

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

4|89



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. Д. Бугров (Харьков), В. Я. Волков (Оболensk, Моск. обл.), В. М. Гордиенко (Киев), В. Н. Запорожан (Одесса), П. А. Калиман (Харьков), С. С. Лаврик (Киев), В. В. Лемешко (Харьков), В. Д. Мануильский (Киев), В. А. Моисеев (Харьков), А. С. Попов (Москва), Н. Г. Соломонов (Якутск), Ю. С. Суханов (Москва), В. В. Шенталь (Москва), М. И. Шраго (Харьков)

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

A. D. Bugrov (Kharkov), V. Ya. Volkov (Obolensk, Moscow Region), V. M. Gordiyenko (Kiev), V. N. Zaporozhan (Odessa), P. A. Kaliman (Kharkov), S. S. Lavrik (Kiev), V. V. Lemeshko (Kharkov), V. D. Manuilsky (Kiev), V. A. Moiseyev (Kharkov), A. S. Popov (Moscow), N. G. Solomonov (Yakutsk), Yu. S. Sukhanov (Moscow), V. V. Shental (Moscow), M. I. Shrago (Kharkov)

Адрес редакции:
310015, Харьков, 13
ул. Переяславская, 23,
тел. 72-10-39.

Научный редактор *В. И. Луговой*
Редактор *Л. А. Рябинина*
Технический редактор *В. Н. Волкова*
Корректор *Н. П. Спичак*

Сдано в набор 18.07.89. Подп. в печ. 25.09.89. БЦ 23403. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Уч.-изд. л. 5,31. Усл. кр.-отт. 5,6. Тираж 1000 экз. Цена 65 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 1429.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

4 1989

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1985 ГОДА
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1989

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

<i>Вишневский В. И.</i> Стимулирующий ультразвук и криоконсервирование	3
<i>Коца К.-Д., Спюрль Э., Маттеус В., Венгорс Г., Герлах К.</i> Локализация фронта замораживания в тканях ультразвуковым методом при криотерапии	11
<i>Строна В. И., Бойков П. Я., Юрченко Т. Н., Белоношко А. П.</i> Реакции клеточного генома на холодостресс	15
<i>Карпенко Л. Г.</i> Влияние замораживания до -196°C на активность аденилатциклазы в клетках коры надпочечников и щитовидной железы	21
<i>Запорожан В. Н., Беспоясная В. В.</i> Динамика напряжения кислорода в тканях после комбинированного криохирургического воздействия с низкочастотным магнитным полем	23
<i>Губина Н. Ф., Беркало Л. В., Утевский А. М.</i> Адренергические процессы в коре надпочечников быка в условиях низкотемпературного замораживания	27
<i>Розанов Л. Ф., Розанова Е. Д., Неков И. А.</i> Кинетика взаимодействия эритроцитов человека с растворами глицерина и 1,2-пропандиола	30
<i>Родин В. В., Новиков И. А., Волков В. Я.</i> Влияние ксенона на систему ДНК-связанная вода по данным метода импульсного ЯМР	35
<i>Спиридонова Н. З., Медведев М. М.</i> Нелинейная математическая модель криовоздействия на биоткани	38

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

<i>Курбатов А. Д., Косьяненко С. В.</i> Влияние различных факторов на результаты искусственного осеменения уток криоконсервированной спермой	42
--	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Лобынцева Г. С., Бондаренко Т. П., Вотякова И. А.</i> Перекисное окисление липидов в гемопоэтических клетках эмбриональной печени человека после низкотемпературного консервирования	45
<i>Шпакова Н. М., Бондаренко В. А.</i> Влияние ионов кальция на развитие гипертонического холодового шока эритроцитов	46
<i>Борисов В. А., Мяделец О. Д., Бринкевич В. Н.</i> Методика искусственной гипотермии на мелких лабораторных животных	49
<i>Марков В. И., Ткаченко С. И.</i> Изменения ультраструктур капиллярного русла миокарда при общей гипотермии	50
<i>Байкеев Р. Ф., Зинин В. Н., Ильясев А. В.</i> Антитромбопластическое действие криопротекторов биологических мембран	52

ХРОНИКА	54
--------------------------	----

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ	55
-------------------------------------	----



CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Vishnevsky V. I.</i> Stimulating ultrasound and cryopreservation	3
<i>Koza K.-D., Spörl E., Matthäus V., Vengors G., Gerlah K.</i> Localization of freezing front in tissues by the ultrasound method upon cryotherapy	11
<i>Strona V. I., Boykov P. Ya., Yurchenko T. N., Belonozhko A. P.</i> Reactions of the cell genome to cold stress	15
<i>Karpenko L. G.</i> The effect of freezing to—196 °C on the activity of adenylate cyclase in adrenal cortex and thyroid gland cells	21
<i>Zaporozhan V. N., Bespoyasnaya V. V.</i> The dynamics of oxygen tension in tissues subjected to combined application of cryosurgery and low frequency magnetic field	23
<i>Gubina N. F., Berkalo L. V., Utevsky A. M.</i> Adrenergic processes in bovine adrenal cortex upon freezing	27
<i>Rozanov L. F., Rozanova E. D., Nekoz I. A.</i> The kinetics of interaction between human erythrocytes and glycerol or 1,2-propane diol solutions	30
<i>Rodin V. V., Novikov I. A., Volkov V. Ya.</i> Investigation of the influence of xenon on the DNA — bound water system using the method of NMR	35
<i>Spiridonova N. S., Medvedev M. M.</i> A non-linear mathematical model of the freezing effect on biological tissues	38

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Kurbatov A. D., Kosyanenko S. V.</i> The effect of different factors on the results of artificial insemination of ducks with cryopreserved semen	42
---	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Lobyneva G. S., Bondarenko T. P., Votyakova I. A.</i> Lipid peroxidation in homopoietic cells of human embryo liver after freeze preservation	45
<i>Shpakova N. M., Bondarenko V. A.</i> The effect of calcium ions on the development of erythrocyte hypertonic cold shock	46
<i>Borisov V. A., Myadelets O. D., Brinkevich V. N.</i> A method of artificial hypothermia for small laboratory animals	49
<i>Markov V. I., Tkachenko S. I.</i> Ultrastructural changes in myocard capillary bed under total hypothermia	50
<i>Baykeyev P. F., Zinin V. N., Ilyasov A. V.</i> Anti-thromboplastic effect of cryoprotectants on biological membranes.	52
<i>CHRONICLE</i>	54
<i>DEFENSE OF THESES</i>	55

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 57.043:615.831.837.3

В. И. Вишневский

СТИМУЛИРУЮЩИЙ УЛЬТРАЗВУК И КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ

Излагаются результаты применения ультразвуковых колебаний малой мощности для повышения качества криоконсервирования клеточных суспензий. Исследовано действие ультразвука на физико-химические свойства растворов криопротекторов, процессы кристаллизации, замораживание спермы, эритроцитов, костного мозга и процесс размораживания. Обсуждаются возможные механизмы стимулирующего действия ультразвука на клеточные суспензии, подвергающиеся криоконсервированию.

Одним из направлений биофизики является изучение действия физических факторов на живые структуры разной степени организации. В криобиологии физические факторы действуют на фоне снижения температуры биологических объектов, когда изменяются параметры клеток и окружающей их среды. Среди применяемых в биологии и медицине физических воздействий, таких как ультрафиолетовое облучение, магнитные и электрические поля, ультразвуковые колебания, ультразвук вызывает самый широкий спектр изменений в клетках и межклеточной среде. Это связано с тем, что он способен проникать вглубь объекта, изменять физико-химические свойства вещества, закономерности функционирования клеток и морфологическую целостность их структур [1,15].

Диапазон преобразующего действия ультразвука на вещество и живые клетки достаточно широк — от индифферентного и стимулирующего до отрицательного, разрушающего. Если дезинтегрирующий ультразвук достаточно хорошо изучен и широко используется в биологии и медицине, то действие ультразвука малых интенсивностей исследовано недостаточно.

В статье приведены результаты исследований по применению стимулирующего ультразвука с целью повышении эффективности криоконсервирования клеточных суспензий.

Влияние ультразвука на физико-химические свойства растворов криопротекторов. Предназначенные для замораживания клеточные суспензии находятся в водных растворах криопротекторов и солей. Ультразвуковые колебания определенной мощности могут расщеплять молекулы воды и изменять свойства растворов. Под действием ультразвука биологические соединения также могут подвергаться структурным и химическим изменениям. При определенных условиях ультразвук может способствовать полимеризации и синтезу различных сополимеров в сложных растворах, вызывать тиксотропный эффект и др. [15].

Эксперименты по исследованию действия ультразвуковых колебаний на физико-химические свойства растворов криопротекторов включали в себя определение следующих параметров:

- вязкости свежеприготовленных растворов криопротекторов, поверхностного натяжения, концентрации водородных ионов pH ;
- скорости распространения ультразвука, коэффициента преломления света в стабилизированных растворах криопротекторов;
- характера кристаллизации замороженных растворов по рентгенограммам.

Исследовались растворы глицерина и полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 и 1500 в концентрациях от 1 до 30 % на частоте 35 кГц с интенсивностями от 15 до 100 Вт/см².

Результаты экспериментов позволяют сделать следующие выводы:

- обработка ультразвуком растворов криопротекторов, выдержанных в течение недели, не вызывает существенных изменений их криозащитных свойств и они не представляют опасности для консервируемых клеток;
- обработка ультразвуком свежеприготовленных растворов криопротекторов ускоряет растворение криопротекторов в воде и стабилизирует его параметры;
- обработка мощным ультразвуком даже выдержанных растворов криопротекторов по данным рентгенографического анализа вызывает изменения в кристаллизационной картине льда.

В этом случае рефлекс на рентгенограмме расположен равномерно, что свидетельствует о кристаллизации однородного раствора. Ускорение растворения криопротекторов в результате ультразвуковой обработки без изменения их свойств позволяет сократить время приготовления консервирующих растворов и получить стабильные по своим показателям среды для замораживания. Однако при обработке ультразвуком растворов криопротекторов с клетками применение мощного ультразвука недопустимо, так как он разрушает клетки. Поэтому необходимо применение значительно меньших доз ультразвука, которые, действуя на кристаллизацию растворов при охлаждении, способны формировать мелкокристаллическую структуру, изменять степень переохлаждения и ускорять процесс кристаллизации [10].

Методом криомикроскопии изучали действие ультразвуковых колебаний на кристаллизацию растворов криопротекторов полиэтиленоксида (ПЭО-1500), замороженных с разными скоростями (от 1 до 10 °С/мен), а также кристаллизацию спермы быков в глюкозоцитратно-желточной среде с глицерином. В качестве источника ультразвука был использован генератор с частотой 880 кГц и интенсивностью, не превышающей 0,6 Вт/см² [6].

Результаты исследований кристаллообразования льда в растворах криопротекторов свидетельствовали о том, что в ультразвуковом поле кристаллы льда растут с большим разветвлением, чем без ультразвука. С увеличением скорости замораживания и концентрации криопротектора явления эти сохраняются, но кристаллизация становится более мелкоструктурной. Таким образом, действуя ультразвуком, можно без увеличения скорости замораживания достигать величин кристаллов льда, соизмеримых с размерами клеток, что способствует их выживанию.

Измельчение кристаллов объясняется изменением условий первичного зародышеобразования льда под влиянием ультразвука [11]. Капли воды и плазмы мозга с криопротектором взвешивали в смеси вазелинового масла с гептаном и охлаждали под микроскопом в ячейке с излучателем ультразвука. Зародыши, образовавшиеся в некоторых каплях и превратившиеся в центры кристаллизации, обуславливали кристаллизацию в этих каплях, что четко фиксировалось под микроскопом. Сравнивая результаты определения числа закристаллизовавшихся капель без ультразвука и в ультразвуковом поле, определяли зависимость увеличения количества первичных зародышей льда от мощности ультразвука при разных температурах переохлаждения.

В каплях объемом 10⁻⁴ см³ начало гомогенного зародышеобразования возникало при довольно значительных переохлаждениях. Так, в образцах воды и растворах плазмы с криопротектором оно начиналось при -22,5 °С. Ультразвуковое воздействие при этих температурах лишь незначительно увеличивало количество закристаллизовавшихся капель. При температуре -30 °С и интенсивности ультразвука ~1 Вт/см² это увеличение составляло уже 10 % и возрастало с повышением интенсивности.

Аналогичное действие ультразвука проявлялось и при обработке ультразвуком переохлажденных образцов плазмы костного мозга с 15 % полиэтиленоксида. Степень первичного зародышеобразования льда при тех же температурах в плазме была ниже, чем в воде. Так как рост зароды-

шей льда в растворе сопровождается вытеснением молекул примеси в жидкую фазу, то у границ льда образуется слой с повышенной концентрацией примесей. Наложение ультразвукового поля в этом случае приводит к кристаллическим новообразованиям и примеси в поступательное движение. В каждом микрообъеме метастабильной системы это движение приводит к интенсивному перемешиванию и увеличению скорости зарождения центров кристаллизации.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

— ультразвуковые колебания увеличивают количество зародышей льда в биологических растворах;

— увеличение количества центров кристаллизации в биологических системах пропорционально увеличению средней удельной мощности ультразвука;

— при одинаковой мощности ультразвука увеличение количества закристаллизовавшихся капель одинаково в диапазоне 15—35 кГц.

Действие ультразвука интенсивностью 0,5 Вт/см² и частотой 880 кГц на переохлаждение воды, физиологических растворов, растворов глицерина и полиэтиленоксида позволило определить степень изменения переохлаждения этих систем при различных температурах замораживания [9]. Образцы воды, охлаждаемые без воздействия ультразвука, замерзали при средней температуре кристаллизации — $9,5 \pm 1,6$ °С. Но уже при ультразвуковом воздействии интенсивностью 0,05 Вт/см² температура кристаллизации льда повышалась до $-3,7 \pm 0,6$ °С. При интенсивности 0,4—0,5 Вт/см² переохлаждение воды почти полностью снимается, и образование льда начинается при температуре $-0,9 \div -0,6$ °С.

Аналогичные данные были получены и при изучении влияния ультразвука на величину переохлаждения физрастворов с криопротекторами, но уменьшение степени переохлаждения этих растворов было значительно ниже.

Например, температура начала кристаллизации раствора Хенкса с 12 % полиэтиленоксида-300 составляла $-10,9 \pm 1,3$ °С, а в ультразвуковом поле — $-7,3 \pm 1,3$ °С.

Влияние ультразвука на замораживание спермы сельскохозяйственных животных. Рассмотрим на примере спермы сельскохозяйственных животных, как реализуется действие ультразвука на результаты замораживания спермиев.

Ультразвук был применен для стимуляции переживаемости спермы быков с целью увеличения сроков ее хранения и повышения ее криорезистентности. Использовали морфологически и физиологически безопасные дозы ультразвука, которые для этих целей были специально определены заранее.

Разбавленная до концентрации 60 млн. спермиев в 1 мл сперма в полиэтиленовых ампулах обрабатывалась ультразвуком через контактную жидкость. О физиологической активности спермиев судили по абсолютному показателю живучести и времени переживаемости при температуре тела.

Если активность движения спермиев после воздействия ультразвука почти не изменялась по сравнению с начальной, то абсолютный показатель живучести был 20,0 против 15,3 в контроле, а время переживаемости равнялось 6,22 ч по сравнению с 5,22 ч в необработанной ультразвуком сперме [5].

С целью определения влияния ультразвука на процесс проникновения глицерина, меченного по С¹⁴, были проведены исследования, в которых часть спермиев подвергали действию ультразвука, а контрольную инкубировали в тех же условиях, но без ультразвуковой обработки. Применяли ультразвук частотой 880 кГц и интенсивностью 1 Вт/см² в течение 10 мин. Поступление глицерина после обработки ультразвуком и 2 ч инкубации при 0 °С возросло с 5,19 % до 8,75 %, а после 6 ч — с 11,27 % до 12,77 %.

Оказалось, что максимальное количество глицерина в спермии (13,3 %) поступало после 8 ч инкубации. К этому времени за счет эффекта насыще-

ния сокращалось различие в содержании меченного по C^{14} глицерина в контрольных и обработанных ультразвуком образцах.

Изучение выхода глицерина из облученных ультразвуком спермиев после их многократного отмыwania нерадиоактивным разбавителем не выявило достоверной разницы в количестве вымываемого глицерина из спермиев, обработанных и не обработанных ультразвуком.

Проведенные опыты показали, что ультразвук увеличивает скорость накопления глицерина в спермиях, а следовательно, способствует уменьшению времени эквilibрации спермы в среде с криопротектором, что увеличивает количество выживающих спермиев [7].

Таким образом, ультразвук ускоряет процесс растворения криопротекторов, увеличивает проницаемость цитоплазматических мембран спермиев для молекул криопротекторов, снимает переохлаждение в области фазового перехода вода-лед, увеличивает первичное зародышеобразование льда и вызывает мелкокристаллическую кристаллизацию среды, окружающей клетку. Это позволило применить ультразвук в сочетании с низкими температурами для совершенствования способа криоконсервирования спермы сельскохозяйственных животных [16].

Сперму быков-производителей в физрастворе с глицерином запаивали в полиэтиленовые ампулы объемом 1 мл. Одну часть замораживали в общепринятом медленном режиме до $-196^{\circ}C$. Вторую часть замораживали в том же режиме, но в ультразвуковом поле с частотой 880 кГц и интенсивностью 1 Вт/см². После размораживания опытную и контрольную сперму оценивали по активности движения.

В большинстве проб активность спермиев, замороженных в ультразвуковом поле, была выше, чем в контрольных. После ультразвукового воздействия активность спермы составила в среднем 4,34 балла против 3,50 баллов в контроле. Абсолютный показатель живучести спермы, замороженной в ультразвуковом поле, был также выше, чем в контроле. Проверка спермы на оплодотворяющую способность показала, что телята рождаются здоровыми, нормально развиваются, а процент оплодотворяемости коров выше, чем при осеменении необработанной ультразвуком спермой [8].

Криоконсервирование спермы может производиться и с повышенными скоростями охлаждения. В этих случаях сперма замораживается на охлажденных пластинах или в тонкостенных упаковках. Несмотря на значительно большие скорости замораживания, начальный этап (до $-10 \div -15^{\circ}C$) остается замедленным и не очень отличается от традиционного медленного режима замораживания [2]. Следовательно, время действия ультразвука в условиях, когда спермии находятся в жидкой фазе, при обоих режимах почти одинаково, что предполагает и одинаковое стимулирующее действие ультразвука.

Эксперименты по замораживанию малых доз спермы (0,1 мл) на охлаждающих пластинах, находящихся в акустическом контакте с излучателем ультразвука, показали, что лучшие результаты по активности спермы после замораживания-оттаивания были получены на пластинах с температурой $-95^{\circ}C$ и при интенсивности ультразвука 0,6 Вт/см². Увеличение или уменьшение интенсивности ультразвука приводило к снижению активности спермы. Замороженная в гранулах сперма, одновременно подвергшаяся ультразвуковому воздействию, после размораживания имела более высокие по сравнению с контролем показатели. В среднем активность обработанной ультразвуком спермы равнялась 4,45 балла против 3,78 баллов в контроле. Увеличивалась также и переживаемость спермы.

Влияние ультразвука на криоконсервирование эритроцитов. Положительные результаты при замораживании спермы в сочетании с обработкой ультразвуком стимулировали распространение метода на другие клеточные суспензии, подвергающиеся криоконсервированию. Одним из таких объектов была взвесь эритроцитов человека, применяющаяся в медицинской практике.

Прежде всего было установлено, что кровь разных доноров имеет различную устойчивость к ультразвуковому воздействию, что определяется начальным уровнем гемоглобина в плазме. Чем выше в плазме уровень свободного гемоглобина, тем менее устойчивы к ультразвуку эритроциты. Это обстоятельство, по-видимому, необходимо учитывать при подборе крови для криоконсервирования.

Исследования проводились на эритроцитах, выделенных из донорской крови человека на стандартном консервирующем растворе. Ультразвуковая обработка суспензии эритроцитов осуществлялась в кюветах при температуре 20—25 °С. Объем суспензии составлял 10 мл, время обработки — 10 мин. Исследовали влияние ультразвука с частотами 880 и 2640 кГц и интенсивностью от 0,1 до 3 Вт/см².

В качестве криопротектора использовали полиэтиленоксид с молекулярной массой 1500 и глицерин в 10 %-ной концентрации. Эритроциты замораживали в жидком азоте со скоростью 350 °С/мин, отогрев производили в водяной бане при температуре 40 °С/мин [12].

Ультразвуковое воздействие на эритроциты интенсивностями от 0,9 до 2,0 Вт/см² перед замораживанием вызывает достоверное по сравнению с контролем уменьшение гемолиза (на 34 %) после замораживания-оттаивания в среде с 5 %-ным ПЭО-1500.

Для того, чтобы определить влияние на устойчивость клеток перед консервированием многочисленных факторов, одним из которых является ультразвук, были проведены многофакторные эксперименты, учитывающие вклад каждого из них в исход замораживания. Ультразвуковая обработка эритроцитарной массы, огражденной ПЭО-1500 или глицерином (880 кГц, 0,6—1,5 Вт/см²), приводила к повышению криорезистентности клеток. Концентрация свободного гемоглобина в деконсервированных образцах уменьшалась на 75 %, отношение концентрации внутри- и внеклеточного калия (K_i^+/K_e^+) увеличивалось на 15 % (при интенсивности 1,2 Вт/см²). Установлено, что степень влияния ультразвука на улучшение показателя K_i^+/K_e^+ больше, чем изменение концентрации криопротектора ПЭО-1500. Ультразвуковое воздействие во время замораживания повышает отношение K_i^+/K_e^+ деконсервированных эритроцитов в 1,6 раза по сравнению с образцами, замороженными без такового воздействия. Из двух исследуемых частот (880 и 2640 кГц) более выражено положительное действие ультразвука с частотой 880 кГц.

Влияние ультразвука на криоконсервирование клеток костного мозга. Необходимость накопления в низкотемпературных банках запасов эффективно замороженных клеток костного мозга стимулировала исследования возможностей применения ультразвука для повышения сохранности этих клеток при криоконсервировании. С этой целью использовали ультразвук двух частот (880 и 2640 кГц), широко применяемый в медицине.

Исследования проводили на костном мозге человека (доноров) и лабораторных животных (крыс). Взвесь ядросодержащих клеток в растворе ЦОЛИПК-3 после прибавления ПЭО-400 в 15 %-ной концентрации выдерживали в течение 15 мин при комнатной температуре. Опытные и контрольные образцы замораживали в полиэтиленовых ампулах емкостью 1,5—2,0 мл до —196 °С по двухэтапной программе. Первый этап — до —15 °С со скоростью 1—2 °С/мин, второй — до —196 °С со скоростью 300—400 °С/мин. Первый этап замораживания осуществляли в специальном замораживающем устройстве, позволяющем производить в необходимый момент ультразвуковую обработку опытных образцов. Ампулы с костным мозгом размещали на расстоянии 5—10 мм от ультразвукового преобразователя в зоне максимального излучения. На втором этапе замораживания опытные и контрольные образцы погружали в жидкий азот. Отогрев клеток производили в водяной бане при 40 °С. Обработку проводили с учетом требования выделить эффект ультразвука на этапе перехода основной массы жидкой фазы клеточной суспен-

зии в кристаллическое состояние. Приближение начала ультразвуковой обработки охлаждаемой суспензии к началу ее кристаллизации позволяет уменьшить влияние ультразвука на клетки в интервале температур, предшествующих периоду льдообразования. Действие ультразвука после полной кристаллизации замораживаемых клеток исключалось. Учитывая термограммы замораживания костного мозга с 15 %-ным ПЭО-400 и данные о том, что основная масса льда (80—90 %) в растворах, содержащих криопротекторные вещества, образуется сразу же после начала кристаллизации, ультразвуковую обработку образцов костного мозга проводили в интервале температур $-7 \div -15$ °С.

Результаты исследований свидетельствуют о более высоком, чем в контроле, уровне сохранности живых ядродержащих клеток в образцах костного мозга, замороженных в ультразвуковом поле. Сохранность клеток повышается по мере увеличения интенсивности ультразвука, достигая максимального значения при $0,8\text{—}0,9$ Вт/см². Наибольшая разница между уровнями сохранности живых клеток в опытных и контрольных образцах составляет 11,7 % для частоты 880 кГц и 9,0 % — для 2640 кГц. При интенсивностях ультразвука, превышающих $0,9$ Вт/см², процент сохранности клеток уменьшается. Эффект объясняется двойственным характером действия ультразвука на криобиологические процессы. С одной стороны, проявляется положительное влияние, способствующее увеличению устойчивости клеток к экстремальным условиям при кристаллизации образца, и с другой — проявляется повреждающее действие ультразвука при наличии в охлаждаемом образце кристаллической фазы. В области интенсивностей $1,5\text{—}2,0$ Вт/см² повреждающее действие ультразвука, вероятно, начинает превосходить его положительное влияние, и по мере увеличения интенсивности ультразвука результирующий эффект снижается.

Сравнение показателей сохранности живых клеток костного мозга, замороженного в ультразвуковом поле различных частот, показывает, что при более высоких частотах увеличивается и оптимальная интенсивность ультразвука.

Положительное влияние ультразвукового излучения более выражено при замораживании костного мозга крыс. При оптимальных интенсивностях ультразвука на частоте 880 кГц сохранность клеток костного мозга крыс, обработанных ультразвуком, на 17,9 % выше, чем в контроле. Различия в величине защитного эффекта ультразвука по отношению к клеткам костного мозга человека и крыс обусловлено видовыми отличиями резистентности клеток к низким температурам и ультразвуку.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

- замораживание клеточных суспензий костного мозга в ультразвуковом поле способствует повышению сохранности ядродержащих клеток;
- положительный эффект ультразвукового воздействия в процессе замораживания образцов костного мозга зависит от резистентности клеток к низким температурам [3];
- обработку ультразвуком клеточных суспензий с положительным эффектом можно производить в температурном диапазоне начальной фазы кристаллизации [17].

Влияние ультразвука на размораживание биообъектов. Процесс размораживания при криоконсервировании биологического материала, как известно, не менее важен, чем процесс замораживания. Характер физико-химических изменений при размораживании имеет общие с замораживанием закономерности, что явилось предпосылкой для применения ультразвука и на этапе оттаивания биообъектов.

Размораживание в ультразвуковом поле осуществлялось путем воздействия ультразвуком через водяную баню, в которую помещались размораживаемые контейнеры с клеточными суспензиями.

Замороженный в ампулах или контейнерах биологический материал погружали в теплую воду с температурой $40\text{—}45$ °С. Одновременно через

воду пропускали ультразвуковые колебания интенсивностью 1—3 Вт/см² и частотами от 20 до 2640 кГц. Оттаивание длилось до тех пор, пока температура клеточной суспензии не достигала 5—10 °С. После этого ампулы вынимали из ванны и прекращали облучение ультразвуком. Сочетанное действие нагрева и ультразвука способствовало повышению сохранности клеток костного мозга на 20—25 % [19]. Очевидно, ультразвук за счет акустических течений ускоряет теплообмен между стенками контейнера и тепловой водой, с одной стороны, и между нагреваемыми стенками и содержимым контейнера, с другой стороны, снижает опасные градиенты температур (температурный шок). Не последнюю роль, по-видимому, играет также стимулирующее и репарирующее действие ультразвука на клетки [4].

О механизме действия ультразвука при криоконсервировании. В действии различных физических факторов (света, излучения, электрического тока, звука, ультразвука и др.), которые определяются по регистрируемому изменению в биологической системе, много общего. Чем сложнее уровень организации живого, тем более длинная цепь самых различных процессов в живой структуре отделяет воздействие от наблюдаемого биологического эффекта. Число и даже последовательность звеньев цепи может изменяться в зависимости от условий воздействия и объекта, на который действует физический фактор. От длины этой цепи зависит также специфичность действия фактора. Чем длиннее цепь физико-химических и биологических процессов, развивающихся в живой системе под воздействием фактора, тем меньшей специфичностью он обладает.

В случае воздействия ультразвука на клетки в суспензии в цепь физико-химических и биологических процессов включаются процессы, которые происходят под действием ультразвука в жидкой межклеточной среде. Клеточный уровень организации исследуемого объекта значительно сокращает количество звеньев цепи (по сравнению с организменным уровнем), так как исключает некоторые сложные звенья нейро-гуморальной регуляции. Действие ультразвука на клеточную суспензию определяется в основном изменениями в суспензионной среде и изменениями процессов обмена клетки с внеклеточной средой, зависящими от проницаемости биологических мембран к основным продуктам жизнедеятельности. Но даже в такой несложной биологической организации регистрируются только входные и выходные параметры системы: физические характеристики ультразвукового воздействия (частота, интенсивность, время) и соответствующие изменения в регистрируемых параметрах биологического объекта (количество клеток, их морфологическая и функциональная целостность).

