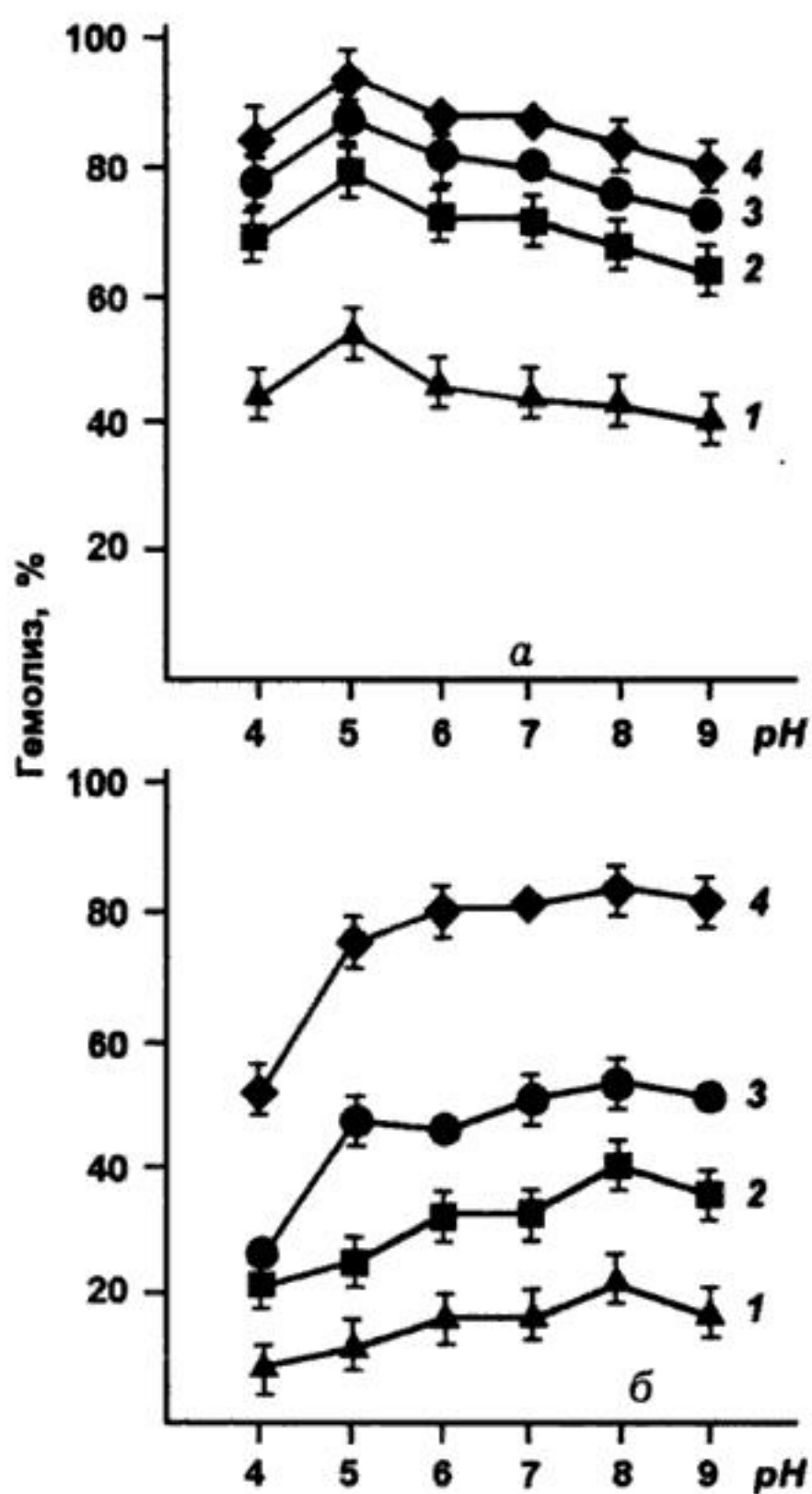


Рис. 4. Влияние pH среды регидратации (0,15 М $NaCl$) на уровень ПЛ эритроцитов, инкубированных 1 мин (1), 15 мин (2), 30 мин (3) и 60 мин (4) в растворе 1,5 М $NaCl$ (а) или в 1,2 М сахарозе (б) при 37 °С

На основе полученных данных можно сделать следующие предположения: в состав гемолитических пор регидратированных эритроцитов входят два активирующих сайта, которые специфичны для ионов Zn^{++} и Ca^{++} ; цинковые сайты обладают большим сродством к ионам Zn^{++} и по сравнению с кальциевыми сайтами менее зависимы в проявлении активирующего эффекта от состава сред инкубации эритроцитов.

В отличие от лизиса, индуцированного гемолитическими агентами, экранирующий эффект при ПЛ наблюдается при ингибирующем действии катионов Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} только в том случае, если они присутствуют в среде предварительной дегидратации эритроцитов. Присутствие катионов Ca^{++} и Zn^{++} в активирующих концентрациях в среде регидратации устраняет указанный экранирующий эффект (происходит активация ПЛ).

Ионы H^+ по своему действию на ПЛ подобны ионам Mg^{++} и способны блокировать его лишь в больших концентрациях, $pH = 4$. Они, как и ионы Mg^{++} , не обладают способностью связываться с активирующими сайтами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – С. 225.
2. Пателарос С. В. Исследование катион-зависимого лизиса регидратированных эритроцитов крови человека // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 4. – С. 31–37.
3. Руденко С. В., Бондаренко В. А. Роль изменения объема эритроцитов при постгипертоническом лизисе // Моделирование криобиологических процессов. – Харьков, 1988. – С. 55–67.
4. Руденко С. В., Пателарос С. В. Активирующее и ингибирующее влияние дивалентных катионов на постгипертонический лизис эритроцитов // Биол. мембраны. – 1995. – 12, № 4. – С. 374–384.
5. Akeson S. P., Mel H. C. Erythrocyte and ghost cytoplasmic resistivity and voltage // Biophys. J. – 1983. – 44, № 3. – P. 397–403.
6. Alder G. M., Arhold W. M., Bashford C. L et al. Divalent cation-sensitive pores formed by natural and synthetic melittin and by triton X-100 // BBA. – 1991. – 1061. – P. 111–120.
7. Bashford C. L., Alder B. M., Menestrina B., Micklem K. J. Membrane damage by hemolytic viruses, toxins complement and other cytotoxic agents // J. Biol. Chem. – 1986. – 261. – P. 9300–9308.
8. Bashford C. L., Rodriguez L., Pasternak C. A. Protection of cells against membrane damage by hemolytic divalent cations and protons act at the extracellular side of the plasma membrane // BBA. – 1989. – 983, № 1. – P. 54–56.
9. Ilani A., Grenoth R. The dependence of hemolysis potency of bile salts // BBA. – 1990. – 1027. – P. 199–204.
10. Pasternak C. A., Bashford C. L. Effect of Ca and other divalent cations on pore formation by viruses, toxins, complement and other agents // J. Studia Biophys. – 1985. – 110, № 1–3. – P. 113–122.
11. Shoket S. B. Possible roles for the membrane cytoskeleton in regulation red cell stability and deformability // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1981. – 41, № 156. – P. 123–130.
12. Young J. D. E., Leong L. G., Dinome M. A., Cohn Z. A. A semiautomated hemolysis microassay for membrane lytic proteins // BBA. – 1986. – 84. – P. 649–654.
13. Zade-Oppen A. M. M. Posthypertonic hemolysis in sodium chloride systems // Acta Physiol. Scand. – 1968. – 73, № 4. – P. 341–364.
14. Zade-Oppen A. M. M. The effect of mannitol, sucrose, raffinose and dextran on posthypertonic hemolysis // Acta Physiol. Scand. – 1968. – 74, № 1–2. – P. 195–206.
15. Zade-Oppen A. M. M. Posthypertonic hemolysis in sucrose systems // Experientia. – 1970. – 26, № 3. – P. 1087–1088.

Медицинский колледж, Греция, о. Крит, г. Ираклион

Поступила 28.01.98

С. В. ПАТЕЛАРОС

ВПЛИВ МОНОВАЛЕНТНИХ КАТІОНІВ Na^+ , K^+ , H^+ НА РОЗВИТОК ОСМОТИЧНИХ МЕМБРАННИХ ПОШКОДЖЕНЬ ЕРИТРОЦИТІВ, ЩО АКТИВУЮТЬСЯ ІОНАМИ Ca^{++} І Zn^{++}

Медичний коледж, Греція, о. Крит, м. Іракліон

Установлено, що катіони Ca^{++} і Zn^{++} здатні активувати гемоліз регідратованих еритроцитів у результаті пов'язання з двома активуючими сайтами, які входять до структури мембранних пошкоджень, специфічних для цих катіонів. Ці компоненти не спостерігаються у випадку лізису, індукованого екзогенними агентами. У випадку гемолізу регідратованих клітин екрануючий ефект катіонів Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} має місце тільки на етапі попередньої дегідратації і призводить до блокування лізису в ізотонічному середовищі. Даний ефект усувається при наявності катіонів у середовищі регідратації. Іони H^+ здатні інгібувати цей тип лізису при більших концентраціях і не взаємодіє з сайтами, що підсилюють мембранні пошкодження.

S.V.PATELAROS

EFFECT OF MONOVALENT CATIONS Na^+ , K^+ , H^+ ON THE DEVELOPMENT OF OSMOTIC MEMBRANE INJURIES IN RED CELLS, ACTIVATED BY IONS OF Ca^{2+} AND Zn^{2+}

Medical College, Greece, Crete, Iraction

The cations Ca^{2+} and Zn^{2+} were found to be capable of activating hemolysis of the rehydrated red cells due to binding with two activating sites, incorporated within the structure of the membrane injuries, which are specific for these cations. these components are not identified in case of lysis, induced by exogenic agents. During hemolysis of the rehydrated cells a screening effect of the cations of Na^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} occurs only at the stage of pre-dehydration and results in the blocking of lysis in the isotonic medium. The given effect is eliminated when the cations are available in the rehydration medium. The ions of H^+ are capable inhibiting this type of lysis only in large concentrations, and they do not interact with the sites, which enhance membrane injuries.

УДК 575.571.1

Л.А.Сергеева

РОЛЬ ФЕРМЕНТОВ РЕПАРАЦИИ ДНК В РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ И ГИБЕЛИ КЛЕТОК

В эксперименте на белых крысах, которым вводили мутаген в различных дозах, показана различная активность репаративных ферментов в клетках крови. Супрессорный и стимулирующий эффекты биологически активных веществ на репаративные ферменты также имели место в реализации хромосомных перестроек.

Повреждение ДНК, вызываемое экстремальными физическими, химическими и биологическими факторами, приводит к активации сложной системы ее восстановления. Реакция ферментов репарации может быть оптимальной или активирующей процессы мутагенеза в соответствии с положением цитогенетики о том, что клетка восстанавливает либо все поврежденные хромосомы, либо ни одной. Известен защитный эффект первой дозы мутагенного фактора. В крови детей, пострадавших при Чернобыльской аварии, частота *in vitro* индуцируемых блеомицином хромосомных aberrаций была существенно ниже, чем при действии той же концентрации блеомицина на лимфоциты, полученные из проб крови здоровых доноров [8]. Это указывает на формирование внутриклеточного адаптивного ответа на действие кластогенного фактора, каковым явилось ионизирующее излучение.

Активация систем восстановления поврежденной ДНК наблюдается при действии любых мутагенных факторов в небольших дозах: низких и высоких температур, ультрафиолета и гамма-лучей (активирующих ДНК-полимеразы), блеомицина (стимулирующего эндонуклеазы), мексамина (индуцирующе-

го синтез лигаз и процессы рекомбинации), кобальта хлорида, ванилина, полифенолов, ретиноидов (усиливающих процессы безошибочной репарации ДНК). Известный феномен адаптации клеточного генома к повреждающему действию мутагенов объясняют сигналом *de novo* репарационных ферментов. Любая репарация зависит от синтеза более 20 белков, а сопряженность их деятельности характеризует разновидности репаративных процессов. Прямая (индуцибельная) репарация, которая стимулируется предобработкой низкой концентрацией мутагена и постобработкой большой его дозой, может понижать или повышать гибель клеток или число сестринских хроматидных обменов. Кроссрепарация, которая возникает, когда постобработка происходит иным типом мутагена, вызывающего отличные от предыдущего повреждения в ДНК, также усиливает либо адаптацию, либо реализацию хромосомных перестроек. Известны хромосомные перестройки, стимулированные ошибочной или "SOS"-репарацией. Экцизионная (темновая) репарация может иметь нескоординированность действия эндонуклеазной и лигазной реакций. Иными словами, мутации часто представляют собой результат ошибок репарации из-за возможного рассогласования активности ее ферментов. В то же время некоторые участки генома не всегда доступны для репарирующих ферментов вследствие суперспирализации ДНК при действии низких температур или экранирования поврежденного локуса белком теплового шока, образование которого может усиливаться при деконсервации клеток. Индукция полифункциональной адаптивной системы клетки, направленной на уменьшение выхода повреждений при последующем стрессовом воздействии, необязательно стимулируется агентами, непосредственно нарушающими структуру ДНК. Сходство механизмов действия ДНК-тропных и негенотоксичных агентов (температурный фактор) заключается в том, что все они меняют модель генной экспрессии. В явлении псевдомутагенеза факторы, не вызывающие локальных изменений в ДНК, могут повышать частоту мутаций путем подавления репарации, т.е. внутриклеточные механизмы репарации ДНК могут быть активированы или угнетены.

Целью исследования явилось изучение степени внутриклеточной активности репарационных ферментов в процессе алкилирования и ее влияния на реализацию хромосомных перестроек.

Реализацию генетических повреждений в костном мозге крыс изучали при введении в их организм различных доз алкилирующего вещества циклофосфана [4], а в лейкоцитарной фракции крови изучали активность репарационных ферментов: кислой ДНКазы, гликоген-фосфорилазы и каталазы [3, 6]. Животных забивали под гексеналовым наркозом, из бедренной кости выделяли лейкопоэтические клетки, находящиеся в метафазе, и на окрашенных препаратах анализировали хромосомные и хроматидные перестройки: дицентрики, сестринские хроматидные обмены, делеции, атипичные хромосомы и кольца. Проводили анализ не только общего количества хромосомных перестроек, но и степени их сложности и доступности к действию ферментов репарации. Материалы опытов обрабатывали статистически с помощью непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни.

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что при введении мутагена в организм животных дозозависимо увеличивалась активность репарационных ферментов: кислой ДНКазы, гликоген-фосфорилазы и каталазы в лейкоцитарных фракциях крови. При введении циклофосфана в дозе 2,5 мг/100 г массы тела животных происходило увеличение активности ДНКазы в

1,93 раза по сравнению с контролем и в 2,95 раза по сравнению с введением алкилирующего средства в дозе, превышающей предыдущую в 4 раза.

Т а б л и ц а 1

Влияние различных доз мутагена на активность репарационных ферментов в лейкоцитах крыс ($n = 10$)

Серия эксперимента	Дозы, мг/100 г	ДНКазы, мкг/мин·мг белка	Гликоген-фосфорилаза, Е/г белка	Каталаза, мкат/г белка
Контроль		6,93	17,23	1019
Циклофосфан	2,5	13,43***	75,0***	3998,8***
	5,0	10,5*	82,0*	2128,0***
	10,0	20,45***	146,82***	3998,9***

Примечания. * — $< 0,01$; ** — $< 0,001$ — достоверность различий по сравнению с дозой циклофосфана 2,5 мг/100 г; *** — $< 0,001$ — достоверность различий по сравнению с контролем.

В ранних экспериментальных и клинических работах нарушение функционирования ДНКаз рассматривалось исследователями в качестве одной из причин поражения ядерной ДНК и гибели клеток, а в более поздних работах ДНКазам стали отводить защитную роль в организме, в том числе в репарации поврежденной ДНК, образовании интерферона. Соотношение количества и активностей эндонуклеаз зависит от высокомолекулярных Ca^{+2} -зависимых протеаз. Большого внимания при этом заслуживают протеолитические ферменты, такие как трипсин и кислые протеазы (катепсины лизосом), а также их ингибиторы и активаторы (гепарин, никотиновая кислота, пирогенал, ионы кальция). Активация репарационной ДНКазы контролируется ионами кальция и магния через аденилатциклазу и гипофиз-адреналовую систему, а угнетение — гепарином, актином и трипсином [2, 9]. При введении на фоне мутагена адренокортикотропных гормонов (АКТГ), кортикостероидов, кальциевого комплекса трилона Б, гепарина и антитрипсина мы получили в костном мозге экспериментальных животных модификацию образования хромосомных нарушений (табл. 2, рис.). Гиперактивация ДНКазы повышает выход мутантных клеток, усложняет их структуру, а снижение ее активности с помощью, например, гепарина — уменьшает воздействие циклофосфана.

В процессе индуцированного мутагенеза при дополнительной активации внутриклеточных ДНКаз с помощью гормонов стрессорной линии (АКТГ и кортикостерона) или замедлении процесса их деградации (введение антитрипсина) усиливается собственно-патологическое звено, которое может приводить клетку к гибели. Поэтому стимуляция апоптоза кортикостероном, хотя и уменьшала процент аберрантных клеток в общей массе лейкопоэтических клеток костного мозга крыс, в оставшихся — включала так называемую “SOS”-репарацию. Следствием этого является увеличение частоты мутаций на 1 мутантную клетку и частоты репарационных ошибок. Реализация описанного выше механизма сопровождается появлением сложнорепазируемых хромосом.

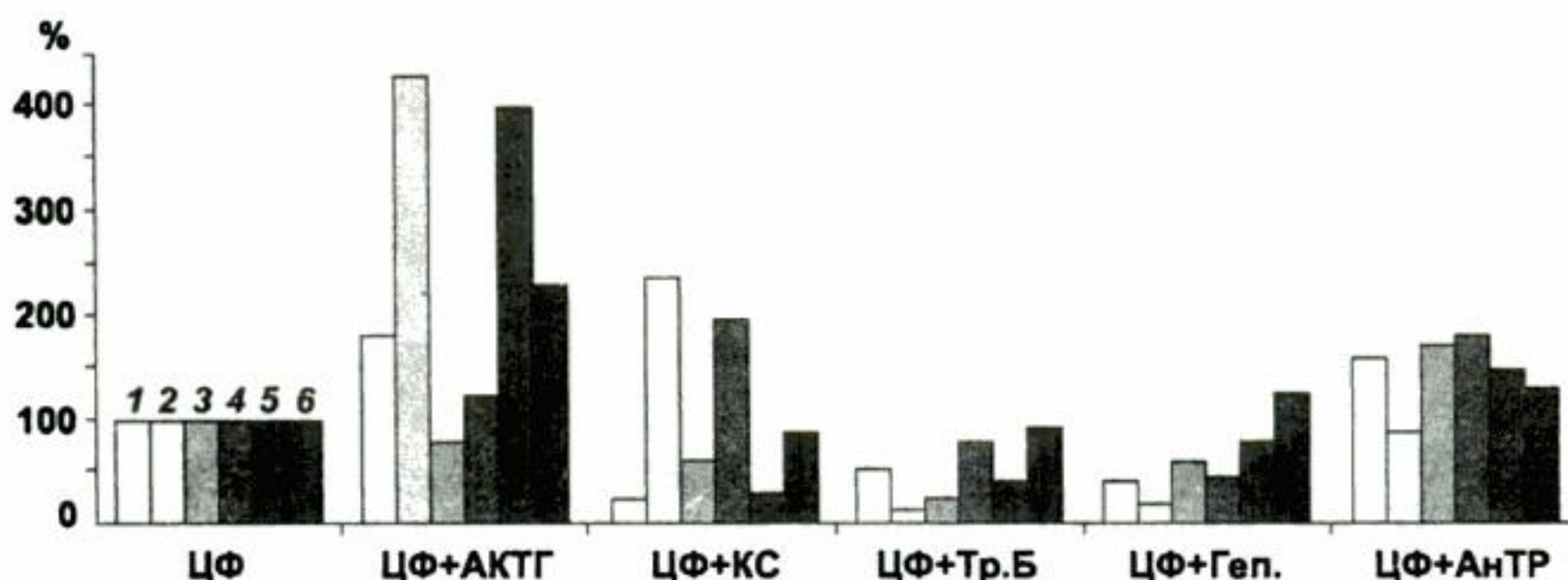
Трилон Б, снижая чрезмерную активацию ДНКазы на фоне мутагена

Т а б л и ц а 2

Изменение количества мутантных клеток в костном мозге крыс при воздействии циклофосфана на фоне различной индукции ДНКаз ($n = 10$).

Серия эксперимента	% метафаз с мутациями
Циклофосфан (ЦФ)	100,0
ЦФ + АКТГ	105,3
ЦФ + кортикостерон	83,7*
ЦФ + трилон Б	16,6*
ЦФ + гепарин	55,8*
ЦФ + антитрипсин	185,0*

Примечание. * — достоверность различий с серией ЦФ, $p < 0,05$.



Качественные изменения индуцируемых циклофосфаном хромосомных перестроек на фоне супрессии или стимуляции ДНКаз: ЦФ — циклофосфан, КС — кортикостерон, Тр.Б — трилон Б, Геп. — гепарин, АнТР — антитрипсин. 1 — парные фрагменты, 2 — сестринские хроматидные обмены, 3 — одиночные фрагменты, 4 — дицентрики, 5 — атипичные хромосомы + кольца, 6 — частота мутаций. По оси абсцисс — серии эксперимента ($n = 10$)

и кальция, улучшал процессы восстановления поврежденных хромосом. Интенсивное снижение цитозольного кальция уменьшает аноксическую гибель клеток, свободнорадикальное окисление мембран, а соответственно и процессы алкилирования нуклеиновых кислот. Таким образом, и гиперактивация, и недостаточность активности кислой ДНКазы могут повлиять на степень антимутагенной защиты генетического аппарата клеток, но более неблагоприятным будет исход мутаций при чрезмерном ее функционировании.

Другой исследованный нами фермент репарации ДНК — гликоген-фосфоорилаза, который производит выщепление из ДНК модифицированных пуриновых и пиримидиновых оснований при ослаблении их связей с сахарными остатками. С помощью, например, урацил-ДНК-гликозилазы (фермент эксцизионной репарации ДНК) достигается также и регуляция клеточного цикла. Такие ферменты обнаруживаются не только в ядре, но и в митохондриях, а также диффузно распределены по цитозолю. Модификация матрикса клеток человека контролируется гликолилизированием базальной мембраны, что приводит к изменению фенотипа клетки. Недостаток этих ферментов может ухудшать биогенез лизосомальных мембран, которые содержат высокогликолизированные белки, приводить к переходу в стадию плотных лизосом, связыванию кислой фосфатазы.

Инактивация гликоген-фосфоорилазы зависит от уровня АМФ, Ca^{+2} , цАМФ, АТФ, глюкозо-1-6-фосфата, гликогена, а значит, и содержания в тканях гормонов, оказывающих влияние на углеводный и энергетический обмен (гормоны стрессорной линии).

