

Национальная Академия наук  
Украины,  
отделение молекулярной  
биологии, биохимии,  
экспериментальной  
и клинической физиологии

Институт проблем криобиологии  
и криомедицины

2  
1999

ISSN 0233-7673

National Academy of Sciences of the  
Ukraine  
Department of Molecular Biology,  
Biochemistry, Experimental and  
Clinical Physiology  
Institute for Problems of Cryobiology  
and Cryomedicine

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



## PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY



# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

*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*

*National Academy of Sciences of the Ukraine  
Department of Molecular Biology,  
Biochemistry, Experimental And Clinical  
Physiology  
Institute For Problems of Cryobiology and  
Cryomedicine  
Scientific and theoretical journal  
Founded in 1985  
Quarterly published*

**Главный редактор В. И. ГРИЩЕНКО**

## **Редакционная коллегия**

С. И. Аксенов (Москва)  
Г. А. Бабийчук (Харьков)  
М. Е. Бекер (Рига)  
Ю. П. Благой (Харьков)  
Л. Воинг (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. Мержичка (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

**Свидетельство о государственной регистрации:  
Серия КВ, № 98 от 23.09.93**

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

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

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

## **Editorial Board**

S. I. Aksenov (Moscow)  
G. A. Babiychuk (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. Lemesenko  
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

**State Registration Certificate:  
KB Series № 98 of 23.09.93**

Address of the Editorial Office: 23, Pereyaslavskaya str.,  
310015 Kharkov, Ukraine. Tel.: (0572) 72-10-39

e-mail: cryo@online.kharkov.ua



# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

## СОДЕРЖАНИЕ

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

|                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Катков И. И. Некоторые аспекты осмотических реакций клеток. I. Основные физические явления и условия существования точки максимального отклонения объема. . . . .                        | 3  |
| Кулешова Л. Г., Кучеренко Ю. В. Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда н-спиртов. Часть 2. Перераспределение неэлектролитов в системе "клетка-среда" . . . . | 12 |
| Орлова Н. В. Действие двухвалентных катионов и гемина на чувствительность эритроцитов к гиперосмотическому стрессу . . . . .                                                             | 17 |
| Линник Т. П. Амиды алифатических кислот — эффективные криопротекторы. II. Криозащитные свойства соединений ряда амидов . . . . .                                                         | 22 |
| Липина О. В. К вопросу о защитном действии ПЭО на организменном уровне при охлаждении белых крыс . . . . .                                                                               | 32 |
| Кравец В. В. Влияние низких температур на направленность потока электронов в митохондриях растений . . . . .                                                                             | 34 |
| Микулинский Ю. Е. Представители семейства белков холодового шока и их функции . . . . .                                                                                                  | 38 |
| Рамазанов В. В., Мельник Э. С., Бондаренко В. А. Функционирование анионного канала эритроцитов в условиях модификации и гипертонического воздействия . . . . .                           | 44 |
| Загнойко В. И. Общие показатели энергетического состояния сусликов <i>S. undulatus</i> в процессе гибернации . . . . .                                                                   | 50 |
| Косевич М. В. Изучение замороженных водных растворов солей двухвалентных металлов методом низкотемпературной масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами . . . . .              | 54 |
| Гардаш Л. И., Гордиенко Е. А. Анализ процесса продавливания эритроцита через микропипетку на основе простых геометрических и физических соображений . . . . .                            | 65 |

### КРИОМЕДИЦИНА

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Капрельянц А. С., Мизунова Р. К., Капрельянц А. А. Криомикроскопическое исследование процесса формирования кристаллов льда вокруг криохирургического зонда . . . . .        | 70 |
| Потапова Л. В. Состояние гуморального иммунитета у больных эндометриозом после имплантации криоконсервированной ткани фетальной вилочковой железы . . . . .                 | 76 |
| Пинсон И. Я. Возможность использования дегидратационных свойств многокомпонентной мази "Левомеколь" при лечении воспалительного процесса в коже после отморожения . . . . . | 79 |

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Грищенко В. И., Лазуренко В. В. Локальная гипотермия передней брюшной стенки и сократительная функция матки у беременных крольчих . . . . .                                  | 85 |
| Суббота Н. П., Пашинский П. П., Питько В. А. Активность супероксиддисмутазы при воспалительном процессе и введении криоэкстракта хориона и экстракта плаценты . . . . .      | 87 |
| Марченко В. С. Нейрональный газ-антиконвульсант в механизмах проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга . . . . .                                        | 89 |
| Исаченко В. В. Влияние возраста и развития <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> девитрифицированных коровьих трофобластических фрагментов на синтез тканевых протеинов . . . . . | 92 |



# PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

## CONTENTS

### THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

|                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Katkov I. I.</i> Some Aspects of Osmotic Reaction of Cells. I. Main Physic Events and Conditions for Existence of the Point of Maximum Volume Excursion. . . . .                                                        | 3  |
| <i>Kuleshova L. G., Kucherenko Yu. V.</i> Transformation of Human Erythrocytes in the Solutions of Non-electrolytes of N-alcohols Series. Part 2. Redistribution of Non-electrolytes in the "Cell-medium" System . . . . . | 12 |
| <i>Orlova N. V.</i> The Effect of Divalent Cations and Hemin on Erythrocyte Sensitivity to Hypertonic Stress                                                                                                               | 17 |
| <i>Linnik T. P.</i> Amides of Aliphatic Acids are Efficient Cryoprotectants. II. Cryoprotective Properties of Amide Series Compounds . . . . .                                                                             | 22 |
| <i>Lipina O. V.</i> To the Question on PEO Protective Effect on an Organism Level During White Rats' Cooling                                                                                                               | 32 |
| <i>Kravets V. S.</i> Effect of Low Temperatures on Electrone Stream Orientation in Mitochondria of Plants                                                                                                                  | 34 |
| <i>Mikulinsky Yu. E.</i> Members of Cold Shock Proteins' Family and their Functions . . . . .                                                                                                                              | 38 |
| <i>Ramazanov V. V., Mel'nik E. S., Bondarenko V. A.</i> The Erythrocyte Anion Channel Functioning under the Modification and Hypertonic Effect Conditions . . . . .                                                        | 44 |
| <i>Zagnoyko V. I.</i> General Indices of the Energetic State of <i>C. undulatus</i> Ground-squirrels During the Hibernation Process . . . . .                                                                              | 50 |
| <i>Kosevich M. V.</i> Study of Frozen Aqueous Solutions of the Bivalent Metal Salts Using the Method of a Low Temperature Mass-Spectrometry with the Fast Atom Bombardment . . . . .                                       | 54 |
| <i>Gardash L. I., Gordienko E. A.</i> Analysis of the Process of Erythrocyte Pressing through Micropipette Basing on Simple Geometrical and Physical Notions . . . . .                                                     | 65 |

### CRYOMEDICINE

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Kaprelyants A. S., Migunova R. K., Kaprelyants A. A.</i> Cryomicroscopic Investigation of the Process of an Ice Crystal Formation Around Cryosurgical Probe . . . . .                             | 70 |
| <i>Potapova L. V.</i> Humoral Immunity State in Patients with Endometriosis after the Implantation of Fetal Thymus Cryopreserved Tissue . . . . .                                                    | 76 |
| <i>Pinson I. Ya.</i> The Possibility of the Usage of Dehydrative Characteristics of the Multicomponent "Levomekol" Ointment when Treating the Inflammatory Process in Skin After Frostbite . . . . . | 79 |

### BRIEF COMMUNICATIONS

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Grischenko V. I., Lazurenko V. V.</i> Local Hypothermia of Anterior Abdominal Wall and Uterus Contractile Function in Pregnant Rabbit Females . . . . .                                           | 85 |
| <i>Subbota N. P., Pashinsky P. P., Pitko V. A.</i> Superoxide Dismutase Activity during an Inflammatory Process and the Introduction of the Chorion Cryoextraction and Placenta Extraction . . . . . | 87 |
| <i>Marchenko V. S.</i> Neuronal Gas-Anticonvulsant in Mechanisms of BBB Permeability of Cooled Brain .                                                                                               | 89 |
| <i>Isachenko V. V.</i> Effect of the Age and <i>In Vivo</i> or <i>In Vitro</i> Development of Devitrified Bovine Trophoblastic Fragments on Tissue Proteins Synthesis . . . . .                      | 92 |

This One



4L4S-6GW-J80X

© Translated from Russian by *E. N. Pushkova*

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, "Problems of Cryobiology", 1999



**Some Aspects of Osmotic Reaction of Cells.  
I. Main Physic Events and Conditions for Existence  
of the Point of Maximum Volume Excursion**

Igor I. KATKOV

*Semen and Embryo Preservation Laboratory of Universal Preservation Technologies, Inc.*

**Некоторые аспекты осмотических реакций клеток.  
I. Основные физические явления и условия существования  
точки максимального отклонения объема**

И. И. КАТКОВ

*Лаборатория сохранения спермы и эмбрионов, универсальные технологии сохранения, Инк.*

During addition and dilution of permeable cryoprotective agents, cells may undergo substantial and possibly lethal volume excursions. Prediction of conditions under which these excursion occurs is essential for developing of strategy of optimal addition and dilution protocols. In this paper, we consider the main osmotic events that occur if the cell is placed in anisotonic conditions. A set of simple inequities allows predicting general pattern of the osmotic reaction. Some practical examples are illustrated. The advantages of the use the two-parameter model vs Kedem-Katchalsky approach for describing of osmotic events are also briefly discussed.

При добавлении и разбавлении проникающих криопротекторов, клетки могут подвергаться существенным и, возможно, летальным отклонениям объемов. Предсказание условий, при которых происходит это отклонение, является необходимым для разработки стратегии оптимальных протоколов добавлений и разбавлений. В данной работе мы рассматриваем основные осмотические явления, происходящие при помещении клетки в анизотонические условия. Совокупность неравенств позволяет предсказать общую картину осмотической реакции. Проиллюстрированы некоторые практические примеры. Также кратко обсуждаются преимущества использования моделей с двумя параметрами по сравнению с подходом Кедем-Качальского.

При добавленні і розбавленні проникаючих криопротекторів клітини можуть зазнавати істотні і, можливо, летальні відхилення об'ємів. Прогноз умов, при яких відбувається це відхилення, є необхідним для розробки стратегії оптимальних протоколів добавлення і розбавлення. У даній роботі ми розглядаємо основні осмотичні явища, які відбуваються при розміщенні клітини в анізотонічних умовах. Сукупність нерівностей дозволяє передбачити загальну картину осмотичної реакції. Проілюстровані деякі практичні приклади. Також коротко обговорюються переваги використання моделей з двома параметрами у порівнянні з підходом Кедем-Качальського.

**Introduction**

The majority of currently used cryoprotectants are permeable cryoprotective agents (CPA). The addition of a CPA before freezing and subsequent removal it after thawing may generate substantial osmotic volume changes. Such large and fast volume excursions may cause lethal or sub-lethal damage in many types of cells. Successful cryopreservation of cells therefore requires that the procedures for addition and removal of CPA be carefully developed [1, 5, 7, 11, 12, 14]. Conventional method to calculate osmotic response of cells in the suspension of permeable and non-permeable solutes by the computer numeration of two coupled differential equations is time consuming and not always available for practical laboratories. That is why, estimation of conditions for the pattern of osmotic reaction without rigorous simulations, especially when permeability parameters are unknown or data are contradictory, is an important task for deve-

loping of practical cryopreservation procedures. In this and in two subsequent companion papers (Katkov. Some aspects of osmotic reaction of cells. II. Water Volume and Intracellular Concentration of Permeable Cryoprotectants at Points of Maximum Volume Excursions (MVE) and III. Time Frame of Osmotic Response of Cells: 1-Membrane vs 2-Membrane Models) we will analyze the main conditions and describe a basic phenomenology of the MVE. All resulting equations we develop and discuss in these papers, are simple and allow to use a calculator or a spreadsheet like Microsoft Excel, that are available in any scientific as well as practical laboratory. Thus, despite of seemingly theoretical approach, this work targets to practical purposes. In two other companion papers, we will practically use this theory to show examples of 1) developing of a new vitrification procedure (Katkov et al. Some aspects of osmotic reaction of cells. IV. Vitrification of Rat Embryos by the Use of Ultra-



Rapid Addition and Dilution (URAD) of Cryoprotective Media); and 2) optimizing method for addition and dilution of glycerol for osmotically sensitive mouse sperm (Katkov. Some aspects of osmotic reaction of cells. V. Optimization of Addition and Dilution Protocols).

### Main osmotic events at the point of maximum volume excursion

**"Addition" and "Dilution": What Does That Mean?** We determine an osmotic process as addition of permeable cryoprotectant if the final concentration of the CPA inside the cell ( $Y_f$ ) is higher than its initial concentration ( $Y_0$ ), i.e.,  $Y_0/Y_f < 1$ . As we will see later, under certain conditions, the total amount of intracellular CPA at the end of the procedure ( $X_f$ ) may be lower than the initial value ( $X_0$ ) even though the final concentration is higher than the initial one. From this point of view, the situation where  $Y_0/Y_f < 1$ , but  $X_0/X_f > 1$ , would be more correct to call as "saturation".

Similarly, the process we refer as DILUTION means that at the end of the procedure the intracellular concentration of CPA is lower than at time zero ( $Y_0/Y_f > 1$ ) even though, in some cases, the total amount of intracellular CPA may increase comparison with initial one ( $X_0/X_f < 1$ ). The terminology "dilution" thus, is more appropriate (universal) than "removal".

**Some Important Tonicities.** In the main part of the paper we will consider the total tonicity as the sum of tonicities of the permeable CPA ( $Y$ ) and impermeable "salts" ( $Z$ ). In other words,  $M_i = Y_i + Z_i$ , where subscript  $i$  means 0 for initial values,  $f$  for final values,  $m$  for values at the moment of MVE, etc. For actual values of osmotic variables we will use no subscripts and italicized font, i.e.  $M = Y + Z$ .

We also introduce the "relative permeability additive" tonicity that we determine as  $T_i = C_{rp} + M_i$ , where subscript  $i$  means 0,  $f$ ,  $m$  etc., and  $C_{rp}$  is the ratio of the membrane CPA-permeability to the membrane permeability to water, i.e.,  $C_{rp} = P_{CPA}/(L_p RT)$  expressed in tonicity units. For example, a cell with  $P_{CPA} = 13.9 \mu\text{m}/\text{min}$ , and  $L_p = 2.0 \mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$  would have the relative permeability term  $C_{rp}$  (at  $T = 300 \text{ K}$ ) as of 282 mOsm. Consider for example the situation when the cell described above is filled at the initial moment with CPA, the intracellular concentration  $Y_0$  is 800 mOsm. Let us assume also that the cell water volume at this moment is iso-tonic. It implies that the initial concentration of intracellular impermeable solute  $Z_0$  equals 290 mOsm. The relative permeability additive tonicity is  $T_0 = 282 + 800 + 290 = 1372 \text{ mOsm}$ . If this cell is placed then in iso-tonic impermeable buffer, it means that the final relative permeability additive tonicity will be  $T_f = 282 + 0 + 290 = 572 \text{ mOsm}$ .

**Special Water Volumes.** In this work we will operate with intracellular water volume normalized to

its iso-tonic value  $w_i = W_i/W_{iso}$ , where subscript  $i$  means 0,  $f$ ,  $m$  etc., and "none" for the actual value.

First, we will express relationship between the iso-tonic water volume, and the volume occupied by water at time zero. If the initial water cell volume is  $W_0$ , and the initial concentration of the impermeable "salts" is  $Z_0$ , then the total amount of impermeable salts  $X_0 = W_0 Z_0$  remains unchanged and equal to the iso-tonic amount of "salts"  $W_{iso} C_{iso}$ . Thus, we can express that:

$$w_0 = C_{iso}/Z_0, \quad (1)$$

where  $w_0 = W_0/W_{iso}$  is normalized to isotonic initial water volume.

At the equilibrium, the final concentration of the "salts" inside the cell equalize external concentration of the "salts"  $Z_f$ , while the total amount of impermeable solutes remains equal to  $X_0$ . Thus, we can express the final (equilibrium) cell water volume in normalized form as follows:

$$w_f = C_{iso}/Z_f = w_0 Z_0 / Z_f, \quad (2)$$

where  $w_0 = W_0/W_{iso}$  and  $w_f = W_f/W_{iso}$  are normalized initial and final water volumes.

If we assume that the permeability to the CPA is much lower than permeability to water, then we can say that the final volume that the cell reaches at the end of fast movement of water obeys the Boyle-van't Hoff (BVH) relationship. Assuming that number of solute (CPA + salt) almost has not been changed during the process, we can then express the Boyle-vant Hoff water volume as follows:

$$w_{BVH} = w_0 M_0 / M_f = W_0 (Y_0 + Z_0) / (Y_f + Z_f), \quad (3)$$

where  $w_{BVH} = W_0/W_{iso}$  is the normalized BVH-volume.

We also introduce the "absolutely permeable membrane" volume  $w_p$  as the volume that would be occupied by water at the equilibrium if both intra- and extra-cellular compartments contain a permeable components only. That situation may be realized if  $Y \gg Z$  at any time in both sides of the membrane, or if  $C_{rp} \gg Y, Z$  at any moment of time. The volume that the cell can reach at these conditions can be found as follows:

$$w_p = w_0 T_0 / T_f = w_0 (C_{rp} + M_0) / (C_{rp} + M_f), \quad (4)$$

where  $M_0$  and  $M_f$  are the initial and final total tonicity respectively.

The volumes expressed by formulas (1)–(4) play an important role in determination of the way and pattern of osmotic reaction and conditions in which MVE occur.

### Main Physical Events at the Point of MVE

**General picture.** Briefly, any osmotic response of the cell that is placed in anisotonic with internal conditions consists of two stages. The first stage is the equilibration of total extra- and intra-cellular toni-



ties. The initial speed of this reaction is proportional to driving forces for water  $F_w$ . The driving forces are proportional to the amplitude of initial gradient of total tonicities across the membrane  $\Delta M_0$ . The initial speed of the equilibration of total tonicities is also proportional to the membrane water permeability  $L_p RT$ , cell surface area  $A$ , and reciprocal to the initial volume of intracellular water  $W_0$ . We will operate with conventional volume-to-surface ratio  $B_0/A$ . In many cases (even though not all of them), the driving forces for the CPA  $F_{CPA}$  that at time zero are proportional to the gradient of the CPA-concentration  $\Delta Y_0 = Y_f - Y_0$ , the CPA membrane permeability  $P_{CPA}$ . These forces are reciprocal to  $B_0$ , and they initially act in opposite to the  $F_w$ 's direction. We will consider the situation in which water and the CPA have different pathways (see below for details) and no friction between them occurs. Because for overwhelming part of real situation, the water membrane permeability is substantially higher than the permeability to the CPA, the first stage of equaling of total tonicities occurs very fast. Even though the total tonicities are equalized at this moment, the gradient of concentration of the CPA is not eliminated, and permeable solute continues to cross the membrane disturbing a non-stable equilibrium. As the results, the driving forces for water try to compensate this misbalance, moving water cross the membrane. Additionally, the driving forces water for impermeable solute  $F_{salt}$  drift whole picture toward the final (equilibrium) water volume that is determined by Eq. (2). The initial speed of this stage is determined by the actual driving forces for the CPA at that moment that are usually much lower than at time zero. As the result, the CPA and the salts concentrations equilibrate much slower than water equilibrated at the fast stage even for cases when  $P_{CPA}$  is relatively high.

The exact picture of the osmotic response can be calculated by numeration of the coupled equations only. However, the basic conditions, general pattern and the values of actual intracellular osmotic variables  $w$ ,  $Y$ ,  $Z$  and  $M$  at the point of MVE can be calculated very simply. To do so, we will consider four important ratios and two important inequities that help us to describe the osmotic response by much easier than software simulations.

#### Four important ratios:

1. First, the ratio of initial and final concentration of the CPA  $Y_0/Y_f$  on definition given earlier determines whether the process leads to increase of concentration (not the amount!) of intracellular CPA (addition), or the intracellular concentration of CPA initially higher than in the extracellular bath ( $Y_0/Y_f > 1$ , DILUTION). The distinction between addition and dilution is based on only this criterion. If  $Y_0/Y_f = 1$ , the process is not determined.

2. The ratio of initial and equilibrium total tonicities  $M_0/M_f$  determines the direction of initial move-

ment of water: if  $M_0/M_f < 1$ , the cell starts to shrink, otherwise it swells initially. If the initial tonicities are equal on both sides of the cell membrane, the process is determined by the previously considered  $Y_0/Y_f$  ratio.

3. The ratio of initial and equilibrium (extracellular) tonicities  $Z_0/Z_f$  determines the final water volume of the cell. According to formula (2), if  $Z_0/Z_f > 1$ , the final volume exceeds the initial one, otherwise it will be lower than the initial value.

4. The ratio of "relative permeability additive" tonicities  $T_0/T_f$  multiplied by the initial volume  $w_0$  is equal the "absolute permeability" volume  $w_p$  in formula (4). As we will see below, this value with good accuracy determines the volume that is occupied by intracellular water at the moment of the equilibration of total tonicities. The further behavior of the cell in slow stage depends on this ratio: if  $w_p < w_f$ , the cell swells towards the final value during the slow stage, otherwise it shrinks. Note that this estimation unlike the three previous, is not exact, but approximate: if  $w_p/w_f = 0.9-1.1$ , additional calculations are required (see below). The importance of this parameter is shown in the example on vitrification of rat embryo when behavior of the cells and whole strategy of URAD-procedure of vitrification of rat embryos was fully determined whether this ratio was less (at low relative membrane permeability  $C_{rp}$ ) or higher (at high  $C_{rp}$ ) than the equilibrium volume (see Katkov et al, "Vitrification of Rat Embryos by the Use of Ultra-Rapid Addition.").

#### Two important inequities:

1. The first inequity applies to relationship between  $w_{BVH}$  and  $w_p$ . If  $M_0/M_f < 1$  that happens in the majority (but not in all) of addition protocols, than  $T_0/T_f$  ratio is higher than  $M_0/M_f$ , but is still less than 1. In the majority (but again, not in all) of dilution procedures,  $M_0/M_f > 1$ . In that case, the BVH-water volume exceeds the absolute relative permeability volume  $1 < T_0/T_f < M_0/M_f$ . If we compare these results with Eqs. (3) and (4), we can express the inequity as two following alternative situations:

$$w_{BVH} < w_p < 1 \text{ or } < 1 < w_p < w_{BVH}. \quad (5)$$

This inequity reflects the fact that amplitude of volume excursion in the case of non-permeable (or very low relative permeable) membrane for which  $\Delta w_{BVH} = |w_0 - w_{BVH}|$  is always higher than for absolutely permeable membrane for which  $\Delta w_p = |w_0 - w_p|$ .

2. The other inequity will help us to simplify formulas and constrains in further calculations. It says:

$$\text{if } Y_0/Y_f < Z_0/Z_f \rightarrow M_0/M_f < Z_0/Z_f \quad (6)$$

and vice versa:

$$\text{if } Y_0/Y_f > Z_0/Z_f \rightarrow M_0/M_f > Z_0/Z_f. \quad (7)$$

The prove of (6), (7) is simple: for any positive  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ ,



Table 1

Conditions for existence of maximum volume excursion ( $w_m$ ) at different initial and final conditions during addition of permeable CPA ( $Y_0 < Y_f$ )<sup>\*</sup>

| Case | Conditions for           |                                           | Existence of $w_m$   | Pattern of osmotic response                              |                                                               |                                                                           |
|------|--------------------------|-------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|      | Relative water volumes   | Tonicities <sup>**</sup>                  |                      | Osmotically Active Water Volume $w$                      | Amount of Intracellular CPA X                                 | Concentration of Intracellular CPA Y                                      |
| 1    | $w_f < w_{BVH} \leq w_0$ | $Z_0/Z_f < Y_0/Y_f$                       | $w_m$ does not exist | Shrinkage only                                           | Slightly increases, than drops lower than initial value $X_0$ | Increases, than slightly drops to the final value $Y_f$                   |
| 2    | $w_{BVH} < w_f < w_0$    | $Y_0/Y_f < Z_0/Z_f$ , if $Z_0/Z_f < 1$    | Depends on $C_{rp}$  | Depends on $C_{rp}$                                      | Depends on $C_{rp}$                                           | Depends on $C_{rp}$                                                       |
| 3    | $w_{BVH} < w_0 \leq w_f$ | $Y_0/Y_f < Z_0/Z_f$ , if $Z_0/Z_f \geq 1$ | $w_m$ exists always  | Fast shrinkage to $w_m$ , than slow re-swelling to $w_f$ | Increases monotonically                                       | Rapidly increases to $Y_m$ , than slow increases (equilibration) to $Y_f$ |
| 4    | $w_0 \leq w_{BVH}$       | $M_0/M_f \geq 1$                          | $w_m$ does not exist | Swelling only                                            | Increases monotonically                                       | Slightly drops, than slow increases (equilibration) to $Y_f$              |

Notes.<sup>\*</sup> — Tonicity (osmolality) of the permeable cryoprotectant in the main part of the paper implies to be equal its molal concentration; <sup>\*\*</sup> — For Cases 1–3 the total final tonicity implies to be higher than the total initial tonicity ( $M_0/M_f < 1$ ).

$$\text{if } a/b < c/d \rightarrow a/b + c/b < c/d + c/b \rightarrow (a+c)/b < c(b+d)/bd \rightarrow (a+c)/(b+d) < c/d. \quad (8)$$

And taking to advantage that  $M = Y + Z$ , we will simply obtain (6).

#### Basic conditions for existence of the point of MVE

Table 1 and 2 summarize all possible combinations of initial and final conditions for realization of different patterns of osmotic response. Table 1 illustrates addition of CPA ( $Y_0/Y_f < 1$ ) and Table 2 represents dilution ( $Y_0/Y_f > 1$ ).

Case 1 in Table 1 represents the situation when the external impermeable solute is much more concentrated than the internal "salts" and  $Z_0/Z_f < Y_0/Y_f < 1$ . In this case according to inequity (7),  $Z_0/Z_f < M_0/M_f$ , and  $w_f < w_{BVH}$ . Because both driving forces for the CPA and salts initially act in the same direction, the cell loses water very fast. This

lost of water occurs so rapidly that at the some moment, the internal concentration of the CPA exceeds the equilibrium value, the effect we refer as "hyper saturation". The permeable solute starts leaving the cell. The driving forces of impermeable salts continue to move water out of the cell to compensate the lost of the CPA, the CPA continue to efflux the cell, and from some moment, the total amount of the CPA became lower than the initial value (if  $Y_0/Y_f > Z_0/Z_f$ , and  $w_0 > w_f$ , than  $w_0 Y_0 > w_f Y_f$ ) i.e., the net flux of the CPA is negative. As we mentioned before, the most appropriate term for this situation is "hyper-saturation" rather than addition that indicates that the final amount of water is so small that allows to maintain higher then initial concentration ( $Y$ ) of the CPA, while intracellular amount of the CPA may be lower than initial one. This situation can be useful during multi-step addition of the CPA when an external solute maintains hyper osmotic. The other advantage of this method is the fact that after replacing of

Table 2

Conditions for existence of maximum volume excursion ( $w_m$ ) at different initial and final conditions during dilution of permeable CPA ( $Y_0 < Y_f$ )<sup>\*</sup>

| Case | Conditions for           |                                           | Existence of $w_m$   | Pattern of osmotic response                              |                                                                |                                                                       |
|------|--------------------------|-------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|      | Relative water volumes   | Tonicities <sup>**</sup>                  |                      | Osmotically Active Water Volume $w$                      | Amount of Intracellular CPA X                                  | Concentration of Intracellular CPA Y                                  |
| 1    | $w_0 \leq w_{BVH} < w_f$ | $Y_0/Y_f < Z_0/Z_f$                       | $w_m$ does not exist | Swelling only                                            | Slightly drops, than increases higher than initial value $X_0$ | Decreases, than slightly increases to the final value $Y_f$           |
| 2    | $w_0 < w_f < w_{BVH}$    | $Y_0/Y_f > Z_0/Z_f$ , if $Z_0/Z_f > 1$    | Depends on $C_{rp}$  | Depends on $C_{rp}$                                      | Depends on $C_{rp}$                                            | Depends on $C_{rp}$                                                   |
| 3    | $w_f \leq w_0 < w_{BVH}$ | $Y_0/Y_f > Z_0/Z_f$ , if $Z_0/Z_f \leq 1$ | $w_m$ exists always  | Fast swelling to $w_m$ , than slow re-shrinkage to $w_f$ | Decreases monotonically                                        | Rapidly drops to $Y_m$ , than slow decreases (equilibration) to $Y_f$ |
| 4    | $w_{BVH} \leq w_0$       | $M_0/M_f \leq 1$                          | $w_m$ does not exist | Shrinkage only                                           | Decreases monotonically                                        | Slightly increases, than slow decreases (equilibration) to $Y_f$      |

Notes.<sup>\*</sup> — Tonicity (osmolality) of the permeable cryoprotectant in the main part of the paper implies to be equal its molal concentration; <sup>\*\*</sup> — For Cases 1–3 the total final tonicity implies to be higher than the total initial tonicity ( $M_0/M_f < 1$ ).



the shrunken cell to iso-osmotic environment, it swells even less that it would be if the cell were transferred to the dilution media before a "hyper-saturation" procedure ( $X_f < X_0$ ).

Two other cases represent the situation in which the buffer is moderate hypertonic or even iso-osmotic/hypo-osmotic. If the final concentration of impermeable salts is equal or less than initial intracellular value ( $Z_0/Z_f \geq 1$ ), it means that  $w_f \geq w_0$ . From definition of addition it means that  $Y_0/Y_f < Z_0/Z_f \rightarrow w_{BVH} < w_f$ . If the initial total tonicity is still less than the total extracellular value ( $M_0/M_f < 1$ ), it represents case 3 in Table 1. Initially, water start leaving the cells, the cell starts shrinking (in general, relatively fast) toward lesser than the initial value, while the CPA is fluxing into the cell. The outflow of water increases the concentration of extracellular salts, and at the same time, the influx of CPA increases its intracellular tonicity. Both processes drive in the same direction of increasing of intracellular total tonicity. At the particular point of time that we determine as  $t_m$ , the intracellular and extracellular tonicity are equilibrated and the water volume reaches peak of volume  $w_m < w_0$ . As we mentioned before, the equilibrium of tonicities is not stable at that moment. At this point, the tonicity of intracellular "salts" is higher than extracellular ( $w_m < w_0 \leq w_f$ ) that means that concentration of the CPA inside the cells is still lower than the final value. As the result, the permeable CPA continues to permeate into the cell, altering the osmotic balance. To maintain the balance of the total tonicity, water starts returning to the cell. From this point, the initial outflow of water is replaced by its influx until the cell reaches the equilibrium volume  $w_f \geq w_0 > w_{BVH}$ . For this situation that represents Case 3 in the Table 1, the local maximum volume excursion (minimum water volume  $w_m$ ) and bi-phasic response of water volume always exists. This situation, especially in case of iso-osmotic buffer is realized in many practical regimes, including addition of CPA to mouse spermatozoa.

In one particular case of addition, the combination of initial and final conditions does not give enough information about osmotic response. This situation when impermeable buffer is moderate hyper osmotic, is presented as Case 2 in Table 1. We consider it after Cases 1 and 2 because the response of this case is either the way similar to the Case 1, or it may go by way presented on Case 3. For this case, the ratio of the concentrations CPA is less than that of the impermeable components ( $Y_0/Y_f < Z_0/Z_f$ ), and  $w_{BVH} < w_f$ . From the other hand, for this case,  $Z_0/Z_f < 1$ , that leads to the conclusion that  $w_{BVH} < w_f < w_0$ . As soon  $w_{BVH} < w_0$ , the cell starts shrinking at the beginning of the procedure that accompanies by influx of the CPA inside the cell. As we will see in the next chapters, the amount of CPA that comes into the cell in exchange of amount of water that effluxes the cell depends on their relative perme-

ability that can be expressed in tonicity units as  $C_{rp} = P_{CPA}/(L_p RT)$ . If the relative permeable term is much lower than the iso-osmotic value ( $C_{rp} \ll C_{iso}$ ), the membrane permeability to the CPA is much lower than to water. In this case, the cell shrinks very fast to the value that is close to  $w_{BVH}$ . If this value at the end of the fast shrinkage stage is lower than the final value of the water volume  $w_0$ , and at the moment of equilibrium of the total tonicities, the concentration of internalsalts" exceeds the external value. As the result, at this moment the situation becomes similar to the Case 3, cells starts re-swelling, and the peak point with minimum volume  $w_m$  exists. If the permeability to the CPA is high ( $C_{rp} \sim$  or  $> C_{iso}$ ), than a substantial amount of the CPA penetrates the membrane during the first stage, and at the moment of the equalizing of total tonicities, the intracellular volume  $w_m$  will be higher than  $w_f$ . That means that at that moment, the intercellular concentration of the salts is less than its extracellular value, while the intracellular concentration of CPA exceeds its external value. This situation is essentially the same as for "hyper saturated" Case 1 described above: the internal CPA starts escapes the cell accompany sub ing the efflux of water, and the cell continues to shrink to the final volume. In this case the pattern of water volume is monophasic, while pattern of intracellular concentration and amount of CPA is bi-phasic, as in the Case 2. The only difference that for this situation, the total amount of the CPA is higher at the final moment ( $Y_0/Y_f < Z_0/Z_f \rightarrow w_0 Y_0 < w_f Y_f \rightarrow X_0 < X_f$ ), while for the Case 1 the net flux of the CPA is negative. This case and its practical application as will be described in details in a companion paper (Katkov *et al.* Some aspects of osmotic reaction of cells. IV. Vitrification of Rat Embryos).

If at the start of addition ( $Y_0 < Y_f$ ), the extracellular concentration of the impermeable buffer is so low ( $Z_0/Z_f > 1$ ) that the total intracellular tonicity does not exceeds that of extracellular value ( $M_0/M_f \geq 1$ ), as it is presented in Case 4 of Table 1, then the cell start to swell immediately [In case of  $M_0 = M_f$ , the first portion of permeated CPA disturbs unstable equilibrium and initializes swelling]. We call this process as "hypo-osmotic buffering" during addition, that is similar to "hyper osmotic buffering" of dilution that is widely used in vitrification protocols. This influx of water dilutes the intracellular CPA at the first moment, and cases to larger and faster influx of the CPA as any other cases. The advantage of this method may be in the cases when tolerable limit of the cell to swelling is substantially higher than that of shrinkage.

**Dilution.** Essentially the same approach can be symmetrically applied to the dilution of the CPA ( $Y_0 > Y_f$ ) as it is done in Table 2. To do so, we replaced ">" with "<", where it's implied. We also substituted terms of pattern (shrinkage, increasing, etc) with their antonymy sub ms. We would like, however, to emphasize that relative practical application of the



Cases are listed in Tables 1 and 2 are not symmetrical: because the use of hypo osmotic impermeable buffer is relatively rare both for addition and dilution, the practical importance of "hyper saturation" (Table 1, Case 1) for addition and "hyper osmotic" buffer suppression (Table 2, Case 4) for dilution are much more important, especially for variety of vitrification procedures, than "hyper dilution" (Table 2, Case 1) or hypo-osmotic buffering of shrinkage during addition (Table 1, Case 4). Nevertheless, one may find useful this systematization during developing of new methods.

**Cell parameters and model chosen for stimulations.** The size of the cell, iso-osmotic water volume and the membrane water permeability are chosen to be close to those for mouse sperm at 300 K [4, 10, 15], namely:  $V_{iso} = 55 \mu^3$ ,  $v_b = 0.61$ ,  $W_{iso} = 33.5 \mu^3$ ,  $A = 120 \mu^2$ ,  $L_p = 2.0 \mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$ .

We have chosen the 2-parameter model of osmotic response for reasons explained in Appendix. The model describes the flux of water as pure osmotic response accordingly to the Osmotic Pressure Law, and the flux of the permeable solute according to the Fick's diffusion law [2]. No interaction between water and the CPA membrane is implied (independent pathways). This model operates with two membrane permeability parameters, namely, the water permeability  $L_p RT$ , and the CPA-permeability  $P_{CPA}$ , [the way to use the original Kedem-Katchalsky's  $\omega$  for the CPA-permeability has introduced a lot of misunderstanding and misuse]. We refer this model as "the 2-parameter

model" accordingly to [3]. Then, the coupled differential equation can be expressed as follows: for cellular water volume:

$$dW/dt = -L_p RT A [(Y_f - Y) + (Z_f - C_{iso} W_{iso}/W)]; \quad (9)$$

for intracellular amount of CPA:

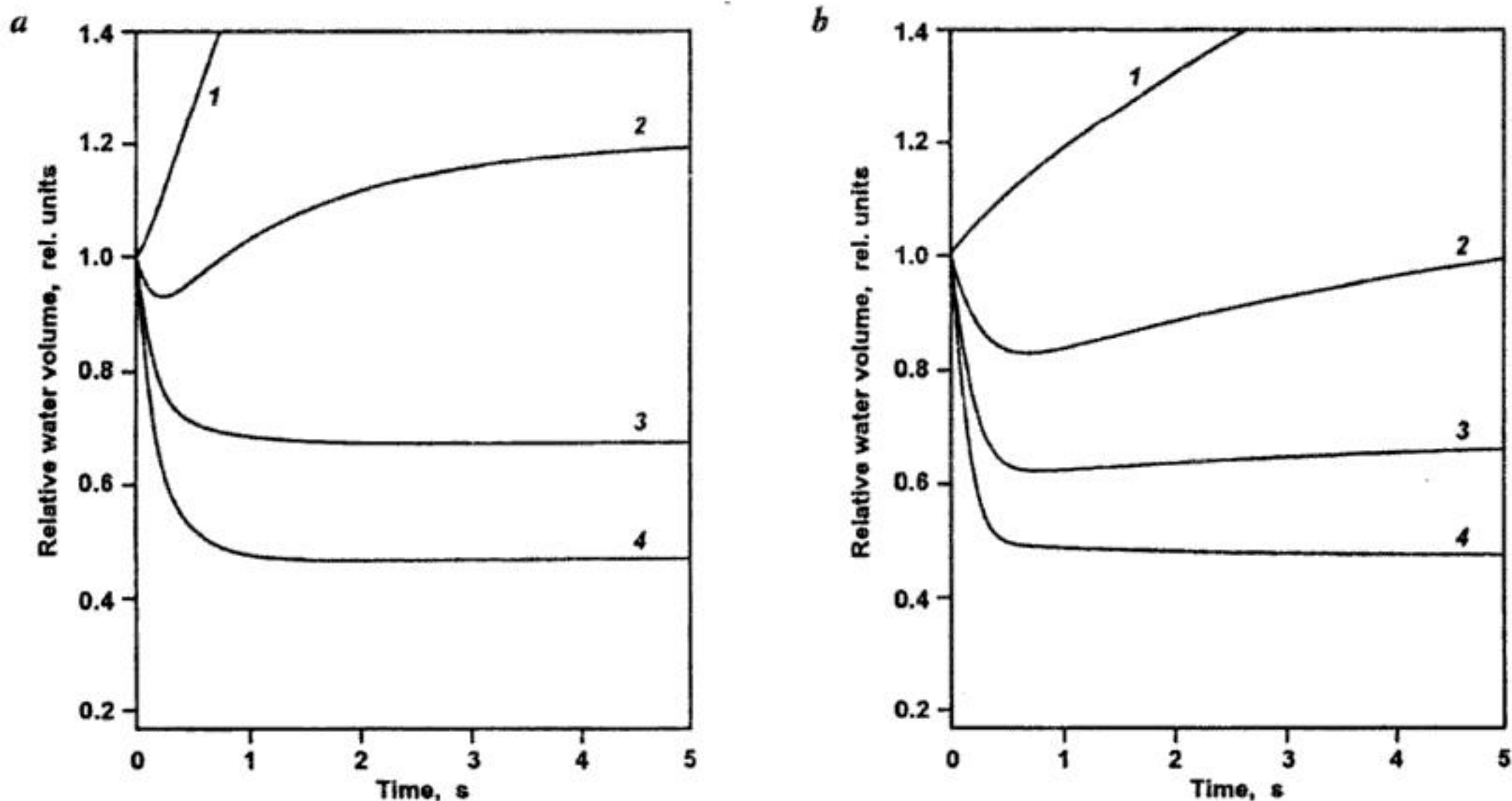
$$dX/dt = W dY/dt + Y dW/dt = P_{CPA} A (Y_f - Y), \quad (10)$$

where  $W$  is the absolute actual value of volume water,  $X$  is the amount of moles of intracellular CPA,  $Y$  is the molal concentration of intracellular CPA, and  $A$  is the surface area.

The initial conditions for Eqs (9), (10) are:  $Y = Y_0$  and  $W = W_0$  at time zero. If  $Z_0$  is given, then  $W_0 = C_{iso} W_{iso}/Z_0$ .

**Example (addition).** We will consider a hypothetical cell with initial iso-osmotic volume ( $w_0 = 1$ ,  $Z_0 = C_{iso} = 300 \text{ mOsm}$ ) that at time zero has been loaded with  $Y_0 = 200 \text{ mOsm}$  of the CPA. Even though in the majority of cryobiological procedures concentration of extracellular CPA is the most commonly altered parameter, the final concentration of the CPA in our examples is also being fixed at value  $Y_f = 400 \text{ mOsm}$  for demonstration purposes. The altering parameter will be the impermeable buffer. We consider four cases when the extracellular tonicity of the buffer is altered as  $Z_f = 650, 450, 250$  or  $50 \text{ mOsm}$ . According to the Table 1, they represent Cases 1, 2, 3 and 4, respectively.

We will consider two cases: a highly permeable to the CPA membrane ( $P_{CPA} = 35 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $C_{cp} = 700 \text{ mOsm}$ ), and the case for a low-permeable



**Fig. 1.** Kinetics of change of intercellular water volume during addition of CPA in different concentrations of extracellular buffer  $Z_f$ , mOsm: 50 (1), 250 (2), 450 (3), 650 (4). Initial concentration of CPA  $Y_0 = 200 \text{ mOsm}$ , concentration of CPA in the medium  $Y_f = 400 \text{ mOsm}$ . The cell initially was pre-equilibrated in iso-tonic medium ( $Z_0 = 300 \text{ mOsm}$ ). The water volume is normalized to iso-tonic value. The lowest curve represents Case 1 in Table 1, the next — Case 2, etc. Cell parameters chosen for simulation are close to mouse sperm:  $V_{iso} = 55 \mu^3$ ,  $v_b = 0.61$ ,  $W_{iso} = 33.5 \mu^3$ ,  $A = 120 \mu^2$ ,  $L_p = 2.0 \mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$ . Figure a represents the situation when the relative membrane permeability is high ( $C_{cp} = 700 \text{ mOsm}$ ), in b it is low ( $C_{cp} = 70 \text{ mOsm}$ ).



membrane ( $P_{CPA} = 3.5 \text{ } \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $C_{cp} = 70 \text{ mOsm}$ ). Figure 1, *a*, *b* represent simulation of osmotic response for both cases assuming there is no interaction between solute and solvent [6], and the 2-parameter model for the coupled osmotic differential equations is to be used [3]. Non-applicability of the Kedem-Katchalsky 3-parameter model to the independent pathway assumption will be discussed below and in **Appendix**. Because of low concentration of CPA, the Scatchard's coefficients for activity and molality are assumed to be equal 1. Possible relatively high concentrations of the impermeable carrier would not change the general pattern. Another obstacle is that permeable and non-permeable component may interact with each other affecting their chemical potentials, but this question is not a topic of the present paper.

As we can see for the Fig. 1, *a*, *b*, the lowest curves that are presented Case 1 in Table 1 implies to the "hyper saturation" pattern: initially the driving forces both for the CPA and the "salts" acts in the same direction, and the cell shrinks very fast. The kinetic of and time-frame of this shrinkage depends mostly on the membrane permeability to water, and pattern curves in Figs. 1, *a* and 1, *b* is similar.

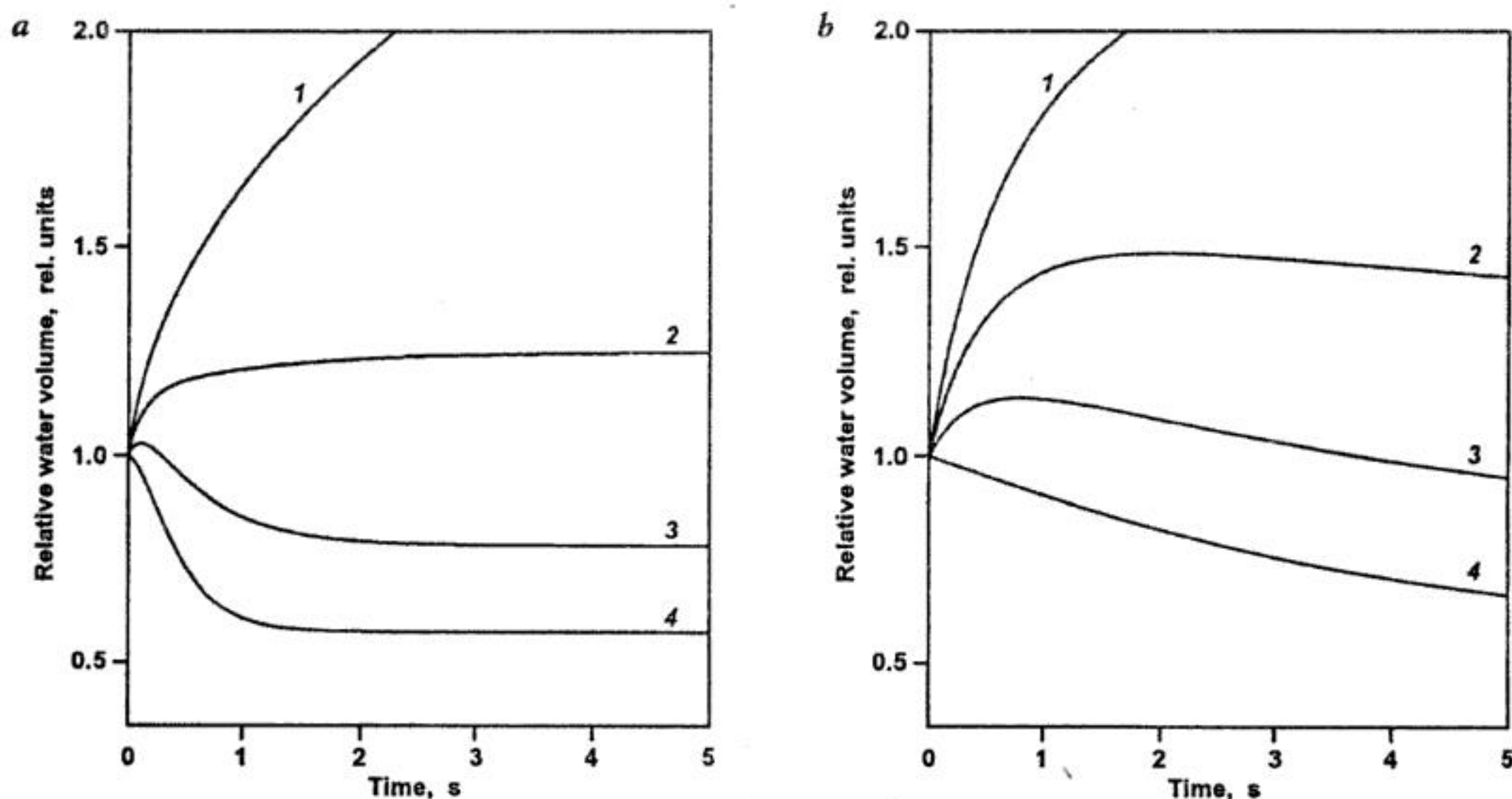
For the upper curves that represent the Case 4 (hypo osmotic swelling only), the driving forces for the CPA and the salt are in opposite direction, and the cell does not swell so fast as it shrinks in Case 1. The main process that determines time-frame of this addition is the diffusion of initially diluted CPA that occurs relatively slower than any shrinkage for other cases even for a highly permeative to the CPA membrane (Fig. 1, *a*). In this case, processes of swelling

occurs much faster than in case of upper curve shown on Fig. 1, *b* because of much higher cell membrane permeability to CPA for former. The final value  $w_f = 6.0$  is not shown, however initial slope of the upper curve in Fig. 1, *a* is approximately 10 times higher than for the upper curve in Fig. 1, *b*.

The pattern of the second upper curve in Figs. 1, *a*, *b* represents Case 3 (slightly hyper osmotic buffer), and this is a "classic" bi-phasic response. The amplitude of volume excursion and the time frame of the reaction, however, are different: the highly permeable membrane allows to permeate the CPA very fast, the equilibration of total tonicity occurs quickly, and the level of peak volume  $w_m$  are substantially lower than for low-permeable case.

The difference in permeability affects the pattern of the second lower curve in the Figures 1 that represents the intermediate Case 2 and intermediate hyper osmolarity 450 Osmol. For the highly permeable membrane, (the second lower curve in Fig. 1, *a*) the "hyper saturation" of intracellular CPA resembles this case with the lowest curve on Fig. 1, *a*, the cell shrinks initially fast than slower to the lowest final value  $w_f$ . The low-permeable model (the second lower curve in Fig. 1, *b*) represents "quasi-impermeable" response, and the cell follows ~BVH-shrinkage to the level that is lower than the final value. The peak of maximum volume excursion exists, and generically is the same curve as in the Case 3 (the next upper curve in this figure), even though the amplitude of the excursions and its kinetics is different.

**Example (dilution).** Figures 2, *a*, *b* depict the relative volume changes of the cell with initial iso-



**Fig. 2.** Kinetics of change of intercellular water volume during dilution of CPA in different concentrations of extracellular buffer  $Z_f$ , mOsm: 100 (1), 240 (2), 380 (3), 520 (4). Initial concentration of CPA  $Y_0 = 400 \text{ mOsm}$ , concentration of CPA in the medium  $Y_f = 200 \text{ mOsm}$ . The cell initially was pre-equilibrated in iso-tonic medium ( $Z_0 = 300 \text{ mOsm}$ ). The water volume is normalized to iso-tonic value. The lowest curve represents Case 1 in Table 2, the next — Case 2, etc. Cell parameters chosen for simulation are close to mouse sperm:  $V_{iso} = 55 \text{ } \mu^3$ ,  $v_b = 0.61$ ,  $W_{iso} = 33.5 \text{ } \mu^3$ ,  $A = 120 \text{ } \mu^2$ ,  $L_p = 2.0 \text{ } \mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$ . Figure *a* represents the situation when the relative membrane permeability is high ( $C_{cp} = 1400 \text{ mOsm}$ ), in *b* it is low ( $C_{cp} = 70 \text{ mOsm}$ ).



osmotic volume ( $w_0 = 1$ ,  $Z_0 = 300$  mOsm) initial concentration of glycerol  $Y_0 = 400$  Osm; we consider that during a multi step dilution procedure the cell is placed into the bath with extracellular concentration of glycerol  $Y_f = 200$  Osm. The altering parameter in the simulation is the external concentration of impermeable carrier.

The first top curves in Figs. 2, *a*, *b* represent the osmotic response when extracellular concentration of the "salts"  $Z_f = 100$  mOsm corresponding to Case 1 in Table 2. For the second top curves,  $Z_f = 240$  mOsm, for the second lower curves,  $Z_f = 380$  mOsm, for the lowest curves,  $Z_f = 520$  mOsm, representing Cases 2, 3 and 4, respectively

The curves on Fig. 2, *a* represents the case when the permeability to the CPA is high and equals  $70 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $C_{rp} = 1400$  mOsm), and for Fig. 2, *b* the CPA-permeability as low as  $3.5 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $C_{rp} = 70$  mOsm).

The first top curves in the Figs. 2, *a*, *b* is the case of "hyper dilution" (Case 1 in Table 2) when initially rapid influx of water leads to dilution of the intracellular CPA lower than the extracellular, and permeable solute begins returning to the cell accompanying to continuing flow of water into the cell. At the equilibrium, the cell undergo very large swelling, that even though, the final concentration of the intracellular CPA is lower than the initial one, the total amount of the CPA is higher than it was at time zero. That is why in this case the term "dilution" is more appropriate for final results than "removal".

As in the Case 3 for the addition, for the dilution, Case 3 (the second lower curves in the figures) represents situation when the osmotic response is always bi-phasic regardless permeability, and maximum peak volume  $w_m$  always exists.

The second top curve in Figs. 2, *a* and 2, *b* show the different pattern depending on the value of relative permeability. In case of high permeability (the curve in Fig. 2, *a*), the cell swells initially fast, however, the CPA penetrates the cell also very fast. At the moment when the total intercellular tonicity reaches unstable equilibrium with the total extracellular counterpart, the water volume is lower than the final volume. At this point, the situation is similar to the "hyper dilution" for Case 1, and the CPA starts returning back to the cell. It leads to responding influx of water to maintain the osmotic balance, and cells continue to swell to its final volume. As the results, the pattern of osmotic response for Case 2 in Fig. 2, *a* as in the Case 1 is monophonic swelling. The difference between Case 1 and this situation is that the total amount of the intracellular CPA at the equilibrium is lower than the initial value  $X_0$  while for the Case 1 for dilution, the reverse influx of the CPA is so large that the final amount of CPA exceeds the initial value. For the situation when the permeability is low (the curve on Fig. 2, *b*), the Case 2 represents a classical bi-phasic response with initial rapid swelling and slow

re-shrinkage. That resembling this situation with the Case 3, however, time frame and amplitude of the cell volume excursion is substantial different.

The lowest curves in both Figures represent the case of "hyper osmotic" suppressing of swelling (Case 4): high concentration of external impermeable solute produces monophasic swelling without shrinkage.

Summarizing both dilution and addition, we would like to emphasize the fact that if under a particular conditions, the pattern of change of water volume is bi-phasic (Case 1 and Case 2 for low relative low-permeability), than pattern of change of intercellular CPA is monotonic increase (addition) or decrease (dilution). In Cases 1, 4 and 2 (high relative permeability), the pattern of change of water volume is monotonic, while the intercellular concentration of CPA changes with minimum or maximum peak value.

### Acknowledgments

This work was partially supported by Dr. Peter Mazur's grant RO1-HD30274. It is also pleasure to express our appreciation to Dr. Fritz Kleinhans for tuition on "MicroMath" software and for pointing out the idea of the advantage of using the 2-parameter model and Ms. Nadezhda Katkova for help in preparation of draft of the manuscript.

### Appendix

#### KK-formalism or the 2-p model: which is appropriate?

There are two possible approaches for analyzing of osmotic response in presence of a permeable solute.

1. The one way is to describe the flux of water as pure osmotic response accordingly to the osmotic pressure Law [2], and the flux of the permeable solute according to the Fick's diffusion law [13]. No interaction between water and the CPA when they cross membrane is implied (independent pathways). Then coupled differential equation can be expressed as follows:

for cellular water volume:

$$\Gamma_w = dW/dt = -L_p RT A [(Y_f - Y) + (Z_f - C_{iso} W_{iso}/W)]; \quad (A1)$$

for the intracellular amount CPA:

$$\Gamma_D = dX/dt = W dY/dt + Y dW/dt = P_{CPA} A(Y_f - Y), \quad (A2)$$

where  $W$  is the absolute actual value of volume water, and  $A$  is the surface area. Note that  $dV_{CPA}/dt = \Gamma_D v_{CPA}$ , is the derivative of the volume occupied by intracellular CPA, where  $v_{CPA}$  is the partial molar volume of the CPA.

The initial conditions for Eqs. (A1) and (A2) are  $Y = Y_0$  and  $W = W_0$  at time zero. If  $Z_0$  is given, than  $W_0 = C_{iso} W_{iso}/Z_0$ .

This model operates with two membrane permeability parameters (if consider "volume" permeability



ties), namely the water permeability  $L_p RT$ , and the CPA-permeability  $P_{CPA}$ . We will call this model as "the 2-p[arameter] model" as it was referred in [3].

2. The Kedem-Katchalsky model implies interaction (friction, dragging, etc) between water and the CPA. The third membrane parameter, namely unit less coefficient of reflection  $\sigma$  is implied as the characteristic of this interaction. For diluted solutions ( $Y \cup_{CPA} \ll 1$ ), the KK-equations are expressed as follows:

for the total cell volume:

$$\Gamma_v = dV/dt = \Gamma_w + \Gamma_1; \quad (A3)$$

for the amount of intracellular CPA:

$$\Gamma_{CPA} = dX/dq = W dY/dt + Y dW/dt = \Gamma_D + \Gamma_2, \quad (A4)$$

where  $V$  is the absolute actual value of volume water,  $\Gamma_1 = dV_{CPA}/dt = (1 - \sigma) L_p RT A (Y_f - Y)$  and  $\Gamma_2 = -(1 - \sigma) \Gamma_v (Y_f - Y) \ln(Y_f/Y)$  is the friction term that reflects the "dragging" effect during interaction between the CPA and water inside the pathways. Note that  $dV_{CPA}/dt = \Gamma_{CPA} \cup_{CPA}$  is the derivative of the volume occupied by intracellular CPA.

**Interaction or independent pathways?** If we assume that is no interaction between solute and solvent ( $\Gamma_2 = 0$ ), than it can be shown, that systems A1 and A2 become identical ( $\Gamma_1 = \Gamma_D \cup_{CPA}$ ) if we substitute  $1 - \sigma = k$ , where  $k$  is the relative volume permeability coefficient  $P_{CPA} \cup_{CPA} / L_p RT$ . Note that  $dV/dt = dW/dt + dV_{CPA}/dt$ .

Thus, the "mathematical" criterion of distinction between the independent pathways (system A1) and the KK-interaction model (system A2) is not the absolute value of  $\sigma$  or  $k$ , but the relationship between these two values.

**The "golden rule" for fitting experimental curves.** If  $1 - \sigma$  is substantially higher than  $k$ , the interaction is reasonable at least "mathematically". If  $1 - \sigma$  is close to  $k$ , the pathways are predominantly independent;  $\Gamma_2$  MUST BE assumed as 0. If  $1 < k < 1 - \sigma$ , the independent pathways are self-evident (negative value of  $\sigma$  confirms it). If  $1 - \sigma < k < 1$  or  $1 < 1 - \sigma < k$ , it does not make any physical sense, or the experimental curve does not fit both models.

There are, however some other reasons we prefer the two-parameter model:

1. Kedem and Katchalsky originally implied the 3-parameter "interaction" model for "macro membranes" where solute and solvent both come through big size "coarse capillary membranes", while independent pathways are more likely applicable to "mosaic" [presumably cell.] membranes [8].

2. KK-model is applicable to diluted suspensions only (the friction term  $\Gamma_2$  is derived from this assumption). The 2-p model is applicable for concentrated solutes if, e.g., Scatchard's corrections are made [3].

3. The reflection coefficient  $\sigma$  is less sensitive to alterations of experimental data than  $L_p$  and  $P_{CPA}$  (F. W. Kleinhans, personal communications), that may bias the real values of water and solute perme-

abilities and even lead to the physical non-sense described above.

4. The 2-p model is simpler. Unless strict evidences in favor of interaction are presented, there is no reason to "create additional properties" (the "Ockham's blade" rule).

In practice, very often both model are non-distinctive in the majority cases if the same  $L_p$  and  $P_{CPA}$  are used [the reasonable difference occurs if  $Y \cup_{CPA}$  is not substantially less than 1, results of simulations will be published somewhere]. However, the use the third parameter  $\sigma$  may introduce a bias in determination of the other two parameters if simultaneous fitting of three parameters to experimental data is performed. That is why, we believe that using of the K-K model is only reasonable if the strict independent biophysical evidence of the fact that solute and solvent passes the membrane through the same channels is presented. Discovery of specific aqueous channels (aquaporines) as well solute-specific membrane structures makes the assumption of interacting (mistakenly referred as "coupled" in some literature) pathways in many cases quite questionable.

## REFERENCES

1. Critser J.K., Huse-Brenda A.R., Aaker D.V., et al. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility // *Fertil. Steril.*— 1988.— 50.— P. 314–320.
2. Dick D.A.T. // *Cell Water.*— Buttersworth, Washigton, 1966.— P. 83–120.
3. Du J., Kleinhans F.W., Mazur P., and Critser J.K. Human spermatozoa glycerol permeability and activation energy determined by electron paramagnetic resonance // *Biochem. Biophys. Acta.*— 1994.— 1194.— P. 1–11.
4. Du J., Tao J., Kleinhans F.W., et al. Water volume and osmotic behavior of mouse spermatozoa determined by electron magnetic resonance // *J. Reprod. Fertil.*— 1994.— 101.— P. 37–42.
5. Gao D.Y., Liu J., Liu C., et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol // *Human Reproduction.*— 1995.— 10.— P. 1109–1122.
6. Gilmore J.A., McGann L.E., Liu J., et al. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa // *Biol. Reprod.*— 1995.— 53.— P. 985–995.
7. Katkov I.I., Katkova N., Critser J.K., and Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: Chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentration // *Cryobiology.*— 1999.— 38: in press
8. Kedem O. and Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes // *Biochem. Biophys. Acta.*— 1958.— 27.— P. 229–246
9. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // *Am. J. Physiol.*— 1984.— 247, *Cell Physiol.*— 16.— P. C125–142.
10. Noiles E. E., Thompson K. A., and Storey B. Water permeability  $L_p$  of the mouse spermatozoa and its activation energy are strongly dependent on interaction of plasma membrane with the sperm cytoskeleton // *Cryobiology.*— 1997.— 35.— P. 79–92.
11. Rowe A. W., Eyster E., and Kellner A. Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion: a low glycerol-rapid freeze procedure // *Cryobiology.*— 1968.— 5.— P. 119–128.
12. Schneider U. and Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability to the survival of frozen-thawed embryos // *Theriogenology.*— 1984.— 21.— P. 68–79.
13. Stein W. D. The Transport of Molecules Across Cell Membranes.— Academic Press, NY, 1967.— P. 40.
14. Watson P. F. The preservation of semen in mammals // *Oxford Reviews of Reproductive Biology* (Finn C.A. ed.), vol. 1.— Oxford University Press, Oxford, 1979.— P. 283–350.
15. Willoughby C. E., Mazur P., Peter A. T., and Critser J. K. Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa // *Biol. Reprod.*— 1996.— 55.— P. 715–727.

Accepted in 13.10.98



# Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда n-спиртов.

## Часть 2. Перераспределение неэлектролитов в системе "клетка-среда"

Л. Г. КУЛЕШОВА, Ю. В. КУЧЕРЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

# Transformation of Human Erythrocytes in the Solutions of Non-electrolytes of n-Alcohols Series.

## Part 2. Redistribution of Non-electrolytes in the "Cell-Medium" System

L. G. KULESHOVA, Yu. V. KUCHERENKO

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

Методами световой микроскопии и  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии исследовано влияние растворов неэлектролитов ряда n-спиртов на морфологию эритроцитов человека и оценен коэффициент распределения  $Q$  между клеткой и средой. Установлено, что в стационарном состоянии между формой эритроцитов и характером перераспределения неэлектролитов в системе "клетка-среда" существует взаимосвязь.

Методами світлової мікроскопії і  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопії досліджено вплив неелектролітів ряду n-спиртів на морфологію еритроцитів людини та оцінено коефіцієнт розподілу  $Q$  між клітиною і середовищем. Установлено, що в стаціонарному стані між формою еритроцитів і характером перерозподілу неелектролітів у системі "клітина-середовище" існує взаємозв'язок.

The effect of non-electrolytes solutions of n-alcohols series on morphology of human erythrocytes was studied by the methods of light microscopy and  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy and the coefficient of distribution between a cell and medium was estimated. It has been established that there is a correlation in a stationary state between a shape of erythrocytes and character of redistribution of non-electrolytes in the "cell-medium" system.

Мерой перераспределения неэлектролитов в системе "клетка-среда" служил коэффициент распределения  $Q$ , равный отношению концентрации вещества в клетке к его концентрации во внеклеточной среде. Исследовали следующие неэлектролиты: этанол, 1,2-пропандиол, глицерин марки ХЧ, а также полиэтиленгликоли молекулярных масс 400, 600, 1500 фирмы "Merck" (ФРГ). Растворы исследуемых веществ в гипертонической концентрации готовили, используя 15 мМ фосфатный буфер, содержащий 150 мМ NaCl (pH 7,4).

Методика приготовления образцов для  $^1\text{H}$ -ЯМР исследований следующая: 30%-й раствор исследуемого неэлектролита по каплям (при постоянном перемешивании) добавляли к отмытой суспензии эритроцитов в соотношении 1:1 (по объему). Для отделения клеток от межклеточной жидкости смесь выдерживали в термостате 20–30 мин при 25 °С, а затем центрифугировали (1 200g, 10 мин).

ЯМР исследования проводили на спектрометре "Tesla BS 597 A" с рабочей частотой 100 МГц для протонов. Разрешение в спектрах надосадочной жидкости при вращении ампулы с образцом в датчике (20 об/с) составляло 2–3 Гц, в спектрах плотной суспензии клеток — 2–6 Гц.