В криобиологии сложность и взаимосвязи процессов значительно возрастают, так как фактически на биологический объект действуют два физических фактора — охлаждение и ультразвук. Во внеклеточной среде, где имеет место в основном переход воды в лед, фазовый переход проходит значительно проще, чем фазовые переходы веществ, входящих в клеточные структуры. Объяснение механизмов действия стимулирующего ультразвука на процессы, развивающиеся в клетках при замораживании, усложняется и тем, что низкие терапевтические интенсивности ультразвука лишь запускают реакцию живой клетки, а конкретная физика взаимодействия ультразвуковой волны с объектом оказывается несущественной [14]. Только мощный ультразвук действует на клетки по кратчайшему пути в начальном звене цепи процессов и вызывает необратимую дезинтеграцию, в которой главную роль играет механическое действие.

Механизм стимулирующего действия ультразвука низкой интенсивности на процесс замораживания клеточных суспензий по результатам наших исследований можно представить следующим образом.

В межклеточной среде, состоящей из существенно важной для замораживания системы криопротектор-вода, ультразвуковые колебания ускоряют растворение криопротекторного вещества и стабилизируют его физико-химические свойства. Ультразвук способствует равномерному мелкодисперс-

ному распределению криопротектора в охлаждаемом объеме. Во время кристаллизации воды ультразвук снимает опасное для клеток переохлаждение, способствует образованию дополнительных центров кристаллизации, вызывает мелкоструктурную кристаллизацию льда, что ведет к увеличению количества выживающих при замораживании клеток.

Действие ультразвука на клетки проявляется в первую очередь в увеличении проницаемости их мембран к криопротекторам и воде. Это способствует быстрому и равномерному насыщению клеточных структур низкомолекулярными криопротекторами, улучшает условия взаимодействия криопротекторных веществ с мембранами, что в конечном счете повышает резистентность клетки к последующему действию низких температур. Увеличение проницаемости клеток для воды улучшает условия их дегидратации во время замораживания, что предотвращает возможность внутриклеточной кристаллизации, которая, как известно, губительна для клеток. Улучшение условий дегидратации позволяет менее критично подходить к выбору скоростей замораживания, которые являются одним из основных параметров, определяющих успех криоконсервации.

Следовательно, при сочетанном действии низких температур и ультразвука низких интенсивностей его положительное действие сильнее всего проявляется на этапах подготовки и начальных этапах охлаждения клеточных суспензий, в период фазовых переходов вплоть до затвердевания. Дальнейшее применение ультразвука, по всей вероятности, не вызывает положительного эффекта, а при повышенных интенсивностях может вызвать и повреждение клеток [13].

Механизм действия ультразвука при отогреве клеток в общих чертах сходен с механизмом замораживания, однако здесь следует учитывать и интенсификацию процесса теплообмена между жидким теплоносителем и контейнером с размораживаемой клеточной суспензией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян В. Б., Сарвазян А. П. Исследование механизмов действия ультразвука на биологические среды и объекты // Акустический журнал.— 1979.— 25, № 3.— С. 462—463.
2. Вишневский В. И. Термодинамика выхода воды из спермиев при замораживании // Научно-технический бюллетень НИИЖ ЛП УССР.— 1976.— № 17.— С. 14—21.
3. Вишневский В. И., Душейко А. Г., Маркова О. П. Замораживание клеток костного мозга в ультразвуковом поле // Криобиология и криомедицина.— 1980.— Вып. 7.— С. 17—21.
4. Вишневский В. И., Душейко А. Г., Марксва О. П. и др. Репарация криповреждений мембранных структур миелокарицитов ультразвуком малой интенсивности // Взаимодействие ультразвука с биологической средой.— М.: Б. и., 1983.— С. 18.
5. Вишневский В. И., Марющенко А. В. Стимуляция переживаемости спермы быков ультразвуковыми колебаниями // Физико-химические основы действия физических факторов на живой организм и его антиокислительные системы.— Сб. научн. тр. № 78 Моск. ветер. акад.— 1974.— С. 54—57.
6. Вишневский В. И., Марющенко А. В. Влияние ультразвуковых колебаний на кристаллизацию спермы быков-производителей // Криобиология и криомедицина.— 1975.— Вып. 1.— С. 48—51.
7. Вишневский В. И., Мусульбас М. С. Проникновение меченного глицерина-1- C^{14} в спермий быков под действием ультразвука // Научно-технический бюллетень НИИЖ ЛП УССР.— 1976.— № 17.— С. 68—70.
8. Вишневский В. И., Скорняков Б. А. Низкотемпературное консервирование спермы сельскохозяйственных животных // Актуальные проблемы криобиологии.— Киев: Наук. думка.— 1981.— С. 248—280.
9. Есьман С. С., Лыков И. Г., Рикберг А. Б. Влияние ультразвука на переохлаждение воды и некоторых биологических сред // Криобиология.— 1986.— № 1.— С. 15—18.
10. Капустин А. П. Влияние ультразвука на кинетику кристаллизации.— М.: Изд-во АН СССР, 1962.
11. Новиков А. Н., Вишневский В. И., Душейко А. Г. Влияние ультразвуковых колебаний на первичное зародышеобразование льда в биологических растворах // Криобиология и криомедицина.— 1982.— Вып. 10.— С. 19—22.

12. *Пушкаръ Н. С., Вишневский В. И., Гордиевко О. И.* Влияние ультразвуковых колебаний на замораживание эритроцитов человека // Криобиология и криомедицина.— 1981.— Вып. 8.— С. 19—21.
13. *Рикберг А. Б., Кузьменко А. П., Андрейченко В. И. и др.* Морфогисто-химическая и ультраструктурная характеристика селезенки и карциномы Герена на различных этапах криоультразвукового воздействия // Механизмы криповреждения и криозащиты биологических структур.— Киев: Наук. думка.— 1977.— С. 78—79.
14. *Сарвазян А. П.* Некоторые общие вопросы биологического действия ультразвука.— Пушкино, 1981.— 28с.— (Препринт / АН СССР Ин-т биофиз.; № 201).
15. *Эльпинер И. Е.* Биофизика ультразвука.— М.: Наука, 1973.— 384 с.
16. *А. С. 494163 СССР, МКИ⁴ А 61 d 7/02.* Способ консервирования биологической жидкости / В. И. Вишневский, А. В. Марющенко — Оpubл. 05.12.75. Бюл. № 45.
17. *А. с. 822799 СССР, МКИ⁴ А 01 N 1/02.* Способ консервирования клеточных суспензий / Н. С. Пушкаръ, В. И. Вишневский, Б. А. Скорняков и др.— Оpubл. 23.04.81. Бюл. № 15.
18. *А. с. 957811 СССР МКИ⁴ А 01 N 1/02.* Способ деконсервирования клеточных суспензий / Н. С. Пушкаръ, В. И. Вишневский, А. Г. Душейко и др. — Оpubл. 15.09.82. Бюл. № 34.
19. *А. с. 997640 СССР МКИ⁴ А 01 N 1/02.* Способ размораживания биологических объектов / Н. С. Пушкаръ, В. И. Вишневский, А. Г. Душейко — Оpubл. 28.02.83. Бюл. № 7.

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

Поступила 07.04.88

V. I. VISHNEVSKY

STIMULATING ULTRASOUND AND CRYOPRESERVATION

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

Ultrasound of low power was used to improve the cryopreservation efficiency of cell suspensions. The effects of ultrasound on physico-chemical properties of cryopreservation solutions, crystallization processes, sperm, erythrocytes, and bone marrow were studied upon freezing and thawing. Possible mechanisms of the stimulating effect of ultrasound on cell suspensions subjected to freezing are discussed.

УДК 615.832.9

К.-Д. Коца, Э. Спюерль, В. Маттеус, Г. Венгорс, К. Герлах

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФРОНТА ЗАМОРАЖИВАНИЯ В ТКАНЯХ УЛЬТРАЗВУКОВЫМ МЕТОДОМ ПРИ КРИОТЕРАПИИ

На модельном объекте — желатине — показана принципиальная возможность определения размеров участков льда, образующихся при использовании криоаппликатора, с помощью ультразвуковой установки. Модельные испытания на мышечной ткани и глазном яблоке кролика подтвердили правильность расчетных данных. Полученные результаты позволили оптимизировать существующие методы криотерапии глаукомы.

В настоящее время криотерапия находит широкое применение в различных областях медицины при лечении ряда заболеваний. Проблема определения границ замороженного участка, его размеров в достаточной степени важна, поскольку именно эти данные являются необходимым условием для точного дозирования холодового воздействия в зависимости от клинических показаний. Применяемые ранее методы измерения (термометрия, импеданс-измерение) распространения фронта замораживания в тканях вызывают их травматизацию и поэтому имеют ограниченное применение. Ультразвуковой метод отличается тем, что в связи с его неинвазивностью предотвращается повреждение тканей, а получаемые результаты достаточно информативны и точны.

Для изучения возможности использования ультразвука при определении размеров замороженного участка нами были проведены модельные

испытания на желатиновых блоках, а также на биологических объектах — мышечной ткани и глазном яблоке кролика, в результате чего были оптимизированы способы криотерапии при лечении глаукомы.

В основе метода ультразвуковой диагностики лежит эффект «отражения» части ультразвуковых колебаний от пограничных областей, например, мышечная/костная ткани, кожа/воздух, замороженная/незамороженная ткань. Ультразвуковая головка в перерывах между трансляциями работает в качестве приемника отраженных импульсов, которые регистрируются на электроннолучевом осциллографе (импульс-эхо-метод). При прозвучивании одна ультразвуковая головка выполняет роль передатчика, другая, находящаяся напротив, — приемника, исследуемый объект находится между

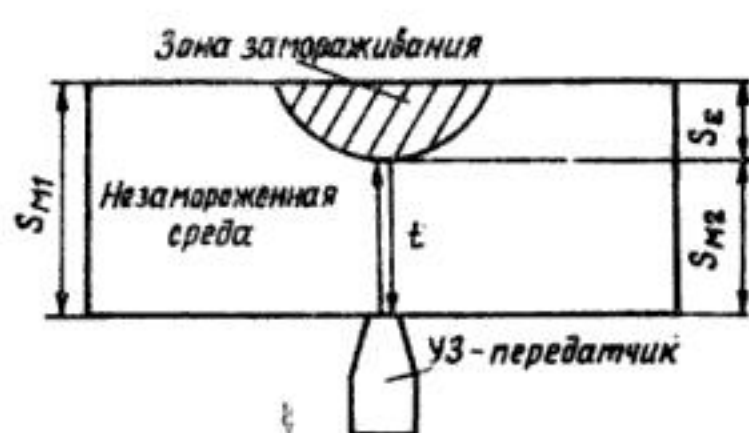


Рис. 1

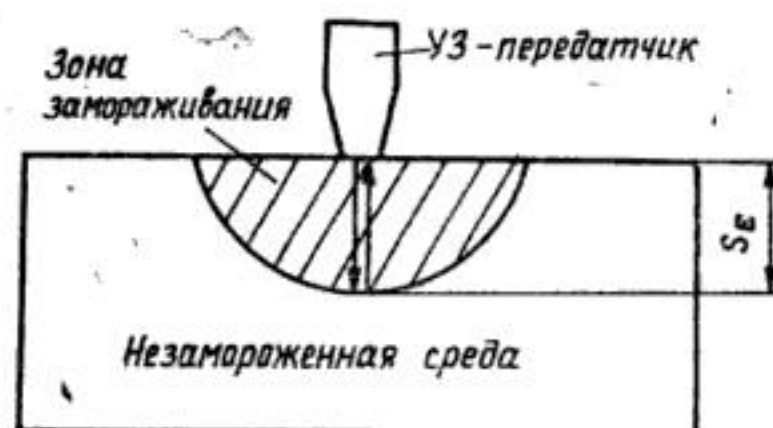


Рис. 2



Рис. 3

Рис. 1. Определение глубины распространения фронта замораживания со стороны незамороженной среды непосредственным импульс-эхо-методом

Рис. 2. Определение глубины распространения фронта замораживания через замороженную среду непосредственным импульс-эхо-методом

Рис. 3. Определение глубины распространения фронта замораживания косвенным импульс-эхо-методом

ними. На основании вычисления времени пробега импульсов, скорости звука в изучаемом объекте определяется длина пробега волны.

Определение глубины вторжения фронта замораживания при помощи импульс-эхо-метода. Положение фронта замораживания определяется при этом методе непосредственно по времени пробега импульсов между передатчиком и фронтом замораживания. Измерение со стороны незамороженной среды изображено на рис. 1. Глубину вторжения фронта замораживания S_E можно вычислить при известной скорости звука в модельном веществе C_M из разницы общего распространения S_{M1} и распространения в незамороженном модельном веществе S_{M2} при измеренном времени пробега t по следующей формуле:

$$S_E = S_{M1} - S_{M2} = S_{M1} - \frac{C_M \cdot t}{2}. \quad (1)$$

Другая возможность определения положения фронта замораживания в модельном веществе показана на рис. 2. При известной скорости звука в замороженной среде C_E и при измеренном времени пробега t можно вычислить распространение замораживания по формуле:

$$S_E = \frac{C_E \cdot t}{2}. \quad (2)$$

Вычисление фронта замораживания по формуле (2) возможно только в том случае, когда «мертвая» зона ультразвуковой головки меньше, чем измеряемая глубина замораживания.

Определение глубины вторжения фронта замораживания косвенным импульс-эхо-методом. При этом методе исследования (рис. 3) вычисление положения замороженного фронта производится из разности времени пробега до замораживания t_1 и после него t_2 на основе следующих формул:

$$t_1 = \frac{2 \cdot S_M}{C_M}, \quad t_2 = 2 \left(\frac{S_E}{C_E} + \frac{S_M - S_E}{C_M} \right),$$

$$t_1 - t_2 = \Delta t = 2 \cdot S_E \left(\frac{1}{C_M} - \frac{1}{C_E} \right),$$

$$S_E = \frac{\Delta t}{2 \left(\frac{1}{C_M} - \frac{1}{C_E} \right)}. \quad (3)$$

Ширина импульсов и «мертвая» зона при этом методе не принимаются во внимание. Подбор ультразвуковой головки производится соответственно частоте, так как при возрастающих частотах понижается ультразвук и одновременно глубина его проникновения (рис. 4).

Определение глубины вторжения фронта замораживания при помощи метода прозвучивания. При данном методе (рис. 5) измеряется время пробега импульса между ультразвуковой головкой передатчика и приемника в незамороженной модели и после ее замораживания (сквозь участок льда).

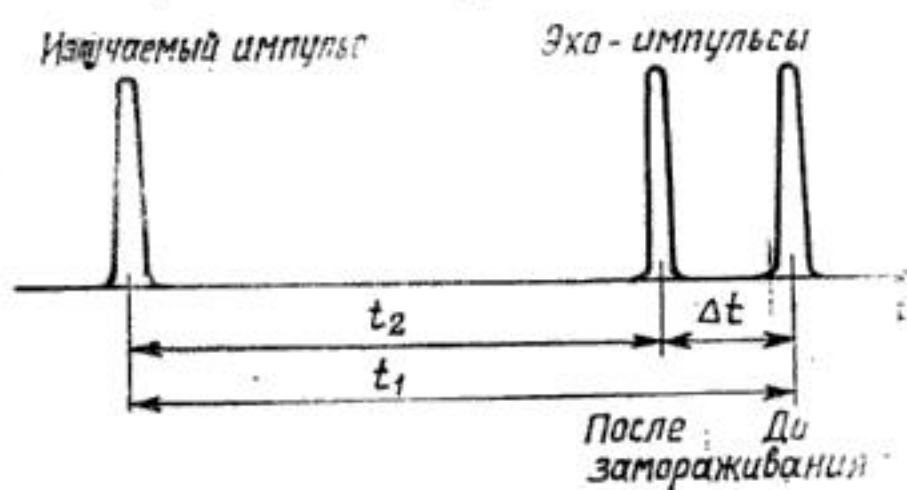


Рис. 4. Излучаемый и эхо-импульс до и после замораживания



Рис. 5. Определение глубины фронта замораживания методом прозвучивания

Из их разницы по следующему уравнению вычисляется глубина замораживания S_E :

$$S_E = \frac{\Delta t}{\left(\frac{1}{C_M} - \frac{1}{C_E} \right)}. \quad (4)$$

При применении этого метода исследования измерение ледяной зоны возможно также при размораживании.

Экспериментальное определение глубины вторжения фронта замораживания в модельном желатиновом веществе. Для экспериментального исследования использовали желатину (10 % сухого вещества) в форме параллелепипеда с размерами $100 \times 50 \times 40$ мм. В замороженном образце $C_E = 3300$ м/с, в незамороженном (20°C) — $C_M = 1550$ м/с.

Исследование проводилось при помощи прибора с изображением ОА 10 фирмы «Штробль» (ГДР) и прибора 7200 МА фирмы «Кретц» (Австрия) и соответствующих приборам ультразвуковых головок.

Экспериментальное определение глубины вторжения фронта замораживания при помощи непосредственного импульс-эхо-метода. Ультразвуковую головку, зондирующую желатиновый блок, закрепляли на нижней стороне блока модельного вещества (на стороне, противоположной замораживанию). В незамороженной части ультразвуковые импульсы отражаются на границе желатин/воздух. Из зарегистрированного времени пробега импульсов и вышеуказанной скорости ультразвука $C_m = 1550$ м/с вычислялась точная толщина параллелепипеда. Отражение ультразвуковых импульсов происходит на границе незамороженной/замороженной желатины, что дает возможность измерить мульду замораживания. Из-за «мертвого» времени и ширины импульсов ультразвуковых головок определение глубины замораживания непосредственным эхо-импульс-методом сквозь замороженные ткани возможно при их минимальной толщине 20 мм. От экспериментального исследо-



Рис. 6. Схематическое изображение криотерапии при глаукоме (трансконъюнктивная цикло-криотерапия)

вания этого метода мы отказались, так как замораживание такого объема в практической криотерапии встречается редко.

Экспериментальное определение глубины вторжения фронта замораживания косвенным импульс-эхо-методом. При помощи криоконтактного зонда (диаметр 30 мм) получали в желатиновом блоке участки замораживания различной величины. Ультразвуковая головка сразу же после окончания процесса замораживания была прикреплена на замороженную среду при помощи геля. Из разницы времени пробега до и после замораживания вычисляли величину участка льда. Из уравнения (3) следует:

$$S_E/\text{мм} = 1,4 \cdot \Delta t/\text{мс}.$$

Для проверки параметров, вычисленных косвенным импульс-эхо-методом, глубина зоны замораживания была измерена при помощи раздвижного калибра. Точность измерения ультразвуком составила $\pm 10\%$.

Экспериментальное определение глубины вторжения фронта замораживания методом прозвучивания. При экспериментальном определении глубины замораживания данным методом применялся последний из описанных способов. Разница состоит в применении в качестве приемника второй ультразвуковой головки, расположенной напротив первой, служащей передатчиком.

Таким образом, было установлено, что при помощи всех трех испытанных вариантов ультразвуковой методики возможно определение глубины фронта замораживания модельного вещества — желатины. Наиболее простым оказался непосредственный импульс-эхо-метод, при котором ультразвуковая головка находится напротив криоаппликатора и, таким образом, против участка льда. Второй метод определения положения фронта замораживания сквозь замороженную среду применим только в том случае, когда «мертвая зона» ультразвуковой головки меньше измеряемой глубины замораживания, как уже было сказано. При применении косвенного импульс-эхо-метода трудность состоит в точном присоединении ультразвуковой головки к замороженному веществу. При прозвучивании необходимы две ультразвуковые головки, однако их накладывание при клиническом применении часто затруднено (или даже невозможно) в связи с недостатком площади.

С целью определения возможности практического использования расчетных данных, полученных на модельных объектах, исследования проведены на мышце задней конечности и глазном яблоке кролика. Согласно приведенным формулам на основании определения общей толщины мышцы,

скорости и времени прохождения ультразвука вычисляли толщину замороженной зоны.

Клиническое применение метода. Метод криотерапии применяется при лечении различных форм глаукомы. Учитывая, что криоаппликации, наносимые в 8—10 участках при времени воздействия 20 с, давлении —1 Н, диаметре рабочей поверхности 2 мм и температуре —160 °С давали клинический эффект лишь в 45 % случаев, нами было определено время промораживания цилиарного тела.

На энуклированных глазах свиньи над цилиарным телом помещали криоаппликатор, а на противоположной стороне глазного яблока — ультразвуковую головку (рис. 6). Через 8 с, по данным измерения, фронт льдообразования полностью пересек цилиарное тело. Это же было подтверждено в опытах *in vivo* на глазном яблоке кролика при использовании импульс-эхо-метода. Подобные исследования были проведены также на глазах человека непосредственно перед их удалением по медицинским показаниям. При этом было обнаружено, что время полного замораживания цилиарного тела равно 28 с.

Клинические исследования больных, получивших лечение по этому методу, свидетельствуют, что у 85 % наблюдалась длительная нормализация внутриглазного давления. Преимущества примененного метода состоят в отсутствии травматизации тканей, возможности повторного применения курса криотерапии.

Таким образом, на основании выполненных исследований можно сделать вывод о возможности использования ультразвуковой индикации размеров замораживаемой ткани при разработке методов холодого лечения или оптимизации существующих способов.

Медицинская академия
«Карл Густав Карус», г. Дрезден,
ГДР.

Поступила 25.09.88

K.-D. KOZA, E. SPÖRL, V. MATTHÄUS, G. VENGORS, K. GERLAH LOCALIZATION OF FREEZING FRONT IN TISSUES BY THE ULTRASOUND METHOD UPON CRYOTHERAPY

Academy of Medicine «Carl Gustav Carus», Dresden

A principle possibility to determine dimensions of ice regions formed by a cryoapplicator has been demonstrated on a model system gelatin using an ultrasound unit. The calculated data have been confirmed by the results of model experiments on rabbit muscle tissue and eyeball. Our findings allowed to optimize routine methods of glaucoma cryotherapy.

УДК 576.315.42.085.23:612.592

В. И. Строна, П. Я. Бойков, Т. Н. Юрченко, А. П. Белоножко

РЕАКЦИИ КЛЕТОЧНОГО ГЕНОМА НА ХОЛОДОВЫЙ СТРЕСС

Изучены некоторые цитологические, структурно-функциональные и биохимические показатели клеток перевиваемой культуры после действия глубокой гипотермии (4 °С). Показано, что в интервале температур от 10 до 4 °С происходит резкая конденсация хроматина клеточного ядра, сменяющаяся деконденсацией при реабилитации клеток. При этом снижаются митотическая активность клеток, синтез ДНК и белков, возрастает число патологий деления.

Гипотермическое воздействие на биологические объекты является неизбежным этапом при их подготовке к низкотемпературной консервации или самостоятельным методом хранения. В связи с этим очевидна необходимость исследования структурно-функциональных параметров охлаждаемого биологического материала, в частности тех показателей, изменения которых являются определяющими в дальнейшей судьбе клеточной популяции. Немаловажным является также выяснение общего и частного в развивающихся перестройках, характеризующих реакцию клеточной системы на действие экстремального фактора.

Согласно последним данным литературы, охлаждение клеток и некоторых одноклеточных организмов до субнулевых температур приводит к ряду изменений в ядерном аппарате. Изучение клеток в культуре, которая подвергалась охлаждению до 3 °С, свидетельствует о появлении разрывов и эрозий хромосом, возрастании числа патологических митозов, то есть развитии реакции, типичной для действия рентгеновского облучения [1]. Холодовой шок индуцирует аномалии эмбриогенеза, приводит к изменению плоидности клеток, понижение температуры может усиливать мутационные процессы [3,14]. Таким образом, нельзя не учитывать того обстоятельства, что холод может являться генетически активным фактором [3,8].

Как известно, чувствительность клетки к экстремальным воздействиям определяется состоянием ДНК: общебиологической защитной реакцией клетки является конденсация хроматина, направленная на предохранение от повреждения клеточного генома [6]. Конденсация хроматина происходит и при замораживании клеток. Тем не менее следует отметить, что в большинстве исследований по изучению влияния охлаждения на структуру ядра приведены результаты, имеющие описательный характер, при этом сведения о количественных показателях в изменении конденсированных и дисперсных образований хроматина отсутствуют. Из имеющихся литературных данных невозможно составить динамическую картину процессов изменения структуры и функционирования хроматина при действии пониженных температур и в период восстановления.

В связи с изложенным выше нами проведено исследование митотической активности, синтеза ДНК и белков, структуры хроматина на клетках перевиваемой линии почки теленка после их охлаждения и на этапах восстановительного периода.

Работа проведена на эпителиоподобных клетках перевиваемой линии почки теленка. Клетки культивировали по общепринятой методике. По достижению состояния конfluентности культур (3 сут роста) клетки снимали с подложки, добавляли ростовую среду, разливали в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами по 2 мл (концентрация клеток $5-6 \times 10^5$ в 1 мл).

Часть флаконов ставили в термостат на 1—2 сут роста (контроль). Остальные флаконы переносили в холодильник, где они хранились 1—4 сут при температуре 4 °С. После различных сроков гипотермического хранения флаконы помещали в термостат на 1—2 сут роста.

Монослой клеток, образовавшийся на покровных стеклах, окрашивали гематоксилином Караччи. В препаратах подсчитывали митотический индекс, соотношение фаз митоза, общее количество патологически делящихся клеток и виды патологий деления [2].

Степень дисперсности хроматина *in situ* анализировали по методу [7]. Для этого при посеве клеток в ростовую среду был внесен ^3H -тимидин (удельная активность 49 МБк/мМ, «Изотоп», СССР) в концентрации 0,2 МБк/мл. По истечении 18—20 ч флаконы с выросшим на стеклах монослоем клеток выдерживали в водяной бане в течение 2 ч при различной температуре в интервале от 37 до 4 °С. Степень конденсации хроматина определяли при температурах 37, 30, 25, 20, 15, 10 и 4 °С.

В восстановительном периоде флаконы с выросшим монослоем, после предварительного охлаждения до 4 °С в течение 2 ч, помещали при темпе-

ратуре 37°C и через определенные интервалы времени определяли степень конденсации хроматина. Соотношение между уровнем счета и размером конденсированных частиц хроматина описывали уравнением, приведенным в работе [8].

Подсчет радиоактивности проб осуществляли с помощью сцинтилляционного счетчика Бекман (США). Статистическая обработка проведена по методу Стьюдента, достоверность результатов не ниже 0,95.

Удельную радиоактивность ДНК и белков определяли после химического фракционирования клеток по модифицированному методу Шмидта-Тоннхаузера [13]. В качестве меченых предшественников для анализа синтеза ДНК и белков использовали ^3H -тимидин и ^{14}C -гидролизат белка хлореллы в концентрации 0,2 МБк/мл. Непрерывное мечение осуществляли в течение 15 мин — 5 ч на этапе реабилитации клеток после охлаждения.