При увеличении дозы мутагена увеличивалась и активность фермента (табл. 1) соответственно в 4,35 и 8,52 раза (на минимальной и максимальной дозах). Интенсивное снижение активности гликоген-фосфоорилазы может приводить к гликолизированию базальные мембраны и изменению фенотипа клеток, а следовательно, и экспрессии генов при репарации. Гликоген-фосфоорилазы отвечают за биогенез лизосомальных мембран, которые содержат высокогликолизированные белки, поэтому недостаток их активности может приводить к дисбалансу ферментов репарации за счет снижения их протеолиза. Каскад репарационных ферментов внутри клетки взаимосвязан прямыми и обратными отношениями настолько, что изменение активности хотя бы одного из них видоизменяет собственно-патологические и защитно-приспособительные звенья в мутагенезе. Рассогласование работы репарационных фер-

ментов чаще всего происходит при сочетании мутагенных факторов, которые имеют разные механизмы экспрессии различных генетических локусов, возможно, поэтому для обеспечения жизнестойкости клеток при размораживании необходима коррекция их микроокружения и состояния рецепторного аппарата на плазматических мембранах, которое зависит от наличия определенных биологически активных веществ, медиаторов и гормонов.

К ДНК-повреждающим агентам могут быть отнесены: повышение содержания кислорода, перекись водорода, перекись липидов, свободные радикалы в среде. Иначе их называют эндогенными генотоксичными агентами. При сбалансированном метаболизме они являются неотъемлемой частью системы регуляции обмена, однако в инициации и развитии мутагенеза происходит суммирование спонтанного и индуцированного перекисного окисления. Точкой приложения активных форм кислородных радикалов, например, являются тиоловые группы. В процесс их детоксикации и метаболической активации вовлечены цитохромы, каталазы и супероксидредуктазы. Последние превращают супероксидные радикалы в перекись водорода, а каталаза и глутатионпероксидаза независимо друг от друга переводят перекись водорода в H_2O . Подтверждено значение супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в процессах старения и раковых заболеваний, повышение активностей каталазы и глутатионпероксидазы приводит к усилению синтеза ДНК. В то же время репарация транскрибируемой цепи ДНК всегда предпочтительнее, а ингибиторы синтеза ДНК усиливают цитогенетические эффекты мутагенов. Поэтому литературные данные показывают, что и разрушение, и синтез ДНК стимулировались при добавлении каталазы [7], при этом положительную корреляцию авторы отмечают между продолжительностью жизни и активностью каталазы.

В наших экспериментах (табл. 1) в лейкоцитах животных активность каталазы на фоне циклофосфана повышалась в 3,92 раза, а при увеличении алкилирования — снижалась и была в 2,1 раза ниже контрольного уровня. От каталазной активности зависит степень алкилирования клеток: при ее недостаточности уровень мутационного процесса будет повышаться, а ее гиперактивация сопровождает начальное повышение гидроксилирования при действии мутагена.

Генетические изменения, распределяясь по популяции, либо элиминируются из нее, либо остаются, как в случае генетико-конституционального отбора в древних миграционных процессах: в различных климатогеографических зонах происходила коэволюция ядерных и митохондриальных генов, продукты которых являются компонентами дыхательной цепи и трансляционного аппарата митохондрий. В экстремальных условиях жаркого и арктического климатов генетические системы, ответственные, например, за продукцию свободных радикалов в клетке в процессе долговременной адаптации претерпевали полярные изменения. В условиях Севера отбор генотипов определялся низкой продукцией перекисей и соответственно — более низкими скоростями повреждений генов митохондриальной ДНК окислительными процессами аэробного метаболизма. Все устойчивые к асфиксии хромосомные варианты входят в состав “южных” кариотипов [1, 5], то есть активация системы (продукция гидроперекисей) и антисистемы (ферменты-антиоксиданты) в условиях адаптации клеточных популяций к высоким и низким температурам отмечена прямой корреляцией. Когда же клеточный геном не приспособлен к таким условиям, могут возникать обратные положительные и отрицательные корреляционные связи, при которых гиперактивация каталазы имеет защит-

ное значение, а более неблагоприятна в антимутагенезе — низкая активность фермента.

Таким образом, можно сказать, что система репарации — это неспецифическая защита клеточного генома, которая, как и любая ответная реакция организма на внешнее отрицательное воздействие, например охлаждающее и нагревающее, может иметь фазы гиперфункционирования и истощения, одинаково отражающиеся на исходе внутриядерных хромосомных мутаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордеев М.И., Первозкин В.П. Стратегия отбора и устойчивость к асфиксии у личинок малярийного комара *Nopheles messeae* с разными кариотипами // Генетика. — 1995. — Т. 31, № 2. — С. 180–184.
2. Керова Н.И., Пухова Г.Т. Об определении ингибиторной активности тканей животных по отношению к панкреатической ДНК-азе // Вопр. мед. химии. — 1983. — Т. 5. — С. 128–132.
3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарева В.Е. Определение активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 335–336.
4. Литвинов С.К. Методические рекомендации по экспериментальному выявлению химических модификаторов мутагенеза и канцерогенеза. — М., 1986, 9 с.
5. Салганик Р.И., Соловьева Н.А., Гришаева О.Н. и др. Наследственная гиперпродукция свободных радикалов // Докл. Акад. наук. — 1994. — 336, № 2. — С. 257–260.
6. Шепотинковский В.И., Микашинович З.И. Активность фосфорилазы в лейкоцитах при ишемической болезни сердца // Лаб. дело. — 1983. — № 5. — С. 56–57.
7. Kobayashi S.O., Ueda Kazumitsu, Morita Junji, Komano Tohru. DNA damage induced by free radicals generated from hydroperoxides // Med. Biochem. and Chem.: Aspects Free Radicals; Proc. 4th Bienn. Len. Meet., Soc. Free Radicals: Kyoto, 9–13 Apr., 1989, № 2. — P. 1513–1516.
8. Tedeschi Bruna, Caporossi D., Vernole P. et al. Do human lymphocytes exposed to the fallout of the Chernobyl accident exhibit an adaptive response. Challenge with bleomycin. Mu7tat. Res. Fund. and Mol. Mech. Mutagen., 1995. — 332, № 1–2. — P. 39–44.
9. Walker Lisa J., Craig Randa B., Harris Adrian L., Hickson Ian D. A role for the human DNA repair enzyme HAP 1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress // Nucl. Acids Res. — 1994. — 22, № 23. — P. 4884–4889.

Гос. мед. ун-т, г. Донецк

Поступила 21.04.98

Л. А. СЕРГЕЕВА

РОЛЬ ФЕРМЕНТІВ РЕПАРАЦІЇ ДНК В РЕАЛІЗАЦІЇ ГЕНЕТИЧНИХ ПОРУШЕНЬ ТА ЗАГИБЕЛІ КЛІТИН

Державний медичний університет, м. Донецьк

В експерименті на білих щурах, яким вводили мутаген в різних дозах, показана неодинаковість активності репаративних ферментів в клітинах крові. Супресивний та стимулюючий ефекти біологічно активних речовин на репаративні ферменти також знаходили відображення в реалізації хромосомних перебудов.

L. A. SERGEYEVA

ROLE OF THE DNA REPARATION ENZYMES IN REALIZATION OF GENETIC IMPAIRMENTS AND DEATH OF CELLS

State Medical University, Donetsk

Different activity of the reparative enzymes in blood cells was demonstrated in the experiments with white rats, which were injected with mutagene in varying dosage. The suppressive and stimulating effects of biologically active substances on the reparative enzymes also occurred during realization of the chromosome rearrangements.

Н.Д.Безуглый, А.В.Медведовский

**ОСМОТИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ЯЙЦЕКЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ В РАСТВОРАХ КРИОПРОТЕКТОРОВ.****IV. ПРЯМАЯ РЕГИДРАТАЦИЯ ЭМБРИОНОВ КОРОВЫ**

Изучалась возможность использования проникающих криопротекторов без их выведения после оттаивания. На основе математического моделирования осмотической реакции эмбрионов коровы в растворах проникающих криопротекторов выбран наиболее подходящий криопротектор. Предложен технологичный метод криоконсервации эмбрионов коровы.

В [1] приведены результаты изучения потенциального повреждающего действия проникающих криопротекторов на эмбрионы коровы. Продолжением этого исследования явилась разработка технологичного способа криоконсервации зародышей сельскохозяйственных животных.

Прямая регидратация эмбрионов коровы без замораживания. Сложность современных технологий криоконсервации эмбрионов млекопитающих в значительной степени определяется сложностью этапов насыщения и выведения криопротектора. Эти этапы наиболее трудоемки, требуют высокой квалификации персонала и наиболее длительны по времени.

Теоретические результаты исследований влияния концентрации растворов криопротекторов на величины максимальных значений клеточных объемов [1] позволили предположить возможность использования быстропроникающих криопротекторов без их выведения перед трансплантацией. Для проверки такой возможности эмбрионы, насыщенные диметилсульфоксидом, глицерином, пропиленгликолем и этиленгликолем в концентрации 1,5 М, переносили прямо в среду Дюльбекко (этот процесс был назван прямой регидратацией), затем выдерживали в течение 15 мин, оценивали морфологически и помещали на культивирование продолжительностью 24 ч. Жизнеспособность определяли по достижению эмбрионами очередной стадии развития. Результаты опыта приведены в табл. 1. Как следует из таблицы, при использовании медленнопроникающих криопротекторов диметилсульфоксида и глицерина прямая регидратация приводит к гибели эмбрионов даже без замораживания, что объясняется значительным (выше критического) увеличением клеточного объема эмбрионов. При использовании этих криопротекторов обязательным является их выведение одним из традиционных методов.

Т а б л и ц а 1

Жизнеспособность эмбрионов коровы после прямой регидратации

Криопротектор	Количество эмбрионов, шт			Сохранность, %	
	в опыте	жизнеспособных по морфологич. оценке	развивавшихся в культуре	Опыт	Контроль*
1,5 М ДМСО	10	0	0	0 ^{a**}	80 ^c (n = 10)
1,5 М глицерина	12	3	2	17 ^b	78 ^c (n = 9)
1,5 М пропиленгликоля	18	16	14	77 ^c	75 ^c (n = 12)
1,5 М этиленгликоля	20	18	16	80 ^c	80 ^c (n = 10)

Примечания. * — криопротекторы выводились в 0,5 М растворе сахарозы;

** — одинаковые суперскрипты соответствуют значениям, достоверно не отличающимся друг от друга, разные — различаются между собой с вероятностью не менее 0,95 (то же в табл. 2 и 3).

При использовании быстропроникающих криопротекторов пропиленгликоля и этиленгликоля сохранность достоверно не отличалась от контроля, так

как объем эмбрионов при прямой регидратации не превышает критического. Таким образом, экспериментальные данные полностью подтвердили наши теоретические предположения [1].

Прямая регидратация эмбрионов коровы при криоконсервации. Для проверки возможности практического использования прямой регидратации был поставлен опыт, в котором использовались только те два криопротектора, выведение которых прямой регидратацией не приводило к осмотическому лизису. Эмбрионы, насыщенные 1,5 М растворами пропиленгликоля и этиленгликоля, замораживали по стандартной методике. После замораживания производили обычное оттаивание и далее эмбрионы переносили непосредственно в фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с добавлением 20% фетальной сыворотки. После морфологической оценки жизнеспособности оттаянные эмбрионы помещали на кратковременное культивирование. В качестве контрольной группы использовались эмбрионы, замороженные с использованием 1,2 М раствора глицерина, который выводился после оттаивания в 0,5 М растворе сахарозы. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 2. Из таблицы следует, что сохранность эмбрионов, замороженных в 1,5 М растворе этиленгликоля, достоверно не отличается от контроля. При использовании пропиленгликоля сохранность эмбрионов резко уменьшилась. Анализ результатов, приведенных в табл. 1 и 2, позволяет предположить, что пропиленгликоль, являясь быстропроникающим веществом, при проникновении внутрь клетки и выходе из нее не вызывает опасных изменений клеточного объема, но, что касается эмбрионов коровы, обладает недостаточным защитным действием и не может быть рекомендован для практического использования при криоконсервации эмбрионов коровы.

Т а б л и ц а 2

Жизнеспособность эмбрионов коровы после замораживания и прямой регидратации

Криопротектор	Количество эмбрионов, шт			Сохранность, %
	в опыте	жизнеспособных по морфологич. оценке	развивавшихся в культуре	
1,5 М пропиленгликоля	20	4	3 (15) ^a	19 ^a
1,5 М этиленгликоля	21	16	14 (67) ^b	84 ^b
1,5 М глицерина*	10	8	7 (70) ^b	87 ^b
Контроль**	10	—	8 (80) ^c	—

Примечания. * — криопротектор выводился в 0,5 М растворе сахарозы;

** — свежеполученные эмбрионы;

— — этап исследований отсутствует.

Таким образом, только один из изученных криопротекторов — этиленгликоль — может быть рекомендован к практическому использованию без его выведения перед трансплантацией.

Т а б л и ц а 3

Жизнеспособность эмбрионов коровы после замораживания в растворах этиленгликоля различной концентрации и прямой регидратации

Концентрация этиленгликоля, М	Количество эмбрионов, шт	
	в опыте	жизнеспособных, %
1,0	15	6 (40) ^a
1,5	15	10 (67) ^b
2,0	15	7 (47) ^a

В связи с этим мы уточнили его оптимальную концентрацию при замораживании эмбрионов коровы. Для этого эмбрионы замораживались и использованием 1, 1,5 и 2 М растворов этиленгликоля, после оттаивания подвергались прямой регидратации и помещались на краткосрочное культивирование. Результаты этого опыта приведены в табл. 3, из кото-

рой следует, что оптимальной концентрацией этиленгликоля для замораживания эмбрионов коровы с последующим использованием прямой регидратации является концентрация 1,5 М. Это объясняется, видимо, тем, что в концентрациях менее 1,5 М этиленгликоль не обладает достаточным защитным действием, а концентрации выше 1,5 М приводят к осмотическому шоку при прямой регидратации.

Разработка технологичного метода низкотемпературной консервации эмбрионов крупного рогатого скота с использованием прямой регидратации. Этиленгликоль обладает хорошими защитными свойствами и обеспечивает сохранность эмбрионов при прямой регидратации, что позволило нам предложить технологичный способ криоконсервации эмбрионов коровы. Используя этиленгликоль, мы исключили из цепочки технологических этапов этап выведения криопротектора, что значительно упростило технологию. Кроме этого, при замораживании в пайетах отпадает необходимость заправки в них кроме среды для замораживания еще и среды для выведения криопротектора (обычно раствор сахарозы). Теперь перед замораживанием эмбрион в растворе криопротектора помещается в пайету, непосредственно после оттаивания пайета заряжается в инструмент для пересадки и производится трансплантация.

Для производственной проверки предлагаемого нами способа замораживания эмбрионов было проведено сравнение результатов криоконсервации эмбрионов коровы по нашему способу с результатами, полученными традиционным путем. В качестве контроля использовались результаты приживляемости свежеполученных эмбрионов (табл. 4).

Результаты сравнения предлагаемого способа криоконсервации с традиционным показывают, что сохранность эмбрионов достоверно не отличается, и быстропроникающие криопротекторы в сочетании с прямой регидратацией могут быть рекомендованы к широкому применению.

Результаты криоконсервации и прямой регидратации эмбрионов коровы нашли подтверждение в работах нескольких авторов [3, 4, 6]. Возможность совершенствования технологии трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота путем прямой регидратации последних после оттаивания привлекла внимание нескольких групп ученых в начале 90-х годов. В наиболее обширной работе С. Волкела и И. Хью приведен огромный эмпирический материал по поиску защитных веществ, не требующих удаления перед трансплантацией [6]. Однако их подход к решению этой задачи принципиально отличается от нашего, поскольку поиск таких веществ велся эмпирически, путем перебора всех известных криопротекторов. В конце концов были получены аналогичные результаты с использованием этиленгликоля.

Приживляемость замороженно-оттаянных и подвергнутых прямой регидратации эмбрионов составила в их исследованиях 42%. Однако хотелось бы подчеркнуть, что эмпирический подход указанных авторов был весьма длительным и дорогостоящим. Для поис-

Т а б л и ц а 4

Результаты трансплантации деконсервированных эмбрионов

Способ криоконсервации	Количество эмбрионов, шт		Количество стельных реципиентов, гол (стельность, %)
	замороженных	трансплантированных реципиентам	
1,5 М EG → ФСБ	31	27	11 (40,7) ^a
1,2 М Gl → 0,5 М сахарозы	25	22	9 (41) ^a
Контроль*	—	20	9 (45) ^a

Примечание. * — свежеполученные эмбрионы.

ка оптимальных режимов прямой регидратации они использовали более 400 эмбрионов. Сравнение описанного выше подхода с нашим (математическое моделирование, теоретический поиск и экспериментальная проверка) показывает явные преимущества последнего, в пользу чего свидетельствуют и неудачные попытки некоторых авторов использовать прямую регидратацию [5], в то время как первые телята-трансплантаты после пересадок деконсервированных с использованием прямой регидратации эмбрионов были получены нами в 1994 г. [2]. В настоящее время и другие авторы пытаются использовать такой метод замораживания, что говорит о его перспективности [3].

Использование разработанного нами технологического способа криоконсервации эмбрионов коровы позволяет значительно упростить технологию трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота и максимально приближает ее по простоте использования к технологии искусственного осеменения коров и телок замороженной спермой быков-производителей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безуглый Н. Д., Медведовский А. В. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих в растворах криопротекторов. III. Метод комплексной оценки потенциального повреждающего действия проникающих криопротекторов // Пробл. криобиол. – 1997. – № 3. – С. 22–27.
2. Безуглый Н. Д., Медведовский А. В. Трансплантация деконсервированных эмбрионов крупного рогатого скота без выведения криопротектора // I-я Межукр. научн. конф. молодых ученых и специалистов “Селекционно-биотехнологические методы использования генетического потенциала сельскохозяйственных животных. – Киев, 1994. – С. 13.
3. Aarts T., Hurmans H., Klop J. et al. Direct rehydration of bovine embryos using ethylene glycol as a cryoprotecting agent // 11th Scientific meeting of the European embryo transfer association. – 1995, Germany. – P. 119.
4. Massip A. P., Van Der Zwalmen B. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose // Vet. Rec. – 1984. – 115. – P. 327–328.
5. Suzuki T., Yamamoto M., Ooe M. et al. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propandiol // Theriogenology. – 1990. – 34. – P. 1051–1057.
6. Voelkel S. A., Hu Y. X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos // Theriogenology. – 1992. – 37. – P. 23–38.

Ин-т животноводства УААН, г. Харьков, п/о Кулинич

Поступила 17.06.96

М. Д. БЕЗУГЛИЙ, О. В. МЕДВЕДОВСЬКИЙ

ОСМОТИЧНА РЕАКЦІЯ ЯЙЦЕКЛІТИН ТА ЕМБРІОНІВ ССАВЦІВ У РОЗЧИНАХ КРІОПРОТЕКТОРІВ. IV. ПРЯМА РЕГІДРАТАЦІЯ ЕМБРІОНІВ КОРОВИ

Інститут тваринництва УААН, м. Харків, п/о Кулінічі

Вивчалась можливість використання проникаючих криопротекторів без їх вилучення після відігріву. На основі математичного моделювання осмотичної реакції ембріонів корови в розчинах проникаючих криопротекторів вибраний найбільш відповідний криопротектор. Запропонований технологічний метод криоконсервації ембріонів корови.

M. D. BEZUGLY, O. V. MEDVEDOVSKY

OSMOTIC REACTION OF MAMMALIAN OOCYTES AND EMBRYOS IN THE SOLUTIONS OF CRYOPROTECTANTS. IV. REHYDRATION OF COW EMBRYOS

Institute of animal breeding of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kharkov, P.O. Box Kulinichi

The possibility of application of penetrating cryoprotectants without their removal after thawing has been studied. On the base of mathematic modelling of osmotic reaction of cow embryos in the solutions of penetrating cryoprotectants the most suitable cryoprotectant has been selected. Thechnological method of cow embryo cryopreservation was proposed.

Т.А.Парченко, В.А.Бондаренко, Е.Е.Нипот**ТЕСТИРОВАНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ МЕМБРАНЫ РЕГИДРАТИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ ЯД-ИНДУЦИРОВАННОГО ГЕМОЛИЗА**

Исследовано действие пчелиного яда на эритроциты, дегидратированные в различных средах при 37 и 0 °С. Выявлено увеличение степени сжатия клеток, по сравнению с начальным объемом, при повышении осмолярности дегидратирующих сред как при 0, так и при 37 °С. Скорость гемолиза повышалась в 2–3 раза за одним исключением: клетки, дегидратированные в гипертонических растворах KCl при 0 °С, имели такую же чувствительность к яд-индуцированному гемолизу, как и контрольные клетки.

Моделью криповреждения эритроцитов при медленном замораживании-оттаивании служит постгипертонический лизис (ПЛ) [8], величина которого зависит от температуры, состава, тоничности среды дегидратации, а также определяется временем экспозиции в гипертоническом и изотоническом растворах [9]. Для того чтобы исследовать возможные изменения эритроцитарной мембраны, происходящие при замораживании-оттаивании, клетки, дегидратированные в концентрированных растворах электролитов и неэлектролитов, а затем регидратированные в изотонической среде, подвергали воздействию пчелиного яда (ПЯ), который вызывает гемолиз эритроцитов и существенное уменьшение их объема [3, 4].

Эритроциты получали из донорской крови путем 3-кратной отмывки в физиологическом растворе (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4). Динамику яд-индуцированного гемолиза изучали спектрофотометрически на длине волны 720 нм [3]. Скорость гемолиза вычисляли как тангенс угла наклона зависимости оптического пропускания от времени. Объем эритроцитов измеряли методом спектроскопии импульсов сопротивления (СИС) [5]. Дегидратацию эритроцитов проводили в растворах NaCl, KCl и сахарозы различной тоничности в течение 15 мин при 37 и 0 °С. Регидратацию проводили путем разбавления гипертонического раствора 0,15 М раствором KCl при 37 °С. После 10-минутной экспозиции в регидратирующей среде центрифугировали при 1 500g, в результате чего получали осадок регидратированных клеток, которые затем отмывали два раза в 0,15 М растворе KCl и один раз в 0,15 М NaCl.

Как уже было показано ранее [1], регидратированные эритроциты имеют больший объем по сравнению с контрольными, и с возрастанием тоничности дегидратирующих сред наблюдается постепенное увеличение объема клеток (табл. 1). В результате действия ПЯ происходит уменьшение объема прогемолизировавших эритроцитов, причем регидратированные клетки сжимаются сильнее по сравнению с контрольными. При этом наблюдается увеличение степени сжатия клеток, по сравнению с начальным объемом, при повышении осмолярности дегидратирующих растворов как при 0 °С, так и при 37 °С для всех используемых сред. Полное сжатие эритроцитов происходит в течение 1 мин, после чего наблюдается постепенное набухание теней, причем тени эритроцитов, дегидратированных при 0 °С, в течение 25 мин набухают сильнее (табл. 1).

