



ISSN 0233-7673

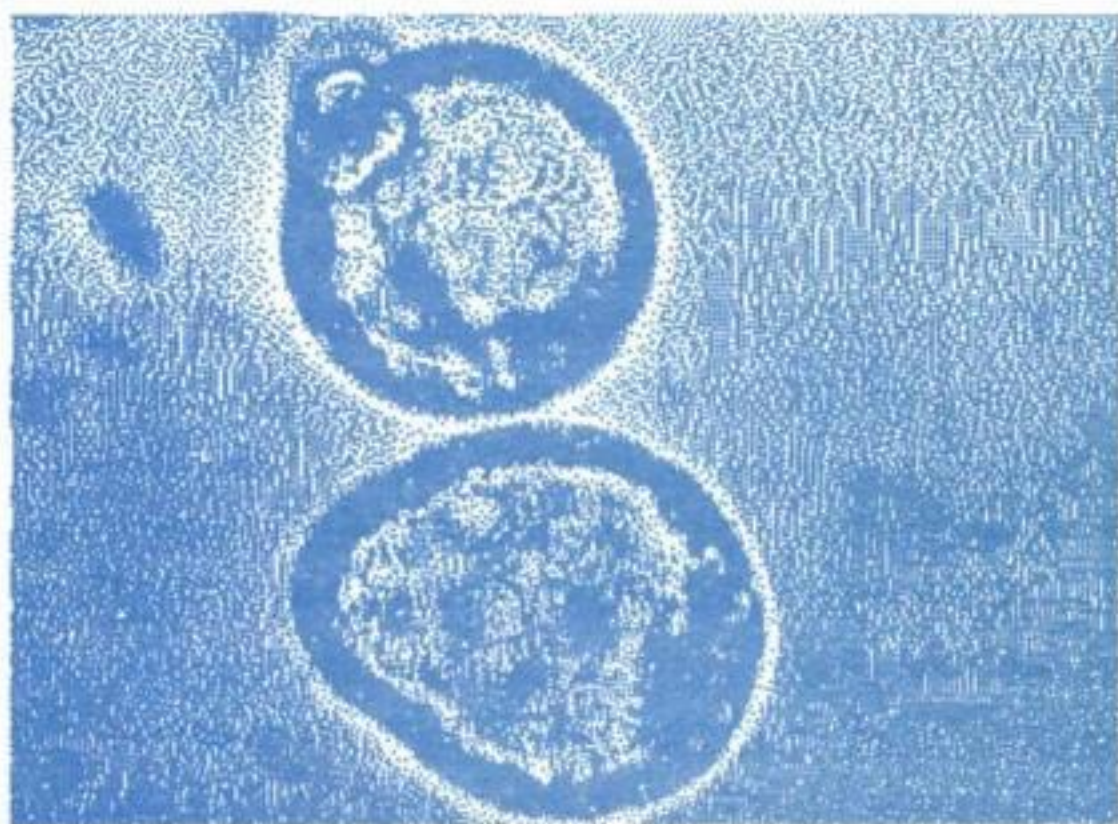
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1994

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ И
СПЕРМЫ *В.И.Грищенко, Ю.В.Калугин, Н.А.Лучко*

ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В РАСТВОРАХ ГЛИ-
ЦЕРИНА И 1,2-ПРОПАНДИОЛА ПРИ ТЕМПЕРАТУРАХ 8-37 °С
Л.Ф.Розанов, Е.Д.Розанова

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ТОКСИЧ-
НОСТЬ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ МОНОХЛОРГИДРИНА ГЛИЦЕРИ-
НА *С.Ю.Бидный, С.В.Коций, В.М.Гучок, М.И.Шраго*

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И КРИОПРОТЕКТОРА ПЭО-1500 НА
ХАРАКТЕР МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА И УС-
ТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ КРИОКОНСЕРВИ-
РОВАНИЯ *Л.А.Бабийчук, Н.Г.Землянских*

Главный редактор **В.И.Грищенко**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

2

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1994

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Розанов Л.Ф., Розанова Е.Д.* Гемолиз эритроцитов человека в растворах глицерина и 1,2-пропандиола при температурах 8-37 °С 3
- Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г.* Влияние температуры и криопротектора ПЭО-1500 на характер модификации белков цитоскелета и устойчивость эритроцитов в процессе криоконсервирования 7
- Рамазанов В.В., Руденко С.В., Бондаренко В.А.* Влияние модификаторов цитоскелета на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при повышении осмолярности среды прединкубации 11
- Гулевский А.К., Клейнбокс И.Я., Терещенко О.С., Колаева С.Г., Доронин В.Н., Габдуллина Е.Ж., Игнатъев Д.А.* Влияние фракции полипептидов 1-10 кД из мозга гибернирующих сусликов *Citellus undulatus* на функционирование терморцепторов кошки *Felis vulgaris* . 17
- Бидный С.Ю., Кошый С.В., Гучок В.М., Шраго М.И.* Некоторые физико-химические свойства и токсичность водных растворов монохлоргидрина глицерина 21
- Кулешова Л.Г., Загнойко В.И.* Сравнительная оценка устойчивости формы эритроцитов гетеротермных животных в условиях гипотермического хранения 25

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А.* Некоторые аспекты криоконсервации эмбрионов и спермы 29
- Цуцаева А.А., Высеканцев И.П., Балыбердина Л.М., Князев Е.М.* Влияние начальных этапов процесса лиофилизации на жизнеспособность лиофилизированных бактерий *Escherichia coli* 37
- Чуйко В.А., Карпенко Л.Г., Новиков А.Н., Олейник С.Т.* Активность аденилатциклазы в адренкортикальной ткани при различных режимах охлаждения с димексидом и пропандиолом 41
- Бердышев Е.В., Ващенко М.А.* Влияние фактора активации тромбоцитов и липидного препарата КПС на оплодотворяющую способность сперматозоидов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, подвергнутых глубокому замораживанию 44

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1994

This One



YWUR-75K-HJ42

Матеріал, захищений авторським правом

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Стегний Б.Т., Рязанцев В.В.</i> Изучение транспорта катионов в культуре клеток FLK/BLV после замораживания-отогрева	51
<i>Белочкина И.В., Волкова Н.А.</i> Адгезивные способности гепатоцитов новорожденных поросят после низкотемпературного консервирования	52
<i>Пересецкая Н.М.</i> Особенности изменения объема и Ca^{2+} -индуцированного выхода калия в интактных и регидратированных эритроцитах	54
<i>Весич Т.Л., Крамар М.И.</i> Изучение действия лазерного облучения на нативные и перенесшие криоконсервирование спермии человека	55

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Rozanov L.F., Rozanova E.D.</i> Hemolysis of human red blood cells in glycerol and 1,2-propanediol solutions at temperatures of 8-37 °C	3
<i>Babychuk L.A., Zemlyanskikh N.G.</i> Effect of temperature and pro-1500 cryoprotectant on the nature cytoskeletal protein modification and red blood cell stability during cryopreservation	7
<i>Ramazanov V.V., Rudenko S.V., Bondarenko V.A.</i> Effect of cytoskeletal modifying agents on susceptibility of red blood cells to hypertonic stress when increasing osmolarity of pre-incubation medium	11
<i>Gulevsky A.K., Kleinbock I.Ya., Tereschenko O.S., Kolayeva S.G., Doronin V.N., Gabdulina E.Zh., Ignatyev D.A.</i> Effect of 1-10 kD polypeptide fraction from brain of hibernating ground squirrels (<i>Citellus undulatus</i>) on functioning of cat (<i>Felis vulgaris</i>) thermoreceptors	17
<i>Bidny S.Yu., Koschiy S.V., Guchok V.M., Shrago M.I.</i> Some physico-chemical properties and toxicity of monochlorhydrine glycerol aqueous solutions	21
<i>Kuleshova L.G., Zagnoiko V.I.</i> Comparative evaluation of red blood cell shape stability of homoiothermic animals during hypothermic storage	25

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Grischenko V.I., Kalugin Yu.V., Luchko N.A.</i> Some aspects of embryo and sperm cryopreservation	29
<i>Tsutsayeva A.A., Vysekantsev I.P., Balyberdina L.M., Knyazev E.M.</i> Effect of initial stages of the process of lyophilization on viability of lyophilized bacteria <i>Escherichia coli</i>	37
<i>Chuiiko V.A., Karpenko L.G., Novikov A.N., Oleynik S.T.</i> Adenylate cyclase activity in adrenocortical tissue during various modes of cooling with dimexide and propanediol	41
<i>Berdyshev E.V., Vashchenko M.A.</i> The effect of platelet activation factor and lipid preparation kps on the sperm fertility of sea urchin <i>Strongylocentrotus intermedius</i> subjected to deep freezing	44

NEWS IN BRIEF

<i>Stegniy B.T., Ryazantsev V.V.</i> A study of cation transport in a FLK/BLV cell culture following freeze-thawing.	51
<i>Belochkina I.V., Volkova N.A.</i> Adhesive properties of hepatocytes of new-born pigs after low temperature preservation.	52
<i>Peresetskaya N.M.</i> Distinguishing features of the volume and Ca^{2+} -induced release of potassium in intact and rehydrated red blood cells.	54
<i>Vesich T.L., Kramar M.I.</i> A study of the action of laser irradiation on native and cryopreserved human spermia.	55

DEFENSE OF THESES

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

Научный редактор *В.И.Луговой*
Редактор *Л.А.Рябинина*
Компьютерный набор и верстка: *Л.А.Рябинина, А.М.Шаталов*

Подп. в печ. 27.04.94. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.
Тираж 350 экз. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак. Р -263

ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В РАСТВОРАХ ГЛИЦЕРИНА И 1,2-ПРОПАНДИОЛА ПРИ ТЕМПЕРАТУРАХ 8–37 °С

Методом спектрофотометрии изучена кинетика гемолиза эритроцитов человека в водных растворах глицерина и 1,2-пропандиола и растворах этих веществ, содержащих изотоническую концентрацию хлористого натрия при температурах 8, 15, 24 и 37 °С. Установлено, что время 50%-го гемолиза эритроцитов в суспензии прогрессивно возрастает с увеличением концентрации криопротекторов и с понижением температуры, однако при концентрациях глицерина 30–40% и концентрации 1,2-пропандиола 40% эта закономерность нарушается. Анализ гематограмм не позволил связать эту “аномалию” с повреждением клеток гиперосмотическим стрессом.

По существующим представлениям гемолиз в растворах проникающих веществ (в том числе криопротекторов) является следствием образования в мембранах набухающих до критического объема эритроцитов крупных пор или разрывов, через которые молекулы гемоглобина выходят во внеклеточное пространство под действием разности его химических потенциалов на мембране. С определенной степенью приближения гемолиз каждой отдельной клетки происходит, когда ее набухание становится критическим, и поэтому время набухания эритроцита до критического объема может служить характеристикой скорости поступления в клетку внеклеточного раствора. Если проникающее вещество (криопротектор) присутствует во внеклеточной среде в изотонической концентрации, его проникновение в клетку нарушает равновесие химпотенциалов вне- и внутриклеточной воды, и вода, благодаря высокой скорости проникновения, достаточно быстро восстанавливает нарушенное равновесие, увеличивая клеточный объем. Если же внеклеточный раствор изначально гипертоничен, то сначала (за достаточно короткий промежуток времени) устанавливается равновесие химпотенциалов вне- и внутриклеточной воды на мембране путем дегидратации эритроцита, и лишь затем в него начинает поступать криопротектор, сопровождаемый водой.

Гетерогенность клеточной популяции по параметрам проницаемости (коэффициент проницаемости клеточной мембраны, площадь поверхности и объем клетки) приводит к тому, что эритроциты в популяции гемолизуют неодновременно. Процент гемолиза в каждый определенный момент времени, благодаря малому времени гемолиза каждой отдельной клетки (по нашей оценке, проведенной методом микроскопии [2] – до 5 с), может быть поставлен в соответствие количеству потерявших гемоглобин клеток. Таким образом, время, соответствующее 50%-у гемолизу, можно рассматривать как время, за которое 50% клеток теряет гемоглобин. Это время можно рассматривать также как усредненный параметр проницаемости популяции клеток для проникающего вещества [3].

В связи с существующей температурной зависимостью коэффициентов проницаемости клеточных мембран для криопротекторов и воды, а также известным положительным эффектом экспозиции клеток в растворах криопротекторов при пониженных температурах [1] возникает вопрос, насколько существенным может быть вклад в кинетику гемолиза, связанного с проникно-

вением в клетки внеклеточного раствора, концентрации этого раствора и температуры.

С учетом вышесказанного нами изучалась кинетика гемолиза эритроцитов человека в растворах глицерина и 1,2-пропандиола методом спектрофотометрии в соответствии с ранее описанной методикой при температурах 8, 15, 24 и 37 °С. Водные растворы криопротекторов были взяты в концентрациях 5, 10, 20, 30 и 40% и охлаждены или нагреты до соответствующих температур перед внесением в них эритроцитов. Для контроля оценивался гемолиз эритроцитов в растворах тех же криопротекторов, но содержащих изотоническую концентрацию NaCl.

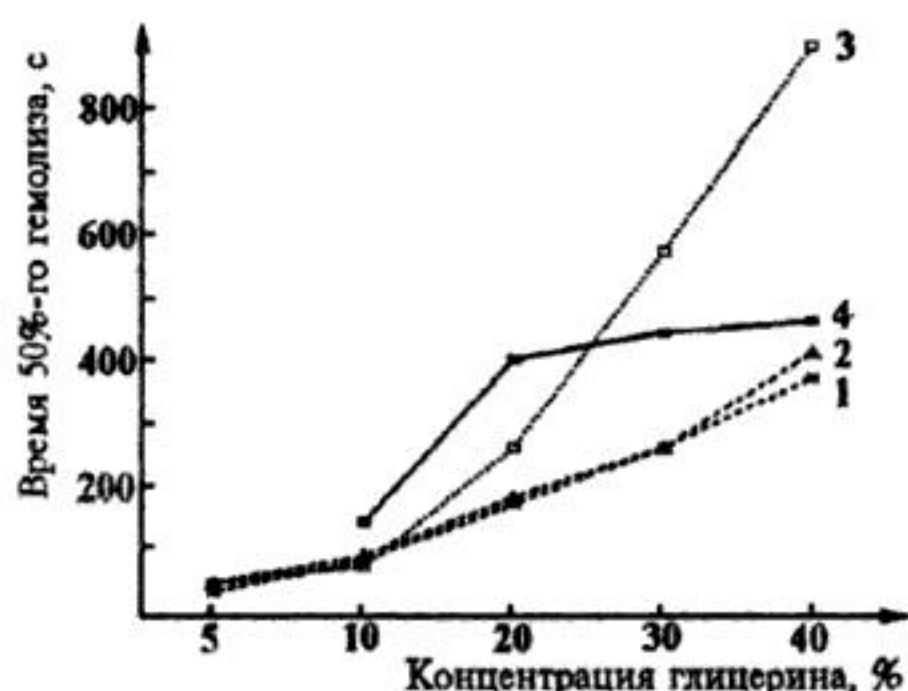


Рис. 1. Зависимость времени 50%-го гемолиза эритроцитов в бессолевых растворах глицерина от его концентрации при различных температурах, °С:
1 – при 37, 2 – при 24, 3 – при 15, 4 – при 8

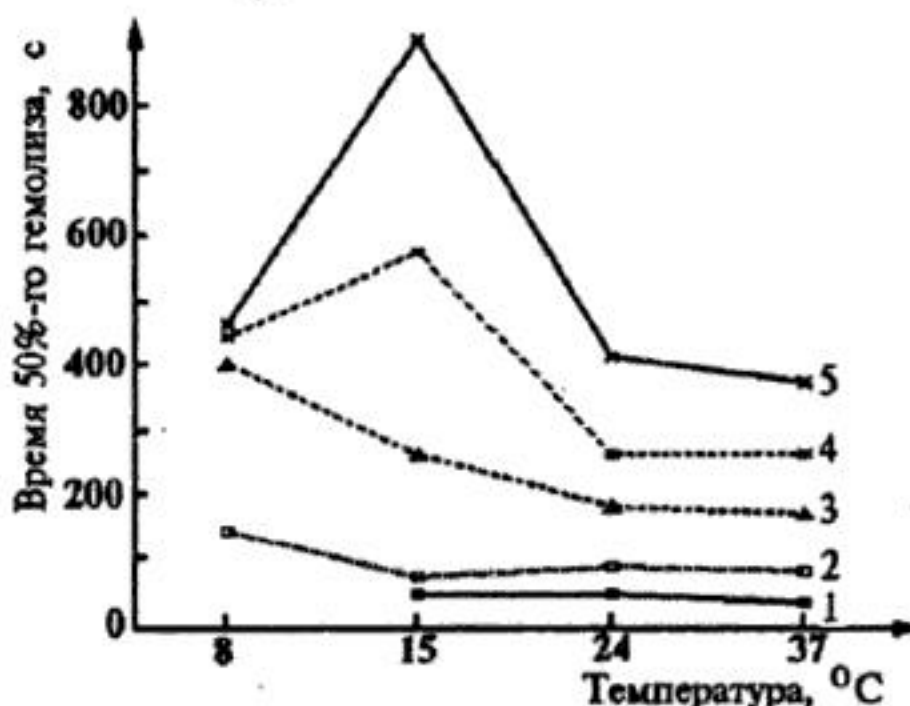


Рис. 2. Зависимость времени 50%-го гемолиза эритроцитов в бессолевых растворах глицерина от температуры:
1 – 5%-й, 2 – 10%-й, 3 – 20%-й, 4 – 30%-й, 5 – 40%-й

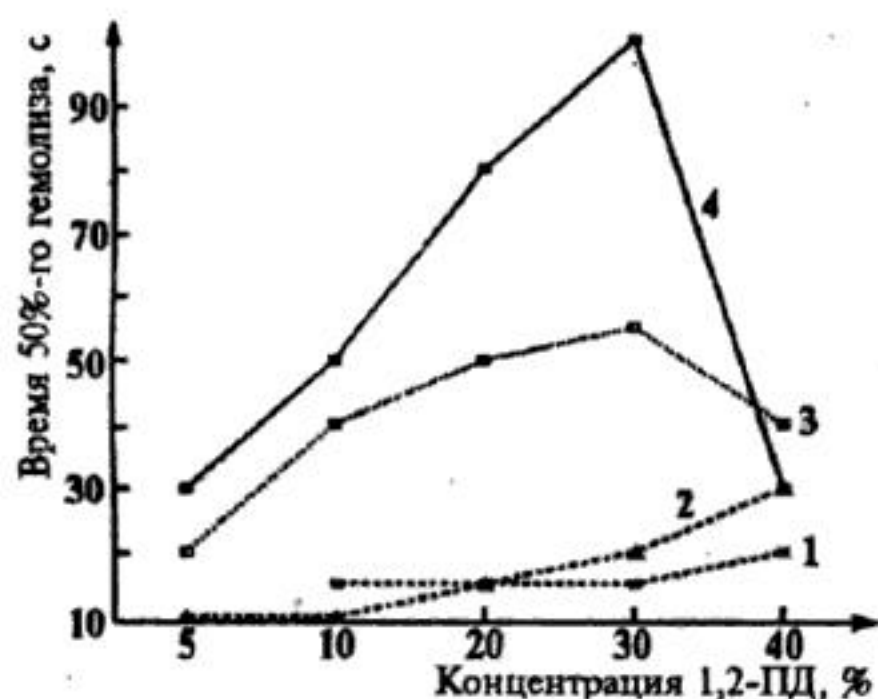


Рис. 3. Зависимость времени 50%-го гемолиза эритроцитов в бессолевых растворах 1,2-пропандиола от его концентрации при различных температурах, °С:
1 – при 37, 2 – при 24, 3 – при 15, 4 – при 8