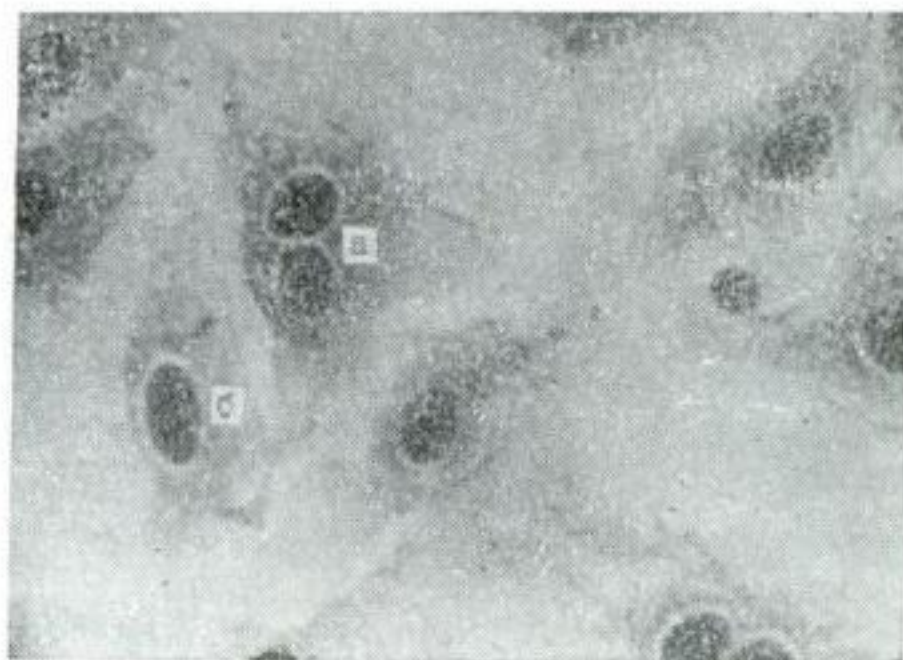
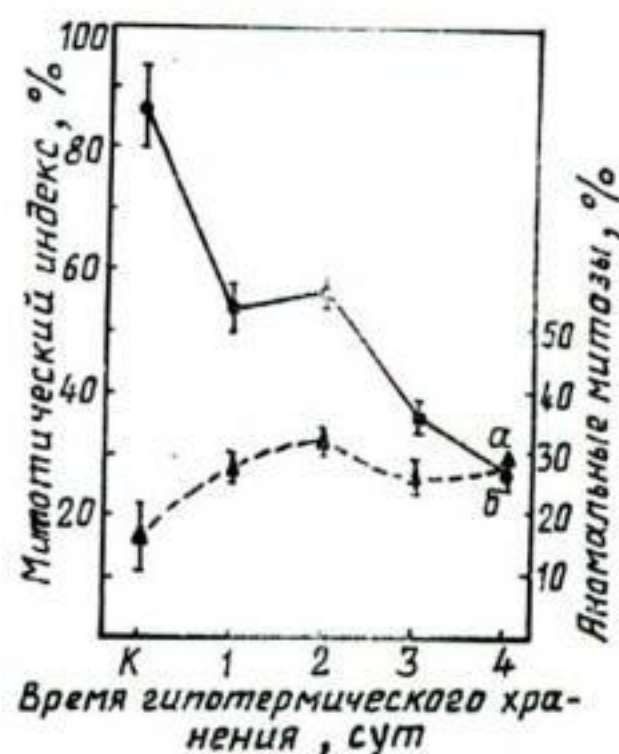


Рис. 1. Митотический режим клеток после охлаждения (4 °C): а — митотический индекс, б — аномальные митозы

Рис. 2. Образование монослоя после 4-суточного гипотермического хранения клеток (X 420): а — двуядерные клетки, б — «обособление» ядра (расширение перинуклеарной зоны)

При цитологических исследованиях оказалось, что охлаждение суспензии клеток до 4 °C в течение суток вызывает при последующем культивировании (до 48 ч) резкое снижение митотического индекса культур (рис. 1). Этот процесс сопровождается статмокинетической реакцией, увеличением числа клеток с патологиями деления, возникающими в результате повреждения хромосом (К-митоз) и митотического аппарата клетки (отставание хромосом в метакинезе, образование мостов и т. д.). Можно предположить, что наблюдаемые нами изменения связаны с нарушением синтеза белков, необходимых для поддержания нормальной степени спирализованности нитей ДНК [1]. При продолжительном охлаждении (в течение 4 сут) форма клеток становится фибробластоподобной, образуются двуядерные клетки, вокруг ядер четко контурируется перинуклеарная зона (рис. 2).

В клетках растений такое явление «обособления» ядра при действии субоптимальных температур известно давно и расценивается как приспособительная реакция клетки на холодостресс [5]. Аналогичные изменения возникают и при замораживании клеток, по всей видимости они влияют на мембрану ядра, однако их роль в нарушении генома пока не известна [8].

Возможно, что «обособление» ядра является общебиологической реакцией клетки на стрессорное воздействие и связано с нарушением структурной целостности мембран эндоплазматического ретикулума в околоядерной зоне, как было показано при изучении реакции клеток печени крыс на введение препаратов с различным механизмом первичного действия [4].

Все приведенные выше факты, полученные при цитологическом анализе клеточного монослоя после действия глубокой гипотермии, подтверждаются и литературными данными [1,2].

Как видно из представленных данных, холодный стресс вызывает возникновение патологических форм метафаз, что может быть связано с модификацией структуры хроматина. В связи с этим нас интересовало исследование первичных реакций хроматина, которые могут приводить в конечном итоге к патологии митотического деления клеток, подвергавшихся охлаждению. С этой целью была изучена динамика изменений структур хроматина в процессе охлаждения и последующей реабилитации.

Соотношение в ядре различных уровней упаковки хроматина, то есть степень его компактизации, является весьма существенным показателем его функционального состояния. Особый интерес представляет изучение

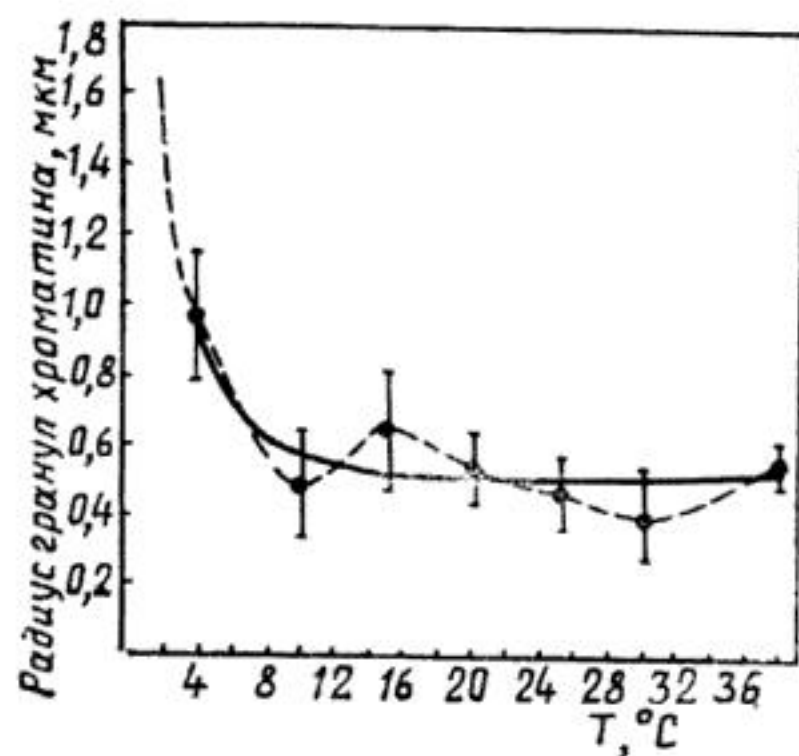


Рис 3. Зависимость размера конденсированных структур хроматина от температуры

структуры хроматина в составе ядра *in situ*, поскольку сам процесс выделения нарушает структурную организацию хроматина. С этой целью использовали метод [12], суть которого состоит в том, что интенсивность β -излучения от включенного в ДНК ^3H -тимидина зависит от степени дисперсности хроматина в ядре клетки. Увеличение компактизации хроматина в ядре снижает интенсивность счета, и наоборот. По относительному изменению скорости счета можно судить о конденсации-деконденсации структур хроматина (увеличение-уменьшение размеров поглощающих β -излучение структур хроматина).

Изучение степени конденсации хроматина при охлаждении клеток от физиологической температуры (37 °C) до

субоптимальной (10 °C) свидетельствует о том, что размер компактных структур хроматина, несущих радионуклид, изменяется незначительно. Размер гранул хроматина колеблется в пределах 0,40—0,66 мкм. В клетках, культивируемых при 37 °C, средний размер конденсированных частиц — $0,58 \pm 0,03$ мкм, что согласуется с данными, полученными при исследовании хроматина в культивируемых фибробластах человека — 0,50 мкм [12].

В температурном интервале 10—4 °C конденсированные фрагменты хроматина достоверно увеличиваются более чем в 2 раза. На рис. 3 представлена эмпирическая кривая с доверительным интервалом на уровне достоверности $p = 0,95$.

Была сделана попытка аппроксимировать динамику конденсации хроматина с помощью следующей функции:

$$Y = A + BX + \frac{C}{X}.$$

Коэффициенты А, В, и С рассчитаны по эмпирическим точкам методом наименьших квадратов [9].

Аналитическая зависимость размеров поглощающих частиц от температуры $r = f(T, ^\circ\text{C})$ — выражается соотношением

$$r = 0,25 + 0,006T + \frac{2,70}{T}.$$

Полученная с помощью уравнения кривая в диапазоне исследуемых температур совпадает с эмпирическими точками в пределах их ошибки. Графическая зависимость $r = f(T, ^\circ\text{C})$ представлена на рис. 3.

Для выяснения вопроса взаимосвязи конденсации хроматина с изменением объема ядер была проведена кариометрия клеток до и после охлаждения при 4 °С. Результаты свидетельствуют о том, что объем ядер, рассчитанный по формуле [11], в процессе охлаждения не изменяется ($1761,5 \pm \pm 59,5$ мкм в контроле и $2012,6 \pm 172,3$ мкм в опыте). Ядра, как правило, приобретают более вытянутую форму, в связи с чем большой диаметр ядер увеличивается (рис. 2).

В начале реабилитации, при резком изменении температурного режима от 4 до 37 °С и экспозиции при этой температуре 30 мин, хроматин претерпевает быстрый переход от максимально конденсированного состояния до минимально конденсированного. Размеры гранул хроматина уменьшаются от 0,96 до 0,35 мкм (рис. 4).



Рис. 4. Структурные изменения хроматина клеток в восстановительном периоде после действия гипотермии (4 °С, 2 ч)

Рис. 5. Динамика синтеза ДНК и белков в клетках после охлаждения (непрерывное мечение): а — синтез ДНК, б — синтез белков

После 4 ч реабилитации наблюдается временное увеличение дисперсности хроматина до контрольного уровня. Полное восстановление размеров глыбок хроматина наблюдается лишь к 16 ч реабилитации.

В начальном периоде в клетках с деконденсированным хроматином синтез ДНК снижен до минимума с тенденцией к возрастанию через 3—5 ч инкубации. Однако и через 5 ч реабилитации уровень синтеза ДНК составляет 42,5 % от контрольного (рис. 5).

Таким образом, в периоде восстановления после действия гипотермии низкий уровень синтеза ДНК наблюдается на фоне деконденсации хроматина. Ингибирование инициации синтеза ДНК связано, вероятно, с нарушением спиральной упаковки нуклеосом в хроматине, в то время как непременным условием репликации ДНК является суперспирализованное состояние.

Резко ингибирован и синтез белков. Динамика их синтеза аналогична синтезу ДНК: минимальное включение радиоактивных предшественников в интервале первых 15—60 мин с последующим возрастанием к 3—5 ч. Спустя 5 ч инкубации с мечеными аминокислотами уровень синтеза белка составляет 43 % от включения в контроле.

Проведенные исследования позволили установить, что кратковременная обработка клеток при 4 °С (2—4 ч) при последующем культивировании при 37 °С в течение 24 ч приводит к заметному снижению митотической активности клеток (50 % от контроля). Следовательно, за 24 ч не происходит полного восстановления структурной и функциональной целостности генетического аппарата клетки. Более длительная инкубация клеток при 4 °С (в течение 24—96 ч) влечет за собой зависимое от времени холодовой обработки снижение митотической активности и повышение количества аномальных митозов. Это говорит о том, что в процессе инкубирования клеток при 4 °С накапливаются повреждения, которые реализуются в аномалиях структуры и функции хромосом.

Первичным механизмом таких повреждений может быть нарушение процессов репарации ДНК в результате изменения топологии хроматина. Переход хроматина в структурное состояние, характеризующееся большей

(или меньшей) конденсированностью, чем это имеет место в норме, может явиться причиной нестабильности хромосом [10], что и наблюдается при длительном гипотермическом хранении клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алов И. А. Механизмы реакции делящихся клеток на гипотермию // Успехи совр. биол.— 1982.— 1.— С. 69—72.
2. Алов И. А. Цитофизиология и патология митоза.— М.: Медицина, 1972.— 230 с.
3. Афонькин С. Ю., Калинина П. В. Генетические эффекты гипотермии // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 3—6.
4. Бойков П. Я. Механизмы иницирования и пролиферации дифференцированных клеток: Автореф. дис. ... докт. биол. наук.— Черноголовка, 1986.— 46 с.
5. Гриф В. Г. Действие низких температур на митоз и хромосомы растений // Цитология.— 1963.— № 4.— С. 635—640.
6. Иванов В. Н., Рапопорт А. И., Пиндрус А. А. и др. Фазоспецифичность повреждений и репарации повреждений клеток дрожжей при обезвоживании-регидратации и замораживании-оттаивании // Микробиология.— 1987.— 56, № 2.— С. 341—346.
7. Карпухин А. В., Липидус И. Л., Щеглов В. С. и др. Влияние структуры хроматина ядра клетки на поглощение β -излучения низких энергий от инкорпорированного источника // Радиобиология.— 1983.— 23, № 6.— С. 726—729.
8. Мануильский В. Д. Проблемы консервации генетических ресурсов растений // Криобиология.— 1987.— № 1.— С. 11—16.
9. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии.— М.: Изд-во МГУ, 1980.— 150 с.
10. Спитковский Д. М. Эпигенетический полиморфизм структуры хроматина как основа хромосомной нестабильности // Тез. докл. I Всес. съезда медицинских генетиков (Киев, апрель 1984).— М.: 1983.— С. 319—320.
11. Ташкэ К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию // Академия СРР, 1980.— 191 с.
12. А. с. 1022019 СССР. МКИЗ G 01 N 23/00. Способ определения степени дисперсности хроматина в ядрах клеток / А. В. Карпухин, И. Л. Липидус, Д. М. Спитковский — Оpubл. 07.06.83, Бюл. № 21.
13. Fleck A., Munro H. The precision of ultraviolet adsorption measurement in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation // Biochem. Biophys. acta.— 1962.— 55.— С. 571—578.
14. Kawamura N. Cytological studies in mixoploidy and embryonic development in mosaic silkworms induced by low temperature treatment // Genetica.— 1983.— 60, N 3.— p. 181—190.

Ин-т проблем криобиологии и
криомедицины АН УССР, г. Харьков,
Отделение Ин-та химической физики
АН СССР, Черноголовка, Моск. обл.

Поступила 03.06.88

V. I. STRONA, P. YA. BOYKOV, T. N. YURCHENKO,
A. P. BELONOZHKO

REACTIONS OF THE CELL GENOME TO COLD STRESS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov; Department of Institute of Chemical Physics of the USSR Academy of Sciences, Chernogolovka

Cytological, structure-functional, and biochemical indices of cells in culture were studied after deep hypothermia (4 °C). Sharp condensation of nuclear chromatin has been shown to occur in a range of 10 to 4 °C followed by decondensation upon reconstitution of the cells. The mitotic activity, DNA and protein synthesis have been found to decrease along with increasing the number of abnormal divisions.

Л. Г. Карпенко

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ДО -196°C НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В КЛЕТКАХ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ И ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Представлены данные о влиянии замораживания — медленного и быстрого — на активность аденилатциклазы в ткани щитовидной железы и коры надпочечников. Показано сохранение функциональной активности исследуемого фермента в данных тканях после криовоздействия.

В настоящее время достаточно глубоко изучено функциональное состояние аденилатциклазной системы, участвующей в реализации действия биологических регуляторов. Однако мало изучен процесс функционирования этой системы в условиях охлаждения. Исследование аденилатциклазной системы в тканях, подвергнутых замораживанию-отогреву, представляет большой практический и теоретический интерес, так как может дать основу тестов для оценки функционального состояния биологического объекта после действия на него низких температур, а также дополнительные данные для понимания механизмов криповреждения.

Целью настоящей работы явилось изучение действия 2 режимов замораживания: медленного ($1-3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) и быстрого ($85-100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) до -196°C на активность аденилатциклазы в 2 эндокринных тканях: надпочечнике свиньи и щитовидной железе быка.

Железы, полученные на Харьковском мясокомбинате в течение часа после убоя животных, очищались от жировой капсулы, ополаскивались физиологическим раствором, замораживались в специальных контейнерах со скоростью $1-3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -70°C и помещались в жидкий азот. Замораживание со скоростью $85-100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ осуществлялось путем погружения контейнеров с образцами в жидкий азот. Оттаивание производилось на водяной бане при 37°C . Контролем служили незамороженные образцы тканей, которые использовались в эксперименте сразу после доставки материала. Выделение плазматических мембран для определения в них активности аденилатциклазы производилось при 4°C по методу [4,5]. Об активности исследуемого фермента судили по приросту содержания цАМФ после инкубации аликвотов мембран в АТФ-буфере следующего состава: $0,02\text{ M}$ трис- HCl буфера, 6 mM MgCl_2 , 3 mM АТФ, $0,5\text{ mM}$ теофиллина, 5 mM фосфоэнолпирувата, 100 мкг/мл пируваткиназы, $0,1\%$ альбумина человека. Инкубация производилась на водяной бане в течение 15 мин при 37°C . Количество цАМФ определялось методом белкового конкурентного связывания при помощи набора ^3H -цАМФ производства ЧССР. Исследовалась активность аденилатциклазы в условиях стимуляции ее NaF , ТТГ, адреналином и АКТГ (синактеном). Базальная активность фермента определялась в пробах, в которых стимуляторы отсутствовали.

Полученные данные в результате проведенных исследований об активности аденилатциклазы в ткани коры надпочечника представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние замораживания на активность аденилатциклазы в мембранах клеток коры надпочечников, пмоль цАМФ/мг белка в мин

Условия эксперимента	Базальная активность	NaF 40 mM	Синактен 10^{-8} M
Интактная ткань	$1,05 \pm 0,10$	$4,56^* \pm 0,96$	$1,74^* \pm 0,19$
Замораживание $1-3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	$2,03^{**} \pm 0,45$	$8,14^{**} \pm 1,42$	$3,41^{**} \pm 0,90$
Замораживание $85-100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	$1,55 \pm 0,45$	$5,45 \pm 0,85$	$1,10 \pm 0,20$

Примечание. * — достоверно по отношению к базальной активности, ** — достоверно по отношению к интактной ткани

После действия медленного замораживания происходит достоверное увеличение чувствительности исследуемого фермента к используемым стимуляторам (NaF и синактену), а также его базальной активности. Аналогичные данные были получены при изучении аденилатциклазной активности в мембранах печени крыс после охлаждения животных до 4 °С [2].

Увеличение чувствительности фермента к стимуляторам, а также его базальной активности, по-видимому, связано с мембранными перестройками, происходящими при охлаждении: увеличением мембранной проницаемости для субстратов и ионов, изменением фазового состояния липидов [1,6]. Мембранные перестройки, возникающие при охлаждении, могут привести к нарушению белок-липидных взаимодействий, в результате которых происходит изменение конформационного состояния белков, что может послужить причиной нарушения их активности.

Таблица 2

Влияние замораживания на активность аденилатциклазы в щитовидной железе быка, пмоль цАМФ/мг белка в мин

Условия эксперимента	Базальная активность	NaF 40 мМ	ТТГ 50 мЕ	Адреналин 10 ⁻⁶ М
Интактная ткань	0,61 ±0,10	3,62* ±0,40	1,90* ±0,31	1,09* ±0,27
Замораживание 1—3 °С/мин	1,15** ±0,25	5,50** ±0,47	2,02 ±0,27	1,55 ±0,28
Замораживание 85—100 °С/мин	1,17** ±0,21	5,82** ±0,49	1,94 ±0,47	1,78 ±0,47

Примечание. * — достоверно по отношению к базальной активности, ** — достоверно по отношению к интактной ткани.

При исследовании влияния быстрого замораживания на ткань коры надпочечников были обнаружены изменения в базальной и фторидчувствительной активности аденилатциклазы аналогичные тем, которые имели место и при медленном замораживании. Однако следует отметить, что в условиях данного воздействия чувствительность фермента к NaF менее выражена, чем при медленном замораживании. Было также обнаружено снижение, хотя и недостоверное, активности аденилатциклазы, стимулированной синактеном. Сходные данные о влиянии быстрого замораживания на указанные процессы были получены на изолированных клетках печени [3].

Проведены также исследования по изучению активности аденилатциклазы в ткани щитовидной железы, подвергнутой замораживанию в условиях, аналогичных замораживанию надпочечника (табл. 2). Из данных, приведенных в таблице, следует, что как при медленном, так и при быстром замораживании происходит увеличение базальной активности аденилатциклазы. Наблюдалось также увеличение чувствительности исследуемого фермента к NaF при использовании данных режимов замораживания. При этом не происходит изменений в активности фермента, стимулируемого ТТГ. Отмечена тенденция к повышению активности адреналинчувствительной аденилатциклазы в условиях быстрого замораживания.

Таким образом, при исследовании активности аденилатциклазы в условиях криовоздействия в ткани щитовидной железы и коры надпочечников сохраняется функциональная активность фермента и чувствительность его к действию специфических и неспецифических регуляторов. Однако эта способность выражена не однозначно. В условиях действия неспецифического регулятора NaF как в щитовидной железе, так и в коре надпочечника активность фермента увеличивается при использовании исследуемых скоростей замораживания. Причем наиболее выражено это увеличение в условиях медленного замораживания в коре надпочечника. При изучении действия специфических регуляторов: ТТГ — для щитовидной железы и си-

нактена — для коры надпочечника, было обнаружено, что активность аденилатциклазы в исследуемых объектах проявляет различия в отношении действия низких температур. В условиях быстрого замораживания аденилатциклаза в надпочечнике, стимулируемая синактеном, оказалась более криолабильной по сравнению с аденилатциклазой в щитовидной железе. Причиной этого различия могут быть особенности структурно-функциональной организации этих эндокринных тканей, обусловленные в том числе и их видовой спецификой, что в конечном счете проявилось в различной реакции фермента на действие замораживания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев.: Наук. думка, 1982—255 с.
2. Золочевская Л. И. Аденилатциклаза печени крыс в процессе адаптации к холодным условиям // Экспериментальный анабиоз: Тез. докл. 2 Всес. конф. по анабиозу. — Рига: Б. и., 1984. — С. 68—69.
3. Коптелов В. А. Состояние аденилатциклазной системы гепатоцитов после замораживания-оттаивания // Экспериментальный анабиоз: Тез. докл. 2 Всес. конф. по анабиозу. — Рига: Б. и., 1984 — С. 74.
4. Bech K., Madsen S. N. Human thyroid adenylate cyclase in nontoxic goitre: sensitivity to TSH fluoride and thyroid stimulating immunoglobulines // J. Clin. Endocrinol. — 1978. — 8. — P. 457—466.
5. Dazord A., Morera A. M., Bertran J., Saez J. M. Prostaglandin receptors in human and ovine adrenal glands: binding and stimulation of adenyl cyclase in subcellular preparations // Endocrinology. — 1974. — 95, N 3. — P. 352.
6. Tsvetkov T., Tsonev L., Meranzov N., Minkov J. Preservation of integrity of the inner mitochondrial membrane after freeze-thawing and freeze-drying // Cryobiology. — 1985. — 22, N 3. — P. 301—306.

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

Поступила 18.06.87

Л. Г. KARPENKO

THE EFFECT OF FREEZING TO — 196 °C ON THE ACTIVITY OF ADENYLATE CYCLASE IN ADRENAL CORTEX AND THYROID GLAND CELLS

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

The data on the influence of slow and rapid freezing on the activity of adenylate cyclase in adrenal and thyroid tissues are presented. The functional activity of the enzyme has been found to be maintained in the tissues subjected to freezing.

УДК 612.127.1—084:612.014.43+538.6

В. Н. Запорожан, В. В. Беспоясная

ДИНАМИКА НАПРЯЖЕНИЯ КИСЛОРОДА В ТКАНЯХ ПОСЛЕ КОМБИНИРОВАННОГО КРИОХИРУРГИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ С НИЗКОЧАСТОТНЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ

Изучались влияние низкочастотного магнитного поля на процессы регенерации тканей после криовоздействия и динамика напряжения кислорода в регенерирующей ткани. Установлено, что переменное низкочастотное магнитное поле оказывает выраженное стимулирующее влияние на процессы регенерации тканей после криовоздействия. Степень ускорения репаративных процессов зависит от напряженности магнитного поля и более выражена в случае магнитного поля напряженностью 8 мТ. Ускорение репаративных процессов связано с интенсификацией микроциркуляции и доставки кислорода в ткани под действием переменного низкочастотного магнитного поля.

Для заживления тканевого дефекта требуется достаточное обеспечение кислородом области, где происходят репаративные процессы. Однако при

травме и воспалительных процессах поступление последнего в ткани затруднено, так как имеют место нарушения микроциркуляции и связанное с ними значительное замедление транскапиллярного обмена кислорода и других веществ [8]. Наряду с этим установлено, что сроки регенерации сокращаются при применении низкочастотного магнитного поля [4]. Однако роль напряжения кислорода в тканях в механизме стимулирующего влияния магнитных полей на процессы регенерации изучена недостаточно. Не изучены особенности регенерации и напряжения кислорода в тканях после комбинированного криохирургического воздействия с низкочастотной магнитотерапией и не определены оптимальные параметры последнего фактора.

Целью работы явилось изучение напряжения кислорода в процессе регенерации слизистой оболочки влагалища после сочетанного воздействия низкими температурами и низкочастотным магнитным полем и определение эффективных параметров последнего фактора.

Распределение животных на группы в зависимости от метода воздействия

Группы животных	Количество животных	Методы воздействия	Сроки отхождения струпа, сут	Сроки полной эпителизации, сут
Контрольная	10	Изолированное криовоздействие в течение 30 с	$10,6 \pm 0,5$	$13,4 \pm 0,5$
2-я	10	Криовоздействие и последующее применение магнитного поля напряженностью 50 мТ	$9,4 \pm 0,6$	$12,3 \pm 0,9$
3-я	10	Криовоздействие и последующее применение магнитного поля напряженностью 8 мТ	$P < 0,1$ $7,9 \pm 0,5$ $P < 0,01$	$P < 0,1$ $10,9 \pm 0,6$ $P < 0,001$

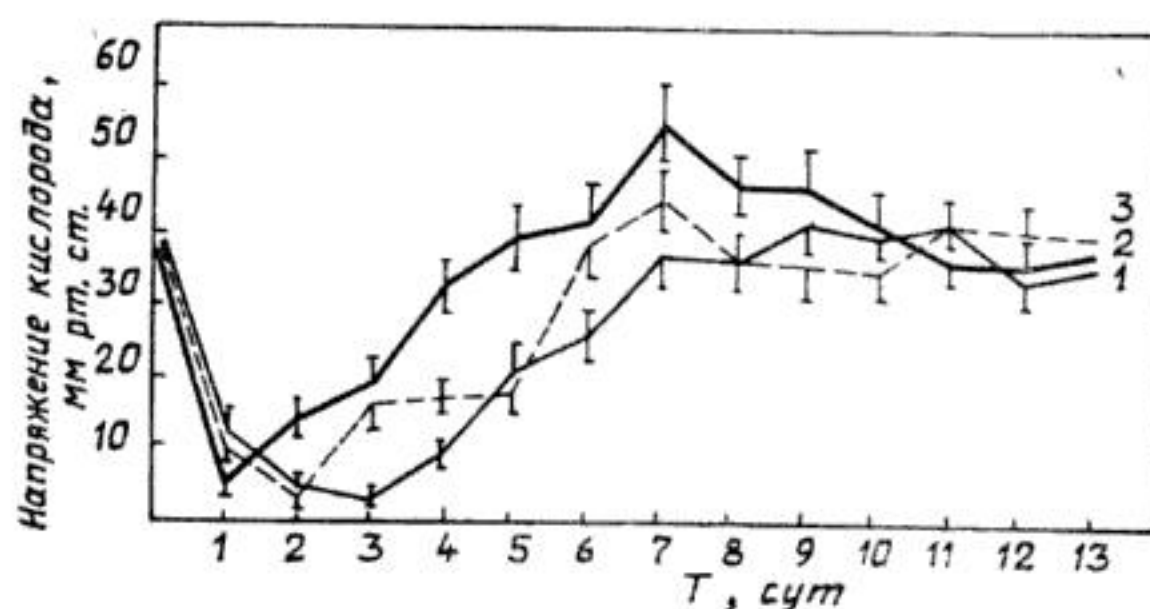
Примечание. P — по сравнению с контролем.