Установлено также, что эритроциты, подвергнутые циклу дегидратации-регидратации, становятся более чувствительными к яд-индуцированному гемолизу (табл. 2). С увеличением тоничности всех используемых сред наблюдается постепенное повышение скорости гемолиза регидратированных эритроцитов по сравнению с контрольными как для 0 °С (за одним исключением), так и для 37 °С.

Т а б л и ц а 1

Влияние состава и тоничности среды дегидратации на изменение относительного объема регидратированных эритроцитов, индуцированное пчелиным ядом (2,5 мкг/мл)

Среда дегидратации	Относительный объем регидратированных эритроцитов					
	Температура дегидратации, °C					
	37			0		
	Начальный объем	через 1 мин	через 25 мин	Начальный объем	через 1 мин	через 25 мин
Контрольные эритроциты	$1 \pm 0,006$	$0,41 \pm 0,003$	$0,49 \pm 0,01$	$1 \pm 0,006$	$0,41 \pm 0,003''$	$0,49 \pm 0,01$
0,7 М NaCl	$0,99 \pm 0,003$	$0,38 \pm 0,006$	$0,51 \pm 0,008'$	$0,98 \pm 0,017$	$0,38 \pm 0,011''$	$0,53 \pm 0,007'$
1,0 М NaCl	$1,06 \pm 0,017^*$	$0,38 \pm 0,004$	$0,5 \pm 0,017'$	$0,98 \pm 0,007$	$0,42 \pm 0,006''$	$0,64 \pm 0,004'$
1,5 М NaCl	$1,17 \pm 0,014^*$	$0,38 \pm 0,004$	$0,6 \pm 0,003'$	$1,02 \pm 0,007$	$0,46 \pm 0,02''$	$0,69 \pm 0,005'$
2,0 М NaCl	$1,22 \pm 0,014^*$	$0,36 \pm 0,006$	$0,63 \pm 0,01'$	$1,15 \pm 0,006^*$	$0,44 \pm 0,009''$	$0,68 \pm 0,01'$
0,5 М KCl	$1,0 \pm 0,003^*$	$0,43 \pm 0,017$	$0,61 \pm 0,003'$	$1,01 \pm 0,003$	$0,52 \pm 0,01''$	$0,72 \pm 0,017'$
0,7 М KCl	$0,98 \pm 0,003$	$0,38 \pm 0,011$	$0,55 \pm 0,008'$	$1,01 \pm 0,004$	$0,49 \pm 0,006''$	$0,68 \pm 0,014'$
1,0 М KCl	$1,1 \pm 0,004^*$	$0,44 \pm 0,12$	$0,56 \pm 0,003'$	$1,02 \pm 0,003$	$0,49 \pm 0,003''$	$0,71 \pm 0,009'$
1,5 М KCl	$1,45 \pm 0,023^*$	$0,38 \pm 0,009$	$0,58 \pm 0,001'$	$1,06 \pm 0,005^*$	$0,5 \pm 0,01''$	$0,64 \pm 0,006'$
0,5 М сахароза	$0,94 \pm 0,01^*$	$0,43 \pm 0,017$	$0,61 \pm 0,017$	$1,0 \pm 0,002$	$0,53 \pm 0,01''$	$0,69 \pm 0,003'$
0,86 М сахароза	$1,02 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,012$	$0,55 \pm 0,012$	$1,0 \pm 0,007$	$0,56 \pm 0,018''$	$0,78 \pm 0,017'$
1,2 М сахароза	$1,18 \pm 0,016^*$	$0,43 \pm 0,006$	$0,53 \pm 0,01'$	$1,0 \pm 0,005$	$0,45 \pm 0,011''$	$0,63 \pm 0,014'$

Примечание. * — $p < 0,05$ относительно контроля, ' — $p < 0,05$ относительно объема эритроцитов, измеренного на 1-й мин, '' — $p < 0,001$ относительно контроля.

Однако клетки, дегидратированные при 0 °C в гипертонических растворах KCl, имели чувствительность к яд-индуцированному гемолизу такую же, как и контрольные. Этот факт показывает, что раствор KCl существенно не изменяет мембрану красных кровяных клеток, тем не менее вызывая сжатие, сравнимое с действием других гипертонических сред.

Из таблиц видно, что наиболее чувствительны к гемолизу, вызванному пчелиным ядом, эритроциты, инкубированные в гипертонических растворах NaCl и сахарозы при 37 °C. Таким образом, полученные результаты показывают, что тип обработки (содержание дегидратирующей среды, тоничность и температура) является определяющим в изменении свойств эритроцитов в

Т а б л и ц а 2

Влияние состава и тоничности среды дегидратации на скорость гемолиза регидратированных эритроцитов, индуцированного пчелиным ядом (2,5 мкг/мл)

Среда дегидратации	Скорость гемолиза	
	Температура дегидратации, °C	
	37	0
Контрольные эритроциты	$6,2 \pm 0,009$	$6,2 \pm 0,009$
0,7 М NaCl	$7,1 \pm 0,071^*$	$6,3 \pm 0,07$
1,0 М NaCl	$6,2 \pm 0,01$	$5,6 \pm 0,02$
1,5 М NaCl	$7,2 \pm 0,013^*$	$6,3 \pm 0,016$
2,0 М NaCl	$8,5 \pm 0,03^*$	$8,1 \pm 0,025^*$
0,5 М KCl	$5,67 \pm 0,022$	$5,1 \pm 0,017^*$
0,7 М KCl	$5,67 \pm 0,03$	$5,67 \pm 0,02$
1,0 М KCl	$6,3 \pm 0,01$	$6,2 \pm 0,013$
1,5 М KCl	$7,9 \pm 0,015^*$	$6,3 \pm 0,01$
0,5 М сахароза	$7,1 \pm 0,08^*$	$7,1 \pm 0,054^*$
0,86 М сахароза	$9,5 \pm 0,019^*$	$6,3 \pm 0,01$
1,2 М сахароза	$9,2 \pm 0,02^*$	$7,1 \pm 0,061^*$

Примечание. * — $p < 0,05$.

процессе постгипертонического лизиса. Известно, что продолжительная деформация комплекса “мембрана–цитоскелет” приводит к смещению димер–тетрамер равновесия спектрина в сторону образования олигомеров, причем процесс имеет выраженную температурную зависимость [6]. В конечном счете экспозиция клеток в условиях гипертонии соответствует подобной мембранной деформации, степень которой повышается с увеличением тоничности. Кроме того, повышение концентрации гемоглобина и концентрации цитоскелетных белков в дегидратированных эритроцитах облегчает олигомеризацию спектрина [7]. Понижение температуры снижает способность спектрина к самоассоциации [6, 7], в то же время снижается чувствительность эритроцитов к яд-индуцированному гемолизу. Вероятно, “пролитические” изменения во взаимо-

действиях цитоскелет-мембранных компонентов эритроцитов являются ответственными за чувствительность регидратированных эритроцитов к данному типу гемолиза. В то время как продолжительность сжатия регидратированных эритроцитов во время яд-индуцированного гемолиза сравнивается с контрольным значением, связывание мелиттина с мембраной обработанных клеток было меньше, чем с контрольными (данные не приведены). Принимая во внимание механизм мелиттин-индуцированного гемолиза, который приписывается предпочтительно мелиттин-белковым взаимодействиям [2], необходимо отметить, что во время дегидратации-регидратации происходит существенное изменение мембранных белков, о чем свидетельствуют наши исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Божок Г.А., Руденко С.В., Бондаренко В.А. Чувствительность субпопуляций эритроцитов разного возраста к постгипертоническому гемолизу // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 4. – С. 55–57.
2. Руденко С.В., Нипот Е.Е. Модуляция мелиттин-индуцированного гемолиза эритроцитов // Биохимия. – 1996. – 61, № 12. – С. 2116–2124.
3. Руденко С.В., Нипот Е.Е., Павлюк О.М. Влияние ионов Zn^{++} на гемолиз эритроцитов, индуцированный мелиттином // Биохимия. – 1995. – 60, № 5. – С. 723–733.
4. Руденко С.В., Семенченко А.Ю. Изменение объема эритроцитов и спектра мембранных белков, индуцированное мелиттином, фосфолипазой A_2 и пчелиным ядом // Биохимия. – 1995. – 60, № 5. – С. 734–745.
5. Akeson S.P., Mel H.C. Deformability and other rheological interactions of red blood cells in electronic cell sizing // Biorheology. – 1986. – 23. – P. 1–15.
6. Liu S.L., Derick L.N., Ralek J. Dependence of the permanent deformation of red blood cell membranes on spectrin dimer - tetramer equilibrium: implications for the permanent membrane deformation of irreversible sickle cells // Blood. – 1993. – 81. – P. 522–528.
7. Liu S.-C., Ralek J. Hemoglobin enhance the self-association of spectrin heterodimers in human erythrocytes // J. Biol. Chem. – 1984. – 259. – P. 11556–11562.
8. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology. – 1972. – № 8. – P. 489–500.
9. Woolgar H.E., Morris C.J. Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on post-hypertonic haemolysis of human red blood cells // Cryobiology. – 1973. – № 10. – P. 82–86.

Харьковский гос. ун-т

Поступила 17.03.98

Т. О. ПАРЧЕНКО, В. А. БОНДАРЕНКО, О. Є. НІПОТ

ТЕСТУВАННЯ ЦІЛІСНОСТІ МЕМБРАНИ РЕГІДРАТОВАНИХ ЕРИТРОЦИТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ГЕМОЛІЗУ, ІНДУКОВАНОГО БДЖОЛИНОЮ ОТРУТОЮ

Харківський державний університет

Досліджено дію бджолиної отрути на еритроцити, дегідратовані у різних середовищах при 37 і 0 °С. Виявлено збільшення стиснення клітин порівняно з початковим об'ємом при підвищенні осмоларності середовищ дегідратації як при 0, так і при 37 °С. Швидкість гемолізу підвищувалась у 2–3 рази за одним виключенням: клітини, дегідратовані у гіпертонічних розчинах KCl при 0 °С, мали таку ж чутливість до гемолізу, індукованого бджолиною отрутою, як і контрольні клітини.

T. A. PARCHENKO, V. A. BONDARENKO, E. E. NIPOT

BEE VENOM-INDUCED HEMOLYSIS AS A TEST OF INTEGRITY OF THE REHYDRATED RED CELL MEMBRANE

Kharkov State University

The action of bee venom on the red cells, dehydrated in various media at 37 and 0 °C, was studied. It was found that the extent of cell shrinking increases as compared with the original volume when increasing the osmolarity of the dehydrating media both at 0 and 37 °C. The rate of hemolysis was accelerated by 2–3-fold with the only exception: the cells, dehydrated in hypertonic solutions of KCl at 0 °C, demonstrated similar susceptibility to the venom-induced hemolysis as compared with control cells.

В.И.Грищенко, А.Г.Геродес, Ю.В.Никитченко

**ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ НА ПЕРЕКИСНОЕ
ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ
Фолликулярной жидкости человека**

Исследовано влияние замораживания-оттаивания и длительного хранения в жидком азоте и при -12°C фолликулярной жидкости человека на содержание в ней гидроперекисей липидов, активность ряда антиоксидантных ферментов и способность к перехвату ОН-радикалов.

В последнее время все большую актуальность приобретают исследования влияния фолликулярной жидкости (ФЖ) человека на подвижность, активность, акросомальную реакцию и оплодотворяющую способность спермиев человека [5, 11]. Важность этой проблемы определяется необходимостью совершенствования методик повышения фертильности спермы для программ репродуктивных технологий.

Если принять во внимание трудности получения фолликулярной жидкости, моральные и этические проблемы, связанные с программой экстракорпорального оплодотворения, а также необходимость использования фолликулярной жидкости в дни, когда получить ее не представляется возможным, особый интерес приобретает возможность длительного хранения данной биологической среды. Критерием эффективности хранения ряда биологических жидкостей может служить изменение состояния свободнорадикального окисления липидов и антиоксидантной системы исследуемой субстанции.

По данным [9], в сыворотке крови, хранившейся при 4°C , наблюдалось незначительное повышение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — малонового диальдегида (МДА) — уже к 10-м сут хранения. Активность глутатионпероксидазы при тех же условиях не изменялась. По данным [10], глутатионпероксидазная активность крови человека в период хранения при 4°C не изменялась в течение 20 сут. Исследования влияния более глубокого замораживания (до -70°C) плазмы крови свидетельствуют о сохранности содержания истинных антиоксидантов до 3,5–4 лет [6].

В доступной нам литературе данных о состоянии свободнорадикального окисления липидов и его регуляции в фолликулярной жидкости человека при ее хранении не обнаружено. Вместе с тем в ранее проведенных исследованиях нами установлено, что фолликулярная жидкость человека, хранившаяся в жидком азоте, оказывала высокое стимулирующее действие на спермии, соизмеримое с нативной жидкостью фолликулов [7].

В настоящей работе исследовано влияние замораживания-оттаивания и длительного хранения в жидком азоте и при -12°C фолликулярной жидкости человека на содержание в ней гидроперекисей липидов, антирадикальную активность и активность ряда антиоксидантных ферментов.

Жидкость из фолликулов получали на 12–14-й день менструального цикла от женщин в возрасте 20–42 лет (средний возраст составил 31 год), участвующих в программе экстракорпорального оплодотворения на базе Центра репродукции и генетики г. Харькова. В качестве индукторов овуляции использовали человеческий менопаузный гонадотропин (Pergonal “Serono”) и фолликулостимулирующий гормон (Metrodin “Serono”). Динамику роста фолликулов исследовали посредством ультразвукового мониторинга. Фоллику-

лярную жидкость аспирировали путем трансвагинальной пункции фолликулов через 34–35 ч после инъекции 5 000 – 10 000 ед. человеческого хорионального гонадотропина (Profasi “Serono”). После выделения ооцитов образцы делили на две части. Хранение производили в запаянных с двух сторон пластиковых трубках по 0,2 мл в рефрижераторе (–12 °С) и в жидком азоте (–196 °С) в течение 7 и 30 сут после получения жидкости. Кримоконсервированные образцы перед погружением выдерживали в течение 20 мин в парах жидкого азота. Оттаивание производили на водяной бане при 37 °С.

Глутатионпероксидазную активность определяли по методу Paltia, Valentine (как описано в [3]) по окислению НАДФН в сопряженной глутатионредуктазной системе. Глутатион-S-трансферазную активность определяли спектрофотометрически [3] с 1-хлор-2,4-динитробензолом. Глутатионредуктазную активность определяли спектрофотометрически при 340 нм по убыли НАДФН [3]. Эффективность перехвата ОН-радикалов фолликулярной жидкости человека определяли в среде, содержащей 25 мМ калий фосфатный буфер, рН 7,4, 100 мкМ FeCl₃, 104 мкМ ЭДТА, 100 мкМ аскорбата, 1 мМ H₂O₂, 3 мМ дезоксирибозы. Инкубацию проводили 1 ч при температуре 37 °С [8]. Спектр поглощения окрашенного продукта записывали на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре “Specord UV VIS” (Германия).

Гидроперекиси липидов определяли по методу [4] в среде, содержащей 0,2 М глициновый буфер, рН 3,6, 0,3 мМ FeCl₃, 0,3 мМ ионола. Окрашивание проводили с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Количество продуктов реакции определяли по оптической плотности при разности длин волн 535–580 нм, принимая коэффициент экстинкции 1,56·10⁵ моль^{–1}см^{–1}.

Представленные в табл. 1 данные подтверждают, что замораживание-оттаивание в жидком азоте по предложенной методике не увеличивает количество продуктов перекисного окисления липидов в фолликулярной жидкости человека. Также не обнаружено изменения количества гидроперекисей липидов при хранении ФЖ в жидком азоте в течение 30 сут. В то же время хранение фолликулярной жидкости при –12 °С в течение того же времени приводило к значительному увеличению этих токсических продуктов ПОЛ. Тенденция к повышению содержания гидроперекисей липидов, хранящихся при –12 °С, наблюдалась уже через 7 сут, когда ни один из исследуемых антиоксидантных ферментов ФЖ еще не изменялся.

Исследования влияния замораживания-оттаивания на активность антиоксидантных ферментов — глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы — свидетельствуют, что ни один из изучаемых параметров достоверно не изменялся (табл. 2). Эти данные в какой-то мере согласуются с ранее полученными результатами влияния замораживания-оттаивания на растворимые антиоксидантные ферменты [2].

Т а б л и ц а 1

Влияние различных способов низкотемпературного хранения на содержание ТБК-активных продуктов ПОЛ в фолликулярной жидкости человека (n = 4–6)

Температура и время хранения	ТБК-активные продукты	
	нмоль МДА/мл	% к контролю
Нативная фолликулярная жидкость человека (контроль)	2,89 ± 0,13	100 ± 4,5
Замороженная-оттаянная ФЖ, –196 °С	2,95 ± 0,14	102,1 ± 4,8
–12 °С, 7 сут	3,18 ± 0,09'	110,0 ± 3,0'
–196 °С, 7 сут	2,97 ± 0,14	102,8 ± 4,9
–12 °С, 30 сут	3,39 ± 0,12*	117,3 ± 4,2*
–196 °С, 30 сут	2,99 ± 0,06	103,5 ± 2,1

Примечания. ' — 0,05 < P < 0,1 по отношению к нативной фолликулярной жидкости; * — P < 0,05 по отношению к нативной фолликулярной жидкости.

Т а б л и ц а 2

Влияние замораживания-оттаивания на антиоксидантную и антирадикальную активность фолликулярной жидкости человека

Вид активности	Контроль	Замораживание-оттаивание (-196°C)
Антирадикальная (% ингибирования к контролю)	$63,6 \pm 2,1$	$63,0 \pm 3,8$
Глутатионпероксидазная с H_2O_2 (I)	$137,2 \pm 14,4$	$132,1 \pm 8,2$
Глутатионпероксидазная с гидроперекисью кумола (II)	$220,0 \pm 41,6$	$219,1 \pm 36,4$
II-I	$83,2 \pm 30,4$	$87,0 \pm 30,5$
Глутатионредуктазная	$23,0 \pm 2,4$	$23,5 \pm 1,6$
Глутатион-S-трансферазная	$234,7 \pm 36,5$	$232,2 \pm 33,3$

Низкотемпературное хранение в жидком азоте в течение 30 сут не приводило к достоверному изменению ни одной из исследуемых активностей (табл. 3). В образцах, хранившихся 30 сут в холодильнике при -12°C , установлено достоверное снижение глутатионпероксидазной активности с H_2O_2 (I) на 9%, с гидроперекисью кумола (II) — на 24% и неселеновой глутатионпероксидазной активности (II-I) — на 45%. Активность глутатионтрансферазы также понижалась на 30%. В то же время глутатионредуктазная активность при данном режиме хранения существенно

но не изменялась.

Анализируя ранее полученные данные [1] и результаты настоящих исследований о снижении глутатионпероксидажной и глутатионтрансферазной активностей фолликулярной жидкости человека в течение 30 сут хранения при -12°C , а также данные о некотором ($0,05 < P < 0,1$) повышении количества гидроперекисей липидов в фолликулярной жидкости уже после 7 сут хранения при -12°C , можно сделать вывод о нецелесообразности длительного (более 7 сут) хранения фолликулярной жидкости человека в холодильнике. В то же время метод хранения в жидком азоте при выбранном режиме криоконсервации обеспечивает долговременную и надежную сохранность активности ферментов антиоксидантной системы исследуемой биологической жидкости и не ведет к накоплению в ней токсических продуктов ПОЛ.

Данный метод может быть рекомендован для длительного хранения фолликулярной жидкости человека при ее использовании в методиках нетрадиционного лечения бесплодия.

Т а б л и ц а 3

Влияние низкотемпературного хранения на антиоксидантную и антирадикальную активность фолликулярной жидкости человека

Вид активности	Контроль	Условия хранения	
		-12°C , 30 сут	-196°C , 30 сут
Глутатионпероксидазная с H_2O_2 (I)	$133,9 \pm 5,7$	$122,4 \pm 6,4^*$	$131,6 \pm 4,3$
Глутатионпероксидазная с гидроперекисью кумола (II)	$225,3 \pm 15,1$	$171,7 \pm 7,8^*$	$191,1 \pm 6,4$
II-I	$91,0 \pm 10,5$	$49,3 \pm 4,2^*$	$83,4 \pm 26,3$
Глутатионредуктазная	$26,0 \pm 1,8$	$23,5 \pm 1,0$	$22,6 \pm 1,5$
Глутатион-S-трансферазная	$252,4 \pm 25,5$	$174,3 \pm 13,5^*$	$244,7 \pm 26,2$
Антирадикальная (% ингибирования к контролю)	$65,3 \pm 1,4$	—	$61,3 \pm 2,7$

Примечание. * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Никитченко Ю.В. Влияние различных способов низкотемпературного хранения на антиоксидантную активность фолликулярной жидкости человека // Криобиология. – 1998. – № 2. – С. 53–57.
2. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Ланкин В.З. Ферменты утилизации гидропероксидов и O_2 в миокарде крыс разного возраста // Бюллетень эксперим. биол. и мед. – М.: Медицина, 1985. – 99, № 5. – С. 563–565.
3. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Свич И.В., Овсянников С.Е. Перекисное окисление липидов биологических мембран и его ферментативная регуляция при старении крыс // Укр. биохим. журн. – 1987. – 59, № 2. – С. 50–57.
4. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids. – 1980. – 15, № 3. – P. 137–140.
5. Avrech O., Fisch B., Shalgi R. Acrosomal status of human spermatozoa after follicular fluid or calcium ionophore challenge in relation to semen parameters and fertilising capacity *in vitro* // Andrologia. – 1997, Mar–Apr. – 29, № 2. – P. 97–101.
6. Comstock C.V., Norcus E.P., Hottman S.C. et al. Stability of ascorbic acid, carotenoids, retinol, and tocopherols in plasma stored at -70°C for 4 years // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 1995. – № 4(5). – P. 505–507.
7. Gerodes A.G. Use of native and cryopreserved follicular fluid for sperm fertility improvement in immunological infertility // Immun. of reprod. – Abstracts international symposium in Kiev, Oct. 22–25. – 1996. – P. 14.
8. Moorhouse P.C., Grootveld M., Halliwell B. et al. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers // Febs Lett. – 1987. – 213, № 1. – P. 23–28.
9. Racek J., Herynkova R., Holecek V. et al. Influence of antioxidants on the quality of stored blood // Vox Sang. – 1997. – № 72(1). – P. 16–19.
10. Webster N.R., Toothill C. Effect of blood storage on red cell antioxidative systems // Acta Haematol. – 1986. – № 75(1). – P. 30–33.
11. Yao Y.Q., Yeung W.S., Ho P.C. Human follicular fluid inhibits the binding of human spermatozoa to zona pellucida *in vitro* // Hum. Reprod. – 1996. – 11, № 12. – P. 2674–2680.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
НИИ биологии Харьковского гос. ун-та

Поступила 23.06.98

V. I. GRISHCHENKO, A. G. GERODES, YU. V. NIKITCHENKO

ВПЛИВ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗБЕРІГАННЯ НА ПЕРЕКИСНЕ ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ І АНТИОКСИДАНТНУ АКТИВНІСТЬ ФОЛІКУЛЯРНОЇ РІДИНИ ЛЮДИНИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків
НДІ біології Харківського державного університету

Досліджено вплив заморожування-відігріву та довгострокового зберігання в рідинному азоті та при -12°C фолікулярної рідини людини на вміст в ній гідроперексидів ліпідів, активність ряду антиоксидантних ферментів та її здібності перехоплювати ОН-радикали.