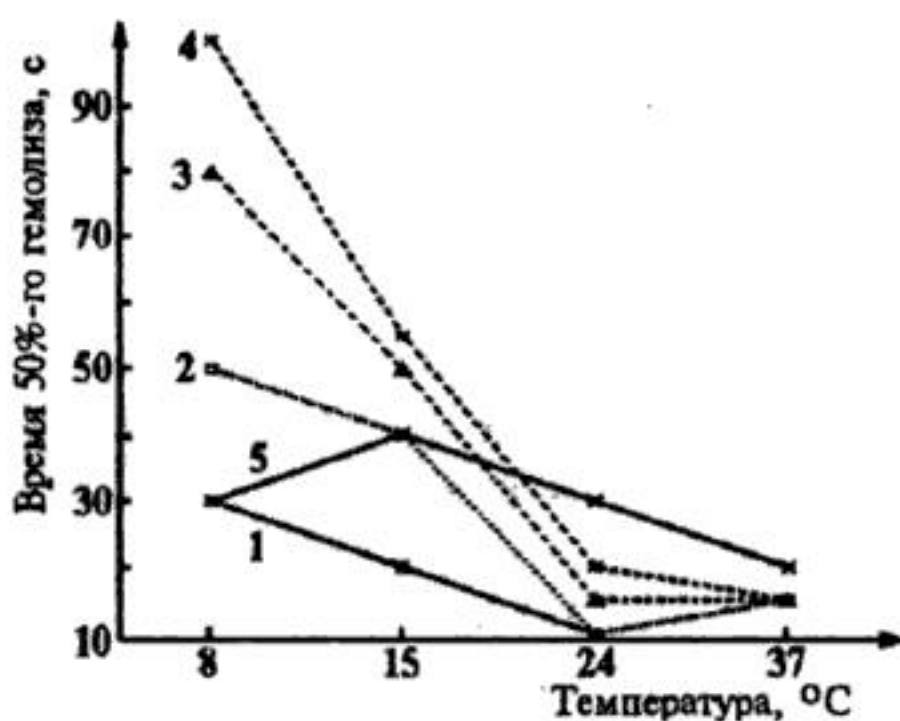


Рис. 4. Зависимость времени 50%-го гемолиза эритроцитов в бессолевых растворах 1,2-пропандиола от температуры: 1 – 5%-й, 2 – 10%-й, 3 – 20%-й, 4 – 30%-й, 5 – 40%-й

Представленные данные в виде зависимостей времени 50%-го гемолиза от температуры и концентрации (рис. 1–4) позволяют высказать следующие соображения. Прежде всего обращает на себя внимание увеличение времени 50%-го гемолиза в водных растворах глицерина и 1,2-пропандиола при повышении концентрации растворов (рис. 1, 3) и при понижении температуры (рис. 2, 4). Эти данные согласуются с известной температурной зависимостью проницаемости: с понижением температуры скорость переноса веществ через клеточную мембрану падает в соответствии с законом Аррениуса. В свою оче-

редь, увеличение времени 50%-го гемолиза при повышении концентрации криопротекторов может быть объяснено тем, что время, требуемое для переноса через клеточную мембрану большего количества вещества, увеличивается.

Наблюдаемая закономерность нарушается в случае растворов повышенных концентраций при температурах 8 и 15 °С. Резкое уменьшение времени 50%-го гемолиза в 30 и 40 %-х растворах глицерина отмечено при температуре 8 °С. В свою очередь, 40 %-й раствор пропандиола давал отклонение кривой температурной зависимости времени 50%-го гемолиза от ее прогнозируемого поведения как при 8 °С, так и при 15 °С. Отмеченные «аномалии» можно было бы объяснить тем, что высокие концентрации криопротекторов, благодаря понижению проницаемости при пониженной температуре, повреждают клетки по механизму гипертонического шока, однако анализ кинетики гемолиза эритроцитов в растворах криопротекторов, содержащих и не содержащих хлористый натрий, не допускает подобного объяснения.

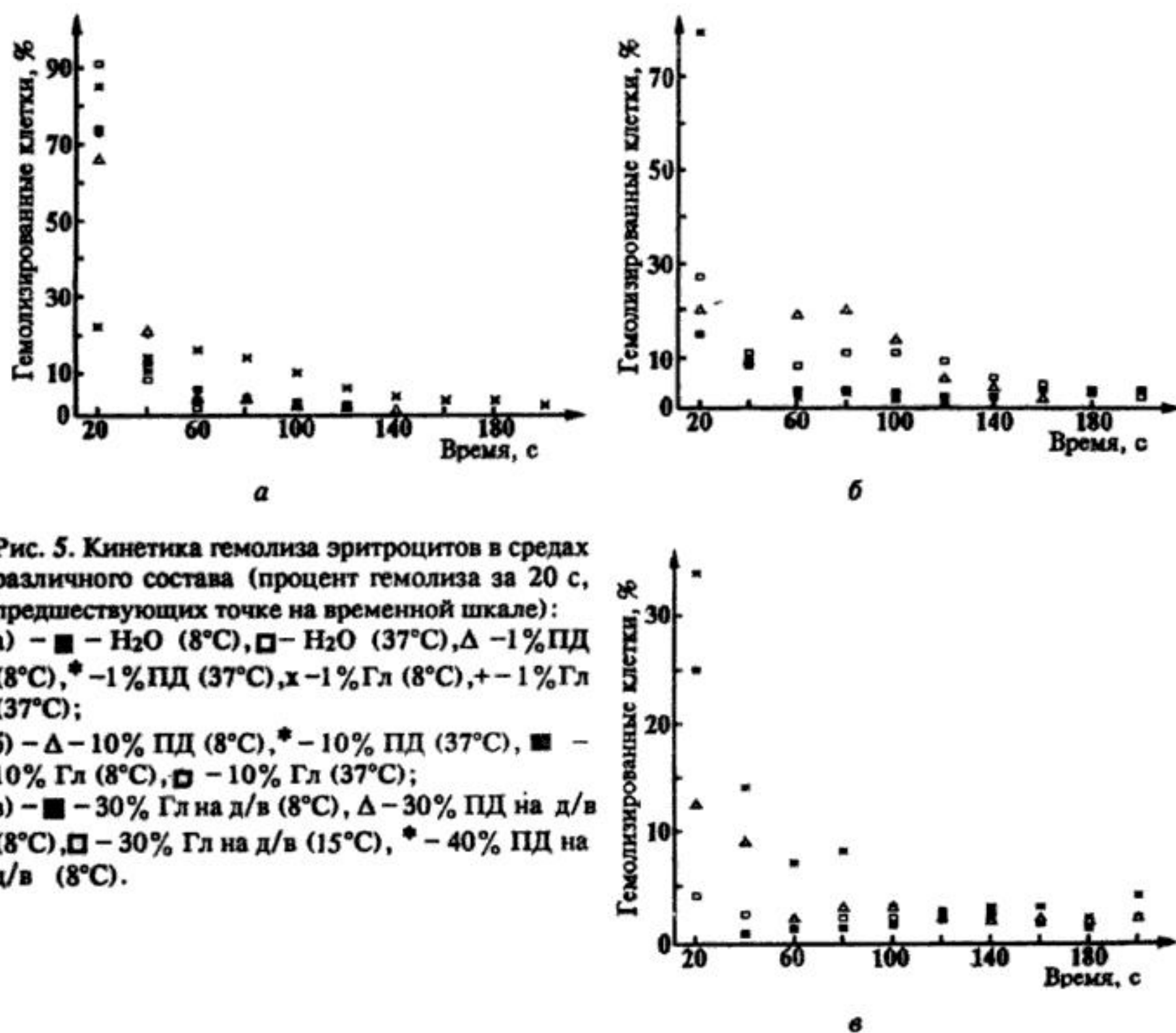


Рис. 5. Кинетика гемолиза эритроцитов в средах различного состава (процент гемолиза за 20 с, предшествующих точке на временной шкале):
а) — ■ — H₂O (8°C), □ — H₂O (37°C), Δ — 1% ПД (8°C), * — 1% ПД (37°C), x — 1% Гл (8°C), + — 1% Гл (37°C);
б) — Δ — 10% ПД (8°C), * — 10% ПД (37°C), ■ — 10% Гл (8°C), □ — 10% Гл (37°C);
в) — ■ — 30% Гл на д/в (8°C), Δ — 30% ПД на д/в (8°C), □ — 30% Гл на д/в (15°C), * — 40% ПД на д/в (8°C).

На гематограммах, представленных на рис. 5, каждой точке временной шкалы поставлен в соответствие процент гемолизировавших за предшествующие 20 °С клеток. Анализ гематограмм показывает, что гемолиз эритроцитов может быть охарактеризован двумя фазами: быстрой, протекающей за 20–40 с, и медленной — до нескольких минут. С повышением концентрации водных растворов криопротекторов и с понижением температуры амплитуда быстрой фазы гемолиза уменьшается, а медленная фаза растягивается во времени. Однако при достижении 30–40 %-х концентраций глицерина и 40 %-й концентрации 1,2-пропандиола эта тенденция нарушается: амплитуда быстрой

фазы гемолиза при пониженных температурах возрастает. Эти данные вполне могли бы соответствовать высказанному нами ранее [1] предположению о том, что при повышении концентрации и понижении температуры осмотически активное вещество с пониженной проникающей способностью повреждает клетки по механизму гипертонического стресса. Такое повреждение должно реализоваться до момента выхода клеток из дегидратированного состояния. Таким образом, можно было бы предположить, что вносимый проявляющийся при повышении концентрации криопротектора и понижении температуры "быстрый гемолиз" связан с гипертоническим стрессом. И действительно, небольшой гемолиз эритроцитов в растворах криопротекторов, содержащих изотоническую концентрацию NaCl, протекающий по типу быстрого гемолиза, мог бы свидетельствовать в пользу такого предположения, однако совершенно неожиданно уровень этого гемолиза оказывается ниже, чем в бессолевых растворах криопротекторов этих же концентраций, хотя, казалось бы, следовало ожидать обратного.

Таким образом, быстрый гемолиз эритроцитов в концентрированных бессолевых растворах криопротекторов, по-видимому, следует связывать не столько с повреждением, сколько с иницирующим проникновением криопротекторов эффектом их повышенных концентраций при пониженной температуре.

При интерпретации полученных в работе данных с позиции теории проницаемости, прежде всего обращает на себя внимание следующее. Увеличение концентрации криопротекторов и понижение температуры обеспечивают сдвиг времени 50%-го гемолиза в сторону больших времен, главным образом путем перераспределения доли клеток, гемолизирующих за малые времена, в достаточно широком температурном диапазоне.

Вообще, говоря о проницаемости в суспензии эритроцитов, всегда следует иметь в виду, что речь идет о весьма гетерогенной популяции, в которой могут присутствовать клетки, скорость насыщения которых криопротектором может значительно различаться. Если считать, что скорость гемолиза отдельных клеток пропорциональна скорости насыщения их криопротектором, то скорости насыщения клеток концентрированными растворами могут различаться почти в 50 раз. Для растворов небольших концентраций такая оценка, к сожалению, затруднена.

В заключение, сравнивая проницаемость эритроцитов для глицерина и 1,2-пропандиола по среднему времени гемолиза при различных концентрациях и температурах, отметим, что 1,2-пропандиол в 8–15 раз быстрее насыщает эритроциты, чем глицерин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Розанов Л.Ф., Розанова Е.Д. Взаимодействие эритроцитов человека с растворами димексида при температурах 5–37 °C // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. – Харьков. – 1990. – С. 140–144.
2. Розанов Л.Ф., Розанова Е.Д., Некоз И.А. Кинетика взаимодействия эритроцитов человека с растворами глицерина и 1,2-пропандиола // Криобиология. – 1989. – № 4. – С. 30–34.
3. Mazur P., Miller P. Permeability of the human erythrocyte to glycerol in 1 and 2M solutions at 0 or 20 °C // Cryobiology. – 1976. – 13, № 5. – P. 507–522.

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

Поступила 16.02.93

Л.Ф. РОЗАНОВ, К.Д. РОЗАНОВА

ГЕМОЛИЗ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ І РОЗЧИНАХ ГЛІЦЕРИНУ І 1,2-ПРОПАНДІОЛА ПРИ ТЕМПЕРАТУРАХ 8–37 °С

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м.Харків

Методом спектрофотометрії вивчена кінетика гемоліза еритроцитів людини у водних розчинах гліцерина, 1,2-пропандіола і розчинах цих речовин, які містять ізотонічну концентрацію хлористого натрію при температурах 8, 15, 24 і 37 °С. Встановлено, що час 50%-го гемолізу еритроцитів у суспензії прогресивно зростає із збільшенням концентрації кріопротекторів із пониженням температури, однак при концентраціях гліцерину 30–40% і концентрації 1,2-пропандіола 40% ця закономірність порушується. Аналіз гематограм не дав можливості пов'язати цю "аномалію" з пошкодженням клітин гіперосмотичним стресом.

L.F.ROZANOV, E.D.ROZANOVA

HEMOLYSIS OF HUMAN RED BLOOD CELLS IN GLYCEROL AND 1.2-PROPANEDIOL SOLUTIONS AT TEMPERATURES OF 8–37 °C

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

The kinetics of hemolysis of human red blood cells (RBC) was studied by a method of spectrophotometry in glycerol and 1.2-propanediol solutions with and without isotonic NaCl concentrations at temperatures of 8, 15, 24 and 37. The duration of the 50% -hemolysis of RBC was found to progressively increase with a rise in cryoprotectant concentration and temperature lowering, though this regularity was not observed when glycerol concentration was 30–40% and 1.2-propanediol concentration equaled 40%. The analysis of hematograms made it impossible to relate such "abnormality" to the cell injury due to hyperosmotic stress.

УДК 57.043:612.111

Л.А.Бабийчук, Н.Г.Землянских

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И КРИОПРОТЕКТОРА ПЭО-1500 НА ХАРАКТЕР МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА И УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

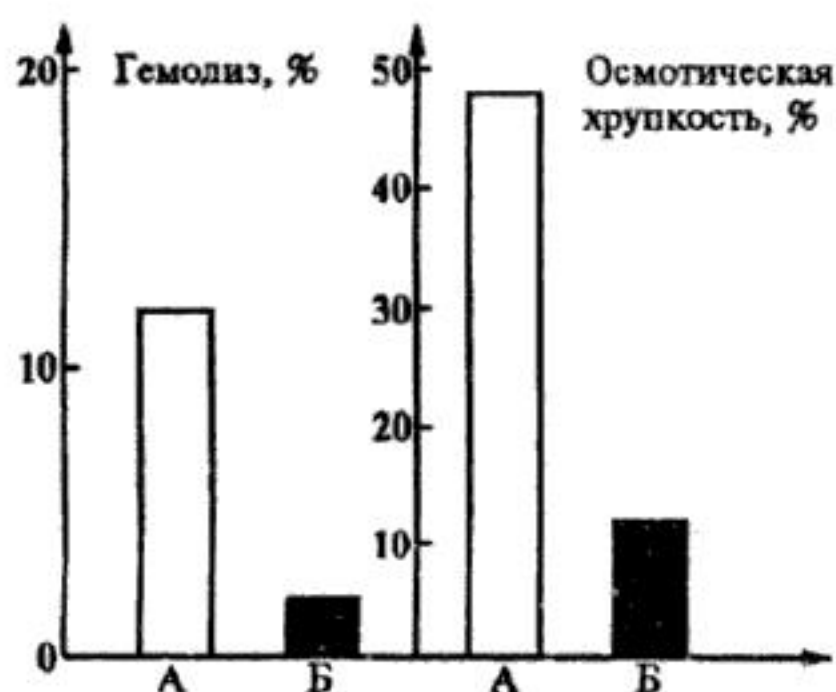
Исследованы оптимальные режимы обработки клеток непроникающим криопротектором полиэтиленоксидом с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500), способствующие повышению их устойчивости к действию факторов низкотемпературного консервирования, а также изучена роль белкового цитоскелета в механизме "адаптации" клеток. Установлено, что холодовая обработка эритроцитов криопротектором ПЭО-1500 в значительной степени повышает их устойчивость к последующему замораживанию-отогреву, и одним из основных факторов приобретения клетками повышенной устойчивости является модификация структурно-функционального состояния белков цитоскелета.

В наших предыдущих исследованиях было установлено, что обработка клеток гипертоническими растворами при 0°C вызывает повышение их устойчивости к последующему замораживанию [1]. При этом выявлено, что в условиях гипертонического и низкотемпературного воздействия происходит деформация плазматической мембраны [2], указывающая на участие в этих процессах липидного слоя мембраны и белков цитоскелета, которые регулируют объем и форму клеток. Вместе с тем детальные механизмы адаптации клеток, роль белков цитоскелета и процессов, регулирующих их структурно-функциональное состояние на уровне целой клетки, во многом остаются невыясненными. Однако можно предположить, что в определенных оптимальных условиях обработки клеток непроникающими криопротекторами реакция белков цитоскелета клеток может быть переориентирована таким образом,

что клетки приобретут повышенную устойчивость к последующему замораживанию-отогреву.

В связи с этим целью данной работы явилось исследование оптимальных режимов обработки клеток непроникающим криопротектором ПЭО-1500 и роли белков цитоскелета в механизме повышения устойчивости клеток к действию факторов низкотемпературного консервирования.

Материалом исследования служили эритроциты донорской крови человека, консервированной на среде "Глюгидир", со сроком хранения до 5 сут. В качестве криопротектора был использован 30 %-й раствор ПЭО-1500, приготовленный на основе 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4, содержащий 150 мМ NaCl. После удаления плазмы к эритромассе добавляли раствор криопротектора 1:1 по объему либо при низкой положительной температуре, либо при комнатной температуре; замораживали в жидком азоте до -196°C . Оттаивание производили на водяной бане при температуре 42°C . Уровень гемолиза после размораживания определяли на спектрофотометре "СФ-46 ЛОМО". Выход ионов K^+ определяли на пламенном фотометре ПАЖ-1 по выходу K^+ во внеклеточную среду. Белые тени получали с помощью гипотонического шока по методу [5]. Изменение состояния белков мембран эритроцитов под влиянием обработки криопротектором и замораживания-оттаивания изучали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Электрофорез белков проводили по методу [5]. Гели сканировали при 540 нм на денситометре "Бекман СД-200". Обработку клеток диамидом проводили так же, как описано в работе [6].



Уровень гемолиза и осмотическая хрупкость эритроцитов, криоконсервированных с ПЭО-1500: А – эритроциты, обработанные криопротектором при комнатной температуре; Б – эритроциты, подвергнутые холодовой обработке

В результате проведенных экспериментов по исследованию оптимальных режимов обработки клеток перед криоконсервированием установлено, что обработка эритроцитов непроникающим криопротектором ПЭО-1500 при низкой положительной температуре способствует развитию повышенной устойчивости клеток к последующему замораживанию-отогреву. Из данных, представленных на рисунке, видно, что после размораживания эритроцитов, подвергнутых холодовой обработке, резко снижается уровень гемолиза по сравнению с клетками, обработанными при комнатной температуре. О высокой сохранности эритроцитов после холодовой обработки сви-

детельствуют также данные, полученные при изучении осмотической хрупкости эритроцитов после размораживания и переноса их в среды с физиологической тоничностью (рис.).