Исследования выполнялись на 30 половозрелых самках морских свинок массой 200—300 г. Криовоздействие производилось автономным аппаратом с диаметром канюли криозонда 5 мм с принудительной циркуляцией хладагента, в качестве которого использовался жидкий азот. Канюлю криозонда вводили во влагалище морской свинки на глубину 10 мм и осуществляли криовоздействие в течение 30 с. Отогрев происходил за счет естественного теплопритока. Напряжение кислорода в тканях определялось полярографическим методом на полярографе LP-9 с регистрирующим устройством TZ213S (ЧССР). Открытые платиновые электроды тарировались по общепринятой методике [1]. Электрод вводили в ткань слизистой влагалища под углом на глубину 2 мм. Для введения электрода в ткани и исключения попадания его в сосуд использовался операционный микроскоп «Цейсс» (ГДР). Электрод сравнения (хлорсеребряный) присоединялся через мостик к конечности животного. Измерение напряжения кислорода в регенерирующей ткани производили на протяжении всего послеоперационного периода в течение 14 дней. Регенерация тканей оценивалась по срокам отхождения струпа и полной эпителизации раневого дефекта, а также на основании результатов морфологических исследований. В качестве источника переменного магнитного поля применялся аппарат магнитотерапии «Полюс-1». Низкочастотное магнитное поле создавалось индуктором с сечением 50×50 мм. Область наружных гениталий ежедневно подвергалась воздействию магнитным полем в течение 20 мин. Индуктор располагался на расстоянии 1 см от тканей для исключения его теплового воздействия. Использовалось переменное электромагнитное поле синусоидальной формы 50 Гц с напряженностью на индукторе 50 и 8 мТ. Распределение животных на группы в зависимости от проводимого воздействия представлено в таблице. Выбор параметров магнитного поля осуществлялся на основании представлений о том, что

магнитное поле как неспецифический раздражитель вызывает развитие в организме различных общих неспецифических адаптационных реакций в зависимости от величины своей биологической активности — реакции тренировки, активации и стресса [2]. Согласно данным ряда исследователей, слабые магнитные поля напряженностью 5—10 мТ уже оказывают выраженное биологическое действие на организм [3]. В то же время диапазон применяемых в практике магнитных полей наиболее часто ограничивается напряженностью 50 мТ, которое, обладая рядом положительных свойств, не оказывают патологического влияния на организм.

Экспериментальные исследования на животных показали, что время полного оттаивания зоны замораживания после криовоздействия составило в среднем 6 мин. Сразу после оттаивания тканей развивается отек, вульва

Динамика напряжения кислорода в слизистой оболочке влажной поверхности после криовоздействия и последующего применения низкочастотного магнитного поля: 1 — напряжение кислорода в тканях после криовоздействия в контроле, 2 — напряжение кислорода в тканях после воздействия магнитного поля напряженностью 8 мТ, 3 — напряжение кислорода в тканях после воздействия магнитного поля напряженностью 50 мТ



увеличивается в размерах, начинается выделение экссудата. На 1-е сут макроскопически во всех группах определялся участок некроза с четко очерченными границами. На 2-е сут струп у всех животных еще плотно соединен с подлежащей тканью и четко отличается от здоровых тканей обескровленностью, коричневым цветом. В 3-й группе тенденция к отторжению струпа более выражена, у 2 животных этой группы по краю зоны регенерации на отдельных участках струп отделился. Отторжение струпа во всех группах начинается на 3-и сут и наиболее выражено в 3-й группе (намечается краевая эпителизация, грануляции сочные с большим количеством сосудов). Сроки отхождения струпа и динамика полной эпителизации представлены в таблице.

Изменения напряжения кислорода в тканях в послеоперационном периоде носят односторонний характер, однако по времени проявления и выраженности изменений существенно отличаются в различных группах (рис.). Понижение pO_2 после криовоздействия одинаково во всех случаях, что свидетельствует о минимальном уровне доставки кислорода в ткани, осуществляемой, вероятно, путем диффузии из тканей, граничащих с замороженными. Тканевая гипоксия, очевидно, способствует более быстрой деструкции участков, подвергнутых криовоздействию, отграничению их от грануляционной ткани и, в конечном счете, отхождению струпа. Повышение напряжения кислорода, определяемое в регенерирующей ткани, связано с началом активизации его доставки в ткани. Известно, что при криовоздействии не происходит замораживания эндотелия, пограничного с участками деструкции. Это способствует, с одной стороны, более быстрому восстановлению функции сосудов, а с другой, — дает возможность более раннему росту микрососудов. Существует мнение, что магнитное поле вызывает дилатацию кровеносных сосудов, улучшение микроциркуляции и оптимизацию диффузии кислорода [10]. Магнитные поля оказывают влияние на функционирование биологических мембран, могут изменять активность ферментов, модулировать свойства водных систем, усиливают кислородное дыхание клеток [7, 9]. Кроме того, переменное магнитное поле обладает стимулирующим

влиянием на нейроэндокринную систему [6], оказывает противовоспалительное, сосудорасширяющее действие, усиливает кровоток, оказывает положительное воздействие на трофику тканей и окислительно-восстановительные процессы, что способствует ускорению регенерации тканей [5].

Пики максимальных значений напряжения кислорода могут означать, что доставка кислорода превышает его потребление регенерирующей тканью в данный временной промежуток, очевидно, за счет интенсивной реваскуляризации. Нормализация этих процессов происходит только за несколько дней до полной эпителизации, когда напряжение кислорода устанавливается на уровне исходных тканей.

Следовательно, низкочастотное магнитное поле оказывает выраженное стимулирующее влияние на регенерацию слизистой оболочки влагалища после криовоздействия, одним из механизмов которого является улучшение снабжения области репарации кислородом. Степень ускорения репаративных процессов зависит от напряженности магнитного поля и более выражена при использовании магнитного поля напряженностью 8 мТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Березовский В. А.* Напряжение кислорода в тканях животных и человека.— Киев: Наук. думка, 1975.— 280 с.
2. *Гаркави Л. Х., Квакуина Б. Б., Уколова М. А.* К вопросу о показаниях к применению магнитных полей различной биологической активности // Применение магнитных полей в клинике: Тез. докл. Куйбышевской обл. конф.— Куйбышев, 1976.— С. 8—9.
3. *Деген И. Л.* О параметрах поля и противопоказаниях для магнитотерапии // Применение магнитных полей в клинике: Тез. докл. Куйбышевской обл. конф.— Куйбышев, 1976.— С. 10—11.
4. *Запорожан В. Н., Хаит О. В.* Магнитотерапия как фактор ускорения регенерации тканей после криовоздействия // Магнитобиология и магнитотерапия в медицине: Тез. докл. Всес. науч.-практ. конф.— Витебск, 1980.— С. 52—53.
5. *Муравьев М. Ф., Загребин А. М., Савельев В. Н.* Некоторые итоги применения постоянных магнитных полей в клинике и эксперименте // Актуальные вопросы магнитобиологии и магнитотерапии: Сб. работ республ. науч.-практ. конф.— Ижевск: Удмуртия.— 1981.— С. 48—50.
6. *Удинцев Н. А.* О механизме биологического действия магнитных полей // Вопросы курортологии.— 1981.— № 1.— С. 9—12.
7. *Холодов Ю. А.* Магнитные поля в медицине // Проблемы техники в медицине: Сб. труд. Всес. науч.-практ. конф.— Таганрог, 1980.— С. 199—202.
8. *Чернух А. М.* Воспаление.— М.: Медицина, 1979.— 296 с.
9. *Haimovici N.* Theoretische Betrachtungen über die Anwendung niederfrequenter gepulster Magnetfelder in der orthopädischen Therapie // Therapiewoche.— 1980.— 30, N 26.— P. 4599—4609.
10. *Warnke U.* Grundlagen zu magnetisch induzierten physiologischen Effecten // Therapiewoche.— 1980.— 30, N. 26.— S. 4609—4616.

Одесский мед. ин-т

Поступила 16.02.87

V. N. ZAPOROZHAN, V. V. BESPOYASNAYA

THE DYNAMICS OF OXYGEN TENSION IN TISSUES SUBJECTED TO COMBINED APPLICATION OF CRYOSURGERY AND LOW FREQUENCY MAGNETIC FIELD

Medical Institute of Odessa

The effect of low frequency magnetic field on tissue regeneration and the dynamics of oxygen tensions in regenerating tissue have been studied. Alternating low frequency magnetic field has been found to exert a stimulating effect on tissue regeneration after cryoapplication. The acceleration of reparative processes is associated with the magnetic field strength being more expressed in the case of 8 mT. The acceleration of reparative processes is related to the intensification of microcirculation and oxygen supply in tissues due to the effect of alternating low frequency magnetic field.

Н. Ф. Губина, Л. В. Беркало, А. М. Утевский

АДРЕНЕРГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КОРЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ БЫКА В УСЛОВИЯХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Приведены данные о влиянии двух режимов замораживания — медленного двухэтапного и быстрого — на процессы мембранного транспорта норадреналина и кинетику рецепторного опосредования адренергической передачи в коре надпочечников быка. Показана криочувствительность адренергических процессов регуляции в клетках коры надпочечников быка.

Проблема трансплантации криоконсервированных эндокринных тканей и органов для лечения эндокринной недостаточности является одной из актуальных для современной эндокринологии и трансплантологии [4]. При разработке эффективных методов криоконсервирования эндокринных тканей необходима всесторонняя оценка жизнеспособности трансплантатов и, в первую очередь, сохранности регуляторных процессов [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение чувствительности нереперторного (захват) и реперторного связывания адренергических лигандов клетками коры надпочечников быка к быстрому и медленному двухэтапному замораживанию ткани до -196°C . Срезы коры надпочечников быка замораживали в специальных контейнерах по двухэтапной программе следующим образом: на первом этапе — со скоростью $1-3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -70°C , затем со скоростью $85-100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -196°C . Быстрое замораживание осуществляли одноэтапно со скоростью $85-100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -196°C . Пробы отогревали на водяной бане при 40°C . Контролем служили срезы интактной ткани, не подвергнутые замораживанию.

Изучение транспорта (захвата) ^3H -норадреналина проводили путем инкубации срезов надпочечников быка массой $20-25\text{ мг}$ (30 мин при 37°C) в физиологическом растворе Тироде с меченым медиатором (конечные концентрации $0,01-1,0\text{ мкмоль}$). Процесс аккумуляции гормона-медиатора останавливали, помещая срезы в ледяной раствор Тироде с последующей 5-кратной промывкой этим раствором [1]. Контролем сорбции служили срезы тканей, которые инкубировали с теми же концентрациями меченого медиатора в течение 30 мин при 0°C . Радиоактивность проб определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Бэкман ЛС 7800. Кинетические параметры захвата — константу Михаэлиса K_m и максимальную скорость реакции V_{max} — вычисляли по методу наименьших квадратов [3].

Кинетические характеристики (равновесную K_d и число мест связывания B_{max}) β -адренорецепторов изучали по связыванию ^3H -дигидроалprenолола с препаратом плазматической фракции мембран коры надпочечников быка, полученной по методу [6]. Для определения общего связывания суспензию мембран ($250-350\text{ мкг}$ белка) инкубировали в объеме 300 мкл 50 ммоль трис-HCl буфера $\text{pH } 7,4$, содержащем 10 ммоль MgCl_2 , в присутствии различных концентраций (от $0,5$ до 10 нмоль) ^3H -дигидроалprenолола в течение 10 мин при 37°C . Неспецифическое связывание определяли в присутствии 10^{-5} моль пропранолола. Специфическое связывание определяли как разность общего и неспецифического связывания при каждой концентрации меченого лиганда. Разделение свободного и связанного лиганда проводили методом вакуумного фильтрования [7]. Анализ кривых связывания для каждого препарата мембран проводили в координатах Скэтчарда. В экспериментах были использованы ^3H -норадреналин с удельной активностью $0,59\text{ ТБк/ммоль}$ и ^3H -дигидроалprenолол (^3H -ДГА) с удельной активностью $2-14\text{ ТБк/ммоль}$ фирмы «Амершам» (Англия).

Процесс поглощения катехоламинов надпочечниками крыс отличен от процессов захвата биогенных аминов другими тканями тем, что он не чув-

ствителен к ингибиторам нейронального захвата адренергических гормонов-медиаторов [1]. На срезах коры надпочечников быка нами проведены опыты с ингибитором нейронального захвата катехоламинов мелипрамином и установлено, что этот ингибитор в концентрации 10^{-5} моль не вызывает изменений скорости поглощения ^3H -норадреналина как нативной тканью, так и после изучавшихся режимов замораживания срезов до -196°C (табл. 1).

Таблица 1

Захват ^3H -норадреналина срезами коры надпочечников быка: влияние замораживания до -196°C (имп/мин/г)

Программа замораживания	Контроль	Мелипрамин 10^{-5} моль
Без замораживания	$26\,692 \pm 3\,689$	$25\,356 \pm 2\,601$
Медленное двухэтапное замораживание	$15\,512 \pm 1\,265^*$	$16\,470 \pm 1\,158^*$
Быстрое замораживание	$18\,605 \pm 3\,127^*$	$17\,805 \pm 1\,455^*$

Примечание. * — различия достоверны по сравнению с контролем без замораживания, $P < 0,005$.

Процессы захвата катехоламинов адренергическими структурами (нейроном) насыщаемы, интенсивность накопления зависит от температуры, pH и времени инкубации. Исследование захвата ^3H -норадреналина срезами коры надпочечников быка при инкубации их с меченым медиатором в одной концентрации при различной длительности инкубации при 37°C показало, что скорость захвата ^3H -норадреналина максимальна в первые 15 мин (поглощается до 70 % медиатора; рис. 1). В следующие промежутки времени

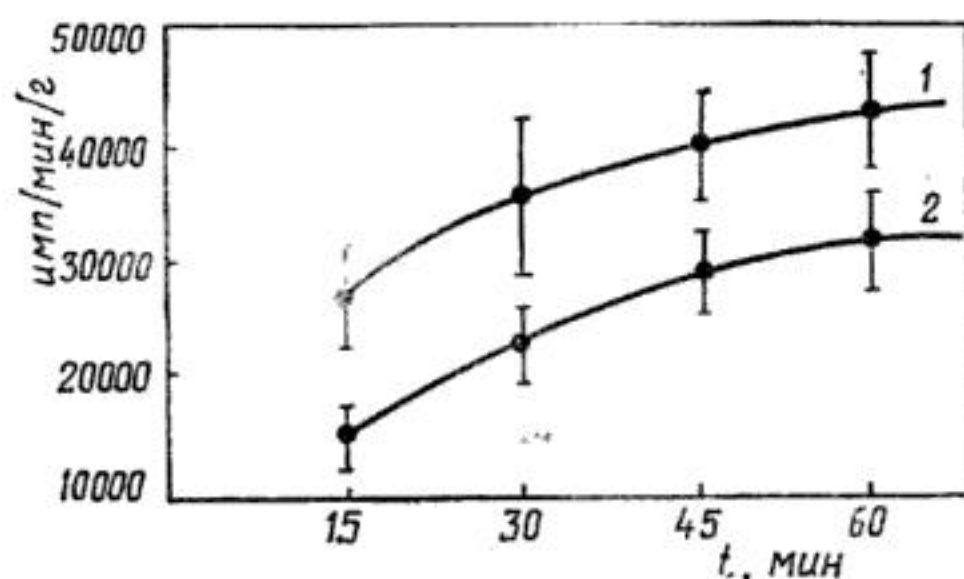


Рис. 1. Зависимость захвата ^3H -норадреналина срезами коры надпочечников быка от времени инкубации ($n=8$); 1 — нативная ткань, 2 — после замораживания по двухэтапной программе

(30, 45 и 60 мин) интенсивность захвата гормона-медиатора тормозится, что свидетельствует о насыщении резервирующего пула тканевых срезов в данных условиях, причем 90 % медиатора поглощается за первые 30 мин инкубации. Медленное двухэтапное замораживание срезов коры надпочечников быка до -196°C снижает количество поглощенного ^3H -норадреналина на 42 %. Быстрое замораживание ткани до -196°C угнетает процесс поглощения меченого катехоламина на 30 % (рис. 1, табл. 1).

Ранее нами на срезах щитовидной железы и предсердий быка было показано, что процессы захвата и высвобождения адренергических гормонов-медиаторов чувствительны как к действию низких температур, так и к кратковременному хранению тканей при пониженных положительных температурах [2], а также показано преимущество медленного двухэтапного замораживания этих тканей до -196°C перед быстрым для сохранности процессов захвата адренергических гормонов-медиаторов. Установлено, что для срезов коры надпочечников быка данные режимы замораживания практически не изменяют K_m захвата ^3H -норадреналина, однако специфичность переносчика медиатора в результате быстрого замораживания срезов коры надпочечников быка снижается по сравнению с медленным двухэтапным замораживанием до -196°C (табл. 2). Отмечено также торможение V_{max} захвата медиатора после медленного двухэтапного замораживания ткани как по сравнению с этим показателем для контрольной

Таблица 2

Кинетические характеристики захвата ^3H -норадреналина срезами коры надпочечников быка ($n = 5-7$)

Условия замораживания	K_M , мкмоль	$V_{\max}$, нмоль/г/мин	E , нмоль/г/мин/нмоль
Интактная ткань (контроль)	$0,682 \pm 0,212$	$16,680 \pm 3,500$	0,012
Медленное двухэтапное замораживание	$0,467 \pm 0,148^*$	$6,126 \pm 0,897^{**}$	0,007
Быстрое замораживание	$1,103 \pm 0,249$	$17,643 \pm 3,534$	0,008

Примечание. * — различия достоверны по сравнению с быстрым замораживанием, $P < 0,005$; ** — различия достоверны по сравнению с контролем и быстрым замораживанием, $P < 0,005$.

ткани, так и для подвергнутой быстрому замораживанию. Величина эффективности реакции поглощения ^3H -норадреналина, включающая в себя оба основных параметра $E = V_{\max} / 2K_M$ [1], уменьшается в равной мере (до 40 %) после обоих режимов замораживания срезов коры надпочечников до -196°C .

Кинетику β -адренорецепторов плазматических мембран коры надпочечников быка изучали по связыванию ^3H -ДГА. Изотермы специфического связывания в координатах Скэтчарда представляют собой прямые, что указывает на существование одного типа мест связывания ^3H -ДГА в мембранах клеток коры надпочечника быка. В качестве примера на рис. 2 представлены графики связывания лиганда адренорецепторами мембран клеток коры надпочечника быка, выделенными из нативной ткани, а также после замораживания ее по описанным выше программам. Связывание ^3H -ДГА насыщаемое, обратимо. Константа диссоциации лиганд-рецепторного комплекса K_d , определяемая наклоном изотермы в координатах Скэтчарда, возрастает примерно в три раза как после быстрого, так и после медленного двухэтапного замораживания срезов коры надпочечников быка до -196°C (табл. 3).

Это свидетельствует о снижении сродства адренергических рецепторов к лиганду. Число мест связывания $B_{\max}$, определяемое величиной отрезка,

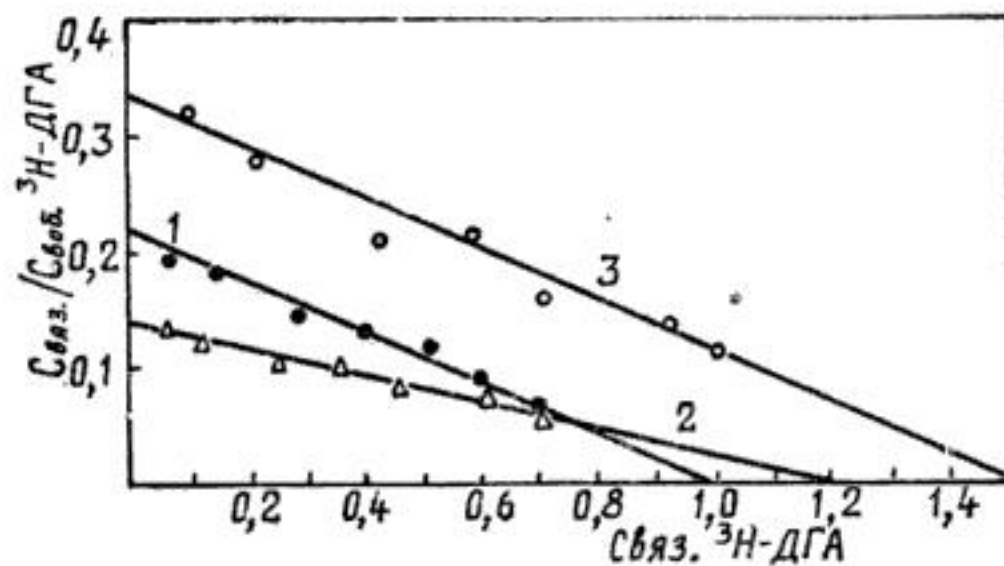


Рис. 2. Специфическое связывание ^3H -ДГА в координатах Скэтчарда с плазматическими мембранами коры надпочечника быка, выделенными из нативной ткани (1), после медленного двухэтапного (2) и быстрого замораживания (3)

Таблица 3

Влияние замораживания до -196°C на связывание ^3H -дигидроалprenолола с β -адренорецепторами мембран клеток коры надпочечников быка ($n = 5$)

Условия замораживания	K_d , нмоль	$B_{\max}$, фмоль/мг белка
Интактная ткань (контроль)	$3,74 \pm 0,50$	920 ± 390
Медленное двухэтапное замораживание	$10,99 \pm 1,11^*$	$3590 \pm 1000^*$
Быстрое замораживание	$10,39 \pm 1,25^*$	$2160 \pm 340^*$

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с контролем, $P < 0,005$.

отсекаемого изотермой на оси абсцисс, увеличивается после обоих режимов замораживания срезов до -196°C . Возможно, это связано с модификацией липидных компонентов мембран, участвующих в гормон-рецепторном взаимодействии, с изменением белок-липидных взаимодействий в мембранах клеток коры надпочечника быка под действием низких температур.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что замораживание до -196°C вносит существенные изменения как в кинетику рецепторного опосредования адренергической передачи, так и в процессы мембранного транспорта катехоламинов в клетках коры надпочечника быка. Характерным является торможение интенсивности захвата ^3H -норадреналина срезами коры надпочечника, а также снижение сродства β -адренорецепторов к лиганду и увеличение количества связывающих мест после быстрого и медленного двухэтапного замораживания ткани до -196°C . Это обуславливает необходимость дальнейшего поиска оптимальных способов криозащиты клеток коры надпочечника быка от повреждающих факторов низкотемпературного консервирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волина Е. В. Некоторые физиологические механизмы регуляции включения норадреналина- H^3 в надпочечники крыс // Пробл. эндокринологии. — 1977. — 23, № 1. — С. 87—93.
2. Губина Н. Ф. Исследование захвата и высвобождения катехоламинов органами животных в условиях охлаждения, замораживания и отогрева // Автореф. дис.... канд. биол. наук — Харьков, 1984. — 21 с.
3. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1979. — 280 с.
4. Пушкарь Н. С., Чуйко В. А., Утевский А. М. и др. Консервация и трансплантация эндокринных органов и тканей. — Харьков, 1981. — 36 с. (Препринт / АН УССР, ИПКиК).
5. Чуйко В. А. Биохимия криоконсервированной щитовидной железы. — Киев: Наук. думка, 1985. — 213 с.
6. Dazord A., A. M. Morera, J. Bertland, J. M. Saez. Prostaglandin receptors in human and ovine adrenal glands: binding and stimulation of adenyl cyclase in subcellular preparation // Endocrinology. — 1974. — 95, N 2. — P. 352—359.
7. Shima S., Kawashima Y., Hirai M. et al. Effect of androgens on isoproterenol-sensitive adenylate cyclase system on the rat prostate // Mol. Pharmacol. — 1980. — 18, N 1. — P. 45—49.

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

Поступила 21.08.87

N. F. GUBINA, L. V. BERKALO, A. M. UTEVSKY

ADRENERGIC PROCESSES IN BOVINE ADRENAL CORTEX UPON FREEZING

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

The effect of two freezing procedures, namely two—step slow and rapid freezing on the noradrenaline membrane transport and on the kinetics of receptor mediation of adrenergic transfer in bovine adrenal cortex has been studied. The cryolability of adrenergic regulation processes in bovine adrenal cortex cells has been shown.

УДК 57.043

Л. Ф. Розанов, Е. Д. Розанова, И. А. Некоз

КИНЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С РАСТВОРАМИ ГЛИЦЕРИНА И 1,2-ПРОПАНДИОЛА

Методами спектрофотометрии и световой микроскопии изучено поведение эритроцитов человека в водных и водно-солевых растворах криопротекторов — глицерина и 1,2-пропандиола — в концентрациях до 40 %. Сравнивается проницаемость эритроцитов для указанных криопротекторов и обращается внимание на то, что время 50 %-ного гемолиза эритроцитов в водных растворах глицерина в отличие от времени 50 %-

ного гемолиза в водных растворах 1,2-пропандиола значительно возрастает с ростом концентрации криопротектора. Установлено, что гемолиз эритроцитов в 30—40 %-ных водных растворах глицерина характеризуется существенной временной задержкой и выявляет выраженное различие индивидуальных клеток по скорости их набухания в бессолевой среде.

Изучение процессов и явлений, сопровождающих эквilibрацию клеток в криозащитных средах,— важный этап как оптимизации методов криоконсервирования биологических суспензий, так и выработки адекватных критериев прогнозирования сохранности клеток после замораживания-оттаивания.

Наиболее плодотворным в изучении реакции клеток на введение в их среду криопротекторов может явиться изучение кинетики изменений объема и формы клеток, ставшее к настоящему времени одним из традиционных в изучении процессов проникновения криопротекторов в клетки [1, 2, 3]. Вместе с тем возможности этого метода реализованы далеко не в полной мере.

В связи с этим мы изучали методами микроскопии и спектрофотометрии кинетику деформационных изменений и гемолиза эритроцитов, помещенных в водные растворы глицерина и 1,2-пропандиола, содержащие и не содержащие NaCl.

В качестве объекта исследования использовали эритроциты донорской крови со сроком хранения при 4 °C не более 3 сут. В спектрофотометрических исследованиях кровь предварительно разводили в соотношении 1 : 50 физиологическим раствором NaCl, а затем 0,1 мл разбавленной крови переносили в кювету спектрофотометра, содержащую 2,9 мл раствора криопротектора, и содержимое кюветы перемешивали. Зависимость уровня светорассеяния от времени контакта эритроцитов с растворами криопротекторов изучали при $\lambda = 700$ нм, т. е. в области, где отсутствует поглощение хромофоров, и оптическая плотность обусловлена только рассеянием света на частицах — эритроцитах. В микроскопических исследованиях 0,1 мл цельной крови добавляли к 4 мл раствора криопротектора, перемешивали и переносили объект на столик микроскопа. Время смешивания и последующих наблюдений фиксировали секундомером.

1-, 5-, 10-, 15-, 20-, 30- и 40 %-ные растворы глицерина и 1,2-пропандиола были приготовлены на дистиллированной воде с добавлением или без добавления NaCl до 0,15 М концентрации. Исследования проводились при температуре 25 °C.

В работе использован спектрофотометр типа Пай Уникам SP-8000, микроскопические исследования проведены на поляризационно-интерференционном микроскопе MPI-5 с применением техники микрокиносъемки (увеличение на пленке X450).

Взаимодействие эритроцитов с растворами глицерина и 1,2-пропандиола, не содержащими NaCl. В табл. 1 и 2 приведены полученные из кинетических кривых светорассеяния данные о времени полного и 50 %-ного гемолиза эритроцитов, помещенных в растворы криопротекторов, приготовленные на дистиллированной воде.

Таблица 1

Зависимость времени полного и 50 %-ного гемолиза эритроцитов от концентрации глицерина в системе глицерин-вода

Концентрация глицерина, %	0	1	5	10	15	20	30	40
Время полного гемолиза, с	± 25 5	± 166 10	± 173 16	± 244 20	± 320 5	± 505 10	± 775 30	± 1000 40
Время 50 %-ного гемолиза, с	10	± 15 5	± 40 5	± 80 5	± 105 5	± 240 5	± 420 10	± 550 40

Таблица 2

Зависимость времени полного и 50 %-ного гемолиза эритроцитов от концентрации 1,2-пропандиола в системе 1,2-пропандиол-вода

Концентрация 1,2-пропандиола, %	0	1	5	10	15	20	30	40
Время полного гемолиза, с	± 25 5	± 70 25	± 93 20	± 185 20	± 205 10	± 215 30	± 220 20	± 235 10
Время 50 %-ного гемолиза, с	10	10	± 13 4	± 20 5	± 20 1	± 25 1	± 25 5	± 33 10

Время 50 %-ного гемолиза является основной экспериментальной характеристикой при теоретическом расчете коэффициента проницаемости эритроцитов для веществ. Обычно такой расчет предполагает, что 50 %-ный гемолиз в растворах проникающих веществ, гипотоничных по NaCl, наступает в момент времени, соответствующий набуханию эритроцитов до критического объема [1].