V. I. GRISCHENKO, A. G. GERODES, YU. V. NIKITCHENKO

EFFECT OF LOW TEMPERATURE STORAGE ON LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF HUMAN FOLLICULAR FLUID

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov
Scientific Research Institute of Biology of the Kharkov State University

There was studied the effect of freeze-thawing and long-term storage in liquid nitrogen and at -12°C of the human follicular fluid on the content of lipid hydroperoxides in it, activity of some antioxidative enzymes and ability for capturing OH-radicals.

Н.А.Лучко, И.Н.Кучков**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ МЕТИЛКСАНТИНА НА НЕКОТОРЫЕ
БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СПЕРМИЕВ ЧЕЛОВЕКА
ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ**

Исследовано влияние производных метилксантина на содержание АТФ и креатинфосфата в нормальных и астенических клетках до и после криоконсервации. Показана роль креатинфосфатной системы в поддержании концентрации АТФ в нативных и криоконсервированных спермиях человека.

Несмотря на успехи, достигнутые в области биохимии криоконсервированной спермы, многие частные вопросы еще далеки от разрешения [1]. В настоящее время установлено, что в процессе криоконсервирования страдает прежде всего биоэнергетика клетки. Об этом свидетельствуют как прямые исследования внутриклеточных ферментов, принимающих участие в энергетическом метаболизме [18], так и интегральный показатель выживаемости гамет [20]. Полагают, что возможной причиной криоповреждений является потеря клеткой цитоплазматических и митохондриальных субстратов и кофакторов в процессе криоконсервации [8, 10]. При замораживании суспензии спермиев известными способами выявлены, в частности, повреждения АТФ-азных систем митохондрий, ответственных за поступление энергетического материала в сократительный аппарат спермиев [24]. Проведенные биохимические исследования подтвердили, что в результате криоповреждения митохондрий уменьшается потребление фруктозы, угнетаются энергетические обменные процессы, снижаются подвижность и оплодотворяющая способность спермиев [21].

Способ сверхбыстрого охлаждения гамет, разработанный сотрудниками Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [11], может быть применён для замораживания спермы человека. Проведенные в отделе криобиологии систем репродукции ИПКиК НАНУ исследования влияния сверхбыстрого охлаждения на морфофункциональные свойства спермиев по данным содержания акрозина, состояния акросомы, активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и оплодотворяющих свойств гамет дали основание для использования нового подхода к реализации криозащиты спермиев при нормоспермии для клинических целей [3–5].

Астеноспермия, обусловленная прежде всего нарушениями в энергетической системе спермиев, создает серьезные препятствия для их клинического применения. С введением в практику способа криоконсервирования с использованием сверхбыстрых скоростей охлаждения биообъектов и сохранением их морфофункциональных свойств стало возможным замораживание спермиев с различными видами патологии, в частности при астеноспермии [6]. Показано, что с целью стимуляции биоэнергетики клеток при астено- и олигоспермии часто используют как физические, так и химические методы [2, 13], одним из которых является применение метилксантиновых ингибиторов фосфодиэстеразы [21, 26].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния некоторых фармакологических препаратов ряда метилксантина — кофеина и пентоксифиллина (РФ) на концентрацию АТФ и креатинфосфата в нормальных и астенических спермиях человека до и после криоконсервирования.

Объектом исследования служила нормальная и патологическая сперма человека, полученная из клиники. Образцы спермы от нормоспермических доноров ($> 20 \cdot 10^6$ клеток/мл, $> 40\%$ активно-подвижных форм, $> 40\%$ нормальных форм клеток) и астеноспермических доноров ($< 40\%$ активно-подвижных форм при прочих равных условиях) были получены путем мастурбации. Всего было исследовано 15 образцов спермы на содержание в них креатинфосфата (КФ) и АТФ. Стимуляцию биоэнергетики гамет достигали путем добавления растворов кофеина и РР в конечных концентрациях 6 и 3,5 мМ в соответствии с данными [26]. После добавления биостимуляторов сперма инкубировалась в течение 30 мин при 37 °С. Содержание АТФ и КФ определяли ферментативным методом по

Лампрехту и Тротшольду [7], регистрируя уровень содержания НАДФН в системе сопряженных ферментативных реакций фотометрически при 340 нм. Измерения проводили в среде состава: 100 мМ трис-НСl, рН 7,4, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. Реакционная смесь содержала глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гексокиназу, глюкозу, креатинфосфокиназу. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента-Фишера. Криоконсервацию спермиев осуществляли в условиях их сверхбыстрого охлаждения [8]. Результаты определения АТФ при нормо и астеноспермии представлены в табл. 1. Достоверно низкое ($P < 0,05$) содержание АТФ при астеноспермии — ($2,5 \pm 0,7$) нмоль/ 10^8 клеток, по сравнению с нормой — ($4,7 \pm 0,64$) нмоль/ 10^8 клеток, свидетельствует о возможном превалировании ее распада над синтезом либо нарушении способности клеток синтезировать АТФ при этой патологии. После отогрева спермиев достоверных изменений концентрации АТФ для нормо- и астеноспермических образцов, по сравнению с контрольными значениями до замораживания, не выявлено. Этот ре-

Т а б л и ц а 1

Содержание АТФ в сперме человека при нормо- и астеноспермии до и после криоконсервации с использованием производных метилксантина в среде инкубации

Условие эксперимента	Содержание АТФ, нмоль/ 10^8 клеток	
	нативная суспензия спермиев	криоконсервированная суспензия
Нормоспермия	$4,7 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,3$
6 мМ кофеина	$4,7 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,4$
3,5 мМ РР	$4,9 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,2$
Астеноспермия	$2,5 \pm 0,7$	$2,1 \pm 0,1^*$
6 мМ кофеина	$3,0 \pm 1,1$	$2,8 \pm 0,3$
3,5 мМ РР	$2,7 \pm 0,9$	$2,7 \pm 0,1$

Примечание. * — различия достоверны по отношению к контрольным значениям в группах нормо- и астеноспермии, $P < 0,05$ ($n = 15$).

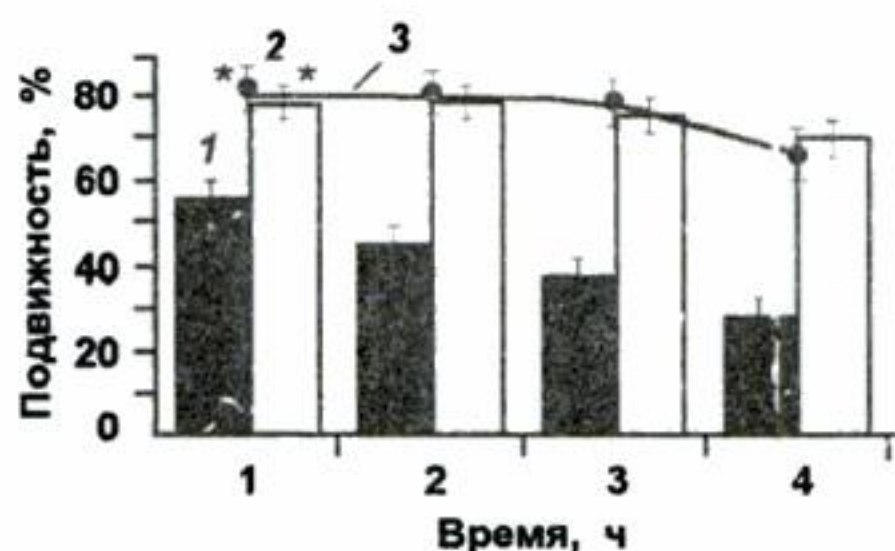


Рис. 1. Подвижность нативных спермиев человека (нормоспермия), инкубированных в растворах биостимуляторов при 37 °С: 1 — контроль, 2 — кофеин, 3 — РР; * — достоверные различия по сравнению с контролем при $P < 0,05$, $n = 15$

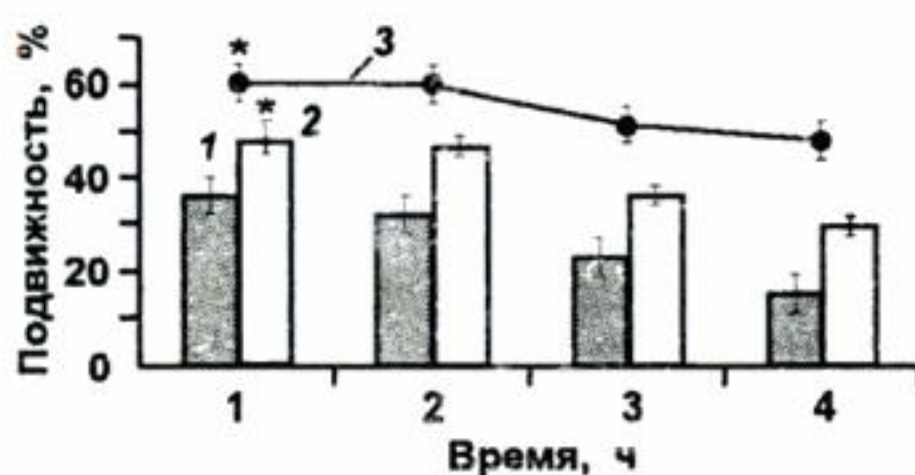


Рис. 2. Подвижность нативных астенических спермиев человека, инкубированных в растворах биостимуляторов при 37 °С: 1 — контроль, 2 — кофеин, 3 — РР; * — достоверные различия по сравнению с контролем при $P < 0,05$, $n = 15$

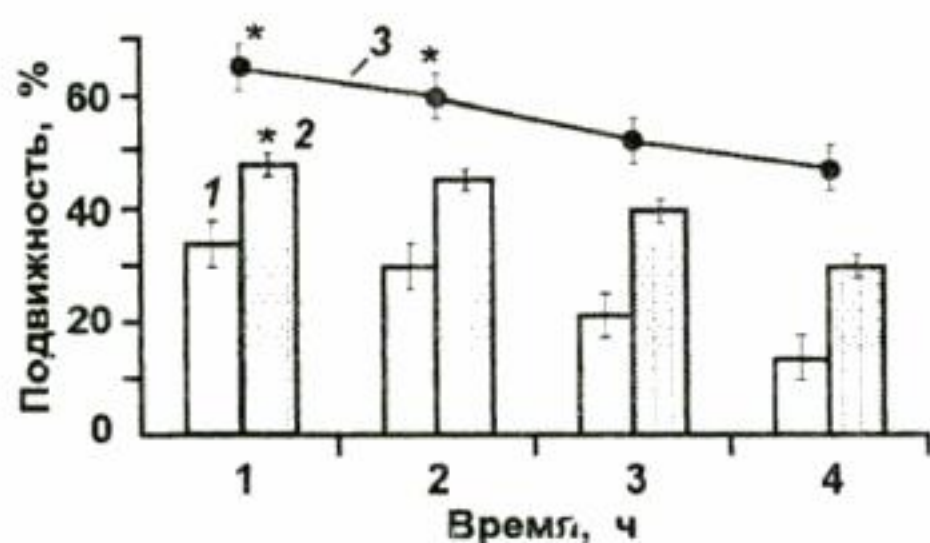


Рис. 3. Подвижность криоконсервированных астенических спермиев человека, инкубированных в растворах биостимуляторов при 37 °С: 1 — контроль, 2 — кофеин, 3 — PF; * — достоверные различия по сравнению с контролем при $P < 0,05$, $n = 15$

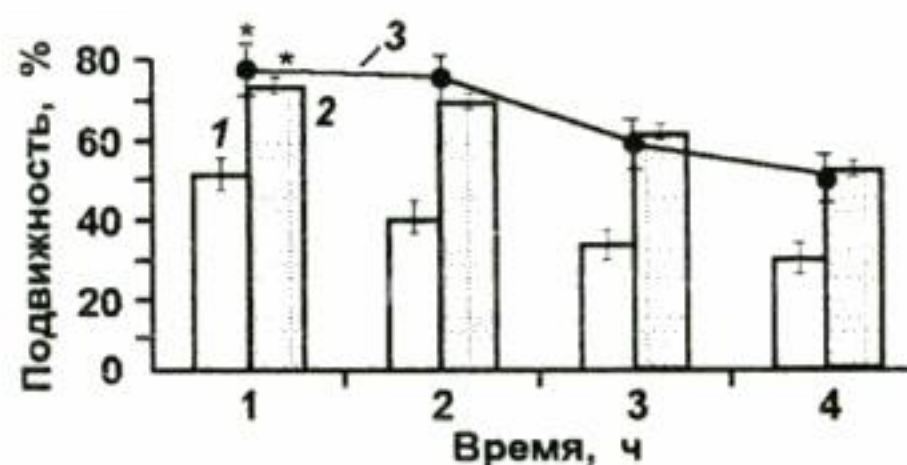


Рис. 4. Подвижность криоконсервированных спермиев человека при нормоспермии, инкубированных в растворах биостимуляторов при 37 °С: 1 — контроль, 2 — кофеин, 3 — PF; * — достоверные различия по сравнению с контролем при $P < 0,05$, $n = 15$

зультат свидетельствует о высокой сохранности спермиев человека, перенесших криоконсервирование в условиях сверхбыстрого охлаждения.

Стимулирующий эффект ингибиторов фосфодиэстеразы (ФДЭ) проявлялся как в норме, так и при патологии (рис. 1, 2). При наличии стимулирующих факторов подвижность спермиев была наибольшей в случае воздействия PF на отогретые астенические клетки (рис. 3), в отличие от таковых при нормоспермии после криоконсервации (рис. 4).

Можно предположить, что при астеноспермии имеет место повышенная активность ФДЭ в клетках, в результате чего их подвижность находится на низком уровне. С другой стороны, суммарное воздействие метилксантинов и процесса замораживания-отогрева позволяет, очевидно, снизить активность этого фермента настолько, что увеличение процента подвижных форм спермиев при этой патологии оказывается максимальным.

Результаты экспериментов показали, что при нормо- и астеноспермии, несмотря на увеличение подвижности спермиев, стимулированных с применением производных метилксантина, содержание АТФ в них остается на прежнем уровне (табл. 1). Из данных литературы известно, что увеличение подвижности спермиев быка приводило к заметному снижению уровня АТФ [16, 19]. Аналогичный результат был ранее получен в экспериментах на сперме хряков [17], в которых использование кофеина в качестве стимулятора приводило к уменьшению содержания АТФ и соответственно к повышению уровней АДФ и АМФ на фоне увеличения подвижности клеток.

Известно, что АТФ играет ключевую роль в биоэнергетике любой клетки. Спермии человека генерируют ее преимущественно в цикле гликолиза (фруктолиза) [22] и значительно меньше — путем окислительного фосфорилирования [15, 25]. Тем не менее общий пул АТФ обеспечивает спермию энергией для движения [27], основных ионных градиентов [12] и является источником цАМФ [23]. Показатели содержания АТФ положительно коррелируют с показателями подвижности спермиев [14].

Таким образом, есть все основания полагать, что несоответствие между увеличением подвижности спермиев и содержанием АТФ происходит из-за того, что спермии человека реализуют генерируемый ими АТФ посредством эффективного буфера, которым может являться система креатин-креатинфосфат.

Исследования, проведенные с целью выяснения этого предположения (табл. 2), показали высокое содержание в спермиях креатинфосфата — $(28,82 \pm 0,63)$ нмоль/ 10^8 клеток, что приблизительно в 6 раз выше, чем количество АТФ. При астении до замораживания уровень креатинфосфата был ниже

($p < 0,05$) и составлял ($11,04 \pm 0,85$) нмоль/ 10^8 клеток, что однако также превышает содержание АТФ при этой патологии. После отогрева спермиев, уровень АТФ незначительно, но достоверно ($p < 0,05$) повышался, что, очевидно, связано с активацией энергетического обмена клетки для репарационных процессов после стресса (табл. 2).

Из табл. 2 следует, что использование производных метилксантина в качестве стимуляторов подвижности нормальных и астенических спермиев человека, подвергнутых криоконсервации с применением сверхбыстрых скоростей охлаждения, приводит к увеличению подвижности и общего пула АТФ в этих клетках. Отсутствие роста концентрации АТФ в спермиях при их стимуляции кофеином и РР может свидетельствовать о высокой буферной емкости системы креатин-креатинфосфат. Наличие данного буфера позволяет спермиям регулировать скорость синтеза и распада АТФ в условиях повышенного синтеза последней при стимуляции клеток метилксантинами.

Эксперименты показали, что при астеноспермии, для которой характерно снижение биоэнергетических показателей спермиев, в первую очередь изменяется содержание креатинфосфата. Причем после криообработки и стимуляции спермиев РР концентрация КФ в них была значительно выше по сравнению с клетками, подвергшимися стимуляции без замораживания-отогрева (табл. 2). Это может быть связано в первую очередь с более выраженным дестабилизирующим действием процесса замораживания-отогрева на цитоплазматические мембраны спермиев при астеноспермии, что приводит к более эффективному проникновению стимулятора внутрь этих клеток.

Таким образом, анализ результатов экспериментов позволяет предположить, что энергия окислительных процессов спермиев человека, полученная в виде АТФ, используется для осуществления их двигательной функции не непосредственно. Возможно, креатинфосфокиназная система, которая играет важную роль в функционировании клеток сердца при ишемии, нервных окончаний и скелетных мышц [9, 28], принимает непосредственное участие в контроле энергетического режима работы митохондрий спермиев человека, и эта регуляция имеет свои особенности при астеноспермии. Есть основания полагать, что определение содержания креатинфосфата в криоконсервированных спермиях человека является важным критерием оценки состояния энергетического метаболизма этих клеток не только в норме, но и при патологии.

В заключение можно сделать следующие выводы:

— присутствие производных метилксантинов в суспензии нативных и криоконсервированных спермиев человека приводит к увеличению содержания АТФ и КФ. Эффект доказан как для суспензии спермиев с нормоспермией, так и при астеноспермии;

Т а б л и ц а 2

Содержание креатинфосфата в спермиях человека при нормо- и астеноспермии до и после криоконсервации с использованием производных метилксантина в среде инкубации

Условие эксперимента	Содержание креатинфосфата, нмоль/ 10^8 клеток	
	нативная суспензия спермиев	криоконсервированная суспензия
Нормоспермия	$28,82 \pm 0,63$	$30,97 \pm 0,48$
6 мМ кофеин	$33,33 \pm 0,48^*$	$36,34 \pm 0,54^*$
3,5 мМ РР	$42,23 \pm 0,33^*$	$41,69 \pm 0,26^*$
Астеноспермия	$11,04 \pm 0,85$	$12,22 \pm 0,41$
6 мМ кофеин	$13,93 \pm 0,66^*$	$17,68 \pm 1,13^*$
3,5 мМ РР	$16,48 \pm 0,35^*$	$23,15 \pm 0,41^*$

Примечание. * — различия достоверны по отношению к контрольным значениям в группах нормо- и астеноспермии, $P < 0,05$ ($n = 15$).

— спермии человека, криоконсервированные в условиях сверхбыстрых скоростей охлаждения, отвечают на стимулирующее действие производных метилксантина увеличением подвижности и переживаемости, особенно при астеноспермии;

— показатели подвижности и переживаемости спермиев, криоконсервированных с использованием сверхбыстрых скоростей охлаждения, выше в случае выраженной астеноспермии при стимуляции РФ;

— буферная емкость системы креатин-креатинфосфат позволяет поддерживать постоянство концентрации АТФ в спермиях человека, обеспечивая оптимальный режим работы их энергетической системы в среде, содержащей биостимуляторы, производные метилксантина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – 1994. – К.: Наук. думка, 430 с.
2. Вишневский В.И. Применение ультразвука при криоконсервации клеточных суспензий: Автореф. дис.... д-ра биол. наук. – Харьков, 1990. – 40 с.
3. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А. Некоторые аспекты криоконсервации эмбрионов и спермы // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 2. – С. 29–37.
4. Лучко Н.А. Вплив умов понадшвидкого охолодження на морфофункціональні властивості спермій та ембріонів: Автореф. дис... докт. биол. наук. – Харків, 1997. – 43 с.
5. Лучко Н.А. Новый підхід до проблеми криоконсервування сперми донорів з метою її клінічного використання // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 1997. – № 5. – С. 45–47.
6. Лучко Н.А., Кучков И.Н. Повышение эффективности криоконсервации спермиев человека при астеноспермии // Сексология і андрология. – Вип. 4. – С. 112.
7. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Учеб. пособие / Под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 256 с.
8. Петренко А.Ю. Энергетическое состояние и метаболизм ксенобиотиков в изолированных гепатоцитах в зависимости от условий выделения и криоконсервирования клеток. Автореф. дис.... д-ра биол. наук. – Харьков, 1993. – 31 с.
9. Сакс В.А., Джалилашвили И.В., Конорев Е.А., Струмиа Э. Молекулярные и клеточные аспекты кардиопротективного действия фосфокреатина // Биохимия. – 1992. – 57, № 12. – С. 1763–1784.
10. Суббота Н.П. Функціональний стан криоконсервованих гепатоцитів людини та тварин. Автореф. дис.... докт. біол. наук. – Харків, 1993. – 33 с.
11. А.с. 1469580 СССР, МКИ⁴ А 01 N 1/00. Способ криоконсервирования эмбрионов / В. И. Грищенко, Ю. В. Калугин, Ю. С. Паращук, Н. А. Лучко и др. Не публикуется.
12. Borle A.B. Control, modulation and regulation of cell calcium // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. – 1981. – 90. – P. 13.
13. Colon J.M., Ginsburg F., Lessing J.B. et al. The effect of relaxin and prostaglandin E₂ on the motility of human spermatozoa // Fertil. Steril. – 1986. – 46. – P. 1133–1139.
14. Calamera J.C., Brugo S., Vilario. Relationship between motility and adenosine triphosphate (ATP) in human spermatozoa // Andrologia. – 1982. – 14. – P. 239.
15. Ford W.C.L., Harrison A. The role of oxidative phosphorylation in the generation of ATP in human spermatozoa // J. Reprod. Fertil. – 1981. – 63. – P. 271–278.
16. Garbers D., Lust W.D., Lardy H.A. et al. The stimulation of bovine epididymal sperm metabolism by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors on ejaculated porcine spermatozoan metabolism // Biol. Reprod. – 1973a. – 8. – P. 599–606.
17. Garbers D., Lust W.D., Lardy H.A. et al. The effect of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors on ejaculated porcine spermatozoan metabolism // Biol. Reprod. – 1973b. – 8. – P. 589–598.
18. Guerin J.F., Menezo Y., Czyba J.C. Modification of the dehydrogenase activities of human sperm after freezing in liquid nitrogen // Cryobiology. – 1979. – 16. – P. 443–447.
19. Halangk W., Bohnensacs R. et al. Interdependence of mitochondrial ATP production and extra mitochondrial ATP utilisation in intact spermatozoa // Biochem. Biophys. Acta. – 1985. – P. 316–322.
20. Hagland H., Pincus G. Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen // J. Gen. Physiol. – 1942. – 25. – P. 337–345.
21. Lewis S.E.M., Moohan J.M., W. Thompson. Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis // Fertil. Steril. – 1993. – 59. – P. 418–423.
22. Mann T. Fructose and fructolysis in semen in relation to fertility // Lancet. – 1948. – № 6499.
23. Menon K.M.J., Gunaga K.P. Role of cyclic AMP in reproductive processes // Fertil. Steril. – 1974. – 25. – P. 732–739.
24. Pedersen H., Lebech P.E. Ultrastructural changes in the human spermatozoa after freezing for artificial insemination // Fertil. Steril. – 1971. – 22, № 2. – P. 125–133.