Известно, что добавление к клеткам осмотически активных веществ, в частности непроникающих криопротекторов, может вызвать деформацию плазматической мембраны, интенсивность проявления которой зависит от тоничности среды и температуры [3]. Модификация плазматической мембраны в свою очередь оказывает существенное влияние на барьерные свойства мембраны. В связи с этим была исследована проницаемость плазматической мембраны для ионов K^+ при различных режимах обработки, а также после замораживания-отогрева (табл. 1).

Установлено, что после холодовой обработки эритроцитов видимые изменения проницаемости плазматической мембраны для ионов K^+ отсутствуют. Обработка при комнатной температуре вызывает повышенную утечку калия из клеток. Это связано с тем, что обработка эритроцитов при комнатной температуре приводит к сильно выраженной деформации мембраны [4], в результате чего формируются каналы утечки для ионов. Холодовая обработка клеток не приводит к значительным деформациям мембраны [2], что способствует сохранению барьерных свойств мембраны. После замораживания-отогрева клеток, обработанных при комнатной температуре, наблюдается значительная утечка ионов K^+ , в то время как при холодовой обработке этот процесс выражен значительно слабее.

Т а б л и ц а 1

Выход K^+ при различных способах обработки эритроцитов криопротектором ПЭО-1500

Условия эксперимента	Концентрация K^+ , мМ
Контроль	$4,24 \pm 0,66$
Холодовая обработка раствором ПЭО-1500	$3,82 \pm 0,44$
Обработка раствором ПЭО-1500 при комнатной температуре	$5,70 \pm 0,74$
Замораживание-отогрев после холодовой обработки	$23,36 \pm 2,23$
Замораживание-отогрев после обработки при комнатной температуре	$37,20 \pm 0,99$

Таким образом, холодовая обработка эритроцитов непроникающим криопротектором ПЭО-1500 способствует повышению устойчивости клеток к действию низких температур, что во многом может быть связано с особенностями модификации цитоскелетных белков. Характер модификации цитоскелета эритроцитов в указанных выше экспериментальных условиях оценивали методом электрофореза белков в ПААГ с применением белок-сшивающего реагента — диамида [6]. Диамид окисляет *SH*-группы белков, расположенных на определенном расстоянии друг от друга с образованием *S-S*-связей между полипептидными цепями, в результате чего образуются высокомолекулярные белковые агрегаты, которые выявляются на старте геля.

Данные денситометрии (табл. 2) свидетельствуют о том, что добавление криопротектора при 22 и 0 °С сопровождается различной направленностью в модификации пространственной структуры белков мембранного каркаса эритроцитов. При холодовой обработке образования агрегатов белка не обнаруживается, в то время как при 22 °С добавление ПЭО-1500 приводит к нарушению пространственной структуры, хотя агрегация белков невелика — 2,4%. По-видимому, обработка клеток криопротектором при 0 °С приводит к формированию устойчивой к действию экстремальных факторов структуры цитоскелета. Подтверждением этому служат результаты изучения белкового спектра эритроцитов, которые обрабатывали криопротектором при низкой положительной температуре после замораживания-отогрева. Как видно из данных, представленных в табл. 2, агрегация белков в этом случае составляет 3,8%, а распределение белков по основным фракциям несущественно отличается от спектра нативных эритроцитов. Обработка эритроцитов при комнатной температуре не обеспечивает стабильности цитоскелета при замораживании-отогреве. В результате этого происходит нарушение пространственной

структуры цитоскелета, приводящее к значительной агрегации белков под действием диамида. При этом уровень агрегации сопоставим с агрегацией мембранных белков эритроцитов, замороженных в среде, не содержащей криопротектора. В агрегацию вовлекаются различные белки цитоскелета: спектрин, актин, белок 4.1, белок полосы 3, о чем свидетельствует снижение их содержания в данных фракциях белкового спектра.

Т а б л и ц а 2

Содержание основных фракций белков в мембранах эритроцитов при различных температурных режимах экспонирования с ПЭО-1500 и после замораживания

Условия эксперимента	Мембранные белки (% от общего содержания белка)					
	спектрин	анкирин	белок п.3	белок п.4.1	актин	агрегаты
Нативные эритроциты	17,7	12,5	25,1	9,6	11,3	-
Замораживание без криопротектора	14,0	13,9	17,1	7,7	7,8	14,5
Обработка при комнатной температуре	16,6	10,9	26,5	6,9	9,7	2,4
Замораживание после обработки при комнатной температуре	12,4	9,5	20,8	4,2	4,3	14,0
Холодовая обработка	17,6	10,8	28,3	7,3	10,1	0,5
Замораживание после холодовой обработки	17,8	12,9	26,3	7,8	7,5	3,8

Примечание. Представлены результаты одного типичного эксперимента.

Различный характер модификации цитоскелета эритроцитов в условиях частичной дегидратации под влиянием ПЭО-1500 при 0 и 22 °С определяется, по-видимому, особенностями структурного состояния белков при различных температурах. Так, известно, что при снижении температуры энергетически более выгодным становится тетра- и олигомерная ассоциация спектрина [7]. Возникающие дополнительные связи между белками цитоскелета при формировании олигомерных форм спектрина при 0 °С могут способствовать повышению устойчивости клеток к действию экстремальных факторов криоконсервирования.

В связи с изложенным выше можно заключить, что модификация структурно-функционального состояния белков цитоскелета клеток при их холодовой обработке может явиться одним из основных факторов, определяющих высокую сохранность клеток, низкий уровень гемолиза и осмотической хрупкости эритроцитов после криоконсервирования, а также сохранения барьерных свойств плазматической мембраны.

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. 25–28.
2. Белоус А.М., Гулевский А.К., Бабийчук Л.А. и др. Роль белков цитоскелета в изменении стабильности клеток при температурно-осмотическом воздействии // Криобиология. – 1990. – № 4. – С. 3–13.
3. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах. – Киев: Наук. думка, 1988. – 206 с.

4. *Babiytchuk L.A., Zemlyanskikh N.G.* The mechanism of structural and osmotic adaptation of erythrocytes to cryopreservation // *Cryobiology and Freeze-drying*. – Bulgaria, Sofia, 1989. – P. 31–33.
5. *Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H.* Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // *Biochemistry*. – 1971. – P. 2606–2617.
6. *Haest C.W.H., Kamp D., Plasa G. et al.* Intra and intermolecular cross-linking of membrane proteins in intact erythrocytes and ghosts by SH-oxidizing agents // *Biochem. and Biophys. Acta*. – 1977. – 469, № 2. – P. 226–230.
7. *Morrow J.S., Marchesi V.T.* Self-assembly of spectrin oligomers *in vitro*: a basis for a dynamic cytoskeleton // *J. Cell. Biol.* – 1981. – 88. – P. 463–468.

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

Поступила 15.06.93

Л.О.БАБИЙЧУК, Н.Г.ЗЕМЛЯНСЬКИХ

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ І КРІОПРОТЕКТОРА ПЕО-1500 НА ХАРАКТЕР МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ ЦИТОСКЕЛЕТУ І СТІЙКОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ У ПРОЦЕСІ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Досліджено оптимальні режими обробки клітин непроникаючим кріопротектором поліетилен оксидом з молекулярною масою 1500 (ПЕО-1500), які сприяють підвищенню їх стійкості до дії факторів низькотемпературного консервування, а також вивчена роль білкового цитоскелета у механізмі "адаптації" клітин. Встановлено, що холодова обробка еритроцитів кріопротектором ПЕО-1500 у значній мірі підвищує їх стійкість до наступного заморожування-відігріву і одним із основних факторів підвищення стійкості клітин є модифікація структурно-функціонального стану білків цитоскелету.

L.A.BABIYCHUK, N.G.ZEMLYANSKIKH

EFFECT OF TEMPERATURE AND PEO-1500 CRYOPROTECTANT ON THE NATURE CYTOSKELETAL PROTEIN MODIFICATION AND RED BLOOD CELL STABILITY DURING CRYOPRESERVATION

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

The report deals with the investigation of the optimal modes of cell treatment by a non-penetrating cryoprotectant polyethylene oxide with molecular mass of 1500 (PEO-1500). These modes facilitate a rise in cell resistance to the action of the low temperature preservation factors. The role of protein cytoskeleton in the mechanism of cell "adaptation" was also studied. Cold treatment of red blood cells (RBC) by a PEO-1500 cryoprotectant was shown to considerably increase their resistance to subsequent freeze-thawing, and one of the basic factors, imposing an increased resistance to the cells, is modification of the structural-functional state of cytoskeletal proteins.

УДК 57.043

В.В.Рамазанов, С.В.Руденко, В.А.Бондаренко

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАТОРОВ ЦИТОСКЕЛЕТА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ ШОКУ ПРИ ПОВЫШЕНИИ ОСМОЛЯРНОСТИ СРЕДЫ ПРЕДИНКУБАЦИИ

Исследовалась чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку после обработки клеток реагентами, модифицирующими взаимодействие цитоскелета с липидным бислоем мембраны. Показано, что направленность действия диизотиоцианостильбендисульфоната (ДИДС) зависит от осмолярности среды прединкубации. Обработка эритроцитов парахлормеркурийбензоатом (ПХМБ) приводит к устранению способности клеток приобретать устойчивость к гипертоническому шоку и изменять свою форму при возрастании осмолярности среды прединкубации.

Известно, что повышение осмолярности среды прединкубации до величины 0,7 осмоль, приводит к росту устойчивости эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 4 М NaCl. Данный эффект связывают со стабилизацией комплекса цитоскелет-мембрана в условиях частичной дегидратации клетки [2]. При этом характерные дискоидные эритроциты кренируют и клетки приобретают эхиноцитарные формы. Эхиноцитарные формы эритроцитов, которые при повышении осмолярности среды предшествуют уплощенным формам, являются наиболее устойчивыми к гипертоническому шоку, тогда как уплощенные формы наиболее чувствительны к холодовому и гипертоническому шоку [1].

При осмотическом воздействии на эритроциты изменения объема клеток сопровождаются изменениями в их форме. Направленность таких изменений должна отражать динамику структурных взаимодействий в мембранном комплексе цитоскелет-бислой как в интактных, так и в модифицированных клетках [1]. Учитывая то, что эхиноцитарная форма эритроцитов является переходной при повышении осмолярности среды, степень эхиноцитоза была использована в работе в качестве показателя реакции клеток на осмотический стресс.

В статье исследуется чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку, а также изменение формы эритроцитов в растворах, содержащих возрастающие концентрации сахарозы, после обработки клеток реагентами, модифицирующими взаимодействие белка полосы 3 с мембранным скелетом. В работе использовались эритроциты, полученные из донорской крови 2-й группы. Клетки суспендировали с 20 %-м гематокритом и обрабатывали последовательно иодоацетамидом (15 мМ, 37 °С, 60 мин) и ПХМБ (1 мМ, 37 °С, 60 мин), как описано в работе [3]. ДИДС в количестве 30 мкМ добавлялся непосредственно в среду инкубации при проведении экспериментов. Эритроциты инкубировали 2 мин при 37 °С в растворах, содержащих 0,27-1,1 М сахарозы и 20 мМ фосфата (рН 7,4), добавляли глутаровый альдегид в конечной концентрации 1 % и выдерживали 60 мин при комнатной температуре. Количество эхиноцитов подсчитывали в световом микроскопе. Результат выражался в степени эхиноцитоза клеток (%). Чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 М NaCl исследовали после инкубации клеток в растворах, содержащих 0,27-1,1 М сахарозу [2].

Полученные результаты показали, что повышение концентрации сахара-

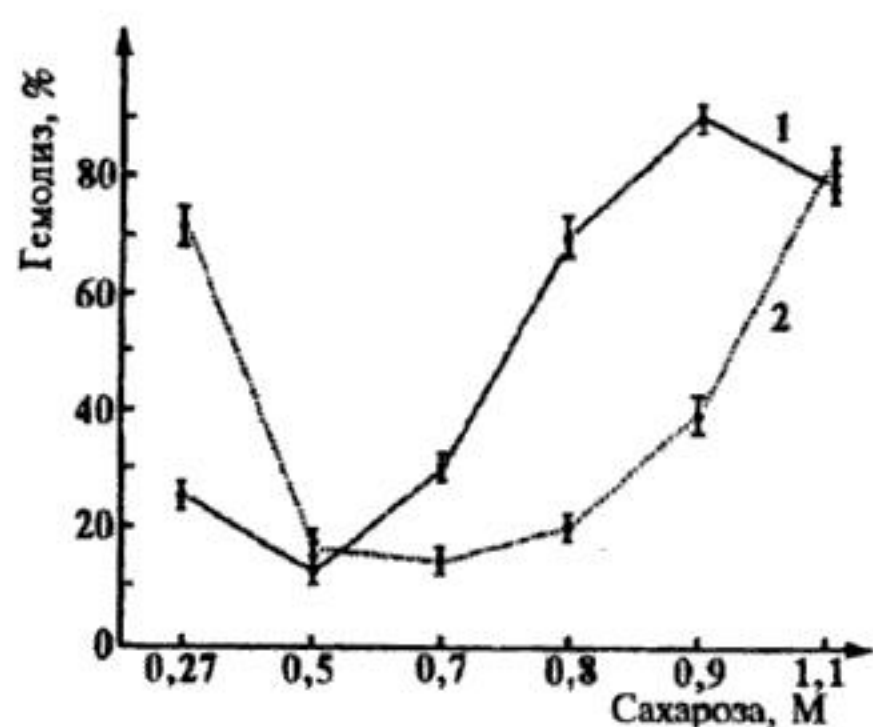


Рис. 1. Чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 М NaCl после инкубации 2 мин (37 °С) в растворах, содержащих сахарозу: 1 — контроль, 2 — ДИДС, 30 мкМ

розы в среде прединкубации эритроцитов до 0,5 М приводит к возрастанию устойчивости клеток к гипертоническому шоку (рис.1). Повышение концентрации сахарозы от 0,5 до 0,86 М приводит к снижению устойчивости эритроцитов к гипертоническому шоку. Присутствие в среде прединкубации ингибитора анионного транспорта ДИДС приводит к значительному возрастанию чувствительности клеток к гипертоническому шоку после инкубации их в растворе, содержащем 0,27 М сахарозы (рис.1). Если среда прединкубации содержит сахарозу в концентрации 0,5 М, то присутствие

ДИДС не вызывает сдвига чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку. Повышение концентрации сахарозы в среде прединкубации от 0,5 до 1,1 М приводит к тому, что присутствие ингибитора начинает проявлять блокирующее действие на гипертонический шок (рис.1). В растворе, содержащем 0,5 М сахарозы не отмечается развитие чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку в течение 60 мин прединкубации клеток, как в отсутствие ДИДС, так и в присутствии данного ингибитора (рис.2). Если в растворе прединкубации содержится сахароза в концентрации 0,7 М, то отмечается возрастание чувствительности клеток к гипертоническому шоку. Присутствие ДИДС в последнем случае приводит к снижению уровня повреждения эритроцитов при гипертоническом шоке, однако и в присутствии ингибитора наблюдается нарастание чувствительности во времени (рис.2).

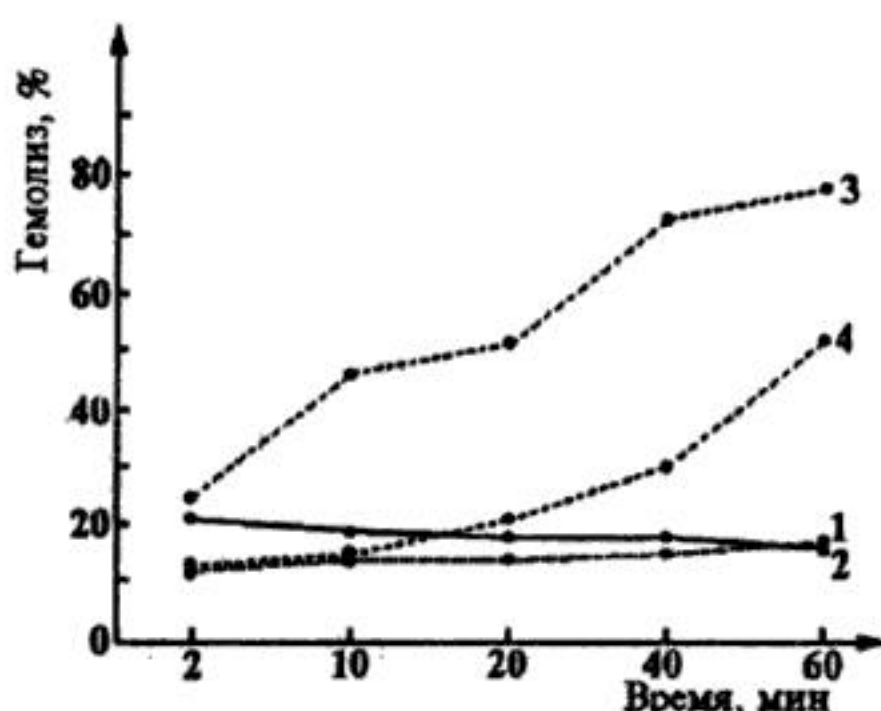


Рис. 2. Чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 М NaCl после инкубации 2-60 мин (37 °С) в растворах, содержащих сахарозу: 1,2 – 0,5 М, 3, 4 – 0,7 М; 1,3 – контроль, 2,4 – ДИДС, 30 мкМ

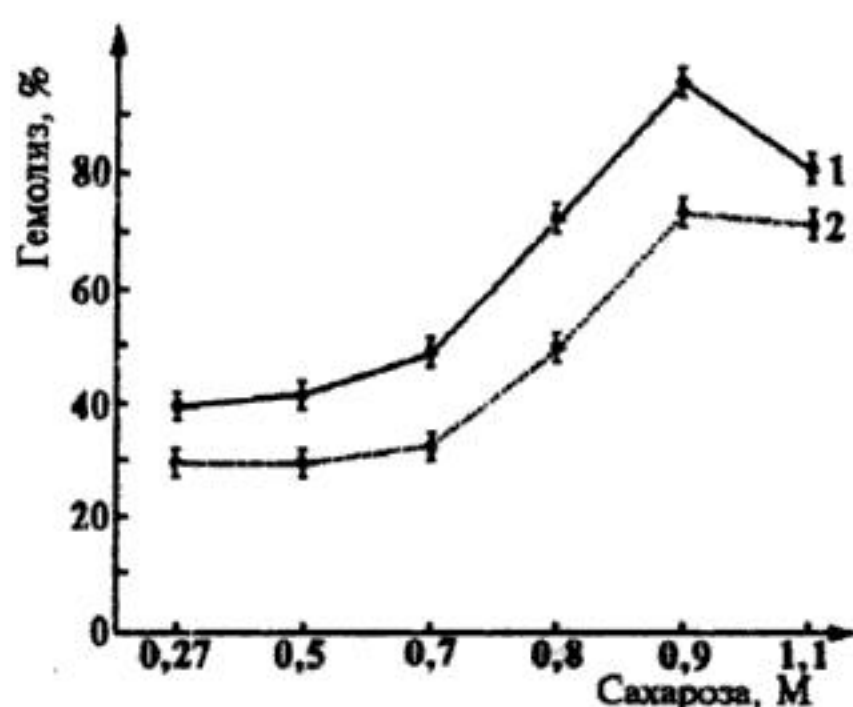


Рис. 3. Чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 М NaCl после инкубации 2 мин (37 °С) в растворах, содержащих сахарозу: 1 – ПХМБ, 2 – ПХМБ+ДИДС

Обработка эритроцитов иодоацетамидом и ПХМБ приводит к тому, что уровень гипертонического шока после инкубации клеток в растворах, содержащих 0,27-0,7 М сахарозы повышается, причем таким образом, что эффект снижения чувствительности, который отмечался в интактных клетках, при повышении концентрации сахарозы в среде прединкубации до 0,5 М (рис.1) устраняется (рис.3). Кроме того, сенсibiliзирующее действие ДИДС на гипертонический шок, которое отмечалось для интактных эритроцитов, после инкубации их в изотоническом растворе сахарозы (рис.1) также устраняется и его присутствие приобретает некоторое ингибирующее действие (рис.3).