The measure of redistribution of non-electrolytes in the "cell-medium" system was the coefficient of distribution  $Q$ , equal to the ratio of the substance concentration in a cell to its concentration in extracellular medium. The following non-electrolytes were studied: ethanol, 1,2-propane diol, chemically pure glycerol, as well as polyethylene glycols of molecular masses of 400, 600, 1500 (Merck, Germany). The solutions of investigated substances were prepared under hypertonic concentration, using 15 mM phosphate buffer, containing 150 mM NaCl (pH 7.4).

Preparation of samples for  $^1\text{H}$ -NMR studies was as follows: 30% solution of studied non-electrolytes by drops (during non-stop stirring) was added to washed-out suspension of erythrocytes (1:1, v/v). To separate cells from intercellular liquid the mixture was thermostated within 20–30 min at 25 °C and then centrifuged (1 200g, 10 min).

NMR studies were carried out using a "Tesla BS 597 A" spectrometer with an operating frequency of 100 MHz for protons. Resolution in spectra under rotation (20 RPM) of a sample containing tube was 2–3 Hz (for supernatant liquid) 2–6 Hz (for dense suspension).

Since integral intensity of a substance signal in NMR spectrum is proportional to the number of resonating nuclei, this allows to use it as the measure for



Поскольку интегральная интенсивность сигнала вещества в спектре ЯМР пропорциональна числу резонирующих ядер, это позволяет использовать ее как меру концентрации вещества в растворе [4, 5]. Коэффициент распределения  $Q$  вычисляли из соотношения площадей сигналов углеводородных групп неэлектролита  $S_{\text{вещ}}^*$  и сигнала гидроксильных групп  $S_{\text{вод}}^*$ , образованного протонами воды и гидроксильными протонами неэлектролита.

Метод определения значений  $Q$  следующий: из  $^1\text{H}$ -ЯМР спектров плотной суспензии эритроцитов и надосадка при помощи встроенного в спектрометр интегратора вычисляли площади под сигналами углеводородных групп исследуемого вещества (ошибка вычисления не превышала 10%). Для учета вклада  $\text{OH}^-$  групп неэлектролита из общего сигнала воды и  $\text{OH}^-$  групп вычитали величину  $A$ :

$$S_{\text{вод}} = S_{\text{вод}}^* - A, \quad A = S_{\text{вещ}}^* / k,$$

где  $k$  — константа, равная для этанола 5, 1,2-пропандиола — 3, глицерина — 5/3, ПЭГ-400 — 18, ПЭГ-600 — 24, ПЭГ-1500 — 68.

Истинная концентрация вещества внутри или вне клетки

$$S_{\text{вещ}} = S_{\text{вещ}}^* + A.$$

Величину  $K$  определяли из формулы

$$K = S_{\text{вещ}} / S_{\text{вод}}, \quad (1)$$

а искомый коэффициент распределения — из соотношения

$$Q = K_{\text{эр}} / K_{\text{над}}, \quad (2)$$

где  $K_{\text{эр}}$  — значение величины  $K$  в плотной суспензии эритроцитов;  $K_{\text{над}}$  — значение величины  $K$  в надосадке.

Поскольку плотная суспензия эритроцитов, полученная после эквilibрации клеток с неэлектролитом, включала, кроме эритроцитов, некоторое количество внеклеточной жидкости, была внесена поправка на остаточный объем внеклеточной жидкости в расчетную формулу (2). Остаточный объем межклеточной жидкости оценивали измерением гематокритного числа в осадке клеток, полученном после центрифугирования эритроцитов, суспендированных в растворе криопротектора. Гематокритное число измеряли по стандартной методике центрифугирования образцов в тонком капилляре на центрифуге типа МГЦ-8.

Таким образом, величину  $K$  в эритроmasсе определяли по формуле

$$K_{\text{эр}}^{\text{расч}} = \frac{100 (K_{\text{эр}}^{\text{изм}} - V_{\text{ост}} K_{\text{над}}^{\text{изм}} / 100)}{100 - V_{\text{ост}}}, \quad (3)$$

где  $K_{\text{эр}}^{\text{изм}}$  — экспериментальное значение величины  $K_{\text{эр}}$ ;  $K_{\text{над}}^{\text{изм}}$  — экспериментальное значение величины  $K$  в надосадочной жидкости;  $V_{\text{ост}}$  — поправка на остаточный объем внеклеточной жидкости.

the substance concentration in a solution [2, 5]. The distribution coefficient  $Q$  was calculated from the correlation of the areas of signals of carbohydrate groups of non-electrolyte  $S_{\text{sub}}^*$  and the signal of hydroxyl groups  $S_{\text{wat}}^*$ , formed by water protons and non-electrolyte hydroxyl protons.

The method of determination of  $Q$  values was as follows: the areas under the signals of carbohydrate groups of the substance studied were calculated from  $^1\text{H}$ -NMR spectra of a dense suspension of erythrocytes and a supernatant using by means spectrometer integrator (calculation error was less than 10%). To register the contribution of  $\text{OH}^-$  groups of non-electrolytes from the total signal of water and  $\text{OH}^-$  groups the  $A$  value was subtracted:

$$S_{\text{wat}} = S_{\text{wat}}^* - A, \quad A = S_{\text{sub}}^* / k,$$

where  $k$  — constant, equal to 5 for ethanol, 1,2-propanediol — 3, glycerol — 5/3, PEG-400 — 18, PEG-600 — 24, PEG-1500 — 68.

Substance real concentration inside and outside a cell:

$$S_{\text{sub}} = S_{\text{sub}}^* + A.$$

The  $K$  value was calculated from the equation:

$$K = S_{\text{sub}} / S_{\text{wat}}, \quad (1)$$

Unknown distribution coefficient:

$$Q = K_{\text{er}} / K_{\text{sup}}, \quad (2)$$

where  $K_{\text{er}}$  —  $K$  value in a dense suspension of erythrocytes;  $K_{\text{sup}}$  —  $K$  value in supernatant.

Since a dense suspension of erythrocytes, obtained after cell equilibration with non-electrolyte included along with erythrocytes some amount of extracellular liquid, the correction for residual volume of extracellular liquid was performed. A residual volume of extracellular liquid was evaluated by measuring hematocrit number in a cell sediment, obtained after centrifugation of erythrocytes, suspended in the cryoprotectant solution. Hematocrit number was measured according to standard procedure of centrifugation of samples in a thin capillar using a MHC-8 centrifuge.

Thus the  $K$  value in a dense cells suspension was defined from the equation:

$$K_{\text{er}}^{\text{cl}} = \frac{100 (K_{\text{er}}^{\text{exp}} - V_{\text{rem}} K_{\text{sup}}^{\text{exp}} / 100)}{100 - V_{\text{rem}}}, \quad (3)$$

where  $K_{\text{er}}^{\text{exp}}$  — experimental meaning of  $K_{\text{er}}$  value;  $K_{\text{sup}}^{\text{exp}}$  — experimental meaning of  $K$  value in supernatant liquid;  $V_{\text{rem}}$  — the correction for residual volume of extracellular liquid.

Numeric values of the  $Q$  distribution coefficients of studied non-electrolytes are presented in the table. For low molecular substances (ethanol, 1,2-propanediol, glycerol) the  $Q$  values are close to 1 and make 1.21, 0.92, 0.84, correspondingly. It means that under



Численные значения коэффициентов распределения  $Q$  исследованных неэлектролитов приведены в таблице. Для низкомолекулярных веществ (этанол, 1,2-пропандиол, глицерин) значения  $Q$  близки к 1 и составляют 1,21, 0,92, 0,84 соответственно. Это означает, что в стационарных условиях концентрации неэлектролитов в клетке и во внеклеточной среде практически совпадают. Таким образом, термодинамическое равновесие в условиях внеклеточной гипертоничности устанавливается за счет проникновения веществ в клетку. При этом эритроциты трансформируются в сфероэритроциты (глицерин) и сферостоматоциты (этанол, 1,2-пропандиол). Известно, что действие неразветвленных короткоцепочечных  $n$ -спиртов на клеточные мембраны сопровождается изменением их текучести, поверхностного заряда, толщины, диэлектрической проницаемости [7–9, 13]. Быстро проникая в клетку, связывая и заменяя внутриклеточную воду, данные соединения уменьшают количество растворяющей свободной воды клетки, что приводит к изменению коллоидных свойств протоплазмы в целом, в том числе и свойств спектринового геля, а это, несомненно, отражается на форме эритроцитов.

**Значения коэффициентов распределения серии неэлектролитов ряда  $n$ -спиртов по данным  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии**

| Вещество       | Отношение интенсивности сигнала вещества к сигналу воды |              | Остаточный объем межклеточной жидкости в плотной суспензии клеток, % | Значение $Q$ по формулам (2) и (3) |
|----------------|---------------------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                | Надосадочная жидкость                                   | Эритрограмма |                                                                      |                                    |
| Этанол (5)     | 0,081±0,004                                             | 0,097±0,005  | 5–10                                                                 | 1,23±0,12                          |
| Пропандиол (5) | 0,067±0,004                                             | 0,064±0,003  | 6–10                                                                 | 0,95±0,10                          |
| Глицерин (6)   | 0,081±0,005                                             | 0,070±0,004  | 5–10                                                                 | 0,85±0,09                          |
| ПЭГ-400 (5)    | 0,229±0,010                                             | 0,127±0,019  | 1–5                                                                  | 0,53±0,09                          |
| ПЭГ-600 (5)    | 0,246±0,012                                             | 0,134±0,017  | 1–5                                                                  | 0,52±0,09                          |
| ПЭГ-1500 (5)   | 0,308±0,013                                             | 0,127±0,021  | 1–2                                                                  | 0,40±0,08                          |

**Примечание.** В скобках указано количество экспериментов.

Величины коэффициентов распределения для высокомолекулярных спиртов ПЭГ-400, ПЭГ-600, ПЭГ-1500 составляют 0,53, 0,51, 0,40 соответственно. Следует отметить, что столь высокие значения величины  $Q$  обусловлены низким содержанием свободной растворяющей клеточной воды, по отношению к которой определяется концентрация веществ в клетке, и не означают, что данные соединения проникают в клетку в больших количествах. Напротив, увеличение количества оксигильных групп в молекулах ПЭГ, т.е. молекулярной массы, приводит к уменьшению коэффициента распределения  $Q$  (таблица), что свидетельствует об уменьшении проницаемости клеток для данных соединений. Поскольку при взаимодействии с высокомолекулярными спиртами трансформация эритроцитов сопровождается их обезвоживанием (дискоэритроцитоз: ПЭГ-400 — выраженный, ПЭГ-600 — умеренный; ПЭГ-1500 —

stationary conditions the concentrations of non-electrolytes in a cell and in extracellular medium are practically equal. Thus thermodynamic equilibrium under conditions of extracellular hypertonicity is established due to the penetration of substances into a cell. By these conditions erythrocytes transform into spherocytes (glycerol) and spherostomatocytes (ethanol, 1,2-propanediol). It is known, that the effect of non-branched short-chain  $n$ -alcohols on cellular membranes is accompanied by the change in their fluidity, surfacial charge, thickness, dielectrical permeability [7–9, 13]. Penetrating rapidly into a cell, binding and replacing intracellular water, these compounds reduce the quantity of solving free water of a cell, that results in the change of colloid properties of protoplasm in a whole, including the properties of spectrin gel, and this, without doubt, affects the erythrocyte shape.

**Values of distribution coefficients of non-electrolytes of  $n$ -alcohols series according to the data of  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy**

| Substance       | Substance to water signal intensity ratio |              | Residual volume of intercellular liquid in a dense cell suspension, % | Q value on (2) and (3) equations |
|-----------------|-------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
|                 | Supernatant liquid                        | Erythro-mass |                                                                       |                                  |
| Ethanol (5)     | 0.081±0.004                               | 0.097±0.005  | 5–10                                                                  | 1.23 ± 0.12                      |
| Propanediol (5) | 0.067±0.004                               | 0.064±0.003  | 6–10                                                                  | 0.95 ± 0.10                      |
| Glycerol (6)    | 0.081±0.005                               | 0.070±0.004  | 5–10                                                                  | 0.85 ± 0.09                      |
| PEG-400 (5)     | 0.229±0.010                               | 0.127±0.019  | 1–5                                                                   | 0.53 ± 0.09                      |
| PEG-600 (5)     | 0.246±0.012                               | 0.134±0.017  | 1–5                                                                   | 0.52 ± 0.09                      |
| PEG-1500 (5)    | 0.308±0.013                               | 0.127±0.021  | 1–2                                                                   | 0.40 ± 0.08                      |

**Note:** Number of experiments is given in brackets

The values of coefficients of distribution for high-molecular alcohols PEG-400, PEG-600, PEG-1500 make 0.53, 0.51, 0.40, correspondingly. It should be noted that such high meanings of the  $Q$  value are the result of a low content of free dissolving cellular water, relatively to which the concentration of substances in a cell is determined, and do not mean that these compounds penetrate into a cell in large amounts. Into the contrast, an increase in the number of oxyethyl groups in PEG molecules, i.e. of molecular mass, results in a reduction in the  $Q$  coefficient of distribution (Table), that testifies to a decrease of cell permeability for a given compound. Since during the interaction with high-molecular alcohols the transformation of erythrocytes is accompanied by their dehydration (discoechinocytosis: PEG-400 — manifested; PEG-600 — moderate; PEG-1500 — stomatocytosis), this testifies to a predominant localization of these compounds in extracellular medium. It should be taken into account, that polyethylene glycols possess a significant lipophilicity. The  $K$  coefficient of distribution, characterizing hydrophobic-hydrophilic properties of  $n$ -alcohols, in the system of  $\text{H}_2\text{O}$ –chloroform, for glycerol, 1,2-propanediol, PEG-400, PEG-1500 [3], makes, correspondingly  $1.0 \cdot 10^{-5}$ ,  $2.0 \cdot 10^{-3}$ ,  $2.7 \cdot 10^{-1}$ , 3.5, i.e., hydrophilicity of compounds falls in



стоматоцитоз), это также свидетельствует о преимущественной локализации данных соединений во внеклеточной среде. Следует учесть, что полиэтиленгликоли обладают значительной липофильностью. Коэффициент распределения  $K$ , характеризующий гидрофобно-гидрофильные свойства  $n$ -спиртов, в системе  $H_2O$ -хлороформ, для глицерина, 1,2-пропандиола, ПЭГ-400, ПЭГ-1500 [3] составляет соответственно  $1,0 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,0 \cdot 10^{-3}$ ,  $2,7 \cdot 10^{-1}$ , 3,5, т.е. гидрофильность соединений падает в указанной последовательности. И если более гидрофильные глицерин и 1,2-пропандиол не взаимодействуют с липидами мембраны, то ПЭГ-400 и ПЭГ-1500 более гидрофобны и способны либо адсорбироваться на поверхности мембраны, либо встраиваться в ее липидные бислои. Это приводит к изменению соотношения площадей липидных бислоев, вызывает полиморфные превращения в липидной фазе, связанные с нарушением бислоевой ламеллярной структуры, а также дегидратацию головок фосфолипидов и усиливает разделение бислоев [6, 7, 10, 11]. Кроме того, высокомолекулярные  $n$ -спирты могут действовать как детергенты, экстрагируя из наружного бислоя часть липидов, тем самым уменьшая его площадь [2].

Локализация вещества во внеклеточном пространстве способствует усилению действия осмотических сил на клетку. Существенная дегидратация клетки приводит к изменению осмотического давления спектринового геля, а молекулы ПЭГ, интеркалированные в мембрану, изменяют поверхностное натяжение мембранных белков. Дегидратация и изменение ионной силы, сопровождающие добавление высокомолекулярных  $n$ -спиртов к клеткам, приводят к структурным изменениям белков цитоскелета [13–15], в частности сократительного белка, супермолекулярный комплекс которого преимущественно содержит мембранный актин и миозин. Активность данного белка во многом определяет форму эритроцита [10]. По оценкам Merymen [12] при обезвоживании эритроцит может уменьшиться только на  $1/3$ , после чего сжатие клетки прекращается, а некомпенсированный осмотический градиент приводит к нарушению избирательной проницаемости мембраны и образованию гидрофильных пор, размер которых позволяет проникать в клетку веществам, в норме в нее не проникающим. Возможность диффузии ПЭГ-400 и низкомолекулярных фракций ПЭГ-1500 в эритроциты человека по флукутирующим порам показана в [1].

Таким образом, всесторонний анализ полученных экспериментальных данных позволяет утверждать, что в исследованном ряду неэлектролитов существует однозначная связь между коэффициентом их распределения  $Q$  в системе "клетка-среда" и формой эритроцитов. В растворах неэлектролитов, характеризующихся высоким значением  $Q$  ( $Q \sim 1$ ), преобладают кренированные формы эритроцитов. Если же коэффициент распределения

the sequence mentioned. More hydrophilic glycerol and 1,2-propanediol do not interact with membrane lipids. PEG-400 and PEG-1500 are more hydrophobic and either capable to be adsorbed from the membrane surface or to intercalate in lipid bilayers. This results in the change of the ratio of lipid bilayers areas, causes polymorphous transformations in a lipid phase, related to a disorder of bilayer lamellar structure, as well as dehydration of phospholipid heads and enhances the bilayers separation [6, 7, 10, 11]. Besides, high-molecular  $n$ -alcohols may act as detergents, extracting the part of lipids from outer bilayer, and by this decreasing its area [2].

The localization of a substance in extracellular space contributes to the intensification of the effect of osmotic forces on a cell. Considerable dehydration of a cell results into the change of osmotic pressure of spectrin gel, and PEG molecules, intercalated into a membrane, change a surfacial tension of membrane proteins. Dehydration and change of ionic force, accompanying the addition of high-molecular  $n$ -alcohols to cells, result in structural changes of cytoskeleton proteins [13–15], in particular, contractile protein, a supermolecular complex of which predominantly comprises membrane actin and myosin. The activity of given protein mainly determines the shape of erythrocyte [10]. According to the estimations of Merymen [12] during dehydration an erythrocyte can diminish only by  $1/3$ , after that the cell shrinkage stops and non-compensated osmotic gradient results in the disorder of selective membrane permeability and formation of hydrophilic pores, the size of which permits penetration of non-penetrating substances into a cell. The possibility of PEG-400 and low molecular fractions of PEG-1500 diffusion into human erythrocytes by fluctuating pores is presented in [1]. Thus comprehensive analysis of obtained experimental data allows to approve that within the studied series of non-electrolytes there is a correlation between the coefficient of their distribution  $Q$  in the "cell-medium" system and a shape of erythrocytes. In non-electrolyte solutions, characterizing by a high  $Q$  value ( $Q \sim 1$ ), crenated shapes of erythrocytes prevail. If the coefficient of distribution is  $Q \sim 0.5$  then the transformation is accompanied by the formation of invaginated shapes. The results obtained are in quite agreement with present theoretical notions on the mechanisms of erythrocytes transformation in various media.

## REFERENCES

1. Gordienko O.I., Nekoz I.A., Shejkin V.I. Aqueous diffusive exchange and electric characteristics of erythrocytes in the media with cryoprotectants // Physical and Chemical Properties and Effect of Cryoprotectants.— Kharkov, 1990.— P. 36–41.
2. Markin V.S. Organization of membranes in the layer plane and shape of a cell. Biological consequences of the theory // Biophysics.— 1981.— 26, issue 1.— P. 158–167.
3. Pichugin Yu.I., Novikov A.N., Olejnik S.T. Lyotropic series of cryoprotectants // Cryobiology and Cryomedicine.— 1984.— № 7.— P. 12–13.



$Q \sim 0,5$ , то трансформация сопровождается образованием инвагинированных форм. Полученные результаты вполне соответствуют современным теоретическим представлениям о механизмах трансформации эритроцитов в различных средах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гордиенко О.И., Некоз И.А., Шейкин В.И. Водный диффузионный обмен и электрические характеристики эритроцитов в средах с криопротекторами // Физ.-хим. свойства и действие криопротекторов. — Харьков, 1990. — С. 36–41.
2. Маркин В.С. Организация мембран в плоскости слоя и форма клетки. Биологические следствия теории // Биофизика. — 1981. — 26, Вып. 1. — С. 158–167.
3. Пичугин Ю.И., Новиков А.Н., Олейник С.Т. Лиотропный ряд криопротекторов // Криобиология и криомедицина. — 1984. — № 7. — С. 12–13.
4. Попл Дж., Шнейдер В., Вернштейн Г. Спектры ядерного магнитного резонанса высокого разрешения. — М.: Изд. иностр. лит., 1962. — С. 70–131.
5. А.с. № 1642342 СССР МКИ G01 № 24/08. Способ оценки проникновения веществ в клеточные суспензии / В. Д. Зинченко, М. И. Щетинский, В. И. Мусатов, В. А. Моисеев. Опубл. 15.04.91. Бюл. № 14.
6. Arnold K., Lvov Y.M., Szogyi M., Gyorgyi S. Effect of poly(ethylene oxide)-containing surfactants on membrane-membrane interaction // Stud. biophys. — 1986. — 113, № 1–2. — P. 7–14.
7. Brasseur R., Chatelin P., Goormaghtin E., Ruyscheq J.M. A semiempirical conformational analysis of the interaction of n-alkanols with dipalmylphosphatidylcholine // BBA. — 1985. — 814. — P. 227–236.
8. Harris R.A., Hitzemann R.J. Membrane fluidity and alcohol actions // Cur. Alcohol. — 1981. — 8. — P. 379–404.
9. Herbet L., Napolitano C.A., Messineo F.C., Katz A.M. Interaction of amphiphilic molecules with biological membranes. A model for nonspecific and specific drug effects with membranes // Adv. Myocardiol. — 1985. — 5. — P. 333–346.
10. McDonald R.I. Membrane fusion due to dehydration by polyethylene glycol, dextran, or sucrose // Biochemistry. — 1985. — 24, № 15. — P. 4058–4066.
11. Mirceva L., Kodicek M., Pilcova H. Contractile protein-intermediary of  $Ca^{2+}$  and ATP effect on erythrocyte membrane properties // Stud. Biophys. — 1989. — 134, № 1–2. — P. 39–42.
12. Meryman H.T. Freezing injury and its prevention in living cells // Ann. Rev. Biophys. and Bioeng. — 1974. — 3. — P. 341–363.
13. Quinn P.J. Membrane lipid phase behavior and lipid - protein interactions // Subcell. Biochem. — 1989. — 14. — P. 25–95.
14. Stokke B.J., Mikkelsen A., Elgsaeter A. The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic gel. 2. Numerical analyses of cell shapes and shape transformations // Eur. Biophys. J. — 1985. — 13, № 4. — P. 219–233.
15. Toon M.R., Solomon A.K. Interrelation of ethylene glycol, urea and water transport in the red cell // BBA. — 1987. — 898 (M147), № 3. — P. 275–282.
4. Popl J., Sneider V., Vernstein G. Spectra of nuclear magnetic resonance of a high resolution. M: Foreign Literature Publ. House, 1962. — P. 70–131.
5. Author certificate 1642342 of the USSR. Published on 15.04.91 Bul. № 14. V.D. Zinchenko, M.I. Schetinsky, V.I. Musatov, V.A. Moiseyev.
6. Arnold K., Lvov Y.M., Szogyi M., Gyorgyi S. Effect of poly(ethylene oxide)-containing surfactants on membrane-membrane interaction // Stud. biophys. — 1986. — 113, № 1–2. — P. 7–14.
7. Brasseur R., Chatelin P., Goormaghtin E., Ruyscheq J.M. A semiempirical conformational analysis of the interaction of n-alkanols with dipalmylphosphatidylcholine // BBA. — 1985. — 814. — P. 227–236.
8. Harris R.A., Hitzemann R.J. Membrane fluidity and alcohol actions // Cur. Alcohol. — 1981. — 8. — P. 379–404.
9. Herbet L., Napolitano C.A., Messineo F.C., Katz A.M. Interaction of amphiphilic molecules with biological membranes. A model for nonspecific and specific drug effects with membranes // Adv. Myocardiol. — 1985. — 5. — P. 333–346.
10. McDonald R.I. Membrane fusion due to dehydration by polyethylene glycol, dextran, or sucrose // Biochemistry. — 1985. — 24, № 15. — P. 4058–4066.
11. Mirceva L., Kodicek M., Pilcova H. Contractile protein-intermediary of  $Ca^{2+}$  and ATP effect on erythrocyte membrane properties // Stud. Biophys. — 1989. — 134, № 1–2. — P. 39–42.
12. Meryman H.T. Freezing injury and its prevention in living cells // Ann. Rev. Biophys. and Bioeng. — 1974. — 3. — P. 341–363.
13. Quinn P.J. Membrane lipid phase behavior and lipid - protein interactions // Subcell. Biochem. — 1989. — 14. — P. 25–95.
14. Stokke B.J., Mikkelsen A., Elgsaeter A. The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic gel. 2. Numerical analyses of cell shapes and shape transformations // Eur. Biophys. J. — 1985. — 13, № 4. — P. 219–233.
15. Toon M.R., Solomon A.K. Interrelation of ethylene glycol, urea and water transport in the red cell // BBA. — 1987. — 898 (M147), № 3. — P. 275–282.

Accepted on 15.10.98

Поступила 15.10.98



## Действие двухвалентных катионов и гемина на чувствительность эритроцитов к гиперосмотическому стрессу

Н. В. ОРЛОВА

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## The Effect of Divalent Cations and Hemin on Erythrocyte Sensitivity to Hypertonic Stress

N. V. ORLOVA

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

Показано, что обработка клеток гемом снижает гиперосмотический лизис примерно на 40% и не влияет на гемолиз клеток, предварительно дегидратированных в 0,7 М NaCl и перенесенных в 4,0 М NaCl при 0 °С. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  защищают клетки от гиперосмотического повреждения. При модификации клеток гемом протектирующее действие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в отличие от  $\text{Zn}^{2+}$  не проявляется. Установлено, что двухвалентные катионы ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) проявляют антигемолитическую активность при гиперосмотическом стрессе контрольных и модифицированных гемом эритроцитов, если переносу в 4,0 М предшествовала инкубация клеток в 0,7 М NaCl.

Показано, що обробка клітин гемом знижує гіперосмотичний лізис приблизно на 40% і не впливає на гемолиз еритроцитів, попередньо дегідратованих в 0,7 М NaCl і перенесених до 4,0 М NaCl при 0 °С. Іони  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  захищають клітини від гіперосмотичного пошкодження. При модифікації клітин гемом протектуюча дія іонів  $\text{Ca}^{2+}$  на відміну від іонів  $\text{Zn}^{2+}$  не виявляється. Встановлено, що двовалентні катіони ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) проявляють антигемолітичну активність в умовах гіперосмотичного стресу контрольних і модифікованих гемом еритроцитів, якщо перед перенесенням у 4,0 М NaCl клітини інкубували у 0,7 М NaCl.

It has been shown that cell treatment by hemin results in a decrease of hyperosmotic lysis approximately by 40% and does not affect hemolysis of cells, preliminarily dehydrated in 0.7 M NaCl and transferred into 4.0 M NaCl at 0 °C.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions protect cells against hyperosmotic damage. At cell modification by hemin the protecting effect of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in contrast to  $\text{Zn}^{2+}$  ones does not manifest. It has been established that divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) demonstrate antihemolytical activity at hyperosmotic stress of both control and modified by hemin erythrocytes, if cell incubation in 0.7 M NaCl preceded cell transfer into 4.0 M NaCl.

Основными повреждающими факторами при замораживании биологического материала являются изменения температурных и осмотических условий среды [1]. Для моделирования замораживания используется перенос клеток в высококонцентрированные растворы солей при положительных температурах (гиперосмотический стресс) [2]. Известны факторы, повышающие устойчивость клеток к гиперосмотическому стрессу: предварительная дегидратация клеток, насыщение клеток глюкозой, использование некоторых амфифильных соединений [3–5, 7]. Двухвалентные катионы также снижают уровень повреждения эритроцитов при гиперосмотическом шоке [6]. Они обладают достаточно выраженным антигемолитическим эффектом при действии на клетки различных факторов (способность двухвалентных катионов, в частности  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ , повышать устойчивость эритроцитов к гипотоническому, постгипертоническому лизису, а также к действию порообразующих агентов и др.) [9–11, 14].

Полагают, что фактором, определяющим поведение клеток при резком изменении осмотических условий среды, является состояние цитоскелет-

The changes of temperature and osmotic medium conditions [1] are the main damaging factors when freezing biological material. The cell transfer into highly concentrated salines at positive temperatures (hyperosmotic stress) [2] is used for a freezing modelling. Different factors, increasing cell stability to hyperosmotic stress, are known, such as preliminary cell dehydration, cell saturation by glucose, usage of some amphiphilic compounds [3–5, 7]. Divalent cations also decrease the level of erythrocyte damage at hyperosmotic shock [6]. They possess sufficiently manifested antihemolytical effect when different factors affect cells (possibility of divalent cations, in particular,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ) to increase erythrocyte stability to hypotonic, posthypertonic lysis, as well as to the effect of pore forming agents [9–11, 14].

It is supposed that the main factor, detecting cell behaviour at a sharp change of osmotic medium conditions, is the state of cytoskeleton in a membrane complex [8]. It has been shown that cell treatment by hemin, modifying the state of given complex [15, 17], also may decrease erythrocyte hyperosmotic lysis [4].

The aim of the given work is to study the effect of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) and hemin — modifica-



мембранного комплекса [8]. Показано, что обработка клеток геминном, который модифицирует состояние данного комплекса [15, 17], также может снижать гиперосмотический лизис эритроцитов [4].

Цель данной работы — изучение влияния двухвалентных катионов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) и модификатора цитоскелет-мембранного комплекса гемина на чувствительность эритроцитов к действию гиперосмотического шока (4,0 М NaCl).

Эритроциты получали из донорской крови II группы. После удаления плазмы их дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 М NaCl, 10 мМ трис, pH 7,4) и хранили в виде плотного осадка не более 2 ч при 0 °C. Для изучения влияния гиперосмотического стресса эритроциты предварительно помещали в среды, содержащие 0,15, 0,7 М NaCl при температуре 0 °C 2 мин, а затем переносили в гипертонический раствор NaCl (4,0 М) с различными концентрациями ионов  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Zn}^{2+}$  (конечный гематокрит 0,4%) при той же температуре. После этого целые клетки осаждали центрифугированием и спектрофотометрически на длине волны 543 нм определяли количество гемоглобина в супернатанте. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу в присутствии тритона X-100 (0,1%).

Клетки (20%-й гематокрит) обрабатывали геминном (300 мкМ) в среде, содержащей (мМ): KCl — 90, NaCl — 44, сахарозы — 44, фосфатного буфера — 10, pH 7,4, при 37 °C в течение 10 мин. После инкубации клетки трижды отмывали средой инкубации, затем холодным физиологическим раствором [16]. Модифицированные клетки хранили при 0 °C не более 30 мин. В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации "хч" и "чда".

Эритроциты характеризуются высокой чувствительностью к изменению осмотических условий среды. Уровень гемолиза при переносе клеток в 4,0 М NaCl достигает 80–90% [6]. Чувствительность клеток к действию гиперосмотического шока можно модифицировать. В частности, предварительная дегидратация эритроцитов повышает устойчивость клеток к последующему переносу в 4,0 М NaCl [7]. Показано, что максимальную устойчивость к действию гиперосмотического стресса проявляют клетки, которые предварительно находились в 0,45 М NaCl [7]. Повышение концентрации соли в среде предварительной инкубации до 0,7 М NaCl сопровождается резким возрастанием чувствительности клеток к повреждающему действию 4,0 М NaCl. Поэтому средой предварительной инкубации были выбраны 0,15 М NaCl как контроль и 0,7 М NaCl как зона неустойчивости клеток к последующему переносу в 4,0 М NaCl.

Из рис. 1, 2 видно, что гемолиз клеток, перенесенных из физиологической по тоничности среды в 4,0 М NaCl при 0 °C, составляет 80%. Обработка

tor of a cytoskeleton and membrane complex on the erythrocyte sensitivity to the effect of hyperosmotic shock (4.0 М NaCl).

Erythrocytes were obtained from the donors' blood of the II group. After the plasma removal they twice were washed-out by the physiological solution (0.15 М NaCl, 10 mM tris, pH 7.4) and stored as a dense sediment not more than 2 hrs at 0 °C. To study the effect of hyperosmotic stress, erythrocytes were preliminarily transferred into media, containing 0.15, 0.7 М NaCl at the temperature of 0 °C during 2 min, and then were removed into 4.0 М NaCl hypertonic solution with different concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions (0.4% of final hematocrit) at equal temperature. After this the whole cells were subjected to centrifugation and haemoglobin content in supernatant was determined by means of spectrophotometry with the wave length of 543 nm. The haemoglobin release from cells was calculated in percentage by the ratio to 10% hemolysis at the triton X-100 presence (0.1%).

Cells (20% hematocrit) were treated by hemin (300 ) in the medium, containing mMol: KCl — 90, NaCl — 44, sucrose and phosphate buffer — 10 with pH 7.4, at 37 °C during 10 min. After the incubation, cells were three times washed out by means of incubation medium, then were treated by cold physiological solution [16]. Modified cells were stored at 0 °C not more than 30 min. The reagents of the Ukrainian production of "chemically pure" and "pure for analysis" qualification were used in the work.

Erythrocytes are characterized by a high sensitivity to the change of medium osmotic conditions. Hemolytical effect at cell transfer into 4.0 М NaCl was 80–90% [6]. Cell sensitivity to the effect of hyperosmotic shock may be modified. In particular, the preliminary erythrocyte dehydration increases cell stability to its further transfer into 4.0 М NaCl [7]. It has been shown that maximum stability to the effect of hyperosmotic stress demonstrate the cells, preliminarily treated by 0.45 М NaCl [7]. An increase of saline concentration in the medium of preincubation up to 0.7 М NaCl is accompanied by a sharp increase of cell sensitivity to the damaging effect of 4.0 М NaCl. So, we chose 0.15 М NaCl as a control and 0.7 М NaCl as a zone of cellular instability to its further transfer into 4.0 М NaCl were determined as media of preincubation.

As it is seen from Figs. 1, 2, the hemolysis of cells, transferred from the physiological on tonicity medium into 4.0 М NaCl at 0 °C, is 80%. Cell treatment by hemin decreases a hypertonic lysis approximately by 30%. Similar results were obtained when studying a hyperosmotic stress at the temperature of 37 °C [4]. Hemin is a product of a haemoglobin denaturation. In the erythrocyte membrane the concentration of free hemin in the norm is not high, but it increases with the cell growth and at pathologies [15–17]. Depending on the concentration, hemin with decreasing affinity



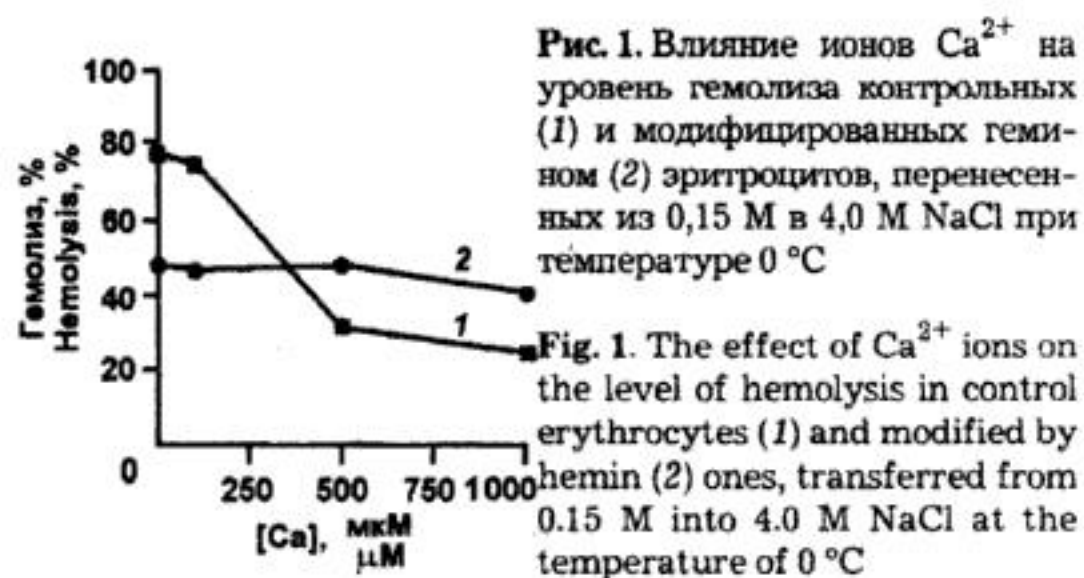


Рис. 1. Влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на уровень гемолиза контрольных (1) и модифицированных гемом (2) эритроцитов, перенесенных из 0,15 М в 4,0 М NaCl при температуре 0 °C

клеток гемом снижает гипертонический лизис примерно на 30%. Аналогичные результаты получены при исследовании гиперосмотического стресса при температуре 37 °C [4]. Гемин — продукт денатурации гемоглобина. В эритроцитарной мембране концентрация свободного гема в норме небольшая, но увеличивается с возрастом клетки и при патологиях [15–17]. В зависимости от концентрации гема с убывающим сродством взаимодействует с белком полосы 4.1, спектрином и актином [15]. В нашей работе использовался гемин в концентрации 300 мкМ, так как при такой обработке клеток белок полосы 4.1 модифицируется, что способствует частичному откреплению цитоскелета от мембраны, при этом цитоскелет сохраняет свою целостность [15].

Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  оказывают протектирующее действие на клетки в условиях гиперосмотического стресса концентрационно зависимым образом. Увеличение концентрации кальция от 500 до 1 000 мкМ сопровождается снижением чувствительности клеток к гиперосмотическому стрессу. При оптимальной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  гиперосмотический лизис снижается на 50% (рис. 1). Иная картина наблюдается при использовании эритроцитов, обработанных гемом. Как видно из рис. 1, присутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в лизирующей среде фактически не оказывает влияния на модифицированные гемом клетки. Ионы  $\text{Zn}^{2+}$  (рис. 2) протектируют клетки, перенесенные из изотонической среды в 4,0 М NaCl при 0 °C [6]. Следует отметить, что защитное действие ионов  $\text{Zn}^{2+}$  начинает проявляться при использовании их в концентрации 1 мкМ. Для получения максимального протектирующего эффекта при действии гиперосмотического стресса на клетки необходима концентрация ионов  $\text{Zn}^{2+}$  на два порядка меньше по сравнению с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . В отличие от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  присутствие  $\text{Zn}^{2+}$  в лизирующей среде снижает гемолиз модифицированных гемом эритроцитов до 10–15%, что свидетельствует о различных механизмах действия данных катионов. Во всяком случае мало вероятно, что действие ионов кальция реализуется по электростатическому механизму [6].

На рис. 3, 4 представлены зависимости уровня гемолиза контрольных и модифицированных гемом клеток при переносе из 0,7 в 4,0 М NaCl от концентрации двухвалентных катионов в лизирующей среде.  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  оказывают протектирующее

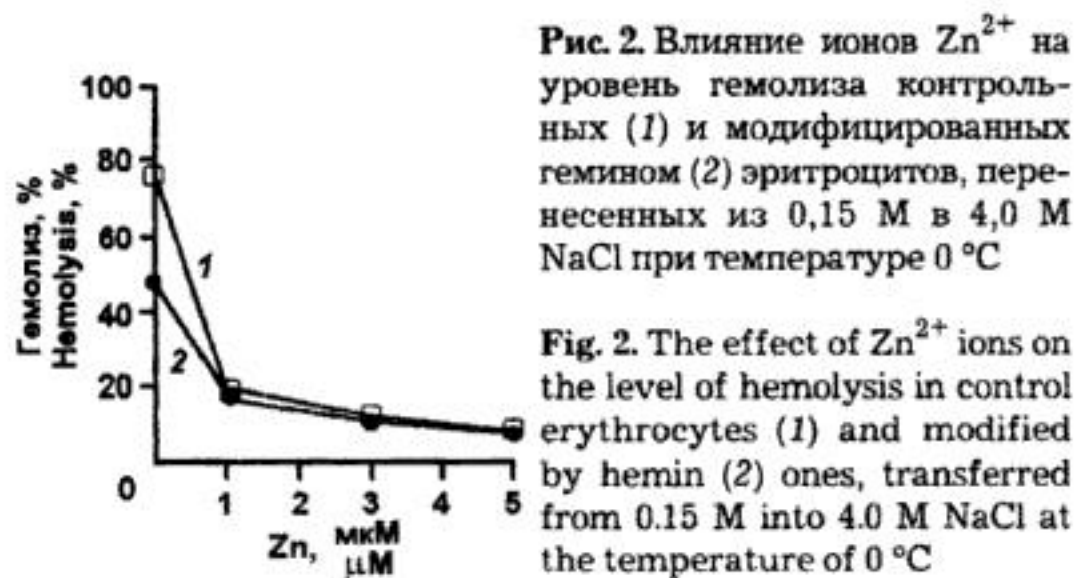


Рис. 2. Влияние ионов  $\text{Zn}^{2+}$  на уровень гемолиза контрольных (1) и модифицированных гемом (2) эритроцитов, перенесенных из 0,15 М в 4,0 М NaCl при температуре 0 °C

Fig. 2. The effect of  $\text{Zn}^{2+}$  ions on the level of hemolysis in control erythrocytes (1) and modified by hemin (2) ones, transferred from 0.15 M into 4.0 M NaCl at the temperature of 0 °C

interacts with the protein of 4.1 band, with spectrin and actin [15]. Hemin in concentration of 300 μM has been used in our work, because during such cell treatment the protein of band 4.1 is modified, that results in partially cytoskeleton separation from membrane, thereat cytoskeleton preserves its integrity [15].

$\text{Ca}^{2+}$  ions demonstrate the protecting effect on cells under the conditions of hyperosmotic stress, depending on the concentration. The increase of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration from 500 up to 1 000 μM is accompanied by a cell sensitivity to a hyperosmotic stress. When  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is optimal, a hyperosmotic lysis is decreased by 50% (Fig. 1). Another picture is observed when using erythrocytes, treated by hemin.

As it is seen from Fig. 1, the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in lysing medium does not properly affect cells, modified by hemin.  $\text{Zn}^{2+}$  ions (Fig. 2) protect cells, transferred from isotonic medium into 4.0 M NaCl at the temperature of 0 °C [6]. It should be noted, that the protecting effect of  $\text{Zn}^{2+}$  ions begins to manifest when being used in concentration of 1 μM. To obtain maximum protecting effect when hyperosmotic stress affects cells, the necessary concentration of  $\text{Zn}^{2+}$  ions is twice lower in comparison with  $\text{Ca}^{2+}$  ions. In contrast to  $\text{Ca}^{2+}$  ions, the presence of  $\text{Zn}^{2+}$  in lysing medium decreases the hemolysis of erythrocytes, modified by hemin down to 10–15%, that testifies to different mechanisms of the effect of given cations. Unlikely, that the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  ions is realized by means of electrostatic mechanism [6].

The dependences of hemolytical effect both of control cells and modified by hemin ones during their transferring from 0.7 into 4.0 M NaCl on the concentration of divalent cations in lysing medium are shown in Fig. 3, 4.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  shows the protecting effect on the cells, transferred from 0.7 into 4.0 M NaCl. But the level of hyperosmotic hemolysis of preliminarily dehydrated erythrocytes when use an optimal  $\text{Ca}^{2+}$  ions concentration (in contrast to  $\text{Zn}^{2+}$  ions), is lower, than lysis in control cells.

As it is seen from Fig. 3, 4, divalent cations also demonstrate an antihemolytical activity in cells, modified by hemin, but the curve profiles are quite equal. The modification of a cytoskeleton and membrane complex at the presence of hemin may accompanied by a cytoskeleton separation from membrane, that results in a decrease of stabilizing effect of peripheric proteins on the membrane defect, appeared during the



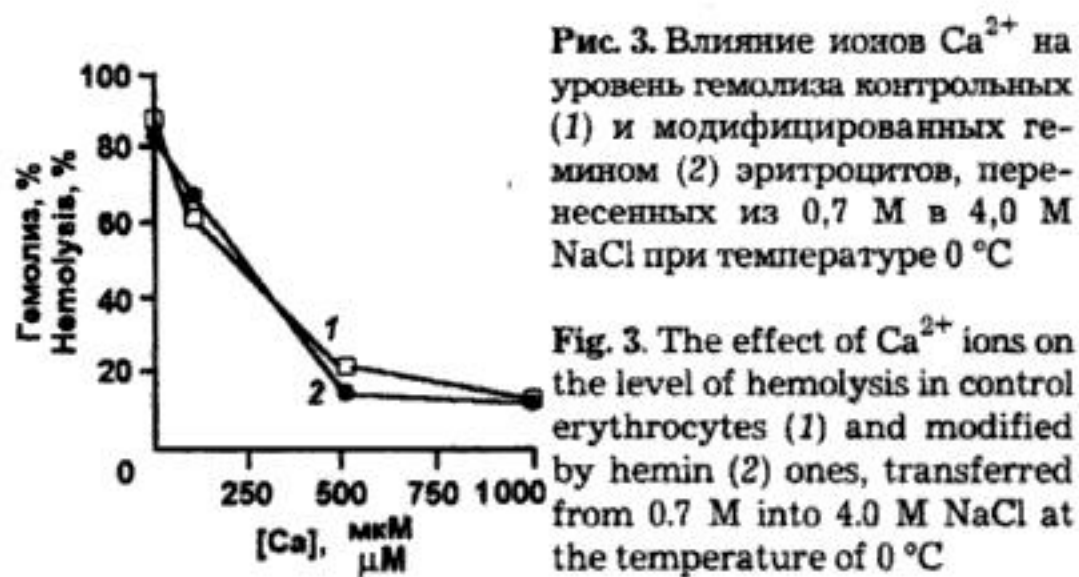


Рис. 3. Влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на уровень гемолиза контрольных (1) и модифицированных гемом (2) эритроцитов, перенесенных из 0,7 М в 4,0 М NaCl при температуре 0 °C

Fig. 3. The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  ions on the level of hemolysis in control erythrocytes (1) and modified by hemin (2) ones, transferred from 0.7 M into 4.0 M NaCl at the temperature of 0 °C

действие на клетки, перенесенные из 0,7 в 4,0 М NaCl. Однако следует отметить, что уровень гиперосмотического гемолиза предварительно дегидратированных эритроцитов при использовании оптимальной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (в отличие от ионов  $\text{Zn}^{2+}$ ) ниже, чем уровень лизиса контрольных клеток.

Как видно из рис. 3, 4, двухвалентные катионы проявляют антигемолитическую активность и в клетках, модифицированных гемом, причем профили кривых практически идентичны. Модификация цитоскелет-мембранного комплекса в присутствии гемина может сопровождаться откреплении цитоскелета от мембраны, в результате чего будет уменьшаться стабилизирующее влияние периферических белков на образовавшийся при осмотическом стрессе мембранный дефект и время его жизни будет сокращаться. Этим объясняется наблюдаемое снижение уровня гемолиза клеток, перенесенных из физиологического раствора в 4,0 М NaCl (рис. 1, 2). Предварительная дегидратация эритроцитов может приводить к пространственному сближению цитоскелетных белков и мембраны, взаимодействие которых в результате обработки гемом было нарушено, при этом стабилизирующее влияние периферических белков на мембранный дефект будет восстанавливаться. Возможно, поэтому предварительное экспонирование клеток в 0,7 М NaCl не позволяет проявиться эффекту гемина, наблюдаемому для контрольных клеток (рис. 3, 4).

Однако в условиях, когда клетки, обработанные гемом, инкубируются в 0,7 М NaCl, а затем переносятся в 4,0 М NaCl, ионы  $\text{Ca}^{2+}$  оказывают свое защитное действие и снижают уровень лизиса эритроцитов. Таким образом, когда гемин защищает клетки от гиперосмотического лизиса, протектирующее действие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  не проявляется (рис. 1) и наоборот, когда гемин не изменяет чувствительность клеток к переносу в 4,0 М NaCl, то  $\text{Ca}^{2+}$  существенно ингибирует гемолиз (рис. 3). В последнем случае условием, определяющим характер действия гемина и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на клетки при гиперосмотическом стрессе, является предварительная инкубация эритроцитов в 0,7 М NaCl. Возможно, предварительная дегидратация клеток повышает внутриклеточную концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в результате осмотического сжатия клеток и увеличения проницаемости мембраны для данных

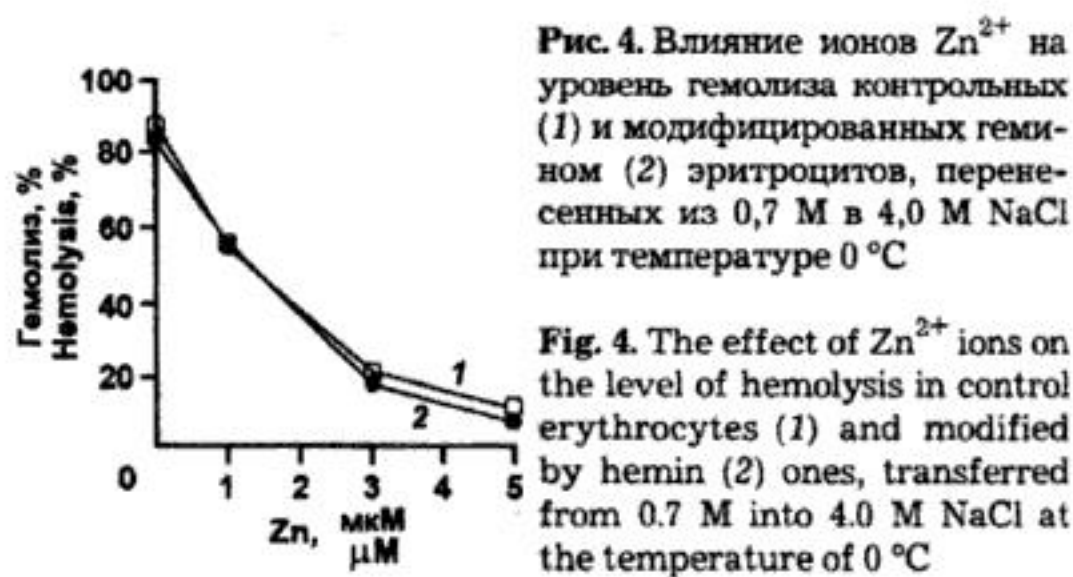


Рис. 4. Влияние ионов  $\text{Zn}^{2+}$  на уровень гемолиза контрольных (1) и модифицированных гемом (2) эритроцитов, перенесенных из 0,7 М в 4,0 М NaCl при температуре 0 °C

Fig. 4. The effect of  $\text{Zn}^{2+}$  ions on the level of hemolysis in control erythrocytes (1) and modified by hemin (2) ones, transferred from 0.7 M into 4.0 M NaCl at the temperature of 0 °C

осмотический стресс и его время жизни будут уменьшены. Таким образом, наблюдаемое снижение уровня гемолиза клеток, перенесенных из физиологического раствора в 4,0 М NaCl (рис. 1, 2), объясняется. Предварительная дегидратация эритроцитов может привести к пространственной аффинности цитоскелетных белков с мембраной, тогда взаимодействие в результате обработки гемом было нарушено, тогда стабилизирующее влияние периферических белков на мембранный дефект будет восстановлено. Возможно, что предварительная обработка клеток в 0,7 М NaCl не позволяет проявиться эффекту гемина, наблюдаемому для контрольных клеток (рис. 3, 4).

Но в условиях, когда клетки, обработанные гемом, инкубируются в 0,7 М NaCl, а затем переносятся в 4,0 М NaCl, ионы  $\text{Ca}^{2+}$  демонстрируют свой защитный эффект и снижают уровень эритроцитарного лизиса. Таким образом, когда гемин защищает клетки от гиперосмотического лизиса, защитный эффект ионов  $\text{Ca}^{2+}$  не проявляется (рис. 1), и наоборот, когда гемин не изменяет чувствительность клеток к переносу в 4,0 М NaCl, то  $\text{Ca}^{2+}$  существенно ингибирует гемолиз (рис. 3). В последнем случае условием, определяющим характер действия гемина и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на клетки при гиперосмотическом стрессе, является предварительная инкубация эритроцитов в 0,7 М NaCl. Возможно, предварительная дегидратация клеток повышает внутриклеточную концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в результате осмотического сжатия клеток и увеличения проницаемости мембраны для данных

## REFERENCES

1. Belous A.M., Bondarenko V.A. Structural changes of biological membranes at cooling. — Kiev: Naukova Dumka, 1982. — 255 p.
2. Belous A.M., Bondarenko V.A., Babiychuk L.A. et al. Common mechanism of the cell damage at a temperature shock, freezing and posthypertonic lysis // Kriobiologia. — 1985. — № 2. — P. 25–32.
3. Buzhurina I.M., Panov M.A. The mechanisms of cell response to the outer effects // Results of science and techniques. General problems of physical and chemical biology. — M., 1986. — 214 p.
4. Dunayevskaya O.N., Shpakova N.M. Protective effect of trifluoroperazine at the erythrocyte hyperosmotic shock // Ukr. Biochem. Journ. — 1997. — 69, № 2. — P. 30–34.
5. Levitsky D.O.  $\text{Ca}^{2+}$  and biological membranes. — M.: Vysshaya shkola, 1990. — 123 p.



ионов [13]. Показано, что возросшие внутриклеточные концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  могут приводить к активированию транскляминазы и появлению ковалентных сшивок в структуре цитоскелета, стабилизируя мембрану в условиях действия гиперосмотического стресса [12].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка, 1982.— 255 с.
2. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бабийчук Л.А. и др. Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология.— 1985.— № 2.— С. 25–32.
3. Бужурина И.М., Панов М.А. Механизмы клеточного ответа на внешние воздействия // Итоги науки и техники. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии.— М.: ВИНТИ, 1986.— 214 с.
4. Дунаевская О.Н., Шпакова Н.М. Защитный эффект трифторперазина при гиперосмотическом шоке эритроцитов // Укр. биохим. журн.— 1997.— 69, № 2.— С. 30–34.
5. Левицкий Д.О. Кальций и биологические мембраны.— М.: Высш. шк., 1990.— 123 с.
6. Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Действие двухвалентных катионов на чувствительность эритроцитов к гиперосмотическому стрессу и холодовому шоку // Пробл. криобиологии.— 1998.— № 1.— С.30–35.
7. Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1989.— 16 с.
8. Рамазанов В.В. Влияние осмотического стресса и модификаторов цитоскелета на развитие холодового и гиперосмотического шока эритроцитов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1994.— 16 с.
9. Руденко С.В., Пателарос С.В. Активирующее и ингибирующее влияние двухвалентных катионов на постгипертонический лизис эритроцитов // Биол. мембраны.— 1995.— 12, № 4.— С. 381–383.
10. Bashford C.L., Alder G.M., Grahman J.M., et al. Ion modulation of membrane permeability: effect of cation on intact cell and on phospholipid bilayer treated with pore-forming agents // J. Membr. Biol.— 1988.— 103, № 1.— P. 79–94.
11. Bodemann H., Passow H. Factors controlling the resealing of the human erythrocyte ghosts after hypotonic lysis // J. Membrane Biol.— 1978.— 8, № 1.— P. 1–26.
12. Lorand L., Weissmann L.B., Edel D.L., Bruner-Lorand J. Role of the intrinsic transglutaminase in the  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated cross-linking of erythrocyte proteins // Proc. Nat. Acad. Sci.— 1976.— 73, № 13.— P. 4479–4481.
13. Plishker G.A., Gitelman H.J. Calcium transport in human red blood cells under hypertonic conditions // Amer. J. Physiol.— 1979.— 237, № 1.— P. 96–101.
14. Rudenko S.V., Nipot E.E. Protection by chlorpromazine, albumin and bivalent cations against haemolysis induced by melittin, [Ala-14] melittin and whole bee venom // Biochem. J.— 1996.— 317.— P. 747–754.
15. Shaklai N., Avissar N., Rabizadeh E., Shaklai M. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // Biochem. Intern.— 1986.— 13, № 3.— P. 467–477.
16. Solar I., Muller-Eberhard U., Shviro Y., Shaklai N. Long-term intercalation of residual hemin in erythrocyte membranes distorts the cell // Biochim. Biophys. Acta.— 1991.— 1062, № 1.— P. 51–58.
17. Solar I., Shaklai N. Association of hemin with protein 4.1 as compared to spectrin and actin // Biochim. Biophys. Acta.— 1989.— 983, № 2.— P. 199–204.
6. Orlova N.V., Shpakova N.M. The effect of divalent cations on erythrocyte sensitivity to hyperosmotic stress and cold shock // Problemy kriobiologii.— 1998.— № 1.— P. 30–35.
7. Pozdnyakov V.V. The effect of medium content and osmolarity on erythrocyte stability to osmotic and temperature shock: Authors' abstract of PhD (biology) thesis.— Kharkov, 1989.— 16 p.
8. Ramazanov V.V. The effect of osmotic stress and cytoskeleton modifier on the development of erythrocyte cold and hypertonic shock: Authors' abstract of PhD (biology) thesis.— Kharkov, 1994.— 16 p.
9. Rudenko S.V., Patelaros S.V. An activating and inhibiting effect of divalent cations on the erythrocyte posthypertonic lysis // Biol. membranes.— 1995.— 12, № 4.— P. 381–383.

Accepted in 09.06.98

Поступила 09.06.98



## Амиды алифатических кислот — эффективные криопротекторы.

### II. Криозащитные свойства соединений ряда амидов

Т. П. ЛИННИК

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Amides of Aliphatic Acids are Efficient Cryoprotectants.

### II. Cryoprotective Properties of Amide Series Compounds

T. P. LINNIK

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

Представлен обзор литературных данных и собственных исследований криопротекторной активности одного из классов химических соединений, а именно амидов низкомолекулярных алифатических кислот в отношении ряда биологических объектов. Отмечена перспективность применения амидов как криопротекторов, особенно при криоконсервировании спермы птиц. Предложено использовать амиды в комбинации с другими классами соединений, преимущественно с низко- и высокомолекулярными полиолами, что позволит снизить или нейтрализовать токсическое действие криопротекторов на биологические объекты и одновременно повысить их криозащитную эффективность.

Подано огляд літературних даних і власних досліджень криопротекторної активності одного з класів хімічних сполук, а саме амідів низкомолекулярних кислот у відношенні ряду біологічних об'єктів. Зазначена перспективність застосування амідів як криопротекторів, особливо при криоконсервуванні сперми птахів. Запропоновано використовувати амідів в комбінації з іншими класами сполук, переважно з низко- і високомолекулярними поліолами, що дозволить зменшити або нейтралізувати токсичну дію криопротекторів на біологічні об'єкти та одночасно підвищити їх криозахисну ефективність.

The literature data review and own investigations of cryoprotective activity of one of the chemical compounds classes, namely the amides of low-molecular aliphatic acids in respect to the series of biological objects was presented. The perspective of amide application as cryoprotectants, especially when cryopreserving the poultry sperm was noted. One proposed to use amides in combination with other classes of compounds, mainly with low- and high-molecular polyols, that would allow to decrease or neutralize a toxical effect of cryoprotectants on biological objects and simultaneously to increase their cryoprotective efficiency.

Амиды низкомолекулярных алифатических кислот являются одним из немногих классов химических соединений, широко используемых как защитные агенты при низкотемпературном консервировании различных биологических объектов [1, 2, 6, 7, 34]. Особенности структуры и физико-химических свойств амидов дают основание считать их перспективными криопротекторами при низкотемпературном консервировании. К тому же амиды представляют собой гомологический ряд, что позволяет более корректно рассматривать изменение их криопротекторной активности в зависимости от химической природы.

Первые сообщения об изучении криозащитной активности веществ ряда амидов появились в 50-е годы [23, 25]. Была исследована криопротекторная активность формамида, ацетамида, N-метилформамида, N-метилацетамида, N,N-диметилформамида, N,N-диметилацетамида, N,N-диизопропилацетамида, а также алкильных производных мочевины при замораживании эритроцитов человека. Защитное действие исследуемых соединений сравнивалось по минимальной концентрации вещества, которая обеспечивала бы 50% защиты клеток при температуре максимального повреждения. Такая концентрация составляла: для глицерина — 1,5, N,N-диметилаце-

Amides of low-molecular aliphatic acids are the one of the few classes of chemical compounds widely applied as protective agents at low temperature preservation of different biological objects [1, 2, 6, 7, 34]. Peculiarities of the amide structure and physical and chemical properties allow to consider them as perspective cryoprotectants at low temperature preservation. Besides, amides represent a homological series, that permits to consider more correctly the change of their cryoprotective activity depending on a chemical nature.

The first information about the investigation of cryoprotective activity of the amide series substances appeared in the fifties [23, 25]. A cryoprotective activity of formamide, acetamide, N-methylformamide, N-methylacetamide, N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide, N,N-diisopropylacetamide, as well as alkyl derivatives of urea when freezing human erythrocytes was studied. A protective effect of compounds investigated was compared by a minimum concentration of substance, which might provide 50% of cell preservation at the temperature of maximum damage. Such concentration made for glycerol — 1.5, N,N-dimethylacetamide (N,N-DMA) — 1.4, N-methylacetamide — 1.6, N,N-dimethylformamide (N,N-DMFA) — 1.8, N-methylformamide — 2.1 M. Thus, three compounds from amide series were not quite



тамида (N,N-ДМАЦ) — 1,4, N-метилацетида — 1,6, N,N-диметилформамида (N,N-ДМФА) — 1,8, N-метилформамида — 2,1 М. Таким образом, три соединения из ряда амидов практически не уступали глицерину по криозащитной активности в отношении эритроцитов человека.

По нашим данным [7], N,N-ДМАЦ и N,N-ДМФА обеспечивали сохранность около 90% эритроцитов после замораживания-оттаивания. Результаты были получены при концентрации амидов в эритроцитарной суспензии 20%, что соответствует для N,N-ДМАЦ — 2,3, для N,N-ДМФА — 2,7 М. Замораживали в пластиковых цилиндрических ампулах объемом 1 мл на первом этапе со скоростью охлаждения 15 °C/мин до -75 °C, на втором — 35 °C/мин до -175 °C, затем погружали в жидкий азот. При испытании криопротекторной активности амидов на эритроцитах были получены аномально низкие значения осмотической хрупкости после замораживания-оттаивания. Видимо, N,N-ДМАЦ и N,N-ДМФА вследствие их высокой способности проникать через мембрану клетки относятся к осмотически неактивным веществам, что подтверждается и для других клеток [13]. Несмотря на успешные результаты испытаний, применять амиды как основной криопротектор без отмывания в практике криоконсервирования эритроцитов не позволяет их токсичность на организменном уровне. Однако можно рекомендовать амиды как дополнительный компонент в концентрации 5–7% в сочетании с высокомолекулярными криопротекторами (ПЭО, ПВП, гидроксипропилкрахмал и др.), а также в смеси с низкомолекулярными полиолами.

В 1971 г. Djerassi J. [16] опубликовал сообщение об успешном применении N,N-диметилацетида в качестве криопротектора при замораживании тромбоцитов человека. По данным автора, тромбоциты человека, замороженные со скоростью 3 °C/мин в присутствии 5% N,N-ДМАЦ и 5% декстрозы, после оттаивания были перелиты больным с острой лейкемией без отмывания криопротектора.

Работы [1, 2, 4, 13] посвящены изучению криозащитных свойств N,N-ДМАЦ при низкотемпературном консервировании гранулоцитов и тромбоцитов человека. В ЦНИИГПК был разработан метод криоконсервирования лейкоцитов под защитой N,N-ДМАЦ [1]. Предложенный криоконсервирующий раствор (лейкокриодмац) содержит: N,N-ДМАЦ — 20 мл, глюкозы — 20 г, воды — до 100 мл. Конечная концентрация N,N-ДМАЦ в суспензии клеток 5%. Соотношение лейкоцитарной массы и криопротектора 3:1. На первом этапе скорость охлаждения 3 °C/мин до температуры кристаллизации, затем остановка на 3–4 мин на плато кристаллизации, на втором этапе скорость охлаждения 5 °C/мин до -100 °C с последующим погружением в азот. По мнению авторов [1, 4], морфофункциональную полноценность оттаянных гранулоцитов в большей степени обеспечивает

inferior to glycerol in cryoprotective activity in respect to human erythrocytes.

According to our data [7], N,N-DMA and N,N-DMFA provided the integrity of 90% of erythrocytes after freeze-thawing. The results were obtained under the amide concentration in an erythrocytic suspension of 20%, that corresponded for N,N-DMA to 2.3, for N,N-DMFA — 2.7 M. It was frozen in plastic 1 ml volume cylindrical ampoules at the first stage with cooling rate of 15 °C/min down to -75 °C, at the second one — 35 °C/min down to -175 °C, then it was immersed into a liquid nitrogen. Abnormally low values of osmotic fragility after freeze-thawing were obtained when testing the amide cryoprotective activity in erythrocytes. Probably N,N-DMA and N,N-DMFA due to their high capacity to penetrate through the cell membrane are related to osmotically non-active substances, that is confirmed [13] also for other cells. In spite of successful results of tests, amide toxicity in an organism level does not allow to apply them in the practice of erythrocyte cryopreservation as the main cryoprotectant without washing-out. But one can recommend amides as a supplementary component under concentration of 5-7% in combination with high-molecular cryoprotectants (PEO, PVP, hydroxyethylstarch etc.), as well as in the mixture with low-molecular polyols.