На рис. 1 представлены построенные по данным табл. 1 и 2 зависимости времени 50 %-ного гемолиза от концентрации глицерина и 1,2-пропандиола. Обращает на себя внимание большая скорость гемолиза в растворах 1,2-пропандиола, чем глицерина, свидетельствующая, согласно существующим представлениям, о более высокой проницаемости эритроцитов для этого

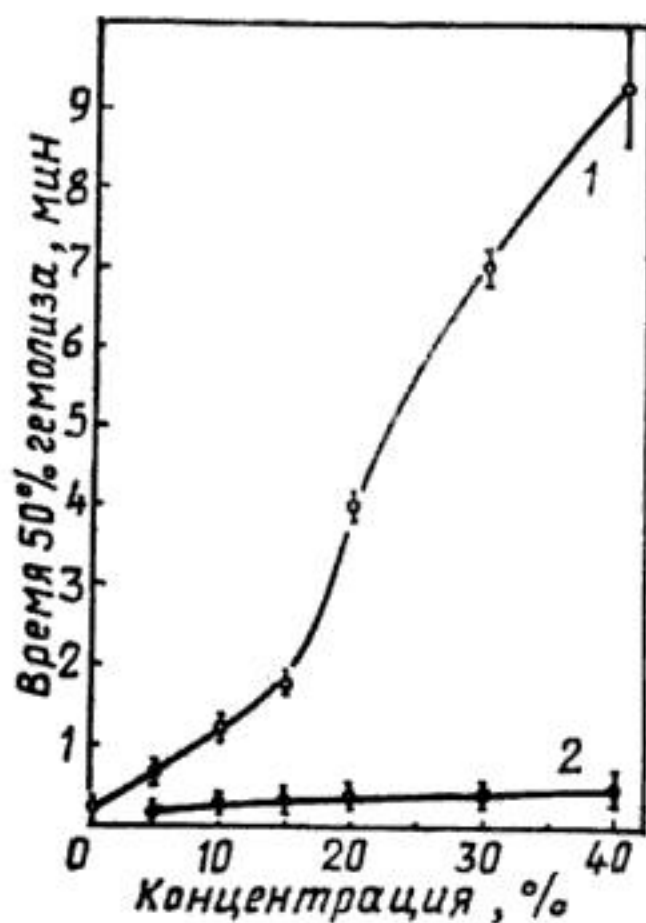


Рис. 1. Зависимость времени 50 %-ного гемолиза при 25 °C от концентрации глицерина (1) и 1,2-пропандиола (2)

криопротектора. Различие в скоростях гемолиза возрастает при концентрациях криопротекторов выше 15 %, где кривая зависимости времени 50 %-ного гемолиза от концентрации глицерина существенно изменяет свой наклон. Так, если время 50 %-ного гемолиза для 5 и 15 %-ного 1,2-пропандиола составляет соответственно 13 и 20 с (возрастает в 1,6 раза), а для 5 и 15 %-ного глицерина — 40 и 105 с (возрастает в 2,6 раза), то в диапазоне концентраций 15—40 % время 50 %-ного гемолиза в растворах 1,2-пропандиола (20 и 33 с) возрастает в 1,7 раза, а в растворах глицерина (105 и 550 с) — более чем в 5 раз.

Проведенные микроскопические исследования также показали значительные различия в скорости гемолиза эритроцитов в растворах глицерина и 1,2-пропандиола. В растворах 1,2-пропандиола гемолиз начинался ранее, чем мы приступали к наблюдению этого процесса под микроскопом (~25 с) и к 1,5 мин экспозиции в поле зрения оставались лишь теряющие (или потерявшие) гемоглобин тени.

В растворах глицерина потеря гемоглобина единичными клетками наблюдалась через 1—2 мин экспозиции. Оценка времени полного гемолиза дала следующие значения: для 5 %-ного глицерина — 2—3 мин, для 10 %-ного — 5—7 мин, для 15 %-ного — 10—13 мин, для 20 %-ного — 15—20 мин, для 30 %-ного — 30—40 мин и для 40 %-ного глицерина — 45—60 мин. Причины такой задержки гемолиза по сравнению с гемолизом, регистрируемым методом спектрофотометрии, нам пока не ясны. Возможно, здесь определенную роль играют различия в чувствительности методов, предварительное разведение эритроцитов физиологическим раствором, применяемое при спектрофотометрии. Тем не менее сопоставление полученных нами времен 50 %-ного гемолиза для 10 %-ного (1,07 М) и 20 %-ного (2,15 М) глицерина

с данными П. Мазура и Р. Миллера [1] для 1 и 2 М глицерина при 20 °C показывает их хорошее совпадение.

В 5—30 % растворах глицерина эритроциты образовывали агрегаты, которые разрушались по мере гемолиза составляющих агрегаты клеток. Особенно выраженной агрегация была в 15—30 % растворах глицерина (рис. 2). В 40 %-ном глицерине образование агрегатов не наблюдалось. Подавляющее большинство клеток в этом растворе возвращалось из дегидратированного состояния в состояние, близкое к исходному, примерно к 2-й мин экспозиции. В процессе последующего гемолиза массового перехода эритроцитов в сферическое состояние не наблюдалось и даже после разруше-

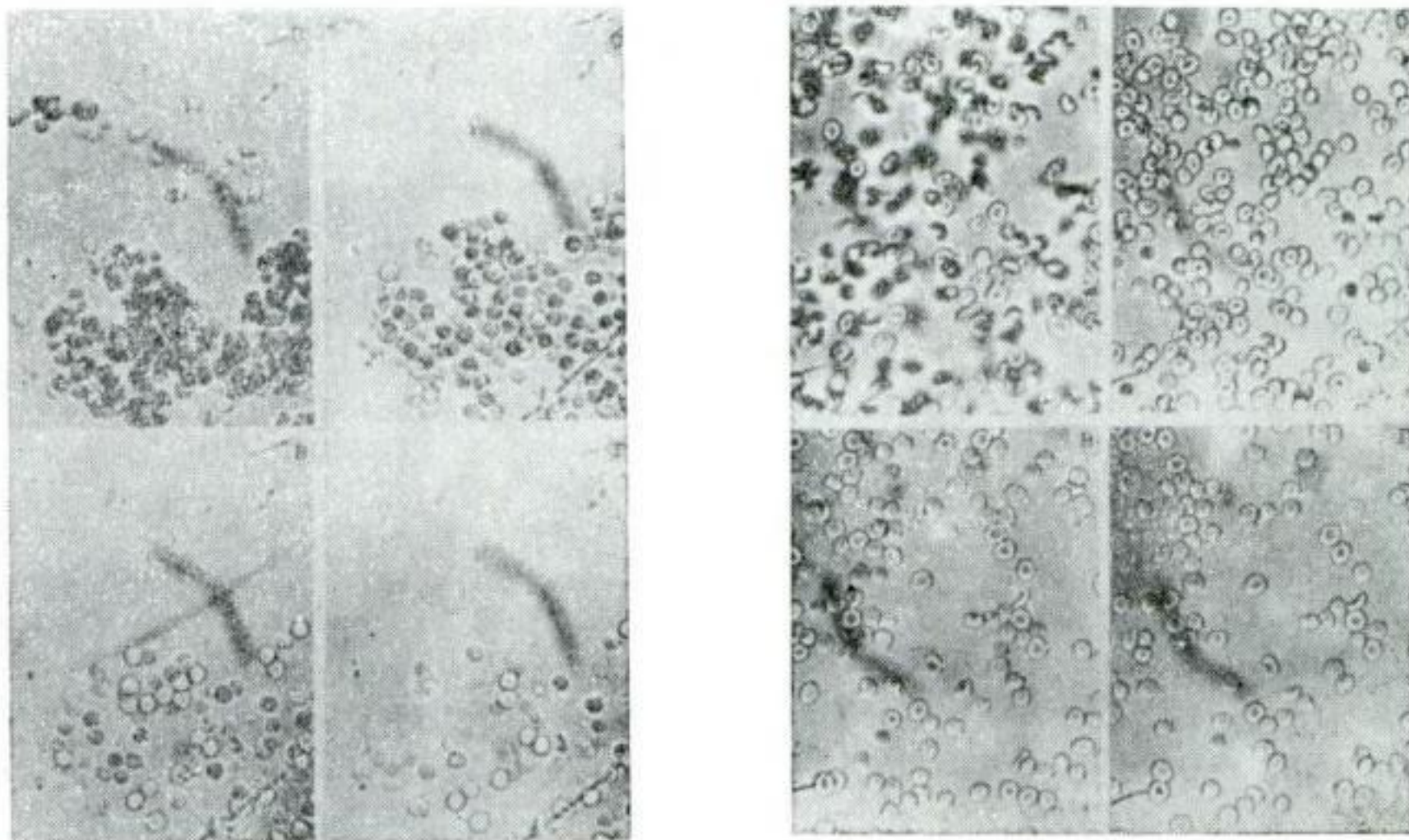


Рис. 2. Кинетика трансформации и гемолиза эритроцитов в 20 %-ном водном растворе глицерина (X 450): а — 1 мин 30 с, б — 4 мин, в — 13 мин, г — 40 мин

Рис. 3. Кинетика трансформации и гемолиза эритроцитов в 40 %-ном водном растворе глицерина (X 450): а — 1 мин 30 с, б — 3 мин, в — 4 мин, г — 5 мин

ния большей части клеток оставались эритроциты, имеющие объем, близкий к исходному (рис. 3).

Эти данные невозможно объяснить существующими представлениями о том, что время 50 %-ного гемолиза соответствует моменту набухания эритроцитов до критического объема. Более того, они предполагают весьма существенный разброс во времени набухания клеток в популяции до критического объема, причины которого требуют дальнейшего изучения.

Взаимодействие эритроцитов с растворами глицерина и 1,2-пропандиола, содержащими 0,15 М NaCl. Спектрофотометрические исследования не выявили существенных различий в поведении эритроцитов при помещении их в 5—20 %-ные растворы глицерина и 5—30 %-ные растворы 1,2-пропандиола, содержащие 0,15 М NaCl. Взаимодействие эритроцитов с 30—40 %-ным глицерином и 40 %-ным 1,2-пропандиолом приводило к нарастающему во времени гемолизу, который к 7-й мин экспозиции в 30- и 40 %-ном глицерине составлял оценочно соответственно 10 и 30 %, а в 40 %-ном 1,2-пропандиоле уже к концу 1-й мин достигал 70 %.

Микроскопические исследования, в свою очередь, показали, что реакция эритроцитов на 5—30 %-ные растворы 1,2-пропандиола и 5—20 %-ные глицерина, в основном, однотипна — клетки принимают форму сфероэхиноцитов и сохраняют эту форму в процессе дальнейшей экспозиции.

Поведение эритроцитов в 30 и 40 %-ном глицерине характеризовалось возвращением первоначально дегидратированных клеток к форме, близкой

к нормоциту (рис. 4), которая сохранялась в течение длительного времени. Однако наряду с этим наблюдался гемолиз отдельных клеток в течение экспозиции.

В 40 %-ном растворе 1,2-пропандиола поведение эритроцитов несколько отличалось. После дегидратации клетки быстро принимали форму сфероцитов и эллипсоидов с последующим гемолизом сфероцитов и переходом эллипсоидов в сфероциты (рис. 5).

Причины гемолиза эритроцитов в растворах глицерина и 1,2-пропандиола больших концентраций, содержащих 0,15 М NaCl, пока не ясны и требуют специальных исследований.

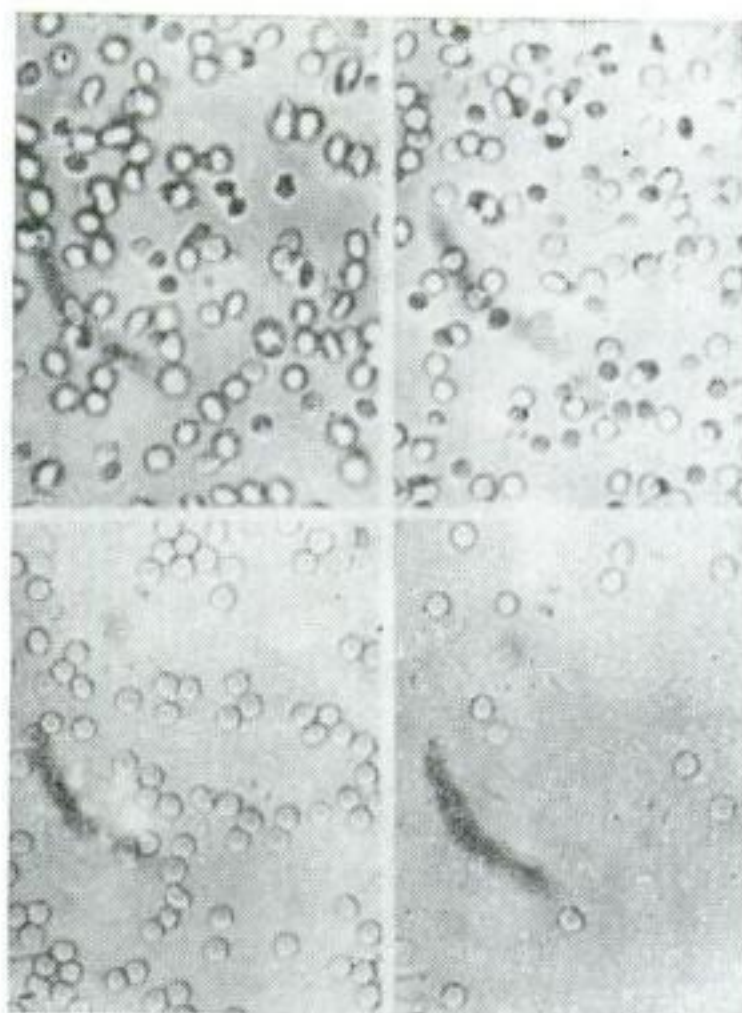
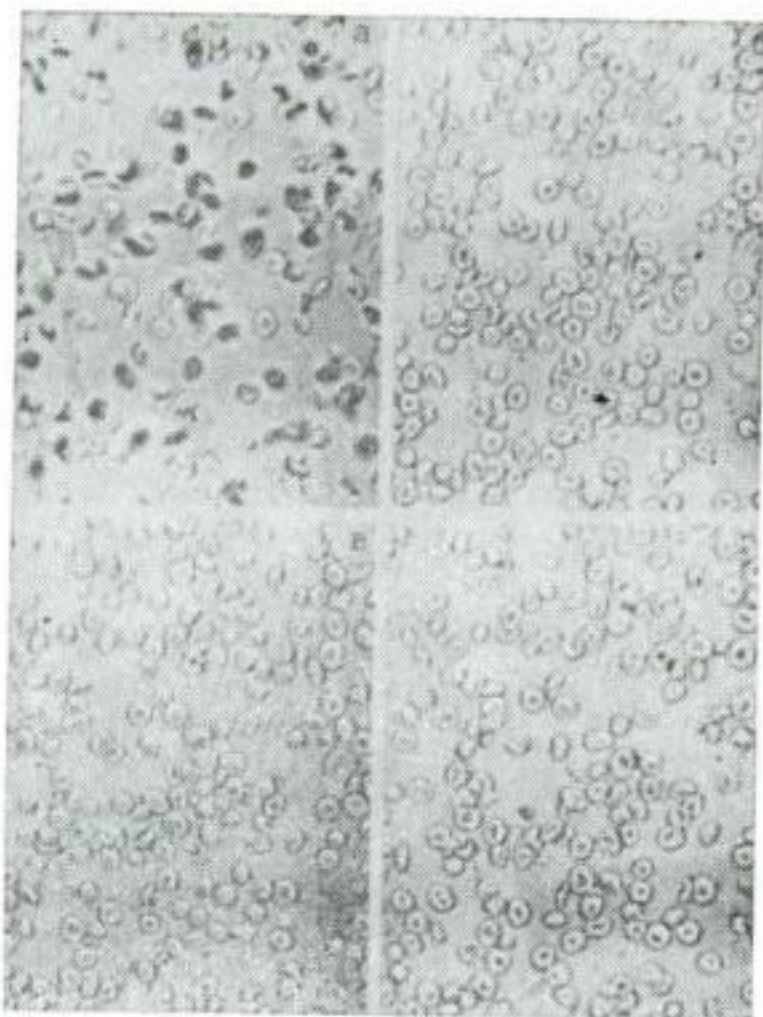


Рис. 4. Кинетика трансформации эритроцитов в 30 %-ном растворе глицерина, содержащем 0,15 М NaCl (X 450) а — 1мин, б — 3мин, в — 8мин, г — 30мин
г — 15мин

Рис. 5. Кинетика трансформации и гемолиза эритроцитов в 40 %-ном растворе 1,2-пропандиола, содержащем 0,15 М NaCl (X450): а — 50с, б — 1мин 24с, в — 8мин 30с, г — 15мин

Таким образом, полученные данные указывают на необходимость более детального анализа кинетики индивидуального поведения эритроцитов в растворах криопротекторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mazur P., Miller R. Permeability of the human erythrocyte to glycerol in 1 and 2 M solutions at 0 or 20 °C // *Cryobiology*.— 1976.— 13, N 5.— P. 507—522.
2. Saari J. T., Beck J. S. Hypotonic hemolysis of human red blood cells: A two-phase process // *J. Membr. Biol.*— 1975.— 23.— P. 213—226.
3. Wessels J. M. C., Pals D. T. F., Veerkamp J. H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes. 1. A reexamination of the osmotic lysis method // *Biochim et biophys acta*.— 1973.— 291.— P. 165—174.

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

Поступила 04.05.87

L. F. ROZANOV, E. D. ROZANOVA, I. A. NEKOZ

THE KINETICS OF INTERACTION BETWEEN HUMAN ERYTHROCYTES AND GLYCEROL OR 1,2-PROPANE DIOL SOLUTIONS

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

The behavior of human erythrocytes in aqueous and water-salt solutions of cryoprotectants such as glycerol and 1,2-propane diol in a concentration of 40 % has been studied using the methods of spectrophotometry and light microscopy.

В. В. Родин, И. А. Новиков, В. Я. Волков

ВЛИЯНИЕ КСЕНОНА НА СИСТЕМУ ДНК-СВЯЗАННАЯ ВОДА ПО ДАННЫМ МЕТОДА ИМПУЛЬСНОГО ЯМР

Методом импульсного ЯМР изучено влияние инертного газа ксенона на характер перестроек в гидратной оболочке ДНК при $T < 273$ К в интервале относительной влажности 80—100 %.

Известно, что вода играет важную роль в формировании и стабилизации структуры таких биополимеров, как ДНК, РНК и белки. От состояния гидратной оболочки лиофилизированной ДНК зависит устойчивость ДНК-содержащих биопрепаратов при некоторых экстремальных воздействиях [5]. Поэтому возникает необходимость исследования на молекулярном уровне механизма возможных структурных перестроек в системе ДНК-связанная вода и поиска различных условий и факторов, влияющих на эти перестройки.

По данным литературы [3,5], препараты лиофилизированной ДНК при относительной влажности (о. в.) свыше 70—80 % в области температур менее 273 К претерпевают два структурных перехода, один из которых обусловлен вымерзанием воды, тогда как другой, происходящий при более высоких температурах (258—268 К), не связан с переходом воды в лед. Эти переходы обнаружены по температурным зависимостям времени корреляции вращения спинового зонда [5] и изучены методами ЯМР [3]. При подборе веществ, влияющих на структурные переходы в данной системе, выбор падает на соединения, которые производят наименьшее химическое воздействие на макромолекулы самого биополимера. В этой связи представляется возможным использовать инертный газ ксенон (оказывающий при определенных условиях сильное влияние на структуру воды [1,6]), который в растворах биополимеров и клеточных суспензиях уже был апробирован нами ранее [4]. В данной работе методом импульсного ЯМР исследовался механизм влияния ксенона на препараты лиофилизированной ДНК с о. в. 75—100 %.

В работе использовались лиофильно высушенные препараты натриевой соли тимусной ДНК, выдержанные в парах насыщенных растворов солей с о. в. 75—100 %. ДНК в этих условиях имеет высокоупорядоченную структуру двойной спирали [5]. Леофильно сухие препараты помещались в специальные пирексные ампулы, после чего образцы насыщали водой в эксикаторах с соответствующей о. в., закрывали герметическими крышками и использовали в последующих ЯМР-экспериментах.

Экспериментальные данные получали на основе анализа амплитуды сигнала свободной индукции (ССИ) (ССИ протонов после 90°-го импульса и времени спин-спиновой релаксации T_2 протонов воды и протонов ДНК). Время спин-спиновой релаксации протонов воды определяли на частоте резонанса 90 МГц с помощью серии Карра-Парселла-Майбума-Гилла. Для протонов ДНК время спин-спиновой релаксации измеряли по спаду ССИ. Анализ спада ССИ, имеющего двухкомпонентный характер, показал, что медленная компонента ($T_2 \sim 2$ —10 мс) относится к протонам воды, а быстрая — ($T_2 \sim 15$ —20 мкс) — к протонам ДНК. По уменьшению амплитуды медленной компоненты ЯМР-сигнала при охлаждении рассчитывали содержание незамерзшей воды (с учетом известной массы образца, массы нуклеотида и соответствия ЯМР-сигнала водных протонов количеству воды в образце).

Обработку препаратов ДНК ксеноном проводили статическим методом [4], для чего ампулы с образцами выдерживали под давлением этого газа 0,8—1,2 МПа при 278 К. В этих условиях образовывались льдоподобные структуры клатратов ксенона, количество которых, как и ранее, оценивали

по уменьшению ССИ протонов воды [4]. Процесс клатратообразования инициировали путем встряхивания ампул и кратковременного их охлаждения сухим льдом. Температуру образцов поддерживали с точностью 1 К.

Данные ЯМР-исследований структурных переходов в системе ДНК-связанная вода (зависимости логарифмов времени спин-спиновой релаксации протонов воды от обратной температуры [3,5]) были воспроизведены на используемых в настоящей работе препаратах ДНК и представлены на рис. 1. На этом же рисунке приведена зависимость содержания незамерзшей воды в гидратной оболочке ДНК при 86 % о. в. от температуры с целью сопоставления ее поведения при одних и тех же температурах с динамическими характеристиками водной фазы данной системы. На кривых $\ln T_2$ (рис. 1)

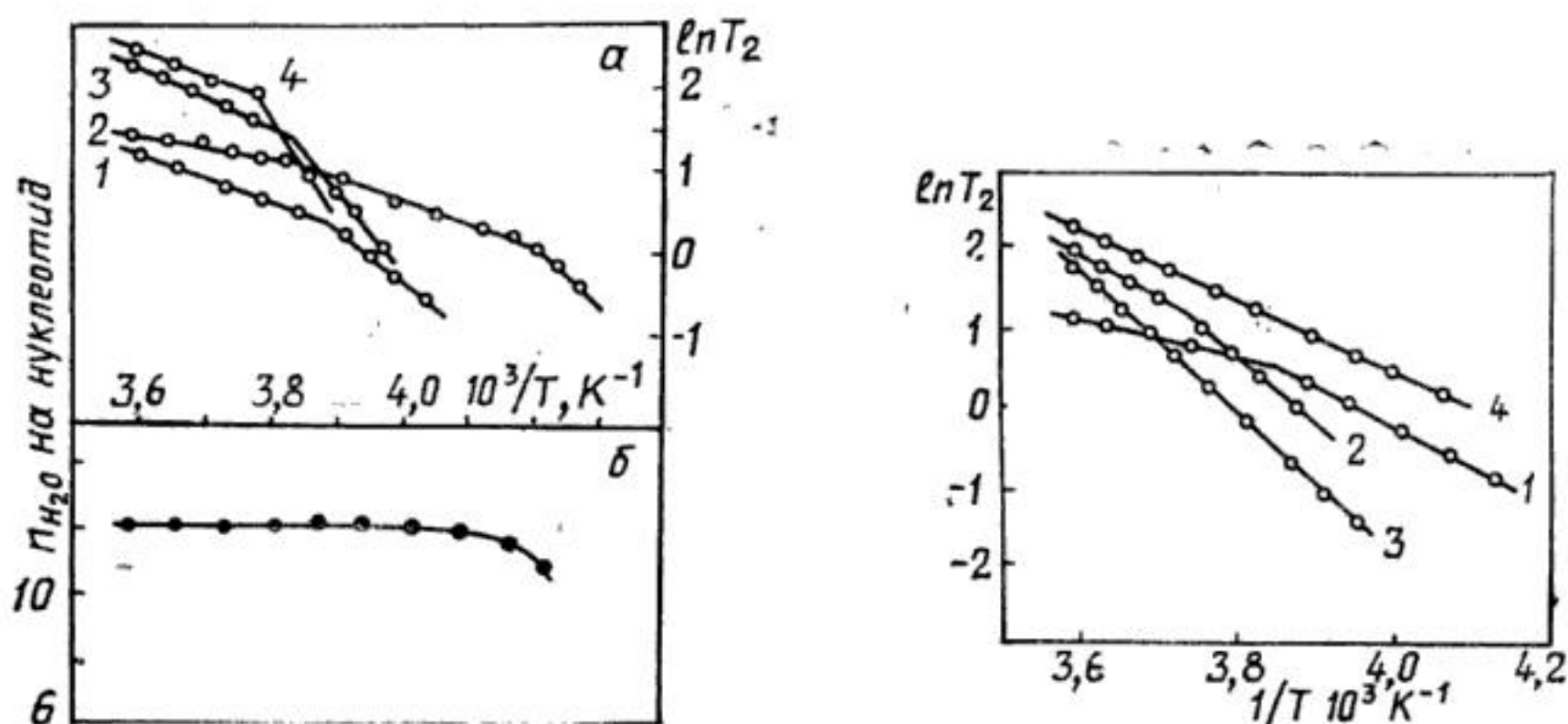


Рис. 1. Зависимость $\ln T_2$ от обратной температуры для протонов связанной с ДНК воды (а) и зависимость содержания незамерзшей связанной с ДНК воды от обратной температуры ($1/T$) (б). Препараты ДНК насыщены водой в атмосфере воздуха при различных значениях о. в.: (1 — 81 %, 2 — 86 %, 3 — 93 %, 4 — 100 % (а), 86 % (б))

Рис. 2. Зависимость $\ln T_2$ от обратной температуры для протонов воды в системе ДНК-связанная вода-ксенон (давление ксенона 1 МПа) при различных о. в.: 1 — 81 %, 2 — 86 %, 3 — 93 %, 4 — 100 %

отчетливо видны изломы, которые характеризуют резкое уменьшение подвижности водных протонов с понижением температуры и не связаны с замерзанием воды. Образование льда в данных препаратах ДНК с о. в. ~ 86 % не происходит вплоть до 234 К. Указанные выше перегибы в зависимостях $\ln T_2$ от $1/T$ связываются в литературе с конформационными перестройками в структуре гидратной поверхности ДНК и самой молекулы биополимера [3,5].

Увеличение исходной влажности препаратов ДНК приводило к повышению температуры наблюдаемого перехода (рис. 1, кривые 3, 4), а при высоком содержании воды — и к совпадению ее величины с температурой фазового перехода вода-лед.

При обработке ксеноном этих же препаратов ДНК наблюдались характерные изменения положения точек перегибов в зависимостях $\ln T_2$ от $1/T$ (рис. 2). Из рисунка видно, что излом указанной зависимости в области 258—266 К в присутствии ксенона сдвигается в область повышения температур либо совсем исчезает при повышении исходной влажности препаратов. Представленные на этом рисунке данные свидетельствуют также о том, что ксенон начинает изменять гидратную оболочку ДНК при о. в. ≥ 86 %. При о. в. ≥ 93 % большинство молекул воды переходит в твердую фазу клатратов ксенона уже при 270—281 К; в результате этого при температурах менее 273 К отсутствует переход без вымерзания воды. По-видимому, процесс клатратообразования аналогичен структурному переходу, связанному с вымерзанием воды в системе ДНК-связанная вода в отсутствие данного газа при более низких температурах.