Возрастание концентрации сахарозы в среде инкубации до 0,5 М приводит к эхиноцитозу 90% клеток (рис.4, кривая 1). В интервале концентраций сахарозы 0,7-1,1 М степень эхиноцитоза эритроцитов уменьшается, что коррелирует с возрастанием чувствительности клеток к гипертоническому шоку (рис.1). Присутствие ДИДС вызывает 100%-й эхиноцитоз эритроцитов при концентрации сахарозы в среде инкубации 0,27-0,5 М. При концентрациях сахарозы 0,7-1,1 М степень эхиноцитоза клеток также выше, чем в контроле, однако снижение степени эхиноцитоза при возрастании осмолярности в присутствии ДИДС может говорить об обратимости действия ингибитора на осмотически-индуцированные изменения формы эритроцитов (рис.4, кривая 2).

Обработка эритроцитов иодоацетамидом и ПХМБ приводит к эхиноцитозу и почти к полной потере способности таких модифицированных клеток трансформироваться при повышении осмолярности среды (рис.5, кривая 2).

Присутствие ДИДС в среде инкубации вызывает дополнительный эхиноцитоз эритроцитов со 100%-м результатом при всех концентрациях сахарозы (рис.5, кривая 3).

Характер зависимости чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку от осмолярности среды прединкубации в присутствии ДИДС подобен зависимости в отсутствие ингибитора, т.е. имеется область осмолярности, в которой происходит снижение чувствительности, и область осмолярности, в которой происходит рост чувствительности клеток к переносу в 3 М NaCl (рис.1). Обработка эритроцитов ПХМБ приводит к устранению описанного

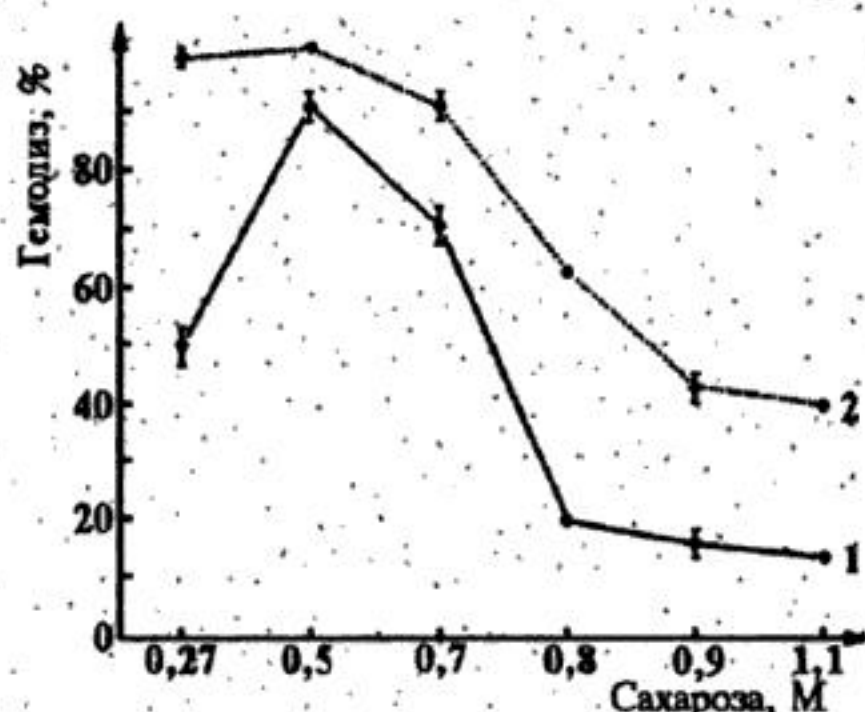


Рис. 4. Влияние ДИДС на изменение формы эритроцитов при повышении осмолярности среды: 1 – контроль, 2 – ДИДС, 30 мкМ

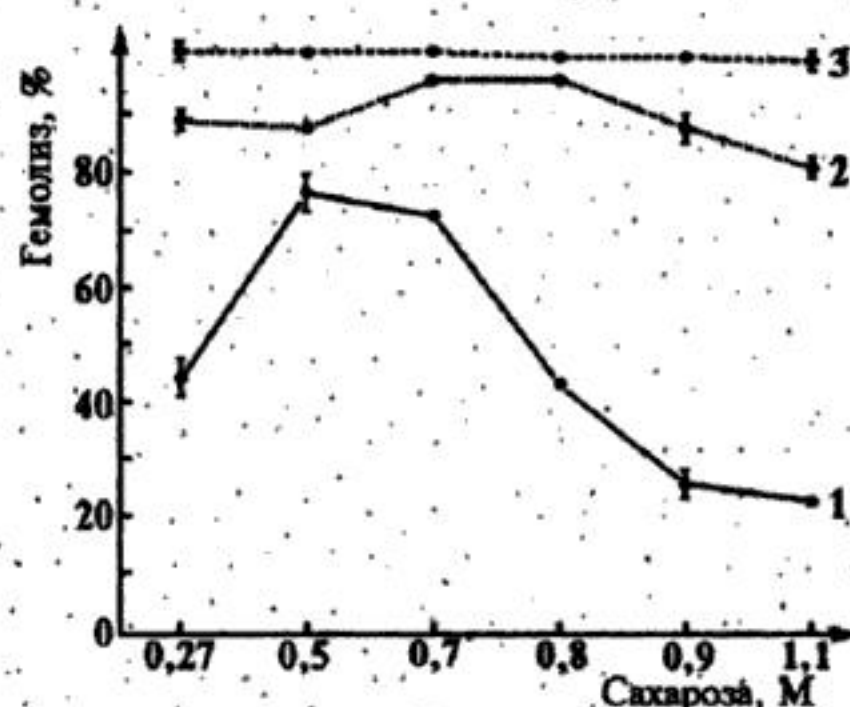


Рис. 5. Влияние обработки ПХМБ на изменение формы эритроцитов при повышении осмолярности среды: 1 – контроль, 2 – ПХМБ, 3 – ПХМБ+ДИДС

характера зависимостей чувствительности клеток к гипертоническому шоку как в отсутствие ДИДС, так и в его присутствии (рис.3). Известно, что связывание ДИДС в мембранах эритроцитов с белком полосы 3 приводит к возрастанию прочности связи указанного белка с компонентами цитоскелета [4]. Обработка эритроцитов ПХМБ не изменяет параметров связывания ДИДС, в то же время подобная обработка теней эритроцитов приводит к экстракции анкирина из мембран [3]. В этом случае причиной устранения действия ДИДС на гипертонический шок эритроцитов, модифицированных ПХМБ, может являться изменение взаимодействий белка полосы 3 с компонентами цитоскелета, опосредованное анкирином. Если изменение направленности действия ДИДС, зависимо от осмолярности среды, происходит при условии немодифицированного взаимодействия белка полосы 3 с белками цитоскелета, тогда возрастание осмолярности должно приводить к изменениям такого взаимодействия при связывании ДИДС. В таком случае можно предположить, что повышение осмолярности среды приводит к модификации взаимодействий белка полосы 3 с белками цитоскелета, причем таким образом, что модификация этих взаимодействий при повышении концентрации сахарозы до 0,5 М приводит к возрастанию устойчивости эритроцитов к гипертоническому шоку, тогда как модификация при возрастании концентрации сахарозы выше 0,5 М приводит к повышению чувствительности. Тогда при концентрации сахарозы в среде прединкубации 0,5 М устанавливается взаимодействие между белком полосы 3 и цитоскелетом, которое отвечает наиболее максимальной устойчивости эритроцитов к гипертоническому шоку (рис.1). Причем данное взаимодействие, по-видимому, уже не модифицируется ДИДС, на это указывает тот факт, что ингибитор не вызывает значительного сдвига чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку даже во временном интервале

прединкубации клеток до 60 мин (рис.2). Присутствие же ДИДС в изотоническом растворе прединкубации вызывает значительный рост гемолиза эритроцитов после переноса их в 3 М NaCl (рис.1). В растворе, содержащем 0,7 М сахарозы, по сравнению с раствором, содержащим 0,5 М сахарозы в присутствии ДИДС, отмечается возрастание некоторой устойчивости эритроцитов к гипертоническому шоку (рис.1), однако прединкубация во времени выявляет развитие чувствительности в первом случае, но не во втором (рис.2).

Модификация взаимодействия белка полосы 3 с белками цитоскелета при связывании ДИДС может оказать существенное влияние на изменение формы эритроцитов в условиях возрастающей осмолярности (рис.1). Если принять во внимание предположение о том, что контроль формы эритроцитов происходит при непосредственном взаимодействии цитоскелета с липидным бислоем мембраны [5], то усиление взаимодействия белка полосы 3 с белками цитоскелета при связывании ДИДС [4] должно привести к торможению динамического взаимодействия белков цитоскелета с липидным бислоем мембраны в условиях осмотического воздействия. Обработка эритроцитов ПХМБ, которая приводит к модификации взаимодействий белка полосы 3 с цитоскелетом [3], устраняет способность клеток изменять свою форму при повышении осмолярности среды (рис.5). Данный результат указывает на необходимость упомянутой связи цитоскелета с мембраной при изменении формы клеток в условиях возрастающей осмолярности.

Известно, что обработка эритроцитов ДИДС не вызывает изменения количественного и качественного состава белков в мембране [4]. Способность клеток изменять свою форму в присутствии ДИДС в области концентраций сахарозы 0,7-1,1 М (рис.4, кривая 2) указывает на обратимую модификацию ингибитором взаимодействий белка полосы 3 с белками цитоскелета в условиях возрастающей осмолярности. Известно также, что процесс формотрансформации эритроцитов опосредуется через контакты цитоскелета с мембраной на уровне анкирина и белка 4.1 [6]. Необратимое устранение изменений формы клеток, индуцированной осмотическим стрессом, наступает после обработки эритроцитов реагентами, модифицирующими взаимодействие цитоскелета с мембраной в области контактов белок полосы 3 - анкирин - цитоскелет (рис.5). Нарушение указанной связи приводит к эхиноцитозу и к значительной потере способности таких эритроцитов изменять свою форму в условиях возрастающей осмолярности. Существует предположение, что наиболее устойчивыми формами эритроцитов к гипертоническому шоку являются эхиноциты [2]. Данное предположение верно в случае эхиноцитов, образованных при осмотическом воздействии, т.е., когда среда прединкубации содержит 0,5 М сахарозы (рис.1,4). Однако возрастание количества эхиноцитов в присутствии ДИДС в среде инкубации, содержащей 0,27 М сахарозы (рис.4), сопровождается значительным ростом чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку (рис.1). Обработка эритроцитов ПХМБ, которая приводит к значительному эхиноцитозу (рис.5), также приводит к росту чувствительности клеток к гипертоническому шоку после инкубации в растворах, содержащих 0,27-0,7 М сахарозы (рис.1,3).

Таким образом, развитие чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку при повышении осмолярности среды прединкубации происходит вследствие модификации взаимодействий белка полосы 3 с компонентами цитоскелета. Нарушение указанных взаимодействий приводит к устранению механизма, посредством которого при повышении в среде прединкубации кон-

концентрации сахарозы до 0,5 М эритроциты приобретали устойчивость к гипертоническому шоку.

Действие ингибитора анионного транспорта ДИДС на изменения формы эритроцитов, индуцированные осмотическим стрессом, опосредуется модификацией взаимодействия белка полосы 3 с белками цитоскелета.

Повышение концентрации сахарозы в среде прединкубации до 0,5 М приводит к эхиноцитозу эритроцитов и снижению чувствительности клеток к гипертоническому шоку. Напротив, образование эхиноцитарных форм эритроцитов при обработке их модификаторами взаимодействия цитоскелета с мембраной приводит к росту чувствительности клеток к гипертоническому шоку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дисс....д-ра биол. наук. – Харьков 1988. – 30 с.
2. Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дисс.... канд. биол. наук. – Харьков. – 1989. – 16 с.
3. Clark S.J., Ralston G.B. The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membranes brought about by p-mercuribenzenesulfonate // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – 1021. – P. 141–147.
4. Hsu L., Morrison M. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components // Arc. Biochem. Biophys. – 1983. – 227. – № 1. – P. 31–38.
5. Johnson R.M., Taylor G., Meyer D. Shape and volume changes in erythrocyte ghosts and spectrin-actin networks // The J. Cell Biol. – 1980. – 86. – P. 371–376.
6. Nakao M., Jinbu Y., Sato S. et al. Structure and function of red cell cytoskeleton // Biomed. Biochim. Acta. – 1987. – 46, № 2–3. – P. 55–59.

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

Поступила 27.07.93

В.В.РАМАЗАНОВ, С.В.РУДЕНКО, В.А.БОНДОРЕНКО

ВПЛИВ МОДИФІКАТОРІВ ЦИТОСКЕЛЕТА НА ЧУТЛИВИСТЬ ЭРИТРОЦИТІВ ДО ГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ ПРИ ПІДВИЩЕННІ ОСМОЛЯРНOSTІ СЕРЕДОВИЩА ПРЕДІНКУБАЦІЇ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, Харків

Досліджувалась чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку після обробки клітин реагентами, які порушують взаємину цитоскелету з ліпідним бішаром мембрани. Виявлено, що направлення дії ДІДС залежить від осмолярності розчину предінкубації. Обробка еритроцитів ПХМБ призводить до усунення здібності клітин набувати стійкість до гіпертонічного шоку і змінювати свою форму при підвищенні осмолярності середовища інкубації.

V.V.RAMAZANOV, S.V.RUDENKO, V.A.BONDARENKO

EFFECT OF CYTOSKELETAL MODIFYING AGENTS ON SUSCEPTIBILITY OF RED BLOOD CELLS TO HYPERTONIC STRESS WHEN INCREASING OSMOLARITY OF PRE-INCUBATION MEDIUM

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

Susceptibility of red blood cells (RBC) to hypertonic stress was studied following treatment of cells by reagents, modifying interaction of cytoskeleton with membrane lipid bilayer. The direction of the effect of diizotocyanostilbene disulphonate (DIDS) depended on the osmolarity of pre-incubation medium. Treatment of RBC by parachlormercurium benzoate (PCMB) eliminates the ability of cells to become resistant to hypertonic stress and alter their shape when increasing osmolarity of pre-incubation medium.

**А.К.Гулевский, И.Я.Клейнбок, О.С.Терещенко,
С.Г.Колаева, В.Н.Доронин, Е.Ж.Габдуллина,
Д.А.Игнатъев**

**ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИИ ПОЛИПЕПТИДОВ 1–10 кД ИЗ МОЗГА
ГИБЕРНИРУЮЩИХ СУСЛИКОВ (*CITELLUS UNDULATUS*)
НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ТЕРМОРЕЦЕПТОРОВ КОШКИ
(*FELIS VULGARIS*)**

Приведены результаты исследований влияния фракции полипептидов 1–10 кД, выделенной из мозга гибернарующих сусликов (*Citellus undulatus*) на функционирование терморецепторов гомойотермного животного – кошки (*Felis vulgaris*). Установлено, что после аппликации раствора фракции полипептидов 1–10 кД на рецепторное поле холодового рецептора кожи кошки достоверно увеличивается появление межимпульсных интервалов длительностью до 320 мс. Специфическое действие фракции полипептидов 1–10 кД из мозга гибернарующего суслика *Citellus undulatus* на холодовые рецепторы проявляется как при исходной температуре исследуемого участка кожи кошки, так и при холодовом воздействии в область рецепторного поля.

Ранее было показано, что пептидная фракция 1–10 кД, выделенная из различных органов и тканей гибернарующих сусликов и холодоадаптированной якутской лошади, вызывает при введении в организм гетеро- и гомойотермных животных ряд физиологических реакций, характерных для состояния спячки: гипотермию, брадикардию, гипометаболический эффект и др. [2, 4, 15, 21]. По имеющимся данным, это обусловлено содержанием во фракции 1–10 кД нейропептидов, способных взаимодействовать с клеточными рецепторами и ионтранспортными системами [1, 8–10]. Можно было предположить, что среди регуляторных нейропептидов, обеспечивающих управление зимней спячкой, находятся нейропептиды, регулирующие активность терморецепторов, роль которых в реакции на холодовое воздействие чрезвычайно велика.

В связи с вышеизложенным представляло интерес изучить влияние фракции полипептидов 1–10 кД, выделенной из мозга гибернарующих сусликов (*Citellus undulatus*), на функционирование терморецепторов гомойотермного животного – кошки (*Felis vulgaris*).

В острых экспериментах на кошках с использованием термомеханостимуляции исследовались изменения текущей импульсной активности афферентных волокон дорсальных корешков спинного мозга, связанных с терморецепторами кожи задней конечности. Подготовка животных, способы термостимуляции и регистрации импульсных характеристик терморецепторов подробно описаны ранее в работах [5, 7]. В данной работе использовалась фракция полипептидов 1–10 кД уксуснокислого экстракта мозга гибернарующих сусликов (*Citellus undulatus*), выделенная путем последовательного фракционирования с помощью ультрафильтров РМ-10 и УМ-2 (“Амикон”) [10]. Предварительное тестирование физиологической активности исследуемой фракции полипептидов 1–10 кД проводили по методу [4].

Работа проведена на 6 половозрелых кошках (*Felis vulgaris*), массой 2,4–4,0 кг. Были выявлены 23 термомеханочувствительные единицы. Все они обладали фоновой активностью, 6 из них были отнесены к тепловым, а 17 – к холодовым. По характеру изменения частоты импульсной активности при температурном воздействии изученные единицы полностью соответствовали критериям, описанным для холодовых и тепловых рецепторов [6, 13–16].