In 1971 Djerassi J. [16] published the information on successful application of N,N-dimethylacetamide as cryoprotectant when freezing human blood platelets. According to the author's data, human blood platelets, frozen with the rate of 3 °C/min in the presence of 5% N,N-DMA and 5% dextrose, after freeze-thawing were transfused to patients with acute leukemia without cryoprotectant washing-out.

The works [1, 2, 4, 13] are devoted to the study of cryoprotective properties of N,N-DMA at the human granulocyte and blood platelet low temperature preservation. In Central Scientific and Research Institute for Hematology and Blood Transfusion (CSRIHBT) the method of leukocyte cryopreservation under N,N-DMA protection [1] was developed. Proposed cryopreserving solution (leukocryodmac) contains: N,N-DMA — 20 ml, glucose — 20 g, water — upto 100 ml. A final concentration of N,N-DMA in cell suspension is 5%. The ratio of leukocytic mass and cryoprotectant is 3:1. At the first stage the cooling rate is 3 °C/min down to the temperature of crystallization, then the stop during 3–4 min on the plateau of crystallization, at the second stage cooling rate is 5 °C/min down to -100 °C with further immersion into a liquid nitrogen. According to the authors' opinion [1, 4] N,N-DMA provides in a greater extent a morphofunctional full value of frozen-thawed granulocytes, than glycerol and dimethylsulfoxide (DMSO). Besides, DMSO is non-persistent and after short storage or sterilization by means of autoclaving, as well as after introduction into recipient's organism forms toxic decay products with unpleasant garlic



N,N-ДМАЦ, чем глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО). К тому же ДМСО нестойкий и после непродолжительного хранения или стерилизации автоклавированием, а также после введения в организм реципиента образует токсичные продукты распада, имеющие неприятный чесночный запах. Отмечается болезненный спазм вен на месте инфузии.

Сравнительное изучение эффективности глицерина, ДМСО и N,N-ДМАЦ при замораживании чистой фракции гранулоцитов показало определенное преимущество N,N-ДМАЦ [1]. Количество восстановленных клеток в суспензиях, криоконсервированных под защитой глицерина, ДМСО и N,N-ДМАЦ, составляло 58, 74 и 84% соответственно. Фагоцитарная активность клеток, криоконсервированных под защитой ДМСО, варьировала в пределах 12–33%, под защитой N,N-ДМАЦ — 33–57%, а клеток, замороженных с глицерином, определить не удавалось из-за их слипания.

Каличава Л. Х. [4] изучал криозащитное действие нескольких сред, одним из компонентов которых являлись амиды, при замораживании лейкоцитов. Найдено, что высокими криозащитными свойствами обладают среды следующего состава: N,N-ДМАЦ — 1,5–7,5, ПЭО-400 — 5; N,N-ДМАЦ — 1,5, ПЭО-400 — 5, глицерина — 15%. Автор отметил взаимоусиливающее действие криопротекторов N,N-ДМАЦ и ПЭО, использование этих веществ в сочетании обеспечивает более высокую сохранность лейкоцитов к действию низких температур.

В ЦНИИГПК разработан метод криоконсервирования тромбоцитов с N,N-ДМАЦ как основном криопротекторе [2], основанный на применении 5- и 10%-й его концентрации в 5%-м растворе глюкозы или в плазме крови. Указанный метод дает возможность получить 50–70% восстановленных клеток. Изучение функциональных свойств криоконсервированных тромбоцитов показывает, что N,N-ДМАЦ по степени криозащитного действия приближается к ДМСО. При этом отдается предпочтение N,N-ДМАЦ как криопротектору при замораживании тромбоцитов, отмечаются отсутствие неприятного запаха, меньшая токсичность, возможность использования небольших концентраций криопротектора, не требующих удаления из клеточной взвеси перед трансфузиями [2].

Fahy G. M. [17, 18] при замораживании срезов почки кролика исследовал несколько соединений ряда амидов (формамид, ацетамид, мочевины) как добавки к основному криопротектору ДМСО, понижая его концентрацию. Отмечено, что улучшаются показатели восстановления почки кролика после замораживания до  $-40^{\circ}\text{C}$  и оттаивания в присутствии ДМСО при частичной его замене ацетамидом, формамидом или мочевиной [17]. Установлено, что снижение токсичности более зависит от стехиометрии амид:ДМСО, чем от абсолютного уровня концентрации ДМСО в криозащитной

smell. A painful vein spasm on the infusion place is observed.

A comparative study of glycerol, DMSO and N,N-DMA efficiency when freezing a pure fraction of granulocytes demonstrated a certain advantage of N,N-DMA [1]. A number of recovered cells in suspensions cryopreserved under protection of glycerol, DMSO and N,N-DMA made 58, 74 and 84% correspondingly. A phagocytic activity of cells cryopreserved under DMSO protection varied within the limits of 12–33%, under N,N-DMA protection — 33–57%, but one did not manage to determine the cells frozen with glycerol due to their adhesion.

Kalichava L. Kh. [4] studied a cryoprotective effect of several media, whose one component were amides, when freezing leukocytes. It has been found, that medium of following composition: N,N-DMA — 1.5–1.7% and PEO-400 — 5%; N,N-DMA — 1.5% + PEO-400 — 5% + glycerol — 15% have a high cryoprotective properties. The authors noted a mutual strengthening effect of N,N-DMA and PEO cryoprotectants, the usage of these substances in combination provides a high preservation of leukocytes to the effect of low temperatures.

The method of blood platelet cryopreservation with N,N-DMA as a main cryoprotectant [2], based on the application of the 5- and 10% of its concentration in 5% solution of glucose or in blood plasma was developed in CSRIHBT. The method mentioned gives the possibility to obtain 50–70% of recovered cells. The study of functional properties of cryopreserved blood platelets shows, that N,N-DMA approaches to DMSO by the degree of cryoprotective effect. Thereat, N,N-DMA is preferable as a cryoprotectant during blood platelet cryopreservation, the absence of disagreeable smell, lesser toxicity, the possibility to use small concentrations of cryoprotectants without removal from a cellular suspension before transfusions [2] are observed.

Fahy G.M. [17, 18], when freezing the rabbit liver sections, studied several compounds of amide series (formamide, acetamide, urea), as addition to the main protectant of DMSO, decreasing its concentration. The amelioration of indices of rabbit kidney recovering after freezing down to  $-40^{\circ}\text{C}$  and freeze-thawing in the presence of DMSO at a partial its replacing by acetamide, formamide and urea [17] was noted. It has been established that a decrease in toxicity depends in a greater extent on stoichiometry of the amide:DMSO, than on an absolute level of DMSO concentration in cryoprotective medium. Better results were obtained when using the mixture of 22,8% of DMSO + 17,2% of acetamide, that is expressed in moles by the ratio 1:1. The ratio DMSO to urea 3:1 is optimal for urea, for formamide — 2:1, correspondingly. In the experiments accomplished in sections of rabbit kidney [18], being incubated in 40% solutions of DMSO or acetamide with 300 mM of mannitol, it has been established, that the semi-period of passive



среде. Лучшие результаты получены при использовании смеси 22,8% ДМСО + 17,2% ацетамида, что выражается в молях соотношением 1:1. Для мочевины оптимальным является соотношение ДМСО к мочеине 3:1, для формамида соответственно 2:1. В опытах, выполненных на срезах почки кролика [18], инкубированных в 40%-х растворах ДМСО или ацетамида с 300 мМ маннитола, установлено, что полупериод пассивного транспорта составляет: воды — 0,8, ДМСО — 8, ацетамида — 5 мин. Такие высокие скорости диффузии позволяют предполагать отсутствие выраженного осмотического стресса во время насыщения органа раствором криопротектора или удаления его отмыванием. Однако причина взаимной нейтрализации специфической токсичности криопротекторов, используемых в смеси, является предметом дискуссии и окончательно не выяснена.

В работе Филева Л. В. с соавт. [13] изучено влияние некоторых криопротекторов (ПВП, ПЭО-400, N,N-ДМАЦ) на функциональную активность клеток-предшественников грануломонопоэза костного мозга человека до и после замораживания. Конечная концентрация криопротекторов: ПЭО-400 — 15, ПВП — 10, N,N-ДМАЦ — 3%. По мнению авторов, наибольший интерес представляет N,N-ДМАЦ, который не вызывает значительного осмотического воздействия на клетку и способен защитить наибольшее количество клеток-предшественников грануломонопоэза после замораживания-оттаивания.

Несколько соединений ряда амидов были исследованы как криопротекторы при замораживании спермы быка [18]. Формамид, N,N-диметилформамид оказались токсичными еще на этапе эквilibрации, до замораживания. Соединения ацетамид, N-метилацетамид и N,N-диметилацетамид показали криозащитный эффект при замораживании спермы быка, лучшим оказался N-метилацетамид. Однако его криопротекторная активность при криоконсервировании спермы быка уступала глицерину и была на уровне следующих соединений: диэтиленгликоль, триэтиленгликоль, ДМСО, 1,2,4-бутантриол.

Парашук Ю. С. и др. [11] исследовали криопротекторную активность 4-х соединений ряда амидов при криоконсервировании спермиев человека. Они приводят довольно высокие результаты выживаемости клеток после замораживания в присутствии N,N-ДМАЦ (65%) и ацетамида (60%).

Как видно из литературы, амиды были испытаны на значительном числе биообъектов, но широкое практическое применение они получили при криоконсервировании спермы сельскохозяйственных птиц [6, 14, 34]. В странах СНГ разработано несколько отличных друг от друга технологий примерно равной эффективности замораживания-оттаивания спермы петухов, индюков, гусей и уток с использованием амидов как основного

transport makes: water — 0,8, DMSO — 8, acetamide — 5 min. Such high diffusion rates permit to suppose the absence of manifested osmotical stress during organ saturation by cryoprotectant solution or during its removal by washing. However, the cause of mutual neutralization of specific toxicity of cryoprotectants, used in mixture, is the subject for discussing and not finally revealed.

In the work [13] the effect of some cryoprotectants (PVP, PEO-400, N,N-DMA) on functional activity of cell-precursors of human bone marrow granulomonopoiesis before and after freezing was studied. A final concentration of cryoprotectants is: PEO-400 — 15, PVP — 10, N,N-DMA — 3%. According to the authors' opinion, N,N-DMA, which does not cause a considerable osmotic effect on a cell, is capable to protect more number of cells-precursors of granulomonopoiesis after freeze-thawing.

Several compounds of amide series were investigated as cryoprotectants when freezing bull sperm [18]. Formamide, N,N-dimethylformamide were toxic even at the stage of equilibration, before freezing. Such compounds as acetamide, N-methylacetamide, N,N-dimethylacetamide showed a cryoprotective effect during bull sperm freezing, N-methylacetamide was the best one. But its cryoprotective activity during bull sperm cryopreservation was inferior to glycerol and were at the level of following compounds: diethylene glycol, triethylene glycol, DMSO, 1,2,4-butantriol.

Paraschuk Yu. S. with coauthors [11] investigated a cryoprotective activity of 4 compounds of amide series during human spermatozoa cryopreservation. They reported quite high results of cell survival after freezing in the presence of N,N-DMA (65%) and acetamide (60%).

As it is seen from the literature, amides were tested in a considerable number of bioobjects, but they obtained a wide practical application at cryopreservation of sperm of agricultural poultry [6, 14, 34]. Several different from each other technologies of freeze-thawing of fowl, turkey, goose and duck sperm with usage of amides as a main cryoprotectant of approximately equal efficiency, providing 60–80% of younger animals hatch from a number of laid eggs were developed in NIS countries. N,N-dimethylacetamide [6, 34] and D,D-dimethylformamide are used often of all as cryoprotectant at poultry sperm cryopreservation.

However, in countries with developed poultry breeding one continues to apply traditional cryoprotectants: glycerol, DMSO, ethylene glycol [22, 29, 30, 31, 35] for poultry sperm cryopreservation in agricultural practice, by thereat noting considerable insufficiencies of each of them. So, with DMSO and ethylene glycol the egg fertilization rates by sperm being frozen with these cryoprotectants does not surpass the level of 50–60% [29, 31]. Glycerol has a limited application, because it causes a contraceptive effect on poultry spermatozoa. According to the data of some investiga-



криопротектора, обеспечивающих 60–80%-й вывод молодняка от числа заложённых яиц. При криоконсервировании спермы птиц в качестве криопротекторов чаще всего используют N,N-диметилацетамид [6, 34] и N,N-диметилформамид [14].

Но в странах с развитым птицеводством для криоконсервирования спермы птиц в сельскохозяйственной практике продолжают применять традиционные криопротекторы: глицерин, ДМСО, этиленгликоль [22, 29, 30, 31, 35], отмечая при этом существенные недостатки каждого из них. Так, с ДМСО и этиленгликолем оплодотворенность яиц спермой, замороженной с этими криопротекторами, не превышает уровня 50–60% [29, 31]. Глицерин имеет ограниченное применение, так как оказывает на сперму птиц контрацептивное действие. По данным ряда исследователей [21], введение глицерина в криозащитную среду даже в концентрации 1–3% значительно снижает ее оплодотворяющую способность. При остаточной концентрации глицерина 0,8% в среде после диализа оплодотворенность яиц падает на 10–12%. Оптимальная концентрация глицерина в среде, обеспечивающая криозащитное действие на сперму птиц, находится в пределах 15–20%, хотя некоторые исследователи утверждают, что высокие результаты можно получить при его концентрации в клеточной суспензии 7–10% [35]. В то же время для сохранения высокой оплодотворяющей способности спермы содержание этого криопротектора в среде должно быть по меньшей мере в 10–20 раз ниже, поэтому технология криоконсервирования спермы птиц с глицерином требует перед осеменением обязательного его удаления из среды.

Следует отметить, что цитотоксическое действие криопротекторов на сперму птиц на этапах криоконсервирования до настоящего времени мало изучено [24, 25, 32, 36]. Показано [25, 36], что добавление глицерина в разбавители вызывает набухание головок, искривление сперматозоидов в области шейки, ультраструктурные изменения акросом, а также способствует утечке ферментов. Данные о повреждающем действии этиленгликоля на сперматозоиды птиц практически отсутствуют, имеются лишь отдельные сообщения [12], а для ДМСО — очень противоречивые [12, 32]. Установлено, что цитотоксический эффект ДМСО в отношении спермы птиц, в частности спермы петуха [32], существенно зависит от времени и температуры эквilibрации, а также от состава среды, которой разбавляется сперма. По данным [7, 12], ДМСО является самым токсичным криопротектором для спермы петухов, добавление ДМСО к сперме при 4 °C вызывает максимальное повреждение сперматозоидов. Выявлено [12], что в порядке возрастания повреждающего действия на сперматозоиды петуха криопротекторы располагаются следующим образом:

tors [21], the introduction of glycerol into a cryoprotective medium even in the concentration of 1–3% considerably decreases its fertilizing capacity. At a residual concentration of glycerol of 0.8% in the medium after dialysis, the egg fertilization rate decreases by 10–12%. An optimal glycerol concentration in the medium providing cryoprotective effect on poultry sperm is within the limits of 15–20%, but some investigators affirm that one can obtain high results at its concentration in cellular suspension of 7–10% [35]. At the same time to preserve a high fertilizing ability of sperm, the content of this cryoprotectant in a medium should be, at least, in 10–20 times lower, therefore the technology of poultry sperm cryopreservation with glycerol requires an obligatory its removal from a medium before insemination.

It should be noted that a cytotoxic effect of cryoprotectants on poultry sperm at the stages of cryopreservation has not quite studied till now [24, 25, 32, 36]. It has been shown that the addition of glycerol into the diluents causes a swelling of heads, curvature of spermatozoa in the neck field, ultrastructural changes of acrosomes, as well as contributes to enzyme leakage. The data on a damaging effect of ethylene glycol on poultry spermatozoa are quite absent, there are only some communications [12], and for DMSO — very contradictory ones [12, 32]. It has been established, that cytotoxic effect of DMSO in respect to poultry sperm, fowl sperm in particular [32], considerably depends on the equilibration time and temperature, as well as on the medium composition, by which the sperm is diluted. According to the data [7, 12], DMSO is the most toxic cryoprotectant for fowl sperm, the addition of DMSO to the sperm at 4 °C causes a maximum damage of spermatozoa. It has been revealed [12], that in an increasing order of damaging effect on fowl spermatozoa, cryoprotectants are arranged as follows:

N,N-DMFA < N,N-DMA < glycerol <  
< ethylene glycol < DMSO.

According to the authors' opinion [21, 37] a number of spermatozoa preserved the capacity to fertilization after freeze-thawing even with the usage of optimal technologies made about 2% from an initial level. So, upto  $500 \cdot 10^8$  of cells in the insemination dose is needed for obtaining a high egg fertilization rate, meanwhile approximately  $50 \cdot 10^8$  of cells are enough during hen insemination by a fresh sperm. Taking into consideration this fact, technological difficulties of poultry cryopreserved sperm application in a wide practice become evident. Nevertheless, the application fields of poultry frozen sperm in selection get wider: one uses a cryopreserved sperm for posterity estimation or extensive repeated coupling with certain males during 3–4 years, maintenance of control populations, genefond preservation of rare breeds and inbred lines, reserve genefond of industrial crosses and microlines, genefond of elite males, as well as for the creation of an exchangeable genofond [5]. That is why



$N,N\text{-DMFA} < N,N\text{-DMAЦ} < \text{глицерин} < \\ < \text{этиленгликоль} < \text{DMSO}.$

По мнению авторов [21, 37], количество спермиев, сохранивших способность к оплодотворению после замораживания-оттаивания даже с использованием оптимальных технологий, составляет около 2% от исходного уровня. Поэтому для получения высокой оплодотворенности яиц требуется до  $500 \cdot 10^8$  клеток в дозе осеменения, в то время как при осеменении кур свежей спермой достаточно около  $50 \cdot 10^8$  клеток. Учитывая это, технологические трудности применения криоконсервированной спермы птиц в широкой практике становятся очевидными. И тем не менее области применения замороженной спермы птиц в селекции расширяются: криоконсервированную сперму используют для оценки потомства или экстенсивного повторного спаривания с определенными самцами в течение 3–4 лет, поддержания контрольных популяций, сохранения генофонда редких пород и инбредных линий, резервного генофонда промышленных кроссов и микролиний, генофонда элитных самцов, а также для создания обменного генофонда [5]. Поэтому интерес к разработке оптимальных технологий замораживания-оттаивания спермы птиц не угасает, ведущую роль в этих исследованиях занимает поиск эффективных криопротекторов и криозащитных сред. В последнее время амидам как перспективным криопротекторам для спермы птиц уделяется повышенное внимание.

В работе [22] было исследовано влияние ряда криопротекторов (1,2-пропандиола (1,2-ПД), ДМСО, этиленгликоля (ЭГ), N-метил-2-пирролидона (МП), N,N-диметилацетамида) на оплодотворяющую способность криоконсервированных спермиев петухов. Показано, что в присутствии этих криопротекторов в среде для разбавления незамороженной спермы оплодотворенность яиц через 2–8 дней составила: в контроле — 92, с 1,2-ПД — 91,7, ДМСО — 96, ЭГ — 85, МП — 91,5, N,N-ДМАЦ — 94,0%, после замораживания-оттаивания с N,N-ДМАЦ — 69,8, с 1,2-ПД — 34,1%, через 2–8 дней с N,N-ДМАЦ — 60,0, с 1,2-ПД — 29,0%. Авторы пришли к выводу о перспективности применения N,N-ДМАЦ как защитного агента при криоконсервировании спермы петухов.

В университете им. Гумбольда (Германия) проводили сравнительное изучение ряда криопротекторов [19, 28]. Лучшие результаты были получены при использовании N,N-ДМАЦ и N,N-ДМФА. Оплодотворенность яиц достигла соответственно 68,6 и 85,0%, выводимость была на уровне 84,3%, вывод цыплят составил 57,8 и 71,7%. Использование 1,2-пропандиола и этиленгликоля обеспечивало более низкие результаты: оплодотворенность яиц, выводимость и вывод цыплят составили 61,5 и 42,9; 76,8 и 87,2; 47,3 и 37,4% соответственно. Дальнейшими исследованиями было установлено, что N,N-ДМФА более эффективен как криопротектор по

the interest to the development of optimal technologies of freeze-thawing of poultry sperm remains actual, the search of efficient cryoprotectants and cryoprotective media takes a leading role in these investigations. Recently, an increased attention is given to amides as perspective cryoprotectants for poultry sperm.

In the work [22] the effect of series of cryoprotectants (1,2-propanediol (1,2-PD), DMSO, ethylene glycol (EG), N-methyl-2-pyrrolidone (MP), NN-dimethylacetamide) on a fertilizing ability of fowls' cryopreserved spermatozoa was studied. It has been shown that in the presence of these cryoprotectants in the medium for dilution of non-frozen sperm, the fertilization rate of eggs in 2–8 days made: in the control — 92, with 1,2-PD — 91.7, DMSO — 96, EG — 85, MP — 91.5, N,N-DMA — 94.0, after freeze-thawing — with N,N-DMA — 69.8, with 1,2-PD — 34.1%, in 2–8 days — with N,N-DMA — 60.0, with 1,2-PD — 29.0%. The authors concluded on the perspectiveness of N,N-DMA application as a protective agent during fowl sperm cryopreservation.

At Humboldt University (Germany) a comparative study of some cryoprotectants [17, 28] was carried out. The best results were obtained using N,N-DMA and N,N-DMFA. Eggs' fertilization rate reached 68.6 and 71.7%, correspondingly, hatchability was at the level of 84.3%, the hatch of chicken made 57.8 and 71.7%. The usage of 1,2-propanediol and ethylene glycol provided a lower results: eggs' fertilization rate, the hatchability and hatch of chicken made 61.5 and 42.9; 76.8 and 87.2; 47.3 and 37.4%, correspondingly. In following investigations it has been established, that N,N-DMFA is more efficient as cryoprotectant in comparison with N,N-DMA. Eggs' fertilization rate and chicken' hatch with N,N-DMFA made 94.9 and 85.5%, correspondingly, with N,N-DMA eggs' fertilization rate 90.2, chicken' hatch — 80.6% [28]. Therefore, N,N-DMFA is recommended as cryoprotectant for a wide usage.

In our investigations together with UkrSRIP (Ukrainian Scientific & Research Institute for Poultry) [3, 7, 8–10, 14] a comparative study of protective effect of some cryoprotectants, specimens of various classes of compounds, such as: polyols, diols, amides, sulphoxides (30–40 compounds) was conducted. Final concentration of cryoprotectants in the medium varied from 6 to 10%. The best results on indices of morphological integrity of spermatozoa, eggs' fertilization rate and young hatch were obtained when using as cryoprotectant compounds of amide series: N-methylacetamide, N,N-DMFA, N,N-DMA. One developed and proposed the technology of poultry sperm cryopreservation with application of N,N-DMFA [13]. According to the given method, freshly obtained sperm is diluted by a cryoprotective medium in the ratio of 1:1 at the temperature of 20–25 °C and cooled down to the temperature of 4–5 °C, cryoprotective solution of N,N-DMFA is added in the medium upto a final concentration in cellular suspension of 7%.



сравнению с N,N-ДМАЦ. Оплодотворенность яиц и вывод цыплят с N,N-ДМФА составили 94,9 и 85,5% соответственно, с N,N-ДМАЦ оплодотворенность яиц — 90,2, вывод цыплят — 80,6% [28]. Поэтому для широкого использования в качестве криопротектора рекомендован N,N-ДМФА.

В наших исследованиях совместно с УкрНИИП [3, 7, 8–10, 14] проведено сравнительное изучение защитного действия ряда криопротекторов, представителей различных классов соединений: полиолов, диолов, амидов, сульфоксидов (30–40 соединений). Конечная концентрация криопротекторов в среде варьировала от 6 до 10%. Лучшие результаты по показателям морфологической сохранности спермиев, оплодотворенности яиц и выводу молодняка получены при использовании в качестве криопротекторов соединений ряда амидов: N-метилацетамида, N,N-ДМФА, N,N-ДМАЦ. Разработана и предложена технология криоконсервирования спермы птиц с применением N,N-ДМФА [14]. По данному способу свежеполученную сперму разбавляют криозащитной средой в соотношении 1:1 при температуре 20–25 °C и охлаждают до температуры 4–5 °C, добавляют раствор криопротектора N,N-ДМФА в среде до конечной концентрации в клеточной суспензии 7%. Замораживание проводят в полиэтиленовых трубках типа “СЖ” со скоростью охлаждения 3 °C/мин до начала кристаллизации, выдерживают в течение 1–3 мин на плато кристаллизации, замораживают до –16–22 °C со скоростью 25–30 °C/мин, затем до –80–90 °C со скоростью 50–70 °C/мин и погружают в жидкий азот. Оттаивание образцов выполняют на водяной бане при 40 °C. Осеменение кур проводят размороженной спермой в дозе 0,12 мл на глубину 2–3 см с частотой один раз в три–четыре дня. Описанный способ замораживания-оттаивания спермы петуха обеспечивает оплодотворенность яиц на уровне 75–85% и вывод молодняка 70–75%.

В НИИ разведения и генетики сельскохозяйственных животных (г. С-Петербург) разработаны достаточно эффективные технологии криоконсервирования спермы петухов, индюков, гусей и уток с применением N,N-ДМАЦ как криопротектора [34]. Криозащитные среды для спермы разных видов птиц отличаются по составу компонентов и физико-химическим свойствам (*pH*, осмотичность), конечная концентрация N,N-диметилацетамида в клеточной суспензии составляет для спермы: петухов — 6, гусей — 4, уток — 5%. Условия подготовки спермы, режимы замораживания для разных видов птиц также разные. Авторам удалось получить стабильные и высокие результаты: после искусственного осеменения уток, гусынь, индюшек и кур криоконсервированной спермой оплодотворенность яиц составила 69–90, 81–90, 80–90 и 75–85% соответственно. Однако предложенные технологии имеют существенный недостаток: сперма петухов, индюков и гусей

Freezing is performed in polyethylene tubes “SZh” type with cooling rate of 3 °C/min before crystallization beginning, one stands within 1–3 min on the plateau of crystallization, freezes down to –16–22 °C with the rate of 25–30 °C/min, then down to –80–90 °C with the rate of 50–70 °C/min and immerses into a liquid nitrogen. Freeze-thawing of samples is performed at a water bath at 40 °C. Hens’ insemination is conducted by frozen-thawed sperm in the dose of 0.12 ml for the depth of 2–3 cm with the frequency of one time on three-four days. The method described of fowl’s sperm freeze-thawing provides eggs’ fertilization rate at the level of 75–85% and young hatch — 70–75%.

Quite efficient technologies of fowl, turkey, goose, duck sperm cryopreservation with the application of N,N-DMA as cryoprotectant [34] were developed at the Scientific and Research Institute of Breeding and Genetics of Agricultural Animals (city of St-Petersburg). Cryoprotective media for sperm of various kinds of poultry differ by the composition of components and physical and chemical properties (*pH*, osmoticity), a final concentration of N,N-dimethylacetamide in a cellular suspension made for sperm of fowls — 6, geese — 4, ducks — 5%. Conditions of sperm preparation, regimens of freezing for various kinds of poultry are also different. The authors managed to obtain stable and high results: after artificial insemination of ducks, geese, turkey-hens and hens with cryopreserved sperm the eggs’ fertilization rate made 69–90, 81–90 and 75–85%, correspondingly. But technologies proposed have a significant disadvantage: sperm of fowls, turkey-fowls, and geese is frozen in granules, ducks’ sperm — in penicillin bottles; both first and second variants are equally inconvenient both for a long-term storage in low temperature banks, and for transportation.

Maeda T., Terada T. [25, 33] carried out series of investigations, comparing the efficiency of applied for fowl sperm freezing traditional cryoprotectants with amide: ethylene glycol, glycerol, DMSO and N-methylformamide. The effect of cryoprotectants on the change of morphological indices (integrity of acrosome and membrane of heads, volume of spermatozoa), spermatozoa motility, as well as on the rate of oxygen absorption at different stages of cryopreservation was tested. It has been shown, that the dynamics of spermatozoa volume change in the process of cryopreservation under the effect of all studied cryoprotectants was quite equal, spermatozoa motility, morphological indices were different. Studying the indices of energetic change under the effect of cryoprotectants one has found out, that amide suppresses the rate of oxygen absorption in a larger extent than glycerol before and after freezing, that confirms well with the conclusions [27]. As a result of conducted series of works [25, 33], the authors come to the conclusion on a differentiated effect of amides and glycols on fowl spermatozoa in the process of freeze-



замораживается в гранулах, сперма уток в пенициллиновых флаконах; и первый, и второй варианты одинаково неудобны как для длительного хранения в низкотемпературных банках, так и для транспортировки.

Maeda T., Terada T. [25, 33] провели цикл исследований, сравнивая эффективность применяемых для замораживания спермы петухов традиционных криопротекторов с амидом: этиленгликоля, глицерина, ДМСО и N-метилформамида. Проверено влияние криопротекторов на изменение морфологических показателей (целостность акросом и мембраны головок, объем спермиев), подвижность спермиев, а также на скорость поглощения кислорода на различных этапах криоконсервирования. Показано, что динамика изменения объема спермиев в процессе криоконсервирования под действием всех изученных криопротекторов была практически одинакова, подвижность спермиев, морфологические показатели отличались. При изучении показателей энергетического обмена под влиянием криопротекторов было обнаружено, что амид подавляет скорость поглощения кислорода в большей степени, чем глицерин, до и после замораживания, что хорошо согласуется выводами [27]. В результате проведенного цикла работ [25, 33] авторы приходят к заключению о дифференцированном действии амидов и гликолей на спермии петуха в процессе замораживания-оттаивания и предлагают использовать в практике криоконсервирования их смесь.

Нами было проведено сравнительное изучение криопротекторной активности отдельных представителей 2-х классов химических соединений (амидов и гликолей) и их комбинации с различным молярным соотношением при замораживании спермы петуха [8]. Общая концентрация смеси криопротекторов сохранялась на уровне 8%. Были изучены морфологические показатели сохранности спермы. Выявлено, что в присутствии амидов сохраняется больше спермиев с целыми мембранами головок, под защитой гликолей — спермиев с целыми акросомами. Применение смеси амидов и диолов показало, что она не уступает по эффективности отдельным криопротекторам, при этом после замораживания-оттаивания сохраняется одновременно максимально возможное число спермиев с целыми мембранами головок и с целыми акросомами. Наиболее высокая сохранность спермиев петуха при криоконсервировании получена под защитой смеси криопротекторов N-метилацетамид плюс этиленгликоль с молярным соотношением 3:2 и N,N-ДМФА плюс этиленгликоль с молярным соотношением 1:2 и 3:2 при общей концентрации 8%. При этом число спермиев с целыми мембранами головок достигло уровня 80–83%, с целыми акросомами — 45–47%, такое сочетание морфологических показателей сохранности спермиев петуха с подвижностью 4,5–5,0 баллов позволяет ожидать после осеменения размороженной спермой оплодо-

thawing and propose to use their mixture in practice of cryopreservation.

We conducted a comparative study of cryoprotective activity of some specimens of 2 classes of chemical compounds (amides and glycols) and their combination with different mole ratio at fowl sperm freezing [8]. An aggregate concentration of mixture of cryoprotectants was at the level of 8%. Morphological indices of sperm integrity were studied. It has been revealed, that in the presence of amides a bigger number of spermatozoa with intact membranes of heads are preserved, under glycol protection — spermatozoa with intact acrosomes. The application of amide and glycol mixture has shown, that it is not inferior in the efficiency to some cryoprotectants, thereat after freeze-thawing a simultaneously maximum possible number of spermatozoa with intact membranes of heads and with intact acrosomes. The highest integrity of fowl spermatozoa at cryopreservation was obtained under protection of cryoprotectant mixture of N-methylacetamide plus ethylene glycol with 3:2 mole ratio and N,N-DMFA plus ethylene glycol with 1:2 and 3:2 mole ratio at general concentration of 8%. Thereat a number of spermatozoa with intact head membranes reached the level of 80–83%, with integral acrosomes — 45–47%, such combination of morphological indices of fowl spermatozoa integrity with motility of 4.5–5.0 points allows to expect, after insemination by frozen-thawed sperm, the egg fertilization rate about 70–80%. The results obtained confirm the perspectiveness of the application of cryoprotectant mixture of amide plus glycol at freezing fowl sperm and allow to recommend their combination in cryopreservation practice.

Thus, amides of low molecular aliphatic acids are efficient cryoprotectants for many biological objects, but for poultry sperm, undoubtedly, have a priority to traditional ones. The perspectiveness of amide application in combination with cryoprotectants of exo- and endocellular type should be especially noted. Practical and theoretical data permit to suppose, that mixtures of amides with polyols will be the most efficient by cryoprotective activity, because they supplement and mutually amplify each other according to some physical and chemical properties. The mechanism of amide cryoprotective effect, N,N-DMA and N,N-DMFA widely applied, in particular, has remained still unclear. Obviously, it is similar to the mechanism of penetrating cryoprotectant effect, DMSO like.

## REFERENCES

1. Agranenko V.A., Ermolovich S.V. Leukocyte cryopreservation // Cryopreservation of cellular suspensions.— Kiev: Nauk. Dumka, 1983.— P. 98–106.
2. Agranenko V.A., Kompaniets A.M. Cryopreservation of blood platelets // Cryopreservation of cellular suspensions.— Kiev: Nauk. Dumka, 1983.— P. 107–120.
3. Artemenko A.B., Tereschenko A.V., Novikov A.N., Linnik T.P. Cryopreservation of fowl sperm // Poultry breeding.— 1990.— № 43.— P. 14–17. (in Russian)



творенность яиц около 70–80%. Полученные результаты подтверждают перспективность применения смеси криопротекторов амид плюс гликоль при замораживании спермы петуха и позволяют рекомендовать их сочетание в практику криоконсервирования.

Таким образом, амиды низкомолекулярных алифатических кислот являются эффективными криопротекторами для многих биологических объектов, а для спермы птиц, несомненно, имеют приоритет перед традиционными. Особо следует отметить перспективность применения амидов в комбинации с криопротекторами экзо- и эндоцеллюлярного типа. Практические и теоретические данные позволяют предположить, что наиболее эффективны по криопротекторной активности будут смеси амидов с полиолами, поскольку по ряду физико-химических свойств они дополняют и взаимно усиливают друг друга. Механизм криозащитного действия амидов, в частности широко применяемых N,N-ДМАЦ и N,N-ДМФА, остается неясным. Очевидно, он подобен механизму действия проникающих криопротекторов типа ДМСО.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аграненко В.А., Ермолович С.В. Криоконсервирование лейкоцитов // Криоконсервирование клеточных суспензий. — Киев: Наук. думка, 1983. — С. 98–106.
2. Аграненко В.А., Компаниец А.М. Криоконсервирование тромбоцитов // Криоконсервирование клеточных суспензий. — Киев: Наук. думка, 1983. — С. 107–120.
3. Артемченко А. Б., Терещенко А. В., Новиков А. Н., Линник Т. П. Криоконсервирование спермы петуха // Птицеводство. — 1990. — № 43. — С. 14–17.
4. Каличава Л.Х. Применение различных сочетаний криофилактиков для криоконсервирования лейкоцитов // Сообщ. АН ГССР. — 1983. — 110, № 3. — С. 633–635.
5. Каримов К.К., Паронян И.А., Иванов Б.И. и др. Создание банка спермы петухов — перспективный метод сохранения генофонда // Птицеводство. — 1983. — № 3. — С. 17.
6. Курбатов А.Д. Низкотемпературное хранение спермы птиц // Криобиология. — 1995. — № 3. — С. 13–15.
7. Линник Т.П. Зависимость криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1986. — 19 с.
8. Линник Т.П., Новиков А.Н., Терещенко А.В. и др. Криоконсервирование спермы петуха на основе смеси криопротекторов амид-гликоль // Патологические аспекты действия холода на организм. — Харьков, 1989. — С. 64–68.
9. Линник Т.П., Новиков А.Н., Рындин В.Ф. и др. Прогнозирование эффективных криопротекторов методом КССА при криоконсервировании спермы петуха // Криобиология. — 1990. — № 3. — С. 41–45.
10. Линник Т.П. Подходы и принципы создания криозащитных сред для спермы птиц и млекопитающих // Пробл. криобиологии. — 1993. — № 4. — С. 40–48.
11. Паращук Ю. С., Грищенко В. И., Калугин Ю. В., Черныш Е. Н. Влияние различных условий криоконсервации на выживаемость спермиев человека // Криобиология. — 1985. — № 4. — С. 22–28.
12. Сахацкий М.И., Терещенко О.В., Артеменко О.Б. та ін. Токсичність і криозахисна дія деяких криопротекторів при заморожуванні сперми півнів // Птахівництво. — 1992. — Вип. 44. — С. 20–24.
13. Филев Л.В., Дыгин В.П., Холодный А.Я., Петренко Г.И. Влияние криопротекторов на колониеобразующую способность клеток-предшественников грануломонопоэза костного мозга человека до замораживания // Криобиология. — 1985. — № 4. — С. 14–17.
14. А. С. 1524882 СССР МКІ<sup>4</sup> А61Д 7/02. Способ криоконсервирования спермы птиц / Н. И. Сахацкий, А. В. Терещенко, А. Н. Новиков, Т. П. Линник, А. В. Артеменко. — Опубл. 1989. Бюл. изобретений. — № 44. — С. 17.
4. Kalichava L.Kh. Application of various combinations of cryophyllactics for leukocyte cryopreservation // Inform. of Acad. of Sci. of GSSR. — 1983. — 110, № 3. — P. 633–635.
5. Karimov K.K., Paronyan I.A., Ivanov B.I., et al. Creation of the bank of fowl sperm is a perspective method of genofond preservation // Poultry breeding. — 1983. — № 3. — P. 17.
6. Kurbatov A.D. Low temperature storage of poultry sperm // Cryobiology. — 1995. — № 3. — P. 13–15.
7. Linnik T.P. Dependency of cryoprotective activity of compounds of amide series on their physical and chemical properties: author's thesis for obtaining Candidate degree (biology). — Kharkov, 1986. — 19 p.
8. Linnik T.P., Novikov A.N., Tereschenko A.V. et al. Cock sperm cryopreservation on the basis of amide glycol cryoprotectant mixture // Pathophysiological aspects of cold effect on an organism. — Kharkov, 1989. — P. 64–68.
9. Linnik T.P., Novikov A.N., Ryndin V.F. et al. Forecasting of efficient cryoprotectants by means of QRSA method of at the fowl sperm cryopreservation // Cryobiology. — 1993. — № 4. — P. 40–48.
10. Linnik T.P. Approaches and principles of creation of cryoprotective media for the poultry and mammalian sperm // Problems of cryobiology. — 1993. — № 4. — P. 40–48.
11. Paraschuk Yu.S., Grischenko V.I., Kalugin Yu.V., Chernysh E.N. The effect of different conditions of cryopreservation on survival of human spermatozoa // Cryobiology. — 1985. — № 4. — P. 22–28.
12. Sakhatsky M.I., Tereschenko O.V., Artemenko O.B. et al. Toxicity and cryoprotective effect of some cryoprotectants when fowl sperm freezing // Poultry breeding. — 1992. — № 1. — P. 20–24.
13. Fileyev L.V., Dygin V.P., Kholodny A.Ya., Petrenko G.I. The effect of cryoprotectants on a colony-forming capacity of cells-precursors of human bone marrow granulomonopoiesis before freezing // Cryobiology. — 1985. — № 4. — P. 14–17.
14. Author's certificate 1524882 of the USSR. MKI<sup>4</sup> A 61 D 7/02. Method of cryopreservation of poultry sperm/N.I. Sakhatsky., A.V. Tereschenko, A.N. Novikov, T.P. Linnik, A.V. Artemenko. — Publish. 1989. Bull. of inventions. — № 44. — P. 17.
15. Buss E.G., Redly R.P. Effect of low concentration of glycerol on fertility of nonfrozen rooster sperm suspended in three buffers // Proc. 19th World Poultry Cong. — Amsterdam, 1992. — 1. — P. 664.
16. Djerassi J., Roy A., Kim J., Cavins J. Dimethylacetamide a new cryoprotective agents for platelets // Transfusion. — 1971. — № 11. — P. 72–76.
17. Fahy G.M. Cryoprotectant toxicity neutralizers reduce freezing damage // Cryo Lett. — 1983. — 14, № 5. — P. 309–314.
18. Fahy G.M. Cryoprotectant toxicity reduction : specific or nonspecific? // Cryo Lett. — 1984. — 5, № 5. — P. 287–289.
19. Hübner R., Schram G.-P. Untersuchungen Nüber die krio-protective eignung von äthylenglykol und dimethylacetamid zur tiefgefrierkonservierung von hahnensperma // Mh. Vet.-Med. — 1988. — 43. — S. 279–282.
20. Jeyendran R.S., Graham E.F. An evaluation of cryoprotective compounds on bovine spermatozoa // Cryobiology. — 1980. — 17, № 5. — P. 458–464.
21. Lake P.E. The history and future of the cryopreservation of avian germ plasm // Poultry Sc. — 1986. — 65, № 1. — P. 1–15.
22. Lake P.E., Ravie O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa // Brit. Poultry Sc. — 1984. — 25, № 1. — P. 145–150.
23. Lovelock J.E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing // Biochemical Journal. — 1954. — 56, № 2. — P. 265–270.
24. Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y. Studies of the factors causing abnormal acrosomes and crooked-necks in fowl spermatozoa during freezing and thawing // Brit. Poultry Sc. — 1986. — 27, № 4. — P. 695–702.
25. Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y. Comparative study of the effect of various cryoprotectants in preserving the morphology of frozen and thawed fowl spermatozoa // Brit. Poultry Sc. — 1984. — 25, № 4. — P. 547–553.



15. Buss E.G., Redly R.P. Effect of low concentration of glycerol on fertility of nonfrozen rooster sperm suspended in three buffers // *Proc. 19th World Poultry Cong.*— Amsterdam, 1992.— 1.— P. 664.
16. Djerassi J., Roy A., Kim J., Cavins J. Dimethylacetamide a new cryoprotective agents for platelets // *Transfusion.*— 1971.— № 11.— P. 72–76.
17. Fahy G.M. Cryoprotectant toxicity neutralizers reduce freezing damage // *Cryo-Lett.*— 1983.— 14, № 5.— P. 309–314.
18. Fahy G.M. Cryoprotectant toxicity reduction: specific or non-specific? // *Cryo-Lett.*— 1984.— 5, № 5.— P. 287–289.
19. Hübner R., Schram G.-P. Untersuchungen Nüber die krio-protektive eignung von äthylenglykol und dimethylacetamid zur tiefgefrierkonservierung von hahnensperma // *Mh. Vet.-Med.*— 1988.— 43.— S. 279–282.
20. Jeyendran R.S., Graham E.F. An evaluation of cryoprotective compounds on bovine spermatozoa // *Cryobiology.*— 1980.— 17, № 5.— P. 458–464.
21. Lake P.E. The history and future of the cryopreservation of avian germ plasm // *Poultry Sc.*— 1986.— 65, № 1.— P. 1–15.
22. Lake P.E., Ravie O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa // *Brit. Poultry Sc.*— 1984.— 25, № 1.— P. 145–150.
23. Lovelock J.E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing // *Biochemical Journal.*— 1954.— 56, № 2.— P. 265–270.
24. Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y. Studies of the factors causing abnormal acrosomes and crooked-necks in fowl spermatozoa during freezing and thawing // *Brit. Poultry Sc.*— 1986.— 27, № 4.— P. 695–702.
25. Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y. Comparative study of the effect of various cryoprotectants in preserving the morphology of frozen and thawed fowl spermatozoa // *Brit. Poultry Sc.*— 1984.— 25, № 4.— P. 547–553.
26. Nash T. The Chemical constitution of compounds which protect erythrocytes against freezing damage // *J. Gen Physiol.*— 1962.— 46, № 1.— P. 167–175.
27. Ochkur S.I., Kopeika E.F., Suraj P.F., Grischenko V.I. The influence of cryopreservation on parameters of energetic metabolism and motility of fowl spermatozoa // *Cryobiology.*— 1994.— 31, № 3.— P. 239–247.
28. Schram G.-P., Hübner R. Konservierung von Geflügelsperma // *Arch. Tierz.*— 1989.— 32, № 1.— P. 51–61.
29. Schram G.-P. Flussung und gefrierkoserveryvierung von Putersperma // *Mh. Vet.-Med.*— 1986.— 41, № 13.— S. 460–463.
30. Seigneurin F., Blesbois E. Effect of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowls spermatozoa // *Theriogenology.*— 1994.— 40.— P. 1352–1358.
31. Sexton T. Optimal rates for cooling chicken semen from +5 to -196 °C // *Poultry Sc.*— 1980.— 59.— P. 2765–2770.
32. Sexton T. A new poultry semen extender.5. Relationship of diluent components to cytotoxic effects of dimethylsulfoxide on turkey spermatozoa // *Poultry Sc.*— 1980.— 59, № 5.— P. 1142–1144.
33. Terada T., Haschimoto H., Maeda T. Influence of cryoprotectant concentration on cell volume and motility of frozen-thawed fowl spermatozoa // *Japan Poultry Sc.*— 1988.— 25, № 5.— P. 268–277.
34. Tselutin K. Narubina L., Mavrodina T., Tur B. Cryopreservation of poultry semen // *Brit.Poultry Sc.*— 1995.— 36.— P. 805–811.
35. Watanabe M., Terada T. Fertility of frozen fowl semen stored for term (9 years) // *Fac. Appl. Biol. Sc.*— 1980.— 19, № 2.— P. 155–159.
36. Westfall F.D., Howarth B. I. The effect of glycerol and dilution on the release of glutamic oxalaacetic transaminase from chicken spermatozoa // *Poultry Sc.*— 1978.— 57, № 3.— P. 1037–1041.
37. Wishart G.J. Quantification of the fertilising ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa // *Brit. Poultry Sc.*— 1985.— 26.— P. 375–380.

Accepted in 9.03.98

Поступила 9.03.98



## К вопросу о защитном действии ПЭО на организменном уровне при охлаждении белых крыс

О. В. ЛИПИНА

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## To the Question on PEO Protective Effect on an Organism Level During White Rats' Cooling

O. V. LIPINA

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

Получены данные, свидетельствующие о том, что полиэтиленоксиды с молекулярным весом 400 и 1 500 при пероральном введении проникают в кровеносное русло. Это дает основание более аргументированно судить о механизме защитного действия ПЭО при холодовой травме гомойотермного организма.

Отримано дані, які свідчать, що поліетиленоксиди з молекулярною вагою 400 і 1 500 при пероральному введенні проникають у кровоносне русло. Це дає підставу більш аргументовано робити висновок про механізм захисної дії ПЕО при холодовій травмі гомойотермного організму.

The data testifying to the fact, that polyethylene oxides with 400 and 1500 molecular weight during peroral introduction penetrate into a blood channel were obtained. This fact gives the reason to use more arguments for judging about the mechanism of PEO protective effect at cold injury of homoiothermal organism.

В течение многих лет вещества ряда полиэтиленоксида (ПЭО) находятся в центре внимания исследователей в связи с тем, что они обладают выраженной осмодиуретической и гипотензивной активностью при отеках различной этиологии [2, 4]. Эти вещества при введении в кровеносное русло снижают периферическое сопротивление и вязкость крови (при малых напряжениях сдвига), а также являются криопротекторами при консервировании различных биообъектов [2, 5].

В наших экспериментах изучалось криозащитное действие ПЭО на организменном уровне при остром общем охлаждении животных в холодной воде. Для этого белым беспородным крысам-самцам перед погружением в воду перорально вводили 30%-е растворы ПЭО-400 или ПЭО-1500. Было показано, что применение ПЭО перед охлаждением крыс предупреждает возникающие в процессе охлаждения гемореологические расстройства: уменьшается степень подъема вязкости крови и предельного напряжения сдвига; вязкость плазмы остается на уровне, достоверно не отличающемся от нормотермического; показатель гематокрита увеличивается в меньшей степени и более равномерно; улучшается микроциркуляция в сосудах брыжейки. Кроме того, полиэтиленоксид способствует повышению выживаемости гомойотермного организма в условиях холодовой травмы [5].

В [2, 3] отмечено, что механизм защитного действия ПЭО при низкотемпературном консервировании биологических объектов обусловлен его способностью связывать воду на молекулярном уровне. Однако вклад данного фактора в механизм криозащитного действия ПЭО на организменном уровне при тех малых концентрациях, в которых ПЭО при используемых дозах может находиться в крови, являющейся водной средой, не существенен [3]. По нашему мнению, механизм защитного действия ПЭО при охлаждении теплокровного орга-

Within many years the substances of polyethylene oxide (PEO) series are the centers of investigators' attention due to their manifested osmодиuretic and hypotensive activity at oedemas of different etiology [2, 4]. These substances, being injected into a blood channel decrease peripheric resistance and blood viscosity (at low shift tensions), as well as they are cryoprotectants when preserving various bioobjects [2, 5].

In our experiments we have studied PEO cryoprotective effect on an organism level during an acute general cooling of animals in cold water. For this purpose, 30% solutions of PEO-400 or PEO-1500 were perorally introduced to breedless white male rats before immersion into water. It has been shown, that PEO application before rats' cooling prevents hemorrhological disorders occurring in the process of cooling; the degree of increase in blood viscosity and a limiting tension of shift decreases; plasma viscosity remains at the level, not significantly differing from normothermal one; hematocrit index increases in a lesser extent and more uniformly; microcirculation improves in mesentery vessels. Besides, polyethylene oxide contributes to increase in survival of homoiothermal organism under cold injury conditions [5].

It has been noted in [2, 3], that the mechanism of PEO protective effect at biological object low temperature preservation is stipulated by its ability to bind water at a molecular level. However, the contribution of given factor in the mechanism of PEO cryoprotective effect at an organism level, at those low concentration when PEO at the used doses may exist in blood, being an aqueous medium, is not significant [2]. By our opinion, the mechanism of PEO protective effect during cooling of homoiotheremal organism might be explained by the PEO ability to retain water in a blood channel due to osmotical processes and affect its redistribution in an organism. It was necessary for this to make sure, that PEO at peroral introduction penetrates into blood, but at present this fact



низма можно было бы объяснить способностью ПЭО удерживать воду в кровеносном русле за счет осмотических процессов и таким образом влиять на ее перераспределение в организме. Для этого необходимо было убедиться в том, что ПЭО при пероральном введении проникает в кровь, но это в настоящее время однозначно не выяснено [1].

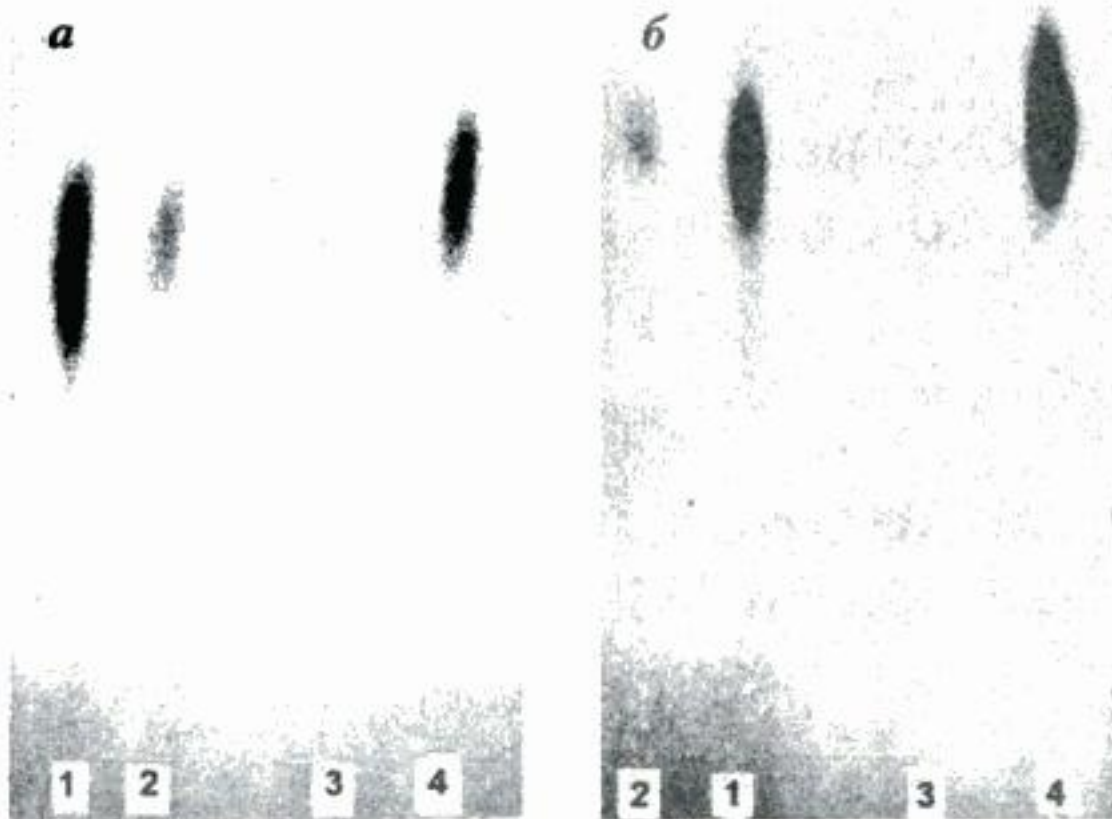
Цель работы — получить экспериментально доказательства проницаемости полиэтиленоксидов в кровь животных при применении их *per os*. Методом тонкослойной хроматографии [6] выявили, что в моче крыс, которым перорально вводили водные растворы ПЭО-400 и ПЭО-1500, присутствует полиэтиленоксид (рисунок).

Таким образом, установлено, что полиэтиленоксид проникает через желудочно-кишечный тракт в кровеносное русло и выводится с мочой, т.е. вполне возможно допустить, что криозащитное действие ПЭО на организменном уровне объясняется его осмотической активностью. Однако для дальнейшего изучения механизма защитного действия ПЭО при холодовой травме теплокровного организма нужно выяснить кинетику выведения ПЭО из организма при пероральном введении. Следует иметь в виду, что коррекция полиэтиленоксидом гемореологических нарушений и микроциркуляции крови при остром общем охлаждении может быть, помимо указанных процессов, обусловлена способностью полиэтиленоксидов взаимодействовать с белками плазмы и белок-липидными комплексами мембран эритроцитов. Не исключено, что через систему центральных регуляторных механизмов ПЭО могут также влиять на указанные параметры, что требует всестороннего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бездетко П. А. Влияние полиэтиленоксида на внутриглазное давление: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 1982.— С. 12.
2. Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология.— Киев: Наук. думка, 1994.— 431 с.
3. Зинченко В. Д., Манк В. В., Моисеев В. А. и др. Исследование водных смесей полиэтиленгликолей методом ЯМР // Коллоид. журн.— 1977.— 38, № 2.— С. 30–35.
4. Мазалов В. К., Гучок В. М., Луговой В. И. Противоотечные свойства криополиэтиленоксида // Тез. докл. I Нац. съезда фармакологов Украины.— Полтава, 1995.— С. 46.
5. Луговой В. И., Липина О. В., Мазалов В. К., Слета И. В. Влияние полиэтиленоксидов на реологические свойства белых крыс при охлаждении // Криобиология.— 1995.— № 3.— С. 32–38.
6. Чеканова В. В. Синтез, токсичность и криопротекторная активность оксиэтилированных амидов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1995.— С. 17.

Поступила 03.06.98



Хроматограмма мочи крыс при пероральном введении раствора: а — ПЭО-400; б — ПЭО-1500; 1 — контрольный образец мочи, в котором растворен ПЭО в 1%-й концентрации; 2 — моча крыс, которым вводили раствор ПЭО; 3 — моча крыс, которым перорально вводили воду; 4 — 1%-й водный раствор ПЭО

Chromatogram of rats' urine at peroral introduction of the solution: а — PEO-400; б — PEO-1500; 1 — a control sample of urine, where PEO in 1% concentration is dissolved; 2 — urine of rats, to whom PEO solution was introduced; 3 — urine of rats with perorally introduced water; 4 — 1% PEO aqueous solution

is not unambiguously elucidated [1]. The aim of the work was to experimentally obtain the proofs of polyethylene oxide permeability into animals' blood at their application *per os*. One has revealed by means of the method of thin-layer chromatography [6], that there is polyethylene oxide in rats' urine, to whom aqueous solutions of PEO-400 and PEO-1500 were introduced (Fig.).

Thus, it has been established, that polyethylene oxide penetrates through a gastroenteric tract into blood channel and is removed with urine, i.e. it is quite possible to admit, that the PEO cryoprotective effect at an organism level is explained by its osmotical activity. But it is necessary to elu-

citate the kinetics of PEO removal from an organism during peroral introduction for further study of the mechanism of PEO protective effect at homoiothermal organism cold injury. It should be considered, that correction of homorheological disorders and blood microcirculation by polyethylene oxide at an acute general cooling may be, besides the mentioned above processes, stipulated by the capacity of polyethylene oxides to interact with plasm proteins and protein-lipid complexes of erythrocyte membrane. It is not excluded, that PEO may also affect the indicated parameters through the system of central regulatory mechanisms, that requires a detailed study.

## REFERENCES

1. Bezdetko P.A. The effect of polyethylene oxide on an intraocular pressure: Abstr. Thesis... Cand. Med. Sci.— Kharkov, 1982.— P. 12.
2. Belous A. M., Grischenko V.I. Cryobiology.— Kiev: Nauk. dumka, 1994.— 431 p.
3. Zinchenko V.D., Mank V.V., Moiseyev V.A. et al. Study of aqueous mixtures of polyethylene glycols by means of NMR method // Colloid. jour.— 1977.— 38, № 2.— P. 30–35 (in Russian).
4. Mazalov V.K., Guchok V.M., Lugovoy V.I. Antiedematic properties of cryopolyethylene oxide // Rep. abstr. for I National congress of pharmacologists of the Ukraine.— Poltava, 1995.— P. 46.
5. Lugovoy V.I., Lipina O.V., Mazalov V.K., Sleta I.V. Polyethylene oxide effect on rheological properties of white rats at cooling // Cryobiology.— 1995.— № 3.— P. 32–38.
6. Chekanov V.V. Synthesis, toxicity and cryoprotective activity of oxyethylate damides: Abstr. Thesis... Cand. Biol. Sci.— Kharkov, 1995.— P. 17.

Accepted in 03.06.98



## Влияние низких температур на направленность потока электронов в митохондриях растений

В. В. КРАВЕЦ

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев*

## Effect of Low Temperatures on Electrone Stream Orientation in Mitochondria of Plants

V. S. KRAVETS

*Institute of Physiology of Plants and Genetics  
of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kiev*

Изучали влияние низких температур на поглощение кислорода тканями корней кукурузы, находящихся на различных стадиях развития. Показано, что действие низких температур обуславливает увеличение альтернативного и цитохромного дыхания тканей корней зоны зрелых клеток.

Досліджували вплив низьких температур на поглинання кисню тканинами коренів кукурудзи, що знаходяться на різних етапах розвитку. Показано, що дія низьких температур обумовлює збільшення альтернативного і цитохромного дихання тканин коренів зони дорослих клітин.

The effect of low temperature on oxygen uptake by tissues from different stages of development of maize's roots was studied. It was shown that low temperature caused increasing of alternative and cytochrome respiration of root tissues of mature cells' zone.

Энергетические потребности тканей растений на ранних этапах онтогенеза обеспечиваются митохондриальными системами аккумуляции и трансформации энергии в клетке. Митохондрии клеток растений в отличие от органелл тканей животного происхождения имеют два пути транспорта электронов к кислороду: цитохромный (ЦП) и альтернативный (АП), нечувствительный к цианиду [6]. Альтернативная оксидаза (АОК) дыхательной цепи растений катализирует поглощение кислорода, нечувствительное к цианиду. Она ответвляется от главной цепи на уровне убикинона и обходит пункты сопряжения окисления с фосфорилированием [6]. Функции АОК у растений полностью не выяснены, исключая ее роль в термогенных тканях цветов, где альтернативный путь генерации тепла содействует их опылению [3]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что синтез АОК у растений индуцируется окислительным стрессом [5], а также ингибированием ЦП [3, 6].

Приведены результаты исследований влияния низких температур (НТ) на активность цитохромного и альтернативного путей транспорта электронов клеток растений, находящихся на различных этапах развития.

Объект исследований — клетки корней гибрида кукурузы "Коллективный 100 СВ". Проростки кукурузы выращивали в темноте в течение 3,5 сут при 25 °С, после чего для развития в них адаптационных изменений эксперимент продолжали при температуре 10 °С. Исследовали направленность потока электронов в клетках ткани меристем корней кукурузы разных зон: от кончика корня —

Energetic needs of plant tissues at early stage of ontogenesis are provided by mitochondrial systems of energy accumulation and transformation in a cell. Plant cell mitochondria into the contrast to organelles of tissues of animal origin have two pathways of electrone transport to an oxygen: cytochrome (CP) and alternative (AP), non-sensitive to cyanide [6]. Alternative oxidase (AO) of respiratory chain of plants catalyzes an oxygen uptake, non-sensitive to cyanide. It derives from a main chain at the level of ubiquinone and goes round the sites of conjugation of oxidation with phosphorylation [6]. AO functions in plants have not been completely elucidated, excluding its role in thermogenic tissues of flowers, where an alternative pathway of heat generation contributes to their pollination [3]. Experimental data testify to the fact the AO synthesis in plants is induced by an oxidative stress [5], as well as the CP inhibiting [3, 6].

The results of studies of the effect of low temperatures (LT) on the activity of cytochrome and alternative pathways of electrone transport of plant cells, being at various stage of development, are presented.

Root cells of maize hybrid "Collective 100 SV" was used as an object. Maize seedlings were grown in the darkness during 3.5 days at 25 °C after that for the development of their adaptational changes the experiment was continued at 10 °C. An orientation of electrone stream in tissue cells of maize root meristem of various zones were studied: on the distance of 0–2 mm from the root tip, zone of cell tension — 2–4 mm and zone of mature cell — 10–20 mm. Tissue gas exchange for maize roots were recorded by means of polarographic technique and closed platinum elec-



0–2 мм, зоны растяжения клеток — 2–4 мм и зоны зрелых клеток — 10–20 мм. Газообмен тканей корней кукурузы регистрировали с помощью полярографической техники и закрытого платинового электрода типа Кларка в полярографической ячейке объемом 5,2 мл при температуре 25 °С. Среда инкубации содержала: 20 мМ CaCl<sub>2</sub> и трис-НCl буфер (10 мМ, pH 7,4). Активность ЦП и АП транспорта электронов определяли в присутствии специфических ингибиторов дыхания [3]. Ткани растений перед анализами разрезали лезвием на участки длиной 2–3 мм.

Перед измерениями газообмена исследуемые образцы выдерживали в аэрируемых растворах трис-НCl буфера (контроль) или же в аэрируемых растворах соответствующих ингибиторов в течение 20 мин. В качестве ингибитора ЦП транспорта электронов в митохондриях использовали 5 мМ азид натрия (NaN<sub>3</sub>). Для блокирования АП транспорта электронов в среду инкубации вводили 10 мМ бензгидроксамовой кислоты (БГК) [3].

Активность ЦП митохондрий клеток корней определяли по общепринятой методике [3] как разницу между интенсивностью поглощения кислорода в среде инкубации в присутствии БГК и ингибиторами БГК и NaN<sub>3</sub>. Потенциальную активность АП рассчитывали как разницу в интенсивности дыхания в присутствии NaN<sub>3</sub> и ингибиторов БГК и NaN<sub>3</sub>. Долю активности оксидаз немитохондриального происхождения в суммарном поглощении кислорода определяли как остаточное дыхание после совместного введения в ткани корней кукурузы БГК и NaN<sub>3</sub> (табл. 1). Активность АП рассчитывали по соотношению степени ингибирования дыхания бензгидроксамовой кислотой к степени устойчивости блокирования дыхания в присутствии NaN<sub>3</sub>.

Как свидетельствуют результаты проведенных исследований, в процессе роста клеток корней наблюдается снижение интенсивности их дыхания

trode of Clark type in a polarographic cell of 5.2 ml volume at the temperature of 25 °C. Incubation medium contained: 20 mM CaCl<sub>2</sub> and tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4). The activity of CP and AW electron transport was determined in the presence of specific inhibitors of respiration [3]. Plant tissues before analysis were cut by a blade into pieces of 2–3 mm length.