На рис. 3 представлена зависимость количества образующихся клатратов ксенона от исходной влажности образцов ДНК, которая указывает на особый характер связывания водных молекул в матрице двойной спирали ДНК. При малом содержании воды в препаратах ДНК (8—9 молекул H_2O на нуклеотид) водные молекулы достаточно жестко соединены с сахарофосфатным остовом и азотистыми основаниями, и ксенон не может конкурировать с молекулами воды при постройке клатратных ячеек. При влажности препаратов свыше 11—12 молекул H_2O на нуклеотид (когда начинает появляться второй и последующий монослой водных молекул) происходит набухание матрицы ДНК и появление более слабосвязанных молекул воды. В этих условиях оказывается возможным образование структур клатратоподобного типа в связи с вероятным стабилизирующим влиянием азотистых оснований на структуру воды. Известно, что клатратные структуры с большим количеством содержащихся в них водных молекул образуются

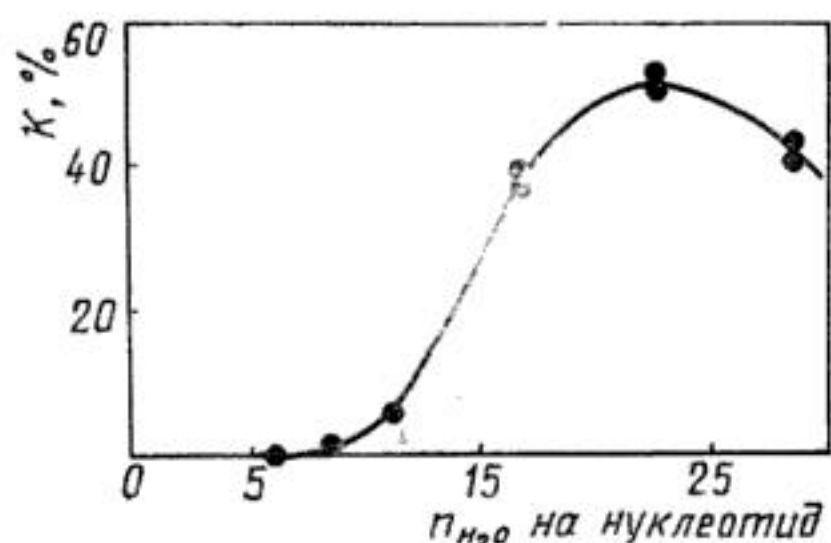


Рис. 3. Зависимость количества образующихся клатратов ксенона от исходного содержания воды в препаратах ДНК при температуре 280 К и давления газа 1 МПа

такими гидрофобными веществами, как благородные газы, метан, хлор и другие [1,6]. Однако по такому же клатратному типу связывают воду (но только в меньшем количестве) вещества, молекулы которых выступают донорами и акцепторами водородных связей. Соединения, содержащие аминогруппы, могут образовывать водные клатраты не только помещением своих молекул (или отдельных участков) в полости клатратной решетки воды, но также встраиванием групп NH непосредственно в структуру самой решетки [1,2,6]. По-видимому, в условиях нашего эксперимента имеет место взаим-

ный стабилизирующий эффект влияния азотистых оснований ДНК и молекул гидрофобного газа в постройке клатратной решетки воды. Количество клатратных структур увеличивается, пока основания ДНК оказывают влияние на имеющуюся в системе воду. Это подтверждается экспериментом, поскольку эффект стабилизации снижается (количество клатратов уменьшается) при больших влажностях ДНК (~ 30 молекул H_2O на нуклеотид), так как молекулы внешних монослоев воды испытывают слабое влияние азотистых оснований ДНК.

Таким образом, результаты работы свидетельствуют, что под давлением ксенона 1 МПа при температурах более 273 К в препаратах ДНК с о. в. $\geq 86\%$ происходит образование клатратных структур из молекул этого газа и воды, количество и стабильность которых возрастает при понижении температуры. По-видимому, полинуклеотидная матрица ДНК участвует в стабилизации клатратов ксенона. В присутствии ксенона в препаратах ДНК с о. в. $\geq 98\%$ устраняется структурный конформационный переход в области температур 258—268 К, связанный с резким изменением подвижности молекул и наблюдаемый в образцах в отсутствие газа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бык С. Ш., Макогон Ю. Ф., Фомина В. И. Газовые гидраты.— М.: Химия, 1980.— 296 с.
2. Дядин Ю. А., Кузнецов П. Н., Яковлев И. И. Диаграмма состояния системы вода-диэтиламин в области кристаллизации при давлениях до 3000 бар // Докл. АН СССР.— Сер. Химия.— 1972.— 203, № 4.— С. 825—828.
3. Новиков И. А., Рыжов В. Г., Волков В. Я. Исследование системы ДНК-связанная вода в области отрицательных температур методом ЯМР-релаксации // Материалы V совещ. по конформационным изменениям биополимеров в растворах.— Тбилиси: Телави, 1980.— С. 47.

4. Родин В. В. Образование клатратов ксенона и состояние воды в бактериальных суспензиях по данным метода ЯМР: Автореф. дисс... канд. физ.-мат. наук.— Пушкино: Ин-т биол. физики АН СССР, 1985.— 17 с.
5. Сухоруков Б. И., Новиков И. А. Исследование температурных структурных переходов в системе ДНК-связанная вода методом спинового зонда // Пушкино.— 1981.— 37 с.— Рук. депон. в ВИНТИ.— № 3361—81.
6. Jeffrey G. A. Water Structure in Organic Hydrates // Accounts Chem. Res.— 1969.—2, N 11.— P. 344—352.

ВНИИ прикладной микробиологии,
Оболensk, Моск. обл.

Поступила 05.05.87

V. V. RODIN, I. A. NOVIKOV, V. YA. VOLKOV

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF XENON ON THE DNA — BOUND WATER SYSTEM USING THE METHOD OF NMR

All-Union Research Institute of Applied Microbiology, Obolensk, Moscow Region

The effect of inert gas xenon on the character of changes in the DNA hydration shell has been studied at sub-zero temperatures in a range of relative humidity of 80 to 100 %.

УДК 616.832.9:713(083.3)

Н. З. Спиридонова, М. М. Медведев

НЕЛИНЕЙНАЯ МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ НА БИОТКАНИ

Представлен интегральный подход к описанию теплофизических аспектов процесса замораживания живой ткани, базирующийся на принципе Гюйгенса. Приведены результаты и алгоритмы обработки экспериментальных и клинических данных в рамках этого подхода. Предложен метод прогноза размеров зоны и времени замораживания.

При криохирургическом воздействии в тканях организма имеют место явления весьма различного характера: от физических, тепловых до биологических, проявляющихся в изменении жизнедеятельности тканей. Математическому, количественному анализу в настоящее время поддаются лишь явления первого типа, а именно тепловые процессы, вызванные криовоздействием. Цель такого анализа состоит в том, чтобы количественно описать эти процессы и сформировать правила их прогноза. Значительная работа в этом направлении уже проделана [1—8]. В результате предложен подход к описанию процессов в тканях при замораживании на основе физической теории теплопроводности, исходя из дифференциальных теплофизических характеристик ткани, таких как теплопроводность, тепловыделение за счет метаболизма, теплоперенос кровотоком, а также изменения их при замораживании.

В настоящей работе указанные явления рассматриваются интегрально, отправляясь от регистрируемых в эксперименте, а также в условиях клиники, температуры в различных тканях при замораживании и размеров зоны замораживания. В основу положена теория теплопроводности с привлечением принципа Гюйгенса. Такой подход является дополнительным к общепринятому, его результаты — также.

Математическое описание процесса замораживания. Предположим, что процесс распространения холода от криоинструмента к рассматриваемой точке ткани подчиняется известному из оптики принципу Гюйгенса [9]. Согласно ему каждая точка ткани, захваченная процессом, становится новым источником этого же процесса, причем из каждой точки процесс распространяется сферически. Принятие этого принципа позволяет вычислить форму изотермических поверхностей для любого заданного расстояния x от криоинструмента как огибающую всех сфер радиуса x с центром

в точках рабочей поверхности криоинструмента. Для точек определенных таким образом поверхностей изменение температуры ткани зависит лишь от координаты x и времени t , то есть является одномерным.

Искомая формула может быть получена из характерного вида зависимости температуры T замораживаемой ткани от времени t (рис. 1):

$$T = \alpha \{1 - \exp [(\tau - t)/t_1]\} + \beta [(\tau - t)/t_1] \exp [(\tau - t)/t_1], \quad (1)$$

$$T = (T - T_0)/T_0, \quad t_1 = (1/c) \left(\int dx/S \right) (S^2/S_x), \quad \alpha = a \int dx/S.$$

Здесь T_0 — начальная температура ткани; a , α , β , t_1 — постоянные, характеризующие процесс; τ — запаздывание его начала; c — коэффициент термодиффузии; S , S_x и интеграл $\int dx/S$ — площадь изотермы на расстоянии x от криоинструмента, ее производная по координате и интеграл. Эту формулу

можно вывести и теоретически.

Составляющая $\alpha \{1 - \exp [(\tau - t)/t_1]\}$ формулы (1) описывает монотонное убывание T со скоростью, пропорциональной α , и характерный «перегиб» при $t \sim 2t_1$ с последующим выходом на установившееся значение. Составляющая при β — уточняющая, призванная описать возможные отклонения реальной зависимости от экспоненциальной.

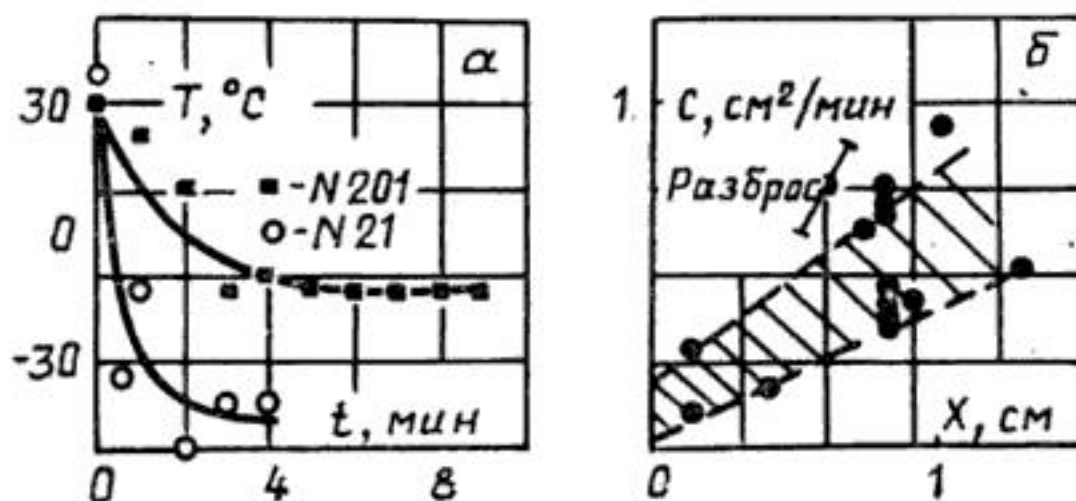


Рис. 1. Аппроксимация изменения температуры ткани при замораживании (а); оценка коэффициента термодиффузии (б). Здесь и в табл. «N» означает номер (код) данных (экспериментальных или клинических)

ной в окрестности «перегиба». Непосредственным дифференцированием проверяется, что решение (1) удовлетворяет неоднородному уравнению теплопроводности, известному под названием уравнения Перла [6].

Прогноз зоны замораживания. Цель прогноза зоны замораживания состоит в том, чтобы по характеристике криоинструмента и особенностям живой ткани оценить координату x заданной изотермы T_f и минимальное время криовоздействия, гарантирующее достижение в ткани, охваченной этой изотермой, установившихся значений температуры.

Прогноз строится следующим образом:

— по заданным характеристикам криоинструмента, а именно площади S и геометрии рабочей поверхности, ее температуры и начальной температуры ткани T_0 , считая рабочую поверхность изотермой T , рассчитывается параметр a , входящий в коэффициент α формулы (1):

$$a = (T - T_0)/(T_0 \int dx/S);$$

— по заданной конечной температуре T_f находится ее координата x как решение уравнения

$$(T_f - T_0)/T_0 = \alpha \int dx/S_f,$$

где S_f — площадь поверхности изотермы T_f ;

— по заданному параметру c , определяемому характером ткани, оценивается минимальная длительность криовоздействия $t_f \geq 2t$, где t_1 рассчитывается с площадью изотермы T_f .

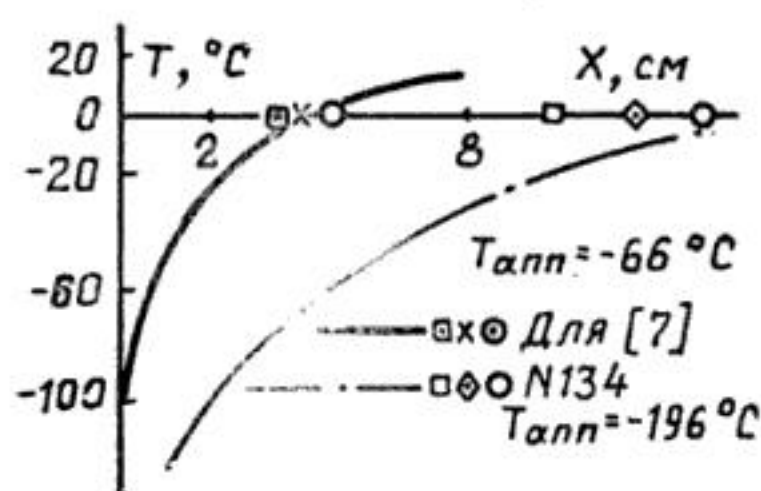


Рис. 2. Сопоставление фактического (пересечение кривой с осью x) и прогнозного (метки) положений изотермы 0°C ($T_{\text{анн}}$ — температура криоинструмента)

Площадь S , производная S_x и интеграл $\int dx/S$ могут быть вычислены аналитически или численно или табулированы для основных видов криоинструмента.

Пример прогноза. На рис. 2 представлена взятая из [7] зависимость координаты x изотермы ткани, подвергшейся воздействию криоинструмента с полусферической рабочей частью радиуса 0,236 см с характерной температурой — 65,88 °С и начальной температурой ткани 37 °С. Для этого воздействия выполнен прогноз координаты изотермы $T_f = 0$ °С следующим образом: для полусферического криоинструмента $S = 2\pi (r + x)^2$, $\int dx/S = 1/[2\pi (r + x)]$.

Поэтому $a = (-65,88 - 37) 2\pi (0,236/37) = -4,123$ и $x = [-a/(2\pi)] - 0,236 = 0,42$ см. Расчет времени при $S_x = 4\pi (r + x)$ для $c = 0,2 - 0,9$ см²/мин дает $t_f \geq 2t_1 = 2,14 - 0,48$ мин, что не противоречит указанному в [7]. Следует отметить, что такой прогноз может быть сделан, отправляясь от любой изотермической поверхности. Соответствующие результаты приведены на рис. 2 (прогноз, реализуемый с учетом поверхности криоинструмента, отмечен указанием его температуры).

Сводная таблица оценки коэффициента термодиффузии

N	x, см	c, см ² /мин	σ, °С
Клиника			
11	0,5	0,46	1,9
12	0,5	0,7	1,4
14	0,5	0,45	3,9
15	0,5	0,89	6,3
21	0,5	1,19	9,1
22	0,5	0,81	6,2
23	0,5	1,47	3,7
Эксперимент			
111	0,75	0,5	0,73
112	1,0	0,95	12,9
113	0,25	0,32	11,2
131	0,4	1,13	7,4
132	0,9	0,33	10,5
133	1,4	0,4	7,0
134	0,25	0,25	16,5
201	0,8	0,35	4,8
202	0,8	0,55	6,1
211	0,8	0,55	3,1
221	0,8	0,31	4,1
212	0,8	0,57	2,5
222	0,8	0,3	4,0
213	0,8	0,57	1,6
223	0,8	0,33	4,5

Описание данных и результат их обработки. Обработывались данные, полученные при клиническом лечении гемангиом и при экспериментальном исследовании на животных (собаках) процесса замораживания костной ткани. Осуществлялась аппроксимация по формуле (1) наблюдаемых зависимостей изменения температуры ткани, то есть определялись коэффициенты формулы (1) и через них — параметр c . Примеры аппроксимации представлены на рис. 1. Результаты обработки показаний термопар сведены в таблицу. Качество аппроксимации оценивалось величиной среднеквадратичного отклонения σ , рассчитанной по формуле (1) температуры от измеренной. Из рис. 1 и табл. следует, что величина σ меньше для зависимостей, содержащих длительный участок установившейся температуры ткани, и больше — когда такого участка нет. Это значит, что формула (1) правильно отражает результат процесса и хуже — процесс изменения температуры, что совершенно естественно ввиду его сложности. Поскольку на

оценку параметра c существенно влияет погрешность δ измерения расстояния термопары от поверхности криоинструмента ($\delta \simeq 0,1$ см), величина c для каждого измерения температуры оценивалась 3 раза: для x , $x \pm \delta$. Результаты оценки параметра c для костной ткани приведены на рис. 1.

Величина c сильно варьирует для гемангиом: среднее значение 0,893, среднее квадратическое отклонение 0,379 см²/мин. Для костной ткани величина c имеет тенденцию к уменьшению с уменьшением x и, следовательно, установившейся температуры. Среднее значение меняется от 0,445 до 0,15 см²/мин для x от 1,4 до 0 см, среднеквадратическое отклонение — от 0,113 до 0,08 см²/мин для x от 0,8 до 0,125 см. Оценки c для костной ткани близки к оценке c , сделанной по известным теплофизическим характеристикам ткани *in vivo*, 0,15—0,445 против 0,3 см²/мин, а для гемангиом — превышают ее. Изменение c с изменением расстояния от криоинструмента и тем-

пературы ткани, а также его большая величина (особенно для гемангиом), превышающая ожидаемое по теплофизическим измерениям *in vitro* ($0,2 \text{ см}^2/\text{мин}$ [3,6]), могут быть объяснены влиянием кровотока и активной терморегуляцией живой ткани. Пока кровоток не остановлен замораживанием, он одновременно выполняет две функции: теплопритока и отвода холода, последним увеличивая эффективную теплопроводность ткани и, как следствие, величину термодиффузии s . Аналогично действует и активная терморегуляция. При обработке показаний термопар осуществлялся прогноз изотермы 0°C (результаты — на рис. 2). Как и прогноз, описанный в примере, его можно квалифицировать как удовлетворительный. В целом прогноз по описанному методу дает заниженный размер зоны.

Из представленных результатов можно заключить, что процесс замораживания биотканей в основном удовлетворяет представлениям теории теплопроводности, к нему применим принцип Гюйгенса. Значения коэффициента термодиффузии либо близки к получаемым в специальных теплофизических измерениях, либо могут быть непротиворечиво объяснены. Его величина для ангиом более чем в два раза выше, чем для кости, что может быть обусловлено различием в содержании воды и кровоснабжении. Предложенный метод более пригоден для описания и прогноза замораживания костной ткани, поскольку ее теплопроводность слабо зависит от температуры. Метод прогноза позволяет оценить размер зоны замораживания и минимальное время замораживания с удовлетворительной точностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микулин Е. И., Резницкий В. Т., Шафранов В. В. Теоретическое исследование тепловой задачи локального замораживания биотканей // *Электронная промышленность*. — 1982. — № 8. — С. 75—79.
 2. Антонов А. Н., Микулин Е. И. Математическое моделирование процесса криовоздействия на биологическую ткань // *Тр. МВТУ*. — 1982. — Вып. 5. — № 381. — С. 3—9.
 3. Дульнев Г. Н., Заричняк Ю. П., Муратова Б. П. Теплопроводность твердых пористых увлажненных материалов // *ИФЖ*. — 1976. — 31, № 2. — С. 278—283.
 4. Войтенко А. И. Температурные профили зоны замораживания в криохиргии. — Киев, 1986. — С. 12—26. — (Препринт/АН УССР. ИФ; № 12).
 5. Дель-Джудиче, Комини Дж. Тепловые аспекты криохиргии // *Тр. Амер. общ. инж.-мех. Сер. Теплопередача*, № 4. — 1976. — С. 8—16.
 6. Купер Т., Трезек Ж. Зонд для определения теплопроводности биологической ткани // *Тр. Амер. общ. инж.-мех. Сер. Теплопередача*, № 2. — 1972. — С. 5—14.
 7. Заппи Е., Шульман С. Криоиммунология: хирургический подход и тепловой режим при замораживании элементов системы размножения кролика-самца // *Тр. Амер. общ. инж.-мех. Сер. Теплопередача*, № 2. — 1972. — С. 1—4.
 8. Рубинский Б., Штиф А. Исследование задачи Стефана для биологической ткани вокруг криохиргического зонда // *Тр. Амер. общ. инж.-мех. Сер. Теплопередача*, № 3. — 1976. — С. 187—192.
 9. Детлаф А. А., Яворский Б. М. Справочник по физике. — М.: 1963. — С. 551—552.
- МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, г. Москва, Поступила 12.05.88
ЦАГИ им. Н. Е. Жуковского, г. Москва

N. S. SPIRIDONOVA, M. M. MEDVEDEV

A NON-LINEAR MATHEMATICAL MODEL OF THE FREEZING EFFECT ON BIOLOGICAL TISSUES

Research Clinical Institute of Moscow Region

An integral approach to description of thermophysical aspects of freezing of biological tissues according to Huygen's principle has been presented. The results and algorithms of experimental and clinical data processing are considered. A method for prediction of freezing time and area size has been suggested.

А. Д. Курбатов, С. В. Косьяненко

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИСКУССТВЕННОГО ОСЕМЕНЕНИЯ УТОК КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМОЙ

Изучали влияние среды-разбавителя, концентрации криопротектора диметилацетамида, частоты осеменения и дозы криоконсервированной спермы на результаты искусственного осеменения уток пекинской породы. Установлено, что для получения оплодотворенности яиц 90—94 % сперму селезней необходимо разбавлять средой «Ю» в соотношении 1 : 4, перед замораживанием добавлять 5 % диметилацетамида, осеменять уток 2 раза в неделю дозой криоконсервированной спермы 0,15—0,2 мл.

Изучение проблемы криоконсервации спермы птиц позволило решить многие практические задачи селекционной работы. В частности, разработанные методы криоконсервации спермы петухов и гусakov позволяют сохранять ее высокую оплодотворяющую способность (80—95 %). Однако методы замораживания спермы селезней еще слабо разработаны. Так, при осеменении уток кросса Х—II криоконсервированной спермой оплодотворенность яиц равнялась лишь 23,8—30,0 %, хотя выводимость яиц была довольно высокой (80,0—91,6 %) [1]. В аналогичных опытах на мускусных утках оплодотворенность яиц тоже была невысокой — 23,7 % [4]. Лишь в работе [3] были получены более высокие результаты оплодотворенности яиц при осеменении уток криоконсервированной спермой пекинских селезней (62,5 %), оплодотворенность же яиц от использования спермы мускусных селезней была низкой (18,7 %). В обоих случаях отмечены высокая подвижность замороженно-оттаянной спермы (50—70 %) и выводимость яиц (83,3—86,6 %).

Опыты проводились в экспериментальном хозяйстве Белорусской зональной опытной станции по птицеводству на утках и селезнях кросса «Темп» пекинской породы. Селезней содержали индивидуально в двухъярусной клеточной батарее, уток — в селекционных гнездах на подстилке. Сперму получали методом массажа 4—5 раз в неделю. Разбавляли сперму в соотношении 1 : 4, замораживание и оттаивание ее проводили по способу, разработанному в лаборатории искусственного осеменения птиц Всесоюзного НИИ разведения и генетики сельскохозяйственных животных [2].

Последовательность процедур была следующая: сперму разливали в пенициллиновые флаконы по 0,5 мл, сюда же добавляли 0,5 мл среды ЛКС — 1 (1,92 г глутамата натрия, 0,8 г фруктозы, 0,032 г протаминсульфата и 0,5 г уксуснокислого калия безводного). Флаконы с разбавленной спермой в закрытом виде помещали в холодильник на 40—60 мин при температуре 2—8 °С. После этого охлажденной микропипеткой доливали 0,08 мл охлажденного *N*, *N*-диметилацетамида (ДМА). Флаконы осторожно встряхивали и помещали в криостат, предварительно охлажденный до —80 °С. Перемешивание спермы с криопротектором, наслаивание ее на внутренние стенки флаконов и следующий этап охлаждения проводили в камере криостата при температуре от —60 до —80 °С путем вращения держателя с флаконами в течение 4 мин со скоростью 12—13 об/мин. Затем флаконы с содержимым помещали в жидкий азот. Скорость снижения температуры от 2—8 °С до —6 °С — 2,5—3 °С/мин, а от —6 до —196 °С — 900—1000 °С/мин.

Оттаивание проводили в 2 этапа: на первом этапе из флаконов сливали жидкий азот и выдерживали в течение 30—40 с при комнатной температуре. Скорость повышения температуры при этом 90—720 °С/мин. На втором этапе флаконы со спермой погружали на 7—10 с в водяную баню при темпе-

ратуре 60—70 °С. Скорость повышения температуры при этом равнялась 950—1200 °С/мин. Изучали влияние следующих факторов на результаты искусственного осеменения уток криоконсервированной спермой: среды-разбавителя, концентрации ДМА, дозы введения спермы и частоты осеменения уток. При изучении влияния различных сред были испытаны следующие: ЛКС-1, «Ю», ВИРГЖ-3.

Таблица 1

Активность и оплодотворяющая способность спермы селезней после криоконсервации ее в различных средах

Группа опыта	Среда	Активность спермы (баллы)		Число яиц, заложенных на инкубацию	Оплодотворенность яиц, %	Вывод утят, %
		после взятия	после оттаивания			
1	Осеменение цельной спермой (контроль)	8,6	—	243	93,8	69,1
2	ЛКС-1	8,5	4,6	241	91,3	58,5*
3	«Ю»	8,5	4,8	245	93,1	71,4
4	ВИРГЖ-3	8,5	4,0	226	86,7**	56,2**

Примечание. * $P > 0,95$, ** $P > 0,99$.

рольной — 93,8 %). Вывод утят был выше, чем в контроле, на 2,3 % и составил 71,4 %. Осеменение уток спермой, консервированной в присутствии сред ЛКС-1 и ВИРГЖ-3 дало результаты вывода утят более низкие, чем в контроле. В этом же опыте изучалась продолжительность снесения утками оплодотворенных яиц после последнего осеменения. Высокий уровень оплодотворенности яиц в контрольной группе (87,5—100%) сохранялся в течение 7 дней после осеменения. Из опытных групп хорошая оплодотворенность яиц уток в третьей группе наблюдалась в течение 7 дней, во второй группе — в течение 5 дней и в четвертой группе еще более короткое время — 4 дня.

В данном опыте изучали оплодотворенность яиц после многократного осеменения уток спермой, консервированной с различными средами, в последующем опыте было проведено лишь однократное осеменение спермой, замороженной только со средой «Ю». Результаты этого опыта показали, что высокая оплодотворенность наблюдалась только на 2-й и 3-й дни после осеменения, а с 12-го дня уже все яйца были неоплодотворенными. Эти данные дают основание считать, что однократное осеменение не обеспечивает создание значительного запаса спермиев в половых путях самок, который бы давал возможность получения оплодотворенных яиц в течение длительного времени.

Изучение влияния различных концентраций криопротекторов ДМА было проведено при добавлении его в среду «Ю». Осеменяли уток 2 раза

Уток контрольной и опытных групп осеменяли 2 раза в неделю, доза осеменения первых — 0,05 мл свежей неразбавленной спермы, а вторых — 0,2 мл разбавленной 1 : 4 консервированной спермы. Материалы этого опыта, представленные в табл. 1, показывают, что лучшей активностью после оттаивания обладает сперма, разбавленная в среде «Ю», с которой также получены лучшие показатели оплодотворенности яиц и вывода утят. Оплодотворенность яиц в этой группе была на одном уровне с контрольной и равнялась 93,1 % (в контрольной — 93,8 %).

и равнялась 93,1 % (в контрольной — 93,8 %).

Таблица 2

Влияние различных концентраций ДМА в среде «Ю» на оплодотворяющую способность криоконсервированной спермы селезней

Группа опыта	Концентрация ДМА, %	Заложено яиц на инкубацию, шт.	Оплодотворенность яиц, %	Вывод утят, %	Выводимость яиц, %
1	Контроль	172	93,6	78,5	83,8
2	4	162	86,4*	64,8**	75,0
3	5	181	94,5	78,4	83,0
4	6	167	92,8	76,6	82,6
5	7	186	92,5	74,7	80,8

Примечание. * $P > 0,95$, ** $P > 0,99$

в неделю. Результаты опыта представлены в табл. 2. Их анализ показывает, что лучшее сохранение оплодотворяющей способности было при замораживании спермы с 5 %-ным ДМА; оплодотворенность яиц равнялась 94,5 %, а вывод утят 78,4 %. В контроле аналогичные показатели были почти на таком же уровне: 93,6 и 78,5 % соответственно.

Увеличение концентрации ДМА в среде до 6 и 7 % не улучшило показатели качества криоконсервированной спермы, а уменьшение количества ДМА до 4 % резко снизило их.

При изучении влияния различных доз, взятых для одного осеменения, консервировали сперму со средой «Ю» и 5 %-ным ДМА, осеменяли уток 2 раза в неделю. Материалы опытов, представленные в табл. 3, свидетель-

Таблица 3

Влияние различных доз криоконсервированной спермы на инкубационные качества яиц уток

Группа опыта	Доза осеменения, мл	Заложено яиц на инкубацию, шт.	Оплодотворенность яиц, %	Вывод утят, %	Выводимость яиц, %
1 (контроль)	0,1	150	93,0	74,7	80,0
2	0,1	145	84,1*	71,0	84,4
3	0,15	153	92,2	75,8	82,3
4	0,2	136	94,1	79,4	84,4
5	0,4	148	79,0***	65,5	82,9

Примечание. * $P > 0,95$, *** $P > 0,999$.