25. *Peterson R.N., Freund M.* ATP synthesis and oxidative metabolism in human spermatozoa // *Biol. Reprod.* – 1970. – 3. – P. 4–12.
26. *Rees J.M., Ford W.C.L., Hull M.G.R.* Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa // *J. Reprod Fertil.* – 1990. – 90. – P. 147–156.
27. *Suter I., Chow P.Y.W., Martin I.C.A.* Maintenance of motility in human spermatozoa by energy derived through oxidative phosphorylation and addition of albumin // *Biol. Reprod.* – 1979. – P. 5056–5063.
28. *Yager J.Y.* Correlation between content of high-energy phosphates and hypoxic-ischemic damage in immature and mature astrocytes // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 1994. – 14. – P. 62.

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

Поступила 24.03.98

Н. А. ЛУЧКО, І. М. КУЧКОВ

ВПЛИВ ПОХІДНИХ МЕТИЛКСАНТИНУ НА ДЕЯКІ БІОЕНЕРГЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ СПЕРМІЇВ ЛЮДИНИ ДО ТА ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчено вплив похідних метилксантину на вміст АТФ та креатинфосфату в нормальних та астенічних клітинах як до, так і після кріоконсервації. Показана роль креатинфосфатної системи в підтриманні концентрації АТФ в нативних та кріоконсервованих сперміях людини.

N. A. LUCHKO, I. N. KUCHKOV

EFFECT OF METHYL XANTHINE DERIVATIVES UPON SOME BIOENERGETIC PARAMETERS OF HUMAN SPERMATOZOA PRIOR TO AND AFTER CRYOPRESERVATION

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

The effect of methyl xanthine derivatives on the content of ATP and creatine phosphate in the normal and asthenic cells was studied prior to and after cryopreservation. The role of a creatine phosphate system in maintaining the ATP concentration in the native and cryopreserved human spermatozoa was demonstrated.

УДК 576.3: 57.043: 577.3

Н.П.Суббота, П.П.Пашинский

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

4-(п-ДИМЕТИЛАМИНОСТИРИЛ)-І-МЕТИЛПИРИДИНИЯ В ГЕПАТОЦИТАХ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ХРАНЕНИИ

Описано изменение энергетического состояния паренхиматозных клеток печени в присутствии флуоресцирующего красителя 4-(п-диметиламиностирил)-І-метилпиридиния (ДСМ) после действия низких положительных и субнулевых температур. В полученных из печени клетках в присутствии разбавителя 2,4-динитрофенола (ДНФ) происходит снижение интенсивности флуоресценции клеточных компонентов. Замороженно-отогретье и хранимые при гипотермических температурах клетки характеризуются резким снижением максимума флуоресценции ДСМ и лишь незначительным дополнительным снижением интенсивности флуоресценции в присутствии разбавителя.

Эффективное использование гепатоцитов в клинических целях в качестве заместительной терапии при некоторых патологических состояниях организма требует решения ряда задач: получения жизнеспособных клеток, выбора простых и информативных методов определения их морфофункциональной сохранности при различных способах длительного хранения. Наиболее актуальной является проблема разработки методов длительного хранения гепатоцитов с целью создания банка. В этом случае используют низкие положительные и субнулевые температуры [4, 5].

Для оценки структурно-функциональной полноценности клеток при решении названных задач широко используют исследования состояния мембранных систем клетки с помощью флуоресцентных зондов [3]. Подобные приемы получили широкое распространение в криобиологии, где степень криоповреждения определяется, как доказано, криочувствительностью мембранных структур.

С целью определения влияния низких температур (2–4 и –196 °С) на изолированные гепатоциты использовали полихроматический потенциалзависимый флуоресцентный краситель 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний (ДСМ). Краситель позволяет одновременно тестировать состояние цитоплазматической мембраны и клеточных компонентов: митохондрий, ядра, а также судить об энергопродуцирующей способности клеток [2, 3]. В работе использовали флуоресцентный краситель ДСМ, синтезированный в Институте оргсинтеза АН Латвии. Гепатоциты получали коллагеназным методом из печени белых беспородных крыс. При инкубации гепатоцитов раствор ДСМ в воде добавляли в конечной концентрации 12 мкМ. Время эквilibрации клеток с красителем — 15 мин. Клетки окрашивали добавлением водного раствора ДСМ к клеточной суспензии до конечной концентрации 12 мкМ и инкубировали 15 мин. Для обработки клеток, окрашенных ДСМ, разобщитель ДНФ добавляли в водный раствор до конечной концентрации 0,2 мМ. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури. Спектры

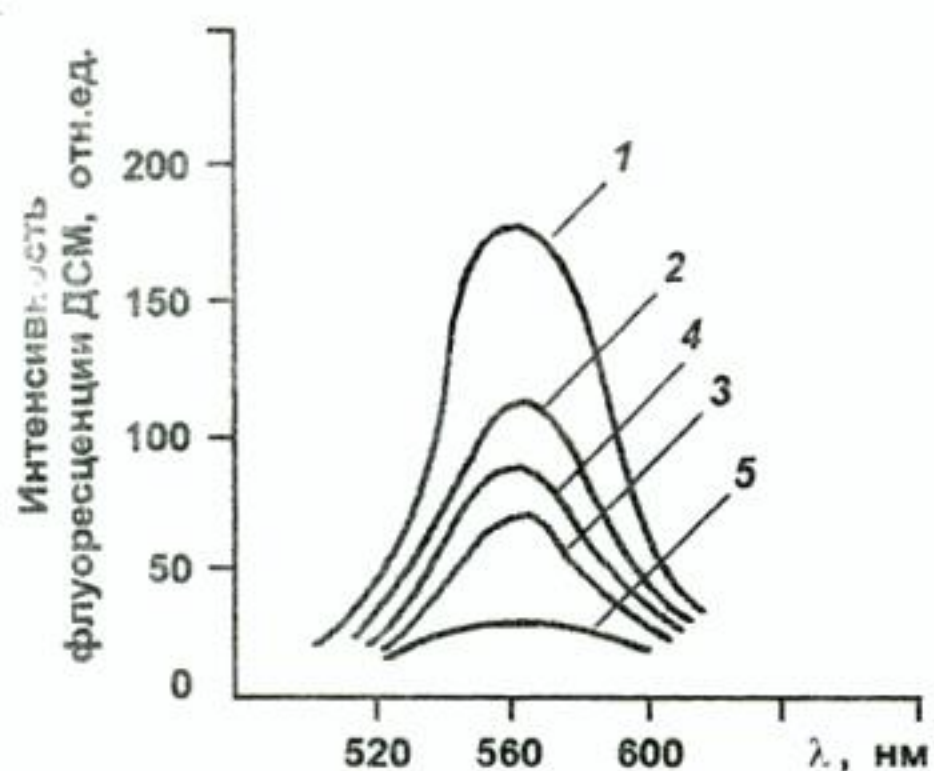


Рис. 1. Спектры флуоресценции ДСМ: 1 — контроль; 2 — после 48 ч хранения при 2–4 °С; 3 — спустя 72 ч хранения при 2–4 °С; 4 — хранение при –196 °С (в среде без криопротектора); 5 — деэнергизация клетки (в среде с ДНФ)

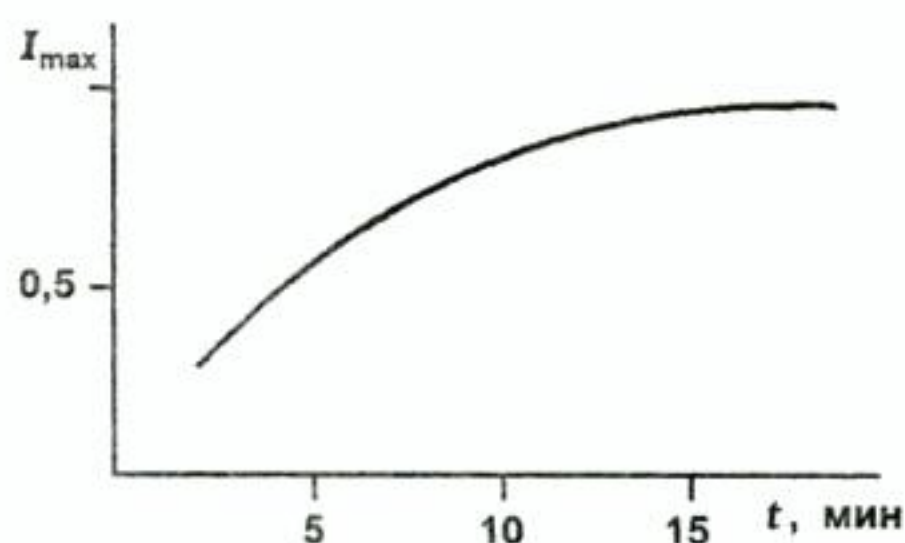


Рис. 2. Кинетика флуоресценции ДСМ при эквilibрации с гепатоцитами

флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре “Hitachi” MPF-2A (Япония) в кюветах объемом 3 мл при возбуждении длиной волны 465 нм в среде 0,01 М трис-НСl. Гепатоциты хранили при температуре 2–4 °С от 0 до 72 ч, а также при –196 °С (замораживание со скоростью 300–400 °С/мин до –196 °С).

В буферном растворе при $pH = 7,4$ флуоресцентный краситель имеет максимум поглощения 450 нм, максимум флуоресценции — 580 нм и максимум возбуждения — 465 нм. В присутствии клеток печени интенсивность флуоресценции красителя резко возрастает и характер спектра изменяется. Связывание ДСМ с мембранами приводит к сдвигу положения максимума флуоресценции красителя до 550 нм (рис. 1, 1). Происходит накопление красителя в клетках, и флуоресценция гепатоцитов возрастает (рис. 2). Кинетика роста интенсивности флуоресценции красителя отражает процесс его проникновения в клетку и связывание с мембранами [2]. При этом накопление зонда-катиона происходит двухступенчато: накопление в цитоплазме по отноше-

нию к внешней среде и накопление в митохондриях по отношению к цитоплазме. Концентрирование зонда клетками обусловливается трансмембранным потенциалом цитоплазматической и митохондриальной мембран. Величины потенциалов при этом не зависят от присутствия ДСМ. Через 15 мин достигается равновесная концентрация зонда внутри митохондрий, т.е. поток катионов зонда через мембрану практически равен нулю, судя по стабилизации величины флуоресценции. Добавка 2,4-динитрофенола (ДНФ) к гепатоцитам приводит к значительному снижению интенсивности флуоресценции ДСМ (рис. 1, 5): флуоресценция красителя чувствительна к изменению энергетического состояния клеток.

Окрашенный с помощью ДСМ гепатоцит дает флуоресцентное изображение, состоящее из: зеленой плазматической мембраны, ярко-желтых митохондрий, красно-оранжевого ядра. При этом интенсивность флуоресценции митохондрий значительно выше, чем плазматической мембраны и ядра. При добавлении ДНФ к гепатоцитам происходит снижение интенсивности флуоресценции красителя в митохондриях и она при этом из ярко-желтой становится бледно-зеленой.

После замораживания гепатоцитов со скоростью 300–400 °С/мин и последующего отогрева (рис. 1, 4) интенсивность флуоресценции красителя снижается на 40%. Митохондрии в таких гепатоцитах практически дезэнергизованы: добавка разобщителя ДНФ приводит лишь к незначительному дополнительному снижению интенсивности флуоресценции. При гипотермическом хранении интенсивность флуоресценции зонда спустя 48 и 72 ч практически не отличается от показателей в замороженно-отогретых клетках (рис. 1, 3 и 1, 2 соответственно). При медленном (1 °С/мин) охлаждении гепатоцитов до –196 °С на флуоресцентном изображении отсутствует не только зеленая флуоресценция плазматической мембраны, но и полностью — флуоресцентное изображение ядра клетки.

Доказано, что в основе реакций клеток на холодовое воздействие лежит развитие двух инициирующих механизмов, ведущих к дестабилизации мембраны: термодинамически обусловленное ослабление гидрофобных взаимодействий и фазовые переходы липидов в мембранах [1]. Фазово-структурные переходы в плазматической мембране гепатоцитов и мембранах митохондрий служат основой для латерального разделения липидов в бислое мембраны и формирования различных по составу липид-липидных и липид-белковых доменов, что приводит к перемешиванию липидного бислоя мембраны и его “комкованию” в виде отдельных участков. Все это создает условия для формирования микро- и макроскопических дефектов в структуре мембраны, следствием чего является резкое возрастание ее проницаемости для ионов и биомолекул. Вместе с тем известно, что обязательным условием для сопряжения процессов окисления субстратов с синтезом АТФ является проницаемость мембраны для ионов. Увеличение ионной проницаемости сопровождается разобщением процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, приводящим к падению трансмембранного потенциала. От величины трансмембранного потенциала зависит распределение ионов между внешней средой и цитоплазмой. Деполяризация плазматической мембраны клеток в несколько раз снижает интенсивность флуоресценции ДСМ. Увеличение протонной проницаемости митохондриальных мембран и дезинтеграция клетки в наших экспериментах подтверждают значительное снижение суммарной интенсивности флуоресценции красителя при хранении гепатоцитов в зоне низких температур. Снижение интенсивности зеленого свечения красителя обусловлено

структурными изменениями липидов плазматической мембраны клеток после отогрева. Являясь положительно заряженным ионом, ДСМ, в условиях дыхания и окислительного фосфорилирования, значительно меньше накапливается внутри митохондрий, так как мембранный потенциал их резко снижен. Вместе с тем интенсивность флуоресценции зонда в митохондриях г. и всех условиях выше.

Таким образом, флуоресцирующий краситель ДСМ является простым и удобным для тестирования общего морфофункционального статуса гепатоцитов при разработке методов гипотермического и низкотемпературного консервирования. Присутствие зонда в среде позволяет одновременно судить о состоянии основных клеточных компонентов на этапе деконсервации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 256 с.
2. Добрецов Г. Е., Косников В. В., Морозова Г. И. и др. Измерение градиента концентрации флуоресцентного зонда-катиона ДСМ на плазматической и митохондриальной мембранах лимфоцита // Биол. мембраны. – 1986. – 3, № 3. – С. 266–273.
3. Морозова Г. И., Добрецов Г. Е., Дубур Г. Я. и др. Флуоресценция 4-(п-диметиламиностирил)-I-метилпиридиния в живой клетке // Цитология. – 1981. – 23, № 8. – С. 916–922.
4. Fuller B. J., James E. Cryopreservation of isolated rat hepanocytes in pellet form // Cryo-Lett. – 1985. – № 1. – P. 49–56.
5. Gomez-Lechom, Lopez P., Castell. Cryopreservation of isolated adult hepanocytes // Biol. Cell. – 1984. – 52. – P. 58.

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

Поступила 27.01.98

Н. П. СУБОТА, П. П. ПАШИНСЬКИЙ

ФЛУОРЕСЦЕНЦІЯ 4-(Н-ДИМЕТИЛАМІНОСТИРИЛЬ)-І-МЕТИЛПІРІДІНІЯ В ГЕПАТОЦИТАХ ПРИ ГІПОТЕРМІЧНОМУ ТА НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОМУ ЗБЕРІГАННІ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Описано зміну енергетичного стану паренхіматозних клітин печінки в присутності флуоресцируючого фарбника 4-(п-диметиламиностирил)-I-метилпиридиния (ДСМ) після дії низьких та субнульових температур. В отриманих з печінки клітинах в присутності роз'єднувача 2,4-дінітрофенола відбувається зниження інтенсивності флуоресценції клітинних компонентів. Заморожено-відігріті клітини, що зберігаються при гіпотермічних температурах, характеризуються різким зниженням максимуму флуоресценції ДСМ та лише незначним зниженням інтенсивності флуоресценції в присутності роз'єднувача.

N. P. SUBBOTA, P. P. PASHINSKY

FLUORESCENCE OF 4-(N-DIMETHYL AMINOSTIRYL)-I-METHYL PYRIDINIUM IN HEPATOCYTES DURING HYPOTHERMIC AND LOW TEMPERATURE STORAGE

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

The authors observed a change in the energetic state of parenchymous liver cells in the presence of a fluorescent dye 4-(n-dimethyl aminostiryl)-I-methyl pyridinium (DSM) after exposure to low positive and subzero temperatures. The intensity of fluorescence of cell components is reduced in the presence of a 2,4-dinitrophenol (DNP) in the cells, harvested from the liver. Frozen-thawed cells, stored at hypothermic temperatures, are characterized by a rapid reduction in the maximum fluorescence of DSM and minor additional decrease in the fluorescence intensity in the presence of the uncoupler.

С.Е.Гальченко, А.В.Мамонтова, Б.П.Сандомирский**СОХРАННОСТЬ СПЛЕНОЦИТОВ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ СЕЛЕЗЕНКИ**

Показано, что при криоконсервировании фрагментов селезенки свиньи под защитой ПЭО-400 и ПЭО-1500 в концентрациях 10 и 20% со скоростью охлаждения 1 °С/мин биоэнергетические показатели спленоцитов, количество жизнеспособных клеток, мембранный потенциал и их фагоцитарная активность сохраняются на близком к контрольному уровню.

Селезенку относят к лимфоидным органам, так как в ней происходит размножение лимфоцитов, которые поступают в кровь. Помимо этого селезенка выполняет важную роль в поддержании иммунологического статуса организма и в захвате микроорганизмов из кровяного русла. При использовании фрагментов селезенки в контурах для экстракорпоральной гемоперфузии наиболее важное значение имеют две последние функции [1].

Использование криоконсервированных фрагментов селезенки в контурах экстракорпоральной гемоперфузии при септических состояниях подразумевает определенный уровень сохранности жизнеспособности биологического объекта и его специфических функций, в частности определенный уровень сохранности спленоцитов. Установлено, что при положительных температурах спленоциты сохраняются в жизнеспособном состоянии в течение ограниченного промежутка времени [2]. В этих условиях в клетках достаточно интенсивно протекают обменные процессы, что приводит к их старению, накоплению в среде продуктов жизнедеятельности и распада, и в результате — к гибели клеток.

Наиболее эффективными оказались методы консервации спленоцитов и других биологических объектов с использованием низких температур. Программное замораживание биологических объектов является наиболее эффективным и позволяет достичь высокой повторяемости результатов. В связи с этим мы в настоящей работе изучали влияние режимов криоконсервирования на сохранность некоторых функций спленоцитов, выделяемых из тканевых фрагментов до и после их криоконсервирования. Выбор криопротекторов и скорости охлаждения произведен на основании ранее полученных данных об интенсивности эндогенного дыхания фрагментов селезенки и характере перекисных процессов в ткани в зависимости от применяемых криопротекторов и скоростей охлаждения. Объектом криоконсервирования служили фрагменты селезенки половозрелых свиней. Селезенку получали на Харьковском мясокомбинате и доставляли в лабораторию на льду.

Селезенку иссекали на фрагменты массой 2–5 мг и три раза отмывали в 10-кратном объеме физиологического раствора. В качестве криопротекторов использовали ПЭО-400 и ПЭО-1500 в конечных концентрациях 10 и 20%. Растворы криопротекторов, содержащих их двойную концентрацию, добавлялись капельно к фрагментам ткани в соотношении 1:1. Взвесь фрагментов расфасовывалась в пластиковые контейнеры объемом 1 мл или в контейнеры из фольги для сверхбыстрого замораживания. Замораживание со скоростями 1, 10 и 100 °С/мин проводилось с помощью программного замораживателя УОП-6, а с большими скоростями — с помощью устройства для замораживания биологических объектов [5]. Отогрев осуществляли на водяной бане при 40 °С. Отмывка от криопротекторов проводилась сахарозными средами с последующей их заменой на физиологический раствор.

Спленоциты получали из фрагментов селезенки половозрелых свиней путем щадящей гомогенизации в охлажденном до 4 °С Рингер-фосфатном буфере. Суспензию фильтровали через 6 слоев нейлона. Клетки осаждали центрифугированием при 250g в течение 10 мин. Осадок клеток ресуспендировали в том же буфере. Количество изолированных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность полученных клеток определяли по их окрашиванию витальным красителем трипановым синим. Для этого клетки инкубировали с 0,3%-м раствором красителя в течение 5 мин при комнатной температуре и затем подсчитывали долю поврежденных клеток, которые имели ярко выраженную голубую окраску ядра либо ядра и цитоплазмы.

Определение интенсивности дыхания и сопряженности дыхания и окислительного фосфорилирования определяли полярографическим способом. В кювету полярографа, содержащую 1 мл среды 199, добавляли последовательно клетки, сукцинат — 10 мМ и ДНФ — 100 мкМ. Скорость потребления кислорода рассчитывали на 10^8 клеток. Сохранность мембранного потенциала митохондрий определяли с помощью флуоресцентного зонда ДСМ (4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний) и выражали в относительных единицах [4]. Фагоцитарную активность спленоцитов определяли хемилюминесцентным методом [3].