Before measuring the gas exchange the samples under study were put into aerated solutions of tris-HCl buffer (control) or into aerated solutions of corresponding inhibitors within 20 min. 5 mM sodium azide (NaN<sub>3</sub>) was used as CP inhibitor of electron transport in mitochondria. To block AP transport of electrons 10 mM benzhydroxamic acid (BHA) was introduced into the incubation medium [3].

The activity of CP of root cell mitochondria were defined by common methods [3] as a difference between the intensity of oxygen consumption in the incubation medium in the presence of BHA and inhibitors BHA and NaN<sub>3</sub>. Potential activity of AP was calculated as a difference in respiration intensity in NaN<sub>3</sub> and inhibitors BHA and NaN<sub>3</sub>. The contribution of oxidase activity of non-mitochondrial origin into a total oxygen consumption was determined as a residual respiration after combined introduction of BHA and NaN<sub>3</sub> into maize root tissues (Table 1). AP activity was calculated by the ratio of respiration inhibition extent by BHA to the extent of respiration blocking resistance in NaN<sub>3</sub> presence.

The results of the investigations performed testify that in the process of root cell growth there is a reduction of their respiration intensity (Table 1), that corresponds to the results of studies in barley protoplasts, obtained from segments, located higher and lower in respect of interpolar meristem of barley seedlings. The changes in dark respiration of protoplasts corresponded to those in the activity of metabolism and phase of cell development [4]. LT effect within 24 hrs on maize plants induces a respiration activation

Таблица 1

Влияние холодового шока на дыхание корней кукурузы *Zea mays* L. гибрида "Коллективный 100 СВ", нМ O<sub>2</sub>/(г сух. в-ва·ч)

Effect of cold shock on respiration of maize roots *Zea mays* L. of "Collective 100 SV" hybrid, nm O<sub>2</sub>/(g of dry subst.·h)

| Интенсивность дыхания<br>в разных средах<br>Respiration intensity<br>in various media | Контроль / Control<br>(25 °C)      |             |             | Холод 24 ч / Cold 24 hrs<br>(10 °C) |              |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|-------------|-------------------------------------|--------------|-------------|
|                                                                                       | Участок корня, мм<br>Root site, mm |             |             | Участок корня, мм<br>Root site, mm  |              |             |
|                                                                                       | 0–2                                | 2–4         | 10–20       | 0–2                                 | 2–4          | 10–20       |
| Контроль<br>Control                                                                   | 450,9 ± 6,3                        | 338,8 ± 8,9 | 249,2 ± 2,8 | 451,6 ± 9,1                         | 363,0 ± 10,1 | 343,5 ± 4,9 |
| В среде с NaN <sub>3</sub><br>In the medium with NaN <sub>3</sub>                     | 198,7 ± 4,4                        | 179,3 ± 6,2 | 131,4 ± 7,2 | 197,9 ± 4,1                         | 183,2 ± 3,9  | 167,3 ± 5,8 |
| В среде с БГК<br>In the medium with BHA                                               | 407,4 ± 3,1                        | 299,5 ± 8,9 | 208,3 ± 4,3 | 399,7 ± 4,5                         | 301,3 ± 3,6  | 260,0 ± 6,8 |
| В среде с NaN <sub>3</sub> и БГК<br>In the medium with NaN <sub>3</sub><br>and BHA    | 48,4 ± 4,6                         | 34,9 ± 0,5  | 31,0 ± 12,9 | 40,8 ± 2,7                          | 35,0 ± 4,2   | 29,3 ± 2,3  |



(табл. 1), что согласуется с результатами исследований дыхания протопластов ячменя, полученных из сегментов, расположенных выше и ниже интерполярной меристемы проростков ячменя. Изменения темнового дыхания протопластов соответствовали изменениям в активности метаболизма и фазам развития клеток [4]. Действие НТ в течение суток на растения кукурузы индуцирует активацию дыхания завершивших рост тканей, но активация поглощения кислорода в зоне растяжения клеток при этом была незначительна. НТ не оказывали влияния на интенсивность дыхания клеток меристемы корня (табл. 1, 2).

Результаты исследований свидетельствуют о том, что в митохондриях клеток сформировавшихся тканей НТ индуцируют активацию как ЦП, так и АП транспорта электронов (табл. 3). Выявленные изменения в активности альтернативного дыхания зоны корней 10–20 мм свидетельствуют об участии АОК в перестройке метаболизма в ответ на действие НТ, как это было выявлено у других растений [1, 3]. Активация ЦП в указанных тканях может быть объяснена возросшими энергетическими потребностями клеток в условиях действия НТ. Клетки зоны меристемы наименее чувствительны к действию НТ. Отсутствие изменений активности исследуемых характеристик дыхания клеток меристемы свидетельствует о том, что в период интенсивного деления клеток их метаболизм, в том

of grown tissues, but the activation of oxygen consumption in the cell tension zone was insignificant. LTs did not affect the intensity of cell respiration of root meristem cells (Table 1, 2).

The results of investigations testify to the fact that LT induces the activation of both CP and AP electron transport in mitochondria of formed tissues (Table 3). Revealed changes in the activity of alternative respiration of root zone 10–20 mm testify to the AO participation in metabolism rearrangement in response to LT effect, as it was found in other plants [1, 3]. CP activation in the tissues mentioned can be explained by enhanced energetic needs of cells under LT effect conditions. Cells of meristem zone have the lowest sensitivity to LT effect. The absence of changes in the activity of studied respiration characteristics of meristem cells testifies to that in the period of intensive cell fission, their metabolism, in particular respiratory, is directed to the realization of cell growth

Таблица 2

Действие азиды натрия и бензгидроксамовой кислоты на интенсивность поглощения кислорода тканями корней гибрида кукурузы "Коллективный 100 СВ"

Sodium azide and benzhydroxamic acid effect on the intensity of an oxygen uptake by root tissues of maize hybrid "Collective 100 SV"

| Интенсивность дыхания в разных средах<br>Respiration intensity in various media | Контроль / Control (25 °C)         |       |       | Холод 24 ч / Cold 24 hrs (10 °C)   |       |       |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------|-------|------------------------------------|-------|-------|
|                                                                                 | Участок корня, мм<br>Root site, mm |       |       | Участок корня, мм<br>Root site, mm |       |       |
|                                                                                 | 0–2                                | 2–4   | 10–20 | 0–2                                | 2–4   | 10–20 |
| Контроль<br>Control                                                             | 450,9                              | 338,8 | 249,2 | 451,6                              | 363,0 | 343,5 |
| В среде с NaN <sub>3</sub><br>In the medium with NaN <sub>3</sub>               | 44,1                               | 52,9  | 52,7  | 43,8                               | 50,5  | 48,7  |
| В среде с БГК<br>In the medium with BHA                                         | 9,6                                | 11,6  | 16,4  | 11,5                               | 17,0  | 24,3  |
| В среде с NaN <sub>3</sub> и БГК<br>In the medium with NaN <sub>3</sub> and BHA | 0,22                               | 0,22  | 0,34  | 0,26                               | 0,34  | 0,50  |

Таблица 3

Индукцированные низкой температурой изменения активности цитохромного и альтернативного путей транспорта электронов митохондрий в процессе роста корней гибрида кукурузы "Коллективный 100 СВ", нМ O<sub>2</sub>/(г сух.в-ва·ч)

Low-temperature induced changes in the activity of cytochrome and alternative pathways of ion transport of mitochondria in the process of root growth of the hybrid "Collective 100 SV", nm O<sub>2</sub>/(g of dry subst.·h)

| Параметры энергообмена тканей<br>Parameters of energy exchange of tissues                                      | Контроль / Control (25 °C)         |             |             | Холод 24 ч / Cold 24 hrs (10 °C)   |              |             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|-------------|------------------------------------|--------------|-------------|
|                                                                                                                | Участок корня, мм<br>Root site, mm |             |             | Участок корня, мм<br>Root site, mm |              |             |
|                                                                                                                | 0–2                                | 2–4         | 10–20       | 0–2                                | 2–4          | 10–20       |
| Интенсивность дыхания (контроль)<br>Respiration intensity (control)                                            | 450,9 ± 6,3                        | 338,8 ± 8,9 | 249,2 ± 2,8 | 451,6 ± 9,1                        | 363,0 ± 10,1 | 343,5 ± 4,9 |
| Активность цитохромного пути дыхания<br>Activity of respiration cytochrome pathway                             | 359,0                              | 264,6       | 177,3       | 358,9                              | 266,3        | 230,7       |
| Потенциальная активность альтернативного пути дыхания<br>Potential activity of alternative respiration pathway | 150,3                              | 144,4       | 100,4       | 157,1                              | 148,2        | 138,0       |
| Остаточное дыхание, %<br>Residual respiration, %                                                               | 10,73                              | 10,30       | 12,44       | 9,03                               | 9,64         | 8,53        |



числе дыхательный, направлен на реализацию процессов роста клеток. Например, известно, что на ранних этапах развития ткани не реагируют на тепловой шок новообразованием специфических белков [2].

Проведенные исследования свидетельствуют об активации АП и ЦП транспорта электронов в клетках сформировавшихся тканей. По-видимому, интенсивно растущие клетки корней кукурузы под воздействием холодового шока не изменяют ход генетически детерминированных процессов роста и развития тканей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kravets V.S. The alternative respiration of maize embryo tissues during germination of seeds at low temperatures // *Response of plant metabolism to air pollution and global change* / Ed. by L. J. de Kok and I. Stulen. — Backhuys Publishers. — Leiden, The Netherlands, 1998. — P. 355–358.
2. Krone P.H., Lele Z., Sass J.B. Heat shock genes and the heat shock response in zebrafish embryos // *Biochem. Cell Biol.* — 1997. — 75. — P. 487–497.
3. Lambers H. Respiration in intact plants and tissues: its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organism // *Encyclopedia of Plant Physiology.* — New series, 1985. — V. 18. — P. 418–473.
4. Owen J., Laybourn-Parry J.E.M., Wellburn A.R. Leaf respiration during early plastidogenesis in light-grown barley seedlings // *Physiol. Plantarum.* — 1986. — 68. — P. 100–106.
5. Purvis A.C., Shewfelt R.L. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? // *Physiol. Plantarum.* — 1993. — 88. — P. 712–718.
6. Wagner A.M., Krab K. The alternative respiration in plants: role and regulation // *Physiol. Plantarum.* — 1995. — 95. — P. 318–325.

Поступила 09.02.99

processes. For example, it is known that at early stages of development tissues do not response to a heat shock by a new formation of specific proteins [2].

The investigations conducted testify to the activation of AP and CP electrone transport in the cells of formed tissues. Perhaps, intensively growing cells of maize roots under the effect of cold shock do not change the course of genetically determinated processes of growth and development of tissues.

## REFERENCES

1. Kravets V.S. The alternative respiration of maize embryo tissues during germination of seeds at low temperatures // *Response of plant metabolism to air pollution and global change* / Ed. by L. J. de Kok and I. Stulen. — Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, 1998. — P. 355–358.
2. Krone P.H., Lele Z., Sass J.B. Heat shock genes and the heat shock response in zebrafish embryos // *Biochem. Cell Biol.* — 1997. — 75. — P. 487–497.
3. Lambers H. Respiration in intact plants and tissues: its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organism // *Encyclopedia of Plant Physiology.* — New series 1985. — V. 18. — P. 418–473.
4. Owen J., Laybourn-Parry J.E.M., Wellburn A.R. Leaf respiration during early plastidogenesis in light-grown barley seedlings // *Physiol. Plantarum.* — 1986. — 68. — P. 100–106.
5. Purvis A.C., Shewfelt R.L. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? // *Physiol. Plantarum.* — 1993. — 88. — P. 712–718.
6. Wagner A.M., Krab K. The alternative respiration in plants: role and regulation // *Physiol. Plantarum.* — 1995. — 95. — P. 318–325.

Accepted in 09.02.99



# Представители семейства белков холодового шока и их функции

Ю. Е. МИКУЛИНСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Members of Cold Shock Proteins' Family and their Functions

Yu. E. MIKULINSKY

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

Описывается недавно открытая группа белков холодового шока. Охарактеризованы представители семейства этой группы и осуществляемые ими функции.

Описується нещодавно відкрита група білків холодового шоку. Охарактеризовані представники родини цієї групи та функції, які вони виконують.

Recently found group of cold shock proteins is described in this work. The members of this family group and their functions, are characterized here.

В последнее время опубликовано большое количество работ по изучению белков, синтезирующихся в клетке после действия холодового шока. Одно из сообщений даже носит нетипичное для научной литературы название: "Ответ на холодовой шок — горячая тема" [13]. Значительная часть исследователей изучает белки холодового шока (БХШ) бактерий. Холодовой стресс вызывает в микроорганизмах синтез нескольких белков, которые вовлечены в такие клеточные процессы, как транскрипция, трансляция, рекомбинация. Так, снижение температуры выращивания *Escherichia coli* с 37 до 15 °C ведет к резкому, по некоторым данным, 300-кратному повышению количества CspA — главного белка холодового шока этой бактерии [9]. *E. coli* обладает целым семейством гомологичных малых кислых белков. Помимо упомянутого белка, это CspB и CsdA (идентичность более 70%, молекулярная масса 7,4 кД) [6]. Аналогичное семейство белков холодового шока обнаружено у *Bacillus subtilis* [10]. Это белки CspB (маленький белок, состоящий из 67 аминокислотных остатков), CspC и CspD, которые постоянно индуцируются в ответ на холодовой шок. Berger F. и соавт. [2] клонировали и секвенировали ген cspA, гомологичный cspA *E. coli*. Этот ген кодирует белок CapA, который играет решающую роль в адаптивном ответе нейротропной бактерии *Arthrobacter globiformis* SI55 на холодовой шок. Увеличение синтеза специальных белков после холодового шока описывается и в других работах. Например, в [1] сообщается об изучении белков холодового шока *Listeria monocytogenes*, пищевого патогена, способного расти при 5 °C. Исследовано три штамма этого микроорганизма и обнаружено по меньшей мере двенадцать белков холодового шока (Csps) с молекулярными массами 48,6, 41,0, 21,8,

Many works concerning the study of proteins, synthesizing in a cell after the effect of cold shock have been recently published. One of such reports has the title, not typical to scientific literature: "The cold shock response is a hot topic" [13]. Many investigators study the cold shock proteins (CSP) of bacteria. Cold shock provokes in microorganisms a synthesis of some proteins involved in such cellular proteins as a transcription, transmitting and recombination. Thus, the decrease of growing temperature of *Escherichia coli* from 37 down to 15 °C leads, according to some data, to a sharp (by 300 times) increase of CspA content — the main cold shock protein of this bacterium [9]. *E. coli* has a family of small homologous acid proteins. Besides the protein, mentioned above, these proteins are CspB and CsdA (identity more than 70%, molecular mass is 7.4 kD) [6]. An analogous family of cold shock proteins was revealed in *Bacillus subtilis* [10]. These proteins are CspB (small protein, consisting of 67 amino acid rests), CspC and CspD, always inducing on a cold shock response. Berger F. et al. [2] cloned and sequenced the capA gene, homologous to cspA *E. coli*. This gene encodes the CapA protein that plays a main role in an adaptive response of the neurotropic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55 on a cold shock. An increase of a special protein synthesis after the cold shock is described in another works. For example, in [1] is reported about the study of cold shock protein *Listeria monocytogenes*, a food pathogenic organism, able to grow under the temperature of 5 °C. Three strains of this microorganism have been investigated and 12 cold shock proteins have been revealed (Csps) with the molecular mass of 48.6, 41.0, 21.8, 21.1, 19.7, 19.2, 18.8, 17.2, 15.5, 14.5 and 14.4 kD, induced during a decrease of the temperature from 37 down to 5 °C, that was shown by means of



21,1, 19,7, 19,2, 18,8, 17,2, 15,5, 14,5 и 14,4 кД, которые индуцировались при понижении температуры с 37 до 5 °С, что было показано с помощью включения меченого <sup>35</sup>SL-метионина и последующего двумерного геля-электрофореза.

Исследователи [19] сообщают о наличии около 14 белков холодового шока *Escherichia coli* и о том, что уровень синтеза основного белка холодового шока CspA этой бактерии составляет при пониженной температуре 13% общего синтеза белков клетки [15].

Перечень подобных работ можно продолжать [3, 8, 11], но достаточно будет упомянуть работу Фрэнсиса и Стюарта [7]. Как известно, обнаружение бактерий с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) — хорошо разработанный диагностический метод. Однако обычная ПЦР требует использования олигомерных ДНК-праймеров, которые специфичны для искомого организма, и, как следствие, образцы могут быть изучены только на присутствие одной специфической мишени. Существенным преимуществом было бы исследование образцов на присутствие любых бактерий, с последующей идентификацией. Чтобы достичь этого, необходимо идентифицировать последовательность ДНК, общую для всех бактерий. Авторы показали, что ею может быть последовательность, которая кодирует главные белки холодового шока. Используя два универсальных праймера из консервативных областей этих генных последовательностей, они амплифицировали 200-нуклеотидную парную ДНК-последовательность из более 30 различных Грам-положительных и отрицательных бактерий родов *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Yersinia*. Нуклеотидный анализ амплифицированных продуктов подтвердил высокий уровень гомологии ДНК.

Nishiyama H. и соавт. [16] информируют о том, что мягкий холодовой стресс (32 °С) активирует в клетках грызунов синтез индуцированного холодом РНК-связывающего белка (CIRP). Авторы отмечают клонирование кДНК, кодирующей протеин 18 кДа с 95,3%-й идентичностью аминокислотной последовательности с мышинным CIRP. Человеческий ген CIRP был картирован к хромосомному локусу 19p13.3 с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации. Матричная РНК CIRP экспрессировалась во всех изученных линиях, включая K562, HepG2, NC65, HeLa, T24 и NEC8. В них уровни мРНК CIRP и белка поднимались в течение 12 ч после понижения температуры с 37 до 32 °С. Эти результаты свидетельствуют, что CIRP является белком холодового шока в клетках человека. Идентификация CIRP может дать ключ к регуляторным механизмам холодового ответа в человеческих клетках. Эти же авторы [5] сообщают об открытии

the inclusion of labelled <sup>35</sup>SL-metionin and further two-dimensional gel-electrophoresis.

The researchers [19] report on the presence of about 14 *Escherichia coli* cold shock proteins, that the level of the synthesis of main CspA cold shock protein of this bacterium is 13% of general cellular protein synthesis at a decreased temperature [15]. The list of such works could be continued [3, 8, 11], but it is necessary to mention the work of Francis and Stewart [7]. As it is known, the bacterium revealing by means of polymerase chain reaction (PCR) is well-elaborated diagnostic method. But a common PCR demands the usage of oligomer DNA primers, that are specific to an organism under search, and, as a result, samples could be studied only by the presence of one specific target. The study of samples on the presence of different bacteria with their further identification would be an important advantage. To result this, it is necessary to identify DNA sequence, common to all bacteria. The authors demonstrated that it will be a sequence, encodes the main cold shock proteins. Using two universal primers of conservative fields of these gene sequences, the authors amplified 200-nucleotide pair DNA-sequence of more than 30 different Gram-positive and negative bacteria of *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Yersinia*. A nucleotide analysis of amplified products confirmed a high level of DNA homology.

Nishiyama H. et al. [16] inform us, that a mild cold stress (32 °C) activates in rodent's cells a synthesis of cold-inducible RNA binding protein (CIRP). Authors observe the DNA cell cloning, encoding protein 18 kDa with the identity of 95.3% of amino acid sequence with murine Cirp. A human CIRP gene was mapped on chromosome locus 19p13.3 by means of fluorescent *in situ* hybridization. Matrix RNA CIRP was expressed in all studied bands, including K562, HepG2, NC65, HeLa, T24 and NEC8. The level of matrix RNA CIRP and protein increased during 12 hrs after the temperature decrease from 37 down to 32 °C. These results testify to, that CIRP is a cold shock protein in human cells. CIRP identification may open the regulatory mechanisms of cold response in human cells. These authors [5] report concerning the discovery of the second member of the glycine-rich RNA-binding protein family in human proteins — RBM3, being synthesized at a same temperature decrease and in the same cellular bands, but distinguishing on CIRP.

Concerning the question about the stress-proteins of more complicated organized systems, the work of Canadian scientists [4] should be noted. A comparison of heat and cold protein spectra in *Rhizobium* algae allowed them to conclude that the types of this algae family might synthesized proteins under the temperatures, not optimal for a growth. Three main highly



второго члена семейства глицин-богатых РНК-связывающих белков человека — RBM3, синтезирующегося при том же снижении температуры и в тех же линиях клеток, однако отличающегося от CIRP.

Касаясь вопроса о стресс-белках более сложно организованных систем, назовем работу канадских исследователей [4]. Сравнение спектра белков теплового и холодового шока у водорослей *Rhizobium* позволило им сделать вывод о том, что виды этого рода водоросли могут синтезировать белки при неоптимальных для роста температурах. Выявлено три основных высокомолекулярных белка теплового шока (106,9, 83,1, 59,5 kD). Холодовой шок (–2, –5 и –10 °C) вызывал индукцию пяти белков холодового шока (52,0, 38,0, 23,4, 22,7 и 11,1 kDa).

Storey K. B. и соавт. [17] изучили синтез белков после замораживания (12 ч при –1,4 °C), дегидратации (потеря 27 или 40% общей воды тела) или регидратации (после потери 40% воды тела) в тканях лесной лягушки (*Rana sylvatica*) после интраперитонеальной инъекции <sup>35</sup>S-меченого метионина плюс цистеин. Все изученные органы после замораживания и у регидратированных особей, содержащихся при 3–5 °C, показали линейное повышение включения аминокислот во фракцию кислото-преципитируемого белка. Вновь синтезированный белок имел изоэлектрическую точку 6,0, меченые белки в этой точке концентрировались через 5, 10 и 24 ч после введения метки. SDS-PAGE анализ пика 6,0 размороженных, дегидратированных и регидратированных лягушек выявил присутствие одного главного низкомолекулярного белка с молекулярной массой 15, 13 и 21 kD соответственно. Авторы делают вывод, что эти белки могут являться БХШ либо играть специфическую роль в адаптации метаболизма.

Основная функция описываемых белков заключается в преходящем ингибировании синтеза белков в клетке во время первых стадий ответа на холодовой шок. Так, в [17] сообщается, что CIRP состоит из N-терминальной РНК-связывающей области и C-терминального глицин-богатого домена и играет существенную роль в индуцированной холодом супрессии клеточной пролиферации. Интересные результаты получены Jiang W., Hou Y., Inouye M. [12]. По их сообщению, количество CspA, главного белка холодового шока *Escherichia coli*, резко повышается во время ответа на холодовой шок. Они показывают, что CspA связывается с РНК как шаперон. CspA связывается с денатурированной теплом однонитчатой РНК, если она больше 74 оснований, вызывая значительное смещение при гель-электрофорезе. Минимальная концентрация CspA  $2,7 \cdot 10^{-5}$  М абсолютно необходима для этого связывания и она существенно ниже, чем расчетная клеточная концентрация CspA ( $10^{-4}$  М) в клетках, подвергшихся холодовому шоку. Никаких специфических последовательностей РНК для связывания CspA не обнаружено, что свидетельствует

молекуляр cold shock proteins (106.9, 83.1, 59.5 kD) have been revealed. Cold shock (–2, –5, and –10 °C) provoked the induction of 5 cold shock proteins (52.0, 38.0, 23.4, 22.7 and 11.1 kDa).

Storey K.B. et al. [17] studied the protein synthesis after the freezing (12 hrs under the temperature of –1.4 °C), dehydration (the loss of 27 or 40% of total water in organism) or rehydration (after the loss of 40% of total water in an organism) in the wood frog tissues (*Rana sylvatica*) after the intraperitoneal injection of <sup>35</sup>S-labeled methionin and cystein. All studied organs after freezing and in rehydrated individuals, stored at 3–5 °C, demonstrated a linear increase of amino acid connection into the fraction of acid-precipitated protein. Again synthesized protein has isoelectric point 6.0, labelled proteins in this point were concentrated in 5, 10 and 24 hrs after the label introduction. SDS-PAGE analysis of the 6.0 peak in thawed, dehydrated and rehydrated frogs revealed the presence of one main low-molecular protein with the molecular mass of 15, 13 and 21 kDa correspondingly. Authors concluded, that these proteins might be the PCS or play a specific role in a metabolism adaptation.

The main function of described proteins is a transient inhibiting of protein synthesis in a cell at the first stages of a response on a cold shock. Thus, in [17] it is reported that CIRP consist of N-terminal RNA-binding zone and C-terminal glycine-rich domen and has a great role in the supression of the cellular proliferation, induced by cold. Interesting results were obtained by Jiang W., Hou Y., Inouye M. [12]. They reported that the number of Cspa, the main cold shock protein of *Escherichia coli*, sharply increases during the response on a cold shock. They demonstrate that CspA binds with RNA as a chaperon. CspA is binded with one thread RNA, denaturated by heat, if it is bigger than 74 bases, provoking a considerable removal during gel-electrophoresis. Minimum CspA concentration  $2.7 \cdot 10^{-5}$  M is necessary for this binding, and it considerably lower, than calculated cellular CspA concentration ( $10^{-4}$  M) in cells subjected to cold shock. Specific RNA sequences for binding were not revealed, that testify to, that it has a wide sequence specificity for its binding. When 142-nucleotide 5'-not transmitting mRNA zone CspA was used as a substrate for A and T1 ribonucleases, CspA addition considerably stimulate the Rna hydrolysis by means of the prevention of formation (due to a stabile secondary structure of 5'-not transmitting zone), stable to RNA-ase bands. These results testify to, that CspA binding with RNA destabilize its secondary structures and makes them sensitive to ribonucleases. Authors suppose that CspA functions as RNA chaperon to prevent the formation of secondary structures in RNA molecules under a low temperature. This function may be decisive for a productive RNA transmitting at a low temperature and may also function at a transcription.



о том, что он имеет широкую специфичность последовательностей для своего связывания. Когда 142-нуклеотидная 5'-нетранслируемая область мРНК *cspA* была использована как субстрат для рибонуклеаз А и Т1, добавление CspA существенно стимулировало гидролиз РНК посредством предотвращения формирования (благодаря стабильной вторичной структуре 5'-нетранслируемой области) устойчивых к РНК-азе участков. Эти результаты свидетельствуют, что связывание CspA с РНК дестабилизирует ее вторичные структуры и делает их чувствительными для рибонуклеаз. Авторы предполагают, что CspA функционирует как шаперон РНК для предотвращения формирования вторичных структур в молекулах РНК при низкой температуре. Эта функция может быть решающей для производительной трансляции мРНК при низкой температуре, а также действовать при транскрипции.

Для уточнения интимных механизмов функционирования гена *cspA* проведена работа по молекулярному моделированию [18]. В качестве модельной системы для сравнения продуктивности IPTG *tac*-промотора и промотора холодошокового белка CspA при экспрессии рекомбинантных белков в выращиваемой при пониженной температуре *Escherichia coli* был избран склонный к образованию агрегатов белок слияния пре-S2-S'-бета-галактозидазы. При 37 °C белок слияния продуцировался в большом количестве с *tac*-промотором, но агрегировался в биологически неактивной форме. В противоположность этому при данной температуре с *cspA* промотором синтезировалось меньше такого белка. Максимальный выход фермента наблюдался при уменьшении температуры с 37 до 30 °C для *tac*-промотора и до 25 °C для *cspA* промотора. При 37 °C оба промотора производили идентичный по характеристикам фермент в течение 2 ч после индукции. Затем *cspA* промотор становился репрессированным, а *tac* система продолжала синтез белка. При последующем снижении температуры до 10 °C *tac* система была полностью ингибирована, в то время как *cspA* промотор управлял синтезом белка еще более 2 ч, хотя уровень ферментативной активности продукта был примерно в 3 раза ниже по сравнению с полученным при 25 °C. Суперэкспрессия нативного CspA не оказывала влияния на накопление активной пре-S2-S'-бета-галактозидазы. Следовательно, касаясь вопроса регуляции белков холодового шока, отметим, что CspA не является, по-видимому, собственным положительным индуктором. Важным для понимания функционирования БХШ представляются данные немецких ученых, свидетельствующие о том, что белки холодового шока необходимы для клеточного роста и синтеза белка не только при низких, но и при оптимальных температурах [10]. Авторы отметили, что делеции по *cspC* или *cspD* генам не отражаются заметно на фенотипе; в противоположность этому двойные мутанты *csp* показывают сильную редукцию кле-

To elaborate the intimate mechanisms of gene CspA functioning the work on a molecular modelling was conducted [18]. As a model system to compare the productivity of IPTG *tac*-promoter and cold shock promoter of CspA protein during the expression of recombinant proteins in growing at a low temperature *Escherichia coli*, was the protein of pre-S2-S'- $\beta$ -galactozidaze junction, able to an aggregate formation. Under the temperature of 37 °C the junction protein was produced in a great extent with *tac*-promoter, but was aggregated in biologically not active shape. In contrast to it at this temperature with CspA promoter it was synthesized a protein number. A maximum enzyme yield was observed at a temperature decrease from 37 down to 30 °C for *tac*-promoter and down to 25 °C for the CspA promoter. At the temperature of 37 °C both promoters produced enzyme, equal by characteristics during 2 hrs after the induction. Then CspA promoter became repressed, but the *tac*-system continues a protein synthesis. At a further temperature decrease down to 10 °C *tac*-system was completely inhibited, but CspA promoter directs the protein synthesis during more than 2 hrs, though the level of a fermentative activity of a product was approximately in three times lower in comparison with obtained at 25 °C. Superexpression of the native CspA does not affect the accumulation of a native pre-S2-S'- $\beta$ -galactozidaze. So, concerning to cold shock protein regulation, it must be noted that CspA, apparently, is not an own positive inductor. The data of German scientists, testifying, that cold shock proteins are necessary for the cellular growth and protein synthesis not only under low temperatures, but also at optimal ones, are very important to understand CSP functioning [10]. The authors noted, that the deletions on CspA or CspD genes does not reflected on a phenotype; in contrast to it, double *csp* mutants demonstrate a great reduction of a cellular growth at 15 and 37 °C, including a decrease of survival during a stationary phase. Two-dimentional gel-analysis showed, that in double *spa* mutants the protein synthesis is unregulated and an insufficiency of one or two CSP results in an increase of remained Csp synthesis at 37 °C and after a cold shock, testifying that CSP negatively regulate the production of the members of this protein family. A triple *cspB/C/D* mutant (64BCD<sub>bt</sub>) may be produced only at the presence of *cspB* upon the plasmide, being not loosen, in spite of the antibiotic insufficiency, testify to, that some *spa* gene minimum is necessary to *B. Subtilis* survival. After a cold shock, the CspB synthesis in 64BCD<sub>bt</sub> was considerably lower, than in cells of a wild type, that was accompanied by a growth stop and a sharp reduction of the main protein synthesis. If it was shown that CspB/C/D could bind RNA jointly and individually, it is supposed that CSP functions as RNA chaperons, helping to transmitting initiation at optimal and low temperatures.



точного роста как при 15, так и при 37 °C, включая ухудшение выживания во время стационарной фазы. Двумерный гель-анализ показал, что в двойных мутантах *csp* синтез белков разрегулирован и недостаток одного или двух БХШ приводит к возрастанию синтеза оставшихся CSP при 37 °C и после холодового шока, свидетельствуя, что БХШ отрицательно регулируют продукцию членов этого белкового семейства. Тройной мутант *cspB/C/D* (64BCD<sub>bt</sub>) мог воспроизводиться только в присутствии *cspB* через плазмиду, которая не была потеряна, несмотря на недостаток антибиотиков, свидетельствуя, что некий минимум *csp* гена необходим для выживания *B. subtilis*. После холодового шока синтез CspB в 64BCD<sub>bt</sub> был значительно ниже, чем у клеток дикого типа, что сопровождалось остановкой роста и резкой редукцией синтеза основных белков. Поскольку показано, что CspB, CspC и CspD могут связывать РНК как совместно, так и индивидуально, предполагается, что БХШ функционируют как шапероны РНК, содействуя инициации трансляции при оптимальной и низкой температурах.

Результатом функционирования белков холодового шока является повышенная выживаемость микроорганизмов. Как известно, *S. enteritidis* — главный пищевой микробный патоген, который может расти и выживать при низких температурах в течение значительного времени. Была обнаружена повышенная выживаемость замороженной культуры сальмонеллы после предварительной обработки при 10 °C. Вестерн блот с антителами к *Escherichia coli* CspA и анализ радиоактивно меченых белков культур сальмонелл после холодового шока при 10 и 5 °C показали увеличение экспрессии 7,4 кДа основного белка холодового шока (CS 7,4), схожего по размеру с аналогичным белком, типичным для *E. coli* [11]. О подобных результатах сообщают исследователи из Австралии [14]. После 2-часового выдерживания при 10 °C процент клеток, выживших при последующем замораживании до -20 °C на 24 ч, значительно возрос — для штаммов *Lactococcus lactis* на 25–37% и *Pediococcus pentosaceus* PO2 — на 18%. После холодового шока в течение 5 ч выживаемость увеличилась и для *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, ранее не отвечающих на холодовой шок, и штаммов *Lactobacillus helveticus* LB1 и *Streptococcus thermophilus* TS2.

Таким образом, на основании литературных данных показано, что под влиянием холодовых факторов в клетках про- и эукариотов появляется индукция специфических стресс-белков, которые могут быть охарактеризованы как белки холодового шока.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bayles D.O., Annous B.A., Wilkinson B.J. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures // *Appl. Environ. Microbiol.*— 1996.— 62, № 3.— P. 1116–1119.

The result of CSP functioning is an increased microorganism survival. As it is known, *S. Enteritidis*, that is a main food pathogenic microorganism, able to grow and survive at low temperatures during a long time. An increased survival of a frozen salmonella culture after the preliminary treatment at 10 °C has been revealed. The Western blot with the antibodies to *E. coli* CspA and the analysis of radioactively labelled proteins of salmonella cultures after a cold shock at 10 and 5 °C demonstrated an increase of the 7.4 kDa expression of the main CSP (CS 7.4), similar on a size with the analogous protein, typical to *E. coli* [11]. The Australian researchers report about the similar results [14]. After 2 hrs storage at 10 °C the percentage of a survived cells at the further freezing down to -20 °C during 24 hrs, considerably increased — for *Lactococcus lactis* cultures by 25–37% and *Pediococcus pentosaceus* PO2 — by 18%. After the cold shock during 5 hrs, survival increased in *Lactococcus lactis* subsp. *Cremolis*, *Lactobacillus helveticus* LB1 and *Streptococcus thermophilus* TS2, did not response earlier on a cold shock.

Thus, on the base of the literature data it has been shown that under the effect of cold factors in the cells of pro- and eukariots the induction of specific stress-proteins may be characterized as cold shock proteins, appears.

## REFERENCES

1. Bayles D.O., Annous B.A., Wilkinson B.J. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures // *Appl. Environ. Microbiol.*— 1996.— 62, № 3.— P. 1116–1119.
2. Berger F., Normand P., Potier P. CapA, a *cspA*-like gene that encodes a cold acclimation protein in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55 // *J. Bacteriol.*— 1997.— 179, № 18.— P. 5670–5676.
3. Chapot-Chartier M.P., Schouler C., Lepeuple A.S. et al. Characterization of *cspB*, a cold-shock-inducible gene from *Lactococcus lactis*, and evidence for a family of genes homologous to the *Escherichia coli* *cspA* major cold shock gene // *J. Bacteriol.*— 1997.— 179, № 17.— P. 5589–5593.
4. Cloutier J., Prevost D., Nadeau P., Antoun H. Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia // *Appl. Environ. Microbiol.*— 1992.— 58, № 9.— P. 2846–2853.
5. Danno S., Nishiyama H., Higashitsuji H. et al. Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*— 1997.— 236, № 3.— P. 804–807.
6. Fang L., Hou Y., Inouye M. Role of the cold-box region in the 5' untranslated region of the *cspA* mRNA in its transient expression at low temperature in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.*— 1998.— 180, № 1.— P. 90–95.
7. Francis K.P., Stewart G.S. Detection and speciation of bacteria through PCR using universal major cold-shock protein primer oligomers // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*— 1997.— 19, № 4.— P. 286–293.
8. Franco G.R., Garratt R.C., Tanaka M. et al. Characterization of a *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of the Y-box binding protein. // *Gene.*— 1997.— 198, № 1–2.— P. 5–16.
9. Goldenberg D., Azar I., Oppenheim A.B. et al. Role of *Escherichia coli* *cspA* promoter sequences and adaptation



2. Berger F., Normand P., Potier P. CapA, a cspA-like gene that encodes a cold acclimation protein in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55 // J. Bacteriol.— 1997.— 179, № 18.— P. 5670–5676.
3. Chapot-Chartier M.P., Schouler C., Lepeuple A.S. et al. Characterization of cspB, a cold-shock-inducible gene from *Lactococcus lactis*, and evidence for a family of genes homologous to the *Escherichia coli* cspA major cold shock gene // J. Bacteriol.— 1997.— 179, № 17.— P. 5589–5593.
4. Cloutier J., Prevost D., Nadeau P., Antoun H. Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia // Appl. Environ. Microbiol.— 1992.— 58, № 9.— P. 2846–2853.
5. Danno S., Nishiyama H., Higashitsuji H. et al. Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1997.— 236, № 3.— P. 804–807.
6. Fang L., Hou Y., Inouye M. Role of the cold-box region in the 5' untranslated region of the cspA mRNA in its transient expression at low temperature in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.— 1998.— 180, № 1.— P. 90–95.
7. Francis K.P., Stewart G.S. Detection and speciation of bacteria through PCR using universal major cold-shock protein primer oligomers // J. Ind. Microbiol. Biotechnol.— 1997.— 19, № 4.— P. 286–293.
8. Franco G.R., Garratt R.C., Tanaka M. et al. Characterization of a *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of the Y-box binding protein // Gene.— 1997.— 198, № 1–2.— P. 5–16.
9. Goldenberg D., Azar I., Oppenheim A.B. et al. Role of *Escherichia coli* cspA promoter sequences and adaptation of translational apparatus in the cold shock response // Mol. Gen. Genet.— 1997.— 256, № 3.— P. 282–290.
10. Graumann P., Wendrich T.M., Weber M.H. et al. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures // Mol. Microbiol.— 1997.— 25, № 4.— P. 741–756.
11. Jeffreys A.G., Hak K.M., Steffan R.J. et al. Growth, survival and characterization of cspA in salmonella enteritidis following cold shock // Cur. Microbiol.— 1998.— 36, № 1.— P. 29–35.
12. Jiang W., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone // J. Biol. Chem.— 1997.— 272, № 1.— P. 196–202.
13. Jones P.G., Inouye M. The cold-shock response—a hot topic // Mol. Microbiol.— 1994.— 11, № 5.— P. 811–818.
14. Kim W.S., Dunn N.W. Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance // Cur. Microbiol.— 1997.— 35, № 1.— P. 59–63.
15. Lee S.J., Xie A., Jiang W. et al. Family of the major cold-shock protein, CspA (CS7.4), of *Escherichia coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins // Mol. Microbiol.— 1994.— 11, № 5.— P. 833–839.
16. Nishiyama H., Higashitsuji H., Yokoi H. et al. Cloning and characterization of human CIRP (cold-inducible RNA-binding protein) cDNA and chromosomal assignment of the gene // Gene.— 1997.— 204, № 1–2.— P. 115–120.
17. Storey K.B., Storey J.M., Chruchill T.A. De novo protein biosynthesis responses to water stresses in wood frogs: freeze-thaw and dehydration-rehydration // Cryobiology.— 1997.— 34, № 3.— P. 200–213.
18. Vasina J.A., Baneyx F. Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems // Protein Expr. Purif.— 1997.— 9, № 2.— P. 211–218.
19. Wolffe A.P. The cold-shock response in bacteria // Sci. Prog.— 1995.— 78, № 4.— P. 301–310.

Accepted in 09.06.98

Поступила 09.06.98



# Функционирование анионного канала эритроцитов в условиях модификации и гипертонического воздействия

В. В. РАМАЗАНОВ, Э. С. МЕЛЬНИК, В. А. БОНДАРЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## The Erythrocyte Anion Channel Functioning Under the Modification and Hypertonic Effect Conditions

V. V. RAMAZANOV, E. S. MEL'NIK, V. A. BONDARENKO

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

Методом рН-метрии оценивали транспорт различных видов анионов в эритроцитах человека. Обработка клеток гемом приводит к большему блокированию транспорта галогенидных анионов по сравнению с оксианионами в присутствии ДИДС (4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфонат). При гипертоническом воздействии выявляется дополнительная модификация анион-транспортной системы эритроцитов, которая в большей степени выражена при транспорте нитрата.

Методом рН-метрії оцінювали транспорт різних аніонів в еритроцитах людини. Обробка клітин геміном призводить до більшого блокування транспорту галогенідних аніонів у порівнянні з оксианіонами в присутності ДІДС (4,4'-діізотіоціаностильбен-2,2'-дисульфонат). При гіпертонічному впливі виявляється додаткова модифікація аніон-транспортної системи еритроцитів, яка в значній мірі має місце при транспорті нітрату.

The transport of various kinds of anions in human erythrocytes was estimated by means of the pH-metry method. The cell treatment by hemin results in the greater blocking of the halogenide anions transport in comparison with oxianions in the DIDS presence (4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid Disodium salt). During hypertonic effect an additional modification of the erythrocyte anion-transport system, that is in a greater extent manifested during the nitrate transport, is revealed.

При гипертоническом воздействии потеря катионов  $K^+$  клетками, а также холодовой шок эритроцитов значительно блокируются ингибитором анионного транспорта ДИДС [1]. Это указывает на то, что перераспределение катионов между клеткой и средой контролируется движением анионов через мембрану. Факт влияния различных классов анионов на транспорт катионов и органических субстратов описан в литературе. Например, скорость  $Na^+$ -зависимого транспорта аминокислот в эритроцитах определяется видом аниона в среде инкубации и коррелирует со скоростью их переноса [2]. Скорость транспорта зависит не только от заряда, но и от структуры аниона, которая определяет энергию активации процесса переноса. При этом происходит структурная переориентация в мембране гидрофобных сегментов анионного канала [5]. Очевидно, транспорт различных анионов будет по-разному изменяться при гипертоническом воздействии и модификации анионного канала. Чтобы выявить, как модификация анионного канала эритроцитов повлияет на транспорт различных субстратов, использовали два класса анионов: галогениды ( $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ) и оксианионы ( $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ).

В работе использовали эритроциты донорской крови, отмытые раствором, содержащим 150 ммоль/л NaCl и 5 ммоль/л фосфата (pH 7,4). Клетки (20%-й гематокрит) обрабатывали гемом

During a hypertonic effect a loss of  $K^+$  cations by cells, as well as a cold stress of erythrocytes are considerably blocked by the DIDS anion transport inhibitor [1]. It points to the fact, that the cation redistribution between the cell and medium is controlled by the anion moving through the membrane. The fact of the effect of anion various classes on the cation transport and organic substrates was described in the literature. For example, the rate of  $Na^+$ -dependent transport of aminoacids in erythrocytes is determined by the anion kind in the incubation medium and correlates with their transfer rate [2]. The transport rate depends not only on a charge, but on the anion structure, determining the activation energy of the transfer process. Thereat a structural reorientation in the membrane of hydrophobic segments of an anion channel occurs [5]. It is evident, that the transport of various anions will differently change during a hypertonic effect and the anion channel modification. Two classes of anions: halogenides ( $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ) and oxianions ( $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ) were used in order to reveal how the modification of the erythrocyte anion channel will affect the transport of various substrates.

Erythrocytes of a donor blood, washed-out by the solution containing 150 mMol/l of NaCl and 5 Mol/l of phosphate (pH 7.4) were used in the work. Cells (a 20%th hematocrit) were treated by hemin in the medium containing (mMol/l): KCl — 90, NaCl — 45, succrose — 44, phosphate — 10 (pH 7.4). Hemin was



в среде, содержащей (ммоль/л): KCl — 90, NaCl — 45, сахарозы — 44, фосфата — 10 (pH 7,4). Гемин добавляли в концентрации 300 мкмоль/л и инкубировали 10 мин при 37 °C [7]. 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 300 или 860 ммоль/л сахарозы. После закисления суспензии клеток вследствие перераспределения анионов Cl<sup>-</sup> в среду [8] в ячейку вносили различные анионы и динамику защелачивания контролировали самописцем. Ингибитор анионного транспорта ДИДС добавляли в ячейку в концентрации 2 мкмоль/л. Были использованы анионы в составе натриевых солей NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и KI в конечной концентрации 150 ммоль/л.

Комбинирование суспензии эритроцитов после закисления с NaCl приводит к защелачиванию среды инкубации. При этом скорость транспорта протонов в контрольных эритроцитах не отличается от таковой в клетках, обработанных геминном. Присутствие ингибитора анионного транспорта ДИДС замедляет скорость защелачивания среды

added in 300 μMol/l concentration and incubated within 10 min at 37 °C [7]. After treatment erythrocytes were washed-out by the incubation medium. A washed-out sediment of erythrocytes with a 2% hematocrit was introduced into a thermostating cell (37 °C) with pH electrode. Thereat the medium contained 300 or 860 mmol/l of succrose. After the cell suspension acidulation due to the Cl<sup>-</sup> anion redistribution into the medium [8], various anions were introduced into a cell and the dynamics of alkalization was controlled by means of a recorder. The DIDS anion transport inhibitor was added into a cell in the concentration of 2 μMol/l. One used anions in the composition of sodium salts of NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and KI in a final concentration of 150 mMol/l.

The combination of the erythrocyte suspension after acidulation with NaCl results in an alkalization of the incubation medium. Thereat the proton transport rate in control erythrocytes does not differ from the same in cells, treated by hemin. The presence of the DIDS anion transport inhibitor inhibits the rate of the medium alkalization both with control erythrocytes and treated with hemin ones, but in the latter

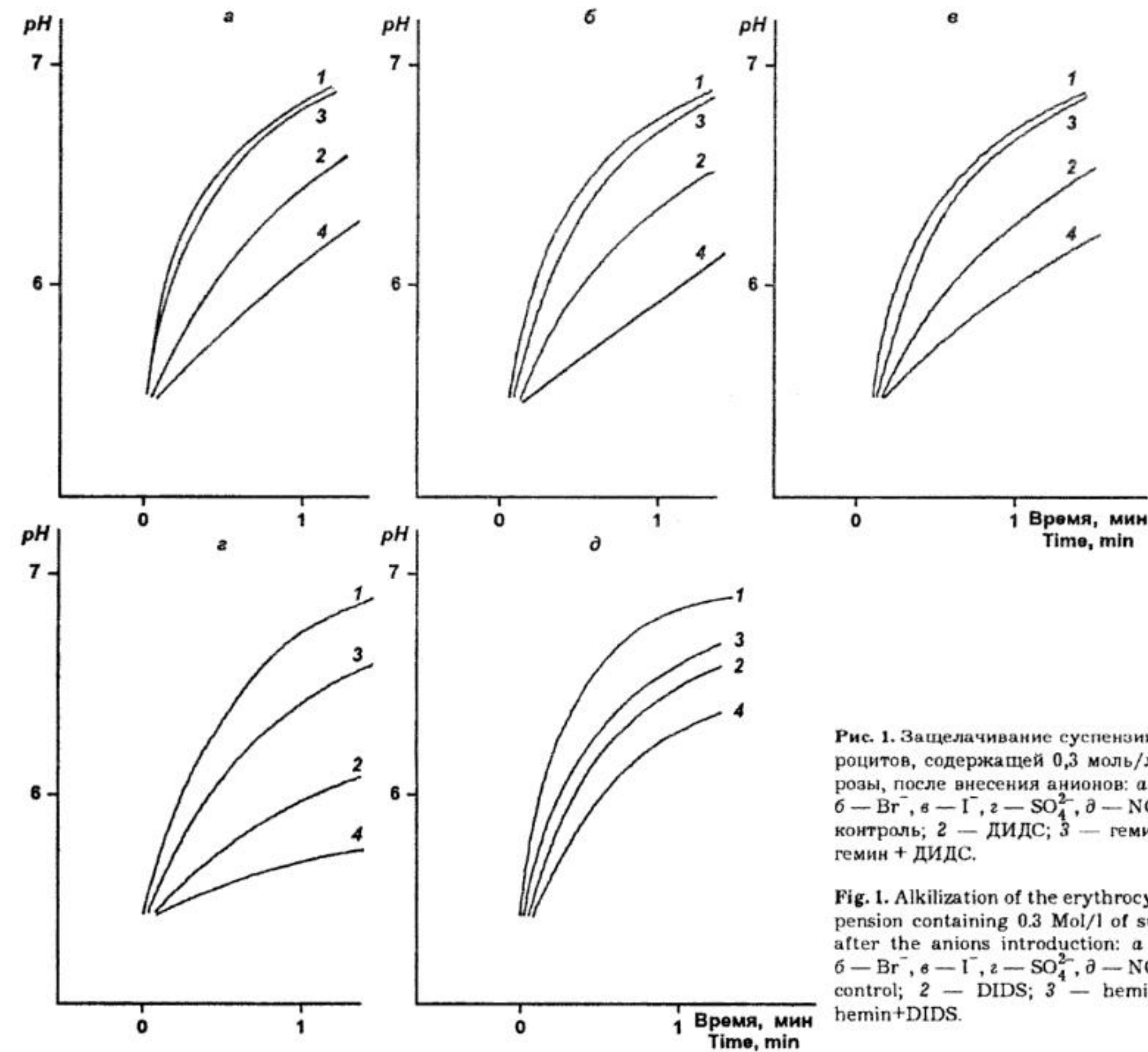


Рис. 1. Защелачивание суспензии эритроцитов, содержащей 0,3 моль/л сахарозы, после внесения анионов: а — Cl<sup>-</sup>, б — Br<sup>-</sup>, в — I<sup>-</sup>, г — SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, д — NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; 1 — контроль; 2 — ДИДС; 3 — гемин; 4 — гемин + ДИДС.

Fig. 1. Alkilation of the erythrocyte suspension containing 0.3 Mol/l of succrose after the anions introduction: а — Cl<sup>-</sup>, б — Br<sup>-</sup>, в — I<sup>-</sup>, г — SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, д — NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; 1 — control; 2 — DIDS; 3 — hemin; 4 — hemin+DIDS.



как с контрольными эритроцитами, так и с обработанными гемином, однако в последнем случае его действие выражено значительно сильнее (рис. 1, а). Подобный характер транспорта протонов в суспензии клеток отмечается при внесении в среду анионов  $\text{Br}^-$  или  $\text{I}^-$  (рис. 1, б, в). При использовании оксианионов  $\text{SO}_4^{2-}$  и  $\text{NO}_3^-$  влияние обработки гемином выявляется в отсутствии ДИДС, транспорт протонов в эритроцитах, обработанных гемином при внесении указанных анионов, замедляется. Кроме того, ингибитор в меньшей степени приводит к блокированию защелачивания суспензии клеток для  $\text{NO}_3^-$  (рис. 1, д) и в большей степени для  $\text{SO}_4^{2-}$  (рис. 1, з) по сравнению с экспериментами, в которых суспензия клеток комбинировалась с анионами галогенов (рис. 1, а-в).

Для выявления влияния осмотического стресса на анион-транспортную систему эритроцитов эксперименты были проведены в гипертонической среде, содержащей 0,86 моль/л сахарозы. Указанная среда несколько тормозит транспорт протонов в клетках, обработанных гемином, при внесении в суспензию галогенидных анионов (рис. 2, а-в), что

case its effect is manifested more significantly (Fig. 1, a). A similar character of the proton transport in the cell suspension is noted when introducing  $\text{Br}^-$  or  $\text{I}^-$  anions in the medium (Fig. 1, б, в). When using  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{NO}_3^-$  oxianions, the effect of treatment by hemin is revealed in the absence of DIDS, the proton transport in erythrocytes treated by hemin during the introduction of indicated anions decelerates. Besides, an inhibitor in the lesser extent results in the blocking of the cell suspension alkalization for  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 1, д) and in the greater extent for  $\text{SO}_4^{2-}$  (Fig. 1, з) in comparison with the experiments when the cell suspension was combined with the halogen anions (Fig. 1, а-в).

Experiments were carried-out in a hypertonic medium containing 0.86 Mol/l of succrose in order to find out the effect of an osmotic stress on the erythrocyte anion-transport system. The medium mentioned slightly inhibits the proton transport in cells treated by hemin during the introduction of halogenide anions into a suspension (Fig. 2, а-в), that was not revealed in the succrose isoosmotic solution (Fig. 1, а-в). Thereat, the presence of DIDS in the incubation medium causes a slightly greater blocking

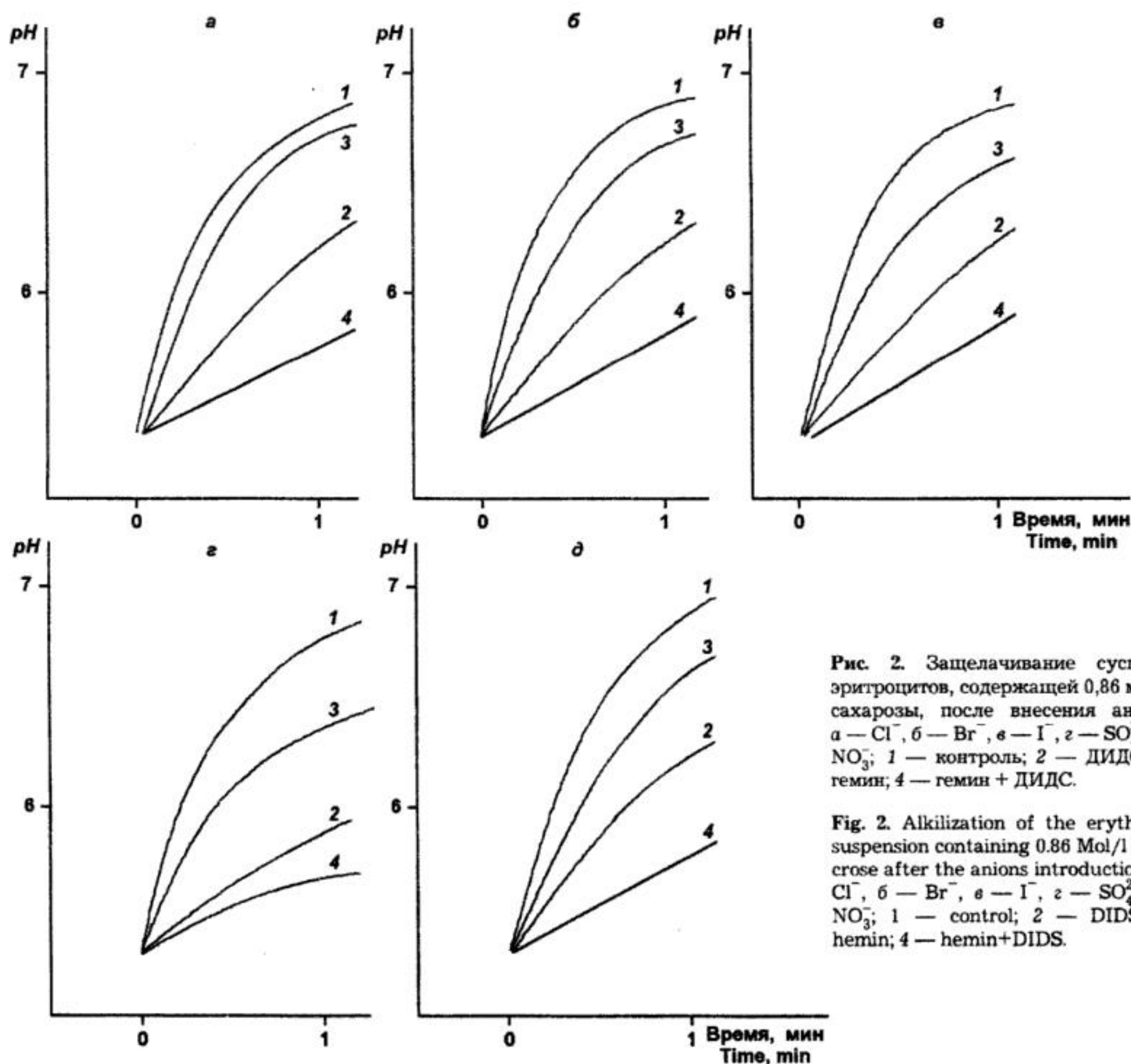


Рис. 2. Защелачивание суспензии эритроцитов, содержащей 0,86 моль/л сахарозы, после внесения анионов: а —  $\text{Cl}^-$ , б —  $\text{Br}^-$ , в —  $\text{I}^-$ , з —  $\text{SO}_4^{2-}$ , д —  $\text{NO}_3^-$ ; 1 — контроль; 2 — ДИДС; 3 — гемин; 4 — гемин + ДИДС.

Fig. 2. Alkilation of the erythrocyte suspension containing 0.86 Mol/l of succrose after the anions introduction: а —  $\text{Cl}^-$ , б —  $\text{Br}^-$ , в —  $\text{I}^-$ , з —  $\text{SO}_4^{2-}$ , д —  $\text{NO}_3^-$ ; 1 — control; 2 — DIDS; 3 — hemin; 4 — hemin + DIDS.



не выявлялось в изоосмотическом растворе сахарозы (рис. 1, а–в). При этом присутствие ДИДС в среде инкубации вызывает несколько большее блокирование защелачивания как в контрольных эритроцитах, так и в модифицированных гемин (рис. 2). Для  $\text{SO}_4^{2-}$  никаких изменений в динамике транспорта протонов в данной гипертонической среде не отмечается (рис. 2, з) по сравнению со средой, содержащей 0,3 моль/л сахарозы (рис. 1, з). В то же время повышение осмолярности среды при комбинации суспензии клеток с  $\text{NO}_3^-$  приводит к большему эффекту ДИДС (рис. 2, д) чем для изоосмотической среды (рис. 1, д).

Таким образом, использование различных классов анионов в условиях модификации анион-транспортной системы эритроцитов выявляет некоторые особенности функционирования анионного канала при гипертоническом воздействии.

Гемин по своей природе не является ингибитором транспорта анионов. Однако его влияние на анион-транспортную систему эритроцитов может проявляться опосредованно через модификацию белок-белковых взаимодействий. Индуцированное гемин разрушение цитоскелета эритроцитов и снижение подвижности остатков сиаловых кислот на поверхности клетки происходят в результате изменения нативной структуры белка полосы 4.1 при связывании с ним реагента [7, 10]. Показано, что гемин ингибирует  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азу посредством взаимодействия его с SH-группами фермента [6]. Вследствие окисления тиолов теряется нормальная асимметрия фосфолипидов [9]. Подобные преобразования могут привести к нарушению функционирования анионного канала, так как транслокация комплекса “транспортный сайт–анион” сопровождается значительными конформационными изменениями белка полосы 3 [5]. Для сферических анионов, обработанных гемин, не отмечается изменений в транспорте, тогда как при использовании оксианионов выявляется торможение защелачивания (рис. 1). Такую особенность можно обосновать в рамках гипотезы Лаботка–Галантер, в которой характер взаимодействия анионов с транспортным сайтом белка полосы 3 в большей степени определяется его структурой, чем зарядом [4]. Анализ скоростей транспорта и структуры оксианионов показал, что анион-транспортный сайт наиболее оптимально адаптирован для связывания и транспорта оксианионов, которые включают три атома кислорода ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{HSeO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ ,  $\text{FHPO}_3^-$ ). Нитрат ( $\text{NO}_3^-$ ) можно отнести к указанной группе анионов. Скорость его обмена в эритроцитах составляет около 60% от обмена бикарбоната, и эта величина выше, чем у других оксианионов. Вероятно, формирование переходного состояния комплекса белок–субстрат в транспортном цикле анионного переносчика при оптимально адаптированном связывании трехкислородных оксианионов по сравнению со сферическими аниона-

of alkalization both in control erythrocytes and modified by hemin ones (Fig. 2). For  $\text{SO}_4^{2-}$  no changes in dynamics of the proton transport in a given hypertonic medium are observed (Fig. 2, z) in comparison with the medium, containing 0.3 Mol/l of sucrose (Fig. 1, z). At the same time an increase in the medium osmolarity during the combination of cell suspension with  $\text{NO}_3^-$  results in the greater DIDS effect (Fig. 2, d), than for an isoosmotic medium (Fig. 1, d).

Thus, the usage of the anion various classes under conditions of modification of the erythrocyte anion-transport system reveals some peculiarities of the anion channel functioning during a hypertonic effect.

Hemin by its nature is not inhibitor of the anion transport. However its effect on an anion-transport system of erythrocytes may be manifested intermediately through the modification of protein–protein interactions. The destruction of the erythrocyte cytoskeleton induced by hemin and a decrease in the motility of the sialic acids rests on the cell surface occur as a result of changes of a native structure of the band 4.1 protein during binding a reagent with it [7, 10]. It has been shown, that hemin inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP by means of its interaction with SH-groups of enzyme [6]. A normal asymmetry of phospholipids is lost due the thiol oxidation [9]. Similar transformations may result in the anion channel functioning disorder, as the translocation of a “transport site–anion” complex is accompanied with considerable conformational changes of the band 3 protein [5]. For spherical anions treated by hemin no changes in transport were observed; meanwhile when using oxianions the alkalization inhibition is revealed (Fig. 1). Such capacity may be substantiated within the frame of Labotka–Galanter hypothesis, where the anion interaction character with a transport site of the band 3 protein in the greater extent is determined by its structure, that the charge [4]. The analysis of the transport rates and the oxianion structure demonstrated that an anion-transport site was not the most optimally adapted for binding and transport of oxianions, which included three oxygen atoms ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{HSeO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ ,  $\text{FHPO}_3^-$ ). Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) may be related to the indicated anion group. The rate of its exchange in erythrocytes makes about 60% from the bicarbonate exchange, and that value is higher than in other oxianions. Perhaps, the formation of a transitional state of the protein–substrate complex in a transport cycle of an anion carrier during an optimally adapted binding of three-oxygenous oxianions in comparison with spherical anions is subjected in the greater extent to the modification by hemin. The binding of a four-oxygenous anion of  $\text{SO}_4^{2-}$  does not quite differ from the binding of three-oxygenous anions [4], and the affinity of sulphate to a transport site — from the one of rapidly transported  $\text{Cl}^-$  and  $\text{HCO}_3^-$  anions [3]. However the existence of the fourth oxygen atom in the anion structure results in a decrease of the rate of an exchange transport by 2 orders for  $\text{SO}_4^{2-}$  [4].



ми подвергается в большей степени модификации гемом. Связывание четырехкислородного аниона  $\text{SO}_4^{2-}$  принципиально не отличается от связывания трехкислородных анионов [4], а сродство сульфата к транспортному сайту — от сродства быстро транспортируемых анионов  $\text{Cl}^-$  и  $\text{HCO}_3^-$  [3]. Однако существование четвертого атома кислорода в структуре аниона приводит к снижению скорости обменного транспорта на два порядка для  $\text{SO}_4^{2-}$  [4]. Это указывает на то, что образование переходного состояния и транслокация активированного комплекса "транспортный сайт-анион" через мембрану требуют больше энергии. Согласно [5] структура анионов определяет как скорость их транспорта, так и энергию активации процесса переноса. В случае с галогенидами и сульфатом (рис. 1) обработка гемом, вероятно, приводит к большей доступности ДИДС к транспортному сайту, вследствие чего и происходит большее блокирование входа анионов по сравнению с контрольными эритроцитами. В то же время эксперименты с  $\text{NO}_3^-$  не выявляют подобного эффекта гема на действие ДИДС (рис. 1, д). Основываясь на теории переходного состояния применительно к анионному переносчику [5] и гипотезе связывания оксианионов [4], можно сказать, что образование активированного комплекса " $\text{NO}_3^-$ -транспортный сайт" и его транслокация через мембрану сравнительно с переносом других анионов в меньшей степени подвергаются воздействию ингибитора анионного транспорта ДИДС.

Вследствие гипертонического воздействия эритроциты теряют значительную часть воды и деформируются, приобретая распластанную форму, что характерно только для клеток с немодифицированным цитоскелетом [1]. При обработке эритроцитов гемом или парахлормеркурийбензоатом гипертоническое воздействие не вызывает значительных изменений формы, хотя деформация отмечается [1]. Возрастание концентрации сахарозы в среде инкубации от 0,3 до 0,86 моль/л приводит к некоторому торможению транспорта анионов  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  в клетках, обработанных гемом (рис. 2). При этом отмечается большее ингибирование входа  $\text{NO}_3^-$  в эритроциты в присутствии ДИДС как в контрольных эритроцитах, так и в обработанных гемом (рис. 2, д). Анионный канал представляет собой трансмембранный белок, сегменты которого пересекают мембрану до 13 раз. Количество его молекул достигает  $1,2 \cdot 10^6$  копий на клетку [3]. Очевидно, что, наряду с цитоскелетом, белок полосы 3 осуществляет армирующую функцию липидного бислоя. При гипертоническом воздействии происходит деформация мембраны, которая приводит к изменению конформации гидрофобных сегментов белка относительно друг друга. Поскольку перенос анионов сопровождается не локальными конформационными изменениями транспортного сайта, а согласованной пространственной переориентацией

This indicates to the fact, that the formation of a transitional state and the "transport site-anion" activated complex translocation through a membrane require more energy. According to [5] the anion structure determines both the rate of their transport and the activation energy of the transfer process. In case with halogenides and sulphates (Fig. 1) the treatment by hemin probably results in the greater DIDS accessibility to a transport site, due to this fact the greater blocking of the anion entrance in comparison with control erythrocytes occurs. At the same time the experiments with  $\text{NO}_3^-$  do not cause the similar hemin effect on DIDS action (Fig. 1, d). Basing on the theory of a transitional state with reference to an anion carrier [5] and the hypothesis of the oxianion binding [4] one can say, that the " $\text{NO}_3^-$ -transport site" activated complex formation and its translocation through a membrane in comparison with the transfer of other anions are subjected in the lesser extent to the effect of the DIDS anion transport inhibitor.