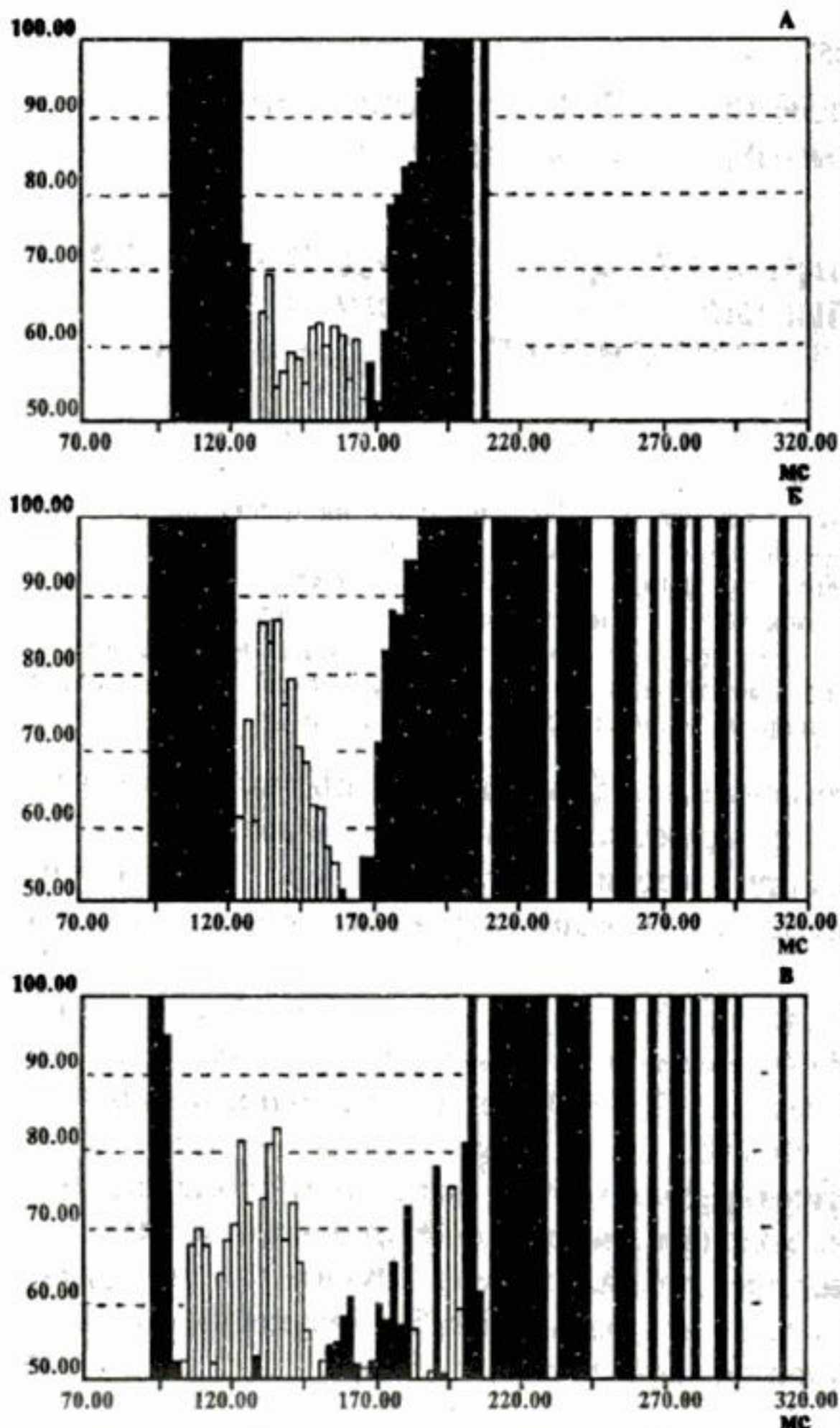


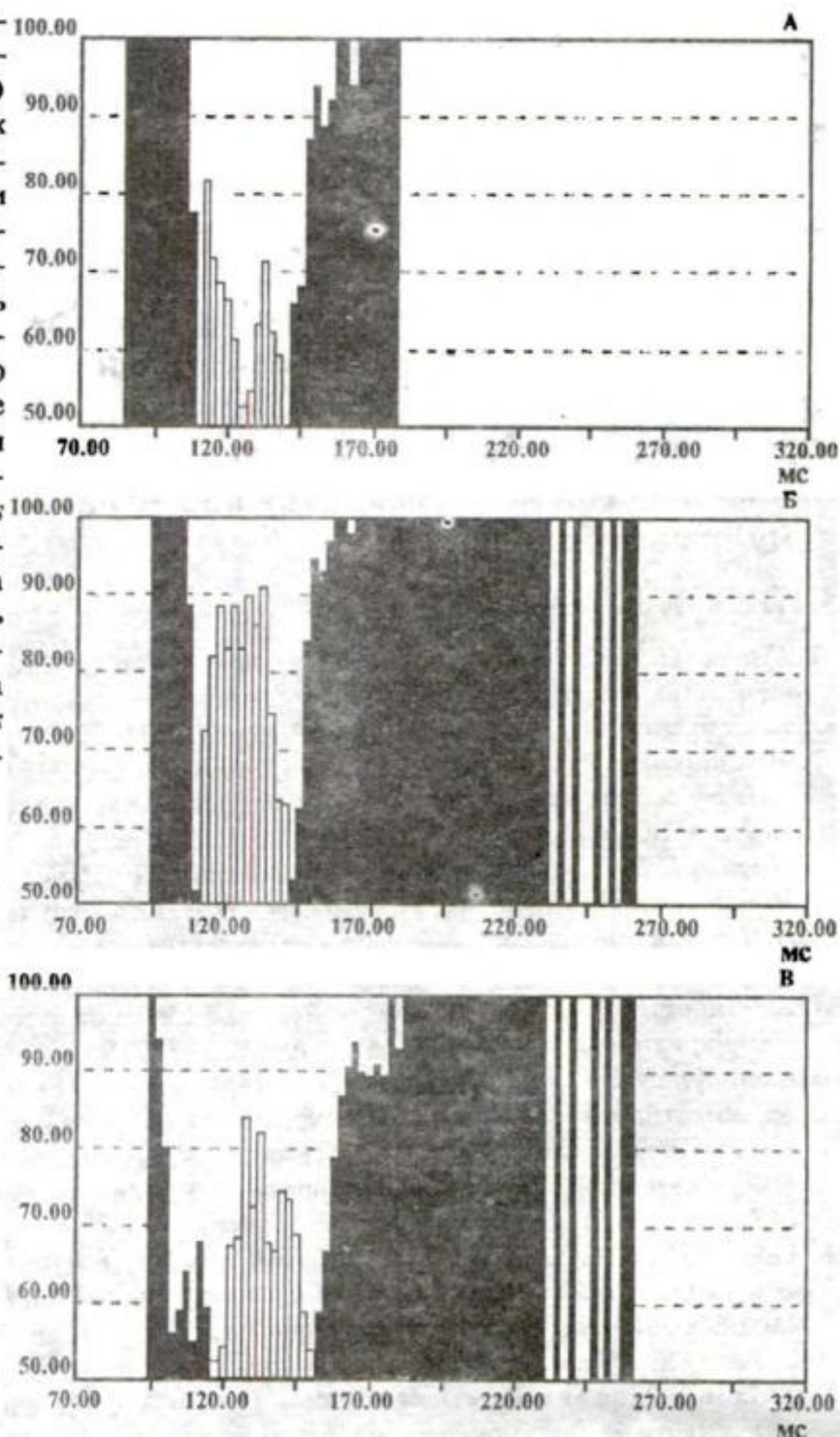
Рис. 1. Влияние фракции полипептидов 1–10 кД из мозга гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*) на распределение межимпульсных интервалов импульсной активности холодного рецептора кожи кошки (*Felis vulgaris*): А – □ – контроль до аппликации, ■ – контроль после аппликации раствора альбумина (1 мг/л), Б – □ – контроль до аппликации, ■ – контроль после аппликации раствора фракции полипептидов 1–10 кД из мозга гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*) (1 мг/л); В – □ – контроль после аппликации раствора альбумина (1 мг/л), ■ – контроль после аппликации раствора фракции полипептидов 1–10 кД из мозга гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*) (1 мг/л). Различия достоверны при $\leq 0,001$.

После выяснения температурной модальности исследуемого рецептора (теплового или холодного) на кожу в области его локализации апплицировались исследуемые растворы, время экспозиции аппликации в экспериментах было 10 мин. Для примера разберем реакцию одного из холодных рецепторов. Афферентное волокно локализовалось в дорсальном корешке

шестого поясничного сегмента спинного мозга, связанный с ним терморептор — в коже задней конечности кошки. До воздействия (контроль) регистрировались четко выраженные флуктуации средней частоты импульсной активности от 6 до 7 имп/с. Прикосновение к коже в области рецептора термодом индифферентной температуры вызвало увеличение средней частоты активности до 8,7 имп/с. Поскольку температура термоды и кожи под ним была одинакова, то увеличение частоты возможно за счет реакции рецептора на механическое воздействие. Далее температура термоды была понижена до 5 °С, частота импульсной активности исследуемого рецептора в этом случае увеличилась до 10,9 имп/с. Повышение температуры термоды до 45 °С вызвало снижение частоты импульсной активности примерно до 5,5 имп/с. Новое понижение температуры термоды до температуры кожи кошки вызвало увеличение уровня средней частоты импульсной активности и появление флуктуаций. Анализ полученных данных позволяет заключить, что проводилась регистрация активности холодного рецептора, реагировавшего и на механическое воздействие.

Далее проводился анализ распределения временных интервалов импульсной активности холодного рецептора после аппликации в область его локализации исследуемых растворов. Так, после аппликации раствора альбумина

Рис. 2. Влияние фракции полипептидов 1–10 кД из мозга гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*) на распределение межимпульсных интервалов импульсной активности холодового рецептора кожи кошки (*Felis vulgaris*) на фоне холодового воздействия: А – □ – контроль до аппликации, ■ – контроль после аппликации раствора альбумина (1 мг/л), Б – □ – контроль до аппликации, ■ – контроль после аппликации раствора фракции полипептидов 1–10 кД из мозга гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*) (1 мг/л); В – □ – контроль после аппликации раствора альбумина (1 мг/л), ■ – контроль после аппликации раствора фракции полипептидов 1–10 кД из мозга гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*) (1 мг/л). Различия достоверны при $\leq 0,001$.



(1 мг/л) (рис. 1, А) достоверно регистрировали появление коротких межимпульсных интервалов (от 100 до 135 мс) и длинных (от 170 до 208 мс). После аппликации фракции полипептидов 1–10 кД из мозга *Citellus undulatus* (1 мг/л) также увеличивалось появление коротких межимпульсных интервалов, в то же время достоверно возросло появление импульсных интервалов длительностью до 320 мс (рис. 1, Б). Учитывая, что при аппликации обоих растворов вероятность появления коротких интервалов приблизительно одинакова, а интервалы длительностью от 208 до 320 мс появляются только при аппликации полипептидной фракции 1–10 кД, представляется возможным считать появление интервалов такой длительности специфичностью действия исследуемой пептидной фракции.

Таким образом, сопоставляя данные, полученные при анализе изменения распределения межимпульсных интервалов средней частоты импульсной активности холодового рецептора кожи кошки, можно сделать вывод о том, что апплицируемые растворы альбумина и фракции полипептидов 1–10 кД из мозга гибернирующего суслика *Citellus undulatus* оказывали разное действие на деятельность рецептора. Это достоверно подтверждается увеличением появления более длинных (до 320 мс) межимпульсных интервалов после аппликации фракции полипептидов 1–10 кД (рис. 1, В).

Специфическое действие на рецептор исследуемых веществ проявляется также на фоне холодового воздействия. Из рис. 2 (А, Б, В) следует, что при холодовом воздействии в область локализации рецептора особенно выражено появление длительных межимпульсных интервалов после аппликации иссле-

дуслого раствора фракции полипептидов 1–10 кД из мозга гибернирующего суслика *Citellus undulatus* (1 мг/л).

Из литературы известно, что в основе деятельности рецепторов вообще и температурных в частности заложена активность Na^+/K^+ АТФазы. Электрогенный Na^+/K^+ насос нуждается в метаболической энергии и поэтому является только температурочувствительным [11, 12, 18–20]. Показано также, что в регуляции активности Na^+/K^+ насоса термомеханочувствительных рецепторов большую роль играет концентрация ионов Ca^{2+} [3].

Представляется возможным предположить, что наблюдаемые изменения функционального состояния термомеханорецепторов при аппликации на кожу раствора фракции полипептидов 1–10 кД из мозга суслика (*Citellus undulatus*) происходили за счет влияния на тканевой метаболизм или на систему транспорта Ca^{2+} .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гулевский А.К., Терещенко О.С., Загнойко В.И. и др. Влияние фракции 1–10 кД из мозга якутской лошади на Ca^{2+} -транспортирующие системы в везикулах сарколеммы кардиомиоцитов // Бюл. exper. биол. и мед. – 1992. – № 9. – С. 274–278.
2. Иваницкий Г.Р., Колаева С.Г., Пастухов Ю.Ф. и др. Эффект выраженного снижения метаболизма у теплокровных эндогенными веществами из тканей зимоспящих в состоянии спячки // Докл. АН СССР. – 1982. – 267. – № 2. – С. 978–990.
3. Иванов К.П. Основы энергетики организма. – Л.: Наука, 1990. – С. 194–220.
4. Игнатъев Д.А., Колаева С.Г., Михалева И.И. и др. Результаты тестирования некоторых биологически активных фракций, выделяемых из тканей зимоспящих // Механизмы зимней спячки. – Пушкино. – 1987. – С. 106–118.
5. Клейнбок И.Я. Спинальный контроль эфферентной температурной информации у кошки // Нейрофизиология. – 1986. – 18, № 6. – С. 773–779.
6. Клейнбок И.Я., Габдулина Е.Ж. Характеристики термо. механочувствительных рецепторов кожи животных и человека // Нейрофизиология. – 1992. – 24, № 3. – С. 314–322.
7. Клейнбок И.Я., Мельников В.Л. Изменение активности эфферентов при температурном воздействии на кожу передней конечности // Физиол. журн. СССР. – 1983. – 69, № 1. – С. 140–145.
8. Кокос Ю.М., Накимова О.В., Свириев В.И. и др. Действие веществ, содержащихся во фракциях мозга и тонкой кишки гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*); на возбудимость миокардных волокон // Механизмы зимней спячки. – Пушкино. – 1987. – С. 146–159.
9. Сухова Г.С., Игнатъев Д.А., Ахременко А.К. и др. Кардиотропная, гипометаболическая и гипотермическая активность пептидных фракций из тканей зимоспящих и холодоадаптированных животных // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1990. – 26, № 5. – С. 623–629.
10. Amorese P.A., Swan H., Bamburg J.R. Extracts from the brains of hibernating and alert ground squirrels: Effects on cells in culture // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – Neurobiology. – 1982. – 79. – P. 6375–6379.
11. Carpenter D.O. Ionic and metabolic bases of neural thermosensitivity // Fed. Proc. – 1981. – 40. – № 14. – P. 2608–2913.
12. Clausen T. Regulation of active $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ transport in skeletal muscle // Physiol. Rev. – 1986. – 66, № 3. – P. 542–580.
13. Dodt E., Zotterman Y. Mode of action of warm receptors // Acta physiol. scand. – 1952. – 26, № 2. – P. 345–357.
14. Hensel H., Iggo A. Analysis of cutaneous warm and cold fibers in primates // Pflügers Arch. – 1971. – 329, № 1. – P. 1–8.
15. Iggo A. Cutaneous heat and cold receptors with slowly conducting (C) afferent fibers // Quart. J. Exp. Physiol. – 1959. – 44, № 3. – P. 362–370.
16. Iggo A., Ramsey R. Thermosensory mechanisms in the spinal cord of monkey // Sensory Function. Skin. Primat. Spec. Ref. Man. Proc. Intern. Sympos. – Stockholm etc. – 1976, № 5. – P. 129.
17. Myers R.D., Oeltgen P.R., Spurrier W.A. Hibernation "trigger" injected in brain induces hypothermia and hypophagia in the monkey // Brain. Res. Bull. – 1981. – 7, № 6. – P. 691–695.
18. Pieran F.K. Possible transducer mechanisms of peripheral temperature receptors // J. Therm. Biol. – 1983. – 8, № 4. – P. 393–399.
19. Pieran F.K., Ulrich I., Tsuchiga K. Rezeption und Verarbeitung peripherer Temperatursignale durch warm blutern // Arch. Exp. Veterinarmed. – 1984. – 38, № 3. – P. 327–335.
20. Schafer K., Braun H.A., Hensel H. Adaptive changes of thermoreceptor discharge revealed to hypothetical receptor mechanisms // J. Therm. Biol. – 1983. – 8, № 4. – P. 396–397.

21. Swan H., Schatte C. Anti – metabolic extract from the mebrain of the hybernating ground squirrel *Citellus tridecemlineatus* // Science. – 1977. – 195. – P. 84–85.

Ин-т проблем криобиологии

Поступила 31.03.93

и криомедицины АН Украины, г. Харьков,
Ин-т физиологии АН Казахстана, г. Алма-Ата,
Ин-т биофизики клетки АН России, г. Пущино

О.К.ГУЛЕВСЬКИЙ, І.Я.КЛЕЙНБОК, О.С.ТЕРЕЩЕНКО, С.Г.КОЛАЄВА, В.М.ДОРОНІН,
Є.Ж.ГАБДУЛЛІНА, Д.О.ІГНАТЬЄВ

ВПЛИВ ФРАКЦІЇ ПОЛІПЕПТИДІВ 1–10 КД В МОЗКУ ГІБЕРНУЮЧИХ ХОВРАХІВ (*CITELLUS UNDULATUS*) НА ФУНКЦІОНУВАННЯ ТЕРМОРЕЦЕПТОРІВ КІШКИ (*FELIS VULGARIS*)

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м.Харків,
Інститут фізіології АН Казахстану, м. Алма-Ата,
Інститут біофізики клітини АН Росії, м. Пущино

Наведені результати досліджень по впливу фракції поліпептидів 1–10 кД, виділеної із мозку гібернуючих ховрахів (*C. undulatus*) на функціонування терморекторів гомойотермної тварини — кішки (*Felis vulgaris*). Встановлено, що після аплікації розчину фракції поліпептидів 1–10 кД на рецепторне поле холодого рецептора шкіри кішки достовірно збільшується поява міжімпульсних інтервалів до 320 мс. Специфічна дія фракції поліпептидів 1–10 кД з мозку гібернуючого ховраха *C. undulatus* на холодові рецептори проявляється як при початковій температурі досліджуваної ділянки шкіри кішки, так і при холодовому впливі в ділянці рецепторного поля.

A.K.GULEVSKY, I.YA.KLEINBOCK, O.S.TERESCHENKO, S.G.KOLAYEVA, V.N.DORONIN,
E.ZH.GABDULLINA, D.A.IGNATYEV

EFFECT OF 1-10 kD POLYPEPTIDE FRACTION FROM BRAIN OF HIBERNATING GROUND SQUIRRELS (*CITELLUS UNDULATUS*) ON FUNCTIONING OF CAT (*FELIS VULGARIS*) THERMORECEPTORS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian
Academy of Sciences, Kharkov, Ukraine,
Institute of Physiology of the Kazakhstan Academy of Sciences, Alma-Ata,
Kazakhstan,
Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences,
Puschino, Russia

The results of studying the effect of a 1-10 kD polypeptide fraction from the brain of the hibernating ground squirrels (*Citellus undulatus*) on the functioning of thermal receptors of a homoiothermic animal — cat (*Felis vulgaris*) — are presented. It was found that application of the solution of a 1-10 kD polypeptide fraction on the receptor field of the cold receptor in cat skin resulted in the development of the interpulse intervals with the duration of 320 ms. A specific action of a 1-10 kD polypeptide fraction from the brain of the hibernating squirrels *Citellus undulatus* on the cold receptors became evident both at the initial temperature of the region of cat skin under study and during cold exposure in the region of the receptor field.

УДК 547.42:541.66:536.63:615.015.35

С.Ю.Бидный, С.В.Коций, В.М.Гучок, М.И.Шраго

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ТОКСИЧНОСТЬ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ МОНОХЛОРИДРИНА ГЛИЦЕРИНА

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии изучены особенности фазовых превращений в системе вода–моноклоридрин глицерина. Получены данные о теплоемкости бинарных смесей в интервале температур 163–313 К, определены теплоты плавления

замороженных водных растворов. Показано, что замена гидроксильной группы в молекуле глицерина усиливает токсичность нового продукта в 23 раза.

Исследование влияния структуры соединений на физико-химические и биологические свойства является широко известным приемом при получении новых биологически активных средств. В этом плане рассмотрены некоторые характеристики водных растворов α -моноклоргидрина глицерина (α -МХГГ) с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии: изучены особенности фазовых превращений в системе, получены данные о теплоемкости бинарных смесей в интервале температур 163–313 К, определены теплоты плавления замороженных водных растворов. В качестве общего показателя биологического действия вещества избраны показатели общей токсичности на уровне смертельных доз [4]. Для сравнения приведены эти же показатели для глицерина.