Таблица 4

Влияние частоты осеменения уток криоконсервированной спермой на инкубационные качества яиц

Группа опыта	Частота осеменения уток	Заложено яиц на инкубацию, шт.	Оплодотворенность яиц, %	Вывод утят, %	Выводимость яиц, %
1 (контроль)	2 в нед.	232	93,1	75,0	80,5
2	1 в 3 дня	245	93,9	77,1	82,2
3	1 в 4 дня	236	92,8	71,6	77,2
4	1 в 5 дней	251	78,5***	62,9**	80,2
5	1 в 6 дней	209	74,6***	59,3***	79,5
6	1 в 7 дней	240	69,6***	54,2***	77,8
7	2 в нед.	248	90,7	71,0	78,2

Примечание. * $P > 0,99$, *** $P > 0,999$.

ствуют о том, что лучшая оплодотворенность яиц и вывод утят отмечались при осеменении уток дозой 0,15—0,2 мл спермы. Несколько ниже были инкубационные качества яиц, когда для осеменения брали 0,1 мл спермы. Увеличение дозы до 0,4 мл при осеменении 1 раз в неделю дает оплодотворенность яиц на 15,1 % ($P > 0,999$) меньше, чем при двухразовом осеменении в неделю дозой спермы 0,2 мл.

При изучении влияния частоты осеменения уток криоконсервированной спермой на инкубационные качества яиц контрольную группу уток осеменяли 0,1 мл спермы, разбавленной средой «Ю», а опытные группы — криоконсервированной спермой дозой 0,2 мл. Лучшие результаты были получены при осеменении уток 1 раз в 3 и 4 дня, а также 2 раза в неделю (табл. 4). Увеличение интервала между осеменениями приводило к снижению оплодотворенности яиц. Так, с увеличением кратности осеменения до 5, 6 и 7 дней увеличивалась разница между этими группами и контролем соответственно на 14,6 ; 18,5; 23,5 % при $P > 0,999$ для всех показателей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев В. И., Сахацкий Н. И. Консервация спермы селезней // Птицеводство. — 1979. — № 1. — С. 31.
2. Курбатов А. Д., Нарубина Л. Е., Бубляева Г. Б., Целютин К. В. Замораживание спермы петухов // Птицеводство. — 1984. — № 11. — С. 28—29.
3. Tai J. J. L., Tai C., Su Y. M. et al. Studies on the cryopreservation of drake semen // Proceedings the Fifth World Conference on Animal Production. — Tokyo, 1983. — 2. — P. 183—184.

4. Watanabe M., Matsumoto Y., Takeshita N., Terada T. Fertility of myscovy semen frozen for about three years // J. Fac. Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ.— 1981.— 20.— N 2.— P. 81—85.

ВНИИ разведения и генетики
сельскохозяйственных животных,
г. Ленинград-Пушкин,

Поступила 25.11.86

Белорусская зональная опытная
станция по птицеводству, Заславль,
Минск. обл.

A. D. KURBATOV, S. V. KOSYANENKO

THE EFFECT OF DIFFERENT FACTORS ON THE RESULTS OF ARTIFICIAL INSEMINATION OF DUCKS WITH CRYOPRESERVED SEMEN

*Research Institute For Breeding and Genetics of Farm Animals, Leningrad-Pushkin;
Belorussian Experimental Station For Poultry Raising, Zaslavl of Minsk Region*

The effects of diluents, cryoprotectant (dimethyl acetamide) concentrations, insemination rate and dose of cryopreserved semen on the results of artificial insemination of Pekin ducks were studied. The fertility of 90 to 94 % was achieved after insemination twice a week with 0.15 to 0.2 ml frozen — thwed semen diluted 1 : 4 with the U -extender in the presence of 5 % DMA added before freezing.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043:612.119.015.3

Г. С. Лобынцева, Т. П. Бондаренко, И. А. Вотякова

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ

В последнее время в качестве источника стволовых кроветворных клеток стали использовать гемопоэтические клетки эмбриональной печени для терапии депрессий кроветворения различного генеза, лучевых поражений, а также тяжелой комбинированной иммунологической недостаточности [2]. Целью данного исследования явилось изучение перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гемопоэтических клетках эмбриональной печени человека после приготовления клеточной суспензии, обработки ее криопротектором и замораживания-оттаивания.

Гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека выделяли из 6—12-недельных эмбрионов, полученных во время операции прерывания беременности [2]. Во всех вариантах опытов конечная концентрация клеток в суспензии составляла $2,5 \cdot 10^7$ в мл. Замораживание осуществляли по методу [2]. Уровень перекисного окисления определяли по накоплению конечного продукта перекисного окисления — малонового диальдегида (МДА) за 15 мин инкубации при 37 °С по методу, описанному в [1].

На рис. а представлены данные по уровню собственного перекисного окисления липидов в клетках эмбриональной печени различных сроков беременности (6—12 нед) после их получения, обработки криопротектором и замораживания-оттаивания. Видно (кривая 1), что уровень собственного ПОЛ зависит от возраста эмбриона, из которого получены клетки. Так, в клетках эмбриональной печени 6-недельных эмбрионов накопление МДА примерно в 5 раз ниже, чем у клеток, полученных из 10—12-недельных эмбрионов. Достоверных различий между 10- и 12-недельными эмбрионами не наблюдалось.

Обработка клеток 0,7 моль/л раствором ДМСО и инкубация с ним в течение 30 мин до замораживания приводит к некоторому повышению уровня ПОЛ, однако эти различия не являются достоверными по отношению к нативным клеткам (кривая 2,

рис. а). Замораживание-оттаивание сопровождается повышением уровня МДА. В гепатоцитах, полученных от 6-недельных эмбрионов, уровень МДА возрастает примерно в 3 раза, а в клетках более поздних эмбрионов эти изменения не столь значимы (кривая 3, рис. а). Можно предположить, что на более поздних стадиях эмбриогенеза в печени происходит интенсивное формирование антиоксидантных систем защиты клеток.

При изучении стимулированного ПОЛ (добавление 1 ммоль/л аскорбата) также обнаружена зависимость от возраста эмбриона (рис. б). Однако следует отметить, что на добавление стимулятора клетки эмбриональной печени «отвечают» слабее, чем, например, изолированные митохондрии [3]. Уровень накопления МДА у клеток печени 10—12-недельных эмбрионов значительно выше по сравнению с 6-недельными при стимуляции ПОЛ аскорбатом. При сравнении этих данных с данными, представленными на рис. а, можно сделать вывод, что в первом случае, возможно, имели место латентные повреждения липидного компонента, которые реализуются при добавлении активатора (1 ммоль/л аскорбата).

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень ПОЛ в клетках эмбриональной печени человека зависит от сроков развития эмбрионов, условий обработки клеток, однако конкретные механизмы развития и ограничения этого процесса неясны и требуют дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 172 с.
2. Грищенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Шерешков С. И. Гемопозитивские клетки эмбриональной печени. — Киев: Наук. думка, 1988. — 190 с.
3. Бондаренко В. А. Перекисное окисление липидов в мембранах митохондрий под влиянием низких температур: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1977. — 24 с.

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

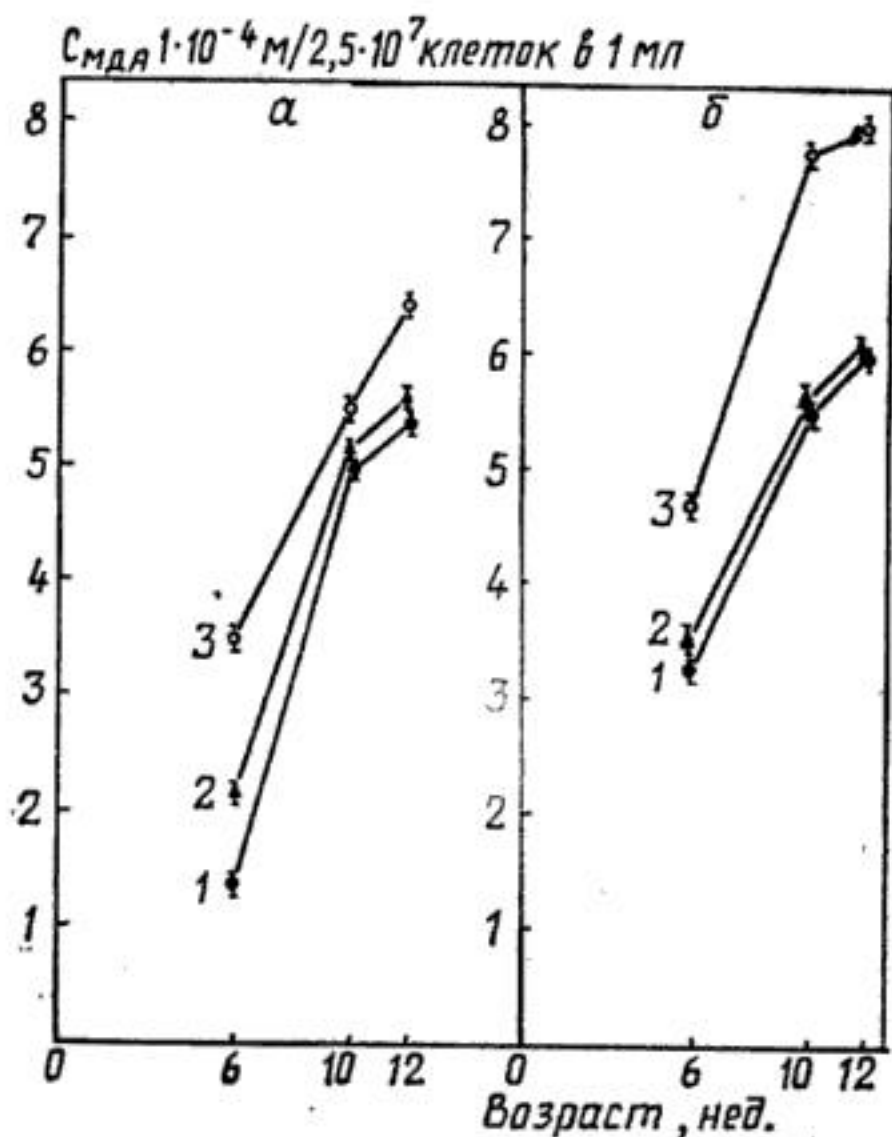
Поступило 26.04.89

УДК 57.043:612.111

Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА РАЗВИТИЕ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО ХОЛОДОВОГО ШОКА ЭРИТРОЦИТОВ

Холодовый шок эритроцитов развивается при сочетанном действии охлаждения и повышенной осмолярности среды. Указанный феномен рассматривается как процесс, связанный с начальным этапом формирования каналов утечки для ионов калия и изменением структуры белкового скелета мембраны [1]. В конечной фазе охлаждения происходит увеличение размера дефектов, уравниваются небольшие молекулы, клетки набухают по коллоидно-осмотическому механизму и лизируют [1].



Уровень собственного (а) и стимулированного (1 ммоль/л аскорбата) (б) перекисного окисления липидов в клетках эмбриональной печени человека различных сроков развития: 1 — нативные клетки; 2 — обработанные 0,7 моль/л ДМСО; 3 — после замораживания-оттаивания

Учитывая чрезвычайно важное значение кальция в жизнедеятельности клетки, а также роль этого катиона как вторичного посредника, обеспечивающего регуляцию внутриклеточных функций при действии на клетку различных внешних воздействий [2], в данной работе исследовалась роль Ca^{2+} как возможного фактора, способного модифицировать развитие холодового шока эритроцитов.

Эритроциты донорской крови II-й группы со сроком хранения не более 3 сут трижды отмывали раствором, содержащим 0,15 М NaCl, 0,005 М фосфатный буфер, pH 7,4 (в экспериментах с ЭГТА использовали 0,01 М трис-HCl буфер, pH 7,4).

Суспензию эритроцитов ($5 \cdot 10^8$ клеток/мл) в вышеуказанной среде инкубировали с ионофором А 23187 и CaCl_2 или хинином в течение 15 мин при температуре 37 °С.

Пробы контрольных и модифицированных клеток ($1,25 \cdot 10^8$ клеток/мл) в среде, содержащей 0,86 М сахарозу, 0,005 М фосфатный буфер, pH 7,4, объемом 2 мл инкубировали в течение 15 мин на водяной бане при температуре 37 °С, а затем переносили на

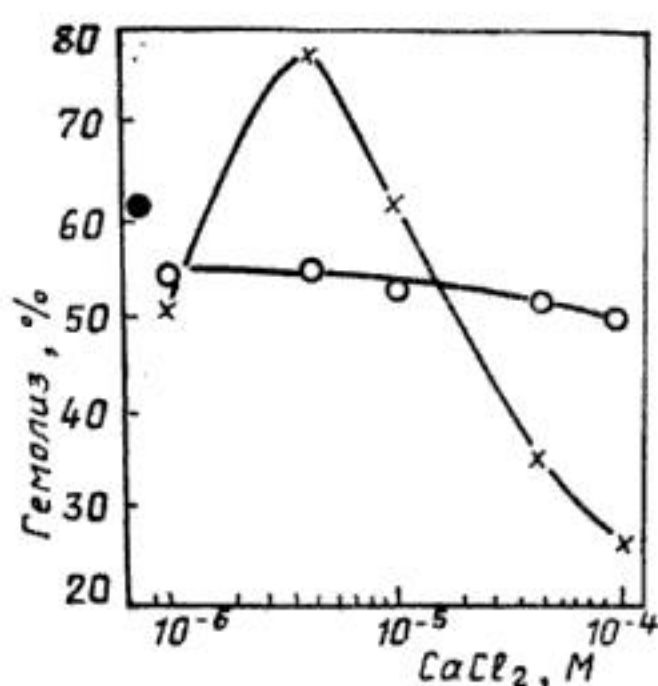
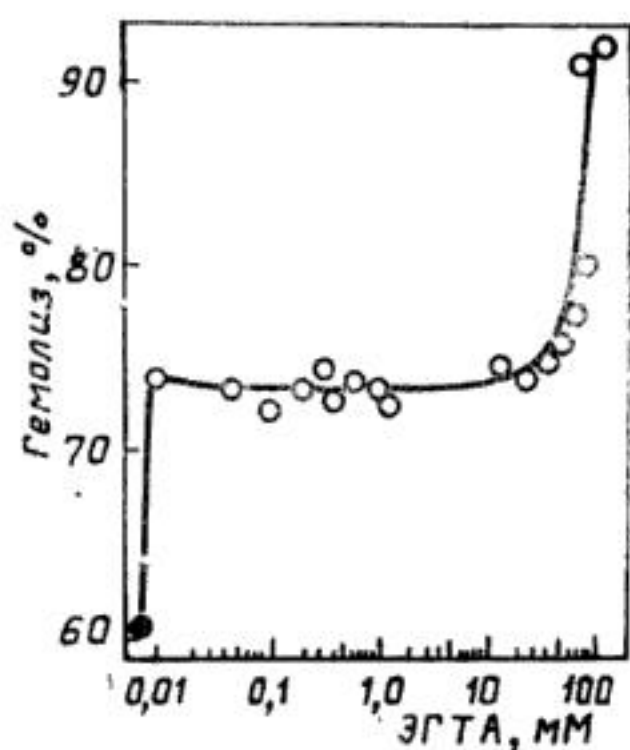


Рис. 1. Влияние ЭГТА на уровень холодового шока эритроцитов (среда: 0,86 М сахароза, 0,15 М NaCl, 0,01 М трис-HCl буфер, pH 7,4); ● — контроль, ○ — опыт

Рис. 2. Действие ионофора А 23187 ($5 \cdot 10^{-5}$ М) и Ca^{2+} на уровень холодового шока эритроцитов (среда: 0,86 М сахароза, 0,15 М NaCl, 0,005 М фосфатный буфер, pH 7,4); ● — контроль, ○ — контроль + Ca^{2+} , × — опыт (А 23187 + Ca^{2+})

то же время на ледяную баню 0 °С. После завершения инкубации пробы центрифугировали и в надосадке определяли экстинкцию при 543 нм. Гемолиз рассчитывали в процентах по отношению к гемолизу, развивающемуся после переноса клеток в дистиллированную воду, принимаемому за 100 %.

В экспериментах с ЭГТА клетки вносили в среду, содержащую сахарозу повышенной осмолярности и комплексон. Холодовый шок осуществлялся, как ранее описано.

Контроль температуры проводили с помощью медь-капельного термопреобразователя.

Возрастание осмолярности среды может двояким образом вызывать увеличение концентрации Ca^{2+} в клетке: с одной стороны, вследствие повышения концентрации катионов при осмотическом обезвоживании клетки, а с другой — из-за неспецифического повышения проницаемости мембраны для кальция в гипертонических средах [6].

В данной работе для уменьшения концентрации Ca^{2+} в среде и эритроцитах использовали проникающий кальциевый комплексон — ЭГТА [3]. Как видно из рис. 1, ЭГТА в концентрации от 0,01 до 10 мм несколько повышает лизис клеток при холодовом шоке по сравнению с контролем, в то время как при более высоких концентрациях комплексона наблюдается значительное повреждение клеток после охлаждения. Таким образом, эритроциты, обработанные кальциевым комплексоном, сильнее подвержены холодовому шоку, что может свидетельствовать о протекторной функции Ca^{2+} при развитии холодового шока эритроцитов. Не исключено однако, что резкое повышение уровня холодового шока клеток при использовании ЭГТА в концентрации 10 мм связано не столько с удалением кальция, сколько со специфическим действием комплексона на мембрану.

Данные, полученные с помощью кальциевого ионофора — А 23187 ($5 \cdot 10^{-5}$ М) (рис. 2), позволяют выделить 2 особенности влияния кальция на холододовый шок: при концентрации Ca^{2+} $5 \cdot 10^{-6}$ М холододовый шок более выражен, в то время как при концентрации Ca^{2+} выше 10^{-5} М величина холододового шока снижается ниже контрольного уровня. Возможно, первая особенность (повреждение клеток) связана с реализацией эффекта Гардоша [4], когда при повышении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} происходит активация K^+ -каналов, что можно рассматривать как фактор, сенсibiliзирующий клетки к действию охлаждения.

Концентрация свободного кальция в эритроцитах человека составляет 10^{-8} М. Поддержание концентрации указанного катиона на столь низком уровне обеспечивается работой кальциевого насоса и чрезвычайно низкой проницаемостью мембраны для ионов Ca^{2+} . Незначительное повышение содержания Ca^{2+} в клетке приводит к активации ряда процессов, таких как Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы, Ca^{2+} - Mg^{2+} -АТФаза и др. [2]. В то же время концентрации кальция выше 10^{-5} М способны активиро-

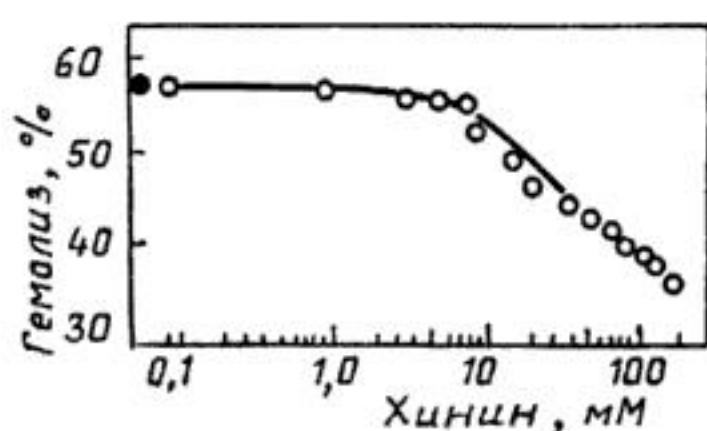


Рис. 3. Влияние хинина на холододовый шок эритроцитов (среда: 0,86 М сахара, 0,15 М NaCl, 0,005 М фосфатный буфер, pH 7,4); ● — контроль, ○ — опыт

вать транскляминазу [5], фермент, катализирующий образование γ -глютамил- ϵ -лизиновых сшивок между молекулами белков. Поэтому весьма вероятно, что вторая особенность (стабилизация клеток) связана с образованием ковалентных сшивок в структуре белкового скелета, что обеспечивает повышенную устойчивость мембраны к действию охлаждения.

Химические соединения, способные ограничивать развитие эффекта Гардоша, могут проявлять свое действие и в снижении уровня холододового шока эритроцитов, нагруженных умеренными концентрациями Ca^{2+} . Действительно, хинин, известный как ингибитор Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов, взаимодействующий с откры-

тым каналом, но не влияющий на накопление Ca^{2+} , ограничивает развитие холододового шока эритроцитов (рис. 3).

Таким образом, полученные результаты показывают, что кальций в зависимости от характера влияния на ту или иную систему клетки может оказывать как сенсibiliзирующий, так и ограничивающий эффект на развитие холододового шока эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Бужурина И. М., Панов М. А. Механизмы клеточного ответа на внешние воздействия // Итоги науки и техники. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии. — 3. — М.: ВИНТИ, 1986. — 214с.
3. Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. Повреждение митохондрий при аноксии // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. — 5. — М.: ВИНТИ, 1975. — С. 11—55.
4. Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta. — 1958. — 30, № 3. — P. 653—654.
5. Lorand L., Weissmann L. B., Edel D. L., Bruner-Lorand J. Role of the intrinsic transglutaminase in the Ca^{2+} -mediated cross-linking of erythrocyte proteins // Proc. Nat. Acad. Sci. — 1976. — 73., N 13. — P. 4479—4481.
6. Plishker G. A., Gitelman H. J. Calcium transport in human red blood cells under hypertonic conditions // Am. J. Physiol. — 1979. — 237, N 1. — P. 96—101.

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

Поступило 10.03.88

В. А. Борисов, О. Д. Мяделец, В. Н. Бринкевич

МЕТОДИКА ИСКУССТВЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ НА МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Методика гипотермии реализуется следующим образом. После наркотизации животных эфиром в эксикаторе до исчезновения мышечного тонуса их извлекают и укладывают в положении на спине в ванночку с холодной водой, покрытую полиэтиленовой пленкой. Дальнейшая подача эфира осуществляется при помощи небольшой воронки с ватой внутри. При определении глубины наркоза следует ориентироваться на наличие или отсутствие мышечной дрожи и на частоту и глубину дыхания. Следует также регистрировать деятельность сердца при помощи электрокардиографа с осциллоскопом. Для изучения температуры тела животных используют тонкий стеклянный термометр, погружаемый в прямую кишку, с диапазоном измерения температур от 0 до 40 °С.

Животных следует охлаждать со скоростью 1 °С за 3—5 мин (как снижение, так и превышение скорости недопустимы). После достижения ректальной температуры 29—30 °С в связи с замедлением скорости охлаждения в ванночку добавляют снег или лед. Температура охлаждающей воды в экспериментах была равна 10 °С, а воды со снегом 1—4 °С. По мере охлаждения животного время подачи эфира постепенно сокращают, а при достижении ректальной температуры 25—23 °С подачу эфира прекращают. При ректальной температуре 25 °С и ниже под голову животного необходимо поместить немного ваты для предотвращения переохлаждения головного мозга и остановки дыхания и сердца. По мере приближения ректальной температуры к 18 °С (глубокая гипотермия) дыхание животных становится поверхностнее и реже, а на глубине охлаждения 20—18 °С может прекратиться, поэтому следует применить искусственное дыхание. Оно выполнялось с помощью аппарата Неговского РДА -1. При достижении температуры тела животного 18 °С оно извлекается из ванночки и выдерживается при этой температуре. Таким образом можно продлить состояние глубокой гипотермии от 15 мин до 18 ч. В случае необходимости углубления гипотермии в ванночку добавляют лед, а для усиления охлаждающих свойств смеси — поваренную соль. При этом лед необходимо поместить и на живот (также через полиэтиленовую пленку). Таким способом можно охладить животных до 0,5 °С (остановка сердца происходит при 6—8 °С), а затем вывести их из состояния гипотермии путем согревания тела животных лампой-рефлектором. Вначале согревается область сердца, при этом остальные части тела животного изолируются при помощи ваты. Важно, чтобы скорость согревания не превышала 1 °С за 4—5 мин. При температуре тела 25 °С переходят на общее согревание. При появлении дрожи применяется эфир, а при температуре тела 29 °С наркоз применять не следует. При пробуждении животного скорость подъема температуры тела должна составлять 1 °С за 8—10 мин. При температуре тела 32—33 °С активное согревание полностью прекращается. Спустя 30 мин животные становятся активными, а спустя 1 ч после опыта полностью исчезает атаксия и поведение животных нормализуется. При охлаждении до околонулевых температур (0,5 °С) режим активного согревания продолжается дольше — до температуры 36 °С, так как у этих животных имеется склонность к самопроизвольному снижению температуры тела в первые часы после эксперимента (спонтанная пойкилотермия). Поэтому животные после согревания должны быть помещены в камеру с подогревом (температура внутри камеры 25—27 °С) на несколько часов (6—8).

Использование в описанной выше методике эфирного наркоза позволяет получать 100 % выживаемость крыс при охлаждении до ректальной температуры 18 °С и 90 % — при охлаждении до температуры 0,5 °С. Для успешного применения этого наркотического вещества важно не передозировать его, а также постепенно снижать подачу и полностью прекращать при ректальной температуре 23—25 °С.

Описанная методика позволяет достигать состояния глубокой и сверхглубокой гипотермии у крыс, мышей, морских свинок. Можно охлаждать до ректальной температуры 18—16 °С и ниже не только половозрелых, но и неполовозрелых

(16 сут жизни) и старых (2 года жизни и старше) крыс. Неполовозрелых крыс при этом можно и охлаждать, и согревать с более высокой скоростью — 1 °С за 2—3 мин. Особенности охлаждения мышей такие же, как и при работе с неполовозрелыми крысами.

Мед. ин-т, г. Витебск

Поступило 24.11.86

УДК 57.043:612.172

В. И. Марков, С. И. Ткаченко

ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУР КАПИЛЛЯРНОГО РУСЛА МИОКАРДА ПРИ ОБЩЕЙ ГИПОТЕРМИИ

Целью данной работы явилось изучение динамики ультраструктуры элементов капиллярного русла миокарда при общей искусственной гипотермии.

Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар массой 180—230 г. Гипотермию вызывали внутрибрюшинным введением нейроплегической смеси и оксипутирата натрия с последующей иммобилизацией и помещением животных в холодую камеру (2—6 °С) по методу [2]. При достижении глубокой гипотермии (ректальная температура 20 °С) через $3,0 \pm 0,5$ ч крыс забивали декапитацией, кусочки папиллярной мышцы левого желудочка брали для электронно-микроскопического исследования и обрабатывали по общепринятой методике [1]. Контролем служила группа животных, которым были введены вышеназванные препараты и которые находились при комнатной температуре.

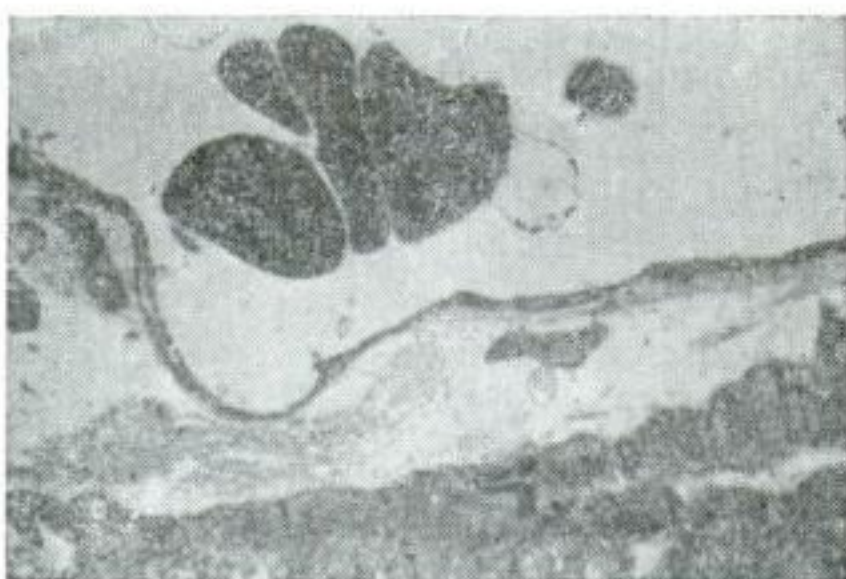


Рис. 1. Ультраструктура миокарда при общей гипотермии (20 °С). «Сладж» эритроцитов. В перикапиллярном пространстве отек и увеличение числа пучков коллагеновых волокон. X 6000

Рис. 2. Охлаждение до 20 °С. Изменение формы эритроцитов в просвете капилляра. X 6000

При охлаждении до 20 °С отмечался выраженный внутриклеточный отек кардиомиоцитов (КМЦ): околоядерный отек, набухание митохондрий, разволокнение миофибрилл. Кроме внутриклеточного отека наблюдался отек интерстиция, что проявлялось увеличением межклеточного и перикапиллярного пространства. Значительные изменения отмечались в некоторых капиллярах в виде стаза крови со «сладжем» эритроцитов (от 3—4 до 10—15) в виде «монетных столбиков» (рис. 1), что, возможно, зависит от изменения реологических характеристик крови. Кроме того, выявлено увеличение количества деформированных эритроцитов (рис. 2). В межклеточном и перикапиллярном пространстве отмечались тенденция к увеличению числа фибрилл коллагена, а также утолщение пучков коллагеновых волокон (рис. 1). Некоторые фибробласты миокарда находились в активном состоянии: увеличивалась активность белоксинтезирующего аппарата, расширялись пузырьки эндоплазматического ретикулума, набухали митохондрии, клетки были окружены пучками коллагеновых фибрилл (рис. 3).