В табл. 1 представлены данные об интенсивности дыхания и сопряженности дыхания и окислительного фосфорилирования в спленоцитах после криокон-

Т а б л и ц а 1
Интенсивность дыхания (нмоль O_2 /мин 10^8 кл) и окислительное фосфорилирование в спленоцитах, выделенных из фрагментов селезенки после их криоконсервирования, в зависимости от криопротектора и его концентрации (скорость охлаждения 1 °С/мин)

Режим криоконсервирования	V_0	$V_{\text{ДНФ}}/V_0$	$V_{\text{сукц}}/V_0$
Контроль	$9,1 \pm 0,9$	$1,9 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$
Без криопротектора	$3,1 \pm 0,1^*$	$1,2 \pm 0,1^*$	$2,2 \pm 0,2^*$
ПЭО-400	10%-й	$8,3 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,2$
	20%-й	$8,0 \pm 1,0$	$1,8 \pm 0,2$
ПЭО-1500	10%-й	$7,1 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,1^*$
	20%-й	$7,8 \pm 1,2$	$1,7 \pm 0,1$

Примечание. * — достоверно отличаются от контроля, $P > 0,05$.

сервирования фрагментов селезенки под защитой ПЭО-400 и ПЭО-1500 в концентрациях 10 и 20% и без криопротектора. Скорость охлаждения составляла 1 °С/мин. Как видно из этих данных, замораживание без криопротектора приводит к значительному снижению эндогенного дыхания, разобщению дыхания и окислительного фосфорилирования, а также к значительной стимуляции дыхания сукцинатом. Использование указанных выше криопротекторов позволяет сохранить исследованные показате-

Т а б л и ц а 2
Количество сохраняемых спленоцитов, выделенных из фрагментов селезенки, в зависимости от режимов криоконсервирования (скорость охлаждения 1 °С/мин)

Режим криоконсервирования	Количество неокрашенных клеток, % от контроля	Интенсивность люминесценции ДСМ, отн.ед.	Интенсивность хемилюминесценции, имп/мин
Контроль	93	137 ± 14	$1\,975 \pm 87$
Без криопротектора	37*	$58 \pm 13^*$	$573 \pm 22^*$
ПЭО-400	10%-й	120 ± 16	$1\,630 \pm 69^*$
	20%-й	129 ± 12	$1\,810 \pm 87$
ПЭО-1500	10%-й	113 ± 18	$1\,587 \pm 95^*$
	20%-й	130 ± 19	$1\,670 \pm 101$

Примечание. * — достоверно отличаются от контроля, $P > 0,05$.

ли на уровне, практически не отличающемся от контроля, т.е. такие режимы криоконсервирования позволяют сохранить целостность плазматических мембран клеток и их биоэнергетические показатели.

В табл. 2 представлены данные о сохранности клеток до и после криоконсервирования, определяемой по исключению трипанового синего, а также мембранный потенциал митохондрий и фагоцитарная активность спленоцитов. Можно сделать вывод, что эти показатели практически не отличаются от контроля при использовании криопротекторов ПЭО-400 и ПЭО-1500. Таким образом, предложенные режимы криоконсервирования позволяют добиться высокой сохранности криоконсервированного биоматериала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коблов Н. Л., Сускова В. С., Перепинова Т. С. и др. Гемоперфузия через криоконсервированные фрагменты ткани ксеноселезенки при гнойно-септических состояниях в урологии // Урология и нефрология. – 1991. – № 4. – С. 25–30.
2. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А. А. Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
3. Мицнефес М. М., Маянский А. Н., Невмятуллин А. Л., Сафонов В. В. Определение реактивной люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 45–46.
4. Морозова Г. И., Добрецов Г. Е., Дубур Г. Я. и др. Флуоресценция (4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния) в живой клетке // Цитология. – 1981. – XXIII, № 8. – С. 916–923.
5. А. с. 1655426 СССР. Устройство для замораживания биологических объектов / В. И. Грищенко, В. Ф. Тарасов, С. Е. Гальченко и др. Не публикуется.

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

Поступила 06.10.97

С. Є. ГАЛЬЧЕНКО, А. В. МАМОНТОВА, Б. П. САНДОМИРСЬКИЙ

ЗБЕРЕЖЕННЯ СПЛЕНОЦИТІВ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ФРАГМЕНТІВ СЕЛЕЗІНКИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Показано, що при кріоконсервуванні фрагментів селезінки свині під захистом ПЕО-400 і ПЕО-1500 в концентраціях 10 і 20% зі швидкістю охолодження 1 °С/хв біоенергетичні показники спленоцитів, кількість життєздатних клітин, мембранний потенціал та їх фагоцитарна активність зберігаються на рівні, близькому до контрольного.

S.E.GALCHENKO, A.V.MAMONTOVA, B.P.SANDOMIRSKY

SURVIVAL OF SPLENOCYTES AFTER CRYOPRESERVATION OF SPLEEN FRAGMENTS

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

During cryopreservation of the porcine spleen fragments under protection of PEO-400 and PEO-1500 in the concentrations of 10 and 20% and the rate of cooling of 1 °C/min the bioenergetical characteristics of the splenocytes, the amount of viable cells, membrane potential and their phagocytic activity are maintained at the level, close to control.

**А.Б.Рикберг, В.А.Трушина, С.С.Есьман, В.В.Роганова,
Ю.П.Верхогляд, Е.И.Капинус, Т.В.Ковалева, Е.Е.Перский**

ИЗУЧЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ХЛОРИНА e_6 В МОЗГЕ КРОЛИКА ПОСЛЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ

На основании анализа спектров люминесценции экстрагированного из мозга кроликов фотосенсибилизатора хлорина e_6 показано повышенное накопление красителя в зонах замораживания по сравнению с незамороженными участками мозга. Полученный результат является экспериментальным обоснованием комбинированного применения криохирургии и фотодинамического эффекта в лечении патологических структур мозга.

Многолетний опыт исследователей и клиницистов в области экспериментальной и практической криохирургии в онкологии и других областях медицины позволил выявить возможности и ограничения криохирургического метода [9]. Одна из основных проблем связана с невозможностью полностью разрушить все клетки в пределах зоны замораживания, особенно вблизи ее границы, что приводит к продолжению опухолевого роста. Другая проблема связана с ограничением в ряде случаев предельных размеров зон замораживания для конкретных криоинструментов. Особенно это актуально для нейрохирургии, в частности, нейроонкологии, где необходимо работать миниатюрными криозондами. Известны такие подходы к повышению эффективности метода, как совершенствование криоаппаратуры и методик самого криовоздействия [11], сочетание с ультразвуком, гипертермией, ионизирующим излучением и другими физическими факторами [4, 6, 12].

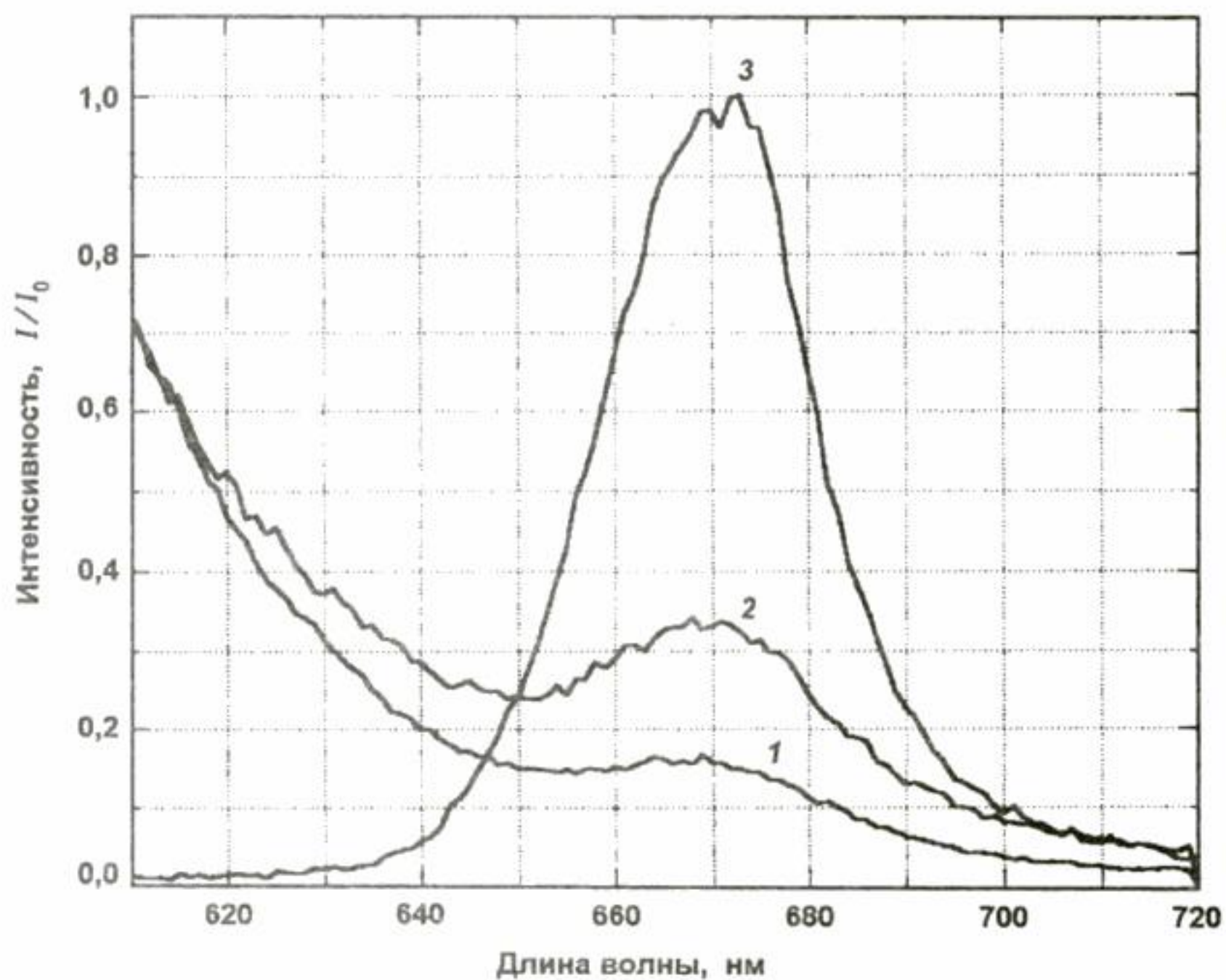
Данная работа посвящена экспериментальному обоснованию возможностей комбинированного применения криохирургии и фотодинамической терапии. Фотодинамический эффект — фотосенсибилизированное красителями фотоокисление биологических объектов под действием излучения оптического диапазона, приводящее к их деструкции. Предполагается, что разрушающее действие сенсибилизаторов при фотодинамическом воздействии может быть обусловлено образованием в системе синглетного кислорода и перекисных радикалов — мощных цитотоксических агентов, способных разрушить биологически важные субстраты [3]. Однако существует ряд проблем, ограничивающих успешное применение фотодинамического воздействия в практической медицине. Так, известно, что возможность реализации и степень выраженности фотодинамического эффекта зависят от введенной дозы красителя и его тропности к определенным органам [7]. В ряде случаев пороговая концентрация красителя в тканях, необходимая для реализации фотодинамического эффекта, в принципе не достигается. Это касается, например, патологических образований мозга, где концентрация вводимого красителя остается достаточно низкой из-за гематоэнцефалического барьера [8]. В этом случае существует необходимость увеличения концентрации красителя в области, подлежащей воздействию. Увеличить локальную концентрацию красителя можно путем целенаправленного влияния на систему микроциркуляции в соответствующей области ткани, приводящего к увеличению проницаемости сосудов для фотосенсибилизатора. Именно таким фактором, который вызывает указанные изменения, является криовоздействие.

В работе выполнено сравнительное изучение накопления красителя в мозге кроликов в пределах зон замораживания и в незамороженных тканях.

В качестве исследуемого фотосенсибилизатора нами был выбран хлорин e_6 . Основанием для выбора послужили известные данные о преимущественных свойствах хлорина e_6 в сравнении с другими фотосенсибилизаторами (такими как порфирины, фотофрин и т.д.): низкая токсичность, достаточно высокий коэффициент экстинкции, способность более избирательно накапливаться в опухолевых тканях, чем в здоровых [13].

Нами проведены собственные исследования фотодинамической активности ряда фотосенсибилизаторов, представляющихся перспективными для фотодинамической терапии. На клеточных моделях *in vitro* (трансформированные фибробласты мыши линии L-529 и клетки гипофиза мыши линии GH-3) изучено влияние гиперическогоина, хлорина e_6 (полученного в лаборатории фотохимии НИТЦ "Сонар" НАН Украины), периллиевого красителя 4992 (Институт органической и неорганической химии НАН Украины) в зависимости от их концентрации и дозы облучения. Наиболее эффективным сенсибилизатором фотоповреждений клеток из всех изученных красителей оказался хлорин e_6 . Так, при концентрации красителя 0,001% и дозе облучения 30 Дж/см² по результатам контрастного люминесцентного теста (диацетат флуоресцеина + бромид этидия) наступает гибель всех клеток в зоне воздействия в течение 3–4 ч после облучения.

Исследования накопления хлорина e_6 *in vivo* проведены на кроликах породы шиншилла массой 2,5 кг. Во всех экспериментах животных анестезировали тиопенталом натрия (Киевский завод медпрепаратов, Украина) в дозе 80 мг/кг массы. Хлорин e_6 получали по методике Fisher [10]. Кроликам хлорин e_6 в дозе 10 мг на 1 кг массы вводили во внутреннюю или общую сонную артерию. Экстракцию хлорина e_6 из тканей через 3 ч после введения проводили щелочным ацетоном [5]. Анализ содержания хлорина e_6 в тканевых экстра-



Спектры люминесценции хлорина e_6 в мозге кролика: 1 — без замораживания, 2 — после замораживания, 3 — эталон

ктах проводили по спектрам люминесценции [2]. Возбуждение люминесценции осуществляли азотным лазером ЛГИ-21, λ возбуждения 337 нм.

Замораживание мозга осуществляли через 2 ч после введения хлорина e_6 . Для этого предварительно под тиопенталовым наркозом с добавлением местной новокаиновой анестезии после снятия кожного лоскута с поверхности черепа, отслоения надкостницы накладывались с помощью зубного бора 4 фрезевые отверстия диаметром 3 мм в проекции лобных долей левого и правого полушарий головного мозга и в проекции стволово-диэнцефальной зоны слева и справа. После тщательного гемостаза в каждое фрезевое отверстие вводили криоинструмент диаметром 2,8 мм на глубину 3–4 мм. Продолжительность замораживания составляла 1–2 мин, диаметр зоны замораживания — 8–10 мм. Через 1 ч после замораживания производили выделение мозга. Образцы ткани мозга (навески 100–300 мг) брали из подвергнутых замораживанию участков и незамороженных областей. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

На рисунке приведены характерные спектры люминесценции тканевых экстрактов мозга кролика. На основании статистического анализа значений интенсивности в максимуме полосы люминесценции экстрактов мозговой ткани установлено, что уровень содержания хлорина e_6 в ткани мозга в пределах зон замораживания достоверно выше ($P < 0,05$), чем в незамороженных областях.

Полученный результат подтверждает предположения о возможности большего накопления фотосенсибилизатора в пределах зоны замораживания. Мы полагаем, это обусловлено тем, что после замораживания развиваются повреждения сосудов, характеризующиеся нарушением микроциркуляции, изменением проницаемости и, в частности, нарушением гематоэнцефалического барьера мозга [8]. В соответствии с этим введенные в кровяное русло красители должны проникать в ткани мозга в зонах замораживания-оттаивания, где произошло локальное нарушение гематоэнцефалического барьера в большей степени, чем в окружающих тканях. В результате развития последующего полного гемостаза зона криовоздействия отграничивается от окружающих тканей [1], благодаря чему введенный краситель удерживается в зоне воздействия. При таких условиях следует ожидать, что проведение через светопровод облучения: подвергнутых замораживанию участков мозга светом с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения красителя, приведет к усилению крио- и фотодинамической деструкции в пределах, не достижимых для указанных методов отдельно, и, следовательно, повышению эффективности лечения опухолей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ананенко В. П., Киндзельский Л. П., Рикберг А. Б. Использование радиоизотопного теста для оценки нарушений микроциркуляции при различных условиях криовоздействия // Респ. науч. конф. "Применение радиоэлектроники в обл. мед. и биол. исследований": Тез. докл., Киев: Здоров'я, 1976. — С. 85–86.
2. Гуринович Г. П., Гуринович И. Ф., Грубина Л. А. и др. Изучение люминесцентным методом распределения в различных тканях экзогенных соединений порфиринового класса // Люминесцентный анализ в медицине и биологии и его аппаратное обеспечение. — Рига, 1985. — С. 32–33.
3. Гуринович Г. П., Жаков И. Г., Костелич Г. Ф. и др. Синглетный кислород и фототерапия рака // Вестник АМН СССР. — 1987. — № 10. — С. 24–30.
4. Запорожан В. Н., Хаит О. В., Рикберг А. Б., Бакай Э. А. Криоультразвуковая терапия доброкачественных заболеваний шейки матки // Криобиология и криомедицина. — 1983. — Вып. 12. — С. 64–69.

5. Зорин В. П., Хлудеев И. И., Зорина Т. Е. и др. Исследование опухолетропности хлорина e_6 и его производных на мышах линии Af с перевитой гепатомой А // Эксп. онкология. – 1992. – 14, № 3. – С. 39–43.
6. Киндзельский Л. П., Курлянд В. А., Злочевская Л. Л., Юречко В. А. Перспективы использования криогенного фактора при лучевой терапии опухолей // Эксп. онкология. – 1986. – 8, № 2. – С. 65–68.
7. Костенич Г. А., Гуринович Г. А. Фотодинамическое действие хлорина e_6 на экспериментальные опухоли / Актуальные проблемы мед. радиологии. Сб. науч. трудов. – Минск, 1986. – С. 168–173.
8. Криохирургия / Под ред. Э. И. Канделя. – М.: Медицина, 1974. – 303 с.
9. Низкие температуры в медицине / Под ред. К. С. Тернового. – Киев: Наук. думка, 1988. – 279 с.
10. Fisher H. Die Chemie des Pyrrols. – Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft. – 1937.
11. Keanini R. G., Rubinsky B. Optimization of multiprobe cryosurgery // ASME Trans. J. Heat Transfer. – 1992. – 114. – P. 796–802.
12. Rikberg A. B., Trushina V. A., Yesman S. S. et al. Experimental basis for combined application of hyperthermia and cryosurgery // Exp. Oncology. – 1995. – 17, № 4. – P. 291–297.
13. Spikes J. D. New trends in photobiology (Invited review). Chlorins as photosensitizers in biology and medicine // J. Photochem Photobiol. – 1990. – 6. – P. 259–274.

Научный и инженерно-технологический центр “Сонар”
НАН Украины, г. Киев

Поступила 22.10.97

А. Б. РІКБЕРГ, В. А. ТРУШИНА, С. С. ЄСЬМАН, В. В. РОГАНОВА, Ю. П. ВЕРХОГЛЯДОВ,
Є. І. КАПІНУС, Т. В. КОВАЛЬОВА, Є. Є. ПЕРСЬКИЙ

ВИВЧЕННЯ НАКОПИЧЕННЯ ХЛОРИНУ e_6 В МОЗКУ КРОЛИКА ПІСЛЯ КРІОВПЛИВУ

Науковий і інженерно-технологічний центр “Сонар” НАН України, м. Київ

На основі аналізу спектрів люмінесценції екстрагованого з мозку кроликів фотосенсибілізатора хлорину e_6 показано підвищення накопичення барвника в зонах заморожування у порівнянні з незамороженими ділянками мозку. Отриманий результат є експериментальним підтвердженням комбінованого застосування кріохірургії і фотодинамічного ефекту в лікуванні патологічних структур мозку.

A. B. RIKBERG, V. A. TRUSHINA, S. S. YESMAN, V. V. ROGANOVA,
YU. P. VERKHOGLYADOV, E. I. KAPINUS, T. V. KOVALEVA, E. E. PERSKIY

A STUDY OF CHLORINE e_6 ACCUMULATION IN THE RABBIT BRAIN AFTER CRYOPRESERVATION

Scientific-Engineering Technological Center “Sonar” of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kiev

On the basis of analyzing the luminescence spectra of a chlorine e_6 photosensibilizer, extracted from the rabbit brain, the authors verified an enhanced accumulation of the dye within the zones of freezing as compared with the unfrozen sites of the brain. The results obtained serve as experimental substantiation of a combined application of cryosurgery and photodynamic effect in treatment of pathological structures of the brain.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 611.013.12:612.592

**В.И.Грищенко, Н.Н.Чуб, М.И.Крамар, И.В.Терпячая, П.Т.Тодоров,
Т.А.Черепанова, И.Н.Кучков**

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМИЕВ ЧЕЛОВЕКА, ХРАНИВШИХСЯ ПРИ НИЗКИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

При использовании новых репродуктивных технологий (IVF, ИСД, ICSI и др.) в некоторых случаях необходимо кратковременное или долгосрочное хранение репродуктивных клеток и эмбрионов. Имеется достаточное количество эффективных методов низкотемпературного консервирования спермиев человека, однако о влиянии гипотермического хранения на спермии человека в до-

ступной литературе обнаружены единичные сообщения [1, 3]. Настоящая работа посвящена изучению морфофункционального состояния спермиев, хранившихся при низких положительных температурах.

Для исследования использовали 48 эякулятов, полученных у мужчин с нормоспермией. Выделение фракции активно-подвижных (АП) (быстрых прогрессивных) спермиев проводили по методу Ватева [4]. Гипотермическое хранение осуществляли в специальном контейнере в условиях холодильника [1]. Исследование проводили в образцах, хранившихся в течение 24 и 48 ч при температуре 10 °С. Контрольную группу экспериментов составили 11 эякулятов. Активность акрозина определяли по методике ЛИГиРЖ [2] в нашей модификации: при нефелометрическом определении количества казеина, не расщепленного акрозином, эякулят промывали не KCl, а средой Менезо В-2. На подготовленный образец наслаивали 3 мл натрий-фосфатного буфера (pH 7,4) с 0,5%-м раствором тритона X-100. Для экстракции фермента смесь оставляли на 4–5 ч при постоянном помешивании при комнатной температуре, после чего центрифугировали при 400g в течение 10 мин. Затем супернатант использовали для определения активности акрозина. Оптическую плотность опытных и контрольных образцов определяли на ФЭК-М-57 и рассчитывали с помощью калибровочного графика, для построения которого использовали раствор казеина в следующих концентрациях: 1,0, 0,75, 0,5, 0,35 мг/мл. Активность фермента выражали количеством мг казеина, расщепленного в 1 мл исследуемой пробы в пересчете на 1 млрд спермиев, измеряли в условных единицах и рассчитывали по формуле

$$A = \frac{(C_0 - C_x)B}{T},$$

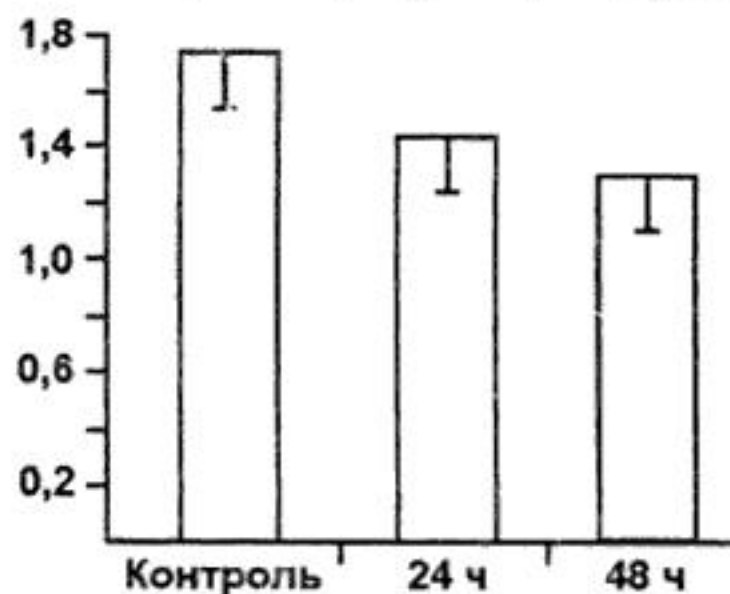
где A — активность фермента, C_0 — начальная концентрация казеина мг/мл, C_x — концентрация нерасщепившегося казеина по калибровочному графику, B — разведение пробы, T — время инкубации.