α -МХГГ получен путем взаимодействия эпихлоргидрина с водой. Очистка вещества осуществлялась двукратной перегонкой в вакууме с отбором средней фракции. Идентификация синтезированного соединения проводилась путем сравнения показателя преломления и плотности ($n_D^{20} = 1,4811$; $d^{20} = 1,3183$) с литературными данными [3]. Строение α -МХГГ подтверждалось молекулярной рефракцией и ИК-спектроскопией. Массовое содержание воды, определенное потенциометрическим титрованием по методу Фишера, не превышало 0,06%. Растворы готовили весовым методом с использованием бидистиллированной воды. В настоящей работе концентрация водных растворов будет указываться по содержанию в масс. % α -МХГГ.

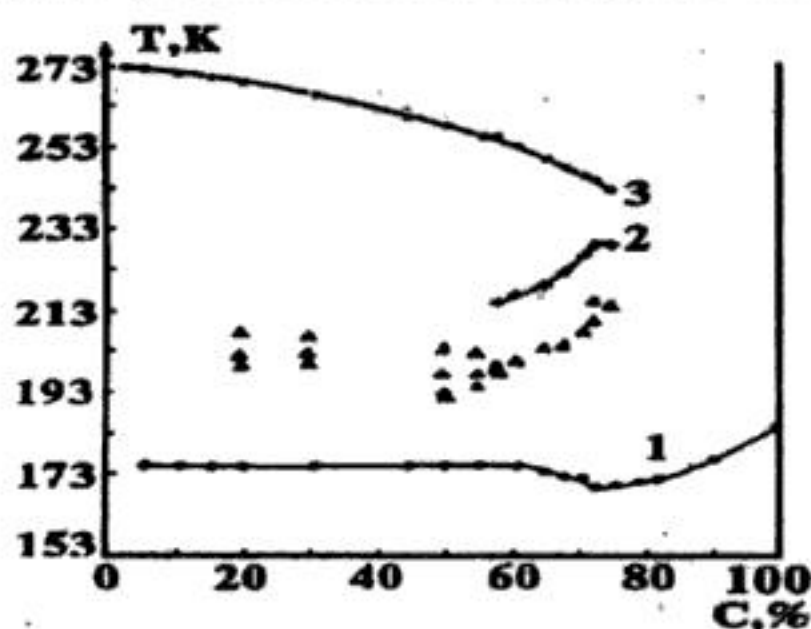


Рис. 1. Диаграмма фазовых и физических состояний бинарной системы вода–МХГГ: 1 – расстеклование аморфной фазы, 2 – кристаллизация аморфной фазы при отогреве, 3 – линия ликвидуса

Измерения проводились на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДСМ–2М по методике [1]. Калибровка температурной шкалы калориметра осуществлялась по вершинам пиков с использованием ацетона и четыреххлористого углерода марки ЧДА, циклогексана – ХЧ и бидистиллированной воды. Все термограммы были получены при скорости отогрева 4 град/мин. Диаграммы, полученные таким образом, обозначаются в литературе как “динамические” или “диаграммы фазовых и физических состояний” (ДФФС) [2], так как на графике

Т (С) кроме температурных фазовых переходов представляются также и температуры изменений физических состояний растворов, обусловленных кинетическими явлениями. При построении диаграммы состояния температуры размытых переходов определялись по площади пика, выделенного проведенной прямой между точкой начала отклонения от базовой линии и точкой выхода на новую базовую после завершения эндоэффекта.

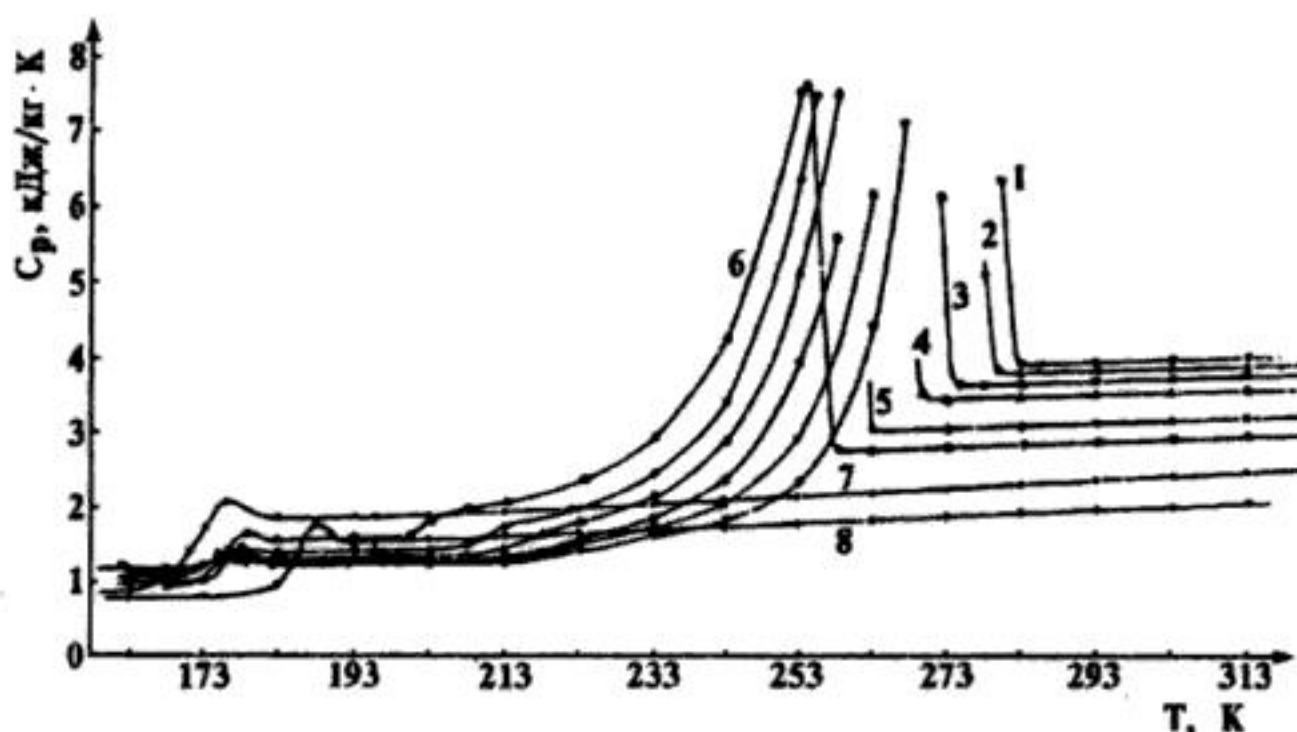
Острая токсичность α -МХГГ в сравнении с глицерином изучена на 42 беспородных мышах обоего пола массой 10,0–22,0 г. Вещества вводили однократно внутрибрюшинно в 20%-х концентрациях, приготовленных на 0,9%-м растворе NaCl.

На представленной на рис. 1 ДФФС бинарной системы H_2O –МХГГ линией 1 обозначен процесс расстеклования, практически не зависящий от кон-

центрации в интервале 5—55 масс. % при 175 К, температура которого начинает уменьшаться и достигает минимума при 170 К для раствора с концентрацией 72 масс. %. При дальнейшем увеличении концентрации МХГГ температура трансформации из стеклообразного состояния в жидкое начинает возрастать и достигает $(185,0 \pm 1)$ К для чистого соединения.

Кристаллизация аморфной фазы на этапе отогрева (кривая 2) отмечается в интервале концентраций 57—75 масс. %, температура перехода соответственно возрастает от 115 до 129 К. Линия ликвидуса (кривая 3) регистрируется в широком интервале концентраций от 0 до 75 масс. % α -МХГГ в температурной области 273—242 К.

Рис. 2. Температурная зависимость теплоемкости водных смесей с различным содержанием МХГГ, масс. %: 1 — 5,0; 2 — 10,1; 3 — 20,0; 4 — 30,5; 5 — 50,0; 6 — 60,2; 7 — 81,3; 8 — 99,9



Треугольниками на ДФФС обозначены эффекты предплавления, обнаруженные у целого ряда бинарных водных растворов, включая глицерин, этиленгликоль, глюкозу и др. [5,6]. Интерпретация данного явления в настоящее время противоречива. В работе [6] эффект предплавления связывают с процессом, имеющим место на границе раздела лед — раствор, соответствующим плавлению смеси с самой высокой концентрацией растворенного вещества и происходящим при постоянной температуре. В работе [5] данное явление объясняется существованием двух стекловидных фаз. Вероятнее наблюдаемый эффект связан с наличием двухфазного состава и процессом растворения воды в концентрированном растворе при плавлении льда. Доказательством этому служит и тот факт, что данный переход в области концентраций 57—75 масс. % наблюдается только при повторном сканировании, когда в предварительном эксперименте при согреве достигалась температура, при которой происходила кристаллизация льда (кривая 2), и растворы охлаждались с образованием двухфазных смесей. При этом четко видны в данной области концентраций симбатность эффекта предплавления с процессом кристаллизации аморфной фазы на этапе отогрева (кривая 2), а также зависимость от термической предистории. Это показано на ДФФС несколькими треугольниками при одной концентрации.

Т а б л и ц а 1

Зависимость теплоемкости $C_p(T)$ чистого МХГГ от температуры

T, K	163	173	183	185	188	193	203	213	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
C_p	0,76	0,78	0,97	1,24	1,78	1,59	1,61	1,65	1,70	1,75	1,80	1,86	1,91	1,97	2,03	2,08	2,13	2,18

На рис. 2 представлены температурные зависимости теплоемкости $[C_p(T)]$ чистого α -МХГГ и его водных растворов в интервале температур 163—313 К, полученные при скорости отогрева 4 град/мин.

Т а б л и ц а 2

Интегральные теплоты плавления $\alpha Q_{пл}$ и интервалы плавления $\alpha T_{пл}$ замороженных водных растворов МХГГ при различных концентрациях

Концентрация МХГГ, масс. %	$\alpha Q_{пл}$, кДж/кг H ₂ O	$\alpha T_{пл}$, К
2,6	304,3	25,5
5,0	285,2	32,0
10,1	274,7	33,0
15,1	249,8	34,7
20,0	240,0	37,5
30,5	218,3	34,3
44,3	184,1	40,0
60,2	131,7	30,2

В табл. 1 приведены данные о теплоемкости $C_p(T)$, кДж/кг·К чистого α -МХГГ. Зависимость $C_p(T)$ с 200 К является линейной функцией температуры.

Теплоемкость раствора с концентрацией 60,2% была определена после предварительной обработки, в результате которой при отогреве происходит кристаллизация льда, после чего смесь охлаждается, и таким образом достигается максимальное приближение системы к равновесному состоянию.

В интервале температур 163—188 К (рис. 2) наблюдаются переходы из стеклообразного состояния в жидкое. С ростом концентрации α -МХГГ величина скачка теплоемкости (ΔC_p) постепенно увеличивается. Максимальное значение ΔC_p отмечается для 81,3%-го раствора и составляет ~ 1 кДж/кг·К. Для чистого α -МХГГ ΔC_p равно 0,75 кДж/кг·К.

В интервале температур 200—215 К хорошо видны эффекты предплавления, по характеру изменения теплоемкости напоминающие процессы растеклования, однако с отсутствием характерных эндопиков, сопровождающих релаксационные явления. Величина изменения теплоемкости возрастает с увеличением концентрации неэлектролита и составляет для 60,2%-го раствора 0,4 кДж/кг·К. Резкое возрастание удельной теплоемкости, начиная с 213 К для растворов, обогащенных водой (кривые 1—6, рис. 2), связано с эндотермическим эффектом плавления льда.

Т а б л и ц а 3

Показатели развития острого смертельного отравления для мышей

Вещество	Токсичность, моль/кг массы	
	ЛД—50 и ее доверительные границы	Кратность изменения ЛД—50
Глицерин (ЧДА)	0,075 (0,057—0,099)	1,0
МХГГ	0,032 (0,003—0,004)	23,4

Интегральные теплоты плавления замороженных водных растворов и интервалы плавления ($\Delta T_{пл}$), которые являются, по-видимому, отражением полидисперсности образующихся кристаллов льда, представлены в табл. 2. Верхние параметры токсичности, определенные методом пробит-анализа [4], для α -

МХГГ в сравнении с глицерином приведены в табл. 3.

Из приведенных данных следует, что замена гидроксильной группы в молекуле глицерина хлором приводит к резкому повышению токсичности (23,4 раза), и в результате, α -МХГГ относится к классу высоко токсичных веществ. Подобное увеличение токсичности отмечалось ранее [3] в веществах других

классов, содержащих галогены. Полученная ДФФС показывает, что для α -МХГГ так же, как и для глицерина [6], гидраты эвтектического состава не кристаллизуются, а переходят в стеклообразное состояние. Однако эвтектическая концентрация водных растворов α -монохлоргидрина глицерина (76 масс. %) значительно превышает значение для водных растворов глицерина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бидный С.Ю., Тимошенко Ю.П., Иванов Е.Ф. Исследование термодинамических свойств водных растворов глицерина // Криобиология и криомедицина. – 1983. – Вып. 11. – С. 102–104.
2. Зинченко А.В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур $-150-0$ °С: Автореф. дис...канд. физ.-мат. наук. — Киев, 1983. – 20 с.
3. Пакен А.М. Эпоксидные соединения и эпоксидные смолы. – Л.: Госхимиздат, 1962. – 963 с.
4. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. Экспресс—метод определения средней эффективной дозы // Фармакология и токсикология. – 1978. – № 4. – С. 497–502.
5. Bohon R.L., Conway W.T. DTA studies on the glycerol–water system // Termochim. Acta. – 1972. – № 4. – P. 321–341.
6. Luyet B., Rasmussen D. Study by DTA of the temperatures of instability of rapidly cooled solutions of glycerol, ethylene glycol, sucrose and glucose // Biodynamica. – 1968. – 4, № 211. – P. 167–191.

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

Поступила 14.06.93

С.Ю.БІДНИЙ, С.В.КОЩІЙ, В.М.ГУЧОК, М.І.ШРАГО

ДЕЯКІ ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ І ТОКСИЧІНСТЬ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ МОНОХЛОРГІДРИНУ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м.Харків

Методом диференціальної скануючої калориметрії вивчено особливості фазових перетворень в системі вода—моноклоргідрин гліцерину. Одержано дані по тепломісткості бінарних сумішей в інтервалі температур 163–313 К, визначені теплоти плавлення заморожених водних розчинів. Показано, що заміна гідроксильної групи в молекулі гліцерину посилює токсичність нового продукту у 23 рази.

S.YU.BIDNY, S.V.KOSCHIY, V.M.GUCHOK, M.I.SHRAGO

SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND TOXICITY OF MONOCHLORHYDRINE GLYCEROL AQUEOUS SOLUTIONS

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

The peculiarities of phase transformations in a water-monochlorhydrine glycerol system were studied using a method of differential scanning calorimetry. The data on the thermal capacity of binary mixtures in the temperature range of 163–313 K were obtained, and the values of the heat of melting of frozen aqueous solutions were determined. Substitution of a hydroxyl group in a glycerol molecule was shown to increase toxicity of a new product by 23-fold.

УДК 611-018.51:57.043.043+57.086.2:681.7.014

Л.Г.Кулешова, В.И.Загнойко

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТОВ ГЕТЕРОТЕРМНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО ХРАНЕНИЯ

Методом световой микроскопии проведен сравнительный морфологический анализ устойчивости формы эритроцитов длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*), находящихся в различных физиологических состояниях, в условиях гипотермического хранения (4 °С). Установлена зависимость скорости накопления предгемолитических форм эритроцитов от физиологического состояния гетеротермных животных. Сделан вывод о том, что в условиях

зимней спячки длиннохвостых сусликов происходит существенная стабилизация традиционной двояковогнутой формы эритроцитов, которая в условиях гипотермического хранения удерживается длительное время.

Гетеротермные животные способны длительное время сохранять клеточный гомеостаз и жизнеспособность при температурах близких к 0°C [4, 7]. В проведенных нами ранее работах [3, 6] с использованием методов ЭПР-спигового зонда, пламенной фотометрии и радиоизотопного анализа установлено, что в состоянии спячки гетеротермных животных наблюдается стабилизация барьерных свойств и уменьшение пассивной проницаемости мембран эритроцитов для ионов ^{86}Rb и K^{+} . Известно, что продолжительность жизни эритроцитов при физиологических условиях определяется физическими, биофизическими и биохимическими показателями [1]. Форма эритроцитов тесно связана с их функциональным состоянием. Отношения объема к площади, толщины к диаметру и двояковогнутая форма определяют эластичность и пла-

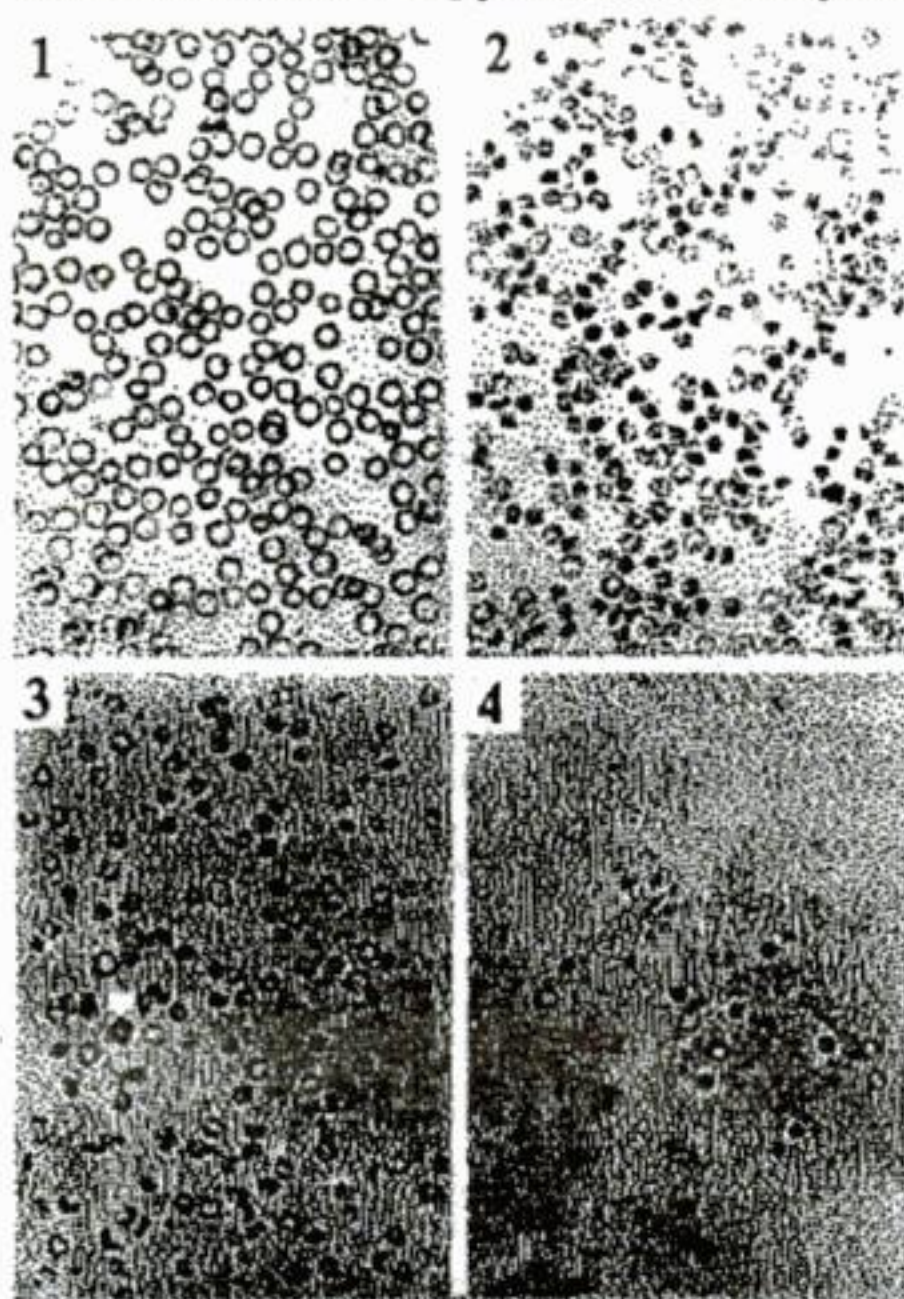


Рис. 1. Трансформация эритроцитов в условиях гипотермического хранения крови: 1 – активного суслика (контроль); 2 – активного суслика, 15-е сут; 3 – крысы (контроль); 4 – крысы, 45-е сут. X 1000. Уменьшение при репродукции 3/5