Наблюдаемые ультраструктурные изменения капиллярного русла и перикапиллярного пространства при охлаждении до 20 °С свидетельствуют об изменении гемато-тканевого обмена, что может являться одной из причин нарушения трофики КМЦ. Увеличение количества коллагеновых фибрилл в строме миокарда при холодовом воздействии, но в более поздние сроки, отмечают в [3], причем коллагенизация стромы может быть связана с нарастающей пластической недостаточностью КМЦ [4].

Через 1 сут после общей гипотермии наряду с существенным уменьшением внутриклеточного отека КМЦ сохранялся отек интерстиция. У части капилляров сохранялся или незначительно уменьшался периваскулярный отек. Значительно уменьшалось количество деформированных эритроцитов. В межклеточном пространстве и в непосредственной близости от капилляров сохранялось повышенное содержание утолщенных пучков коллагена.

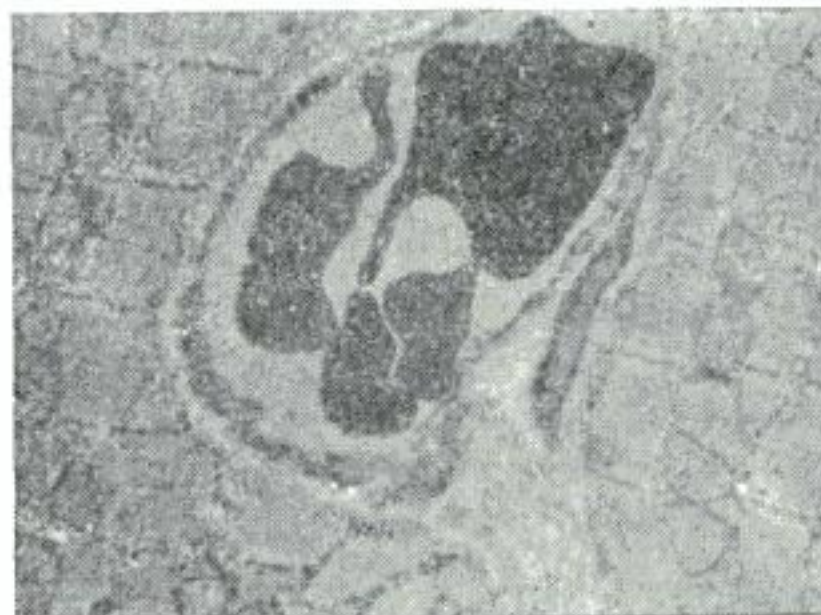
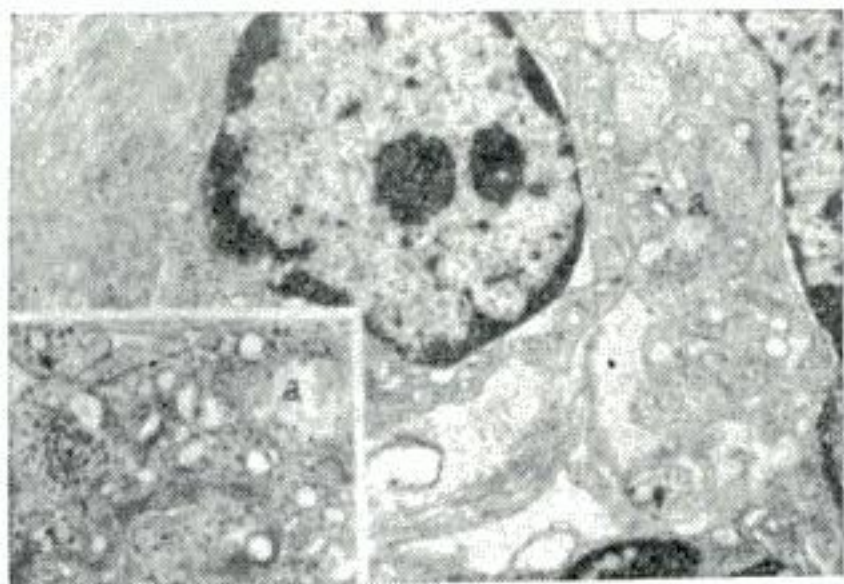


Рис. 3. Охлаждение до 20 °С. Ультраструктура активной формы фибробласта миокарда, окруженного пучками коллагеновых фибрилл (X 10000) и участок цитоплазмы фибробласта (а) с заметной активацией элементов аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулаума (X 15000)

Рис. 4. 7-е сут после гипотермии. Нормализация ультраструктуры КМЦ и капилляров в миокарде. X 8000

Через 3 сут отмечались нормализация структуры КМЦ, дальнейшее уменьшение межклеточного отека, убыль количества коллагеновых волокон, однако местами между КМЦ сохранялись расширенные пространства.

На 7-е сут после гипотермии состояние ультраструктур капиллярного русла приближалось к норме: большая часть обменных капилляров находится в функционально активном состоянии и непосредственно контактируют с КМЦ (рис. 4). Тесное прилегание эритроцитов к внутренней поверхности эндотелиоцитов капилляров свидетельствует об активации обменных процессов. В непосредственной близости от капилляров наблюдалось увеличенное количество клеток соединительной ткани. Количество коллагеновых волокон по сравнению с 1-ми сут значительно уменьшалось.

Таким образом, в условиях общей искусственной гипотермии (20 °С) наблюдаются выраженный внутриклеточный отек КМЦ и отек интерстиция, изменение формы эритроцитов, в перикапиллярном пространстве наблюдается увеличение количества коллагеновых волокон. Через 1 сут после гипотермического воздействия отмечается тенденция к уменьшению отека КМЦ и стромы, в то же время повышенное содержание коллагена в строме миокарда сохраняется.

Через 3,7 сут после гипотермии происходит нормализация структурной организации миокарда, что может свидетельствовать об обратимости наблюдаемых изменений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гайер Г. Электронная гистохимия. — М.: Мир, 1974. — 488 с.
2. Марфина Л. Л. Опыт получения искусственного гипобноза у крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1970. — 14 с.
3. Непомнящих Л. М., Лушникова Е. Л., Непомнящих Г. И. и др. Гистостереологический анализ миокарда гомойотермных животных при охлаждении // Бюлл. exper. биол. и медицины. — 1987. — N 11. — С. 625—630.

4. Семенова Л. А., Непомнящих Л. М., Семенов Д. Е. Морфология пластической недостаточности мышечных клеток сердца.—Новосибирск: Наука (Сиб. отд-е), 1985.—241 с.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков,
Харьковский НИИ мед. радиологии

Поступило 17.05.89

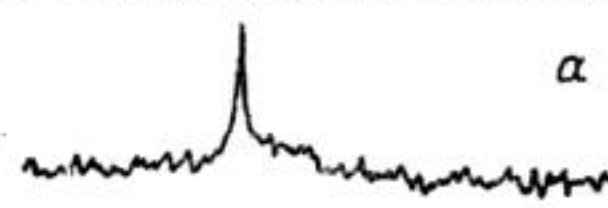
УДК 577.157.2—035.7

Р. Ф. Байкеев, В. Н. Зинин, А. В. Ильясов

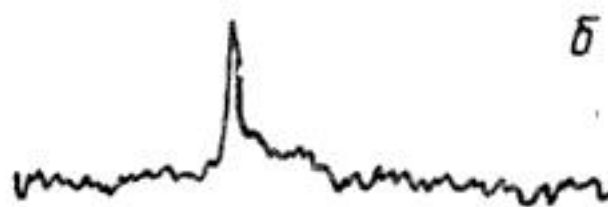
АНТИТРОМБОПЛАСТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Криопротекторы биологических мембран в настоящее время широко используются как при консервации биологических препаратов путем замораживания, так и для обеспечения проникновения некоторых лекарственных препаратов в клетки.

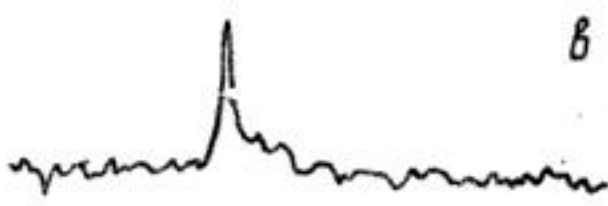
Ранее нами было показано, что криопротекторы (глицерин и диметилсульфоксид) уменьшают биологическую активность тканевого тромбопластина [1]. Тканевой тромбо-



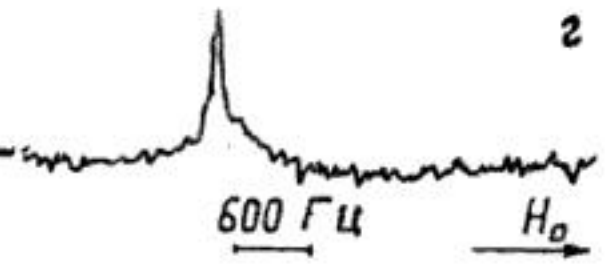
а



б



в



г

Спектр ^{31}P -ЯМР 20 %-ной суспензии препарата тканевого тромбопластина — а, б — в 20 %-ном растворе глицерина, в — в 20 %-ном растворе ДМСО, г — после воздействия ультразвука

пластин является мембранным липопroteinным комплексом, способным активировать фактор УП свертывающей системы плазмы крови в присутствии Ca^{2+} . Вопрос о механизме действия криопротекторов на мембранные структуры, обладающие гемокоагуляционной активностью, имеет как общебиологическое, так и практическое значение, так как в случае поступления криопротекторов в организм, они могут влиять на систему гемостаза в целом.

Исследовали два образца: коммерческий препарат тканевого тромбопластина (Каунасское предприятие бакпрепаратов), изготавливаемый из головного мозга человека, и тканевой тромбопластин, полученный нами из головного мозга крупного рогатого скота. Препараты тромбопластина использовали в концентрации 200 мг/мл, растворитель — 50 %-ный D_2O . Ультразвуковую обработку препаратов осуществляли в ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 (СССР).

Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на спектрометре СХР-100 фирмы «Брукер» (ФРГ) на частоте 36,4 МГц при температуре 310 К. Для улучшения отношения сигнал/шум использовали экспоненциальное умножение сигнала (ЭВМ «Аспект-2000») с развязкой от протонов и внутренней стабилизацией по сигналу дейтерия. Временный интервал между отдельными сканами составил 4,1 с, а число сканов — 300. Химический сдвиг определяли относительно 85 %-ного раствора H_3PO_4 . В качестве анализируемых параметров ЯМР-спектров были выбраны форма резонансной линии, химический сдвиг (δ), ширина сигнала на половине его высоты ($\Delta\nu_{1/2}$) и ширина основания сигнала ($\nu_{\text{эфф.}}$).

В обоих образцах тканевого тромбопластина сигнал ^{31}P -ЯМР имеет очертания, характерные для фосфолипидов, организованных в гексагональную лиотропную мезофазу. Величина $\nu_{\text{эфф.}}$ составляет около 900 Гц. Типичные спектры приведены на рисунке. Присутствие глицерина и диметилсульфоксида (ДМСО) не изменяет фазового состояния фосфолипидов в тканевом тромбопластине, на что указывает сохранение формы резонансной линии в полученных спектрах после добавления криопротекторов (рис.).

Судя по величине $\nu_{\text{эфф}}$, фосфолиппротеидные комплексы препарата тканевого тромбопластина организованы в значительные по размерам структуры. Поэтому с целью детализации эффекта криопротекторов препараты тканевого тромбопластина предварительно были размельчены ультразвуком. Ультразвуковое воздействие более 15 мин реорганизует фосфолипиды тканевого тромбопластина в мицеллярную мезофазу, о чем судили по наличию в спектре единичного изотропного пика (рис., г).

В структуре тканевого тромбопластина имеются два компонента, физико-химическое состояние которых может изменяться в присутствии криопротекторов. Первый компонент — это белки, а второй — липиды. Из всей массы мембранных белков определяющую роль в проявлении гемокоагуляционной активности тканевого тромбопластина играет интегральный белок — апопротеид III.

При исследовании методом ЭПР модельных фосфолипидных мембран было установлено, что в присутствии ДМСО и глицерина увеличивается значение параметра упорядоченности липидов [2,5]. В природных мембранах под влиянием криопротекторов исчезает температурный фазовый переход в липидах, расположенных вокруг интегральных белков [3] и увеличивается размер мембранных пор [4]. В результате дегидратации под действием глицерина и ДМСО липидные бислои уплотняются, их толщина уменьшается [6].

Полученные результаты (рис., табл.) показывают, что в структурную перестройку фосфолиппротеидных комплексов под влиянием глицерина и ДМСО при 310 К не вовлекаются процессы изменения фазового состояния фосфолипидного компонента. Судя по величине $\Delta\nu_{1/2}$ (табл.), при этом не меняется и подвижность полярной фосфорсодержащей головки фосфолипидов.

При исследовании природных мембран с использованием спин-меченой малеимидной метки было показано, что при добавлении криопротекторов, в частности ДМСО, происходит повышение гидрофобности белковых структур [7]. Белки при этом фактически погружаются в липидный матрикс мембран.

На основании проведенных исследований и анализа литературных данных можно сделать следующий вывод: криопротекторы биологических мембран (глицерин ДМСО) в ходе своего воздействия на мембранные фосфолиппротеидные комплексы вызывают значительные физико-химические изменения только в их гидрофобных областях и не затрагивают полярных участков фосфолипидов. При этом не происходит изменения ни фазового состояния липидов, ни подвижности фосфорсодержащих полярных групп*.

Понижение гемокоагуляционной активности препаратов тканевого тромбопластина в присутствии криопротекторов [1] объясняется, по-видимому, тем, что при этом возрастает ригидность естественной конформационной подвижности апопротеида III и окружающих его фосфолипидов. Произшедшие изменения нарушают конгруэнтность между тромбопластической матрицей мембраны и факторами свертывающей системы плазмы крови.

* П р и м е ч а н и е редакции.

В статье И. А. Василенко и др. (Василенко И. А., Тонконог Л. А., Балагуров А. М. и др. Структурная организация фосфолипидов в неводных полярных растворителях // Биол. мембраны. — 1988. — 5, № 4. — С. 428—438.) показано, что для фосфолипидных систем характерны весьма большие времена установления равновесия при замене растворителя. Возможно, в связи с этим авторы публикуемого сообщения не наблюдали существенных изменений спектров ЯМР при добавлении криопротекторов к образцам тромбопластина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байкеев Р. Ф. Влияние диметилсульфоксида и глицерина на активность тканевого тромбопластина // Казанский мед. журн. — 1983. — 64, № 4. — С. 308—309.

Параметры спектров ^{31}P -ЯМР тканевого тромбопластина

Образец	δ , м.д.	$\Delta\nu_{1/2}$, Гц
Тромбопластин человека	1,33	$12,4 \pm 1,1$
Тромбопластин человека в 20%-ном глицерине	1,35	$12,7 \pm 0,7$
Тромбопластин человека в 20%-ном ДМСО	0,86	$14,5 \pm 1,9$
Тромбопластин быка	1,02	$14,1 \pm 2,0$
Тромбопластин быка в 20%-ном глицерине	1,07	$13,2 \pm 1,1$
Тромбопластин быка в 20%-ном ДМСО	0,70	$15,4 \pm 1,2$

2. Жданов Р. И., Суханов В. А., Швеи В. И. Спин-меченые фосфолипиды: синтез, свойства и применение // Метод спиновых меток и зондов: проблемы и перспективы.— М.: Наука, 1986.— 272 с.
3. Иванов Л. В., Гаврилова И. И., Моисеев В. А. Исследование действия низких температур и криопротекторов на структуру мембран эритроцитов методом спиновых меток // Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур.— Киев: Наук. думка, 1977.— С. 33—34.
4. Кнубовец Т. Л., Зинченко В. Д., Сибельдина Л. А. Исследование действия ДМСО на мембраны эритроцитов человека методом ^{31}P -ЯМР // Биол. мембраны.— 1987.— 4, № 1.— С. 84—89.
5. Boggs J. M., Rangaraj G. Phase transitions and fatty acid spin label behavior in interdigitated lipid phase induced by glycerol and polymyxin // Biochim. et biophys. acta; Biomembranes.— 1985.— 816, N 2.— P. 221—233.
6. Kirscher D. A., Hallingshead C. J., Thaxton C., Caspar D. L. D. Structural states of myelin observed by x-ray diffraction and freeze-fracture electron microscopy J. Cell. Biol.— 1972.— 82, N 1.— P. 140—149.
7. Kralisz U., Surewicz W. K., Kotelba-Witkowska B., Pietrucha T. Effect of dimethyl sulfoxide on plasma membrane of human platelets // Stud.biophys.— 1984.— 100, N 1.— P. 33—40.

Казанский гос. мед. ин-т им. С. В. Курашова,
Ин-т органической и физической химии
им. А. Е. Арбузова КФАН СССР, г. Казань

Поступило 10.07.87

ХРОНИКА

III ВСЕСОЮЗНЫЙ СЪЕЗД ЭНДОКРИНОЛОГОВ

С 16 по 19 мая 1989 г. в г. Ташкенте проходил III Всесоюзный съезд эндокринологов, на котором были рассмотрены вопросы патогенеза, диагностики, лечения и профилактики заболеваний эндокринной системы.

Важным направлением современной эндокринологии является использование трансплантации эндокринных клеток и тканей с целью компенсации и лечения различных форм эндокринной недостаточности. Ученые Киева, Москвы, Харькова, Риги, Ташкента, а также зарубежные исследователи из Болгарии, ГДР, ЧССР, Великобритании представили интересные работы по культивированию и консервации β -клеток и тиреоидной паренхимы железы, экспериментальные и клинические наблюдения по трансплантации эндокринных структур.

В. А. Чуйко

ВСЕСОЮЗНОЕ СОВЕЩАНИЕ «НОВЫЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫЕ МЕТОДЫ И ПРИБОРЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ»

6—8 июня 1989 г. в Великом Устюге проходило Всесоюзное совещание «Новые ультразвуковые методы и приборы для применения в биологии и медицине» по секциям: «Активное воздействие ультразвуком на биологические среды и объекты», «Ультразвуковая диагностика», «Акустические методы получения информации о биологических объектах», «Другие применения ультразвука в биологии и медицине». Его проводили Академия наук СССР, Научный совет по проблеме «Акустика» (секция «Ультразвук в биологии и медицине»).

Большое внимание совещание уделило ультразвуковой гипертермии злокачественных опухолей. В докладах Конопляцкой И. И., Выходцевой Н. И. (г. Москва) излагались теоретические и экспериментальные исследования по локальной ультразвуковой гипертермии опухолей головного мозга. Герчиков А. Н., Солонцова Л. В. (г. Москва) представили результаты действия ультразвуковой гипертермии в экспериментальной офтальмоонкологии. Дубров Э. Я., Амброзевич Е. Г. (г. Москва) изложили пути совершенствования ультразвуковой аппаратуры и методик для лечения хирургических инфицированных ран. Применению фокусированного ультразвука для диагностики и лечения нарушений слуха посвятили свои сообщения Цирульников Е. М. и соавторы (г. Ленинград). Фокусированный ультразвук применялся также для воздействия в пунктурной физиотерапии и изучении рецепторов кожи. Широкое применение ультразвук нашел в приборах для измерения скорости кровотока (Бараник Е. А. и соавторы, г. Харьков), в диагностике и профилактике заболеваний молочной железы (Грасюк Д. С. и соавторы, г. Москва), при регистрации показателей внут-

ричерпной гемоликвородинамики у человека (Симонов Л. Г. , Жданова Л. Ф., г. Москва).

Ультразвуковой диагностике посвятил свой доклад Пиляцкас Э. Л. (г. Каунас), в частности, развитию метода ультразвуковой томографии молочной железы. Лукошвичюс А. Й. с соавторами (г. Каунас) рассказали о перспективах применения информационных систем акустодиагностики тканей. В сообщении Бальтера С. А., Мецаева Н. Д. (г. Москва) представлены возможности ультразвуковой компьютерной томографии в диагностике изменений магистральных сосудов при внутрибрюшных и забрюшных, органных и неорганных опухолях. В докладе Чекаловой М. А. (г. Москва) излагались результаты использования ультразвуковой томографии в диагностике злокачественных опухолей яичников.

Акопян В. Б. (г. Москва) обстоятельно и широко рассказал о применении ультразвуковых приборов и методов в сельскохозяйственном производстве, Денисов Г. А. с соавторами (г. Ленинград) — в клинической фармакологии.

Применению ультразвуковых колебаний в криобиологии и криомедицине было посвящено два доклада. Вишневский В. И. (г. Харьков) доложил о криомикроскопических исследованиях процессов кристаллизации в ультразвуковом поле растворов и клеточных суспензий. Доклад Кураксы В. М. (г. Харьков) был посвящен регистрации акустической эмиссии в замораживаемом материале с целью оптимизации программ криоконсервирования.

В дискуссиях совещания отмечалось широкое и плодотворное применение ультразвука в различных областях биологии и медицины, подчеркивалась значимость и полезность полученных результатов, определялись приоритетные направления исследований. Совещание обратило внимание на недостаточное развитие метрологического обеспечения исследований с применением ультразвуковых колебаний, что, в свою очередь, затрудняет определение физиологически обоснованных доз ультразвука и препятствует сравнению результатов многочисленных экспериментов, проведенных на разной аппаратуре. Отмечалось, что необходимо еще более усилить работу по созданию новых методов и приборов для исследования в биологии и медицине.

В. И. Вишневский

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в 1989 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени доктора медицинских наук С. И. Исмаиловым «Криоконсервирование щитовидной железы с целью лечения гипотиреоза». Проведено экспериментально-клиническое исследование, в результате которого был установлен факт сохранения гормонообразовательной и секреторной функции щитовидной железы, возможности ее регуляции со стороны гипофиза при криоконсервировании с сохранением органного принципа.

Диссертационная работа Т. П. Говорухи «Влияние охлаждения на ультраструктуру гепатоцитов печени крыс на некоторых этапах онтогенеза» на соискание ученой степени кандидата биологических наук посвящена изучению реакции внутриклеточных структур гепатоцитов ткани печени пре- и раннего постнатального развития крыс на различные условия охлаждения. Теоретическая и практическая ценность работы состоит в том, что выявленный характер повреждений гепатоцитов при охлаждении различной степени позволяет определить оптимальный возрастной период, в течение которого гепатоциты менее всего повреждаются, а также режим, обеспечивающий максимальную сохранность ультраструктуры гепатоцитов.

В диссертационной работе В. В. Позднякова «Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку» на соискание ученой степени кандидата биологических наук получены новые данные о влиянии исходных условий среды инкубации на устойчивость клеток к замораживанию и гипертоническому шоку. Показано, что осмотическое давление непроникающих компонентов среды является важнейшим фактором, определяющим сохранность эритроцитов человека после замораживания-оттаивания и при гипертоническом шоке. Токсичность непроникающих криопротекторов определяется в большей степени их осмотическим вкладом в общую осмолярность среды, чем их биохимическими свойствами.

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ ЖУРНАЛА «КРИОБИОЛОГИЯ»

Статья представляется в 2 экз. с сопроводительным письмом и экспертным заключением. Объем оригинальной статьи — не более 10, обзорной — 12 стр. машинописного текста, включая список литературы, таблицы, иллюстрации и подписи под рисунками. Объем краткого сообщения — 3 стр. Оба экземпляра статьи подписываются авторами с указанием учреждения, фамилии, имени и отчества, домашнего и служебного адресов, номеров телефонов, даты.

Статья печатается на машинке черной лентой через 2 интервала на белой бумаге форматом А₄ (210×297 мм). На странице не более 30 строк, в строке не более 60—62 знаков. Абзацный отступ равен 5 знакам. Левое поле страницы — не менее 25, правое — 10, верхнее — 20, нижнее — 20 мм.

В левом верхнем углу проставляется УДК, затем инициалы и фамилия автора (авторов), название статьи. Название учреждения указывается под списком литературы, слева.

В тексте ссылки на номер статей по списку литературы даются в квадратных скобках.

Иностранные фамилии и названия фирм даются в русской транскрипции.

Таблицы печатают на отдельных страницах, помещают в рукописи вслед за страницей, содержащей первую ссылку на эту таблицу. На полях проставляют номера таблиц и рисунков против тех мест текста, где они должны быть заверстаны.

Формулы и буквенные обозначения должны быть выполнены четко, крупно, черными чернилами. Прописные и строчные буквы в формулах, одинаковые по начертанию и отличающиеся только размером, подчеркиваются: прописные буквы — двумя черточками снизу, строчные — двумя черточками сверху. Следует особенно четко вписывать сходные по написанию буквы: *e* и *l*, *I* и *J*, *h* и *n*.

Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые буквы, а также нуль, *sin*, *cos*, *exp* и т. д. размечаются на прямой набор знаком $\sqcap$. Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках). Разметка формул производится синей или фиолетовой пастой, греческие буквы подчеркиваются или обводятся красным карандашом, готические — синим. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) выписываются на поле (один раз с указанием их значения).

Рисунки в количестве не более 5 выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге (или в виде фотографий). На них наносятся только необходимые условные обозначения. Расшифровка их дается в тексте или в подписи к рисунку. На обороте рисунка указывается его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и журнала.

Список литературы печатается на отдельной странице через 2 интервала и составляется в алфавитном порядке авторов, русский, затем латинский алфавит. В списке необходимо привести следующие сведения: фамилия и инициалы автора в оригинальной транскрипции, название статьи, журнала или книги и далее: для периодических изданий 1) год издания, 2) том, 3) номер, 4) номера страниц; для монографий — место издания, название издательства, год издания, общее количество страниц.

Названия периодических и продолжающихся изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНТИ.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Объем списка литературы не должен превышать 5 % общего объема рукописи.

Реферат к статье подается на русском и английском языках объемом до 0,3 стр.

Материалы направлять по адресу: 310015, Харьков-15, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, редакции журнала «Криобиология».

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА» ГОТОВИТ К ВЫПУСКУ:

Низкие температуры и лазеры при лечении заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки / Б. П. Сандомирский, Е. Д. Хворостов, Е. И. Брехов.— Киев: Наук. думка, 1989 (III).— 12 л. 2 р. 60 к.

В монографии изложены патофизиологические, экспериментально-клинические обоснования, техника и опыт применения низких температур и лазеров при резекциях желудка, селективных проксимальных ваготомиях, метастазах злокачественных опухолей в печень, а также описаны эндоскопические манипуляции с использованием лазеров и низких температур при язвенных, полипозных поражениях желудка и двенадцатиперстной кишки, гастродуоденальных кровотечениях.

Для научных работников, врачей, преподавателей и студентов медицинских институтов.

Криобиология и проблема бесплодия / В. И. Грищенко, Ф. В. Дахно, Ю. С. Паращук и др.— Киев: Наук. думка, 1990 (III).— 10 л. 2 р. 10 к.

В монографии с современных позиций показана роль криобиологии в репродукции млекопитающих и человека, освещены социальные и медицинские проблемы бесплодного брака. Представлены методы криозащиты спермиев человека, разработанные авторами на основе полученных ими данных о механизмах повреждающего действия низких температур на гаметы.

Для специалистов по репродуктологии, криобиологии, акушеров-гинекологов, андрологов, студентов вузов.

Гипотермия в лечении острых отравлений / Г. А. Бабийчук, В. А. Аркатов, Ю. Н. Арцыбушев и др.— Киев: Наук. думка, 1990 (III).— 15 л. 3 р. 30 к.

В монографии обобщены сведения о различных способах лечения острых отравлений. Рассматриваются механизмы развития коматозного состояния при отравлении с сопутствующими нарушениями регуляции вегетативных функций, метаболизма, мозговой гемодинамики и ликворообращения, возникновением отека-набухания мозга и выраженной гипоксии.

Для физиологов, биохимиков, врачей.

Продолжается подписка на 1990 год на всесоюзный научно-теоретический журнал «Криобиология». В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

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

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

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

KRIOBIOLOGIYA is published 4 times a year.

ISSN 0233-7673. Криобиология. 1989 № 4. 1—56