Средние показатели составили: количество спермиев в эякуляте — $(67 \pm 6,3)$ млн/мл, после отмывки — $(58,7 \pm 7,33)$ млн/мл. Вся подвижная фракция была разделена на 3 группы: АП — 38,7%, подвижные (П) — 40,5%, местно-качающиеся (МК) — 8%. В результате исследования после 20–24 ч хранения образцов при 10 °С количество АП и П спермиев было на уровне контроля. По истечении 2 сут количество АП форм составляло 32,8%, П — 42,4%, МК — 14,8%, что достоверно выше, чем в контрольных образцах.

Однако степень подвижности сперматозоидов не всегда объективно отражает оплодотворяющую способность гамет. Для клинической оценки фертильности мужчин необходимо иметь данные о сохранности акросом и активности акрозина — одного из основных ферментов процесса оплодотворения. Было обнаружено, что при уменьшении скорости охлаждения количество спермиев с поврежденными акросомами снижалось и оптимальная скорость составила 0,1 °С/мин, при которой спермии имеют в основном нормальную неповрежденную акросому [1].

При исследовании акрозина в гипотермически хранившихся спермоконcentратах в контроле активность акрозина составила $(1,74 \pm 0,16)$ у.е., что соответствует средней активности акрозина в норме (рисунок). Величина активности акрозина в экспериментальной группе образцов, хранившихся 24 ч, составляла $(1,44 \pm 0,16)$ у.е., после 48 ч снизилась до $(1,28 \pm 0,14)$ у.е. Несмотря на то, что морфологическая целостность спермиев практически сохранялась, активность акрозина после 48 ч снижалась по отношению к контролю.

Таким образом, биохимическая оценка состояния акросом дает дополнительную и точную информацию о фертильности спермиев и ограничивает их гипотермическое хранение в полноценном состоянии в пределах 48 ч [3]. По-видимому, такое снижение активности фермента связано с изменениями, происходящими в мембранах при хранении, и необходимо подбирать дополнительные условия, позволяющие защитить лабильные мембранные комплексы и ферменты.



Сохранность акрозина в спермиях, хранившихся в условиях гипотермии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крамар М. И. Гипотермическое хранение спермиев человека: Автореф. дис.... канд. биол. наук. — Харьков, 1990. — 17 с.
2. Соколовская И. И., Ойвадис Р., Абулов А. и др. О значении акросомы в оценке семени самцов // Животноводство. — 1981. — № 9. — С. 46–47.
3. Cohen J., Fehilly C. B., Walters D. E. Prolonged storage of human spermatozoa at room temperature or in a refrigerator // Fertil. & Steril. — 1985. — 44, № 2. — P. 254–262.
4. Vatev I. J. // In Vitro Fert. Embryo Transfer. — 1988. — № 5. — P. 48–49.

В.И.Загнойко

ГИПОМЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ СУСЛИКА *C.UNDULATUS*, ВЗЯТОЙ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ БАУТА, НА ПОТРЕБЛЕНИЕ КИСЛОРОДА У БЕЛЫХ МЫШЕЙ

В настоящее время все большее внимание уделяется поиску достаточно физиологического метода создания искусственного гипобиоза у высших теплокровных и, в частности, у человека. Изучение механизмов гипобиоза, отработанных в ходе эволюции, а также идентификация и использование биологически активных веществ, выделенных из тканей гибернирующих животных, безусловно, будут способствовать решению этой важной в прикладном плане для биологии и медицины проблемы. Задачей данной работы являлось изучение влияния на скорость потребления кислорода белыми мышами внутрибрюшинной инъекции плазмы крови *C. undulatus*, декапитированных в разные дни баута.

Сусликов *C. undulatus* отлавливали в Центральной Якутии и содержали в условиях вивария в индивидуальных клетках. Пищу и воду давали в достаточном количестве. Забор крови осуществляли сразу после декапитации сусликов в следующие периоды: в начале вхождения в спячку при температуре тела (T_t) 20–22 °С, в 1-й день

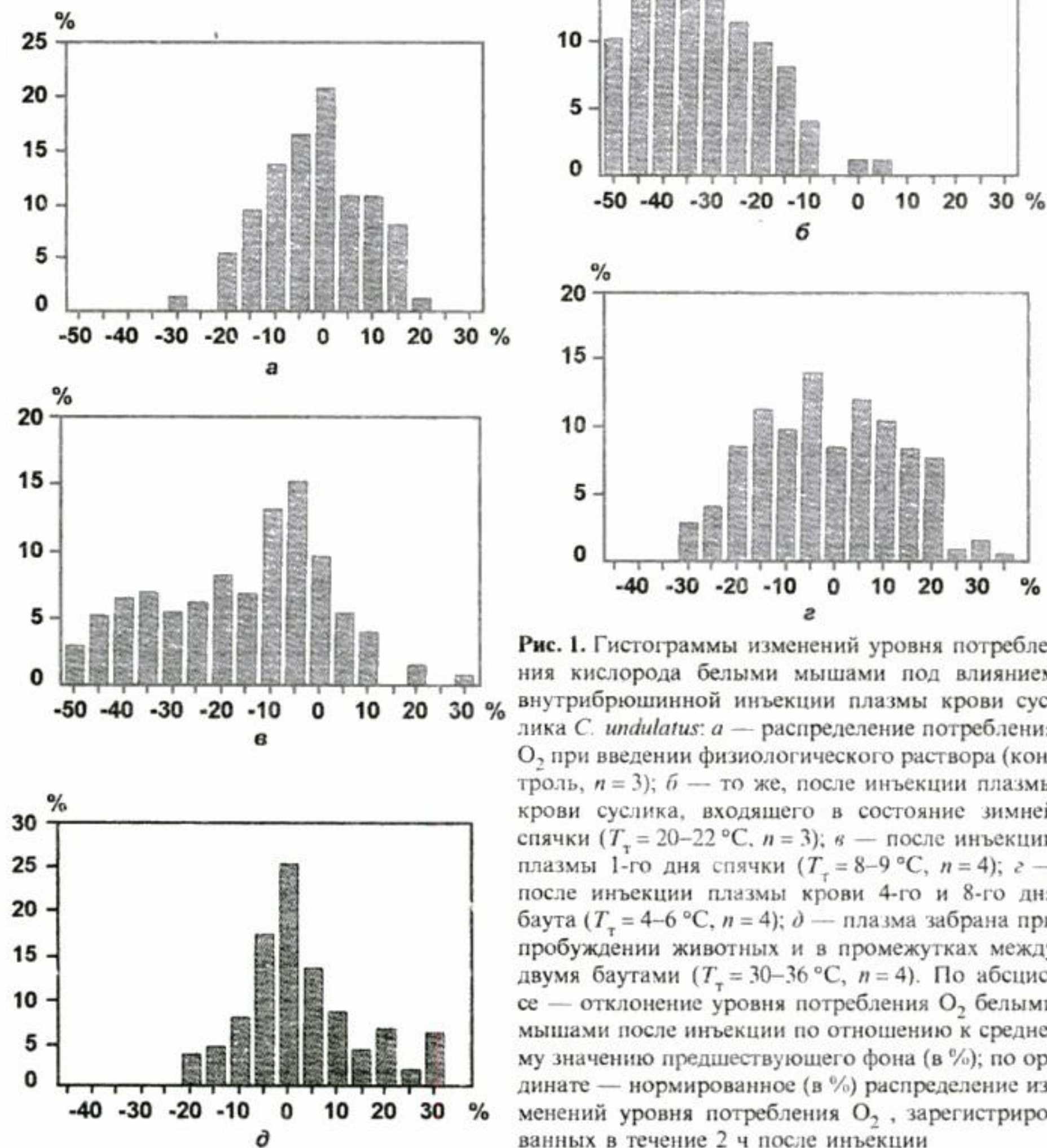


Рис. 1. Гистограммы изменений уровня потребления кислорода белыми мышами под влиянием внутрибрюшинной инъекции плазмы крови суслика *C. undulatus*: а — распределение потребления O_2 при введении физиологического раствора (контроль, $n = 3$); б — то же, после инъекции плазмы крови суслика, входящего в состояние зимней спячки ($T_t = 20-22$ °С, $n = 3$); в — после инъекции плазмы 1-го дня спячки ($T_t = 8-9$ °С, $n = 4$); г — после инъекции плазмы крови 4-го и 8-го дня баута ($T_t = 4-6$ °С, $n = 4$); д — плазма забрана при пробуждении животных и в промежутках между двумя баутами ($T_t = 30-36$ °С, $n = 4$). По абсциссе — отклонение уровня потребления O_2 белыми мышами после инъекции по отношению к среднему значению предшествующего фона (в %); по ординате — нормированное (в %) распределение изменений уровня потребления O_2 , зарегистрированных в течение 2 ч после инъекции

баута (8–9 °С), в 4-й и 8-й дни баута (4–6 °С) и в процессе пробуждения при достижении T_r 18–20 °С. Плазму крови получали по обычной методике (добавляли антикоагулянт гепарин, центрифугировали при 4 °С, 3 000 об/мин). Инъекцию плазмы осуществляли внутривенно в дозе 0,8 мл на 20 г массы мыши. Гипометаболический эффект оценивали измерением скорости потребления кислорода мышами с помощью анализатора кислорода КА-1 (кооператив “Пульс”, г. Новосибирск, точность 2,5%). Измерения производили через 5 мин в течение 1 ч до инъекции (исходный фон) и 2 ч после введения плазмы крови. Данные нормировали в % по отношению к среднему значению скорости потребления O_2 в исходном фоне для каждой мыши. Строили усредненные гistogramмы изменения скорости потребления O_2 под влиянием инъекции плазмы крови сусликов, декапитированных в разные дни баута. По методу Лемли [3] был проведен гель-электрофорез плазмы белков, взятых у *S. undulatus* в начале, середине и конце баута спячки, а также у проснувшихся животных. Радиоавтографию гелей выполняли после их высушивания на установке “Гольдрайер” (Швеция) с использованием рентгеновской пленки РМ-1, экспозиция в течение 20 сут при 20 °С.

Результаты эксперимента приведены на рис. 1. Можно видеть, что максимальным гипометаболическим эффектом обладала плазма крови сусликов, декапитированных в начале вхождения в спячку при T_r 20–22 °С. Быстрое падение уровня метаболизма у мышей наблюдалось здесь уже в первые 10 мин после инъекции и достигало затем более 50%. Плазма крови сусликов, декапитированных после 1 дня спячки, когда T_r животных понижалась до 8–9 °С, оказывала существенно меньшее, хотя и достоверно значимое ингибирующее воздействие. T_r сусликов на 4-е и 8-е сут баута достигала всего 4–6 °С, однако в данном случае не было выявлено достоверного ингибирующего эффекта. И, наконец, плазма крови сусликов, декапитированных при пробуждении или в эутермном состоянии, обнаружила даже некоторую (статистически не значимую) тенденцию к активации скорости метаболизма.

В отдельной серии экспериментов был проведен гель-электрофорез плазмы белков крови, взятой у *S. undulatus* в начале, середине и конце баута спячки, а также у проснувшихся животных. При денситометрии электрофореграмм оказалось, что качественный состав белков плазмы крови в течение баута и у проснувшихся животных практически не отличается. Вместе с тем при исследовании вновь синтезированных белков методом радиоавтографии выяснилось, что в начале баута в крови животных обнаруживается низкомолекулярная белковая фракция, отсутствующая у проснувшихся животных. Как это видно на рис. 2, в середине и конце баута на радиоавтографиях присутствуют лишь следы этой фракции, а у гомойотермных животных она данным методом практически не прослеживается. Так как пул меченных предшественников в плазме крови во всех изученных состояниях отличается незначительно, то данные радиоавтографии электрофореграмм, по-видимому, указывают на связь вновь синтезированной фракции с периодом, непосредственно предшествующим вхождению в гибернацию.

Таким образом, полученные данные не согласуются с мнением ряда авторов [1, 2, 4], полагавших, что количество или активность гипометаболических агентов (или агента) в тканях животных увеличивается с глубиной и продолжительностью спячки. Более того, они скорее свидетельствуют о том, что эндогенный “триггер” оказывает наибольшее ингибирующее воздействие в начале вхождения в гибернацию, когда под общим контролем центральной нервной системы скоординированно подавляется целый ряд физиологических функций и обменных реакций организма. К концу же баута перед очередным пробуждением, являющимся весьма активным процессом, “триггер спячки”, по-видимому, постепенно инактивируется, и продуцируются биологически активные вещества, облегчающие выход животных в гомеотермное состояние.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dawe A. R., Spurrier W. A. Hibernation induced in ground squirrels by blood transfusion // Science. – 1969. – 163. – P. 298–299.
2. Dawe A. R., Spurrier W. A. The blood-borne “trigger” for natural mammalian hibernation in the 13-lined ground squirrel and woodchuck // Cryobiology. – 1972. – 9. – P. 163–172.



Рис. 2. Радиоавтография электрофореграммы белков плазмы крови, полученных из организма сусликов: 1 — в состоянии пробуждения, 2 — в начале, 3 — в середине, 4 — в конце баута

3. Laemmli U. K. Clearance of structural proteins from the assembly of the head of the bacteriophage T. 4 // Nature. – 1970. – 227. – P. 680–685.
4. Swan H., Schatte C. L. Antimetabolic extract from the brain of the hibernating ground squirrel *Citellus tridecemlineatus* // Science. – 1977. – 195. – P. 84–85.

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

Поступило 05.03.98

УДК 591.3+611.0132: 57.086.13+57.043

В.В.Исаченко

СВЕРХБЫСТРОЕ НАСЫЩЕНИЕ И ВЫВЕДЕНИЕ ПРОНИКАЮЩИХ КРИОПРОТЕКТОРОВ ПРИ ВИТРИФИКАЦИИ ЭМБРИОНОВ КРЫС

Развитие метода криоконсервации эмбрионов млекопитающих прямым погружением в жидкий азот началось с середины 80-х годов [4]. В настоящее время разработан ряд эффективно действующих технологий и методика может быть отнесена к разряду рутинных. Классическая схема, условно названная “витрификация”, включает в себя следующие параметры: длительная экспозиция в растворе(рах) проникающих криопротекторов для полного связывания интрацеллюлярной воды; прямое погружение в жидкий азот или в его пары с высокой (от нескольких сотен до нескольких тысяч °C/мин) скоростью охлаждения; выведение проникающих криопротекторов в гипертоническом растворе. В последнее время, однако, появился ряд работ по сверхбыстрому замораживанию эмбрионов, демонстрирующих, что полное связывание интрацеллюлярной воды перед погружением в жидкий азот не является обязательным [1, 2].

Нами были проведены исследования по сверхбыстрому замораживанию крысиных эмбрионов без дополнительного выведения криопротекторов [3] в гипертоническом растворе. Целью настоящих исследований было изучение возможности витрификации крысиных эмбрионов с использованием ультракороткой экспозиции в витрифицирующем растворе, а именно влияния времени и температуры предобработки в витрификационной среде, а также типа проникающих криопротекторов на последующую выживаемость эмбрионов.

Для эксперимента были использованы натурально циклирующие крысы линии Вистар. День обнаружения спермы в вагине считался первым днем беременности крыс. Крысы были забиты на 4-й день и эмбрионы вымыты из матки. Эмбрионы на стадии развития от 7 до 12 бластомеров ($n = 817$) были равномерно разделены на 24 группы и заморожены в 0,25 мл соломинках (Франция), содержащих столбик среды для замораживания (высотой 1 см), приготовленной на питательной среде (ПС). ПС включала TCM-199 (Sigma) с 0,1 мг/мл L-глутамина, 25 мМ Хепес и 10% телячьей фетальной сыворотки (Sigma). Осмотическое давление ПС составляло 285 мОсм/л и $pH = 7,3$. Протокол витрификации включал время экспозиции (3, 4 с, 3, 6, 10 мин) при температуре 25 или 4 °C в 40% пропиленгликоля (ПГ), этиленгликоля (ЭГ) или глицерина (Г) + 0,7 М сахарозы. 5-секундное оттаивание было проведено в водяной бане при 40 °C. После этого порция витрификационной среды объемом 45 мкл вместе с эмбрионами, находящимися в ней, выдувалась из соломинки непосредственно в 200 мкл ПС. После 10-минутной выдержки в этой смеси питательной и витрифицирующей среды эмбрионы были перенесены в свежую ПС для культивирования в 5%-м CO_2 при 40 °C на протяжении 12–14 ч. Развившимися считали эмбрионы, у которых после культивирования наблюдалось формирование бластоцели.

При 3-секундной и 3-минутной экспозициях наблюдалось максимальное (89–92%) развитие эмбрионов за исключением эксперимента, в котором эмбрионы выдерживались 4 с при 4 °C (40%). При увеличении времени экспозиции до 6 мин лишь у эмбрионов, подвергшихся обработке 40% Г + 0,7 М сахарозы, наблюдалась довольно высокая выживаемость (91%). Этот показатель у эмбрионов остальных групп снижается от 52% (экспозиция в 40% Г + 0,7 М сахарозы при 24 °C) до 8% (экспозиция в 40% Г + 0,7 М сахарозы при 24 °C). Ни один из эмбрионов, выдержанных в растворах витрификации 10 мин, не проявил признаков развития.

Результаты свидетельствуют, что возможно развитие и совершенствование метода витрификации эмбрионов млекопитающих с ультракороткой (в технологическом понятии) предэкспозицией в витрифицирующем растворе. Пониженная выживаемость эмбрионов при 40-секундной экспозиции в 40% Г + 0,7 М сахарозы при 4 °C объясняется, по-видимому, тем, что глицерин обладает пониженной в сравнении с этиленгликолем и пропиленгликолем проницаемостью, и при температуре 4 °C времени экспозиции недостаточно для дегидратации бластомеров. При 24 °C показатель выживаемости оттаянных эмбрионов после выдержки в этом же растворе высок (90%). Этот факт демонстрирует зависимость проницаемости цитоплазматических мембран для криопротекторов от температуры. При более чем 6-минутной экспозиции в растворах криопротекторов последующее снижение выживаемости объясняется излишним количеством проникшего в клетки криопротекто-

ра, что при последующей прямой гидратации приводит к частичному или полному разрушению бластомеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Исаченко В. В., Грищенко В. И., Осташко Ф. И. и др. Сверхбыстрое замораживание эмбрионов крыс и коров без "классической" эквilibрации // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 3. – С. 3–7.
2. Gutierrez A., Artiga C. G., Garde J., Pintado B. Effect of equilibration period and cryoprotectant in quick freezing of vouse morulae // Theriogenology. – 1993. – 39. – P. 229.
3. Isachenko V. V., Isachenko E. F., Ostashko F. I., Grishchenko V. I. Ultrarapid freezing of rat embryos with rapid dilution of permeable cryopronectants // Cryobiology. – 1997. – 34. – P. 157–164.
4. Rall W. F., Fahy G. M. Ice free cryc preservation of vouse embryos at –196 °C by vitrification // Nature. – 1985. – 24. – P. 573–575.

Ин-т животноводства УААН, г. Харьков, п/о Кулинич

Поступило 10.06.98

УДК 615.361.451.014.41: 547.422

Е.И.Легач, В.А.Чуйко

КРИОЗАЩИТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДИМЕКСИДА И 1,2-ПРОПАНДИОЛА ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ ТКАНИ

Важнейшим условием сохранения клеток, тканей и органов в жизнеспособном состоянии в условиях низкотемпературной консервации является подбор оптимальных режимов замораживания, вида и концентрации криопротекторов [1]. Целью работы явилось изучение влияния замораживания криопротекторов димексида (ДМСО) и 1,2-пропандиола (1,2-ПД) до –196 °C и их криозащитной эффективности на адренокортикальную ткань новорожденных поросят и половозрелых свиней.

Адренокортикальная ткань замораживалась с использованием криопротекторов: 1-, 5- и 10%-го димексида и 1-, 5- и 10%-го 1,2-пропандиола. Замораживание ткани надпочечника проводилось в специальных контейнерах объемом 10 мл со скоростью 1–3 °C/мин до –70 °C (первый этап) с последующим погружением в жидкий азот со скоростью 80 °C/мин до –196 °C (второй этап). Перед замораживанием адренокортикальную ткань инкубировали в растворах криопротекторов в течение 15 мин. Оттаивание образцов производилось на водяной бане при температуре 37 °C. Контролем являлась незамороженная ткань надпочечников.

Жизнеспособность ткани коры надпочечников оценивали по способности к секреции кортизола в инкубационную среду после криоконсервирования, а также по сохранению чувствительности к стимуляции специфическим аналогом адренокортикотропного гормона — синактеном (0,2 ЕД/мл). Определение содержания кортизола проводилось флюориметрическим методом на флюоресцентном спектрофотометре Hitachi (Япония) [2].