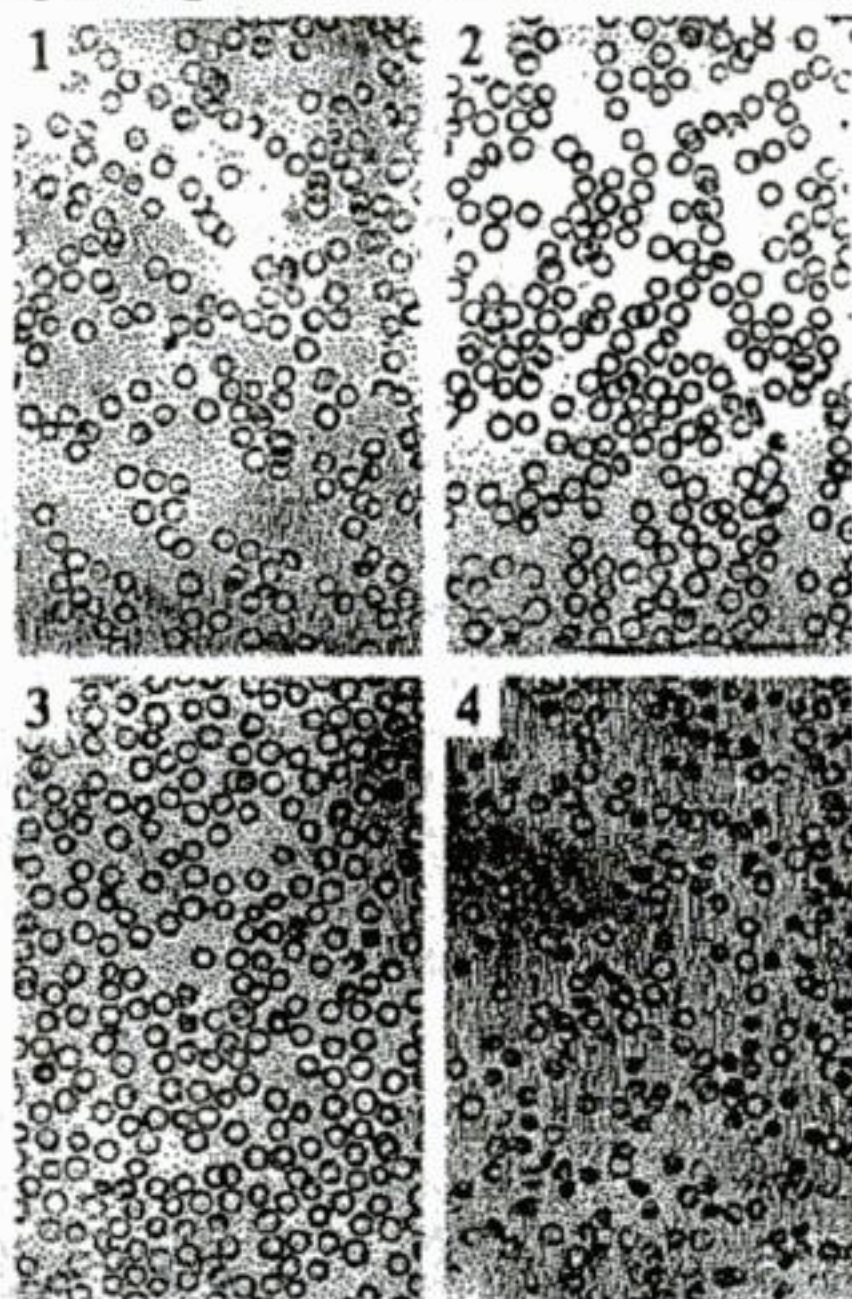


Рис. 2. Трансформация эритроцитов в условиях гипотермического хранения крови зимоспящего суслика: 1 – контроль; 2 – 15-е сут; 3 – 26-е сут; 4 – 45-е сут. X 1000. Уменьшение при репродукции 3/5

стичность, способствующие изменению формы клетки и ее деформируемости при циркуляции в кровеносном русле. Любой их сдвиг снижает пластичность эритроцитов, которые становятся жесткими, не способными изменять свою форму при прохождении через кровеносные капилляры, и приводит, в конечном счете, к патологическому гемолизу. Форма эритроцитов меняется от двояковогнутой до сферы, которая является предельным предгемолитическим состоянием эритроцита. Выходу гемоглобина предшествует утечка ионов K^{+} . Трансформация эритроцитов осуществляется через ряд промежуточных форм: двояковогнутый диск (нормоцит) – дискоэхиноцит – сфероэхиноцит – неполная сфера – полная сфера или двояковогнутый диск – стоматоцит – неполная сфера – полная сфера [2, 5]. Количественный анализ соотношения раз-

личных форм эритроцитов позволяет косвенно качественно судить о функциональном состоянии крови в целом.

Объектом исследования служила кровь, полученная при декапитации длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*) в состоянии зимней спячки (ректальная температура 2-4 °С), искусственно пробужденном (30 °С) и активном (37 °С). Животных в состоянии зимней спячки и искусственного пробуждения изучали в январе-марте. В ряду сравнения исследовалась также кровь беспородных белых крыс. Антикоагуляционный раствор содержал 2% глюкозы, 3% трехзамещенного цитрата натрия, рН 7,4. Исследования проведены методом световой микроскопии на микроскопе МБИ 15-У с фотографической регистрацией морфологической картины крови. Общее состояние клеток крови оценивали в капле, которая помещалась между предметным и покровным стеклами и равномерно распределялась тонким слоем. При этом эритроциты находились во взвешенном состоянии, что позволяло всесторонне фиксировать их форму. Степень устойчивости эритроцитов оценивали путем количественного подсчета нормоцитов и суммарно промежуточных форм в мазках по микроснимкам в различные сроки гипотермического хранения (контроль, 15, 26, 45 сут).

Анализ экспериментальных результатов показал, что наименее устойчивыми являются эритроциты крысы, которые теряют традиционную двояковогнутую форму уже в течение нескольких часов после их получения. При микроскопировании наблюдаются практически только дискоэхиноциты и сфероэхиноциты (рис. 1, 3). На 45-е сут гипотермического хранения отмечается полный гемолиз: эритроциты принимают форму полных сфер и по мере выхода гемоглобина теряют контрастность, превращаясь в тени (рис. 1, 4).

Эритроциты активного суслика в контроле имеют форму двояковогнутых дисков (рис. 1, 1). Однако уже к 15-м сут в поле зрения нормоциты практически отсутствуют (рис. 1, 2).

Иной характер трансформации эритроцитов отмечается у зимоспящего суслика. В контроле (рис. 2, 1) в крови такого суслика наблюдается 100%-е содержание нормоцитов. К 15-м сут ги-

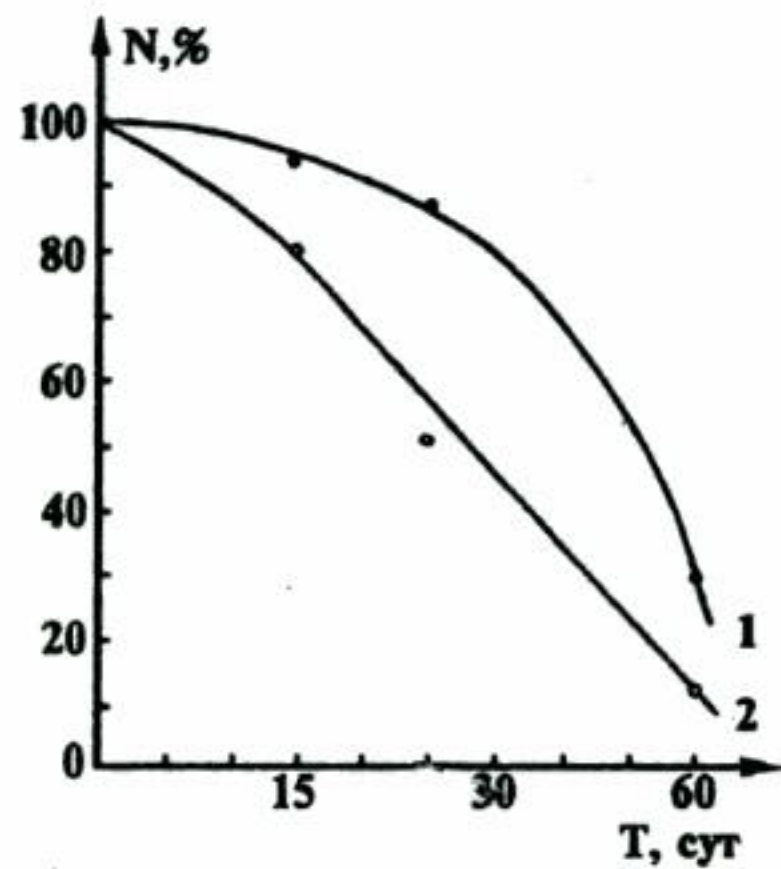


Рис. 3. Кинетика накопления предгемолитических форм клеток (%) в условиях гипотермического хранения крови зимоспящего суслика (кривая 1) и искусственно пробужденного (кривая 2)

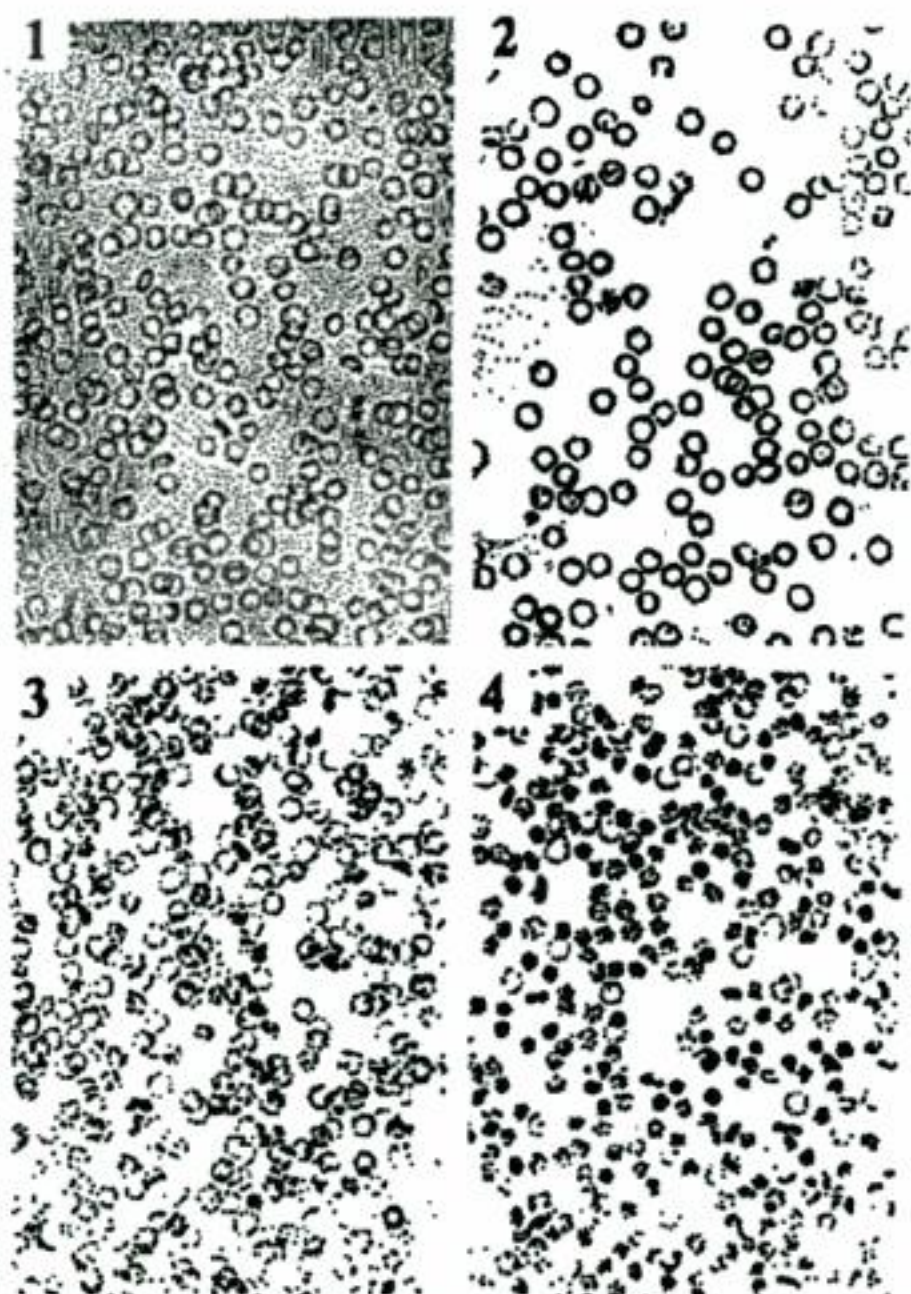


Рис. 4. Трансформация эритроцитов в условиях гипотермического хранения искусственно пробужденного суслика: 1 - контроль; 2 - 15-е сут; 3 - 26-е сут; 4 - 45-е сут. X 1000. Уменьшение при репродуцировании 3/5

потермического хранения количество деформированных эритроцитов возрастает незначительно (рис. 2, 2). По мере увеличения сроков хранения трансформация эритроцитов прогрессирует. К 26-м сут количество промежуточных форм возрастает до 12% (рис. 2, 3). И только к 45-м сут наблюдается существенное изменение морфологической картины крови. Количество предгемоли- тических форм достигает 70%. В поле зрения имеются дискоэхиноциты, сфе- роэхиноциты, полные сферы, тени (рис. 2, 4).

Искусственное пробуждение суслика в условиях зимней спячки существенно влияет на устойчивость эритроцитов. На рис. 3 приведены кривые накопления деформированных клеток (%) в условиях гипотермического хранения крови зимоспящего суслика (кривая 1) и искусственно пробужденного (кривая 2). Видно, что скорость накопления предгемоли- тических форм эритроцитов в крови искусственно пробужденного суслика заметно выше. К 26-м сут гипотермического хранения в его крови количество деформированных клеток составляет уже порядка 50%, в то время как у зимоспящего только 12%. К 45-м сут их уровень практически достигает 90% против 70% у зимоспящего суслика (рис. 4, 1-4).

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что устойчивость эритроцитов зависит от функционального состояния гетеротермных животных. По степени снижения устойчивости эритроцитов исследованных животных в условиях гипотермического хранения их можно расположить в следующем порядке: эритроциты зимоспящего суслика, эритроциты искусственно пробужденного суслика, эритроциты активного суслика, эритроциты крысы. Полученные данные свидетельствуют о том, что у гетеротермных животных в условиях зимней спячки происходит существенная стабилизация эритроцитов, позволяющая удерживать традиционную двояковогнутую форму в условиях гипотермического хранения длительное время.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клиническая гематология // Под ред. Шт. Берчану. – Бухарест.: Медицинское издательство, 1985. – 1221 с.
2. Крымский Л.Д., Нестайко Г.В., Рыбалов А.Г. Растровая электронная микроскопия сосудов и крови. – М.: Медицина, 1976. – 168 с.
3. Нардид О.А., Загнойко В.И., Моисеев В.А., Гулевский А.К. Влияние гипотермии на проницаемость мембран эритроцитов для феррицианидных ионов // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 2. – С. 53–56.
4. Хочачко П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. – М.: Мир, 1988. – 567 с.
5. Bessis M. Living Blood Cells and their Ultrastructure. – Berlin, Heidelberg, New York, 1973. – 767 p.
6. Gulevsky A.K., Zagnojko V.I., Shchenyavsky I.I., Ryazantsev V.V. Peculiarities of structure-functional states of erythrocytes of homiothermic and heterothermic animals // Crio-Letters. – 1992. – 13, № 2. – P. 109–116.
7. Wang L.C.H. Life and low temperature: Mammalian hibernation // Criobiology. – 1985. – 6, № 2. – P. 257–274.

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

Поступила 03.03.93

Л.Г.КУЛЕШОВА, В.І.ЗАГНОЙКО

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА СТІЙКОСТІ ФОРМИ ЕРИТРОЦИТІВ ГЕТЕРОТЕРМНИХ ТВАРИН В УМОВАХ ГІПОТЕРМІЧНОГО ЗБЕРІГАННЯ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м.Харків

Методом світлової мікроскопії проведено порівняльний морфологічний аналіз стійкості форми еритроцитів довгохвостих ховрахів *Citellus undulatus*, які знаходяться у різних фізіологічних становищах, в умовах гіпотермічного зберігання (4 °С). Встановлена залежність

швидкості накопичення передгемолітичних форм еритроцитів від фізіологічного стану гетеротермних тварин. Зроблено висновок про те, що в умовах зимової сплячки довгохвостих ховрахів відбувається значна стабілізація традиційної двичігнutoї форми еритроцитів, яка в умовах гіпотермічного зберігання утримується тривалий час.

L.G.KULESHOVA, V.I.ZAGNOIKO

COMPARATIVE EVALUATION OF RED BLOOD CELL SHAPE STABILITY OF HOMIOOTHERMIC ANIMALS DURING HYPOTHERMIC STORAGE

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

A comparative morphological analysis of the red blood cell (RBC) shape stability of the long-tailed ground squirrels *Citellus undulatus* in various functional states was performed during hypothermic storage of animals at 4°C using a method light microscopy. The rate of accumulation of RBC pre-hemolytic shapes was found to depend on the physiological state of heterothermic animals. It was concluded that traditional biconcave RBC shape was significantly stabilized during hibernation of the long-tailed ground squirrels, which was maintained for a long time during hypothermic storage.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 57.086.13:[611.013+591.3]

В.И.Грищенко, Ю.В.Калугин, Н.А.Лучко

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ И СПЕРМЫ

Рассмотрены некоторые вопросы криоконсервации спермиев и эмбрионов и обоснована необходимость применения низких безвредных концентраций криопротекторов. Представлены данные о разработке новых принципов криоконсервации репродуктивных клеток, основанных на создании многокомпонентных криоконсервантов и использовании сверхбыстрых скоростей охлаждения. Высокая эффективность разработанных способов криоконсервации спермиев и эмбрионов подтверждена комплексом физиологических и биохимических исследований этих видов клеток до и после их криоконсервации.