Due to a hypertonic effect erythrocytes lose a considerable part of water and are deformed acquiring a spreaded shape, that is typical only for cells with unmodified cytoskeleton [1]. When treating erythrocytes by hemin or parachloromercuribenzoate a hypertonic effect does not cause considerable changes of the shape, but the deformation is observed [1]. An increase in the sucrose concentration in the incubation medium from 0.3 to 0.86 Mol/l results in some inhibition of the transport of  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  anions in cells treated by hemin (Fig. 2). Thereat a higher inhibition of  $\text{NO}_3^-$  entrance into erythrocytes in the DIDS presence is noted both in control erythrocytes and treated by hemin ones (Fig. 2, d). An anion channel is a transmembrane protein whose segments cross a membrane upto 13 times. A number of its molecules reaches  $1.2 \cdot 10^6$  of copies per cell [3]. It is evident, that together with cytoskeleton the band 3 protein accomplishes a reinforcing function of a lipid bilayer. During a hypertonic effect the membrane deformation, resulting in the conformation changes of the protein hydrophobic segments in respect to each other occurs. Since the anion transfer is accompanied not local conformational changes of a transport site, but a coordinated spatial reorientation of the protein hydrophobic segments in a membrane in respect to each other [5], so a deforming effect of a hypertonic medium may result in a change of the formation energy and the complex translocation through a membrane. Due to structural changes in the segments formation of the band 3 protein, a more free access the anion transport inhibitor to the anion channel transport site is possible. It is manifested in a higher inhibition of the nitrate transport DIDS in the medium containing 0.86 Mol/l of sucrose.

Thus, the erythrocyte treatment by hemin results in the modification of an anion - transport system, differently affecting the transport of various anion classes. For spherical anions an indicated modification



гидрофобных сегментов белка в мембране относительно друг друга [5], то деформирующее воздействие гипертонической среды может привести к изменению энергии образования и транслокации комплекса через мембрану. Вследствие структурных изменений в построении сегментов белка полосы 3 возможен более свободный доступ ингибитора анионного транспорта к транспортному сайту анионного канала. Это выявляется в большем ингибировании ДИДС транспорта нитрата в среде, содержащей 0,86 моль/л сахарозы.

Таким образом, обработка эритроцитов гемином приводит к модификации анион-транспортной системы, которая по-разному сказывается на транспорте разных классов анионов. Для сферических анионов указанная модификация, вероятно, реализуется в возрастании сродства ДИДС к транспортному сайту, тогда как для оксианионов имеет место противоположная ситуация. При гипертоническом воздействии модификация гемином приводит к некоторому блокированию транспорта и усилению влияния ДИДС на транспорт анионов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Рамазанов В.В. Вплив осмотичного стресу та модифікації цитоскелета на розвиток холодового та гіпертонічного шоку еритроцитів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.— Харків, 1994.— 14 с.
2. Al-Saleh E.A., Wheeler K.P. Transport of neutral amino acids by human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1982.— 684.— P. 157–171.
3. Cabantchik Z.I., Knauf P.A., Rothstein A. The anion transport system of the red blood cell // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1978.— 515.— P. 239–302.
4. Galanter W.L., Hakimian M., Labotka R.J. Structural determinants of substrate specificity of the erythrocyte anion transporter // *Amer. J. Physiology.*— 1993.— 265, № 4.— P. C918–C926.
5. Galanter W.L., Labotka R.J. The temperature dependence of human erythrocyte transport of phosphate, phosphite and hypophosphite // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1990.— 1027.— P. 65–71.
6. Leclerc L., Vasseur C., Bursaux E. et al. Inhibition of membrane erythrocyte (Ca + Mg)-ATP-ase by hemin // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1988.— 946, № 1.— P. 49–56.
7. Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // *Biochem. Internat.*— 1986.— 13, № 3.— P. 467–477.
8. Sitaramam V. Selfpotential generated by unscreened fixed-charges at the membrane surface of the erythrocyte perturbs the lipid bilayer // *Indian J. Biochem. Biophys.*— 1988.— 25, № 2–4.— P. 172–179.
9. Williamson P., Antia R., Schleger R.A. Maintenance of membrane phospholipid asymmetry // *FEBS Lett.*— 1987.— 219, № 2.— P. 316–320.
10. Wyse J.W., Butterfield D.A. Interaction of hemin with erythrocyte membranes: alterations in the physical state of the major sialoglycoprotein // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1989.— 979.— P. 121–126.

Поступила 04.05.98

probably is realized in the manifestation of DIDS affinity to a transport site, meanwhile for oxianions an opposite situation occurs thereat. Within a hypertonic effect the modification by hemin results in a blocking of transport and strengthening of DIDS influence on the anion transport.

## REFERENCES:

1. Ramazanov V.V. The osmotic stress and cytoskeleton modifier effect on the development of the erythrocyte cold and hypertonic stress: Abstr. Thesis...Cand. Biol. Sci.— Kharkiv, 1994.— 14 p.
2. Al-Saleh E.A., Wheeler K.P. Transport of neutral amino acids by human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1982.— 684.— P. 157–171.
3. Cabantchik Z.I., Knauf P.A., Rothstein A. The anion transport system of the red blood cell // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1978.— 515.— P. 239–302.
4. Galanter W.L., Hakimian M., Labotka R.J. Structural determinants of substrate specificity of the erythrocyte anion transporter // *Amer. J. Physiology.*— 1993.— 265, № 4.— P. C918–C926.
5. Galanter W.L., Labotka R.J. The temperature dependence of human erythrocyte transport of phosphate, phosphite and hypophosphite // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1990.— 1027.— P. 65–71.
6. Leclerc L., Vasseur C., Bursaux E. et al. Inhibition of membrane erythrocyte (Ca + Mg)-ATP-ase by hemin // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1988.— 946, № 1.— P. 49–56.
7. Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // *Biochem. Internat.*— 1986.— 13, № 3.— P. 467–477.
8. Sitaramam V. Selfpotential generated by unscreened fixed-charges at the membrane surface of the erythrocyte perturbs the lipid bilayer // *Indian J. Biochem. Biophys.*— 1988.— 25, № 2–4.— P. 172–179.
9. Williamson P., Antia R., Schleger R.A. Maintenance of membrane phospholipid asymmetry // *FEBS Lett.*— 1987.— 219, № 2.— P. 316–320.
10. Wyse J.W., Butterfield D.A. Interaction of hemin with erythrocyte membranes: alterations in the physical state of the major sialoglycoprotein // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1989.— 979.— P. 121–126.

Accepted in 04.05.98



# Общие показатели энергетического состояния сусликов *C. undulatus* в процессе гибернации

В. И. ЗАГНОЙКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## General Indices of the Energetic State of *C. undulatus* Ground-squirrels During the Hibernation Process

V. I. ZAGNOYKO

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

Исследовалась динамика изменений частоты сердечных сокращений и температуры тела сусликов *C. undulatus* в процессе баута. Определены температурные коэффициенты для частоты сердечных сокращений с целью прогнозирования наиболее оптимальных периодов для выделения из тканей сусликов *C. undulatus* биологически активных веществ, стимулирующих спячку животных. Показано, что в этом отношении наибольшей активностью обладает плазма крови, взятая в начале вхождения сусликов в баут.

Вивчалась динаміка змін частоти серцевих скорочень і температури тіла ховрахів *C. undulatus* у процесі баута. Визначались температурні коефіцієнти для частоти серцевих скорочень з метою прогнозування найбільш оптимальних періодів отримання із тканин *C. undulatus* біологічно активних речовин, стимулюючих сплячку тварин. Показано, що у цьому відношенні найбільшу активність має плазма крові, яка взята на початку входження ховрахів у баут.

The dynamics of changes of the frequency of heart contractions and *C. undulatus* ground-squirrel's body temperature during the bout process has been investigated. Temperature coefficients for the frequency of heart contractions with the aim of prognosis of the most optimal periods to separate biologically active substances from the tissues of *C. undulatus* ground-squirrels, stimulating animal's hibernation has been determined. It has been shown, that blood plasma, taken at the first stage of a bout, possesses the highest activity in this respect.

В 60-х годах были предприняты первые попытки выделить из тканей зимнеящих биологически активных веществ (БАВ), или как их еще иногда называют триггеры спячки. Введение диализата или цельной сыворотки крови гибернирующих сусликов или сурков летним активным животным вызвало у последних состояние оцепенения [3]. На основании полученных данных было выдвинуто предположение, что эффективность триггера растет с продолжительностью спячки [4, 5]. Неудачные попытки ряда исследователей [6] повторить эти опыты вызвали недоверие к результатам Daw A., Spurrier W. В частности, говорилось о недостаточной корректности постановки опытов на зимнеящих, так как эти животные имеют генетически запрограммированные механизмы, позволяющие им и без инъекции триггера входить в спячку при неблагоприятных условиях среды [7]. В 1977 году Swan H. и Schatte C. L. выделили экстракт мозга гибернирующих сусликов, внутривенное введение которого крысам уменьшало потребление  $O_2$  на 35% при снижении температуры тела ( $T_t$ ) в среднем на 5,2 °C. Через 90 мин скорость метаболизма (СМ) и  $T_t$  возвращались к субнормальному уровню. У 2-х крыс наблюдалась длительная гипотермия со снижением СМ до 26 ч. Как полагали авторы, этим крысам были введены экстракты мозга сусликов, декапитированных в более глубокой спячке, количество антиметаболи-

First attempts to separate biologically active substances (BAS), sometimes named as triggers of hibernation, from the tissues of hibernating animals have been undertaken in the sixties. The injection of dialysate or a whole blood serum of hibernating ground-squirrels or wood chucks to summer active animals, provoked in the latter a torpid state [3]. On the base of obtained data, the supposition that trigger efficiency grow with the hibernation duration [4, 5] has been put. Not successful attempts of different investigators [6] to repeat these experiments, called the distrust in the results of Daw A. and Spurrier W. In particular, the question was about the insufficient correctness of the experiments on hibernating animals, because they have genetically programmed mechanisms, allowing them to enter hibernation under unfavourable environmental conditions even without the trigger injection [7]. In 1977 Swan H. and Schatte C. L. separated the extraction from the brain of hibernating ground-squirrels, intravenous injection of which to rats decreased  $O_2$  consumption by 35% when body temperature (BT) decreased in average by 5.2 °C. In 90 min metabolism rate (MR) and BT returned to subnormal level. The long-term hypothermia with the MR decrease down to 26 hrs has been observed in two rats. As the authors supposed, the ground-squirrel's brain extractions, decapitated in deep hibernation, were injected to these rats, the num-



ческих агентов увеличивается и активность крыс возрастает с продолжительностью гибернации [6].

Однако известно, что зимняя спячка представляет периодическую последовательность так называемых баутов, каждый из которых состоит из вхождения в спячку, собственно спячки (длительностью до 2–3-х недель) и пробуждения [7]; причем пробуждения являются весьма активным процессом, во время которого, например, у суслика *C. undulatus* уровень СМ возрастает за 2–3 ч в десятки или даже сотни раз [2].

Задачей данной работы являлось изучение динамики сердечных сокращений и температуры тела сусликов *C. undulatus*, а также определение температурного коэффициента  $Q_{10}$  для частоты сердечных сокращений с целью прогнозирования наиболее оптимальных периодов для выделения из тканей сусликов *C. undulatus* биологически активных веществ (ингибирующей или активирующей природы), ответственных за цикл эутермия–гибернация.

Сусликов *C. undulatus* содержали в условиях вивария в индивидуальных клетках. Пищу и воду давали в достаточном количестве. В ноябре перед вхождением в спячку их помещали в темную комнату с температурой среды ( $T_c$ ) 1–3 °C. Для регистрации частоты сердечных сокращений (ЧСС) и температуры тела применяли телеметрическую систему, состоящую из температурных и кардиографических радиопередатчиков оригинальной конструкции, работающих в импульсном режиме в диапазоне 30–50 МГц, и радиоприемника типа Р-323. Информация о  $T_t$  заключалась во временном интервале между звуковыми импульсами. Передатчики массой 10 г вживляли под наркозом (60 мг/кг этиаминала натрия в/б) в области левой лопатки. Отводящий электрокардиографический электрод фиксировали внутри грудной полости, индифферентный электрод закрепляли подкожно на голове животного. ЧСС и  $T_t$  измеряли секундомером на слух при оперативном контроле и регистрировали на электроэнцефалографе ЭЭГП-02. Температурный коэффициент для ЧСС подсчитывали по общепринятой формуле [2].

Предварительно оценивали пробуждающий эффект собственно процедуры инъекций (рис. 1). Контрольное внутрибрюшинное введение спящим животным 0,5 мл физиологического раствора проведено с максимальной осторожностью на стадии вхождения в спячку или на первый день баута, что не вызывало пробуждения сусликов. На 3-й день баута вероятность пробуждения после инъекций составляла примерно 50%. После 6 дней все животные (за исключением 1 из 10 наблюдаемых случаев) выходили из спячки после инъекции.

Эти данные позволяют предположить, что наибольшая концентрация гуморальных факторов, вызывающих состояние зимней спячки *C. undulatus*, по-видимому, имеет место при вхождении в баут

number of antimetabolic agents increases and rat activity grow with the hibernation duration [6].

But it is known, that winter hibernation is periodical sequence of bouts, each of those consists of the first stage of hibernation, hibernation itself (with the duration up to 2–3 weeks) and arousing [7]; arousing is an active process, during which, for example, the MR level in *C. undulatus* ground-squirrels increases to 2–3 hrs in ten or even in hundreds times [2].

The task of the given work is to study the dynamics of the heart contractions and the BT of *C. undulatus* ground-squirrels, as well as the determination of the  $Q_{10}$  temperature coefficient for the frequency of the heart contractions with the aim of forecasting of optimal periods to separate from the ground-squirrel's tissues biologically active substances (of an inhibiting and activating nature) responsible for the euthermia-hibernation cycle.

*C. undulatus* ground-squirrels were kept under vivarium conditions in individual cages. Food and water were given in a sufficient supply. In November before the hibernation start, animals were put in a dark room with the environmental temperature (ET) from 1 to 3 °C. Telemetrical system, consisting of temperature and cardiographic radiotransmitters of original construction, working in an impulse regimen with the range of 30–50 mHz and P-323 series radio receiver were applied to register the frequency of heart contractions (FHC) and body temperature. Information about the BT consisted in a temporal interval between sound impulses. Transmitters with the mass of 10 g were implanted under the anaesthesia (60 mg/kg of sodium ethaminal) in the place of the left shoulder-blade. Tapping electrocardiographic electrode was fixed inside pectoral cavity, indifferent electrode was hypodermically fixed on an animal's head. FHC and BT were measured by means of stop-watch by ear at operative control and were registered with the EEGP-02 electroencephalographer. The  $Q_{10}$  temperature coefficient for FHC was calculated according to generally accepted formulae [2].

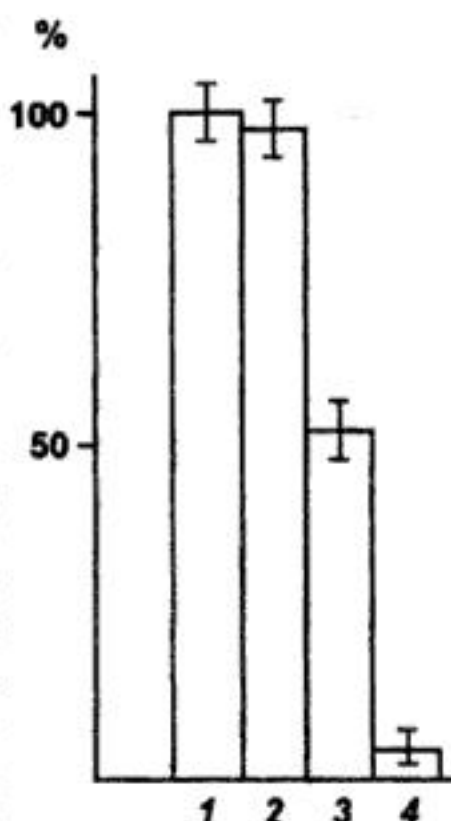
Arousal effect of the injection procedure itself (Fig. 1) has been preliminarily estimated. Control intraperitoneal injection of 0.5 ml physiological solution to sleeping animals was conducted with the maximum caution at the stage of the beginning of hibernation or at the first bout day, what did not cause ground-squirrel arousal. To the third bout day probability of arousing after the injections made approximately 50%. In 6 days, all animals (except 1 of 10 observed cases), aroused after the injection.

These data allow to suppose, that the greatest concentration of humoral factors, provoking winter hibernation state in *C. undulatus*, apparently, take place at the 1 bout stage or at its very beginning. Typical example of the change of ground-squirrel BT and FHC change at the beginning of the first bout stage is demonstrated in Fig. 2. As it is seen, at BT decreasing from 32 down to 22 °C, palpitation frequency



**Рис. 1.** Количество (%) не проснувшихся сусликов *C. undulatus* после инициации пробуждения внутрибрюшинной инъекцией 0,5 мл физиологического раствора: 1 — в момент вхождения в спячку (температура тела 15–20 °C); 2 — первый день баута (7–9 °C); 3 — третий день баута (4–6 °C); 4 — шестой день баута (4–6 °C).

**Fig. 1.** Number (%) of non-awakened ground squirrels *C. undulatus* after initiation of arousal by intra-abdominal injection of 0.5 ml of physiological solution: 1 — into the moment of entering into hibernation (body temperature of 15–20 °C); 2 — the first day of baut (7–9 °C); 3 — the third day of baut (4–6 °C); 4 — the sixth day of baut (4–6 °C).



или в самом его начале. На рис. 2 приведен типичный пример изменения  $T_r$  и ЧСС суслика *C. undulatus* в начале вхождения в спячку. Как видим, при снижении  $T_r$  с 32 до 22 °C частота сердцебиений уменьшается с 160–200 до 30–35 уд./мин. Таким образом, на этом временном отрезке температурный коэффициент  $Q_{10}$  около 6.

В состоянии глубокой спячки *C. undulatus* ЧСС составляет всего 2–4 уд./мин при температуре среды около 2 °C. С повышением температуры среды ЧСС гибернирующего животного также повышается, причем эта зависимость сравнительно хорошо описывается экспоненциальной функцией вида:

$$F = 2,53 \exp(0,1T),$$

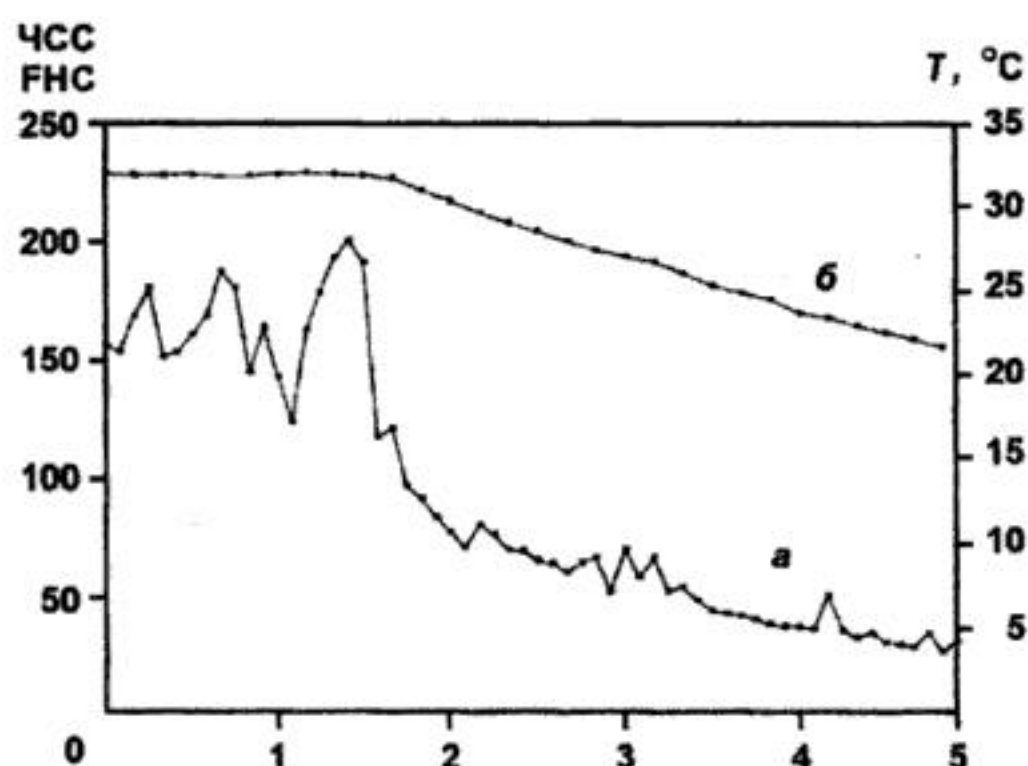
где  $F$  — частота сердцебиений;  $T$  — температура среды.

В этих опытах  $T_r$  в области левой лопатки превышала температуру среды на 1,5–3,5 °C. Несложно подсчитать, что в данном случае в состоянии спячки коэффициент  $Q_{10}$  был порядка 2,7, то есть существенно не отличался от обычных биологических значений (2–2,5).

При выходе *C. undulatus* из спячки отмечено, что при разогревании животного от 7 до 17 °C ЧСС быстро возрастает от 100 до 410 уд./мин, коэффициент  $Q_{10}$  за этот период составляет более 4.

На зимнеящих температурный коэффициент  $Q_{10}$  наиболее исследован для параметра, сопряженного с деятельностью сердца, — скорости потребления  $O_2$ . По данным [2], коэффициент  $Q_{10}$  СМ для сусликов и сурков не превышает 2–2,8, и подавление термogenesis в сочетании с эффектом  $Q_{10}$  удовлетворительно объясняет динамику СМ и  $T_r$  животных при переходах эутермия–гибернация. По [1]  $Q_{10}$  существенно больше 3, и тогда приходится постулировать подавление СМ тканей ниже исходного базального уровня при вхождении в спячку и активации при пробуждении.

В наших опытах коэффициент  $Q_{10}$  частоты сердцебиений *C. undulatus* существенно не отличался от обычных биологических значений только для



**Рис. 2.** Изменение частоты сердцебиений (а) и температуры тела (б) сусликов *C. undulatus* при вхождении в спячку.

**Fig. 2.** The change of the frequency of heart beating (a) and body temperature (b) of ground squirrels *C. undulatus* during entering into hibernation.

decrease from 160–200 down to 30–35 beatings/min. So, on this time period the  $Q_{10}$  temperature coefficient is about 6. FHC of *C. undulatus* at the state of deep hibernation is only 2–4 beatings/min when the temperature is about 2 °C. With the temperature increase, FHC of a hibernation animal also increases, this dependence is comparatively successfully described by such an exponential function:

$$F = 2.53 \exp(0.1T),$$

where  $F$  — frequency of heart beatings;  $T$  — environmental temperature

In these experiments BT in the left shoulder-blade region was higher than environmental temperature in 1.5–3.5 °C. It is simple to calculate, that in the given case  $Q_{10}$  coefficient in hibernation state was about 2.7, does not essentially differ from traditional biological indices (2–2.5).

During *C. undulatus* arousal it has been noted, that at animal warming from 7 up to 17 °C, FHC quickly increases from 100 up to 410 beatings/min,  $Q_{10}$  coefficient for this period is more than 4.

The  $Q_{10}$  temperature coefficient is more investigated in hibernating animals for the  $O_2$  consumption rate — the parameter, connected with a heart activity, — according to the data [2], the MR  $Q_{10}$  coefficient for ground-squirrels and woodchucks is not higher than 2–2.8, and thermogenesis suppression in connection with the effect of  $Q_{10}$  satisfactorily explains the dynamics of MR and animal's BT during the euthermia-hibernation transition.  $Q_{10}$  is considerably higher than 3, and then we have to postulate the MR tissue suppression, lower than initial basal level during the first stage of hibernation and activation during arousing.

In our experiments, the  $Q_{10}$  coefficient of *C. undulatus* heart palpitations does not essentially differ from common biological values only for hibernation state; during the euthermia-hibernation transitions this coefficient has considerably high meanings. It is also important, that BT changes and, therefore, the tem-



состояния спячки; при переходах же эутермия-гибернация этот коэффициент имел весьма высокие значения. Важно и то, что изменения  $T_T$  значительно отставали от соответствующих изменений ЧСС и, следовательно, в данном случае температура не могла являться основной причиной изменения скорости протекания физиологических процессов, хотя эффект  $Q_{10}$  и мог выступать второстепенным неспецифическим фактором, облегчающим переход животных с одного уровня активности на другой. Главная же роль в подавлении физиологических и обменных процессов при вхождении в спячку и их активации при пробуждении принадлежит специальным механизмам, функционирующим на основе соответствующих БАВ.

Итак, есть основания полагать, что триггер, индуцируемый в тканях гибернантов, оказывает наибольшее ингибирующее воздействие в начале вхождения в спячку, когда под общим контролем ЦНС скоординированно подавляется ряд физиологических функций и обменных реакций организма. К концу же баута перед очередным пробуждением, являющимся весьма активным процессом, по-видимому, продуцируются БАВ, облегчающие выход из состояния гибернации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бронников Г. Е. Возможные пути регуляции энергетического метаболизма у зимоспящих, кинетический подход // Механизмы зимней спячки.— Пущино, 1987.— С. 24–32.
2. Шмидт-Нильсон К. Физиология животных. Приспособление и среда.— М.: Мир, 1982, Т. 1.— 416 с.
3. Daw A.R., Spurrier W. Hibernation induced in ground squirrels by blood transfusion // Science.— 1969.— 163.— P. 298–299.
4. Daw 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.
5. South F.E., House W.A. Energy metabolism in hibernation // Mammalian hibernation.— 1967.— 3.— P. 305–324.
6. Swan H., Schatte C.L. Antimetabolic extract from the brain of the hibernating ground squirrel *Citellus tridecemlineatus* // Science.— 1977.— 195.— P. 84–85.
7. Swan H., Reinhard F.G. Caripo D.L., and Schatte C. L. Hypometabolic brain from vertebrates capable of torpor // Cryobiology.— 1981.— 18.— P. 598–602.

Поступила 18.03.98

perature in this case could not be the main cause of the changes of duration rate of physiological processes, though the  $Q_{10}$  effect could be as a secondary not-specific factor, facilitating animal's transition from one activity level to another. The main role in the suppression of physiological and metabolic processes at the first stage of hibernation and their activation when arousing belongs to special mechanisms, functioning on the base of corresponding biologically active substances BAS.

Thus, it may be supposed, that trigger, induced in the hibernants' tissues, showed the most inhibiting effect at the beginning of the first hibernation state, when under the general CNS control the series of physiological functions and organism metabolic reactions was suppressed. Up to the bout end before the next arousing, being an active process, apparently BAS are produced, facilitating the end of hibernation.

## REFERENCES

1. Bronnikov G.E. Possible ways of the regulation of the energetic metabolism in hibernating; kinetic approach // Mechanisms of winter hibernation.— Puschino, 1987.— P. 24–32.
2. Schmidt-Nielsen K. Animal's physiology. Adaptation and environment.— M.: Mir, 1982, V. 1.— 416 p.
3. Daw A.R., Spurrier W. Hibernation induced in ground squirrels by blood transfusion // Science.— 1969.— 163.— P. 298–299.
4. Daw 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.
5. South F.E., House W.A. Energy metabolism in hibernation // Mammalian hibernation.— 1967.— 3.— P. 305–324.
6. Swan H., Schatte C.L. Antimetabolic extract from the brain of the hibernating ground squirrel *Citellus tridecemlineatus* // Science.— 1977.— 195.— P. 84–85.
7. Swan H., Reinhard F.G. Caripo D.L., and Schatte C. L. Hypometabolic brain from vertebrates capable of torpor // Cryobiology.— 1981.— 18.— P. 598–602.

Accepted in 18.03.98



# Изучение замороженных водных растворов солей двухвалентных металлов методом низкотемпературной масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами

М. В. КОСЕВИЧ

Физико-технический институт низких температур им. Б. И. Веркина НАН Украины,  
г. Харьков

## Study of Frozen Aqueous Solutions of the Bivalent Metal Salts Using the Method of a Low Temperature Mass-Spectrometry with the Fast Atom Bombardment

M. V. KOSEVICH

*B. I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering, the National Academy  
of Sciences of the Ukraine, Kharkov*

С помощью метода низкотемпературной масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами изучен ряд водных растворов солей двухвалентных металлов  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $BaCl_2$ , замороженных в неравновесных условиях. На основании анализа кластерных ионов, присутствующих в масс-спектрах, сделан вывод, что, наряду с фазой кристаллогидратов солей, образующихся в системах в соответствии с их равновесными фазовыми диаграммами, наблюдается также формирование кристаллогидрата основной соли или гидроокиси. Высказано предположение, что в связи с использованием неравновесных условий охлаждения в системе не успевает завершиться реакция, обратная гидролизу, имеющему место при растворении солей, и часть продуктов гидролиза выделяется в отдельные фазы. Обсуждены возможные негативные последствия такого эффекта при размораживании криопротекторных сред, содержащих соли двухвалентных металлов.

За допомогою методу низькотемпературної мас-спектрометрії з бомбардуванням швидкими атомами досліджено водні розчини солей двовалентних металів  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $BaCl_2$ , заморожених у нерівноважних умовах. На основі аналізу кластерних іонів, присутніх у мас-спектрах, зроблено висновок, що, поряд з фазою кристалогідратів солей, які утворюються в системах згідно з їх рівноважними фазовими діаграмами, спостерігається також формування фази кристалогідрату основної солі або гідроокису. Висловлено припущення, що у зв'язку з використанням нерівноважних умов охолодження у системі не встигає завершитися реакція, зворотня гідролізу, що мав місце при розчиненні солі, і частина продуктів гідролізу виділяється в окремі фази. Обговорено можливі негативні наслідки цього ефекту при розморожуванні криозахисних середовищ, що містять солі двовалентних металів.

A number of aqueous solutions of salts of  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $BaCl_2$  bivalent metals, frozen under non-equilibrium conditions, was studied using the method of low temperature mass-spectrometry with fast atom bombardment. On the basis of the cluster ions analysis, presenting in mass-spectra, one has concluded, that along with crystalline hydrate phase of salts, forming in systems in the conformity with their equilibrium phase diagrams, the crystalline hydrate phase formation of a basic salt or hydroxide is observed. One suggested, that with using non equilibrium conditions of cooling, the reaction, reversible to hydrolysis, occurring during the salts dissolution, was not completed, and a part of hydrolysis products was formed in separate phases. Possible negative consequences of such effect during freeze-thawing of cryoprotective media, containing salts of bivalent metals, were discussed.

Изучение свойств замороженных водно-солевых растворов представляет интерес для криобиологии, поскольку большинство биологических жидкостей содержит соли щелочных и щелочно-земельных металлов. Например, в плазме крови в наибольшей концентрации присутствуют ионы металлов  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ; в качестве микроэлементов содержатся Fe, Mn, Al, Zn, Ag, Cu; анионами являются  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $HPO_4^{2-}$  [10].

Практически для всех наиболее распространенных солей стандартными методами физико-химического анализа определены равновесные фазовые диаграммы [4, 5, 8]. Отражая фундаментальные свойства системы, в то же время такие фазовые диаграммы являются достаточно идеализированным описанием систем, поскольку для достижения

The study of properties of aqueous-saline solutions is of interest for cryobiology, since the majority of biological fluids contain salts of alkaline and alkaline-earth metals. For example, the ions of  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  metals are present in the greatest concentration in the blood plasma; Fe, Mn, Al, Zn, Ag, Cu are contained as the microelements;  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $HPO_4^{2-}$  are anions [10].

Equilibrium phase diagrams were practically determined for all the most spreaded salts using standard methods of a physical and chemical analysis [4, 5, 8]. Reflecting fundamental properties of a system, at the same time, such phase diagrams are a quite idealized description of a system, since for reaching the balance conditions during their construction one changes the



условий равновесия при их построении температуры систем изменяют с небольшой скоростью, которая намного меньше скоростей, применяемых при замораживании в криобиологической и криомедицинской практике. В связи с этим необходимо изучить водно-солевые растворы, замороженные в неравновесных условиях со скоростями, которые сравнимы с применяемыми при криообработке биоматериала. Однако в таких условиях формируются образцы сложной морфологии и с большой вероятностью сложного химического состава, что осложняет их изучение традиционными методами.

Сравнительно недавно разработанный низкотемпературный (НТ) вариант метода масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА) [1, 6] позволяет получать информацию о химическом и фазовом составе замороженных водных растворов, об образовании новых веществ и фазовых переходах в системе при изменении температуры. Метод НТ ББА был успешно применен к изучению растворов ряда органических и неорганических соединений в воде и органических растворителях [2, 6, 12–14, 16–19]. В частности, детально изучены замороженные водные растворы NaCl в интервале температур  $-196 \div 0^\circ\text{C}$  [13, 17] как простейший пример водно-солевой системы. Были выделены параметры НТ ББА масс-спектров, которые несут информацию об образовании в системе при ее замораживании нового вещества — кристаллогидрата  $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , — о сложной гетерогенной структуре образцов, включающих кристаллы льда и кристаллогидрата, о двух типах фазовых переходов в системе — сублимации льда и обезвоживании кристаллогидрата.

К ограничениям метода следует отнести определенные сложности в использовании фазовых диаграмм, полученных при атмосферном давлении, для интерпретации результатов масс-спектрометрических экспериментов в условиях низкого давления. В частности, при давлении  $10^{-4} - 10^{-5}$  Па, характерном для описываемых экспериментов, практически полная сублимация кристаллов льда заканчивается при  $-55 \pm 5^\circ\text{C}$ , что нарушает соотношение компонентов в образце. Однако при отсутствии активной сублимации параметр давления не оказывает существенного влияния на образец, находящийся в твердом состоянии и соответственно на его масс-спектр. Для кристаллогидратов сравнительно низкое давление насыщенных паров над поверхностью кристаллогидрата при низких температурах препятствует его быстрому обезвоживанию и позволяет регистрировать спектры, соответствующие данному соединению.

Отмеченные выше особенности объектов и выбранного метода позволили сформулировать задачу для нового исследования как изучение водных растворов ряда солей двухвалентных металлов ( $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ), замо-

system temperature with a low rate, which is much lesser than the rates applied during freezing in a cryobiological and cryomedical practice. In this connection it is necessary to study aqueous-saline solutions frozen under non equilibrium conditions with the rates comparable with applied ones during the biomaterial cryotreatment. However under such conditions the samples of a complex morphology and with a high probability of a complex chemical composition are formed, that complicates their study using traditional methods.

Just recently developed low temperature (LT) version of the mass-spectrometry method with the fast atom bombardment (FAB) [1, 6] permits to obtain the information on a chemical and phase composition of frozen aqueous solutions, on the new substances formation and phase transitions in the system during the temperature change. The LT FAB method was successfully applied to the study of solutions of a number of organic and inorganic compounds in water and organic solvents [2, 6, 12–14, 16–19]. In particular, the NaCl frozen aqueous solutions in the temperatures interval of  $-196 \div 0^\circ\text{C}$  were in detail studied as a simple example of an aqueous-saline system [13, 17]. One isolated the LT FAB mass-spectrum parameters, having the information on the new substance —  $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  crystalline hydrate formation in the system during its freezing, on a complex heterogeneous structure of samples, including the ice crystals and crystalline hydrate, on two types of phase transitions in the system — the ice sublimation and the crystalline hydrate dehydration.

Certain difficulties when using phase diagrams obtained during an atmospheric pressure for the interpretation of the mass-spectrometric experiments results under low pressure conditions should be related to the method restrictions. In particular at the pressure of  $10^{-4} - 10^{-5}$  Pa typical for described experiments, a practically complete sublimation of the ice crystals stops at  $-55 \pm 5^\circ\text{C}$ , that disorders the component ratio in a sample. However, during the active sublimation absence the pressure parameter does not cause a significant effect on the sample, being in a solid state and on its mass-spectrum, correspondingly. For crystalline hydrates a comparatively low pressure of saturated vapours over the crystalline hydrate surface at low temperatures obstructs to its rapid dehydration and permits to record the spectra, corresponding to the given compound.

The noted above peculiarities of objects and the method selected permitted to formulate the task for a new investigation as the study of aqueous solutions of the bivalent metals ( $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ) salt series, frozen under non equilib-



рожденных в неравновесных условиях со скоростью порядка 200 °C/мин методом НТ ББА.

Эксперименты проводили с помощью магнитного масс-спектрометра МИ-1201Э (производства ПО "Электрон", Сумы, Украина), снабженного низкотемпературным источником ионов, описанным в [1]. Основным конструктивным элементом этого источника является криогенный блок, охлаждаемый жидким азотом, в который помещается подложка с образцом. Температура образца контролируется терморезистором, вмонтированным в подложку. Для повышения вакуума в источнике ионов в зоне, прилегающей к подложке с образцом, размещен криогенный экран, также охлаждаемый жидким азотом. В качестве бомбардирующего газа использовали аргон, энергия первичного пучка составляла 4 кэВ.

Образец наносили на медную подложку в виде капли раствора объемом 5–10 мкл, замораживали в парах жидкого азота со скоростью ~200 °C/мин и на штоке системы прямого ввода быстро помещали в камеру источника ионов.

Растворы солей готовили на основе деионизированной воды. Использовали соли  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $BaCl_2$  марки "ч" производства Сакского химзавода (Украина). Для каждой соли исследовали растворы нескольких концентраций, которые выбирали по фазовым диаграммам водно-солевых систем, чтобы обеспечить формирование образцов с разной морфологией и составом.

При обработке масс-спектров проводилось разделение вкладов ионов с одинаковой массой, но разным химическим составом в интенсивность некоторых пиков, основанное на учете соотношения распространенности изотопов хлора  $^{35}Cl$  и  $^{37}Cl$ , которая составляет 3:1 (рис. 1, б). В соответствии с этим интенсивность пика, содержащего изотоп  $^{35}Cl$ , не должна превышать 300% от интенсивности пика, содержащего изотоп  $^{37}Cl$ ; превышающая это значение компонента должна относиться к ионам другого состава, в данном случае содержащим ОН-группу.

На рис. 1–4 представлены наиболее характерные масс-спектры, зарегистрированные при различных температурах образцов замороженных растворов некоторых из перечисленных солей; спектры остальных солей имели качественно схожий характер. Следует отметить, что, наряду с результатами, ожидаемыми в соответствии с ранее установленными закономерностями для растворов солей одновалентных металлов [13], для солей двухвалентных металлов был обнаружен ряд новых фактов.

Общей чертой всех НТ ББА масс-спектров является наличие серий кластерных ионов различного состава, причем основные типы ионов совпадают с обнаруженными ранее при изучении кристаллогидрата  $NaCl \cdot 2H_2O$  [13]. Спектры содержат пики, соответствующие иону металла  $Me^+$ , входящего в

риум conditions with the rate about 200 °C/min by means of LT FAB method.

The experiments accomplished by means of a magnetic mass-spectrometer MI-1201E (produced by "Electrone" production unit, Sumy, Ukraine), supplied with the low temperature ion source, described in [1]. The basic constructive element of this source is a cryogenic unit, cooled by a liquid nitrogen, where the base with a sample is placed. The sample temperature is controlled by temperature-sensitive resistor built-in the base. For the vacuum increase in the ion source in the zone, adjacent to the base with the sample, a cryogenic screen, frozen also by a liquid nitrogen, is placed. Argon was used as a bombarding gas, the energy of an primary beam made 4 keV.

The sample was applied on a copper base in the form of the solution drop with 5–10  $\mu l$  volume, frozen in the liquid nitrogen vapours with the rate of 200 °C/min and on the stock of the direct introduction system was quickly placed into the ion source chamber.

The salt solutions were prepared on the base of a deionized water. One used the  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $BaCl_2$  salts of the "p" mark, produced by Saki chemical factory (Ukraine). For each salt one investigated solutions of several concentrations, which were selected according to phase diagrams of aqueous-saline systems, in order to provide the formation of samples with different morphology and composition.

When treating mass-spectra one performed the separation of the ion contribution with the same mass, but different chemical composition in the intensity of some peaks, based on the consideration of the ratio of the  $^{35}Cl$  and  $^{37}Cl$  chlorine isotopes spreading, that makes 3:1 (Fig. 1, б). According to the fact the peak intensity containing the  $^{35}Cl$  isotope should not exceed 300% from the peak intensity, containing  $^{37}Cl$  isotope; the component exceeding this value must be related to ions of another composition, in the given case containing the OH-group.

The most typical LT FAB mass-spectra recorded at different temperatures of the frozen solution samples of some from mentioned salts are presented in Fig. 1–4; spectra of other salts had a qualitatively similar character. It should be noted, that together with results, expected in accordance with early determined regularities for solutions of monovalent metal salts [13], for salts of bivalent metals a number of new facts was revealed.

The presence of series of cluster ions of different composition is a common feature of the LT FAB mass-spectra, moreover the ion basic types coincide with revealed earlier ones when studying  $NaCl \cdot 2H_2O$  crystalline hydrate [13]. Spectra contain peaks, corresponding to the  $Me^+$  metal ion, composing the given



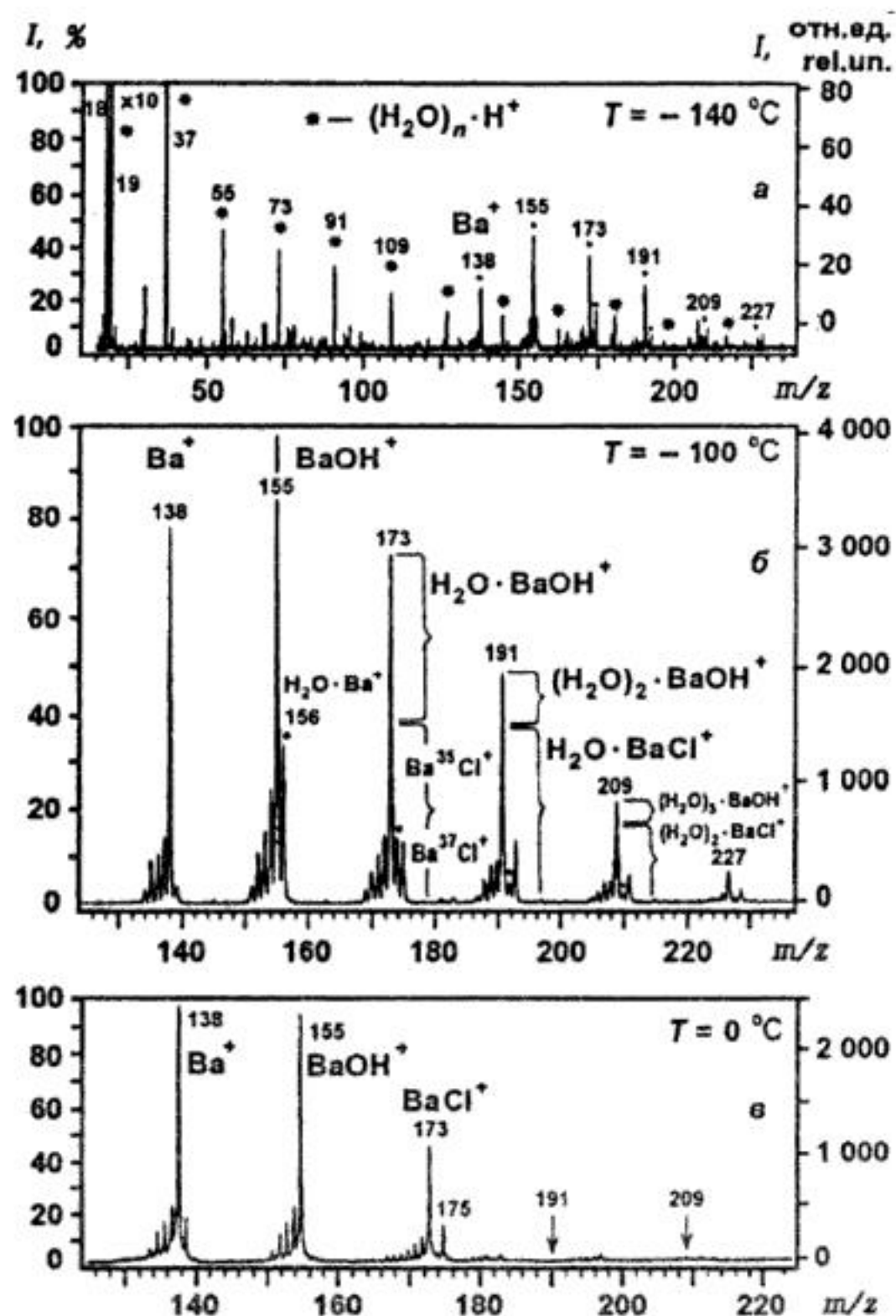


Рис. 1. Масс-спектры, полученные посредством бомбардировки быстрыми атомами аргона замороженного 0,1 М водного раствора соли  $\text{BaCl}_2$  при температурах образца:  $-140$  (а),  $-100$  (б),  $0$  °C (с).

Fig. 1. Mass-spectra, obtained by means of fast argon atom bombardment of a frozen 0.1 M aqueous solution of  $\text{BaCl}_2$  salt at temperatures of the sample:  $-140$  (a);  $-100$  (b);  $0$  °C (s).

состав данной соли, кластерам иона металла с водой  $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{Me}^+$ , кластерам иона металла с противоионом  $\text{Cl} \cdot \text{Me}^+$  и смешанным кластерам вода-металл-противоион  $[(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{Me} \cdot \text{Cl}]^+$  в различных соотношениях. Однако, наряду с ожидаемыми ионами, в спектрах солей Mg, Ca, Mn, Ba присутствуют ионы, не наблюдавшиеся ранее для растворов солей одновалентных металлов и отличающиеся наличием в составе кластера OH-группы:  $\text{MeOH}^+$  и  $[(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{OH} \cdot \text{Me}]^+$ .

В соответствии с разработанным ранее подходом [2, 6, 12–14, 16–19] при планировании эксперимента были использованы имеющиеся в литературе равновесные фазовые диаграммы для водных растворов исследуемых солей [4, 5, 8]. Согласно фазовым диаграммам во всех выбранных системах при замораживании выделяются фазы одного или нескольких новых (отличных от исходных компонентов) веществ, представляющих собой кристаллогидраты солей [4, 7]. Состав и морфология образца определяются начальной концентрацией раствора и могут меняться вследствие фазовых переходов в образце при изменении температуры, что находит отражение в характере масс-

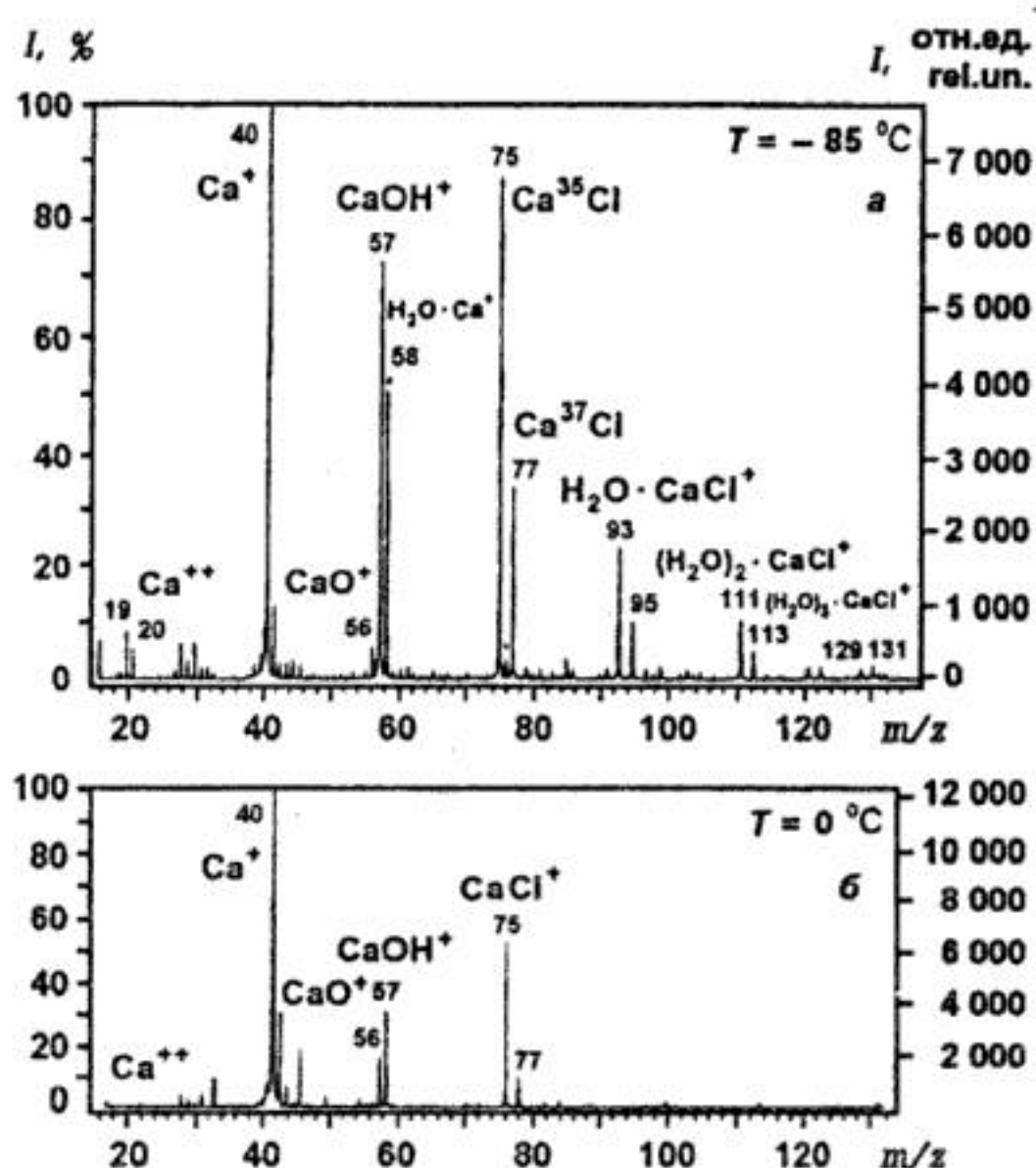


Рис. 2. ЛТ ББА масс-спектры замороженного 0,9 М водного раствора  $\text{CaCl}_2$ , зарегистрированные при температурах образца  $-85$  °C (а) и  $0$  °C (б).

Fig. 2. LT FAB mass-spectra of a frozen 0.9 M aqueous solution of  $\text{CaCl}_2$ , recorded at the sample temperatures of  $-85$  °C (a) and  $0$  °C (b).

spectra, to clusters of the metal ion with water  $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{Me}^+$ , to the metal ion clusters with the counter ion  $\text{Cl} \cdot \text{Me}^+$  and the  $[(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{Me} \cdot \text{Cl}]^+$  mixed clusters of water-metal-counter ion in different ratios. However, together with expected ions, in spectra of Mg, Ca, Mn, Ba salts there are ions not being seen earlier for solutions of monovalent metal salts and differing by the presence in the cluster composition of OH-group:  $\text{MeOH}^+$  and  $[(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{OH} \cdot \text{Me}]^+$ .

According to the developed earlier approach [2, 6, 12–14, 16–19] when planning the experiment one used existing in the literature equilibrium phase diagrams for aqueous solutions of studied salts [4, 5, 8]. In accordance with phase diagrams in all selected systems during freezing one isolates phases of one or several new (different from initial components) substances representing the salt crystalline hydrates [4, 7]. The sample composition and morphology are determined by an initial concentration of solution and may change due to phase transitions in a sample during the temperature change, that is reflected in the mass-spectra character, for whose interpretation it was necessary to make a conclusion on the structure of studied samples at the very first stage of the investigation. Below we demonstrate initial suppositions, which further were subjected to correction in accordance with the obtained experimental data.



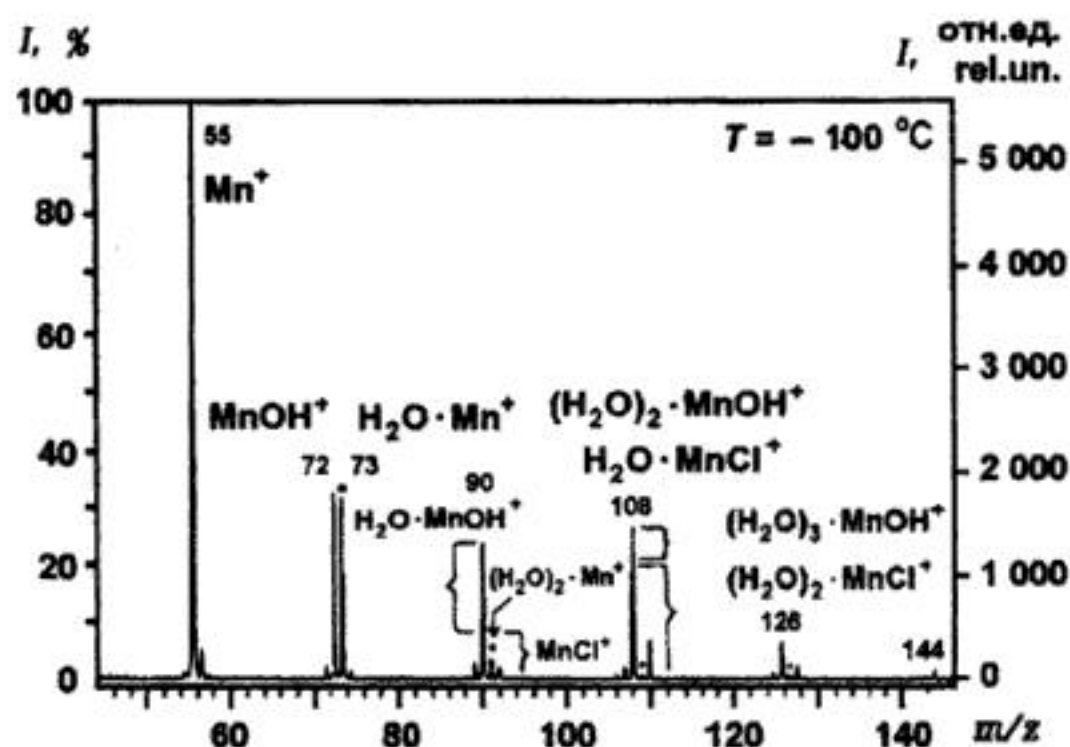


Рис. 3. НТ ББА масс-спектр замороженного 0,1 М водного раствора  $\text{MnCl}_2$ , полученный при температуре образца  $-100^\circ\text{C}$ . Метод разделения вкладов различных ионов в интенсивность ряда пиков тот же, что и на рис. 1.

Fig. 3. LT FAB mass-spectra of a frozen 0.1 M aqueous solution of  $\text{MnCl}_2$ , obtained at the sample temperature of  $-100^\circ\text{C}$ .

спектров, для интерпретации которых на самом первом этапе исследования необходимо было сделать заключение о структуре исследуемых образцов. Ниже мы приводим исходные предположения, которые затем подверглись корректировке в соответствии с полученными экспериментальными данными.

Известно, что при охлаждении растворов с концентрацией соли ниже эвтектической в системе первоначально начинается выделение фазы льда в виде сравнительно крупных кристаллов, а при достижении эвтектической температуры эвтектическая фаза, которая в общем случае представляет собой мелкодисперсную смесь более мелких кристаллитов льда и соответствующего кристаллогидрата [8], затвердевает. На рис. 1, а представлен НТ ББА масс-спектр, который по основным признакам должен соответствовать данному типу образца для системы  $(\text{BaCl}_2 + \text{H}_2\text{O})$ . Он содержит серию сравнительно интенсивных кластеров воды  $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$ , которые обычно связаны с фазой льда, и серию ионов, содержащих барий и связанных с кристаллогидратом. При концентрации выше эвтектической первой начинает выделяться фаза кристаллогидрата, а оставшаяся вода оказывается в составе мелкодисперсной эвтектики. В этом случае интенсивность кластеров воды должна быть незначительна, что связано с меньшим относительным содержанием кристаллов чистого льда. Для исходных концентраций, при которых возможно образование нескольких типов кристаллогидратов и соответственно имеется несколько эвтектических точек, кристаллы льда как источник кластеров воды в системе вообще отсутствуют (рис. 2).

При повышении температуры замороженных образцов водно-солевых растворов в системе обычно наблюдается два типа фазовых переходов: сублимация льда и дегидратация кристаллогидрата [13]. Эти же типы фазовых переходов зарегистрированы для растворов хлоридов двухвалентных ме-

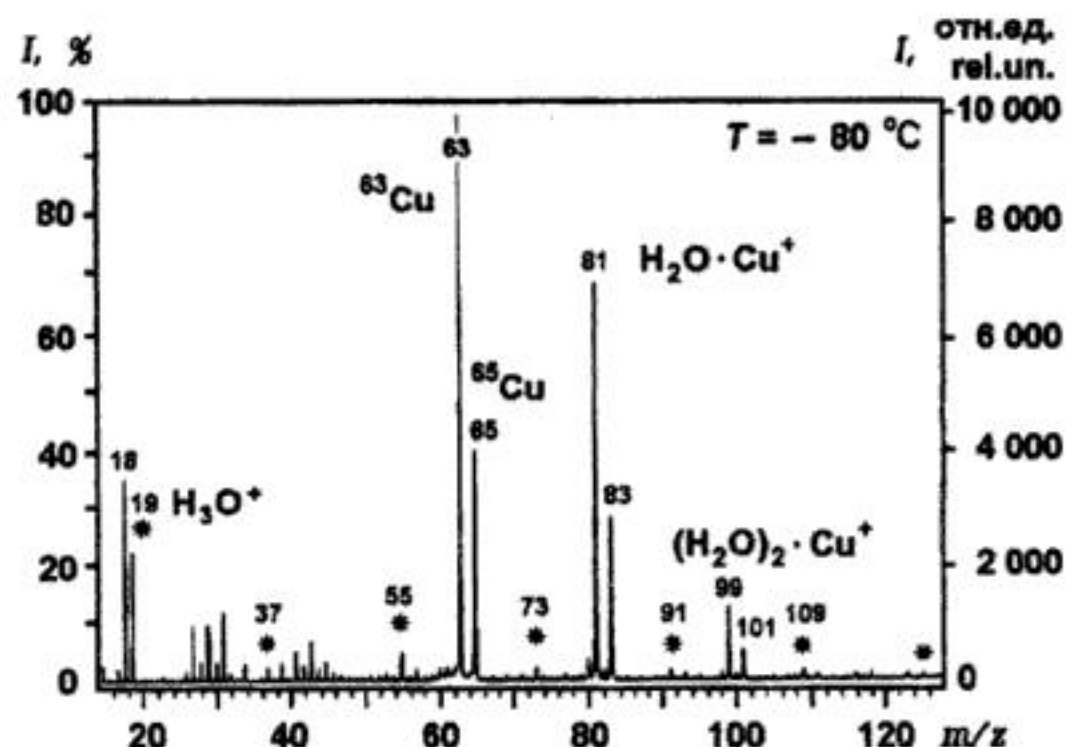


Рис. 4. НТ ББА масс-спектр замороженного 0,1 М водного раствора  $\text{CuCl}_2$ , полученный при температуре образца  $-80^\circ\text{C}$ .

Fig. 4. LT FAB mass-spectra of a frozen 0.1 M aqueous solution of  $\text{CuCl}_2$ , obtained at the sample temperature of  $-80^\circ\text{C}$ .

It is of common knowledge, that when cooling solutions with the salt concentration lower than an eutectic one, the ice phase formation as comparatively large crystals begins in the first place in the system, but when reaching an eutectic temperature, an eutectic phase, that, on general case, presents by itself a finely dispersed mixture of the smaller ice crystallites and a corresponding crystalline hydrate [8], solidifies. LT FAB mass-spectrum, that according to basic signs should correspond to the given type of the sample for the system  $(\text{BaCl}_2 + \text{H}_2\text{O})$  is presented in Fig. 1, a. It contains the series of comparatively intensive water clusters  $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$ , that are usually connected with the ice phase, the ion series containing barium and connecting with crystalline hydrate. At the concentration higher than an eutectic one, the crystalline hydrate phase begins to form the first, and the residual water occurs to be in the composition of a fine dispersed eutectic. In this case the intensity of the water clusters should be insignificant, that is related to the lesser relative content of the pure ice crystallites. For initial concentrations, when the formation of some crystalline hydrate types is possible, and, correspondingly, there are some eutectic points, the ice crystallites as the water clusters source in the system are absent at all (Fig. 2).

During the temperature increase of frozen samples of aqueous-saline solutions in the system, two types of phase transitions are observed: the ice sublimation and the crystalline hydrate dehydration [13]. The same types of phase transitions were recorded for solutions of the bivalent metal chlorides. However, it should be noted, that the  $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$  cluster series disappeared from spectra of corresponding samples at the temperature of  $-100 \div -80^\circ\text{C}$  (Fig. 1, 2), that was slightly lower than an established earlier temperature of the pure ice sublimation ( $-55^\circ\text{C}$  [12]) under experimental conditions of the installation used. The



таллов. Однако отметим, что кластерная серия  $(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{H}^+$  исчезала из спектров соответствующих образцов при температуре  $-100 \div -80^\circ\text{C}$  (рис. 1, 2), что несколько ниже установленной ранее температуры сублимации чистого льда ( $-55^\circ\text{C}$  [12]) в экспериментальных условиях используемой установки. Данный факт позволяет усомниться в принадлежности кластеров  $(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{H}^+$  к фазе чистого льда. После удаления из системы фазы, дававшей в спектре кластеры  $(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{H}^+$ , образец содержит только кристаллогидраты, и можно считать, что спектры на рис. 1, б, 2, а, 3 соответствуют чистым кристаллогидратам. Ранее на примере кристаллогидратов солей щелочных металлов было доказано [13], что источником молекул воды в смешанных кластерах является именно кристаллизационная вода, а не вода из соседних кристаллов льда, поскольку гидратные кластеры регистрируются в спектре и после полной сублимации кристаллов льда из гетерогенного образца. Дальнейшая эволюция образца при повышении температуры происходит в направлении дегидратации кристаллогидрата, параметры которой определяются свойствами каждого конкретного соединения. Изменения в спектрах за счет дегидратации кристаллогидратов (рис. 1, в и 2, б) состоят в исчезновении из спектров смешанных гидратных кластеров. Следует отметить, что на данном этапе исследований не удастся выявить параметры масс-спектров, которые позволили бы различать кристаллогидраты с регулярной кристаллической решеткой и аморфные зерна того же состава, и такое превращение, как кристаллизация стеклованных участков при отогреве образца, не находит явного отражения в масс-спектрах.

Два экспериментальных факта указывают на наличие определенных отклонений от описанных выше процессов, которые должны были бы реализовываться в соответствии с равновесными фазовыми диаграммами: 1) появление в спектрах ионов, в состав которых входит ОН-группа; 2) более низкая в сравнении с температурой сублимации льда температура исчезновения из спектров кластерной серии  $(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{H}^+$ . Рассмотрим возможные причины этих отклонений.

Появление в НТ ББА масс-спектрах замороженных растворов солей двухвалентных металлов кластерных ионов, содержащих ОН-группу, может быть обусловлено, с одной стороны, специфическими особенностями поведения ионов в газовой фазе, то есть чисто экспериментальными факторами, с другой — свойствами самого изучаемого образца. Можно предположить, что ионы  $\text{MeOH}^+$  и  $[(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{OH}\cdot\text{Me}]^+$  образуются путем специфической фрагментации, которая происходит либо в момент распыления ионов из твердого образца, либо при распаде гидратных кластеров. Однако появление в спектре новых ионов обычно свидетельствует о наличии в образце фазы еще одного нового веще-

given fact allows to doubt the belonging of the  $(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{H}^+$  clusters to the pure ice phase. After the phase removal from the system, given the  $(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{H}^+$  clusters in the spectrum, the sample contains only crystalline hydrates and one can consider, that the spectra in Fig. 1, б, 2, а, 3 correspond to pure crystalline hydrates. Considering as the example crystalline hydrates of alkaline metal salts it was proved earlier, that just a crystallization water, not water from adjacent ice crystals, is the source of water molecules in mixed clusters, since hydrate clusters are recorded in the spectrum and after a complete sublimation of the ice crystals from a heterogeneous sample. Further evolution of the sample during the temperature increase occurs in the direction of the crystalline hydrate dehydration, whose parameters are determined by properties of each concrete compounds. Changes in spectra due to the crystalline hydrate dehydration (Fig. 1, в and 2, б) consist in the disappearance from spectra of mixed hydrate clusters. It should be noted, that at the given investigation stage one does not manage to reveal the mass-spectra parameters, that should permit to distinguish crystalline hydrates with a regular crystal lattice and amorphous grains of the same composition and such transformation as crystallization of vitrified parts during the sample dehydration does not find an obvious reflection in mass-spectra.