Т а б л и ц а 1

Влияние замораживания с криопротекторами на содержание кортизола в среде инкубации ткани коры надпочечников половозрелой свиньи

Условия эксперимента	n	Содержание кортизола (нмоль/л·мг ткани)	
		Базальный уровень	Синактен (0,2 ЕД/мл)
Контроль	8	25,37 ± 1,14	46,24 ± 1,23*
Замораживание:			
без криопротектора	8	8,42 ± 1,21	13,20 ± 1,42
с 1%-м димексидом	8	9,11 ± 1,03	13,03 ± 1,14
с 5%-м димексидом	8	19,36 ± 1,31	36,26 ± 1,22*
с 10%-м димексидом	8	16,53 ± 1,53	28,23 ± 1,34*
с 1%-м 1,2-пропандиолом	8	10,43 ± 1,18	17,23 ± 1,22
с 5%-м 1,2-пропандиолом	8	15,23 ± 1,23	24,44 ± 1,32*
с 10%-м 1,2-пропандиолом	8	12,73 ± 1,14	46,24 ± 1,23*

Примечание. * — различия достоверны по отношению к базальной активности, P < 0,05

Данные табл. 1 свидетельствуют об угнетении на 70% освобождения кортизола в среду инкубации. Предварительная инкубация адренокортикальной ткани с 5%-м димексидом и 5%-м 1,2-пропандиолом ведет к сохранению на уровне базальной активности способности исследуемой ткани к высвобождению кортизола в среду инкубации. Менее выраженный криозащитный эффект отмечается при использовании для замораживания 10%-го димексида. Использование 1%-х концентраций димексида и 1,2-пропандиола не оказывает криозащитного эффекта на сохранность исследуемого биообъекта. Таким образом, эффективными концентрациями исследуемых криопротекторов при криоконсервировании адренокортикаль-

ной ткани зрелых свиней являются димексид и 1,2-пропандиол в концентрациях 5%.

При анализе данных табл. 2 было выявлено, что замораживание коры надпочечников новорожденных поросят также сопровождается угнетением на 32% освобождения кортизола в среду инкубации. Предварительная инкубация адренокортикальной ткани с 5%-м димексидом, 5- и 10%-ми концентрациями 1,2-пропандиола способствует сохранению способности исследуемой ткани к высвобождению кортизола в среду инкубации. Менее выраженный криозащитный эффект отмечается при использовании в условиях замораживания 10%-го димексида. Использование 1%-х концентраций димексида и 1,2-пропандиола не оказывает криозащитного эффекта. Следовательно, эффективными криопротекторами при криоконсервации адренокортикальной ткани новорожденных поросят являются 5%-й раствор димексида и 1,2-пропандиола в концентрациях 5 и 10%.

Таким образом, результаты исследований показали, что образцы адренокортикальной ткани новорожденных поросят и половозрелых свиней чувствительны к замораживанию, но наиболее криочувствительными являются образцы ткани взрослых животных. Так, способность к секреции кортизола в ткани коры надпочечников половозрелых свиней, криоконсервированных в отсутствие криопротекторов, сохраняется на уровне 30% от контроля, что на 25% ниже по сравнению с образцами адренокортикальной ткани новорожденных поросят, криоконсервированных при аналогичных условиях. Использование глубокого охлаждения до -196°C без применения криопротекторов сопровождается резким угнетением процесса высвобождения кортизола в среду инкубации. Вместе с тем применение в процессе этапа инкубации димексида и 1,2-пропандиола позволяет сохранить способность исследуемого биоматериала к секреции кортизола на уровне 60% от контроля. Реакция адренокортикальной ткани на синактен (100%-я стимуляция) сохранялась при использовании обоих криопротекторов в концентрациях 5%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 431 с.
2. Резников А. Г. Унифицированный флюориметрический метод определения кортизола в надпочечных железах. Методы определения гормонов. Справочное пособие. – Киев: Наук. думка, 1980. – С. 255–258.

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

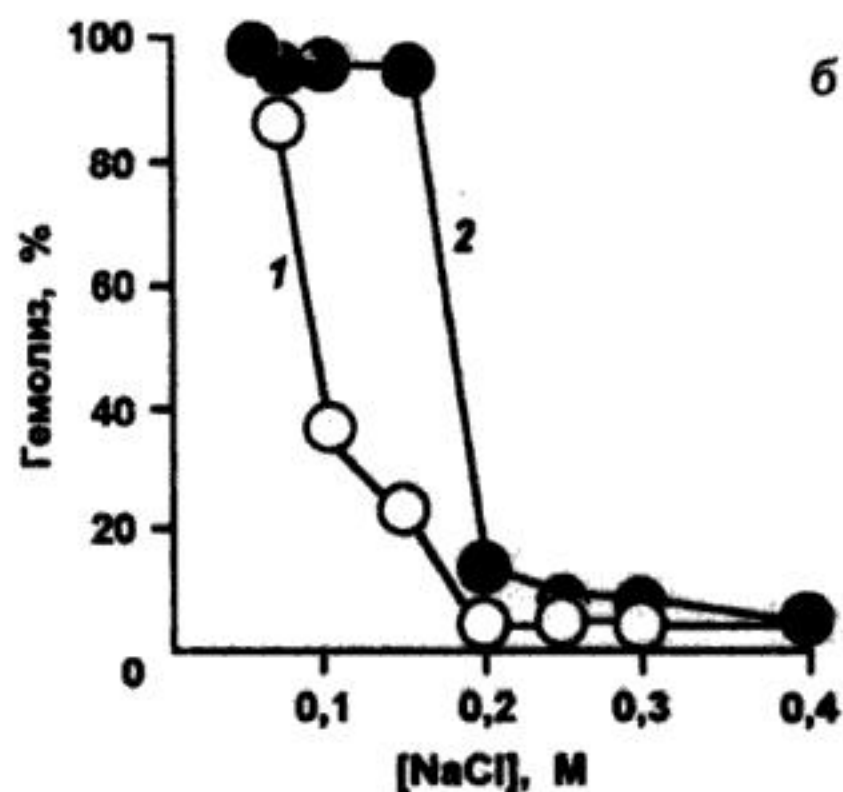
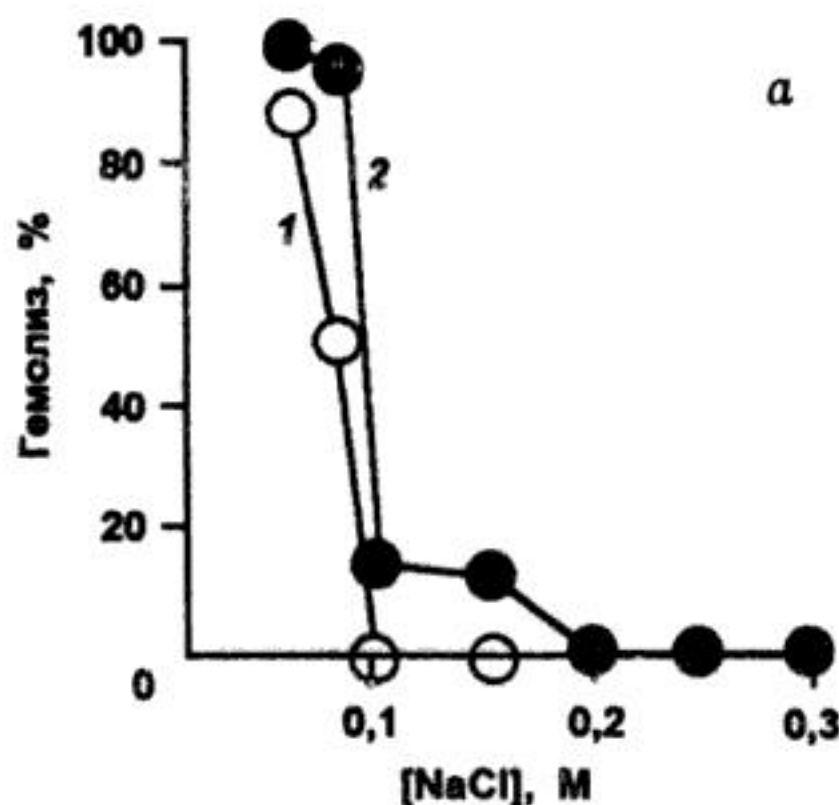
Поступило 30.09.97

УДК 57.043 : 577.112.7

Т.А.Парченко, В.А.Бондаренко

К МЕХАНИЗМУ ИНДУКЦИИ ТРАНСМЕМБРАННОЙ ПОРЫ
ПРИ СОЧЕТАННОЙ ХИМИЧЕСКОЙ И ОСМОТИЧЕСКОЙ
МОДИФИКАЦИИ

Образование трансмембранной поры в эритроцитах человека при изменении осмотических условий происходит как в гипотонических, так и в гипертонических средах [1]. Эта особенность осмотической реакции клеток позволяет выявлять характер действия широкого класса гемолитических агентов и стабилизаторов мембраны в зависимости от того, наблюдается ли синергизм или антагонизм во влиянии осмолярности среды и химического модификатора. В работе использовали хлорпромазин (ХПМ), который модифицирует осмотический ответ эритроцитов как в гипо-, так и в гипертонических условиях [3], и пчелиный яд (ПЯ), действие которого связано преимущественно с внутренней структурной модификацией мембраны, отражающей специфический характер влияния



Влияние пчелиного яда на уровень гемолиза эритроцитов, немодифицированных (а) и модифицированных (б) хлорпромазином (700 мкМ), в средах с различной концентрацией NaCl: 1 — контроль, 2 — пчелиный яд (1,5 мкг/мл)

этого агента[2]. Как видно из данных, представленных на рисунке, в отсутствие ХПМ пчелиный яд в концентрации 1,5 мкг/мл изменяет характер реакции эритроцитов при снижении осмолярности среды. Наблюдается две особенности: повышение чувствительности клеток к гипотонии в области 0,1–0,2 М NaCl и появление слабовыраженного перехода в гипотонической области — ниже 0,1 М NaCl (рис. а, кривая 2). В присутствии ХПМ характер ответа эритроцитов на действие ПЯ изменяется. Если действие ХПМ на контрольные клетки дает профиль реакции, сходный с таковым в случае клеток, обработанных ПЯ, но без ХПМ (рис. а), то при добавлении яда характер реакции клеток в присутствии ХПМ резко изменяется. Это отражается в появлении на кривой плато максимального гемолиза, относящегося к гипотонической области (рис. б, кривая 2), т.е. тенденция к появлению наблюдаемой особенности для контрольных клеток в присутствии ПЯ становится более выраженной. Полученные результаты указывают на то, что ПЯ действует в синергизме с набуханием клеток. Это позволяет предположить вклад липидной компоненты мембраны в механизм образования трансмембранной поры под действием яда. Наиболее очевидна связь механизмов влияния ПЯ и ХПМ с наличием положительного заряда как на молекуле хлорпромазина, так и молекуле главного литического компонента яда — мелиттина. При этом модифицирующее действие химических агентов в условиях изменения осмолярности объясняется нейтрализацией отрицательного заряда на компонентах мембраны эритроцитов и изменением электростатического взаимодействия между компонентами мембраны. Можно предположить, что такое действие реализуется через реорганизацию тех участков бислоя, которые включают преимущественно фосфатидилсерин, отрицательно заряженный фосфолипид, обеспечивающий не только стабилизацию мембраны, но и взаимодействие ее внутреннего монослоя с компонентами белкового цитоскелета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поздныков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дис.... канд. биол. наук.— Харьков, 1989.— 16 с.
2. Руденко С.В., Семенченко А.Ю. Изменение объема эритроцитов и спектра мембранных белков, индуцированное мелиттином, ФА2 и пчелиным ядом // Биохимия.— 1995.— 60, № 5.— С. 734–744.
3. Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Действие хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов // Биохимия.— 1991.— 52, № 12.— С. 2125–2130.

Харьковский гос. ун-т

Поступило 10.09.98

УДК 618.177-08: 615.832.9

Н.Ю.Спиженко

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КРИОДЕСТРУКЦИИ ШЕЙКИ МАТКИ В ЛЕЧЕНИИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО БЕСПЛОДИЯ

В связи с катастрофическим падением рождаемости в Украине проблема бесплодия в семье является одной из актуальных для здравоохранения. Согласно данным литературы [1–3] шеечное бесплодие занимает ведущее место в нарушении репродуктивной функции в связи с наличием антиспермальных факторов в секрете половых органов женщины. Эта проблема не изучена до настоящего времени.

За последние два года под нашим наблюдением находились 46 супружеских пар, страдающих бесплодием. Контрольную группу составили 30 супружеских пар с нормальной репродуктивной функцией. При изучении содержания антиспермальных спермоиммобилизирующих антител (СИАТ) у здоровых женщин их присутствие в шеечном секрете не обнаружено. СИАТ у женщин с "шеечным" бесплодием выявлены в 85,6% наблюдений ($p < 0,05$), при этом у 37 из этих женщин обнаружена патология шейки матки. Степень дисплазии эпителия шейки матки была различной. Поэтому криодеструкция для каждой пациентки выбиралась по индивидуальной программе. Криовоздействие проводили при помощи установки "Криоэлектроника-4", имеющей систему автоматизированного управления.

У 25 женщин с легкой и умеренной степенью дисплазии применялось однократное замораживание патологически измененных тканей при температуре $-120 \div -150$ °C. Скорость охлаждения аппликатора соблюдалась в пределах 70–100 °C/мин. Замораживание продолжали до перекрывания здорового участка ткани на 4–5 мм. 12 женщинам с тяжелой степенью дисплазии проводили два сеанса криовоздействия, при этом температуру аппликатора снижали до $-150 \div -170$ °C. Обязательно между сеансами криодеструкции проводили контрольную кольпоскопию для определения эффективности каждого сеанса. При выявлении островков, не подвергшихся криодеструкции, выполняли их дополнительную криодеструкцию. Кроме того, у 6 женщин на шейке матки были обнаружены ретенционные кисты, которые перед криодеструкцией вскрывали игольчатым электродом на глубину 1–2 см.

Через 11–12 недель после криохирургического лечения повторно в цервикальном секрете определяли концентрацию СИАТ. При этом антиспермальные антитела были обнаружены только у одной женщины из 37 ($10,9 \pm 5,6\%$), что позволяет рекомендовать криовоздействие как метод лечения шеечного бесплодия у женщин с дисплазией эпителия шейки матки.

Из 37 наблюдавшихся женщин беременность наступила у 12 (32,4%) в сроки 2–11 мес после криодеструкции, из них у 8 женщин — в первые 2–5 мес. При этом у 11 женщин беременность протекала без осложнений, у одной — отмечалась угроза прерывания беременности в сроке 7 недель. Она была госпитализирована для стационарного лечения, но, несмотря на это, у нее произошел самопроизвольный аборт в сроке 12 недель. Остальные забеременевшие женщины родили нормальных детей в срок.

Таким образом, при бесплодии женщин с наличием антиспермальных антител криохирургический метод позволяет значительно снизить титр антиспермальных антител и дает высокий процент беременности с последующими благополучными родами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Freundl G.* Antikörper und Sterilität // *Gynäkol. Prax.*— 1990.— Bd. 14, № 3.— S. 479–488.
2. *Quereux C., Desrochas A., Wahl P.* Les glaires hostiles et insuffisantes // *Gynecologie.*— 1987.— 33, № 1.— P. 28–33.
3. *Shulman S.* Sperm Antibody Laboratory, Fertility Antibody Diagnostics // *Immunology of Reproduction.*— International Symposium.— Kiev, 1996.— P. 3.

Киевский национальный мед. ун-т

Поступило 10.09.96

УДК 57.043

В.В.Рамазанов, Н.А.Лупилова, Т.П.Бондаренко

ТРАНСПОРТ ПРОТОНОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИ ГИПЕРТОНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Изменение pH суспензии клеток после внесения эритроцитов в сульфатную среду представляет собой двухфазную кривую, которая включает в себя фазу закисления и фазу защелачивания. Первая фаза отражает выход анионов хлора из клетки, вторая — вход сульфата [5]. Транспорт ионов сульфата и протонов в эритроцитах происходит в обмен на внутриклеточный хлорид [3]. Таким образом, транспорт анионов можно оценивать по динамике сдвига pH суспензии эритроцитов.

Использовались эритроциты донорской крови, отмытые раствором, содержащем 150 ммоль/л NaCl и 10 ммоль/л трис (pH 7.4). Клетки (20% гематокрит) обрабатывали гемин в среде, содержащей, ммоль/л: KCl 90, NaCl 45, сахарозу 44, трис 10 (pH 7.4). Гемин добавляли в концентрации 150 мкмоль/л и инкубировали 10 мин при 37 °C. После обработки эритроциты отмывали средой инкубации. Отмытый осадок эритроцитов с гематокритом 2% вносили в термостатируемую ячейку (37 °C) с pH электродом. При этом среда содержала Na_2SO_4 в концентрации 120 или 800 ммоль/л или 120 ммоль/л Na_2SO_4 + 900 ммоль/л сахарозы. Динамику изменения pH контролировали посредством самописца. Были использованы ингибиторы анионного транспорта: дипиридамом (SIGMA) и ДИДС (4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфат, SIGMA), которые добавлялись непосредственно в ячейку. Константу скорости транспорта протонов вычисляли основываясь на соотноше-

нии $\ln [(H_{\infty} - H_t) / (H_{\infty} - H_0)] = kt$, где k — константа скорости, t — время в минутах, H_0 , H_t , H_{∞} — концентрации протонов соответственно в момент времени $t = 0$, $t = t$, $t = \infty$.

Дипиридамол и ДИДС в концентрации 20 и 0,5 мкмоль/л соответственно не вызывают ингибирование фазы закисления как в контрольных, так и в обработанных геминном эритроцитах. Увеличение концентрации сульфата в среде инкубации до 800 ммоль/л приводит к снижению константы скорости транспорта протонов в контрольных и модифицированных клетках. При этом выявляется блокирующее действие дипиридамола на транспорт протонов (табл. 1). Гипертоническое воздействие за счет комбинирования сульфатной среды с сахарозой также вызывает снижение констант скорости закисления клеточной суспензии и проявление ингибирующей способности дипиридамола.

Т а б л и ц а 1

Константа скорости выхода протонов из эритроцитов в фазе закисления суспензии клеток при модификации и гипертоническом воздействии (мин⁻¹)

Состав инкубационной среды, ммоль/л	Контроль		Дипиридамол		ДИДС	
	интактные эритроциты	модифицированные эритроциты	интактные эритроциты	модифицированные эритроциты	интактные эритроциты	модифицированные эритроциты
120 Na ₂ SO ₄	5,77 ± 0,7	5,77 ± 0,7	5,28 ± 0,6	5,28 ± 0,7	5,77 ± 0,7	5,77 ± 0,8
800 Na ₂ SO ₄	3,18 ± 0,4	2,61 ± 0,4	1,27 ± 0,2	0,98 ± 0,1	3,13 ± 0,3	2,13 ± 0,3
120 Na ₂ SO ₄ + 900 сахараза	4,83 ± 0,6	3,53 ± 0,4	2,92 ± 0,3	1,72 ± 0,2	4,95 ± 0,7	2,97 ± 0,4

Скорость транспорта протонов в клетку во второй фазе значительно ниже (табл. 2), чем транспорт протонов из клетки в первой фазе (табл. 1). В данном случае выявляется блокирующее действие дипиридамола и ДИДС в изотонической среде, а также некоторое ингибирующее действие модификации геминном на динамику сдвига *pH* эритроцитарной суспензии. Гипертоническое воздействие сульфатом или сахарозой вызывает меньшее блокирование транспорта протонов в клетку, чем это отмечалось в фазе закисления клеточной суспензии (табл. 1). Однако при этом отмечается более значительное ингибиторное действие дипиридамола на транспорт протонов.

Т а б л и ц а 2

Константа скорости входа протонов в эритроциты в фазе защелачивания суспензии клеток при модификации и гипертоническом воздействии (мин⁻¹)

Состав инкубационной среды, ммоль/л	Контроль		Дипиридамол		ДИДС	
	интактные эритроциты	модифицированные эритроциты	интактные эритроциты	модифицированные эритроциты	интактные эритроциты	модифицированные эритроциты
120 Na ₂ SO ₄	1,32 ± 0,2	1,04 ± 0,15	0,76 ± 0,09	0,53 ± 0,07	0,99 ± 0,13	0,96 ± 0,15
800 Na ₂ SO ₄	1,02 ± 0,12	0,73 ± 0,1	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,84 ± 0,1	0,62 ± 0,1
120 Na ₂ SO ₄ + 900 сахараза	0,90 ± 0,12	0,66 ± 0,09	0,34 ± 0,05	0,20 ± 0,03	0,73 ± 0,1	0,40 ± 0,05

Таким образом, гипертоническое воздействие в большей степени оказывает влияние на фазу закисления, чем на фазу защелачивания клеточной суспензии. Действие ингибитора анионного транспорта дипиридамола, в отличие от ДИДС, на транспорт протонов как в первой, так и во второй фазе существенным образом изменяется при модификации клеток и гипертоническом воздействии.

Дипиридамол является обратимым неконкурентным ингибитором анионного транспорта и классифицируется как блокатор анионного канала [1]. Кроме того, ингибирующее действие его проявляется только в среде, содержащей анионы хлора, которые инициируют связывание блокатора [4]. Экспериментальные растворы данной работы не содержали хлорид-анионов. Тем не менее присутствие дипиридамола вызывает некоторое блокирование транспорта протонов во второй фазе и существенное повышение его ингибиторной способности при гипертоническом воздействии не только во второй фазе (табл. 2), но и в фазе закисления (табл. 1). Очевидно, что при гипертоническом воздействии происходит модификация структуры ворот анионного канала таким образом, что блокатор приобретает способность проникать в канал и, возможно, связываться.

ДИДС является необратимым ингибитором и классифицируется как блокатор транспортного сайта [2]. Хотя связывающие сайты для дипиридамола и ДИДС в анионном канале стерически перекрываются в некоторой степени, механизм их связывания различен [4]. Вероятно, это и прояв-

ляется в том, что ингибирующее действие ДИДС незначительно изменяется при модификации и гипертоническом воздействии.

Таким образом, можно предположить, что при гипертоническом воздействии происходит структурная модификация анионного канала эритроцитов. При этом транспорт хлорида из клетки блокируется в большей степени, чем транспорт сульфата в клетку. Однако в том и другом случае гипертоническое воздействие приводит к возрастанию ингибиторной способности дипиридамола.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Falke J. J., Chan S. I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 2. Channel blockers // *Biochemistry*. – 1986. – 25. – P. 7895–7898.
2. *Falke J. J., Chan S. I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 1. Transport site inhibitors // *Biochemistry*. – 1986. – 25. – P. 7888–7894.
3. *Jennings M. L., Al-Rhaiyel S.* Modification of a carboxyl group that appears to cross the permeability barrier in the red blood cell anion transporter // *J. Gen. Physiol.* – 1988. – 92. – P. 161–178.
4. *Legrum B., Passow H.* Inhibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride²-dependent association of dipyrindamole with a stilbene disulfonate binding site on the band 3 protein // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1989. – 979, № 2. – P. 193–207.
5. *Red cell membranes — a methodological approach* / Ed. by J. C. Ellory, J. D. Young. – Lnd. etc.: Acad. Pres, 1982. – 369 p.

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

Поступило 16.06.98

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

4

1998

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. – "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском языках. Объем 5,6 печ. л., периодичность четыре номера в год. В журнале публикуются фундаментальные и прикладные работы по проблемам охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, их сублимационному высушиванию и созданию криогенной техники. Освещаются вопросы гибернации, холодостойкости животных и растений.

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

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

Subscription orders should be addressed to

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

ISSN 0233-7673. ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1998. № 4. 1-72 ИНДЕКС 70474