Two experimental facts point to the presence of certain deviations from the described above processes, which should be realized in the conformity with Equilibrium phase diagrams: 1) appearance of ions with OH-group in spectra; 2) lower temperature of the  $(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{H}^+$  cluster series disappearance from spectra in comparison with the pure ice sublimation temperature. Let's consider possible causes of these deviations.

The appearance in LT FAB mass-spectra frozen solutions of the bivalent metal salts of cluster ions, containing OH-group, may be stipulated, on the one hand, by specific peculiarities of the ion behaviour in a gas phase, i.e. by quite experimental factors, on the other one — by properties of studied sample itself. One can suppose, that the  $\text{MeOH}^+$  and  $[(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{OH}\cdot\text{Me}]^+$  ions are formed by means of a specific fragmentation, occurring either in the ion sputtering moment from a solid sample, or during the hydrate clusters decay. However the appearance in spectrum of new ions usually testifies to the presence in the sample of the phase of one more new substance, that might be a hydroxide or a basic salt, proceeding from the observed ions type.

The decay pathway of an ion-precursor with the proton transition (or larger fragment containing proton) to some third particle is mainly possible [11]. However the analysis of possible mechanisms of a



ства, которым в данном случае, исходя из типа наблюдаемых ионов, может быть гидроокись или основная соль.

Путь распада иона-предшественника с переносом протона (или более крупного фрагмента, содержащего протон) к какой-либо третьей частице, в принципе, возможен [11]. Однако анализ возможных механизмов распада, на котором мы не будем здесь детально останавливаться, указывает на малую вероятность подобных процессов для кластеров  $(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{Me}^+$ . Отметим, что в НТ ББА масс-спектрах кристаллогидрата  $\text{NaCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  пик на массе, которая могла бы соответствовать иону  $\text{NaOH}\cdot\text{Na}^+$ , находится на уровне фона [13]; среди солей двухвалентных металлов кластеры, содержащие  $\text{OH}$ -группу, практически отсутствуют в спектрах хлорида (рис. 4) и сульфата меди.

Таким образом, следует обратиться ко второй гипотезе о соответствии  $\text{OH}$ -содержащих ионов еще одному или нескольким новым веществам, присутствующим, по всей видимости, в замороженном образце. Таким веществом может быть основная соль  $\text{Me}(\text{OH})\text{Cl}$  или гидроокись  $\text{Me}(\text{OH})_2$ . Данные типы соединений также могут образовывать кристаллогидраты, из которых возможно распыление гидратных ионов  $[(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{OH}\cdot\text{Me}]^+$ . Отметим, что масс-спектр основной соли качественно не отличим от спектра смеси нормальной соли и гидроокиси, поскольку в обоих случаях спектр будет содержать ионы как  $\text{MeOH}^+$ , так и  $\text{MeCl}^+$ . В связи с этим результаты настоящей работы позволяют констатировать факт образования нового вещества, в состав которого входят  $\text{OH}$ -группы, но не дают однозначного ответа на вопрос, является ли оно основной солью или гидроокисью.

Наиболее веским доказательством существования кристаллогидратов новых соединений в исследуемых образцах следует считать характер температурных изменений их масс-спектров. Как уже отмечалось, при дегидратации кристаллогидратов солей в образце остается фаза безводной соли и гидратные кластеры исчезают из спектра. То же самое должно происходить и с кристаллогидратами основных солей или гидроокисей. Действительно, при повышении температуры после полного исчезновения в спектрах гидратных кластеров ионов металлов  $(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{Me}^+$  (которые могли бы быть предшественниками  $\text{OH}$ -содержащих фрагментов)  $\text{OH}$ -содержащий ион  $\text{MeOH}^+$  регистрируется с высокой интенсивностью (рис. 1, в, 2, б). На основании вышесказанного можно заключить, что в образце остается фаза безводного вещества (основной соли или гидроокиси), из которой и происходит ион  $\text{MeOH}^+$ .

Рассмотрим возможные механизмы появления фазы кристаллогидрата нового вещества в наших образцах, наиболее вероятный из которых связан с явлением гидролиза. Известно, что при растворении в воде соли, образованной кислотой и основа-

decay, we will not consider in details, points to a slight probability of similar processes for the  $(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{Me}^+$  clusters. Let's underline, that in LT FAB mass-spectra of the  $\text{NaCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  crystalline hydrate the peak on the mass, which might correspond to the  $\text{NaOH}\cdot\text{Na}^+$  ion, is at the background level [13]; among the bivalent metal salts the clusters containing  $\text{OH}$ -group are practically absent in the chloride and (Fig. 4) and copper sulphate spectra.

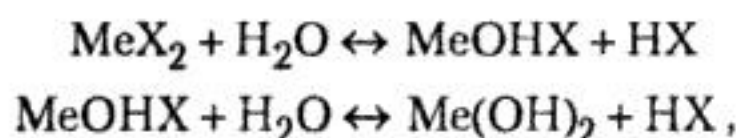
Thus, we should appeal to the second hypothesis on the conformity of  $\text{OH}$ -containing ions to one more or several new substances, present, to all appearances, in a frozen sample. The  $\text{Me}(\text{OH})\text{Cl}$  basic salt or the  $\text{Me}(\text{OH})_2$  hydroxide may be such substance. The given types of compounds may also form crystalline hydrates, from which the  $[(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{OH}\cdot\text{Me}]^+$  hydrate ion sputtering is possible. One should note, that the mass-spectrum of a basic salt does not qualitatively differ from the spectrum of the normal salt and hydroxide mixture, since in both cases the spectrum will contain both the  $\text{MeOH}^+$  ions and the  $\text{MeCl}^+$  ones. In this connection the results of the given work allow to state the fact of the new substance formation, with  $\text{OH}$ -groups being its part, but do not give a distinct answer on the question, if it is a basic salt or a hydroxide.

The most reasonable proof of the new compounds crystalline hydrates existence in the samples studied one should consider the character of temperature changes of their mass-spectra. As it was already noted, during the salt crystalline hydrate dehydration, the phase of a water-free salt remains in the sample and hydrate clusters disappear from the spectrum. The same must occur with the basic salt crystalline hydrates or hydroxides. Really, when increasing the temperature, after a complete disappearance of the  $(\text{H}_2\text{O})_n\cdot\text{Me}^+$  metal ion hydrate clusters (which might be precursors of  $\text{OH}$ -containing fragments) in spectra, the  $\text{OH}$ -containing  $\text{MeOH}^+$  ion is recorded with a high intensity (Fig. 1, в, 2, б). Basing on the mentioned above, one can conclude, that the phase of a water-free substance (basic salt or hydroxide), from which the  $\text{MeOH}^+$  ion proceeds, remains in the sample.

Let's consider possible mechanisms of the crystalline hydrate phase of a new substance appearance in our samples, the most evident from which is related to the hydrolysis phenomenon. It is of common knowledge, that when dissolving in water the salt, formed by an acid and a base, where at least one component is a weak one, the salt is subjected to hydrolysis. The bivalent metal chlorides may be considered as derivatives of a strong hydrochloric acid and weak hydroxides. The following two-stage hydrolysis way is typical for such salts [3, 9]:



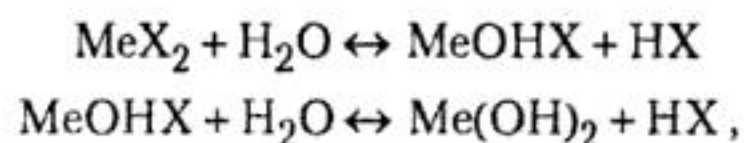
нием, из которых хотя бы один компонент является слабым, соль подвергается гидролизу. Хлориды двухвалентных металлов можно рассматривать как производные сильной соляной кислоты и слабых гидроокисей. Для таких солей характерен следующий двухступенчатый путь гидролиза [3, 9]:



сопровождающийся снижением *pH* раствора. Степень гидролиза зависит от концентрации, температуры раствора и свойств конкретной соли. Для многих солей образование основной соли более вероятно. Отсутствие OH-содержащих ионов в масс-спектрах замороженных водных растворов хлоридов гидроокисных металлов хорошо согласуется с тем фактом, что соли, образованные сильной кислотой и сильной гидроокисью, гидролизу не подвержены.

Процесс гидролиза обратим (за исключением случаев удаления из системы легколетучих или труднорастворимых продуктов), и при медленном выпаривании раствора при положительных температурах или при медленном охлаждении образуются кристаллы кристаллогидрата исходной соли. Однако при сравнительно быстром охлаждении раствора в условиях замедления скорости реакций и диффузии при понижении температуры равновесные условия не достигаются [20]. Можно предположить, что в связи с этим реакция, обратная гидролизу, не проходит до конца, в жидкой фазе остается некоторое количество продуктов гидролиза, система из двойной превращается в многокомпонентную и в результате выделяется фаза кристаллогидрата основной соли (или, с меньшей вероятностью, гидроокиси). При росте кристаллов основной соли остающаяся часть раствора будет иметь повышенное содержание протонов и анионов хлора, что допускает образование кристаллогидрата HCl. Контрольные эксперименты с замороженной соляной кислотой показали, что ионы, распыляемые из такого кристаллогидрата, по массам совпадают с кластерной серией воды  $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$ , однако протон в данном случае поступает от HCl. Признаком, отличающим ИТ ББА спектр  $\text{HCl} \cdot m\text{H}_2\text{O}$  от спектра чистого льда, является повышение интенсивности кластеров с  $n = 1-3$ . Предположение о наличии в образце кристаллогидратов HCl позволяет объяснить более низкую температуру исчезновения кластерной серии  $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$ , которая в таком случае будет относиться не к чистому льду, а к данному кристаллогидрату, характеризующемуся другим температурным поведением [4].

Таким образом, можно сделать вывод, что при неравновесных условиях охлаждения водных растворов некоторых хлоридов двухвалентных металлов процесс, обратный гидролизу, не успевает завершиться и в замороженном образце выделяются фазы, соответствующие продуктам гидролиза.



accompanying by the *pH* solution decrease. The hydrolysis degree depends on the concentration, solution temperature and the distinct salt properties. For many salts the basic salt formation is more probable. The absence of OH-containing ions in mass-spectra of frozen aqueous solutions of alkaline metal chlorides well coordinates with the fact, that salts formed by a strong acid and a strong alkali are not subjected to hydrolysis.

The hydrolysis process is reversible (except the cases of the removal of easily volatile and hardly soluble products from the system) and during a slow evaporation of solution at positive temperatures or during a slow cooling, the crystals of the initial salt crystalline hydrate are formed. However during a comparatively rapid cooling of solution under conditions of the reaction rate inhibition and diffusion at the temperature decrease, equilibrium conditions are not reached [20]. One can suppose, that in this connection the reaction, reversible to hydrolysis, is not completed, a certain number of hydrolysis products remains in a liquid phase, the system from the double transforms into a polycompetent one and as a result, the crystalline hydrate of the basic salt (or, with the lesser probability, hydroxide) is formed. During the growth of basic salt crystals a remained part of solution will have an increased contain of protons and chlor anions, that assumes the HCl crystalline hydrate formation. Control experiments with a frozen hydrochloric acid demonstrated, that the ions, sputtered from such crystalline hydrate coincide with the  $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$  water cluster series, but proton, in the given case, is supplied by HCl. An increase in cluster intensity with  $n = 1-3$  is the sign distinguishing LT FAB spectrum of  $\text{HCl} \cdot m\text{H}_2\text{O}$  from the pure ice spectrum. The supposition on the presence of HCl crystalline hydrates in the sample permits to explain a lower temperature of the  $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$  cluster series disappearance, that will be related not only to a pure ice, but to the given crystalline hydrate, characterizing by another temperature behaviour [4].

Thus, we can conclude, that under non equilibrium conditions of cooling of aqueous solutions of the some bivalent metal chlorides, the process, reversible to hydrolysis, is not completed and the phases, corresponding to hydrolysis products are formed in a frozen sample. The possibility of such deviations from the processes, described by equilibrium phase diagrams, should be taken into consideration when interpreting the results of experimental investigations of rapidly cooled aqueous-saline systems.

Let's once more appeal to LT FAB mass-spectra in order to compare the level of the described processes for different salts. The most intensity of  $\text{MeOH}^+$  ion



Возможность таких отклонений от процессов, описываемых равновесными фазовыми диаграммами, необходимо учитывать при интерпретации результатов экспериментальных исследований быстро охлажденных водно-солевых систем.

Обратимся еще раз к НТ ББА масс-спектрам для сравнения уровня описанных процессов для различных солей. Наибольшая интенсивность иона  $\text{MeOH}^+$  характерна для системы, содержащей  $\text{BaCl}_2$ , за ней следуют  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ . Гидратные кластеры  $[(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{OH} \cdot \text{Me}]^+$  интенсивны в спектрах бария и марганца, а в спектрах кальция их нет (рис. 2, а), что согласуется с отсутствием кристаллогидратов у  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  [4].

Как уже отмечалось, в НТ ББА спектрах солей меди ОН-содержащие пики отсутствуют. В данном случае определенную роль может играть кинетический фактор: для солей меди процесс, обратный гидролизу, по всей видимости, протекает быстрее и эффективнее и успевает завершиться даже при пониженных температурах. Следует напомнить, что стабильные кристаллогидраты меди существуют уже при комнатной температуре.

Интересно, что продукты гидролиза в растворе можно наблюдать с помощью такого масс-спектрометрического метода ионизации, как электрораспыление ионов из растворов. Проанализировав полученные этим методом спектры серии различных солей, авторы [15] пришли к выводу, что состав и соотношение пиков в спектре отражает состав раствора, определяемый процессом гидролиза.

Гидролиз солей играет важную роль в функционировании биологических жидкостей, в частности, плазмы крови и лимфы, которые характеризуются надежными буферными свойствами в области температур существования живых организмов. Однако при замораживании как биологических жидкостей, так и криопротекторных сред ряд процессов может носить неравновесный характер. Обнаруженные особенности поведения растворов солей двухвалентных металлов могут представлять интерес при обсуждении механизмов повреждения биоматериала при замораживании и последующем размораживании. Известно, что одним из повреждающих факторов при замораживании является изменение концентрации и  $pH$  раствора, но и при успешном замораживании часть негативных факторов может сказываться на этапе размораживания. В свете высказанной гипотезы о выделении фазы кристаллогидратов продуктов гидролиза находящиеся в растворе биомолекулы при замораживании могут оказаться в непосредственном контакте с такими кристаллами; при последующем отогреве и плавлении концентрация раствора со временем выравнивается, но в первые мгновения плавления конкретного кристалла биомолекула может оказаться в локальной области с аномально высоким или низким  $pH$ , что может вызвать ее повреждение (денатурацию или деградацию). Данная гипотеза,

is typical for the system, containing  $\text{BaCl}_2$ , then  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ .  $[(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{OH} \cdot \text{Me}]^+$  hydrate cluster are intensive in barium and manganese spectra, but they are absent in calcium spectra (Fig. 2, a), that confirms with the clystalline hydrate absence in  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  [4].

As it was already noted, in LT FAB spectra of copper salts there are no OH-containing peaks. In given case a kinetic factor may play a certain role: for copper salts the process, reversible to hydrolysis, in all appearances, proceeds more rapidly and efficiently and manages to finish even at decreased temperatures. It should be reminded, that stabile copper crystalline hydrates have already existed at a room temperature.

It is interesting, that hydrolysis products in solution can be observed by means of such a mass-spectrometrical method of ionization, as the ions electrospraying from solutitons. After analysing the series spectra of different salts, obtained by means of this method, the authors [15] concluded, that the composition and ratio of peaks in spectrum reflect the composition of the solution, determined by the hydrolysis process.

Hydrolysis of salts plays an important role in biological fluids functioning, in particular, blood plasm and lymph, characterizing by reliable buffer properties in the temperatures field of the alive organisms existence. However, when freezing both biological fluids and cryoprotective media, a number of processes may have a non equilibrium character. Peculiarities revealed of the bivalent metal salts behaviour may present the interest when discussing the mechanisms of the biomaterial damage during freezing and following freeze-thawing. It is known, that one of damaging factors within freezing is the change of concentration and  $pH$  of solution, but during successful freezing a part of negative factors may be revealed at the freeze-thawing stage. As for hypothesis mentioned on the crystalline hydrate phase formation of hydrolysis products, the biomolecules, being in solution, may be found in a direct contact with such crystals within freezing; during following freeze-thawing and fusion the solution concentration gets equal with a time, but in the first moments of fusion of a distinct crystal a biomolecule may be found in a local field with an abnormally high or low  $pH$ , that will result in its damage (denaturation or degradation). The given hypothesis requires, of course, further experimental verification.

Thus, in the given work for the first time one obtained LT FAB spectra of frozen aqueous solutions of the  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$  bivalent metal chloride series. Together with an expected ions set of  $\text{Me}^+$ ,  $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{Me}^+$ ,  $[(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{Me} \cdot \text{Cl}]^+$ , corresponding to  $\text{MeCl}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$



естественно, требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Таким образом, в настоящей работе впервые получены НТ ББА масс-спектры замороженных водных растворов ряда хлоридов двухвалентных металлов  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $BaCl_2$ . Наряду с ожидаемым набором ионов  $Me^+$ ,  $(H_2O)_n \cdot Me^+$ ,  $[(H_2O)_n \cdot Me \cdot Cl]^+$ , соответствующих кристаллогидратам  $MeCl_2 \cdot nH_2O$ , обнаружена серия ионов, содержащих ОН-группу:  $MeOH^+$ ,  $[(H_2O)_n \cdot OH \cdot Me]^+$ . Высказано предположение, что данные пики относятся к новым фазам кристаллогидратов основных солей или, с меньшей вероятностью, гидроокисей. Рассмотрены возможные причины появления фазы, связанной с новыми веществами, наиболее вероятной из них является кристаллизация некоторых продуктов гидролиза солей при неравновесных условиях замораживания. Особенности температурных зависимостей кластеров  $(H_2O)_n \cdot H^+$  позволили сделать предположение о принадлежности их к фазе кристаллогидрата  $HCl$ , выделяющейся из раствора,  $pH$  которого уменьшается вследствие гидролиза. Отмечена необходимость критической оценки возможных отклонений от равновесных фазовых диаграмм при изучении процессов охлаждения и замораживания водно-солевых систем со скоростями, применяемыми в криобиологической практике. Подтверждены обнаруженные ранее чувствительность метода ББА к гетерогенной структуре образца, формирующейся при его замораживании, и следующие из этого возможности установления наличия различных фаз в образце и определения их химического состава непосредственно в условиях низких температур.

Автор выражает благодарность Вовку О. М. и Боряку О. А. за ценное обсуждение материалов работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Боряк О.А., Косевич М.В., Шелковский В.С. Низкотемпературный вторично-эмиссионный источник ионов к масс-спектрометру МИ-1201Б // Приборы и техника эксперимента. — 1993. — № 6. — С. 176–181.
2. Боряк О.А., Косевич М.В., Шелковский В.С., Благой Ю.П. Возможность изучения замороженных растворов азотистых оснований с помощью низкотемпературной масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами // Биофизика. — 1996. — 41, № 6. — С. 1207–1213.
3. Бугаевский А.А. Приближенные оценки равновесного состава растворов. — Харьков: Фолио, 1998. — 228 с.
4. Гороновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некрасов Е.Ф. Краткий справочник по химии. — Киев: Наук. думка, 1987. — 830 с.
5. Здановский А.Б. Справочник экспериментальных данных по растворимости солевых систем. Т. 3. Элементы I группы и их соединения. — Л.: Госхимиздат, 1961. — 1276 с.
6. Косевич М.В. Наблюдение эффектов, связанных с гидратацией, в охлажденных и замороженных растворах методом вторично-ионной масс-спектрометрии // Вісник ХДУ. № 422. Біофіз. вісник. — 1998. — Вип. 2. — С. 5–22.
7. Маленков Г.Г. Геометрия построек из молекул воды в структурах гидратов // Журн. структурной химии. — 1962. — 3. — С. 220–224.
8. Косевич М.В. Observation of hydration-connected effects in cooled and frozen solutions by means of secondary ion mass spectrometry // Bulletin of Kharkov University № 422. Biophysical bulletin. — 1998. — Issue 2. — P. 5–22.
9. Malenkov G.G. The geometry of arrangement from water molecules in hydrate structures // J. Structural Chemistry. — 1962. — № 3. — P. 220–224.
10. Mikheyeva V.I. Methods of Physical and Chemical Analysis in Non-organic Synthesis. — M.: Nauka, 1975. — 272 p.
11. Nazarenko V.A., Antonovich V.P., Nevskaya E.I. Metal ions hydrolysis in diluted solutions. — M.: Atom Publishing House, 1976. — 192 p.
12. Semenov N.V. Biochemical components and components of human vital media and tissues. — M.: Medicine, 1971. — 152 p.
13. Benninghoven A. Some aspects of secondary ion mass spectrometry // Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. — 1983. — 53. — P. 85–99.
14. Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Blagoy Yu.P. Study of water-cryoprotector mixtures by low-temperature fast atom bombardment mass spectrometry // Rapid Commun. in Mass Spectrom. — 1995. — 9, № 11. — P. 978–984.
15. Boryak O.A., Stepanov I.O., Kosevich M.V. et al. Origin of clusters. I. Correlation of low temperature fast atom bombardment mass spectra with phase diagram of NaCl–water solutions // Europ. Mass Spectrom. — 1996. — 2, № 6. — P. 329–339.

## REFERENCES



8. *Мухеева В.И.* Методы физико-химического анализа в неорганическом синтезе.— М.: Наука, 1975.— 272 с.
9. *Назаренко В.А., Антонович В.П., Неевская Е.И.* Гидролиз ионов металлов в разбавленных растворах.— М.: Атомиздат, 1976.— 192 с.
10. *Семенов Н.В.* Биохимические компоненты и компоненты жизненных сред и тканей человека.— М.: Медицина, 1971.— 152 с.
11. *Benninghoven A.* Some aspects of secondary ion mass spectrometry // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*— 1983.— 53.— P. 85–99.
12. *Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Blagoy Yu.P.* Study of water-cryoprotector mixtures by low-temperature fast atom bombardment mass spectrometry // *Rapid Commun. in Mass Spectrom.*— 1995.— 9, № 11.— P. 978–984.
13. *Boryak O.A., Stepanov I.O., Kosevich M.V. et al.* Origin of clusters. I. Correlation of low temperature fast atom bombardment mass spectra with phase diagram of NaCl–water solutions // *Europ. Mass Spectrom.*— 1996.— 2, № 6.— P. 329–339.
14. *Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S.* On some peculiarities of low temperature fast atom bombardment mass spectra of ethanol // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*— 1997.— 163, № 3.— P. 177–184.
15. *Cheng Z.L., Siu K.W.M., Guevremont R., Berman S.S.* Electrospray mass spectrometry: a study on some aqueous solutions of metal salts // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*— 1992.— 3.— P. 281–288.
16. *Kosevich M.V.* Correlation between fast atom bombardment mass spectral patterns of alcohols and the physical state of the sample under low temperature // *Europ. Mass Spectrom.*— 1997.— 3, № 4.— P. 320–322.
17. *Kosevich M.V., Boryak O.A., Stepanov I.O., Shelkovsky V.S.* Origin of clusters. II. Distinction of two different processes of formation of mixed metal/water clusters under low-temperature fast atom bombardment // *Europ. Mass Spectrom.*— 1997.— 3, № 1.— P. 11–17.
18. *Kosevich M.V., Boryak O.A., Shelkovsky V.S., Derrick P.J.* Origin of clusters. III. On the possibilities of production of mixed water-organic solute clusters under fast-atom bombardment at subzero temperatures // *Europ. Mass Spectrom.*— 1998.— 4, № 1.— P. 31–37.
19. *Kosevich M.V., Czira G., Boryak O.A., et al.* Temperature dependencies of ion currents of alcohol clusters under low-temperature secondary mass spectrometric conditions // *J. of Mass Spectrom.*— 1998.— 33, № 9.— P. 843–849.
20. *Sesták J.* Thermophysical properties of solids. Theoretical measurements and theoretical thermal analysis.— Prague: Academia, 1991.— 440 p.

Accepted in 25.11.98

Поступила 25.11.98



# Анализ процесса продавливания эритроцита через микропипетку на основе простых геометрических и физических соображений

Л. И. ГАРДАШ, Е. А. ГОРДИЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Analysis of the Process of Erythrocyte Pressing through Micropipette Basing on Simple Geometrical and Physical Notions

L. I. GARDASH, E. A. GORDIENKO

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

Исходя из простых геометрических и физических соображений, проанализирован процесс продавливания эритроцита через микропипетку с диаметром, не превосходящим характерный размер этих клеток.

Виходячи з простих геометричних і фізичних міркувань, проаналізовано процес продавлювання еритроцита крізь мікропипетку з діаметром, який не перевищує характерний розмір цих клітин.

Basing on simple geometrical and physical notions, the process of erythrocyte pressing through micropipette with the diameter, not exceeding these cells characteristic size, was analysed.

Втягивание клеток, в частности эритроцитов, в микропипетку с диаметром, не превышающим их характерный размер, эффективно используется для определения механических свойств биомембран [4, 10]. Указанный процесс сопровождается деформацией клеточных мембран и зависит при определенных условиях преимущественно от механических свойств самих мембран, а не от упругопластических свойств внутриклеточного содержимого [4].

Известны три типа деформации тонких оболочек [1], какими являются биологические мембраны: 1) неизотропное растяжение мембраны, оставляющее неизменной площадь каждого деформируемого элемента, но не его форму; 2) изгибание, которое оставляет неизменной метрику срединной поверхности мембраны и связано с изменением ее средней кривизны; 3) изотропное растяжение, при котором ее натяжение  $\sigma$  пропорционально относительному увеличению площади мембраны  $S$  в процессе деформации:

$$\sigma = \Gamma \frac{S - S_0}{S_0}, \quad (1)$$

где  $S_0$  — площадь клеточной мембраны при отсутствии деформации;  $\Gamma$  — изотермический модуль растяжения клеточной мембраны. Для эритроцитов человека  $\Gamma = 0,45$  Н/м [5]. В общем случае деформация клеточной мембраны представляет собой суперпозицию всех трех типов. При первых двух типах деформации в отличие от третьего типа измеренная площадь клеточной мембраны в процессе втягивания в микропипетку остается неиз-

Cell pulling-in, in particular, erythrocytes, into a micropipette with the diameter, not exceeding their characteristic size, is efficiently used to determine mechanical properties of biomembranes [4, 10]. The process mentioned is accompanied by cellular membrane deformation and depends under certain conditions mainly on mechanical properties of the membranes themselves, but not on elastic-plastic properties of intracellular content [4].

Three types of deformation of thin covers, that are biological membranes, are known [1]: 1) non-isotropic membrane tension, keeping the area of each deformed element the same, but not its shape; 2) bending, that remains the same metrics of middle membrane surface and related to the change in its average curvature; 3) isotropic tension, at which tension  $\sigma$  is proportional to a relative increase in the  $S$  membrane square in the deformation process:

$$\sigma = \Gamma \frac{S - S_0}{S_0}, \quad (1)$$

where  $S_0$  — the square of cellular membrane when deformation is absent;  $\Gamma$  — isothermic modules of cellular membrane tension. For human erythrocytes  $\Gamma = 0.45$  N/m [5]. In general case a cellular membrane deformation is the superposition of all mentioned three types. In the case of two first types of deformation in contrast to the third one the measured square of cellular membrane in the process of pulling-in into a micropipette remains constant. As the experiment [4] shows, free energy of deformation of isotropic tension considerably exceeds a free energy of bending and



менной. Как показывает эксперимент [4], свободная энергия деформации изотропного растяжения значительно превышает свободную энергию изгиба и сдвига в плоскости мембраны. Поэтому в соответствии с термодинамическим принципом минимума свободной энергии, если допускают внешние условия, мембране термодинамически выгодно принимать ту или иную форму не за счет изотропного растяжения, а путем сдвига в плоскости мембраны и изгиба. Но если при деформации имеет место изотропное растяжение мембраны, то можно не принимать во внимание остальные два типа деформации, допуская при этом лишь пренебрежимо малую погрешность.

Деформации сдвига в плоскости мембраны и изгиба не вызывают сколько-нибудь значительного натяжения мембраны и поэтому не могут привести к ее механическому разрушению. Именно эти типы деформации имеют место, например, при прохождении эритроцитов и других форменных элементов крови через микрокапилляры в кровеносной системе, что обеспечивает длительную сохранность этих клеток при микроциркуляции. Изотропное растяжение мембраны приводит к разрушению клеток по механизму, описанному в [2]. Цель работы — определение условий, при которых процесс втягивания суспензии эритроцитов человека в цилиндрическую микропипетку сопровождается изотропным растяжением его мембраны и, следовательно, гемолизом, а также оценка величины изотропного тангенциального напряжения, возникающего в мембране.

В соответствии с [8] форма передней части эритроцита, продавливаемого через микропипетку, является сферой. Можно считать, что ее радиус  $r$  совпадает с радиусом микропипетки. Обозначим длину втянутой в микропипетку части клетки от входа в микропипетку до сферической «шапочки»  $l$  (рис. 1), а площадь поверхности и объем находящейся вне пипетки части эритроцита  $S$  и  $V$  соответственно. Исходные значения площади поверхности и объема клетки обозначим  $S_0$  и  $V_0$ . Если эритроциты взвешены в водном растворе не проникающего через их мембрану вещества, например хлорида натрия или сахарозы, и объем внеклеточного раствора значительно превышает суммарный объем клеток в суспензии, то зависимость объема клетки  $V_c$  от осмотического давления  $\pi$  растворенного во внешней среде вещества и трансмембранного перепада давления  $\Delta p$  в состоянии термического равновесия описывается уравнением [2]:

$$V_c = \alpha V_0 + \frac{(1 - \alpha) V_0 \pi_0}{\pi + \Delta p}, \quad (2)$$

где  $\alpha$  — объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ, которая для эритроцитов человека равна 0,46 [7];  $\pi_0$  — осмотическое давление изотонического раствора, равное примерно  $8 \cdot 10^5$  Н/м. Разность трансмембранного перепада давлений между клеткой и окружающей ее средой

$$\Delta P = 2\sigma H = 2\Gamma H \frac{S - S_0}{S_0}, \quad (3)$$

shift in membrane plane. So in the accordance with thermodynamic principle of the minimum of free energy, if external conditions permit, it is thermodynamically advantageous for membrane to accept this or that shape not due to isotropic tension, but by means of shifting in the plane of membrane and bending. However if during deformation there is isotropic membrane tension, then one can not to consider the rest two types of deformation, that may cause only neglectedly small error.

Shift deformation in membrane and bending plane do not cause any significant membrane tension and so can not result in its mechanical destruction. It is these types of deformation take place, for example, when erythrocytes and other blood elements pass through microcapillaries in blood circulation system, that provides a long-term integrity of these cells at microcirculation.

Isotropic membrane tension results into the destruction of cells on the mechanism, described in [2]. The aim of the work is to determine the conditions, when the process of pulling-in of the human erythrocyte suspension into cylindrical micropipette is accompanied by an isotropic tension of its membrane and as a consequence by hemolysis, as well as the estimation of the value of isotropic tangential tension, appearing in membrane.

In the accordance with [8] the shape of anterior part of erythrocyte, being pressed through a micropipette, is a sphere. One can consider, that the radius  $r$  coincides with the one of micropipette. Let define the length of pulled-in cell part from the entering into a micropipette up to spheric «cap» as the  $l$  value, and the square of surface and volume of being out of pipette part of an erythrocyte as  $S$  and  $V$ , respectively. Initial values of surface square and cell volume are defined as  $S_0$  and  $V_0$ . If erythrocytes are suspended in one aqueous solution of non-penetrating through a membrane substance, for example, sodium chloride or sucrose, and the volume of extracellular solution considerably exceeds a total cell volume in the suspension, then the dependency of cell volume

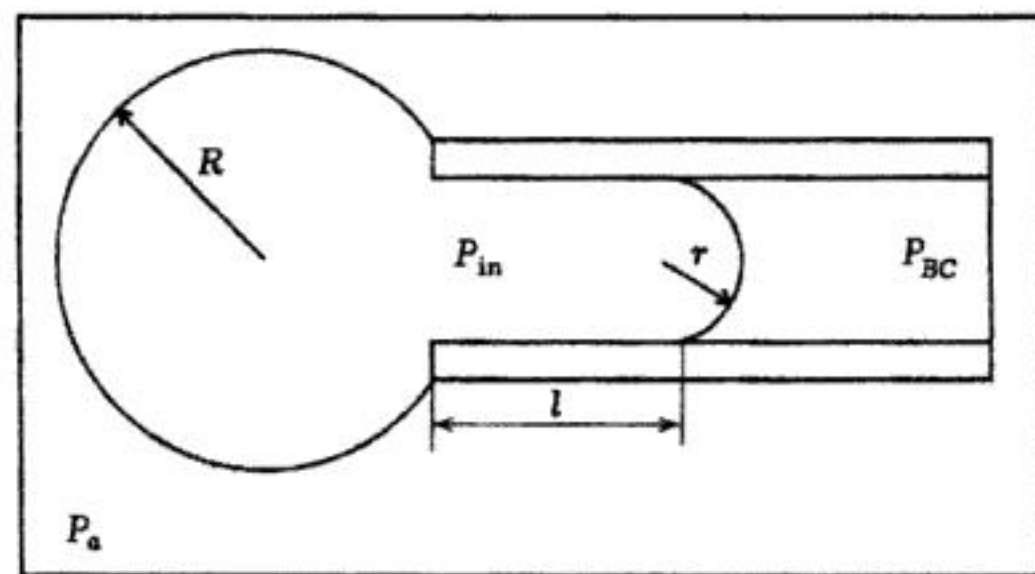


Рис. 1. Схематическое изображение втягиваемого в цилиндрическую микропипетку эритроцита в момент и после возникновения изотропного натяжения в его мембране.

Fig. 1. Schematic image of the erythrocyte being pulled into a cylindrical micropipette into the moment and after appearance of isotropic tension in its membrane.



где  $H$  — средняя кривизна мембраны эритроцита. Поскольку при отсутствии гемолиза значение величины  $(S - S_0)/S_0$  не превышает 0,04 [4], то из (2) и (3) следует, что изменение относительного объема эритроцитов, которое возникает при увеличении изотропного натяжения их мембран вплоть до величин, при которых наступает гемолиз, при  $Hr > 1$  не превышает значения

$$\frac{V_c - V_0}{V_0} = 2\Gamma H (1 - \alpha) \frac{S - S_0}{S_0 \pi_0} \approx 0,013.$$

Следовательно, в этих условиях можно считать объем деформируемого в результате продавливания через микропипетку эритроцита практически неизменным и равным его начальному (до продавливания) значению  $V(0)$ .

Как показывает анализ с помощью вариационного исчисления [1], при переходе деформации мембраны продавливаемого через микропипетку эритроцита от изгибания и сдвига в плоскости мембраны к изотропному растяжению оставшаяся не втянутой в микропипетку часть мембраны принимает форму части сферы, которая опирается на окружность, ограничивающую вход в микропипетку (рис. 1). Из простых геометрических соображений следует, что в момент, после которого мембрана втягиваемого в микропипетку эритроцита начинает растягиваться, выполняются следующие условия:

$$1 + y + x^2 + x \sqrt{x^2 - 1} = S(0)/2\pi r^2; \quad (4)$$

$$2 + 3y + 2x^3 + (2x^2 + 1) \sqrt{x^2 - 1} = V(0)/\pi r^3,$$

где  $y = l/r$ ,  $x = R/r$ . Исключая из системы этих равенств  $y$ , находим

$$2x^3 - 3x^2 - 1 + (2x^2 - 3x + 1) \sqrt{x^2 - 1} = 3V(0)/\pi r^3 - 3S_0/2\pi r^2. \quad (5)$$

По данным [6] для эритроцитов человека  $S_0 = 129,95 \pm 15,86$  мкм<sup>2</sup> и  $V_0 = 97,91 \pm 16,6$  мкм<sup>3</sup>. Вычисленные с помощью (5) зависимости радиуса  $R^*$  не втянутой в микропипетку части мембраны эритроцита, соответствующего началу ее изотропного растяжения, от радиуса микропипетки  $r$  и начального значения объема эритроцита  $V(0)$  или исходного значения величины площади его поверхности представлены на рис. 2 и 3.

Ясно, что продавливаемый через микропипетку эритроцит не будет подвергаться изотропному растяжению и, следовательно, гемолизировать, если  $R^* = r$  или  $x = 1$ , т. е. если, как следует из (5), радиус микропипетки превышает размер, который определяется условием

$$r^3 - \frac{3S_0 r}{4\pi} + \frac{3V(0)}{2\pi} = 0. \quad (6)$$

Рассчитанные по (6) зависимости минимального радиуса микропипетки, при котором в мембране продавливаемого через нее эритроцита отсутствует изотропное растяжение, от исходных значений  $V(0)$  или  $S(0)$  представлены на рис. 4.

Как видно из результатов проведенных с учетом данных [6] расчетов, эритроциты, взвешенные в

$V_c$  on osmotic pressure  $\pi$  of dissolved in outer medium substance and transmembrane pressure overfall  $\Delta p$  in the state of thermic balance is described by the equation [2]:

$$V_c = \alpha V_0 + \frac{(1 - \alpha) V_0 \pi_0}{\pi + \Delta p}, \quad (2)$$

where  $\alpha$  — volumetric portion of osmotically inactive intracellular substances, which for human erythrocytes makes 0.46 [7],  $\pi_0$  — osmotic pressure of isotonic solution, makes approximately  $8 \cdot 10^5$  N/m. The difference of transmembrane overfall of pressures between a cell and its environment is:

$$\Delta P = 2\sigma H = 2\Gamma H \frac{S - S_0}{S_0}, \quad (3)$$

where  $H$  — is an average curvature of erythrocyte membrane. Since when hemolysis is absent, the  $(S - S_0)/S_0$  value does not exceed 0.04 [4], then (2) and (3) demonstrate, that the change in relative volume of erythrocytes, appearing with an increase in isotropic tension of their membranes up to values, at those hemolysis starts, at  $Hr > 1$  does not exceed the value

$$\frac{V_c - V_0}{V_0} = 2\Gamma H (1 - \alpha) \frac{S - S_0}{S_0 \pi_0} \approx 0.013.$$

So, under these conditions we can consider the volume of deformed in the result of pressing through a micropipette erythrocyte as practically not changed and equal to its initial (before pressing through)  $V(0)$  value.

As the analysis by means of variational calculation shows [1], during the transition of membrane deformation of pressed through a micropipette erythrocyte from bending and shift in the membrane plane to isotropic tension, remained not-pulled-in part of membrane takes a shape of the part of sphere, leaning on the circle, limiting the entrance into a micropipette (Fig. 1). From simple geometrical notions it is seen, that in the moment, after which the membrane of erythrocyte being pulled-in into a micropipette gets extended, the following conditions are met:

$$1 + y + x^2 + x \sqrt{x^2 - 1} = S(0)/2\pi r^2; \quad (4)$$

$$2 + 3y + 2x^3 + (2x^2 + 1) \sqrt{x^2 - 1} = V(0)/\pi r^3,$$

where  $y = l/r$ ,  $x = R/r$ . Excluding  $y$  from the system of these equations, we can obtain:

$$2x^3 - 3x^2 - 1 + (2x^2 - 3x + 1) \sqrt{x^2 - 1} = 3V(0)/\pi r^3 - 3S_0/2\pi r^2. \quad (5)$$

According to the data [6] for human erythrocytes  $S_0 = 129.95 \pm 15.86$  μm<sup>2</sup> and  $V_0 = 97.91 \pm 16.6$  μm<sup>3</sup>. Calculated by means of (5) dependencies of  $R^*$  radius of non-pulled-in part of erythrocyte membrane, corresponding to the start of its isotropic tension, on micropipette radius  $r$  and initial value of erythrocyte



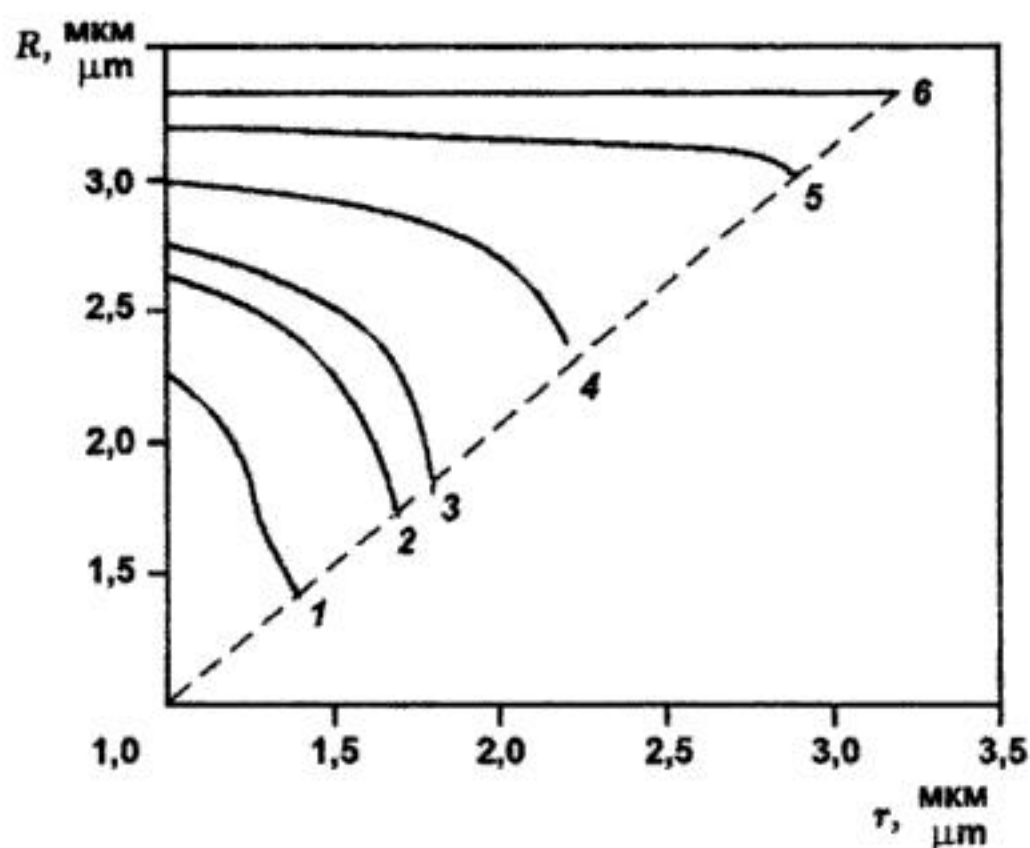


Рис. 2. Зависимость радиуса не втянутой в микропипетку части мембраны эритроцита человека, соответствующего началу ее изотропного растяжения, от радиуса микропипетки при разных значениях начального объема клетки,  $\mu\text{м}^3$ : 1 — 81,31; 2 — 97,91; 3 — 104,51; 4 — 121,11; 5 — 137,71; 6 — 154,31.  $S_0 = 129,95 \mu\text{м}^2$ .

Fig. 2. Dependency of the radius of not pulled-in into a micropipette part of human erythrocyte membrane, corresponding to the start of its isotropic tension, on the radius of micropipette at different initial values of cell initial volume,  $\mu\text{м}^3$ : 1 — 81.31; 2 — 97.91; 3 — 104.51; 4 — 121.11; 5 — 137.71; 6 — 154.31.  $S_0 = 129.95 \mu\text{м}^2$ .

плазме, продавливаются без гемолиза через микропипетку радиусом, превышающим 2,3  $\mu\text{м}$ , и полностью гемолизируются при продавливании через микропипетку радиусом, не превышающим 1,3  $\mu\text{м}$ . При радиусах микропипетки  $1,3 \mu\text{м} < r < 2,3 \mu\text{м}$ , вследствие того, что геометрические параметры эритроцитов человека в плазме не имеют строго определенных значений, а распределены по нормальному закону, при продавливании их через микропипетку гемолизирует только часть эритроцитов.

Рассчитанная по (1) и (6) величина максимального изотропного натяжения мембраны, которое

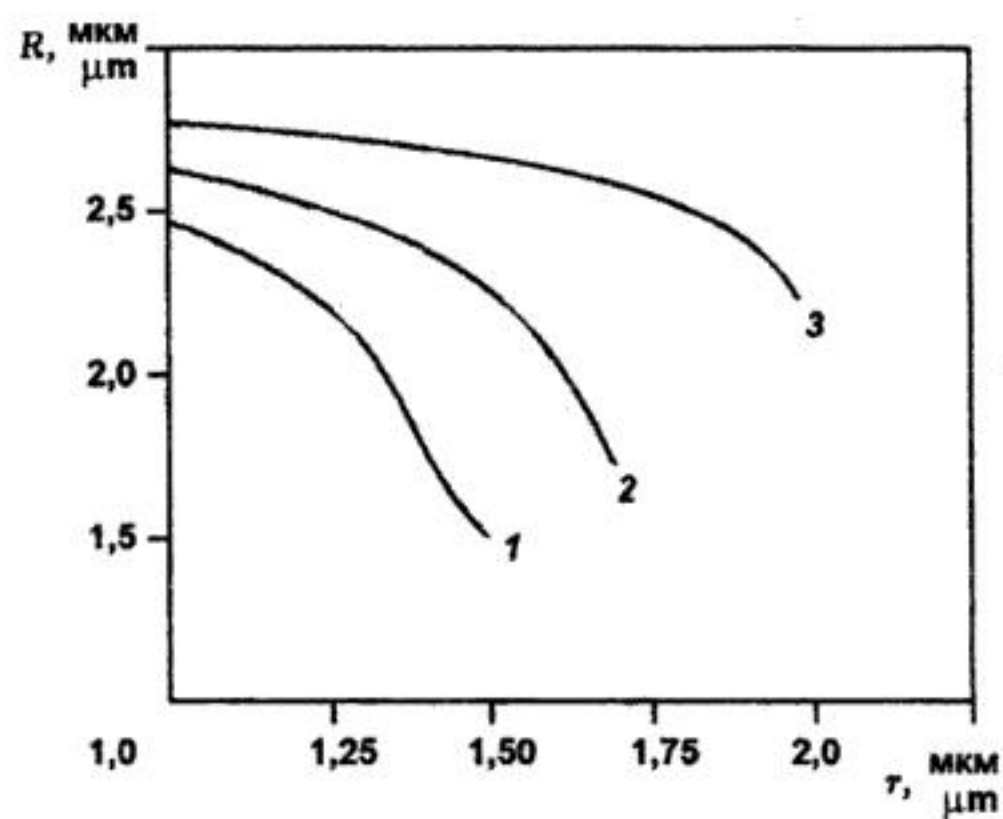


Рис. 3. Зависимость радиуса не втянутой в микропипетку части мембраны эритроцита человека, соответствующего началу ее изотропного растяжения, от радиуса микропипетки при разных начальных значениях площади поверхности его мембраны,  $\mu\text{м}^2$ : 1 — 145,81; 2 — 129,95; 3 — 114,09.  $V_0 = 97,91 \mu\text{м}^3$ .

Fig. 3. Dependency of the radius of not pulled-in into a micropipette part of human erythrocyte membrane, corresponding to the start of its isotropic tension, on the radius of micropipette at different initial values of its membrane surface square,  $\mu\text{м}^2$ : 1 — 145.81; 2 — 129.95; 3 — 114.09.  $V_0 = 97.91 \mu\text{м}^3$ .

$V(0)$  or initial value of square index of its surface are given in Fig. 2 and 3.

It is clear, that erythrocyte being pressed through a micropipette will not be subjected to an isotropic tension and so there will no hemolysis, if  $R^* = r$  or  $x = 1$ , i. e., if as it results from (5), the micropipette radius exceeds the size, defined by the condition:

$$r^3 - \frac{3s_0 r}{4\pi} + \frac{3V(0)}{2\pi} = 0. \quad (6)$$

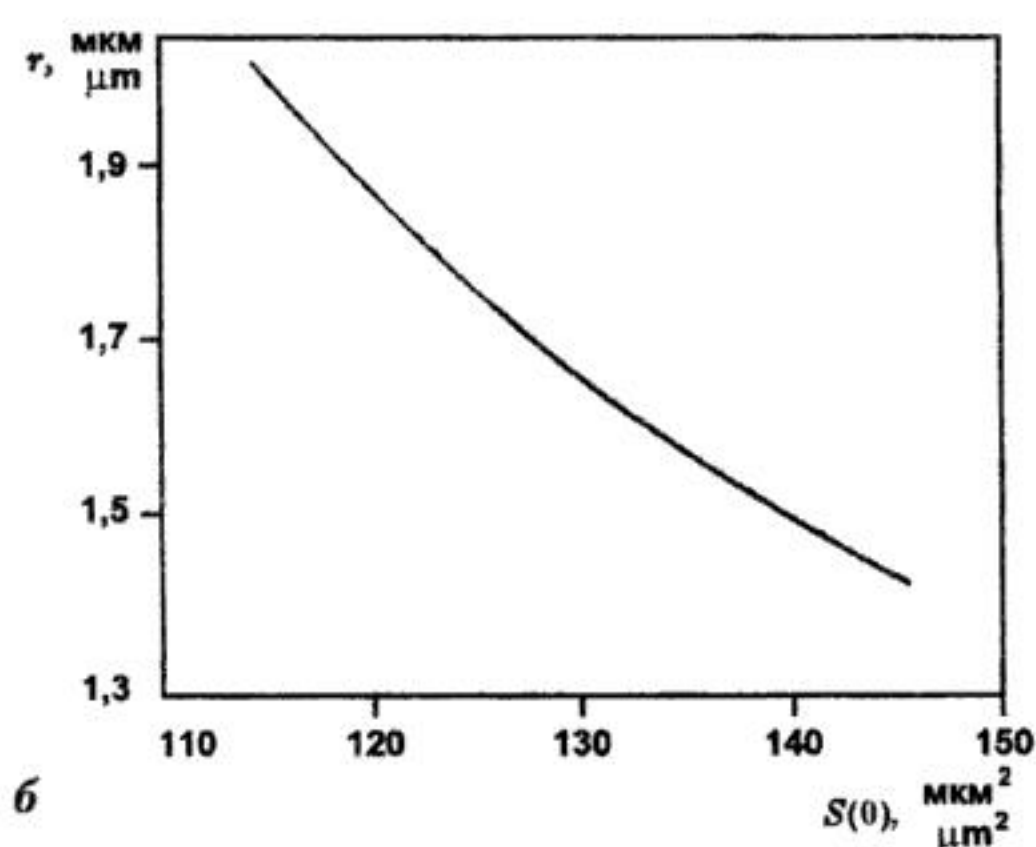
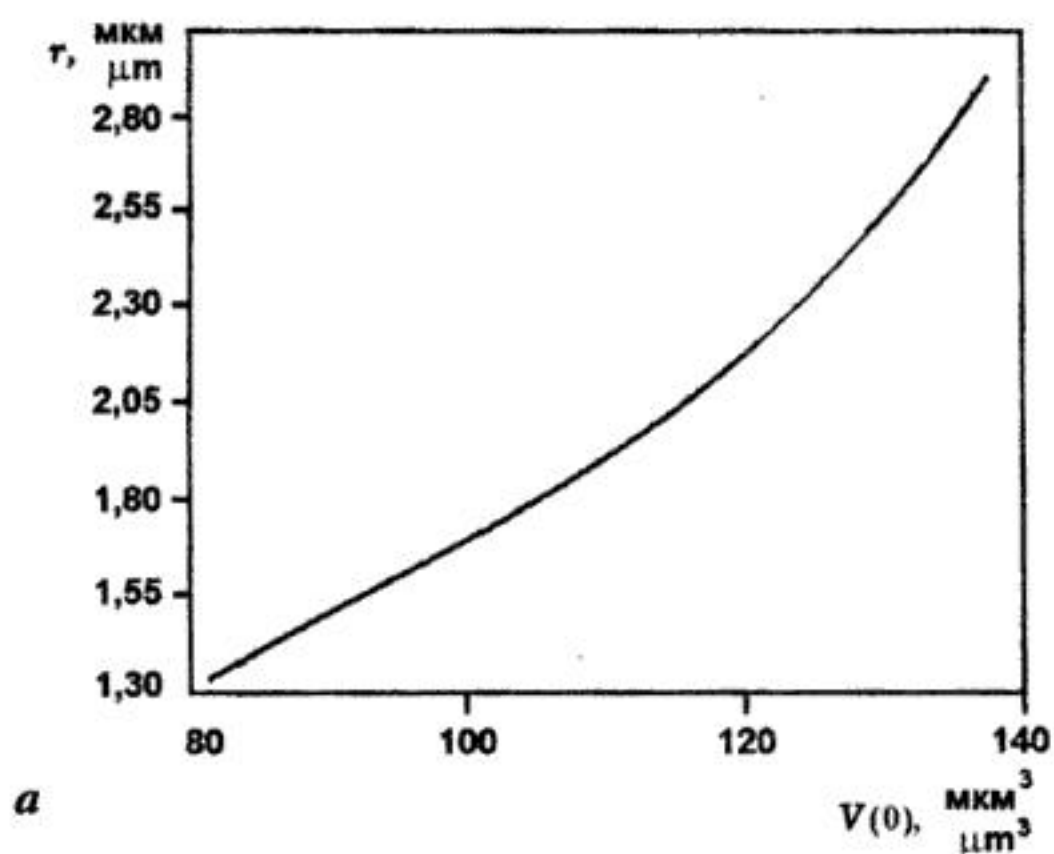


Рис. 4. Зависимость минимального радиуса микропипетки, при котором в мембране продавливаемого через нее эритроцита отсутствует изотропное растяжение, от исходного значения: а — объема эритроцита ( $S(0) = 129,95 \mu\text{м}^2$ ); б — площади поверхности его мембраны ( $V(0) = 97,91 \mu\text{м}^3$ ).

Fig. 4. Dependency of minimal radius of micropipette, at which there is no isotropic tension in membrane of the erythrocyte, pressed through it, on an initial level: а — erythrocyte volume ( $S(0) = 129.95 \mu\text{м}^2$ ); б — its membrane surface square ( $V(0) = 97.91 \mu\text{м}^3$ ).



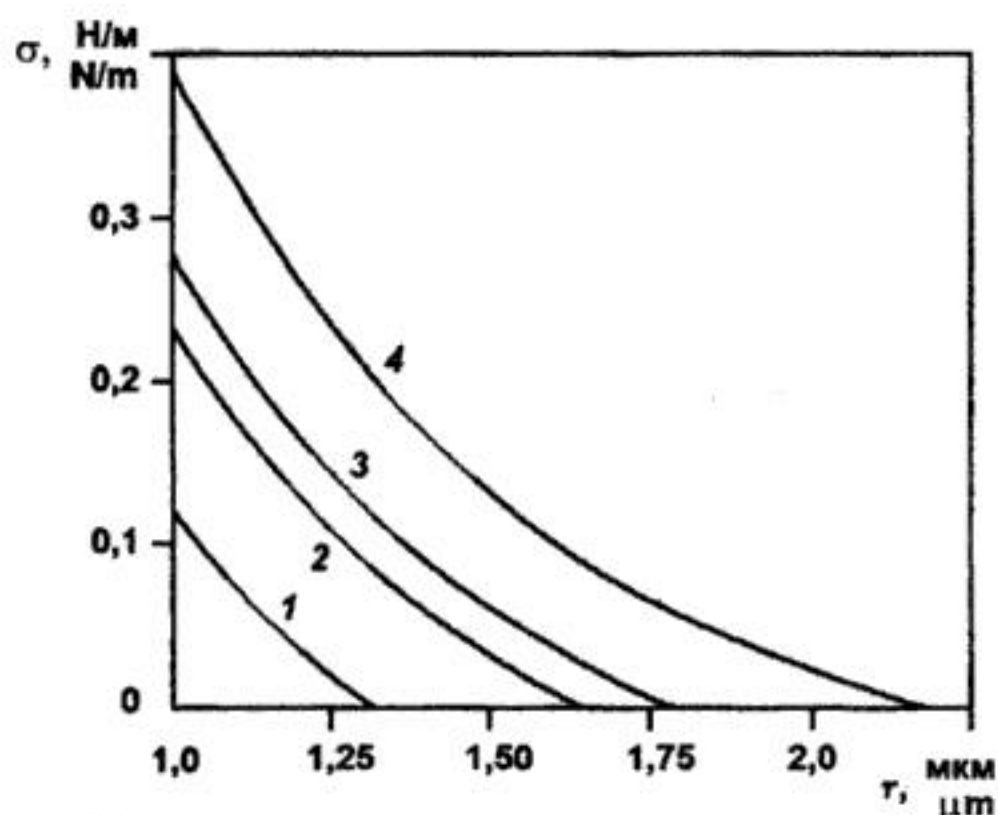


Рис. 5. Зависимость максимального значения изотропного натяжения мембраны эритроцита человека, возникающего при его продавливании через микропипетку, от ее радиуса при следующих значениях начального объема,  $\mu\text{м}^3$ : 1 — 81,31; 2 — 97,91; 3 — 104,51; 4 — 121,11.  $S_0 = 129,95 \mu\text{м}^2$ .

Fig. 5. Dependency of maximal value of isotropic tension of human erythrocyte membrane, appearing at its pressing through a micropipette, on its radius at following values of an initial volume,  $\mu\text{м}^3$ : 1 — 81.31; 2 — 97.91; 3 — 104.51; 4 — 121.11;  $S_0 = 129.95 \mu\text{м}^2$ .

возникает при продавливании эритроцитов через микропипетки с разными диаметрами, представлена на рис. 5.

В совокупности с теоретическими данными о вероятности образования макроскопической поры в изотропно растянутой мембране эритроцита [3] данные о расчете минимального изотропного натяжения, которое возникает при продавливании эритроцитов через микропипетку, могут лечь в основу более точного расчета их гемолиза с учетом динамики протекания суспензии эритроцитов через микрокапилляры разных размеров.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гильберт Д., Кон-Фоссен С. Наглядная геометрия. — М.: Наука, 1981. — 344 с.
2. Гордиенко Е. А., Пушкар Н. С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. — Киев: Наук. думка, 1994. — 143 с.
3. Гордиенко Е. А., Панина Ю. Е. Физико-математическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека. I. Этап набухания // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник. — 1998. — Вип. 1. — С. 79–85.
4. Ивэнс И., Скейлэкс Р. Механика и термодинамика биологических мембран. — М.: Мир, 1982. — 304 с.
5. Evans E. A., Waugh R. Osmotic correction to elastic area compressibility measurements on red cell membrane // Biophys. J. — 1977. — 20. — P. 307–313.
6. Fung Y. C., Winston C. O., Tsang W. S. O., Patitucci P. High-resolution data on the geometry of red blood cells // Biorheology. — 1998. — 18. — P. 369–385.
7. Mlekoday H. J., Moore R., Levitt D. G. Osmotic water permeability of the human red cell // J. Gen. Physiol. — 1983. — 81. — P. 213–220.
8. Yeung A., Evans E. Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipettes // Biophys. J. — 1989. — 64. — P. 139–149.
9. Waterman C. S., Atkinson E. E., Wilkins B. et al. Improved measurement of erythrocyte volume distribution by aperture-counter signal analysis // Clin. Chem. — 1975. — 21. — P. 1201–1211.
10. Zhelev D. V., Needham R. M. A novel micropipette method for measuring the bending modulus of vesicle membranes // Biophys. J. — 1994. — 67. — P. 720–727.

Поступила 23.12.98

Calculated by (6) dependencies of minimal radius of micropipette, at which in a membrane of pressed through it erythrocyte an isotropic tension is absent, on initial values of  $V(0)$  and  $S(0)$  are presented in Fig. 4.

As the results of conducted with taking into account calculations [6] show, the erythrocytes, suspended in plasm, are pressed without hemolysis through a pipette of the radius, exceeding  $2.3 \mu\text{м}$ , and completely hemolysed when being pressed through a micropipette with the radius, exceeding  $1.3 \mu\text{м}$ . At the radiuses of  $1.3 \mu\text{м} < r < 2.3 \mu\text{м}$ , due to the fact, that geometrical parameters of human erythrocytes in plasm have no strictly defined values, and are distributed according to a normal law, during their pressing through a micropipette only a part of erythrocytes are hemolysed.

Calculated according to (1) and (6) the value of maximum isotropic membrane tension, appearing during pressing the erythrocytes through micropipette with different diameters, is represented in Fig. 5.

Together with theoretical data on the probability of the formation of macroscopic pore in isotropically extended membrane of erythrocyte [3], the data on the calculation of minimal isotropic tension, appearing during erythrocyte pressing through a micropipette, can lay into the base of more distinct calculation of their hemolysis with the consideration of dynamics of erythrocyte suspension passing through microcapillaries of different dimensions.

## REFERENCES

1. Gilbert D., Con-Fossen S. Visual geometry. — M: Nauka, 1981. — 344 p.
2. Gordienko E. A., Pushkar N. S. Physical grounds of low temperature preservation of cellular suspensions. — Kiev: Nauk. Dumka, 1994. — 143 p.
3. Gordienko E. A., Panina Yu. E. Physical and mathematical model of the phenomenon of hypotonic hemolysis of human erythrocytes. I. Swelling stage // Vestnik KhSU. Biophysical news. — 1988. — 1. — P. 79–85.
4. Ivens E., Skellak R. Mechanics and thermodynamics of biological membranes. — M: Mir, 1982. — 304 p.
5. Evans E. A., Waugh R. Osmotic correction to elastic area compressibility measurements on red cell membrane // Biophys. J. — 1977. — 20. — P. 307–313.
6. Fung Y. C., Winston C. O., Tsang W. S. O., Patitucci P. High-resolution data on the geometry of red blood cells // Biorheology. — 1998. — 18. — P. 369–385.
7. Mlekoday H. J., Moore R., Levitt D. G. Osmotic water permeability of the human red cell // J. Gen. Physiol. — 1983. — 81. — P. 213–220.
8. Yeung A., Evans E. Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipettes // Biophys. J. — 1989. — 64. — P. 139–149.
9. Waterman C. S., Atkinson E. E., Wilkins B. et al. Improved measurement of erythrocyte volume distribution by aperture-counter signal analysis // Clin. Chem. — 1975. — 21. — P. 1201–1211.
10. Zhelev D. V., Needham R. M. A novel micropipette method for measuring the bending modulus of vesicle membranes // Biophys. J. — 1994. — 67. — P. 720–727.

Accepted in 23.12.98



## Криомикроскопическое исследование процесса формирования кристаллов льда вокруг криохирургического зонда

А. С. КАПРЕЛЬЯНЦ, Р. К. МИГУНОВА, А. А. КАПРЕЛЬЯНЦ

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Cryomicroscopic Investigation of the Process of an Ice Crystal Formation Around Cryosurgical Probe

A. S. KAPRELYANTS, R. K. MIGUNOVA, A. A. KAPRELYANTS

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

Проведено криомикроскопическое исследование кристаллизационных процессов при замораживании жидких сред с помощью криохирургического зонда. Дана качественная характеристика этих процессов при замораживании и оттаивании. Показана возможность управления формированием кристаллической структуры льда в зависимости от условий замораживания.

Проведено криомікроскопічне дослідження кристалізаційних процесів при заморожуванні рідких середовищ за допомогою криохірургічного зонда. Дана якісна характеристика цих процесів при заморожуванні і розморожуванні. Показана можливість керування формуванням кристалічної структури льоду в залежності від умов заморожування.

The cryomicroscopic investigation of crystallizational processes at a liquid medium freezing by means of cryosurgical probe has been carried out. The qualitative characteristics of these processes during freezing and thawing have been given. The possibility of controlling the formation of crystalline ice structure in dependence on freezing conditions has been shown.

Понимание механизмов кристаллообразования льда в клетках тканей и органов имеет большое значение для разработки новых эффективных методов криохирургии. Сегодня знание деталей криодеструкции не менее важно, чем механизмов криопротекции [2]. При решении проблемы криодеструкции ткани необходимо изучение процесса формирования кристаллов льда как первичного механизма криодеструкции. Одним из прямых методов исследования структуры льда при замораживании является метод криомикроскопии, который использовался в криобиологии преимущественно для изучения процессов замораживания клеточных суспензий [3, 8, 10]. В то же время экстраполяция полученных экспериментальных результатов криомикроскопических исследований в тонких пленках на область замораживания реальным зондом в трехмерной модели носит проблематичный характер. Несмотря на то, что в последние годы исследователи пытались изучать рост ледяного шара вокруг криохирургических зондов [4, 9, 11], особенности течения этого процесса до конца не выяснены. Цель настоящей работы — криомикроскопическое изучение процессов кристаллообразования льда при замораживании жидкой среды вокруг стандартного зонда криохирургического прибора.

Общая схема экспериментальной установки приведена на рис. 1. Для замораживания был использован криохирургический прибор 7 AccuProbe System (Cryomedical Sciences, Inc., Роквилл, США)

Understanding of ice crystal formation mechanisms in tissue and organ cells has a great importance for the elaboration of new efficient cryosurgical methods. Today the comprehension of the cryodestruction details is not less important than cryoprotective mechanisms [2]. When the problem solving on tissue cryodestruction it is necessary to study the process of an ice crystal formation as initial cryodestructive mechanism. One of the direct study methods of an ice formation during freezing is cryomicroscopy method used in cryobiology especially to study cellular suspension freezing processes [3, 8, 10]. At the same time the extrapolation of obtained experimental results of cryomicroscopic investigations in thin films on freezing section by means of real probe in three-dimensional model shows a questionable character. In spite of that, recently investigators tried to study the growth of an ice sphere around cryosurgical probes [4, 9, 11], peculiarities of this process course are not clear at all.

The aim of the present work is cryomicroscopic study of ice crystal formation processes during the liquid medium freezing around a standard probe of cryosurgical instrument. General scheme of experimental plant has been shown in Fig. 1. The AccuProbe System (Cryomedical Sciences, Inc., Rockville, USA) cryosurgical instrument 7 with standard proba of the diameter of 3.4 mm and freezing zone of 40 mm [5], located in cryochamber 3 was used for freezing.



со стандартным зондом 4 диаметром 3,4 мм и зоной замораживания 40 мм [5], размещенным в криокамере 3. Прибор имеет оригинальную конструкцию с мощной системой замораживания (Subcooled Liquid Nitrogen System) и применяется во многих клинических центрах США и Европы [5, 13]. Использовались режимы обычного (Freeze) и максимального (Max Freeze) замораживания. Оттаивание производили при максимальном режиме нагревания зонда (35 °C). Температуру измеряли с помощью медь-константановой термопары 5 (30 gage) и микропроцессорного термометра 6 (модель HH23, OMEGA).

При проведении криомикроскопических экспериментов зонд погружали в каплю жидкости 9. Использовали водную среду — солевой раствор (0,8 г йодированной соли и 88,8 мл воды) и желатиновый раствор (1,5% желатина от Aldrich Chemical, Inc. и 98,5% воды при комнатной температуре), размещенные на нижней стенке 8 криокамеры. Визуальный и фотографический контроль процесса замораживания проводился с использованием криокамеры и микроскопа 1 (Bausch & Lomb) фотокамерой 2 Canon EOS Rebel XL. Всего было сделано 168 снимков. Морфометрический анализ ширины кристаллов льда выполняли с помощью компьютерной системы "Morpho Tools", разработанной в отделе криоцитологии и количественной морфологии ИПКиК НАНУ (авторы А. С. Капрельянц, А. Н. Рейлян, А. А. Капрельянц, Р. К. Мигунова).

Визуальный криомикроскопический анализ всего процесса формирования ледяного шара вокруг зонда позволяет выделить последовательно сменяющиеся фазы (1–3). Фазы 1 и 2 соответствуют началу процесса замораживания (активации зонда), а фаза 3 — росту ледяного шара. Для исследования механизма первоначального образования льда вокруг зонда было использовано его медленное охлаждение до температур начала кристаллизации (0 °C и ниже) путем задания соответствующей температуры с пульта управления криохиргического прибора. При фазе 1 образование кристаллов льда происходит не на всей охлаждаемой поверхности зонда. В фазе 2 расстояние от поверхности зонда до края ледяного фронта увеличивается или уменьшается в зависимости от поступления азота в зону



Рис. 1. Общая схема экспериментальной установки

Fig. 1. General scheme of an experimental plant

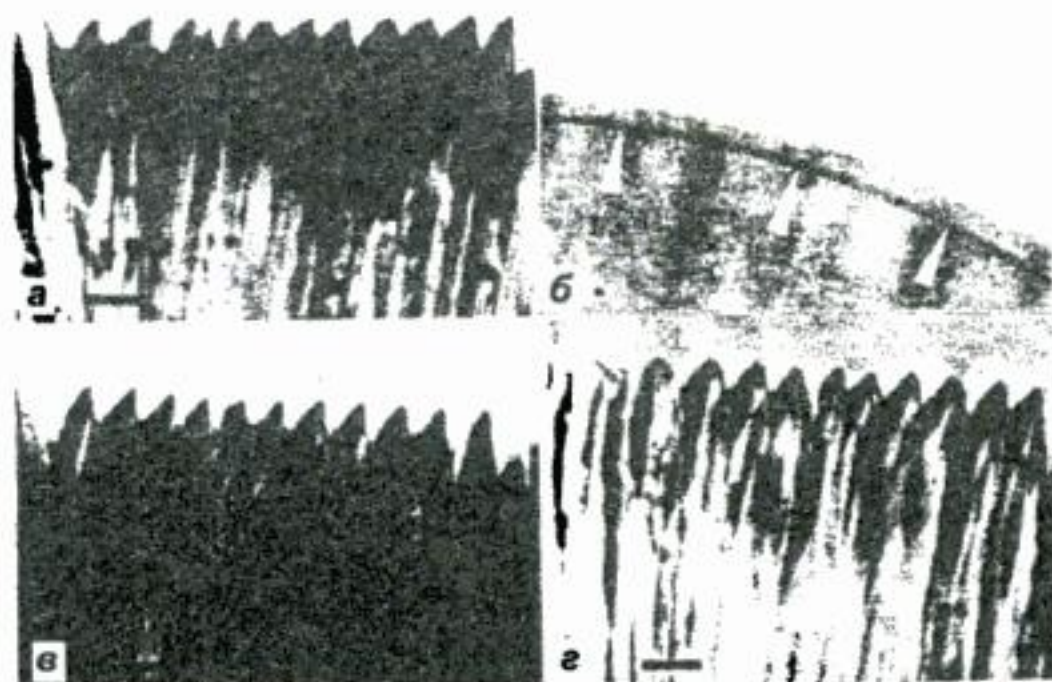
An instrument has an original construction with a high-capacity freezing system (Subcooled Liquid Nitrogen System) and is applied in many USA and European clinical centers [5, 13]. The regimens of usual (Freeze) and maximum (Max Freeze) freezing were used. Thawing was conducted at maximum regimen of probe heating (35 °C). Temperature was measured by means of copper-constant thermocouple 5 (30 gage) and microprocessor thermometer 6 (HH23, OMEGA model).

When conducting cryomicroscopic experiments the probe was submerged into a liquid drop 9. Aqueous medium — saline (0.8 g of Morton iodized salt and 88.8 ml of water) and gelatinous solution (1.5% of gelatine from the Aldrich Chemical, Inc. and 98.5% of room temperature water), located on a lower side of 8 cryochamber were used. Visual and photographic control of the freezing process was carried-out by means of the cryochamber and Bausch&Lomb microscope with the EOS Rebel XL photocamera 2. 168 photos were made in all. Morphometrical analysis of an ice crystal width was conducted by means of "MORPHO TOOLS" computer system, elaborated in the Department of Cryocytology and Quantitative Morphology of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine by the authors: A. S. Kaprelyants, A. N. Reilyan, A. A. Kaprelyants, R. K. Migunova.

Visual cryomicroscopic analysis of the whole formation process of an ice sphere around probe allowed to distinguish phases, consecutively changing (1–3). 1 and 2 phases correspond to the beginning of freezing process (probe activation) and the 3 phase — to an ice sphere. To study the mechanism of an initial ice formation around probe, its slow cooling down to the

Рис. 2. Типичная структура кристаллов льда ледяного фронта при охлаждении криозонда: а — температура криозонда –32 °C; б — общий вид при малом увеличении фронта льда в "режиме Jump Freeze" с темной линией (белые стрелки) — зоной мелких кристаллов льда; в — кристаллы льда при отогреве. Температура зонда –25 °C, тот же участок, что и на снимке а; г — продолжение отогрева. Температура зонда –10 °C. Масштабная полоска равна 100 мкм.

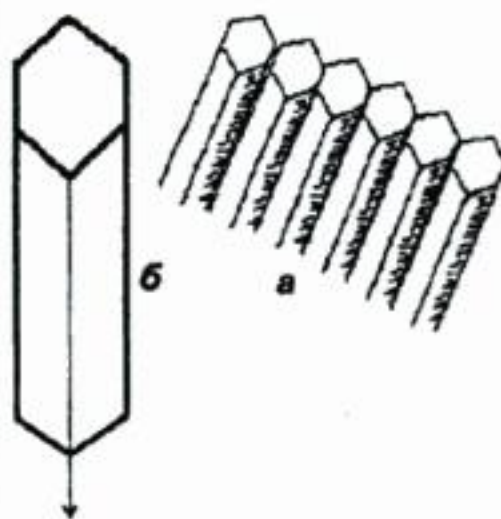
Fig. 2. Typical structure of ice crystals in ice front when cryoprobe cooling: а — the cryoprobe temperature is –32 °C; б — general view at a slight increase of an ice front in "Jump Freeze" regimen with a dark line (white points) — zone of small ice crystals; в — ice crystals during thawing. Probe temperature is –25 °C, the same section as in the photo (а); г — thawing continue. Probe temperature is –10 °C. The scale stripe is equal to 100 microns.





**Рис. 3.** Схема поликристаллической структуры: а — ледяного фронта; б — отдельного спикулообразного кристалла льда при замораживании криозондом в режиме Freeze.

**Fig. 3.** Scheme of polycrystalline structure: а of an ice front; б — of a separate spicule-like ice crystal at freezing by means of cryoprobe in the Freeze regimen.



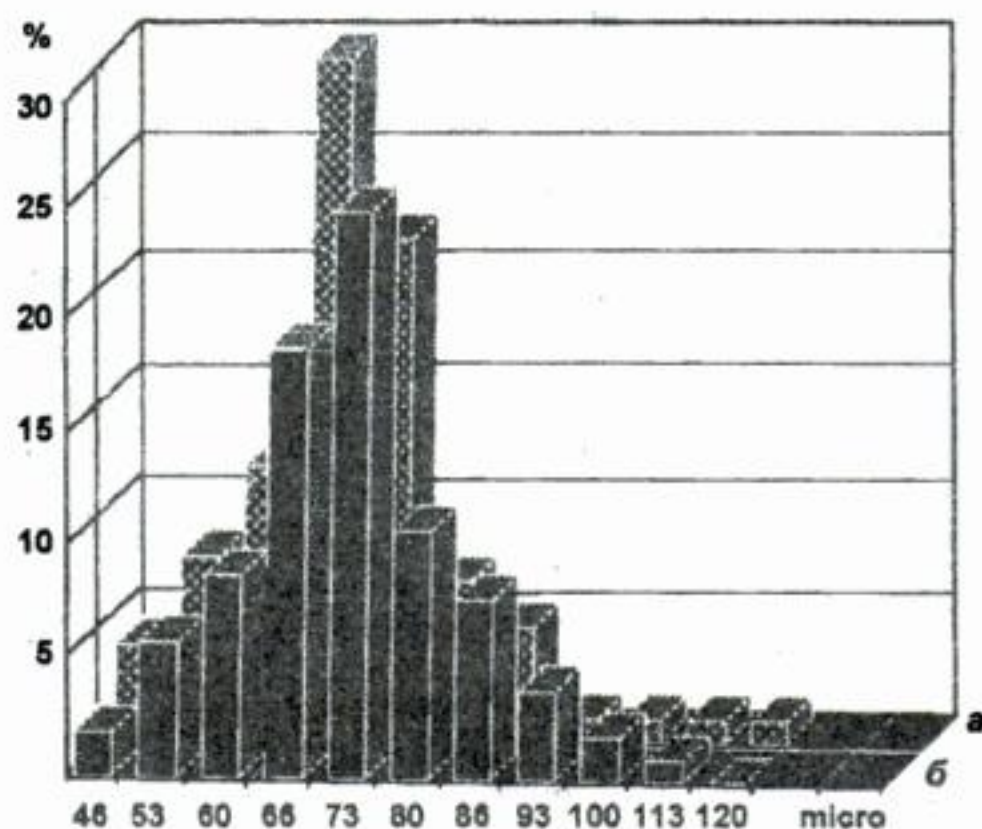
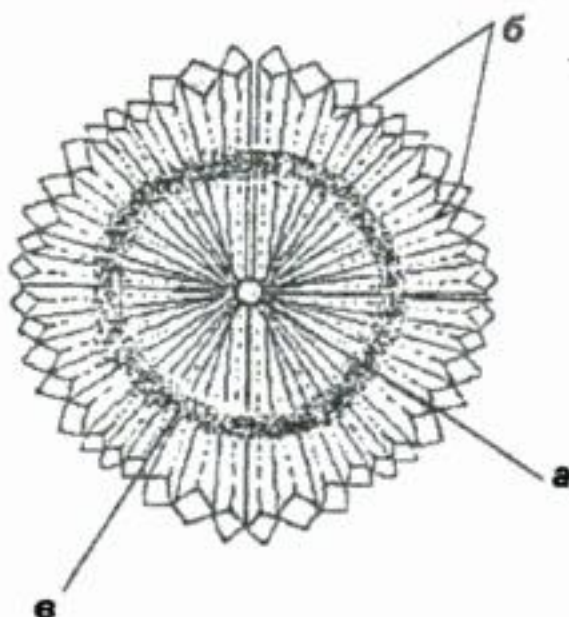
замораживания зонда и сопровождается движением ледяного фронта вперед и назад. Фаза 2 может рассматриваться как этап “нестабильного” замораживания. При дальнейшем снижении температуры (фаза 3) происходит рост ледяного шара.

При охлаждении зонда в режиме Freeze до умеренно низких температур структура ледяного фронта имеет поликристаллический характер и состоит из комплекса спикулообразных кристаллов, радиально ориентированных от зонда (рис. 2, 3). Замороженная фаза представляет собой совокупность удлиненных кристаллов, которые растут по направлению градиента температур, образуя “зубчатую” форму фронта кристаллизации. Морфометрическая характеристика спикулообразных кристаллов представлена на рис. 4. Иногда в кристаллической структуре льда обнаруживаются газовые пузырьки удлиненной формы, которые захватываются ледяным фронтом и ориентированы в радиальном направлении. При резком понижении температуры зонда (переход от умеренно низких до низких температур — “режим Jump Freeze”) в структуре ледяного фронта отмечается образование “темной линии” (рис. 2, 5), слоя более мелких кристаллов с последующим ростом кристаллов описанного вида до максимальных размеров зоны замораживания.

В режиме отогрева зонда после Freeze имеет место изменение структуры наружной части ледяного фронта, выраженное в округлении его спикулообразной поверхности (рис. 2). Наблюдается также выделение разовых пузырьков на тающей поверхности ледяного фронта. При отогреве зонда происходит таяние льда вокруг зонда с образованием жидкой фазы между зондом и льдом, который сохраняется даже при положительной температуре.

**Рис. 5.** Схема структуры ледяного фронта вокруг криозонда при замораживании в “режиме Jump Freeze”: а — криозонд; б — кристаллы ледяного шара; в — зона мелких кристаллов льда.

**Fig. 5.** Scheme of an ice front structure around cryoprobe at freezing in “Jump Freeze” regimen: а cryoprobe; б — ice sphere crystals; в — zone of little ice crystals.



**Рис. 4.** Результаты морфометрического анализа (гистограмма распределения в микронах) ширины кристаллов льда при замораживании в режимах: а — Freeze; б — Max Freeze.

**Fig. 4.** The results of morphometrical analysis (redistribution histogram in microns) of an ice crystal width at freezing in regimens: а — Freeze; б — Max Freeze.

temperatures of crystallization start ( $0^{\circ}\text{C}$  and lower) by the method of corresponding temperature setting from the control panel of cryosurgical instrument was used. In the 2 phase the distance from the probe surface to the end of an ice front increases or decreases, depending on the nitrogen entrance in the probe freezing zone and is accompanied by an ice front movement forward and back. The 2 phase may be considered as a stage of “non-stable freezing”. With a further temperature decrease (3 phase), an increase of an ice sphere occurs.

During probe freezing in “Freeze” regimen down to moderate low temperatures, the structure of an ice front shows polycrystalline character and consists of the combination of spicule-like crystals, directed radially from probe (Figs. 2, 3). Frozen phase is a bulk of long crystals, growing in the direction of temperature gradient, forming “teeth-like” form of front crystallization. Morphometrical characteristic of spicule-like crystals has been shown on Fig. 4. Sometimes elongated form gas bubbles, captured by an ice front and orientated in a radial direction, are revealed in an ice crystalline structure. At a sharp decrease of probe temperature (transition from moderate low temperatures to low temperatures — “Jump Freeze” regimen the formation of a “dark line” (Figs. 2, 5), the layer of smaller crystals with a further growth of described crystals up to maximum sizes of freezing zone is observed in an ice front structure.

In a regimen of probe thawing after the Freeze regimen, the change of outer side of an ice front structure, expressed in rounding of its spicule-like surface (Fig. 2) occurs. Gas bubble isolation on thawing surface of an ice front is also observed. An ice thawing around probe with a liquid phase formation between probe and ice, preserving even at positive temperatures occurs at probe heating.



При замораживании зонда в режиме Max Freeze фазы 1 и 2 визуально не наблюдаются, а отмечается быстрый рост ледяного фронта с типичной структурой льда описанного ранее вида. Морфометрические размеры отдельных кристаллов приближаются к размерам, полученным в режиме Freeze (рис. 4). С увеличением размеров ледяного фронта удается наблюдать образование трещин во внутренней части замороженной зоны, которые имеют преимущественно радиальную направленность. Динамика процесса образования трещин заметно отстает от начала процесса образования и роста замороженной зоны и активно протекает только во второй половине процесса замораживания и в основном имеет линейную зависимость от времени замораживания.

При отогреве после режима Max Freeze отмечается округление наружной части кристаллов фронта льда (рис. 6). Ледяной фронт теряет упорядоченную структуру, с внешней стороны ледяного шара образуются щели и наблюдается проникновение жидкой фазы внутрь между кристаллами. Одновременно оттаивает лед, находящийся в прямом контакте с зондом.

При проведении криомикроскопических исследований структуры льда в желатиновой среде было обнаружено, что характер процесса кристаллообразования при Freeze и Max Freeze в целом напоминает процесс замораживания водно-солевой среды. В то же время кристаллическая структура ледяного фронта в желатиновой среде длительное время сохраняет свои морфологические характеристики даже после полного оттаивания. Данное положение ограничивает возможности исследования структурных перестроек кристаллов льда при оттаивании, но позволяет хранить долгое время "отпечаток" кристаллических структур поверхности ледяного шара, что может быть применено при дальнейших углубленных исследованиях.

Использование данной экспериментальной модели криокамеры с криозондом и системой регистрации температуры, а также микроскопа с большой глубиной резкости позволило впервые получить прямые данные о структуре и характере кристаллов льда, образующихся в жидкой среде при охлаждении зонда криохирургического инструмента. Наличие мощной системы охлаждения зонда обуславливает появление больших температурных градиентов между поверхностью зонда и жидкой средой, что объясняет наличие радиально направленных от центра зонда кристаллов льда. Характер этих кристаллов в режимах Freeze и Max Freeze приближается к спикулообразной модели кристаллов льда при замораживании, что согласуется с данными [1, 6, 12]. Наружная поверхность ледяного фронта имеет острые выпячивания кристаллов, которые определяются не только в горизонтальной плоскости, но и в объеме (3D), что

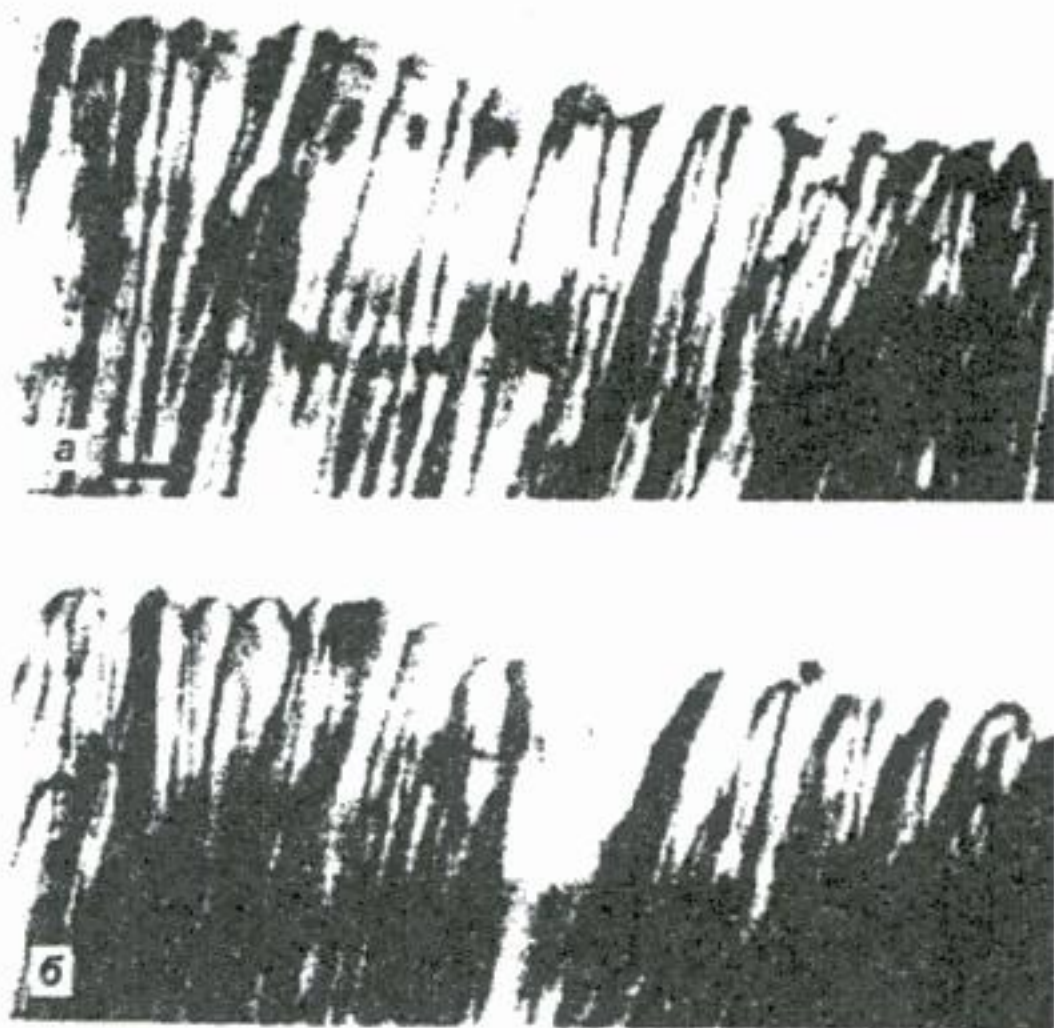


Рис. 6. Кристаллы льда ледяного шара при повышении температуры: а — температура зонда  $-8^{\circ}\text{C}$ ; б — температура зонда  $12^{\circ}\text{C}$  (тот же участок). Масштабная полоска равна 100 мкм.

Fig. 6. Ice crystals of an ice sphere at the temperature increase: а probe temperature is  $8^{\circ}\text{C}$ ; б — probe temperature is  $12^{\circ}\text{C}$  (the same section). The scale stripe is equal to 100 microns.

When probe freezing in the Max Freeze regimen the 1 and 2 phases are not visually revealed, but a sharp growth of an ice front with typical ice structure of the type, described earlier, is observed. Morphometrical sizes of separate crystals approach to sizes obtained under the "Freeze" regimen (Fig. 4). With the increase of ice front sizes one can observe cracking in an inner side of frozen zone, that have especially radial direction. Dynamics of cracking process is significantly falls behind from the beginning of forming and occurs actively only in the second half of freezing and especially has linear dependence on freezing time.

When thawing after the "Max Freeze" regimen an outer side rounding of an ice front crystals is observed (Fig. 6). An ice front loses its regulated structure, cracking is revealed on outer side of an ice sphere and liquid phase penetration is observed. At the same time an ice, directly contacting with probe, thaws.

When conducting an ice structure cryomicroscopic investigations in gelatinous medium, it has been revealed that the character of crystal formation process under the "Freeze" and "Max Freeze" regimens in whole remains freezing process of an aqueous and salt medium. At the same time the crystalline structure of an ice front in gelatinous medium keeps its morphological characteristics for a long time even after the absolute thawing. Such state limits the study of the possibility of an ice crystal structural reconstructions during thawing, but allows to preserve for a long time the photo of crystalline structures of an ice sphere surface, that could be used in further deep investigations.

Application of the following experimental cryo-chamber model with the cryoprobe and with the system of temperature registration as well as the microscope



обнаруживается при перефокусировке микроскопа на нижележащие участки ледяного шара.

Проведенное криомикроскопическое исследование позволило зафиксировать динамику роста ледяного фронта в процессе замораживания. Наличие газовых пузырьков в структуре ледяного фронта, а также характер их включения ("захват") в поликристаллическую структуру дополняет наши представления о процессах, протекающих при формировании структуры замороженной зоны. Обнаруженное выделение газа при таянии кристаллов льда позволяет предположить наличие газа в зоне криовоздействия после отогрева замороженной среды, что может оказывать влияние на выживаемость (или повреждение) размороженных клеток ткани.

Визуальный анализ процесса образования трещин в структуре ледяного шара (характер их распределения, время появления) дает возможность сделать заключение о том, что их появление, очевидно, связано с рекристаллизационными процессами, протекающими в последней фазе образования ледяного шара, и может контролироваться, например, путем управления скоростью и (или) временем замораживания. Учитывая обнаруженный "зубчатый" характер фронта кристаллизации при росте зоны замораживания, можно предположить наличие выраженного деструктивного эффекта при взаимодействиях лед-ткань в условиях реального замораживания клеток ткани с помощью криохирургического инструмента.

Полученные результаты свидетельствуют, что резкое понижение температуры зонда ("режим Jump Freeze") сопровождается характерными изменениями, происходящими в кристаллической структуре ледяного шара. При этом отмечено образование мелкокристаллических структур по внешней поверхности ледяного шара. Такое изменение кристаллической структуры создает "сферу-оболочку" внутри ледяного шара и делает возможным управляемую модификацию структуры льда в зависимости от поставленных целей. Ледяной шар с заданными параметрами кристаллической структуры играет важную роль в криохирургии для получения эффективной криодеструкции патологических клеток и тканей.

Авторы благодарят доктора Джона Дж. Бауста и компанию CMS, Inc. (Роквилл, США) за оказанную помощь и предоставленную возможность выполнения этой работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пушкар Н. С., Капрельянц А. С., Панков Е. Я. Электронно-микроскопическое изучение формирования и структуры льда // Ультраструктура клетки при низких температурах. — Киев: Наук. думка, 1978. — С. 36–43.
2. Baust J. G. Cautions in cryosurgery // *Cryo-Lett.* — 1993. — 14. — P. 1–2.
3. Berger W. K., Uhrig B. J. Dehydration and Intracellular Ice Formation During Freezing in Single Cells and Cell Strands from Salivary Glands // *Proc. of 29th Annual Meeting of the*

with a large depth of sharpness allowed to obtain for the first time the real data about the structure and character of ice crystals, forming in a liquid medium at probe freezing of cryosurgical instrument. The presence of a powerful probe cooling system conditions the appearance of high temperature gradients between probe surface and liquid medium the explains the presence of ice crystals, radially directed from a probe center. The character of these crystals in "Freeze" and "Max Freeze" regimens approaches to spicule-like model of ice crystals at freezing, according with data [1, 6, 12]. The outer surface of an ice front has sharp crystal sticking-out, revealed not only in horizontal plane, but in volume (3D), determined at microscope refocusing on lower sections of an ice sphere.

Conducted cryomicroscopic investigation allowed to fix the dynamics growth of an ice front during freezing. The presence of gas bubbles in an ice front structure, as well as the character of their connection with polycrystalline structure supplements our ideas about the process, proceeded during frozen zone structure formation. Gas emission, revealed at thawing of ice crystalls, allows to suppose the gas presence in cryoeffect zone after frozen medium thawing, that also may affect the viability (or damage) of thawed tissue cells.

Visual analysis of the cracking process in an ice sphere structure (the character of their redistribution, time of appearance) gives an opportunity to conclude, that their appearance, obviously, is connected with recrystallizational processes, taking place in the last phase of an ice sphere formation and may be controlled, for example, by means of a rate direction and (or) frezing time. Taking into consideration the revealed "teeth-like" character of crystallizational front in freezing zone, it may be supposed, that the presence of expressed destructive effect during the interactions between ice and tissue under the conditions of tissue cells real freezing by means of cryosurgical instrument.

Obtained results testify, that a sharp decrease of a probe temperature ("Jump Freeze" regimen) is accompanied by typical changes, occurred in crystalline structure of an ice sphere. Thereat the formation of small crystalline structures on outer surface of an ice sphere is observed. Such change of crystalline structure creates the "sphere-membrane" inside an ice sphere and makes possible the controlled modification of an ice structure, depending on the aims set. An ice sphere with given parameters of crystalline structure has a great importance in cryosurgery to obtain an efficient cryodestruction in pathological cells and tissues.

## REFERENCES

1. Pushkar N. S., Kaprelyants A. S., Pankov E. Ya. Electric and microscopic study of an ice formation and structure // *Cell ultrastructure at low temperatures.* — Kiev: Nauk. Dumka, 1978. — P. 36–43.
2. Baust J. G. Cautions in cryosurgery // *Cryo-Lett.* — 1993. — 14, P. 1–2.
3. Berger W. K., Uhrig B. J. Dehydration and Intracellular Ice Formation During Freezing in Single Cells and Cell Strands from Salivary Glands // *Proc. of 29th Annual Meeting of the*



Society for Cryobiology.— Ithaca, N. Y., June 14–19, 1992.— P. 15–16.

4. *Bischof J., Smith D. et al.* Cryosurgery of Dunning AT-1 Ret Prostate Tumor: Thermal, Biophysical and Viability Response at the Cellular and Tissue Level // *Cryobiology*.— 1997.— № 34.— P. 42–69.
5. *Chang Z. N., Finkelstein J. J., Baust J. G.* Optimization of cryosurgical instrumentation for use in minimally invasive prostate surgery // *Recent Advances in Cryogenic Engineering* / Ed by J. P. Kelly and J. Godman.— 1993.— P. 45–55.
6. *Cross J. D.* Study of the surface ice with scanning electron microscope // *Physics of ice*.— New York, 1969.— P. 81–95.
7. *Gage A. A., Baust J. G.* Mechanisms of Tissue Injury in Cryosurgery // *Cryobiology*.— 1998.— 37, № 3.— P. 171–186.
8. *Gao D., Lin S., Watson P., Crister J.* Fracture Phenomena in an Isotonic Salt Solution during Freezing and Their Elimination Using Glycerol // *Cryobiology*.— 1995.— 32.— P. 270–284.
9. *Homasson J., Thiery J. et al.* The Operation and Efficacy of Cryosurgical, Nitrous Oxide-Driven Cryoprobe // *Cryobiology*.— 1994.— № 31.— P. 290–304.
10. *Larese A., Hongyou Yang, Locksley E. McGann.* Intracellular Ice Formation is Affected by Cell-to-Cell Contact // *Proc. of 29th Annual Meeting of the Society for Cryobiology*.— Ithaca, N. Y., June 14–19, 1992.— P. 28.
11. *Saliken J., Cohen J., Miller R., Rother M.* Laboratory Evaluation of Ice Formation around a 3-mm Accuprobe // *Cryobiology*.— 1995.— № 32.— P. 285–295.
12. *Wilson P. W.* A Model for Thermal Hysteresis Utilizing the Anisotropic Interfacial Energy of Ice Crystals // *Cryobiology*.— 1994.— № 31.— P. 406–412.

Поступила 03.03.98

Society for Cryobiology.— Ithaca, N. Y., June 14–19, 1992.— P. 15–16.

4. *Bischof J., Smith D. et al.* Cryosurgery of Dunning AT-1 Ret Prostate Tumor: Thermal, Biophysical and Viability Response at the Cellular and Tissue Level // *Cryobiology*.— 1997.— № 34.— P. 42–69.
5. *Chang Z. N., Finkelstein J. J., Baust J. G.* Optimization of cryosurgical instrumentation for use in minimally invasive prostate surgery // *Recent Advances in Cryogenic Engineering* / Ed by J. P. Kelly and J. Godman.— 1993.— P. 45–55.
6. *Cross J. D.* Study of the surface ice with scanning electron microscope // *Physics of ice*.— New York, 1969.— P. 81–95.
7. *Gage A. A., Baust J. G.* Mechanisms of Tissue Injury in Cryosurgery // *Cryobiology*.— 1998.— 37, № 3.— P. 171–186.
8. *Gao D., Lin S., Watson P., Crister J.* Fracture Phenomena in an Isotonic Salt Solution during Freezing and Their Elimination Using Glycerol // *Cryobiology*.— 1995.— 32.— P. 270–284.
9. *Homasson J., Thiery J. et al.* The Operation and Efficacy of Cryosurgical, Nitrous Oxide-Driven Cryoprobe // *Cryobiology*.— 1994.— № 31.— P. 290–304.
10. *Larese A., Hongyou Yang, Locksley E. McGann.* Intracellular Ice Formation is Affected by Cell-to-Cell Contact // *Proc. of 29th Annual Meeting of the Society for Cryobiology*.— Ithaca, N. Y., June 14–19, 1992.— P. 28.
11. *Saliken J., Cohen J., Miller R., Rother M.* Laboratory Evaluation of Ice Formation around a 3-mm Accuprobe // *Cryobiology*.— 1995.— № 32.— P. 285–295.
12. *Wilson P. W.* A Model for Thermal Hysteresis Utilizing the Anisotropic Interfacial Energy of Ice Crystals // *Cryobiology*.— 1994.— № 31.— P. 406–412.

Accepted on 03.03.98



# **Состояние гуморального иммунитета у больных эндометриозом после имплантации криоконсервированной ткани фетальной вилочковой железы**

Л. В. ПОТАПОВА

*Харьковский государственный медицинский университет*

## **Humoral Immunity State in Patients with Endometriosis after the Implantation of Fetal Thymus Cryopreserved Tissue**

L. V. POTAPOVA

*Kharkov Medical State University*

Изучено влияние имплантации криоконсервированной ткани фетальной вилочковой железы на клинические проявления заболевания и показатели В-системы иммунитета больных с распространенными формами наружного и внутреннего эндометриоза. В результате комплексной терапии с применением криоконсервированной ткани тимуса отмечены положительный клинический эффект, нормализация функционирования В-системы иммунитета, подавление воспалительных реакций.

Вивчено вплив імплантації криоконсервованої тканини фетальної вилочкової залози на клінічний перебіг та показники В-системи імунітету хворих з поширеними формами зовнішнього та внутрішнього ендометріозу. Після комплексної терапії з використанням криоконсервованої тканини тимуса відмічено позитивний клінічний ефект, а також нормалізацію функціонування В-системи імунітету, пригнічення запальних реакцій.

The effect of the fetal thymus cryopreserved tissue implantation on clinical disease manifestations and the immunity B-system indices of patients with spreaded forms of external and internal endometriosis was studied. As a result of a complex therapy with the thymus cryopreserved tissue application a positive clinical effect, normalization of the immunity B-system functioning, suppression of inflammatory reactions were observed.

В последние годы внимание исследователей обращено на нарушения иммунной системы у больных эндометриозом как одного из важных звеньев патогенеза заболевания. Значение иммунологического компонента в имплантации и распространении эндометриоидных гетеротопий общепризнано [1]. В этой связи при разработке эффективных схем лечения и профилактики рецидивов заболевания должны учитываться особенности функционирования иммунной системы организма.

Цель исследования — изучение состояния гуморального иммунитета у больных с распространенными формами наружного и внутреннего эндометриоза гениталий.

Под наблюдением находились 55 женщин (от 19 до 38 лет), больных наружным и внутренним эндометриозом. У 40 из них во время эндоскопических хирургических вмешательств диагностирован эндометриоз яичников, брюшины, прямокишечно-маточного углубления (3–4 степени по системе R-AFS); у 15 больных — внутренний эндометриоз матки 2–3 степени распространения. Основные проявления заболевания — болевой синдром (дисменорея, дисхезия, диспареуния, тазовые боли), гиперполименорея. Диагноз был подтвержден гистологическим исследованием удаленных препаратов. Контрольную группу составили 20 здоровых женщин того же возрастного периода. О характере клинического течения болезни судили по исчезно-

Recently the attention of investigators was paid to the immune system disorders in patients with endometriosis, as one of the important links of the disease pathogenesis. The importance of an immunological component in the implantation and spreading of endometrioid heterotopias is universally recognized [1]. In this connection, the functioning peculiarities of an organism's immune system must be taken into consideration when developing the efficient treatment schemes and prophylaxis of the disease relapses.

The investigation's aim was to study the humoral immunity state in patients with spreaded forms of internal and external endometriosis of genitals.

55 women (from 19 to 38 years old) with an external and internal endometriosis were under observation, in 40 women from them the endometriosis of ovaries, peritoneum, recouterine pouch (the 3–4 degree by R-AFS system) was diagnosed during endoscopic surgical interventions; in 15 patients — an uterine internal endometriosis of the 2–3 spreading degree. Main manifestations of the disease are a painful syndrome (dysmenorrhea, dyschesia, dyspareunia, pelvic pains), hyperpolymenorrhea. The diagnosis was confirmed by a histological examination of removed preparations. 20 healthy women of the same age made a control group. The character of the disease's clinical course was considered by the disappearance of pains,



вению болей, редукции эндометриоидных очагов, нормализации менструального цикла, уменьшению аллергических реакций на прием гормональных препаратов. Срок наблюдения за больными — 1 год.

Программа иммунологических исследований включала изучение В-системы иммунитета. Кровь для исследований брали из локтевой вены. Содержание В-лимфоцитов определяли в реакции ЕАС-роzetkoобразования [4], сывороточных иммуноглобулинов — спектрофотометрическим методом [3]. Для определения концентрации и размеров циркулирующих иммунных комплексов использовали скрининг-тест [2]. Статистическая обработка материала проводилась с помощью критерия Стьюдента.

Образцы криоконсервированной ткани фетальной вилочковой железы были получены из Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Фетальные ткани использовали на основании решения Министерства охраны здоровья Украины.

Образец (2×2 см) размораживали и производили имплантацию в верхний наружный квадрант ягодицы в условиях операционной (однократно на 5–6-е сутки послеоперационного периода).

В результате терапии криоконсервированной тканью фетальной вилочковой железы отмечен положительный клинический эффект, который проявлялся в отсутствии болевого синдрома за срок наблюдения, нормализации менструальной функции. По данным объективного исследования, УЗИ и контрольной лапароскопии наблюдалась редукция эндометриоидных гетеротопий. Все больные отмечали повышение физического тонуса, устойчивости к респираторным заболеваниям, отсутствие аллергических реакций на гормональные препараты.

Тканевая терапия приводила к нормализации функционирования В-системы иммунитета, подавляла воспалительные реакции. Результаты исследований сгруппированы в таблице.

Показатели состояния В-системы иммунитета у больных эндометриозом

| Иммунологические показатели | Здоровые женщины | Больные эндометриозом |               |            |            |
|-----------------------------|------------------|-----------------------|---------------|------------|------------|
|                             |                  | До лечения            | После лечения |            |            |
|                             |                  |                       | 10-е сутки    | 1 мес      | 6 мес      |
| В-лимфоциты, %              | 17,3±0,7         | 21,6±1,45             | 22,1±0,9*     | 18,4±0,8   | 16,9±0,68  |
| IgG, г/л                    | 12,5±0,6         | 14,7±1,9              | 13,8±0,59*    | 12,6±0,6   | 12,1±0,5   |
| IgA, г/л                    | 1,1±0,09         | 1,9±0,5               | 1,5±0,11*     | 1,2±0,10   | 1,2±0,10   |
| IgM, г/л                    | 1,02±0,09        | 1,83±0,2              | 1,4±0,10*     | 1,03±0,10  | 1,02±0,10  |
| ЦИК, г/л                    | 1,76±0,13        | 1,25±0,2              | 1,36±0,1*     | 1,28±0,09* | 1,29±0,10* |
| ЦИК, конст                  | 1,27±0,05        | 1,39±0,1              | 1,35±0,06     | 1,21±0,03  | 1,20±0,03  |

Примечание. \* —  $p < 0,05$  — степень достоверности различий между показателями состояния здоровых женщин и больных после лечения.

Сравнительная оценка иммунологических показателей состояния здоровых женщин ( $n = 20$ ) и

reduction of endometrioid foci, menstrual cycle normalization, decrease in allergic reactions to the taking of hormonal preparations.

The program of immunological investigations included the immunity B-system study. Blood for examinations was taken from an ulnar vein. B-lymphocyte content was determined in the reaction EAC-rosette-formation [4], the serum immunoglobulin content — by means of spectrophotometrical method [3]. Screening-test [2] was used to determine the circulating immune complex concentration and dimensions. The material statistical treatment was carried out by means of Student's criterion.

The samples of the fetal thymus cryopreserved tissue were obtained from the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine. Fetal tissues were used on the grounds of the Ministry of Health Care of the Ukraine decree.

The sample (2×2 cm) was frozen-thawed and the implantation was performed into the buttocks superior external quadrant under the operating room conditions (once, on the 5–6th day of a postoperative period).

As a result of fetal thymus cryopreserved tissue therapy a positive clinical effect, manifested in the absence of painful syndrome within an observation term, normalizing of menstrual function was noted. According to the data of an objective study, US studies and a control laparoscopy, the reduction of endometrioid heterotopias was observed. All patients noted the increase in a physical tonus, resistance to respiratory diseases, absence of allergic reactions to hormonal preparations.

A tissue therapy resulted in the normalization of the immunity B-system functioning, suppressed inflammatory reactions. The investigations' results are grouped in the table.

State indices of the immunity B-system in patients with endometriosis

| Immunological indices | Healthy women | Patients with endometriosis |                 |            |            |
|-----------------------|---------------|-----------------------------|-----------------|------------|------------|
|                       |               | Before treatment            | After treatment |            |            |
|                       |               |                             | 10th day        | 1 month    | 6 months   |
| B-lymphocytes, %      | 17.3±0.7      | 21.6±1.45                   | 22.1±0.9*       | 18.4±0.8   | 16.9±0.68  |
| IgG, g/l              | 12.5±0.6      | 14.7±1.9                    | 13.8±0.59*      | 12.6±0.6   | 12.1±0.5   |
| IgA, g/l              | 1.1±0.09      | 1.9±0.5                     | 1.5±0.11*       | 1.2±0.10   | 1.2±0.10   |
| IgM, g/l              | 1.02±0.09     | 1.83±0.2                    | 1.4±0.10*       | 1.03±0.10  | 1.02±0.10  |
| CIC, g/l              | 1.76±0.13     | 1.25±0.2                    | 1.36±0.1*       | 1.28±0.09* | 1.29±0.10* |
| CIC, const            | 1.27±0.05     | 1.39±0.1                    | 1.35±0.06       | 1.21±0.03  | 1.20±0.03  |

Notes: \* —  $p < 0.05$  — a significant degree of differences between state indices of healthy women and patients after treatment.

A comparative evaluation of immunological indices of healthy women state ( $n = 20$ ) and women with endometriosis ( $n = 55$ ) testifies to the fact, that an immunological component is of great importance in



женщин с эндометриозом ( $n = 55$ ) свидетельствует, что иммунологический компонент имеет большое значение в развитии этой патологии. Так, исходные показатели в группе контроля и данные в группе больных имеют различия по нескольким позициям (таблица), в основном в сторону увеличения значений исследованных показателей при эндометриозе.

После имплантации ткани криоконсервированной вилочковой железы на 10-е сутки достоверно возросло (по отношению к исходному статусу) количество В-лимфоцитов и циркулирующих иммунных комплексов. Содержание Ig G, M и A снижалось в сравнении с исходными данными, однако не достигало уровня контрольных значений.

Через 1 мес после имплантации отмечалось дальнейшее снижение количества В-лимфоцитов, не достигающее значений контрольных цифр. Показатели, характеризующие уровень иммуноглобулинов в том числе и определяющие уровень циркулирующих иммунных комплексов, также продолжали снижаться. Через 6 мес число лимфоцитов снизилось ниже контрольных значений, количество иммуноглобулина M достигло уровня нормы.

Таким образом, можно констатировать, что эффект имплантации криоконсервированной вилочковой железы прослеживается весь срок наблюдения (1 мес) и наиболее выраженный ее эффект состоит в снижении числа В-лимфоцитов и циркулирующих иммунных комплексов. Клинически это находит проявление в подавлении воспалительной реакции, предупреждении рецидивов заболевания.

Анализ полученных данных показывает, что состояние В-системы иммунитета у больных эндометриозом характеризуется повышением содержания в периферической крови В-лимфоцитов и всех основных классов иммуноглобулинов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Стрижаков А. Н., Давыдов А. И. Эндометриоз. Клинические и теоретические аспекты. — М.: Медицина, 1996. — 330 с.
2. Стручков П. В., Константинова Н. А., Лаврентьев В. В., Чугалин А. Г. Скрининг-тест для оценки патогенных свойств ИК // Лаб. дело. — 1985. — № 7. — С. 410–412.
3. Чиркин В. В., Веников Ю. Ю. Определение сывороточных и Ig Сф-методом // Лаб. дело. — 1990. — № 6. — С. 3–6.
4. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes 1 separation and characterization // J. Exp. med. — 1970. — Vol. 132. — P. 702.

Поступила 09.11.98

the development of this pathology. So, initial indices in the control group and the data in patients' group have differences on several positions (Table), mainly, to the side of an increase in values of studied indices at endometriosis.

After the implantation of the thymus cryopreserved tissue, a number of B-lymphocytes and circulating immune complexes significantly increases (in respect to an initial status) on the 10th day. IgG, M and A content decreased in comparison with initial data, but did not reach the level of control values.

A further decrease in B-lymphocyte number, not reaching the values of control figures was observed in 1 month after implantation. The indices, characterizing the immunoglobulin level and determining the level of circulating immune complexes also continued to decrease. In 6 months a number of lymphocytes decreased lower control values, the immunoglobulin M quantity reached the norm's level.

Thus, one can state, that the cryopreserved thymus implantation effect is seen within all observation term (1 month) and the most manifested effect is a decrease in B-lymphocyte and circulating immune complex number. This fact is clinically revealed in suppression of an inflammatory reaction, prevention of the diseases relapses.

The analysis of the data obtained demonstrates, that the state of the immunity B-system in patients with endometriosis is characterized by an increase in B-lymphocyte content and all main immunoglobulin classes in a peripheric blood.

## REFERENCES

1. Strizhakov A.N., Davydov A.I. Endometriosis. Clinical and theoretical aspects. — M.: Meditsina, 1996. — 330 p.
2. Struchkov P.V., Konstantinova N.A., Lavrent'ev V.V., Chugalin A. G. Screening-test for IC pathogenic property evaluation // Lab. delo. — 1985. — № 7. — P. 410–412.
3. Chirkin V.V., Venikov Yu.Yu. Determination of serum and Ig by means of SF-method // Lab. delo. — 1990. — № 6. — P. 3–6.
4. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes 1 separation and characterization // J. Exp. med. — 1970. — Vol. 132. — P. 702.

Accepted in 09.11.98



# **Возможность использования дегидратационных свойств многокомпонентной мази “Левомеколь” при лечении воспалительного процесса в коже после отморожения**

И. Я. ПИНСОН

*Научно-исследовательский институт общей и неотложной хирургии, г. Харьков*

## **The Possibility of the Usage of Dehydrative Characteristics of the Multicomponent “Levomekol” Ointment when Treating the Inflammatory Process in Skin After Frostbite**

I. Ya. PINSON

*Scientific and Research Institute of General and Urgent Surgery*

Анализируются результаты применения мази “Левомеколь”, содержащей гидрофильные растворители ПЭО-400 и ПЭО-1500, при лечении отморожений кожи. Отморожение моделировали аппликатором КД-3 со снижением температуры кожи до  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин. Методами спиновых зондов установлено, что в клетках кожи через 5 ч после отморожения в течение 3-х суток развиваются гидратация и влажный некроз ткани, что было подтверждено ультраструктурными и гистологическими исследованиями. Применение мази способствовало отграничению зоны некроза, уменьшению воспалительного отека и ускорению процесса заживления ран. Клиническое использование методики исследований у больных с отморожением II-III степени свидетельствовало об уменьшении частоты вторичных некрэтомий в 2 раза и снижении продолжительности лечения больных.

Аналізуються результати використання мазі “Левомеколь”, яка містить гідрофільні розчинники ПЕО-400 та ПЕО-1500, при лікуванні відморожень шкіри. Відмороження моделювали аплікатором КД-3 зі зниженням температури шкіри до  $-20^{\circ}\text{C}$  на протязі 30 хв. Методами спинових зондів встановлено, що в клітинах шкіри через 5 год після відмороження на протязі 3-х діб розвиваються гідратація та вологий некроз тканини, що було підтверджено ультраструктурними та гістологічними дослідженнями. Використання мазі сприяло відокремленню площі некрозу, зниженню запального набряку та прискоренню загоювання ран. Клінічне використання методики дослідження у хворих з відмороженням II-III ступеня свідчило про зниження частоти проведення некрэтомій у 2 рази та тривалість лікування хворих.

The results of “Levomekol” ointment application, containing PEO-400 and PEO-1500 hydrophilic solvents when treating skin frostbites are analysed. A frostbite was modelled by means of AD-3 applicator with a decrease in skin temperature down to  $-20^{\circ}\text{C}$  within 30 min. Using the methods of spinal probes it has been established, that in skin cells in 5 hrs after frostbite during 3-5 days the hydration and the tissue humid necrosis develop, that was confirmed by means of ultrastructural and hystological studies. The ointment application contributed to the necrosis zone limitation, decrease in an inflammatory edema and acceleration of the wound healing process. A clinical usage of the investigation techniques in patients with the frostbite of II-III degree testified to a decrease in the frequency of secondary necrectomies in 2 times and the reduction of the patients treatment duration.

Постоянное стремление к улучшению результатов лечения отморожений побуждает к углубленному изучению проблемы развития общих реакций на холодовую травму, а также характера местных изменений органов и тканей при отморожениях.

Научные исследования последних десятилетий позволяют использовать достижения криобиологии в практических целях. Поиски в основном ведутся в двух направлениях: обеспечение повышения устойчивости тканей к холодовым повреждениям и разработка более эффективных методик в лечении холодовой травмы [1, 2, 6].

Среди факторов повреждения тканей, в частности кожи, при действии низких температур исследователи отмечают процессы кристаллизации вне- и внутриклеточной воды с разрушением биомембран клеток, что при низком содержании так называемой свободной воды в коже делает ее одной из наиболее устойчивых тканей к действию низких температур. Кроме этого, изменения содержания

A constant aspiration to improve the results of frostbite treatment provoked a deep study of the problem of development of general responses on a cold injury, as well as the character of organ and tissue local changes during frostbites.

Scientific studies of last decades allow to use cryobiology achievements in practical purposes. The search, in general, is conducted in two directions: to provide an increase of tissue stability to cold damages and elaborate more efficient methods of cold injury treatment [1, 2, 6].

Among the factors of tissue damage and, in particular, skin during the effect of low temperatures, the investigators noted the crystallizational and vitrificational processes of extracellular and intracellular water with the damage of cellular biomembranes, what at low content of so called free water in skin makes it one of the most stable tissues to the effect of low temperatures. Besides this, the changes of water content of osmotic gradient between a cell and intracel-



воды и осмотического градиента между клеткой и внеклеточной жидкостью после отморожения являются также неблагоприятным фактором развития воспаления в зоне отморожения, увеличивающим объем зоны некроза и ухудшающим восстановительные процессы в ткани кожи [3].

Холодовая травма в средних широтах с частотой отморожений сегментов конечностей колеблется от 14 до 23 случаев на 1 000 лиц, подвергшихся действию атмосферных факторов в зимнее время (температура, влажность воздуха, скорость ветра и др.), последствия холодových травм весьма значительны: образование вялотекущих ран, некроз сегментов конечностей и тканей лица [4, 5, 7].

Перспективными являются экспериментальное изучение воспалительной реакции после отморожений при действии веществ, связывающих тканевую воду, и применение криопротекторов при лечении отморожений в клинической практике.

Исследования были проведены на 94 крысах (три группы) линии Вистар и в клинике у 28 больных с отморожениями сегментов нижних конечностей II–III степени.

В экспериментальной части работы изучали морфологические и физиологические изменения в ткани кожи после моделирования местного отморожения. Была применена модель отморожения, описанная J. Hirvonen [4].

Для создания зоны отморожения на участок кожи уха животного в условиях тиопентал-ГОМК наркоза действовали парами жидкого азота в течение 20–30 мин. Проводили контроль кожной температуры, которую снижали до  $-20^{\circ}\text{C}$ , параллельно измеряли ректальную температуру и температуру в наружном слуховом проходе. Для стандартизации площади холодового воздействия использовали аппликатор дерматологический АД-3 с площадью рабочей поверхности  $5\text{ мм}^2$ . После отогревания при комнатной температуре через 3–5 ч у животных наблюдались гиперемия и отек в области повреждений ушной раковины, через 2–3 сут — образование экссудатов в виде мелких и сливных пузырей, затем к 7-м суткам — некротические изменения в зоне отморожения и формирование демаркационной линии, начиная с 14-х суток — эпителизация раневой поверхности.

Полное заживление ран после отторжения некротических масс наблюдалось к 30–40 дню после воспроизведения модели отморожения.

В первой группе (из 25 животных) исследовали изменения в коже животных, возникающие после местного отморожения через 1, 3, 7, 14 и 30 сут. Во второй группе (из 24 животных) в аналогичные сроки изучали динамику процессов некроза и демаркации в условиях аппликации к поврежденному участку мази на гидрофильной основе "Левомеколь", содержащей криопротекторы ПЭО-400 — 76,2 и ПЭО-1500 — 19,05%. В качестве контроля (третья группа) были использованы результаты ис-

луживания тканей после отморожения. Вывод: луживание тканей после отморожения является также неблагоприятным фактором развития воспаления в зоне отморожения, увеличивающим объем некроза и ухудшающим восстановительные процессы в ткани кожи [3].

Холодовая травма в средних широтах с частотой отморожений сегментов конечностей колеблется от 14 до 23 случаев на 1 000 лиц, подвергшихся действию атмосферных факторов в зимнее время (температура, влажность воздуха, скорость ветра и др.), последствия холодových травм весьма значительны: образование вялотекущих ран, некроз сегментов конечностей и тканей лица [4, 5, 7].

Перспективными являются экспериментальное изучение воспалительной реакции после отморожений при действии веществ, связывающих тканевую воду, и применение криопротекторов при лечении отморожений в клинической практике.

Исследования были проведены на 94 крысах (три группы) линии Вистар и в клинике у 28 больных с отморожениями сегментов нижних конечностей II–III степени.

В экспериментальной части работы изучали морфологические и физиологические изменения в ткани кожи после моделирования местного отморожения. Была применена модель отморожения, описанная J. Hirvonen [4].

Для создания зоны отморожения на участок кожи уха животного в условиях тиопентал-ГОМК наркоза действовали парами жидкого азота в течение 20–30 мин. Проводили контроль кожной температуры, которую снижали до  $-20^{\circ}\text{C}$ , параллельно измеряли ректальную температуру и температуру в наружном слуховом проходе. Для стандартизации площади холодового воздействия использовали аппликатор дерматологический АД-3 с площадью рабочей поверхности  $5\text{ мм}^2$ . После отогревания при комнатной температуре через 3–5 ч у животных наблюдались гиперемия и отек в области повреждений ушной раковины, через 2–3 сут — образование экссудатов в виде мелких и сливных пузырей, затем к 7-м суткам — некротические изменения в зоне отморожения и формирование демаркационной линии, начиная с 14-х суток — эпителизация раневой поверхности.

Полное заживление ран после отторжения некротических масс наблюдалось к 30–40 дню после воспроизведения модели отморожения.

В первой группе (из 25 животных) исследовали изменения в коже животных, возникающие после местного отморожения через 1, 3, 7, 14 и 30 сут. Во второй группе (из 24 животных) в аналогичные сроки изучали динамику процессов некроза и демаркации в условиях аппликации к поврежденному участку мази на гидрофильной основе "Левомеколь", содержащей криопротекторы ПЭО-400 — 76,2 и ПЭО-1500 — 19,05%. В качестве контроля (третья группа) были использованы результаты ис-



следований 14 интактных животных после действия наркоза.

Эксперименты проводили в отделе криомедицины ИПКиК НАН Украины под руководством проф. Б. П. Сандомирского, морфологический раздел исследований выполняли в лаборатории морфологии Харьковского НИИ общей и неотложной хирургии под руководством проф. Л. С. Гончаровой. Опыты по определению свойств тканевой воды в коже выполнялись совместно с лабораторией комбинированных лекарственных средств Харьковского химико-фармацевтического института (с.н.с. Л. В. Иванов). Клинические исследования проводили на базе ожогового центра 4-й Харьковской клинической больницы скорой медицинской помощи им. А. И. Мещанинова (зав. проф. Т. Г. Григорьева).

Методы исследований и количество животных в эксперименте представлены в таблице.

Методы исследований и количество животных в эксперименте

| Объект исследований                           | Методы                                                         | Количество животных |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------|
| Содержание вне- и внутриклеточной воды в коже | Метод спиновых зондов                                          | 24                  |
| Морфология кожи, морфология сосудов кожи      | Световая микроскопия                                           | 14                  |
| Ультраструктура ткани кожи и эритроцитов      | Электронная микроскопия эритроцитов, капилляров, эпителиоцитов | 10                  |
| Микроциркуляция в сосудах кожи                | Контактная биомикроскопия                                      | 28                  |
| Концентрация ионов К и Na в эритроцитах       | Плазменная фотометрия                                          | 18                  |

При изучении содержания и вязкости воды во внеклеточной среде и внутри клеток кожи было определено, что внутриклеточная жидкость представляет собой комбинацию из глицериноподобной жидкости (вязкостью в 6,5 раз выше вязкости воды) и так называемой свободной воды с вязкостью как у цитозоля эритроцита (в 2,5 раза выше вязкости воды). Причем количество свободной неиммобилизированной жидкости в ткани кожи меньше, чем глицериноподобной жидкости.

Использование криопротектора ПЭО-1500 приводило к связыванию свободной фракции как вне-, так и внутриклеточной воды, и кожа по виду содержащейся в ней жидкости приобретала гомогенный характер с выравниванием вязкости воды в роговом и базальном слоях клеток, что является предпосылкой усиления ее сохранности при поверхностном отморожении.

Непосредственно после отморожения в нативной коже наблюдалось увеличение пропорции между несвязанной водой и глицериноподобной жидкостью вследствие деструкции клеток глубоких слоев и выхода цитозоля клеток в межклеточное пространство. После отморожения через 3 сут данная закономерность усиливалась в результате

логической части исследований, проведенной в лаборатории морфологии Харьковского Научно-исследовательского института общей и неотложной хирургии под руководством проф. Л. С. Гончарова. Эксперименты по определению свойств тканевой воды в коже выполнялись совместно с лабораторией комбинированных лекарственных средств Харьковского химико-фармацевтического института под руководством ведущего научного работника Л. В. Иванова. Клинические исследования были выполнены на базе ожогового центра 4-й Харьковской клинической больницы скорой медицинской помощи, названной в честь А. И. Мещанинова проф. Т. Г. Григорьевой.

Исследования методов и количество животных в эксперименте представлены в таблице.

Методы исследований и количество животных в эксперименте

| Объекты под изучением                            | Методы                                                         | Количество животных |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------|
| Содержание экстра- и внутриклеточной воды в коже | Метод спиновых зондов                                          | 24                  |
| Морфология кожи, морфология сосудов кожи         | Световая микроскопия                                           | 14                  |
| Морфология и структура тканей кожи и эритроцитов | Электронная микроскопия эритроцитов, капилляров, эпителиоцитов | 10                  |
| Микроциркуляция в сосудах кожи                   | Контактная биомикроскопия                                      | 28                  |
| Концентрация ионов К и Na в эритроцитах          | Плазменная фотометрия                                          | 18                  |

При изучении содержания и вязкости воды во внеклеточной среде и внутри клеток кожи было определено, что внутриклеточная жидкость представляет собой комбинацию из глицериноподобной жидкости (вязкостью в 6,5 раз выше вязкости воды) и так называемой свободной воды с вязкостью как у цитозоля эритроцита (в 2,5 раза выше вязкости воды). Причем количество свободной неиммобилизированной жидкости в ткани кожи меньше, чем глицериноподобной жидкости.

Использование криопротектора ПЭО-1500 приводило к связыванию свободной фракции как вне-, так и внутриклеточной воды, и кожа по виду содержащейся в ней жидкости приобретала гомогенный характер с выравниванием вязкости воды в роговом и базальном слоях клеток, что является предпосылкой усиления ее сохранности при поверхностном отморожении.

Непосредственно после отморожения в нативной коже наблюдалось увеличение пропорции между несвязанной водой и глицериноподобной жидкостью вследствие деструкции клеток глубоких слоев и выхода цитозоля клеток в межклеточное пространство. После отморожения через 3 сут данная закономерность усиливалась в результате



прогрессивного действия факторов воспаления в зоне отморожения. Некроз кожи, наблюдающийся к 5–7-м суткам, свидетельствует о том, что отторгнутая кожа содержит преимущественно несвязанную воду, т. е. наблюдаются изменения, известные биологам и клиницистам как “влажный некроз”.

Применение мази “Левомеколь” с первых суток после отморожения уменьшало соотношение между свободной и связанной водой как внутри клеток, так и во внеклеточной жидкости, что свидетельствовало об уменьшении экссудативных процессов в зоне холодового повреждения.

Результаты исследования содержания и физических свойств воды в коже после отморожения соответствуют данным, полученным при изучении гистологических срезов ткани кожи и ее ультраструктурных изменений с помощью электронной микроскопии.

Эта закономерность была прослежена и при контактной биомикроскопии микрососудистого русла у животных второй группы.

Показатели микроциркуляции у животных через 5 ч после отморожения значительно ухудшались: в 7 раз уменьшалось количество капилляров на единицу поверхности кожи, достигая  $11 \pm 0,9$  ед/мм<sup>2</sup>, увеличивалось число спазмированных артериол и венул, наблюдалось образование пристеночных и обтурирующих тромбов. Процент тромбированных венул составлял 42,6.

К 7–10-м суткам ишемические изменения ткани нарастали, процент тромбированных венул увеличивался до 52,1; уменьшалась скорость кровотока, отмечались его прерывистость и маятникообразный характер.

При проведении лечебных мероприятий во второй группе микроциркуляторная картина кожи животных претерпевала существенные изменения по сравнению с первой группой. Так, к 14-м суткам количество капилляров на 1 мм<sup>2</sup> достигало максимальных значений, составляя  $62 \pm 2,1$  ед/мм<sup>2</sup>; артериоло-венулярное соотношение снижалось практически до нормальных величин ( $0,4 \pm 0,1$ ). Локально-спазмированные артериолы составляли 12,6%, тромбированные венулы — 9,3% от общего числа микрососудов.

В целом общая микрососудистая сеть хотя и была несколько обеднена, однако ее показатели приближались к нормальным значениям.

Результаты исследований микроциркуляторного русла указывают, что применение мази на гидрофильной основе с 1-х суток после отморожения препятствует развитию выраженного интерстициального отека и способствует обратимости микроциркуляторных расстройств. В этом случае интенсивность некроза кожи менее выражена, а улучшение микрогемодикуляции приводит к более интенсивным восстановительным процессам.

“Levomekol” ointment application from the first day after the frostbite decreased the correlation between free and binded water inside cells and in an extracellular liquid testified to the decrease of exudative processes in the cold damage zone.

The results of the investigation of water content and its physical properties after the frostbite testify to the data, obtained when studying histological sections of a skin tissue and its ultrastructure changes by means of electrone microscopy.

This regularity was also observed during the contact biomicroscopy of microvascular channel in the animals of the second group.

Microcirculation indices in animals in 5 hrs after the frostbite were considerably aggravated: in 7 times the capillary number per skin surface unit decreased, reaching  $11 \pm 0.9$  units/mm<sup>2</sup>, the number of spasmed arteriols and veinules increased, the formation of parietal and obturating thromboses observed. The percentage of thrombosed veinules was 42.6%.

Up to the 7th–10th day tissue ischemic changes increases, the percentage of thrombosed veinules increased up to 52.1; the blood flow rate decreased, its interrupted and pendulum-like character have been observed.

When conducting treating measures in the second group, microcirculatory picture of animal's skin subjected to considerable changes in comparison with the first group. So, up to the 14th day the capillary number on 1 mm<sup>2</sup> reached maximum values, composing  $62 \pm 2.1$  units/mm<sup>2</sup>; the correlation between arteriols and veinules decreased practically up to the normal values ( $0.4 \pm 0.1$ ). The percentage of local and spasmed arteriols was 12.6, of thrombosed veinules — 9.3% of the general microvessel number.

In a whole, since the general microvascular network was some pure, but its indices approximated to the normal values.

The results of the investigations of microcirculatory channel point, that the application of “Levomekol” ointment on hydrophilic base, beginning from the first day after a frostbite, prevents the development of expressed interstitial edema and promotes to the reversibility of microcirculatory disorders. In this case the skin necrosis intensity is less expressed, and microhemocirculation improvement leads to more intensive recovering processes.

The clinical part is presented by the results of the investigations in 28 patients with the frostbites of low extremity segments of the II and III degree, divided on 2 groups in dependence on the applied treating method.

10 patients composed a control group, treating scheme of those included classical measures as a surface warming, vascular and antibacterial agents, neutral ointment dressings and when forming deep necrosis — necrectomia. The following treating scheme was the base also for the experimental patient's group (18 patients), in those the treating



Клинический раздел представлен результатами исследований 28 больных с отморожениями сегментов нижних конечностей II и III степени, распределенных на 2 группы в зависимости от применявшегося метода лечения. Контрольную группу составили 10 больных, схема лечения которых включала классические мероприятия в виде поверхностного отогревания, сосудистых и антибактериальных средств, нейтральных мазевых повязок и при формировании глубоких некрозов — некрэктомии. Данная схема лечения являлась базовой и для опытной группы больных (18 больных), в которой применялся способ лечения, заключавшийся в использовании с первых часов после получения термической травмы мазевых повязок, содержащих неводные гидрофильные растворители (мазь "Левомеколь"). С 5–7-х суток, когда процесс демаркации отмороженного участка завершался, в комплекс лечения включали применение сорбентных повязок.

Изучение магистрального и периферического кровообращения в конечностях по данным реовазографии и доплерографии свидетельствовало о нарушениях гемодинамики как артериального, так и венозного кровообращения у больных опытной и контрольной групп. Уже к 7-м суткам были отмечены существенные отличия в восстановлении кровотока в опытной группе: наблюдалось увеличение объемного кровотока в 2 раза по сравнению с исходным на уровне подколенной артерии, в то время как в контрольной группе прирост данных показателей составлял всего лишь 20%. В венозной системе увеличение кровотока в опытной группе также превышало контрольные значения.

К 14-м суткам восстановление кровотока в опытной группе было максимальным и составляло для артерии — 70% от нормальных значений и для вены — 60%, что способствовало уменьшению зоны некроза, а также более благоприятному течению заживления поверхностных ран и ран, возникших после ампутации фаланг пальцев.

Таким образом, местная реакция на отморожения сегментов конечностей проявляется в нарушении гемодинамики как в артериальном, так и венозном звене. Применение местной дегидратационной терапии в виде гидрофильной мази и сорбентных повязок значительно уменьшало отечность тканей в зоне отморожения и выше отмороженного сегмента, что способствовало более интенсивному восстановлению магистрального кровотока и функционированию коллатералей вследствие уменьшения синдрома тканевого сдавливания в конечностях.

Исследование клинических показателей и соотношения калия и натрия в эритроцитах и плазме крови у больных опытной и контрольной групп также свидетельствовало о более раннем снижении общей интоксикации и воспалительной реакции с

методом, using ointment dressings, containing not-aqueous hydrophilic solvents ("Levomekol" ointment) from the first hrs after the thermic injury has been applied. Beginning with the 5th–7th day, at the end of demarcational process in the frostbited field, the surface application of sorbent dressings was added in treating complex.

The study of magistral and peripheric blood circulation in extremities according to the data of rheovasography and dopplerography testified to the hemodynamics disorders of the arterial and veinous blood circulation in patients of experimental and control groups. Even up to the 7th day considerable differences in blood flow recovery in the experimental group have been observed: an increase of volume blood flow in 2 times in comparison with initial at the level of popliteal artery was observed, meanwhile in the control group the increase of following indices was only 20%. In a veinous system the increase of blood flow in the experimental group also was higher than control values.

Up to the 14th day the blood flow recovery in the experimental group was maximum and composed in artery 70% of the normal values and in veine — 60%, that promoted to the decrease of necrosis zone, as well as to more favourable recovery course of surface wounds and ones, appeared after the finger phalanx amputation.

Thus, the local response to the frostbites of the extremity segments manifests in the hemodynamics disturbance of arterial and veinous links. The application of a local dehydrative therapy such as ointment and sorbent dressings considerably decreased tissue edema in the frostbite zone and at the place, located higher than frostbited segment, that promoted to more intensive recovery of the magistral blood flow and to collateral functioning in consequence of the decrease of the tissue constraining syndrome in extremities.

The investigation of clinical indices and potassium and sodium relations in erythrocytes and blood plasm in patients of the experimental and control group also testified to more early decrease of general intoxication and inflammatory response with the normalization of physiological constants in shorter terms in patients of the experimental group.

The number of accomplished surgical wound treatments after the frostbites, consisting in the amputation of necrotized tissue zones, fasciotomy and amputation of osteal sequesters in the control group was in average 2.8 with the number of bed per day 45.6. In the experimental group these indices were 1.7 surgical treatments on one patient when the decrease of the duration of the average bed per day down to 32.2.

Thus, the clinical results of the application of the ointment on hydrophilic base in patients with the extremity frostbites testified to the favourable frostbite course and earlier beginning of the processes of



нормализацией физиологических констант в более короткие сроки у больных опытной группы.

Количество произведенных хирургических обработок ран после отморожений, заключающихся в удалении некротизированных участков кожи, фасциотомии и удалении костных секвестров, в контрольной группе составляло в среднем 2,8 с койко-днем 45,6. В опытной группе данные показатели составляли 1,7 хирургических обработок на одного пациента при уменьшении продолжительности среднего койко-дня до 32,2.

Таким образом, клинические результаты применения мази на гидрофильной основе у пациентов с отморожениями конечностей свидетельствовали о более благоприятном течении отморожения и более раннем начале процессов заживления ран, образовавшихся на месте термических повреждений.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Теория и практика местного лечения гнойных ран / Под ред. В. М. Даценко.— Киев: Здоров'я, 1995.— 384 с.
2. Котельников В. Н. Отморожения.— М.: Медицина, 1985.— 216 с.
3. Клинтевич В. П. Повреждения холодом.— М.: Наука, 1977.— 177 с.
4. Hirvonen J. Vital reactions to frostbite of the ear and paw skin in guinea pigs exposed to the cold // Z. Rechtsmed.— 1990.— V. 103, № 4.— P. 249–256.
5. Pogrel M. A., Yen C. K., Taylor R. A study of infrared thermographic assessment of liquid nitrogen cryotherapy // Oral Surg. J.— 1996.— V. 81, № 4.— P. 396–401.
6. Renstrom B. Frostbite. General cooling can be life-threatening // J. Alaska Med.— 1993.— V. 17, № 4.— P. 13–18.
7. Virokannas H., Attonen H. Risk of frostbite in vibration-induced white finger cases // Arctic Med. Res.— 1993.— V. 52, № 2.— P. 69–72.

Поступила 12.01.99

wound recovery, formed at the place of thermal damages.

### REFERENCES

1. Theory and practice of the purulent wound local treatment / Ed. by B. M. Datsenko.— Kiev: Zdorov'ya, 1995.— 384 p.
2. Kotel'nikov V. N. Frostbites.— M.: Meditsina, 1985.— 216 p.
3. Klintsevich V. P. Damages by cold.— M.: Nauka, 1977.— 177 p.
4. Hirvonen J. Vital reactions to frostbite of the ear and paw skin in guinea pigs exposed to the cold // Z. Rechtsmed.— 1990.— V. 103, № 4.— P. 249–256.
5. Pogrel M. A., Yen C. K., Taylor R. A study of infrared thermographic assessment of liquid nitrogen cryotherapy // Oral Surg. J.— 1996.— V. 81, № 4.— P. 396–401.
6. Renstrom B. Frostbite. General cooling can be life-threatening // J. Alaska Med.— 1993.— V. 17, № 4.— P. 13–18.
7. Virokannas H., Attonen H. Risk of frostbite in vibration-induced white finger cases // Arctic Med. Res.— 1993.— V. 52, № 2.— P. 69–72.

Accepted in 12.01.99



## Локальная гипотермия передней брюшной стенки и сократительная функция матки у беременных крольчих

В. И. ГРИЩЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

В. В. ЛАЗУРЕНКО

*Харьковский государственный медицинский университет*

## Local Hypothermia of Anterior Abdominal Wall and Uterus Contractile Function in Pregnant Rabbit Females

V. I. GRISCHENKO

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

V. V. LAZURENKO

*Kharkov State Medical University*

С целью выяснения терапевтических возможностей применения локальной гипотермии передней брюшной стенки (ЛГПБС) для коррекции родовой деятельности при ее аномалиях, а также для родовозбуждения нами были проведены экспериментальные исследования на животных.

Цель исследований — определить оптимальную температуру проведения ЛГПБС для получения контрактильного эффекта маточной мускулатуры у беременных крольчих; выработать необходимый режим и экспозицию проведения ЛГПБС для усиления родовой деятельности или родовозбуждения; определить влияние ЛГПБС на состояние маточно-плацентарного комплекса и новорожденных крольчат.

Опыты проводили на 30 беременных крольчихах (всего 140 исследований) весом  $2751,5 \pm 112,3$  г. Все животные были подразделены на 3 группы. Контрольную группу составили 10 беременных крольчих, не подвергавшихся каким-либо воздействиям, у которых роды прошли самостоятельно. Вторая группа включала 10 беременных крольчих, которым на 28-й день после спаривания, т.е. за 2 дня до предполагаемого срока родов (доношенная беременность у данного вида животных соответствует 30 календарным дням), для индукции родов проводился сеанс ЛГПБС. Третью группу составили 10 беременных крольчих с доношенной беременностью, у которых слабость родовой деятельности моделировали введением 0,5 мг партусистена в 20 мл физиологического раствора в ушную вену крольчихи после начала регулярной родовой деятельности. Эффект достигался через 5–15 мин после введения препарата и регистрировался методом электрогистерографии. Лечение слабости родовой деятельности проводили с использованием ЛГПБС.

Методика проведения ЛГПБС: к предварительно выбранной передней брюшной стенке беременной крольчихи в проекции маточных рогов прикладывалась специально изготовленная в СКТБ Института проблем криобиологии и криомедицины накладка, в которой циркулировала охлажденная до заданной температуры жидкость (водно-спиртовая смесь в соотношении 1:1). Охлаждение циркулирующей жидкости в замкнутом контуре достигалось за счет работы аппарата "Холод-2Ф" и варьировало в пределах от 30 до 0 °C.

С целью определения оптимального метода проведения ЛГПБС применялись следующие градации температуры: 30, 25, 20, 15, 10, 5, 0 °C. Для выбора оптимальной экспозиции продолжительность ЛГПБС каждого уровня охлаждения длилась от

We have accomplished experimental investigations in animals to find out therapeutical possibilities of the application of a local hypothermia of an anterior abdominal wall (LHAAW) for the labor activity correction at its abnormalities, as well as for the labor stimulation.

The investigation aim was to determine an optimal temperature of LHAAW conducting for obtaining a contractile effect of an uterine musculature in pregnant rabbit females; to elaborate a necessary regimen and exposure of LHAAW conducting for strengthening of a labour activity or labour stimulation; to determine LHAAW effect on the state of an uterine-placental complex, fetuses and newborn rabbits.

Experiments were conducted in 30 pregnant rabbit females (140 investigations totally) of  $2751.5 \pm 112.3$  g weight. All animals were divided in 3 groups. 10 pregnant rabbit females not subjected to any effects, in which the labour proceeded without assistance, made a control group. The second group included 10 pregnant rabbit females, to whom on the 28th day after coupling, i.e. 2 days before supposed term of labour (a mature pregnancy in the given species of animals corresponds to 30 calendar days [2]), the LHAAW seance was carried-out for the labour induction. The third group consisted of 10 pregnant rabbit females with a mature pregnancy, in which the weakness of a labour activity was modelled by injection of 0.5 mg of partusistene in 20 ml of physiologic solution in an otic vein of a rabbit female after beginning of a regular labour activity. The effect was reached in 5–15 min after the preparation introduction and was recorded by means of the electrohysterography method. The treatment of the weakness of a labour activity was accomplished using LHAAW.

The techniques of LHAAW conducting: to a preliminarily shaven anterior abdominal wall of a pregnant rabbit female in the projection of uterine cornus, the plate, especially created in Special Designing and Technical Bureau of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, where the liquid (aqueous-spirit mixture in the ratio 1:1) cooled down to set temperature circulated, was applied. Cooling of circulating liquid in a closed circuit was reached due to the "Kholod-2F" apparatus work and varied in the limits of 30 to 0 °C.

In order to determine an optimal method of LHAAW conducting the following temperature gradations were applied: 30, 25, 20, 15, 10, 5, 0 °C. For the selection of an optimal exposure the LHAAW duration for each level of cooling lasted from 10 min to 1.5 hrs. Thereat, the temperature changes of rabbit female body on an anterior



10 мин до 1,5 ч. При этом игольчатыми термодатчиками на электронном термометре [3] регистрировались изменения температуры тела крольчихи на передней брюшной стенке в месте приложения накладок, в подмышечной впадине, на шейке матки и в прямой кишке.

При регистрации сократительной способности матки использовали электрогистерограф. Крольчихе за 10–15 дней до спаривания под местной 0,5%-й новокаиновой анестезией в стенку матки вживляли электроды. С началом родовой деятельности к электродам прикрепляли систему, регистрирующую маточные сокращения. При оценке влияния ЛГПБС на контрактильную активность матки учитывали амплитуду, частоту сокращений и изменение тонуса миометрия.

После родов крольчиха подвергалась эвтаназии и проводилась гистологическая оценка состояния ее маточно-плацентарного комплекса и новорожденных крольчат [1]. Полученные данные сравнивались с результатами исследований у беременных крольчих контрольной группы.

Результаты исследований показали, что при воздействии ЛГПБС в диапазоне от 30 до 20 °C частота и амплитуда сокращений матки по сравнению с исходным тонусом незначительно повышались. При проведении ЛГПБС в режиме 15–10 °C тонус матки резко увеличивался, возрастала частота и продолжительность сокращений. При температурном воздействии 5–0 °C сокращения приобретали тетанический характер с максимальной амплитудой и продолжительностью. Таким образом, наиболее оптимальной для сокращения матки была температура 10–15 °C.

Продолжительность воздействия охлаждения на переднюю брюшную стенку беременной крольчихи определялась также экспериментально. Наиболее оптимальной была экспозиция ЛГПБС 30 мин (15-минутное воздействие — практически без эффекта; 45 мин и более — по эффективности такое же, как и 30-минутное ( $P > 0,01$ )). Регистрация температуры различных участков тела крольчих после проведения 30-минутной ЛГПБС при температуре охлаждения 10 °C свидетельствовала о достоверном ее снижении в шейке матки ( $33,6 \pm 0,2$  °C) и прямой кишке ( $33,4 \pm 0,3$  °C).

При изучении маточно-плацентарного комплекса и состояния потомства обращает внимание факт, что при температуре ЛГПБС 10–15 °C с экспозицией в 30 мин достоверных патологических отличий от контрольной группы не выявлено. Снижение температуры ЛГПБС до 0–5 °C приводило в большинстве случаев к отслойке плаценты и гибели плодов в родах.

Таким образом, результаты проведенного экспериментального исследования свидетельствуют, что ЛГПБС способна вызывать и усиливать сократительную функцию матки и, следовательно, данный метод может быть применен в клинической практике с учетом оптимального температурного режима и экспозиции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вельт У., Шторк Ф. Введение в цитологию и гистологию животных / Пер. с нем. — М.: Мир, 1976. — 260 с.
2. Западнюк И. П. Лабораторные животные. — Киев: Вища шк., 1974. — 303 с.
3. Снурников А. С. Электронный термометр для медико-биологических исследований // 2-я Всесоюз. конф. "Механизмы криоповреждений и криозащиты биол. объектов". — Харьков, 1984. — Т. 1. — С. 267.

Поступило 07.07.99

abdominal wall in the place of the plate application, in an axillary space, in uterus neck and in rectum were recorded by means of needle-shaped thermocouples in an electron thermometer [3].

When recording the uterus contractile capacity one used the electrohysterograph. 10–15 days before coupling the electrodes were implanted under a local 0.5% novocainic anesthesia into the uterus wall. With beginning of a labour activity the system, recording uterine contractions was attached to electrodes. To estimate LHAAW effect on the uterus contractile activity one took into account the amplitude, frequency of contractions and change of myometry tonus.

After labour a rabbit female was eutanized and a hystological evaluation of the state of its uterine-placental complex and newborn rabbits was accomplished [1]. The data obtained were compared with the investigations results in pregnant rabbit females of a control group.

The investigations results have demonstrated, that under LHAAW effect in the range from 30 to 20 °C the frequency and amplitude of uterus contractions in comparison with an initial tonus slightly increased. When performing LHAAW under the regimen of 15–10 °C the uterus tonus sharply increased, the frequency and duration of contractions augmented. Under temperature effect of 5–0 °C contractions gained a tetanic character with a maximum amplitude and duration. Thus, the most optimal temperature for uterus contraction was the temperature of 10–15 °C.

The duration of cooling effect on an anterior abdominal wall of a pregnant rabbit female was also experimentally determined. The most optimal was the LHAAW exposure of 30 min (a 15th min effect — practically without effect; 45 min and more — the same according to the efficiency as and a 30th min one ( $P > 0.01$ )). The temperature recording of different body's parts of rabbit females after the 30 min LHAA conducting at the cooling temperature of 10 °C testified to its statistically significant decrease in uterus neck ( $33,6 \pm 0,2$  °C) and in rectum ( $33,4 \pm 0,3$  °C).

When studying an uterine placental complex and the posterity state we paid attention to the fact, that during the LHAAW temperature of 10–15 °C with the exposure of 30 min, statistically significant pathological distinctions from a control group were not revealed. A decrease of the LHAAW temperature down to 0–5 °C resulted in the majority of cases in a placental detachment and death of fetuses during the labour.

Thus, the results of the conducted experimental investigation testify to the fact, that LHAAW is capable to cause and strength a contractile function of the uterus and, consequently, the given method may be applied in a clinical practice taking into consideration an optimal temperature regimen and the exposure.

## REFERENCES

1. Velt U., Shtorkh F. Introduction in cytology and histology of animals / Translation from German. — M.: Mir, 1976. — 260 p.
2. Zapadnyuk I.P. Laboratory animals. — Kiev: Vyscha shkola, 1974. — 303 p.
3. Snurnikov A.S. Electron thermometer for medical and biological studies // 2nd All-union conference "Mechanisms of cryodamages and cryoprotection of biological objects". — Kharkov, 1984. — V. 1. — P. 267.

Accepted in 07.07.99



## **Активность супероксиддисмутазы при воспалительном процессе и введении криоэкстракта хориона и экстракта плаценты**

Н. П. СУББОТА, П. П. ПАШИНСКИЙ

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

В. А. ПИТЬКО

*Харьковский государственный медицинский университет*

## **Superoxide Dismutase Activity during an Inflammatory Process and the Introduction of the Chorion Cryoextraction and Placenta Extraction**

N. P. SUBBOTA, P. P. PASHINSKY

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

V. A. PITKO

*Kharkov State Medical University*

Исследованиями последних лет установлено, что накопление продуктов окисления липидов может привести к развитию патологических процессов, играющих существенную роль в патогенезе целого ряда заболеваний [2, 3]. В условиях патологии, например при воспалительных процессах, нарушается механизм метаболической регуляции восстановления кислорода. Безопасная утилизация его становится невозможной и часть кислорода идет на неконтролируемое перекисное окисление липидов (ПОЛ). Накопление конечных продуктов ПОЛ (окисленных жирных кислот, альдегидов, кетонов) может привести к необратимой инактивации ферментов, структурной перестройке мембран, изменению их проницаемости, вплоть до разрыва, и в конечном итоге — к гибели клетки.

Реакция перекисного окисления контролируется физиологической антиоксидантной системой (АОС). Она обладает свойством тормозить аутоокисление на инициальной стадии образования свободных радикалов липидов или активных форм кислорода в клеточных мембранах, осуществляет экранирование функциональных групп белков и других биомолекул [7].

Цель исследования — изучение влияния криоэкстракта хориона и экстракта плаценты разных сроков гестации на активность фермента супероксиддисмутазы (СОД) при экспериментальном воспалительном процессе у животных. В работе использованы белые беспородные крысы. Моделью воспаления служил острый асептический перитонит, вызываемый внутрибрюшинным введением 5 мг  $\lambda$ -карагинена ("Sigma", USA) в 1 мл изотонического раствора хлорида натрия [1]. Криоэкстракт хориона и экстракт плаценты (8–12 недель гестации плода) получали, как описано в работе [5], а активность СОД контролировали, используя общепринятый метод [4]. Препараты были стандартизованы по содержанию нуклеиновых кислот и общего белка [6], вводились внутрибрюшинно в дозе 1,0 мл.

Показано, что при введении здоровым животным криоэкстракта хориона (КХ) и экстракта плаценты (ЭП) активность СОД по сравнению с контрольными величинами увеличивается (таблица). При этом введение КХ активировало активность фермента в большей мере, чем ЭП.

О нарушении естественных систем защиты организма от чрезмерного ПОЛ при воспалительном процессе у животных свидетельствовало резкое снижение показателей СОД. Не исключено также снижение и других параметров, контролируемых в норме антиокислительные реакции организма, актив-

It has been established by recent investigations, that the accumulation of the lipid peroxidation products may result in a development of pathological processes, playing a significant role in the pathogenesis of quite a number of diseases [2, 3]. Under pathology conditions, at inflammatory processes, for example, the mechanism of metabolic regulation of oxygen recovering is disordered. Its safety utilisation becomes impossible and a part of the oxygen is spent to non-controlled lipid peroxidation (LPO). The accumulation of LPO final products (oxidized fatty acids, aldehydes, ketones) may result in the enzyme irreversible inactivation, membrane structural restructuring, change of their permeability, up to the rupture and, finally, in the cell death.

The peroxidation reaction is controlled by a physiological antioxidant system (AOS). It possesses the property to inhibit the autooxidation at an initial stage of the lipid free radical formation or the oxygen active forms in cellular membranes, performs the screening of the protein functional groups and other biomolecules [7].

The investigation aim was to study the effect of chorion cryoextraction and placenta extraction of different gestation terms on the activity of superoxide dismutase (SOD) enzyme during an experimental inflammatory process in animals. White breedless rats were used in the work. An acute aseptic peritonitis, caused by an intraperitoneal introduction of 5 mg of  $\lambda$ -karaginen ("Sigma", USA) in 1 ml of the sodium chloride isotonic solution [1] was the inflammation model. Chorion cryoextraction and placenta extraction (8–12 weeks of fetus gestation) were obtained as it is described in the work [5], but SOD activity was controlled by using a commonly used method [4]. The preparations were standardized according to the content of nucleic acids and total protein [6] and were intraperitoneally introduced in the 1.0 ml dose.

It has been shown, that when introducing the chorion cryoextraction (CC) and placenta extraction (PE) to healthy animals, the SOD activity in comparison with control values increases (Table). Thereat the CC introduction activated the enzyme activity in a greater extent, than PE.

A sharp decrease in the SOD indices testified to the disorder of natural systems of the organism protection from an excessive LPO during an inflammatory process in animals. During the inflammatory process development without usage of preparations a day later of observations, the enzyme activity decreased by 44, in 2 days — by 69%. After 5 observation days the SOD activity re-



**Активность СОД при воспалительном процессе и введении препаратов плаценты, мкМ/мг б.ч., n = 10**

| Сроки наблюдений, сут | Введение здоровым животным |               | Воспалительный процесс | Лечение воспаления введением КХ |
|-----------------------|----------------------------|---------------|------------------------|---------------------------------|
|                       | КХ                         | ЭП            |                        |                                 |
| Контроль              | 0,57 ± 0,010               | 0,57 ± 0,010  | 0,57 ± 0,010           | 0,57 ± 0,010                    |
| 1                     | 0,64 ± 0,010*              | 0,62 ± 0,012* | 0,32 ± 0,010*          | 0,64 ± 0,012*                   |
| 2                     | 0,68 ± 0,012*              | 0,62 ± 0,010* | 0,18 ± 0,012*          | 0,57 ± 0,012                    |
| 3                     | 0,65 ± 0,010*              | 0,58 ± 0,012  | 0,16 ± 0,010*          | 0,57 ± 0,010                    |
| 5                     | 0,61 ± 0,010               | 0,58 ± 0,012  | 0,34 ± 0,012*          | 0,57 ± 0,012                    |

Примечание. \*p < 0,05 по сравнению с контролем

ности каталазы, показателей глутатиона, церулоплазмينا, токоферола. При развитии воспалительного процесса без использования препаратов спустя сутки наблюдений активность фермента снижалась на 44, через 2-е суток — на 69%. Спустя 5 сут наблюдений активность СОД все еще была снижена на 40% по сравнению с контрольными величинами.

Животным с воспалительным процессом вводили препарат КХ, который согласно полученным данным оказывал более выраженное действие на изученный ферментативный процесс в организме здоровых крыс. Введение препарата КХ животным с воспалительным процессом позволяло полностью нормализовать динамику активности фермента.

Известно, что регуляция ПОЛ в клетке может осуществляться на 3-х уровнях. Первый участок находится на стадии иницирования свободнорадикальной цепи и включает процессы генерации супероксидного радикала, активностей СОД и каталазы, уровня свободного железа [2]. Введение препарата КХ животным с воспалительным процессом позволяло нормализовать показатели активности фермента СОД. Это свидетельствовало о возможности регуляции первого звена процесса ПОЛ, т.е. на стадии иницирования свободнорадикальной цепи, введением экстракта плаценты.

Возможно, что использованные нами препараты хориона и плаценты, полученные в сроки 8–12 недель гестации плода, не только активизируют антиоксидантную защиту организма, но и, являясь по своей природе биопрепаратами, содержащими естественные антиоксиданты, тормозят аутоокисление на инициальной стадии свободных радикалов липидов (токоферола, убихинона) или активных форм кислорода (фермент СОД) в клеточных мембранах.

Полученные экспериментальные данные являются основанием для включения препаратов плаценты и хориона в комплексную терапию воспалительных процессов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александров П. Н., Сперанская Т. В. Динамика керрагинового воспаления в условиях оксидирующего лития // Бюл. эксперим. биол. и мед.— 1988.— Т. 106.— С. 233–235.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.— 252 с.
3. Козлов Ю. П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах.— М.: Изд-во МГУ, 1973.— 174 с.
4. Макаренко С. В. Комплексное определение супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах у больных с хроническими заболеваниями печени // Лаб. дело.— 1988.— Т. 11.— С. 48–50.
5. Суббота Н. П., Грищенко В. И., Козюлинский В. Ф. и др. Получение, хранение и применение фрагментов суспензий и криоэкстракта хориона: Метод. рекомендации.— Харьков, 1997.— 8 с.
6. Суббота Н. П., Пашинский П. П., Розанова Е. Д. Биологические свойства криоэкстрактов эмбриональных тканей // Пробл. криобиологии.— 1998.— № 3.— С. 35–42.
7. Храпова Н. Г. Перекисное окисление липидов и системы, регулирующие его интенсивность // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ.— М., 1980.— С. 147–155.

Поступило 21.01.99

**The SOD activity during an inflammatory process and the placenta preparation introduction,  $\mu$ M/mg prot. hr, n = 10**

| Observation terms, days | Introduction to healthy animals |               | Inflammatory process | The inflammatory treatment by the CC introduction |
|-------------------------|---------------------------------|---------------|----------------------|---------------------------------------------------|
|                         | CC                              | PE            |                      |                                                   |
| Control                 | 0,57 ± 0,010                    | 0,57 ± 0,010  | 0,57 ± 0,010         | 0,57 ± 0,010                                      |
| 1                       | 0,64 ± 0,010*                   | 0,62 ± 0,012* | 0,32 ± 0,010*        | 0,64 ± 0,012*                                     |
| 2                       | 0,68 ± 0,012*                   | 0,62 ± 0,010* | 0,18 ± 0,012*        | 0,57 ± 0,012                                      |
| 3                       | 0,65 ± 0,010*                   | 0,58 ± 0,012  | 0,16 ± 0,010*        | 0,57 ± 0,010                                      |
| 5                       | 0,61 ± 0,010                    | 0,58 ± 0,012  | 0,34 ± 0,012*        | 0,57 ± 0,012                                      |

Note. \*p < 0.05 in comparison with the control.

maintained still decreased by 40% in comparison with the control values.

The CE preparation, that, according to the data obtained, caused a more manifested effect on a studied enzymatic process in the healthy rats' organism was introduced to the animals with an inflammatory process. The introduction of the CC preparation to animals with an inflammatory process permitted to completely normalize the enzyme activity dynamics.

It is known, that the LPO regulation in a cell may be realized at 3 levels. The first site is located at the stage of the free-radical chain initiation and includes the generation processes of superoxide radical, SOD and catalase activities, the level of free ferrum [2]. The introduction of the CC preparation to animals with an inflammatory process allowed to normalize the indices of the SOD enzyme activity. This fact testified to the possibility of regulation of the LPO process first link, i.e. at the stage of the free-radical chain initiation, by the introduction of the placenta extraction.

It is possible, that the chorion and placenta preparations we used, obtained in terms of 8–12 weeks of the fetus gestation not only activate the organism's antioxidant protection, but being biopreparations by their nature, containing natural antioxidants, inhibit the autooxidation at an initial stage of the lipid free radicals (tocopherol, ubiquinone) or the oxygen active forms (SOD enzyme) in cellular membranes.

The obtained experimental data are the reason to include the placenta and chorion preparations in a complex therapy of inflammatory processes.

## REFERENCES

1. Alexandrov P. N., Speranskaya T. V. Dynamics of a kero-geneic inflammation under the sodium hydroxybutyrate conditions // Bull. of experim. of biol. and med.— 1988.— V. 106.— P. 233–235.
2. Vladimirov Yu. A., Archakov A. I. Lipid peroxidation in biological membranes.— M.: Nauka, 1972.— 252 p.
3. Kozlov Yu. P. Free radicals and their role in normal and pathological processes.— M.: Publishing House of the Moscow State University, 1973.— 174 p.
4. Makarenko S. V. A complex determination of the superoxide dismutase and glutathione reductase activity in erythrocytes in patients with the liver chronic disease // Lab. delo.— 1988.— V. 11.— P. 84–50.
5. Subbota N. P., Grischenko V. I., Kozulinsky V. F. et al. Procurement, storage and application of the chorion fragments, suspensions and cryoextractions: Method. recommendations.— Kharkov, 1997.— 8 p.
6. Subbota N. P., Pashinsky P. P., Rozanova E. D. Biological properties of embryonic tissue cryoextractions // Problemy kriobiologii.— 1998.— № 3.— P. 35–42.
7. Khrapova N. G. Lipid peroxidation and the systems regulating its intensity // Lipid biochemistry and their role in the metabolism.— M., 1980.— P. 147–155.

Accepted in 21.01.99



# Нейрональный газ-антиконвульсант в механизмах проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга

В. С. МАРЧЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Neuronal Gas-Anticonvulsant in Mechanisms of BBB Permeability of Cooled Brain

V. S. MARCHENKO

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

Недавно установлено, что свободнорадикальный газ — монооксиды азота и углерода — является важным посредником физиологических процессов [1, 2, 4]. В сердечно-сосудистой системе NO и CO включаются в механизмы расслабления кровеносных сосудов [1, 2], а в мозге они представляют новый класс мессенджеров, которые обеспечивают нейротрансмиттерные процессы типа долговременной потенциации [4], что может играть определенную роль в центральной терморегуляции [1]. Учитывая немаловажное значение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в механизмах температурного гомеостаза [1], следует предполагать, что NO и CO как факторы нейрональной пластичности опосредуют и терморегуляторные функции ГЭБ изменением его проницаемости для термокомпетентных нейромедиаторов.

Целью данного сообщения явилось изучение влияния оксидов азота и углерода на коэффициент проницаемости (КП) ГЭБ для  $^3\text{H}$ -норадреналина ( $^3\text{H}$ -НА) и  $^3\text{H}$ -ацетилхолина ( $^3\text{H}$ -АХ) и судорожную активность при ритмических гипотермических воздействиях.

Исследования проводили на белых крысах массой 180–220 г. Ритмические холодовые раздражения каудальных терморецепторов длительностью 1 с с частотой 0,1 Гц осуществляли путем охлаждения хвоста животного ледяной водой (0 °C) в автоматическом режиме. Проницаемость ГЭБ изучали радиоизотопным методом [1].

В [1] показано, что периодическая активация ГЭБ стимулирует нервно-гормональный механизм "раскачки" установочной точки гомеостаза [3]. Моделирование этого феномена наиболее успешно при ритмической гипотермии. При этом происходит, например, повышение устойчивости организма к гипо- и гипертермии, инфекционным воздействиям и судорожным состояниям. Объяснить такую перекрестную, физиологическую по своей природе, адаптацию можно, если предположить, что ГЭБ в определенных условиях взаимодействует с системами электрогенеза, иммунной, монооксигеназной, терморегуляторной, а также с другими защитными механизмами организма. Такого рода взаимодействия в полной мере не могут быть обеспечены традиционными нейромедиаторами: аминокислотами, биогенными аминами или нейропептидами из-за времени и места их метаболизма и диффузии. Поэтому мы предположили, что функционирование ГЭБ в качестве физиологической системы медленной регуляции обеспечивает принципиально новый класс сигнальных молекул-посредников — NO и CO. Обладая быстрой межклеточной диффузией, центральной и периферической системами синтеза, они потенциально являются идеальными трансмиссерами межсистемных связей.

Действительно, нами показано, что монооксиды азота и углерода опосредуют повышение проницаемости ГЭБ для  $^3\text{H}$ -НА и  $^3\text{H}$ -АХ, участвующих в центральных механизмах теплопродукции при гипотермических воздействиях. Как свидетельствуют модельные нейрофизиологические опыты, существуют оптимальные для повышения проницаемости ГЭБ concentra-

It has been recently established, that free radical gas — nitrogen and carbon monoxide, is an important mediator of physiological processes [1, 2, 4]. In cardiovascular system NO and CO are involved into mechanisms of blood vessel weakening [1, 2], and in brain they represent new class of messengers, providing neurotransmitter processes of long-term potentiation type [4], that can play a certain role in a central thermoregulation [1]. Taking into account quite an important value of blood brain barrier (BBB) in the mechanisms of temperature homeostasis, it should be supposed that NO and CO as the factors of neuronal plasticity mediate thermoregulatory BBB functions by changing its permeability for thermocompetent neuromediators.

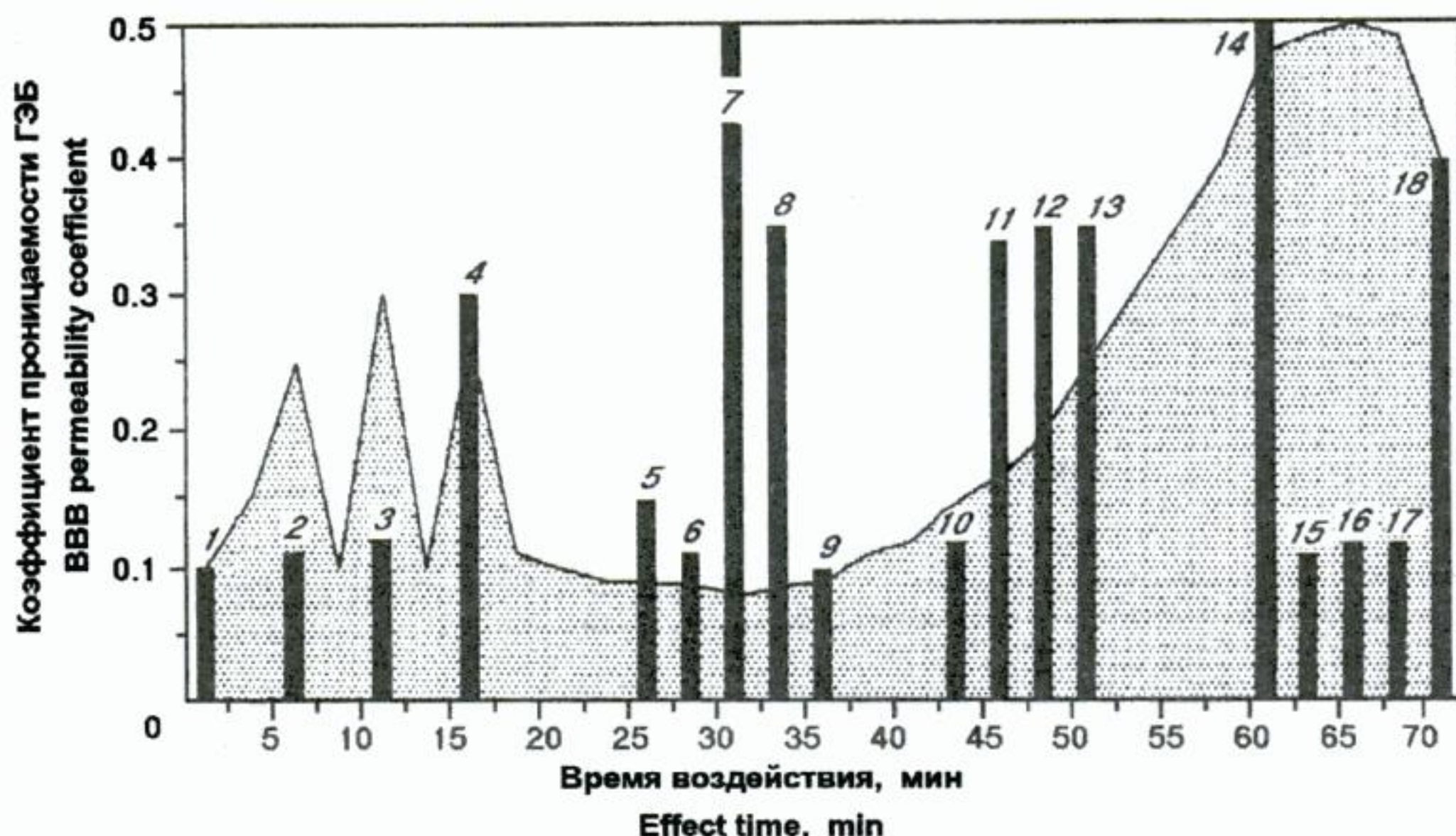
The aim of present report was the study of the effect of oxides of nitrogen and carbon on the permeability coefficient (PC) of BBB for  $^3\text{H}$ -noradrenaline ( $^3\text{H}$ -NA) and  $^3\text{H}$ -acetylcholine ( $^3\text{H}$ -AC) and spasmodic activity under rhythmic hypothermic effects.

Investigations were carried out in white rats of 180–220 g weight. Rhythmic cold agitations of caudal thermoreceptors were done by cooling the animal's tail by an ice water (0 °C) in automatic regimen [1]. BBB permeability was studied by means of radioisotopic method [1].

In [1] it has been demonstrated, that periodic activation of BBB stimulates nerve-hormonal mechanism of "swinging" of set homeostasis point [3]. This phenomenon modelling is the most successful during rhythmic hypothermia. Thereat there is for example an increase in an organism's resistance to hypo- and hyperthermia, infectional effects and spasmodic states. One can explain this physiological by its origin, cross-adaptation, if it is assumed, that BBB under certain conditions interact with the systems of electrogenesis, immune, monooxygenase, thermoregulatory, as well as other protective mechanisms of an organism. These effects can not be competely provided by traditional neuromediators: aminoacids, biogenic amines or neuropeptides due to the time and place of their metabolism and diffusion. Therefore we supposed, that BBB functioning as a physiological system of slow regulation provided principally new class of signal molecules-mediators — NO and CO. Possessing rapid intercellular diffusion, central and peripheral systems of synthesis, they are potentially ideal transmitters of intersystem relations.

In fact we have demonstrated, that monooxides of nitrogen and carbon mediate an increase in BBB permeability for  $^3\text{H}$ -NA and  $^3\text{H}$ -AC, participating in central mechanisms of heat-production under hypothermic effects. As model neurophysiological experiments testify, there are optimal concentrations of NO and CO for an increase in BBB permeability (Figure). The analysis of the results has shown, that the first peak of BBB permeability for  $^3\text{H}$ -NA at hypothermia is mainly stipulated by the activation of endothelial constitutive  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NO-synthase (block of Ca channels reduces the permeability and an increase of cold effect frequency twice does not shift the permeability peak). Following two permeability maximums are related to constitutive  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NO-synthase of nerve tissue (block of calcium channels reduces the permeability, an increase of the frequency of effects shifts the peak





Проницаемость ГЭБ при ритмической гипотермии на фоне фармакологических воздействий: 1, 5, 11 —  $^3\text{H}$ -АХ; 2–4 —  $^3\text{H}$ -НА при блокаде кальциевых каналов; 6, 14 —  $^3\text{H}$ -НА при инъекции в мозг СО на фоне блокады адренорецепторов (АР); 7, 15 —  $^3\text{H}$ -НА при блокаде АР; 8, 13 —  $^3\text{H}$ -АХ при инъекции в мозг СО на фоне блокады АР; 9, 10 —  $^3\text{H}$ -АХ при блокаде АР; 12, 18 —  $^3\text{H}$ -АХ при активации синтеза СО; 16 —  $^3\text{H}$ -НА при активации синтеза NO; 17 —  $^3\text{H}$ -НА при активации синтеза NO. Серым обозначена проницаемость ГЭБ для  $^3\text{H}$ -НА.

BBB Permeability during Rhythmic Hypothermia on the Background of Pharmacological Effects: 1, 5, 11 —  $^3\text{H}$ -AC; 2–4 —  $^3\text{H}$ -NA at the block of calcium channels; 6, 14 —  $^3\text{H}$ -NA at the injection into a brain of CO on the background of adrenoreceptors (AR) block; 7, 15 —  $^3\text{H}$ -NA at the block of ARs; 8, 13 —  $^3\text{H}$ -AC at the injection into a brain of CO on the background of AR block; 9, 10 —  $^3\text{H}$ -AC at the AR block; 12, 18 —  $^3\text{H}$ -AC at the activation of CO synthesis; 16 —  $^3\text{H}$ -NA at the activation of NO synthesis; 17 —  $^3\text{H}$ -NA at the activation of NO synthesis. Grey marked BBB permeability for  $^3\text{H}$ -NA.

ции NO и СО (рисунок). Анализ результатов экспериментов показал, что первый пик проницаемости ГЭБ для  $^3\text{H}$ -НА при гипотермии в основном обусловлен активацией эндотелиальной конститутивной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой NO-синтазы (блокада кальциевых каналов снижает проницаемость, а повышение в 2 раза частоты холодового воздействия не смещает пик проницаемости). Следующие два максимума проницаемости связаны с конститутивной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой NO-синтазой нервной ткани (блокада кальциевых каналов снижает проницаемость, увеличение частоты воздействия смещает пик низкой резистентности ГЭБ) и эндотелиальной индуцируемой  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой NO-синтазой (блокада кальциевых каналов не влияет на повышенную проницаемость ГЭБ). Максимальному пику проницаемости ГЭБ для  $^3\text{H}$ -НА предшествует период резистентности. В это время содержание NO, возможно, превышает оптимальные для "открытия" барьера значения (агенты, угнетающие синтез NO, повышают проницаемость ГЭБ), тогда как на максимумах проницаемости и подавление, и стимуляция наработки оксида азота снижают поступление  $^3\text{H}$ -НА и  $^3\text{H}$ -АХ в мозг (рисунок).

Исходя из вышеизложенного, можно предложить следующую гипотетическую схему последовательности нейрофизиологических событий, приводящих к повышению проницаемости ГЭБ для термокомпетентных нейромедиаторов. Начальный этап ритмической гипотермии характеризуется комплексом условий (увеличение функциональной активности биогенных аминов и активирующих аминокислот, инициирующих процессы долговременной потенциации), которые приводят к каскадному включению трех изоформ NO-синтазы, что сопровождается повышением содержания циклических мононуклеотидов, при этом активируются соответствующие протеинкиназы, регулирующие процессы фосфорилирования цитозольных и цитоскелетных белков, создавая условия для повышенной проницаемости ГЭБ. Очевидно, первой активно включается в работу конститутивная NO-синтаза васкулярных эндотелиоцитов для "аварийной" компенсации напряжения симпатки пе-

of BBB low resistance) and endothelial induced  $\text{Ca}^{2+}$ -independent NO-synthase (block of calcium channels does not affect an increased BBB permeability). The resistance period precedes the maximum peak of BBB permeability. At this time NO content, probably, exceeds optimal for the barrier "opening" values (agents, suppressing NO synthesis, increase the BBB permeability), meanwhile at maximums of permeability both suppression and stimulation of nitrogen oxide producing decrease the entering of  $^3\text{H}$ -NA and  $^3\text{H}$ -AC into a brain (Figure).

Due to all mentioned above one can propose the following scheme of sequence of neurophysiological events, resulting to an increase of BBB permeability for thermocompetent neuromediators. An initial stage of rhythmic hypothermia is characterized by the complex of conditions (an increase in functional activity of biogenic amines and activating aminoacids, initiating the processes of long-term potentiation), resulting to a cascade inclusion of three isoforms of NO-synthase, that accompanies by a rise in the content of cyclic mononucleosides, thereat corresponding protein kinases, regulating the processes of phosphorylation of cytosol and cytoskeletal proteins, by creating the conditions for an increased BBB permeability, are activated. Obviously, constitutive NO-synthase of vascular endotheliocytes starts its work as the first for "emergency" compensation of tension - sympathics of periphery by brain parasympatics. This process is controlled by compensatory CNS mechanisms. In limbic structures of brain the long-term potentiation enhances,  $\text{Ca}^{2+}$ -independent NO-synthase of endotheliocytes is induced, and so NO production increases. The cost of such compensation is apparent: the probability of local hypoxic phenomena in compartments of capillary endotheliocytes and neuroglial complexes increases. It is known [2], that hypoxia results in a significant increase in the activity of heme-oxygenase, those are considered as heat shock proteins. During the interaction of heme-oxygenase with cytochrome-P450-reductase CO is formed [2]. Carbon monoxide causes the dissociation of adrenoreceptors with ligands, but does



риферии парасимпатикой мозга. Этот процесс контролируется компенсаторными механизмами ЦНС. В лимбических структурах мозга усиливается долговременная потенция, индуцируется  $\text{Ca}^{2+}$ -независимая NO-синтаза эндотелиоцитов, а значит, возрастает выработка NO. Цена такой компенсации очевидна — повышается вероятность локальных гипоксических явлений в компартментах эндотелиоцитов капилляров и нейро-глиальных комплексов. Известно [2], что гипоксия приводит к существенному повышению активности гем-оксигеназ, которые считают белками теплового шока. При взаимодействии гемоксигеназы с цитохром-Р450-редуктазой образуется CO [2]. Монооксид углерода вызывает диссоциацию адренорецепторов с лигандами, но не затрагивает ацетилхолиновые рецепторы (рисунок). Эти процессы переключают механизмы проницаемости ГЭБ для НА на избирательную проницаемость для АХ.

Дальнейшее охлаждение способствует спаду активности цитохромов-Р450 и цГМФ при нарастании концентрации цАМФ, проницаемость ГЭБ для АХ несколько снижается, а для НА снова возрастает. Повышение проницаемости ГЭБ для  $^3\text{H}$ -НА и  $^3\text{H}$ -АХ стимулирует адаптивные термоспецифические процессы в мозге, оптимизируя центральные механизмы температурного гомеостаза.

Нейрональный газ NO и CO может быть нейрональным посредником медленной управляющей системы мозга, включающейся в процессы регулирования при экстремальных или систематически действующих раздражителях; ее структурно-функциональной основой является ГЭБ. В таких условиях, по нашему мнению, CO осуществляет связь ГЭБ с монооксигеназной системой, а NO — с иммунной, объединяя три защитные системы организма в одну, которую можно условно назвать экзистозенцефалической (ЭЭС).

Учитывая вышесказанное, интересно было выяснить, насколько перестройки в состоянии ГЭБ, имеющие место при ритмической гипотермии, затрагивают нейродинамику, в какой степени ЭЭС связана с системой электрогенеза охлажденного мозга. Изучалось влияние охлаждения на судорожную активность организма при центральном введении пенициллина. Было обнаружено, что пики проницаемости ГЭБ для НА практически совпадают с достоверным, иногда очень значительным (в 3–4 раза), повышением порога возникновения судорог. Об этом свидетельствовало увеличение латентного периода первого судорожного вздрагивания, отражающего момент возникновения конвульсивного электрического разряда в моторной коре, но общая динамика эпилептиформной биоэлектрической активности существенно не изменялась. Можно предположить, что антиконвульсивное действие NO проявляется лишь в триггерные моменты развития судорожного припадка, не оказывая выраженного влияния на последующие этапы генерализации приступа. Причем и в этом случае существует оптимальный протекторный уровень NO и CO, о чем свидетельствуют аналогичные модельные опыты с применением активаторов и блокаторов NO- и CO-синтаз.

Таким образом, результаты наших исследований в целом согласуются с формирующейся в последнее время концепцией о триггерной роли генерации монооксидов азота и углерода при гипо- и гиперметаболических состояниях организма.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Марченко В. С., Бабичук Г. А., Шило А. В. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3. Оксид азота (II) — один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма // Пробл. криобиологии. — 1995. — № 3. — С. 10–19.
2. Моттерлини Р., Форести Р., Грин К. Дж. Повышенная экспрессия БТШ32 (гем-оксигеназы-1) в эндотелиальных клетках сосудов в условиях гипоксии // Пробл. криобиологии. — 1997. — № 1–2. — С. 104.
3. Пастухов Ю. Ф. Явление сезонного гипометаболизма млекопитающих // Термофизиология. Информ. бюл. Вып. 2. — Минск, 1991. — С. 7–18.
4. Zyuo M., Small S. A., Kandel E. R., Hawkins R. D. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus // Science. — 1993. — 260. — P. 1946–1950.

Поступило 03.06.97

not affect acetylcholine receptors (Figure). These processes switch the mechanisms of BBB permeability for NA to selective permeability for AC.

Further cooling contributes to a decline in the activity of cytochromes-P450 and c-HMPH with an increase in c-AMP, the BBB permeability for AC slightly reduces, and for NA again rises. An increase in the BBB permeability for  $^3\text{H}$ -NA and  $^3\text{H}$ -AC stimulates adaptive thermospecific processes in brain, by optimizing central mechanisms of temperature homeostasis.

Neuronal gas NO and CO can be neuronal mediator of slow control system of the brain, involving in the regulation processes during extreme or systematically functioning agitators; its structural and functional base is BBB. Under such conditions according to our view CO performs the connection of BBB with monooxygenase system, and NO with immune, by combining three protective systems of an organism into one, that can be so-called as existoencephalic (EES).

Taking into consideration all mentioned above it should be interesting to elucidate in what extent the rearrangements in BBB state, occurring at rhythmic hypothermia, affect neurodynamics, and in what extent EES is connected to the system of electrogenesis of cooled brain. The effect of cooling on spasmodic activity of an organism at a central injection of penicillin was studied. It has been found, that BBB permeability peaks for NA practically coincide with a statistically significant and sometimes very considerable (in 3–4 times) increase of the spasm appearance threshold. This was confirmed by the reduction of latent period of the first spasmodic shuddering, reflecting the moment of appearance of convulsive electrical discharge in a motor cortex, but total dynamics of epileptiform bioelectrical activity did not significantly change. One can suppose, that anticonvulsant effect of NO manifests only in triggering moments of the development of spasmodic stroke, by not causing manifested effect on following stages of stroke generalization. In this case there is an optimal protective level of NO and CO, and similar model experiments with application of activators and blockators of NO- and CO-synthesis testify to that.

Thus the results of our investigations in the whole correspond to recently being formed conception on triggering role of generation of nitrogen and carbon monoxides at hypo- and hypermetabolic states of an organism.

## REFERENCES

1. Marchenko V. S., Babichuk G. A., Shilo A. V. et al. To the mechanisms of BBB permeability regulation of cooled brain. Report 3. Nitrogen oxide (II) is one of the triggers of BBB permeability in the structure of ultraslow control system of an organism // Problems of Cryobiology. — 1995. — № 3. — P. 10–19.
2. Motterlini R., Foresti R., Green C. J. An increased expression of HSP32 (hem-oxygenase-1) in endothelial cells of vessels under hypoxia conditions // Problems of Cryobiology. — 1997. — № 1–2. — P. 104.
3. Pastukhov Yu. F. The phenomenon of season hypometabolism of mammals // Thermophysiology. Inform. Bul. Issue 2. — Minsk, 1991. — P. 7–18.
4. Zyuo M., Small S. A., Kandel E. R., Hawkins R. D. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus // Science. — 1993. — 260. — P. 1946–1950.

Accepted in 03.06.97



# Влияние возраста и развития *in vivo* и *in vitro* девитрифицированных коровьих трофобластических фрагментов на синтез тканевых протеинов

В. В. ИСАЧЕНКО

Харьковский биотехнологический центр УААН

## Effect of the Age and *In Vivo* or *In Vitro* Development of Devitrified Bovine Trophoblastic Fragments on Tissue Proteins Synthesis

V. V. ISACHENKO

Kharkov Biotechnological Center of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences

Эмбрионы начинают синтезировать интерфероны задолго до имплантации [2] и это является сигналом для матки продуцировать полипептидные ростовые факторы для транспорта прогестерона [4] и интерферон-зависимых трофобластических протеинов, которые ингибируют лютеолизис, поддерживают беременность и активизируют функцию желтого тела.

Эффективность трансплантации эмбрионов совместно с трофобластическими фрагментами объясняется известными свойствами трофобластических протеинов влиять на беременность. Протеиновый комплекс, секретируемый трофобластом, не только поддерживает беременность, но и влияет непосредственно на сам эмбрион. Это объясняет целесообразность совместного *in vitro* сокультивирования трофобласта и эмбриона для преодоления блока дробления последнего.

Получение трофобластических фрагментов из преимплантационных эмбрионов и их последующее развитие до трофобластических везикул описаны для крупного рогатого скота, лошадей и овец [4]. Известно, что молекулярный вес протеинов, секретируемых препери- и послеимплантационными трофобластами крупного рогатого скота, изменяется в зависимости от стадии развития эмбриона [1]. Однако аналогичные данные об изменении молекулярного веса синтезируемых тканевых протеинов в зависимости от продолжительности их развития *in vitro* или *in vivo* ограничены.

Цель наших исследований — оценка молекулярного веса синтезируемых тканевых протеинов 15- и 22-дневных трофобластических фрагментов, развивающихся *in vivo* и *in vitro*. Двадцать четыре эмбриона получали нехирургически от суперовулированных молочных коров. Для этого коровы обрабатывались фолликулостимулирующим гормоном (Шеринг, США) на протяжении 4-х дней (7–10 мг/день) и 0,5 мг клопростенола на 3-й день. Через 48 ч после введения клопростенола (день 0) животных искусственно осеменяли. Полученные концептусы рассекали на частички длиной 0,2–0,4 мм лезвием, зажатым в пинцет, и разделяли на обрабатываемые группы.

На 15-й день беременности эмбрионы получали из одного рога матки донора, на 22-й день — из противоположного рога. Все трофобластические фрагменты витрифицировали и девитрифицировали путем 10-минутной выдержки в 10% глицерина с последующим перенесением на 30 с в раствор 25%-го глицерина и 25%-го пропиленгликоля и погружения в жидкий азот. Оттаивание проводили в водяной бане при 20 °C на протяжении 6 с и криопротекторы выводили в 1 М сахарозы через 10 мин. После этого фрагменты разделяли на четыре группы (таблица).

Культивирование трофобластических фрагментов 3- и 4-й групп проводили в 3 мл TCM-199 (Сигма) с 0,4% бычьего сывороточного альбумина (Сигма). Перед электрофорезом трофобластические фрагменты центрифугировали (300g) и супернатант удаляли. Электрофорез протеинов проводили в вертикальных пластинах в полиакриламидном геле по Laemmli [3] с модификацией: сила тока 50 мА/гель в течение 3–4 ч и окраска Кумасси-250. Молекулярный вес определяли по по-

Embryos begin to synthesize interferons long before the implantation [2] and this fact is the signal for the uterus to produce polypeptide growth factors, for progesterone transport [4], and interferon-dependent trophoblastic proteins, which inhibit luteolysis, maintain pregnancy and activate corpus luteum function. The efficiency of embryos transplantation together with trophoblastic fragments is explained with known properties of trophoblastic proteins to affect a pregnancy. The protein complex secreted by trophoblast not only maintains the pregnancy, but also directly affects the embryo itself. This fact explains the expediency of mutual *in vitro* coculturing of trophoblast and embryo for overcoming the cleavage block.

Obtaining of trophoblastic fragments from preimplantation embryos and their following development upto trophoblastic vesicles have been described for cattle, horses, and sheeps [4]. It is known that molecular weight of proteins secreted by preperi- and post-implantational trophoblast of cattle changes dependently on bovine embryos development stage [1]. However similar data concerning the change of molecular weight of synthesized tissue proteins depending on the duration of their development *in vitro* or *in vivo* are limited.

The aim of this study was to estimate a molecular weight of synthesized tissue proteins of 15 and 22 days trophoblastic fragments developing *in vitro* and *in vivo*. Twenty-four embryos were not surgically obtained from superovulated from dairy cows. For that the cows were treated with follicle-stimulating hormone (Schering, USA) during 4 days (7–10 mg/day) and with 0.5 mg of cloprosthenol on the 3rd day. The animals were artificially inseminated in 48 hrs after cloprosthenol administration (day 0). The conceptuses obtained were dissected in 0.2–0.4 mm-long pieces using the blade held with forceps and divided in treated groups.

On the 15th day of pregnancy the embryos were procured from one horn of a donor's uterus, on the 22nd day — from an opposite one. All trophoblastic fragments were vitrified and devitrified by means of 10-min exposure in 10% glycerol with following transfer for 30 sec to the solution of 25% glycerol and 25% propylene glycol and immersion into a liquid nitrogen. Thawing was performed in a water bath at 20 °C during 6 sec and cryoprotectants were removed in 1 M of succrose in 10 min and after that the fragments were divided in four groups (Table).

Culturing of trophoblastic fragments of the 3rd and 4th groups was carried out in 3 ml TCM-199 (Sigma) with 0.4% of bovine serum albumin (Sigma). Prior to electrophoresis the trophoblastic fragments were centrifuged (300g) and supernatant was removed. Electrophoresis of proteins was performed in vertical plates in a polyacrilamide gel according to Laemmli [3] with the modification: strength of current — 50 mA/gel within 3–4 hrs and staining with Cumassi-250. The molecular weight was determined according to the motility of the proteins tested in comparison with the standard ones. Trophoblastic fragments (the 15th–22nd days) during 7 days of culturing developed to trophoblastic vesicles with diameter of 0.5–0.7 mm on the 16th–17th day and 3.0–4.0 mm on the 29th day.



## Распределение трофобластических фрагментов на обрабатываемые группы

| Группа | Количество повторов | Возраст трофобластических фрагментов (дни) и условия культивирования к моменту тестирования протеиновой секреции |
|--------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | 24                  | 15 <i>in vivo</i>                                                                                                |
| 2      | 24                  | 22 (15 <i>in vivo</i> + 7 <i>in vitro</i> )                                                                      |
| 3      | 24                  | 22 <i>in vivo</i>                                                                                                |
| 4      | 24                  | 29 (22 <i>in vivo</i> + 7 <i>in vitro</i> )                                                                      |

движности тестируемых протеинов в сравнении со стандартными протеинами.

Трофобластические фрагменты (15- и 22-дневные) на протяжении 7 дней культивирования развились до трофобластических везикул диаметром 0,5–0,7 мм — на 16–17-й и 3,0–4,0 мм — на 29-й день. Каких-либо изменений в спектре тканевых протеинов в диапазоне от 30 до 130 кД в зависимости от возраста тканей (от 15 до 29 дней) или условий развития (*in vivo* или *in vitro*) не было установлено.

В 1969 году Short [5] описал феномен материнского распознавания беременности коров. Позже было установлено, что связь между развивающимся эмбрионом и матерью возможна благодаря секреции эмбрионом специфических протеиновых структур низкомолекулярных протеинов, известных как трофобластические протеины-I и относящихся к интерферонам-альфа. Впервые эти протеины были обнаружены у культивируемых *in vitro* коровьих эмбрионов. Авторы, изучающие протеиновую секрецию, указывали на изменения молекулярного веса протеинов в зависимости от стадии развития эмбрионов. В то же время данные об особенностях изменения молекулярного веса тканевых протеинов ограничены, что явилось причиной настоящих исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Godkin J. D., Lifsey B. J., Gillespie B. E. Characterization of bovine concept proteins produced during the peri- and postattachment period of early pregnancy // *Biol. Reprod.*— 1988.— 38.— P. 703–711.
2. Imakawa K., Anthony R. V., Kasemi M. et al. Interferon-like sequence of bovine trophoblast protein secretion by embryonic trophoblast // *Nature.*— 1987.— 330.— P. 377–379.
3. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 // *Nature.*— 1970.— 227.— P. 680–685.
4. Simmen R. C. M., Baumbach G. A., Roberts R. M. Molecular cloning and temporal expression during pregnancy of the messenger ribonucleic acid encoding uteroferrin, a progesterone-induced uterine secretory protein // *Mol. Endocrinol.*— 1988.— 2.— P. 253–262.
5. Short R. V. Implantation and the maternal recognition of pregnancy // Wolstenholme GEW, O'Connor M (eds) "Fetal. Autonomy".— London.— Churchill.— P. 2–26.

Поступило 10.06.98

Научный редактор В. И. Луговой  
Редактор Е. Д. Пазыч  
Компьютерный набор и верстка:  
И. Г. Пятигорская

## Trophoblastic fragments distribution into treated groups

| Group | Number of replications | Age of trophoblastic fragments (days) and culturing conditions by the moment of testing of protein secretion |
|-------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1     | 24                     | 15 <i>in vivo</i>                                                                                            |
| 2     | 24                     | 22 (15 <i>in vivo</i> + 7 <i>in vitro</i> )                                                                  |
| 3     | 24                     | 22 <i>in vivo</i>                                                                                            |
| 4     | 24                     | 29 (22 <i>in vivo</i> + 7 <i>in vitro</i> )                                                                  |

No significant changes in the tissue protein spectrum in the range from 30 to 130 kD depending on the age (from 15 to 29 days) or development conditions (*in vivo* or *in vitro*) were observed.

In 1969 R. Short [7] described the phenomenon of maternal recognition of cows' pregnancy. Later it was established that the relationship between developing embryo and its mother was possible due to the secretion by embryo specific protein structures of low molecular proteins known as trophoblastic proteins-I and relating to the interferons-alpha. For the first time these proteins were revealed in cultured *in vitro* cow embryos.

The authors studying a protein secretion pointed to the changes of molecular weight of proteins dependently on the stage of the embryo development. At the same time, the data about peculiarities of changes in molecular weight of tissue proteins are limited, that was the given investigations reason.

## REFERENCES

1. Godkin J. D., Lifsey B. J., Gillespie B. E. Characterization of bovine concept proteins produced during the peri- and postattachment period of early pregnancy // *Biol. Reprod.*— 1988.— 38.— P. 703–711.
2. Imakawa K., Anthony R. V., Kasemi M. et al. Interferon-like sequence of bovine trophoblast protein secretion by embryonic trophoblast // *Nature.*— 1987.— 330.— P. 377–379.
3. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 // *Nature.*— 1970.— 227.— P. 680–685.
4. Simmen R. C. M., Baumbach G. A., Roberts R. M. Molecular cloning and temporal expression during pregnancy of the messenger ribonucleic acid encoding uteroferrin, a progesterone-induced uterine secretory protein // *Mol. Endocrinol.*— 1988.— 2.— P. 253–262.
5. Short R. V. Implantation and the maternal recognition of pregnancy // Wolstenholme GEW, O'Connor M (eds) "Fetal. Autonomy".— London.— Churchill.— P. 2–26.

Accepted in 10.06.98

Scientific Editor V. I. Lougovoy  
Editor E. D. Pazych  
DTP-work by I. G. Pyatigorskaya



ПРОБЛЕМЫ  
КРИОБИОЛОГИИ

2

PROBLEMS  
OF CRYOBIOLOGY

Индекс 74390

1999

Index 74390

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. 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 utmost importance with regard to preservation of 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

E-mail: cryo@online.kharkov.ua