До настоящего времени не разработаны достаточно надежные методы криоконсервации репродуктивных клеток человека, способные удовлетворить запросам клинической практики. Успехи в разработке новых способов криоконсервации репродуктивных клеток связаны с прогрессом в области фундаментальных исследований механизмов криоповреждения и криозащиты спермиев и эмбрионов. Последние представляют особый интерес, так как отличаются от всех остальных клеток непрерывным развитием своего морфофункционального статуса, наличием цитоплазматической мембраны с очень низкой проницаемостью для молекул воды и других компонентов среды, а следовательно, наделены исключительно высокой чувствительностью к осмотическим эффектам и действию низких температур. Поэтому познание на эмбрионах мышей как на общебиологической модели действия криоконсервантов и сверхвысоких скоростей охлаждения позволяет установить общие закономерности криоповреждений, криорезистентности и искусственной криозащиты ооцитов и эмбрионов, разработать методы длительного хранения клеток, полученных от представителей различных, часто ценных пород животных, используя эту информацию при создании способов криоконсервации ооцитов и эмбрионов разного вида домашних животных, что имеет большое экономическое значение. Наряду с этим, эмбрионы мышей являются прекрасной моделью для исследования фундаментальных аспектов криобиологии.

Работы по криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов начали интенсивно проводиться в начале 70-х годов, после того как удалось успешно криоконсервировать эмбрионы мыши под защитой диметилсульфоксида (ДМСО) [15]. Разработке способов криоконсервации ооцитов и эмбрионов предшествовал большой цикл теоретических и экспериментальных исследований, посвященных изучению особенностей проницаемости мембран этих клеток для воды, ионов и криопротекторов, на основе которых удалось обосновать параметры эквilibрации этого вида репродуктивных клеток, режим охлаждения, замораживания и отогрева. Термодинамический анализ процесса дегидратации ряда видов клеток, в том числе яйцеклеток и эмбрионов, позволил связать ее с удельной проницаемостью клеточных мембран для воды, со значением энергии активации ее транспорта и поверхностно-объемным соотношением [10].

С учетом низкой проницаемости мембран эмбрионов для молекул воды рутинные способы криоконсервации основаны на очень медленном их охлаждении ($<1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) в среде 1,5 М раствора криопротекторов, преимущественно ДМСО, до $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующим переносом в жидкий азот. Теоретическая концепция, основанная на описании кинетики потери клетками воды, предполагает, что достаточно низкая скорость охлаждения вызовет такую степень их дегидратации, что в них не останется свободной воды, способной кристаллизоваться, что, в свою очередь, предупредит развитие внутриклеточной кристаллизации, являющейся одним из основных повреждающих факторов процесса криоконсервации [11].

Вместе с тем появились многочисленные доказательства того, что клетки, охлажденные со скоростью выше оптимальной в среде криоконсерванта, содержат внутриклеточный лед, который не вызывает непременно их гибель. Это оказалось возможным при медленном охлаждении клеток до температуры, при которой в них сохраняется количество воды, достаточное для развития эндоцеллюлярной кристаллизации, возникающей при последующем быстром переносе проб в жидкий азот. Высокая выживаемость восьми клеточных эмбрионов мыши, охлажденных в среде 1,5 М ДМСО со скоростью $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующим быстрым охлаждением путем погружения их в жидкий азот, была достигнута при быстром (примерно $500\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) отогреве [12]. Эмбрионы овцы и коровы сохранялись жизнеспособными, если их охлаждали со скоростью $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующим погружением в жидкий азот и отогревали со скоростью $360\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Известно, что эмбрионы мышей выживали даже тогда, когда их медленно охлаждали лишь до -20 или $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, выдерживали при этой температуре 10 мин, затем охлаждали до температуры жидкого азота и быстро отогревали [6]. Это может быть связано с растворением образовавшегося внутриклеточного льда в течение температурной остановки [16] либо вследствие препятствия в этих условиях образования избыточного его количества [1]. Аналогично высокая выживаемость спермиев быков была достигнута при их охлаждении в среде криопротектора до $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ после короткой выдержки при этой температуре с последующим погружением в жидкий азот и быстрым отогреве. Появилось сообщение о случае выживания 2 из 23 морул мышей после медленного их охлаждения до $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующим переносом в охлажденную до $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ среду, что имеет принципиальное значение [8].

Допустимость при определенных условиях внутриклеточной кристаллизации позволяет искать методические подходы к криоконсервации репродуктивных клеток на пути рационального использования субоптимальных скоростей охлаждения и, в частности, сверхвысоких скоростей охлаждения, приме-

нение которых в криобиологии, как надо полагать, приведет к развитию внутриклеточной кристаллизации со смешанными областями кристаллических и аморфных образований. Включение в раствор криозащитных компонентов позволяет снизить скорость сверхбыстрого охлаждения до пределов, достижимых в современной криобиологии. Совершенно очевидно, что преимущество сверхбыстрого охлаждения клеток будет связано с возможностью использования значительно более низких, по сравнению с применяемыми, концентраций криозащитных веществ, даже наиболее физиологичные из числа которых далеко не индифферентны по отношению к биоструктурам.

Первой удачной попыткой криоконсервировать сперму ряда экспериментальных и сельскохозяйственных животных явилось охлаждение Смирновым И.В. в 1947 г. спермы без добавления к ней криопротекторов в капле объемом 0,02 мл в парах азота с последующим быстрым отогревом, что позволило сохранить жизнеспособными 10–30% спермиев без потери ими оплодотворяющей способности [3]. Этими экспериментами, не получившими практического применения ввиду малого объема криоконсервируемого материала и невысокой сохранности спермиев, впервые была доказана возможность сохранения биологического материала в жизнеспособном состоянии в условиях глубокого холода.

Последующие исследования в области криоконсервации спермиев показали, что криозащитная эффективность связана с предупреждением чрезмерной их дегидратации и действия “эффекта раствора”. Криозащиту стали достигать насыщением спермиев криопротектором, в основном глицерином, и последующим программным охлаждением. Однако в работах ряда исследователей [5] отмечены повреждения гамет птиц, животных и человека, связанные с действием глицерина, который в рабочих концентрациях (2–2 М) и более низких оказывает негативное действие на морфофункциональные свойства клеток, являющееся прежде всего следствием осмотического дисбаланса на их мембранах. Глицерин, введенный в сперму в концентрации 0,5 М, депонируется в мембране гамет в количестве 1 мМ, что приводит к изменениям в ее двухслойной структуре за счет латеральной сепарации протеина и липидных образований. Это выражается в появлении в ней дефектных зон, изменении трансмембранного переноса воды и ионов и сопровождается активацией потребления спермиями АТФ.

Совершенно очевидно, что применяемые в криобиологии криозащитные вещества не являются безвредными в отношении гамет, да и клеток другого вида. Дальнейший поиск более совершенных способов криоконсервации репродуктивных клеток, по сравнению с рутинными, вызван рядом существенных их недостатков. Процедура криоконсервации продолжительна, особенно для ооцитов и эмбрионов, и составляет 1,5–2 ч, в течение которых они находятся в гиперконцентрации осмотически активных веществ, включая криопротекторы, что приводит к увеличению токсичности среды и негативным влияниям ее на белковые структуры. Во избежание этого, стали вызывать дегидратацию эмбрионов при комнатной температуре, помещая их в среду, содержащую непроникающую сахарозу, 40%-й дегидратационный эффект которой должен был позитивно отразиться на сохранности клеток. Однако их реальная выживаемость после быстрого ($\sim 12^\circ\text{C}/\text{мин}$) и сверхбыстрого ($3000^\circ\text{C}/\text{мин}$) охлаждения под защитой 1,0–1,5 М глицерина была меньшей, чем при использовании традиционных способов криоконсервации [7].

Альтернативным решением проблемы программного замораживания эмбрионов явилось применение смесей высоких (40–60%) концентраций ДМСО,

ацетамида, 1,2-пропандиола, производных этиленгликоля и некоторых других криозащитных соединений, которые при замораживании приводят к развитию процессов стеклования вне- и внутриклеточной среды [9]. Но в этих условиях позитивная роль развития витрификации входит в противоречие с негативным влиянием на клетки гиперконцентрированных растворов криозащитных веществ, проявляющимся как при добавлении, так и при удалении их из биообъектов. Несмотря на это, применение витрифицирующих сред привело к широкому их использованию при криоконсервации ряда биологических объектов, в том числе и эмбрионов. Однако недостаточно глубокое освещение биологических аспектов этого направления и технические трудности насыщения клеток и тканей высококонцентрированными растворами и их элиминации из биоструктур диктуют необходимость дальнейшей разработки высокоэффективных и простых способов криоконсервации ооцитов, эмбрионов и спермы человека для клинических целей, которая, как мы полагаем, должна основываться не на стремлении к развитию процесса витрификации за счет применения высоких концентраций криопротекторов, а лежать на пути поиска сочетания низкого, безвредного их содержания в криоконсерванте со сверхвысокими скоростями охлаждения.

Для создания высокоэффективных и простых в реализации способов криоконсервации гамет и эмбрионов, отвечающих современным требованиям медицинской практики, была поставлена цель добиться высокой сохранности репродуктивных клеток путем применения разработанных композиционных криоконсервантов разнопланового криозащитного действия и использования сверхвысоких скоростей охлаждения, достигаемых в результате реализации идеи — исключить образование на поверхности контейнеров пленочного кипения хладоагента за счет применения твердого хладоносителя. Погружение контейнеров в охлажденный до температуры жидкого хладоагента твердый хладоноситель позволяет развить скорость их охлаждения порядка нескольких тысяч градусов в минуту. Замена хладоносителя дает возможность изменить скорость охлаждения.

В нашем случае, не имея уверенности в том, что в суспензии репродуктивных клеток разовьется витрификация, а, вероятно, образуется лед смешанной аморфно-кристаллической структуры, и учитывая разрушительные последствия процесса рекристаллизации, проявляющегося с тем большей интенсивностью, чем более был осуществлен процесс витрификации, мы предусмотрели создание криоконсерванта, который бы содействовал развитию как витрификации, так и нивелированию эффекта рекристаллизации.

Разработка состава криоконсерванта для сверхбыстрого охлаждения спермы проводилась на основе полученной нами ранее информации о позитивной роли метильных группировок при включении их в молекулу глицерина. Однако ввиду того, что соединения, синтезированные в отделе криопротекторов Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины [2], не являются фармакопейными препаратами и производятся в небольшом количестве, проведенные исследования показали целесообразность осуществления поиска метилсодержащих соединений из числа известных веществ, в том числе среди холинов, в частности холин-хлорида, ацетилхолина и карбохолина. Наличие метильных группировок в молекуле этих веществ обуславливает гидрофобный характер их взаимодействия с биомакромолекулами, и очевидна необходимость реализации криозащитных свойств холинов не автономно, а с целью повышения эффективности традиционных криопротекторов. Надо полагать, эффективность включения в криоконсервант холин-хлорида связана с

сохранением барьерных свойств цитоплазматической мембраны, что обусловлено сглаживанием возникающих при криовоздействии структурных перестроек липид-липидных и липид-белковых комплексов.

Изучение влияния инкубирования эмбрионов мышей в среде холинов показало, что по цитотоксическому действию их следует расположить в следующей возрастающей последовательности: холин-хлорид, ацетилхолин и карбохолин, то есть в той, в которой изменяется их основность. Изучение их криозащитной эффективности позволило установить, что у холин-хлорида более широкий концентрационный интервал, в котором проявляется его криозащитная эффективность, достигающая максимума при $3 \cdot 10^{-4}$ М содержания в криозащитной среде, способствующей 94 %-й сохранности клеток. Эти же закономерности характерны для случаев криоконсервации спермиев человека.

Вероятно, эффективность включения в криоконсервант холин-хлорида связана с сохранением барьерных свойств мембраны, что обусловлено сглаживанием структурных перестроек липид-липидных и липид-белковых комплексов, возникающих при криовоздействии. Мы исходили также из того, что как было показано при криоконсервации ооцитов и 2-клеточных эмбрионов, применение витрификационной среды обеспечивало в процессе криоконсервации витрификацию, однако, сохранность ооцитов и эмбрионов свиньи была низкой, соответственно 24,5 и 26 %. Это, как полагают, свидетельствует о недостаточной криозащите структурной целостности цитоплазматической мембраны при развитии витрификации, что было подтверждено потерей ею мембранного потенциала. Включение в витрифицирующий раствор антифризных гликопротеидов полярных рыб в концентрации 40 мг/мл для ооцитов и 20 мг/мл для эмбрионов способствовало повышению их сохранности до 82 и 86 % соответственно, что связывают с сохранением структурной целостности мембраны [13].

Аналогично цитотоксическому действию в отношении эмбрионов глицерина, монометилового и моноэтилового их производных, проявляющемуся при концентрации этих веществ более 0,5 М, введение глицерина, ДМСО или 1,2-пропандиола также оказывает отрицательное воздействие на сохранность этого вида клеток в случае повышения указанной концентрации. Оптимум криозащиты этих криопротекторов, взятых в равных соотношениях, отмечен также при 0,5 М их концентрации, что коррелирует с ранее приведенными нами литературными данными. Следует отметить, что 1,2-пропандиол имеет некоторые преимущества по сравнению с глицерином, так как легче проникает в клетки, поскольку в своем составе содержит метильный гидрофобный радикал; это повышает сродство его молекулы с цитоплазматической мембраной, эффективно связывает воду и обуславливает низкую эвтектическую концентрацию. Методом сканирующей калориметрии показано, что 1,2-пропандиол обладает, по сравнению с глицерином, значительно большей способностью переходить в витрифицированное состояние. Это было нами учтено при создании криоконсерванта для охлаждения эмбрионов со сверхвысокой скоростью. При криоконсервации зигот человека на стадии 2 пронуклеусов в медленном режиме под защитой 1,2-пропандиола дробление после оттаивания и культивирования отмечалось в 81,6 % и несущественно отличалось от контроля [4]. Глицерин, применявшийся для криоконсервации эмбрионов человека, медленно проникает в клетку и отдельные бластомеры.

Изучение зависимости выживаемости эмбрионов от концентрации криопротекторов, биологически активного вещества, процессов эквilibрации и

скоростей охлаждения дало возможность отметить, что при включении в состав криоконсерванта 3 в разной степени проникающих в эмбрионы криозащитных соединений в концентрации 4,75–5,25% наиболее высокая криозащита выражена при равном их соотношении в криозащитной среде (94,5% сохранности). Однако более перспективным является криоконсервант, позволяющий добиться такой же сохранности эмбрионов, основанный на сочетании проникающего в клетки ДМСО и экзоцеллюлярного многоатомного спирта, наличие которого в криозащитной среде позволяет предельно упростить технологию замораживания за счет одномоментных процедур добавления и удаления криоконсерванта из криобиологической системы. Наиболее высокая эффективность криоконсервирования отмечена при охлаждении эмбрионов в среде указанных криоконсервантов с наибольшей из применяемых скоростей охлаждения при наличии в их составе холин-хлорида. Сохранность эмбрионов после их криоконсервации оценивали по комплексу морфофункциональных свойств. Установлено, что сохранность эмбрионов по оценке их развития в



Рис. 1. Развитие эмбрионов в культуре после криоконсервации до стадии поздней бластоцисты. X 400. Уменьшение при репродукции 2/3

культуре составляет 94,5% (рис. 1).

Криоконсервация повышает интенсивность биосинтеза РНК в эмбрионах по данным включения ее предшественника ^3H -уридина, что, вероятно, является компенсаторной мерой направленного развития репаративных процессов в эмбрионах, получивших латентные повреждения в процессе криоконсервации (рис. 2). Это подтверждено интенсивностью включения ^3H -лейцина, маркера белка, что коррелирует с повышением биосинтеза РНК. После культивирования в течение 1 ч интенсивность биосинтеза белка падает до уровня этого процесса в нативных эмбрионах. Включение предшественника ДНК ^3H -тимидина в размороженные и подвергнутые культивированию в течение 1 ч эмбрионы не позволяет отметить различия в интенсивности биосинтеза ДНК по сравнению с нативными клетками (рис. 3). Флуоресцентный анализ эмбрионов, перенесших глубокое замораживание в среде криоконсерванта и в условиях сверхбыстрого охлаждения, показал полную сохранность цитоплазматической мембраны (рис. 4).

Для спермы человека был разработан композиционный криоконсервант, содержащий 0,26 М глицерина, который в условиях охлаждения со скоростью $3 \cdot 10^2$ °С/мин обеспечивал 90% выживаемости размороженных спермиев. Следует отметить, что это достигалось при применении наиболее низкой из используемых нами скоростей охлаждения, что, по-видимому, связано с менее выраженными в этих условиях процессами внутриклеточной нуклеации и рекристаллизации. Переживаемость размороженных спермиев, перенесших криоконсервацию разработанным способом, соответствовала этому показателю у нативных клеток, а сохранность акросом составляла 90%.

Для спермы человека был разработан композиционный криоконсервант, содержащий 0,26 М глицерина, который в условиях охлаждения со скоростью $3 \cdot 10^2$ °С/мин обеспечивал 90% выживаемости размороженных спермиев. Следует отметить, что это достигалось при применении наиболее низкой из используемых нами скоростей охлаждения, что, по-видимому, связано с менее выраженными в этих условиях процессами внутриклеточной нуклеации и рекристаллизации. Переживаемость размороженных спермиев, перенесших криоконсервацию разработанным способом, соответствовала этому показателю у нативных клеток, а сохранность акросом составляла 90%.

Считают, что при криообработке спермы глицерин в концентрации выше 4% может дестабилизировать мембрану акросом, формируя в ней каналы эли-

минации акросомальных белков, в том числе и акрозина. При этом предполагают, что значительные повреждения акросомы происходят еще при эквilibрации спермы в криоконсерванте. При реализации данного способа даже после 3-часовой эквilibрации спермиев в среде криоконсерванта активность акрозина составляет 95%, а после криоконсервации – 90%. Процесс криоконсервации практически не оказывает влияния на содержание в спермиях ДНК.

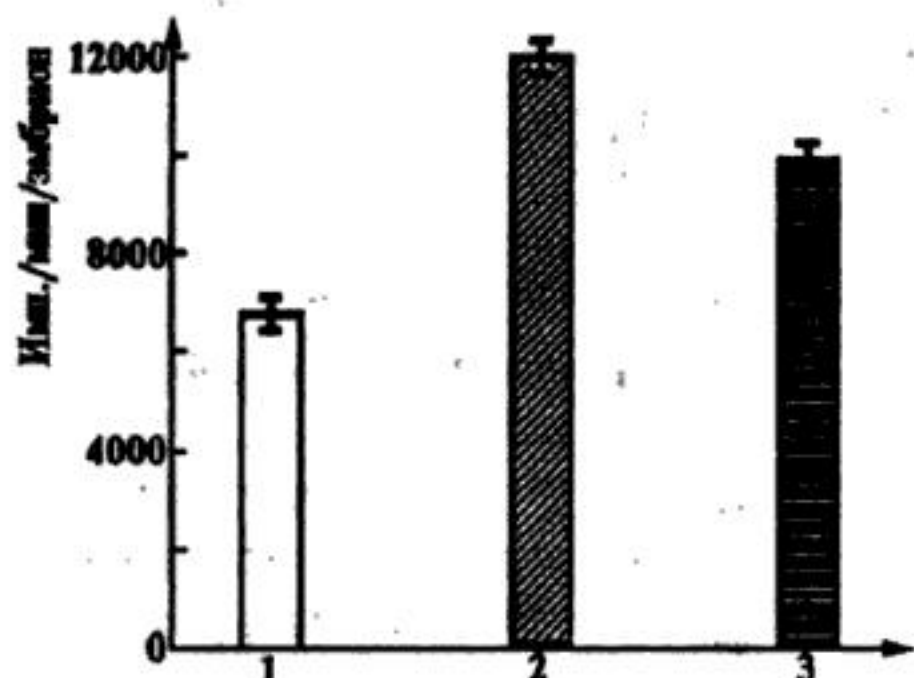


Рис. 2. Влияние криоконсервации на биосинтез РНК в эмбрионах: 1 – натив, 2 – после криоконсервации, 3 – культивирование после криоконсервации

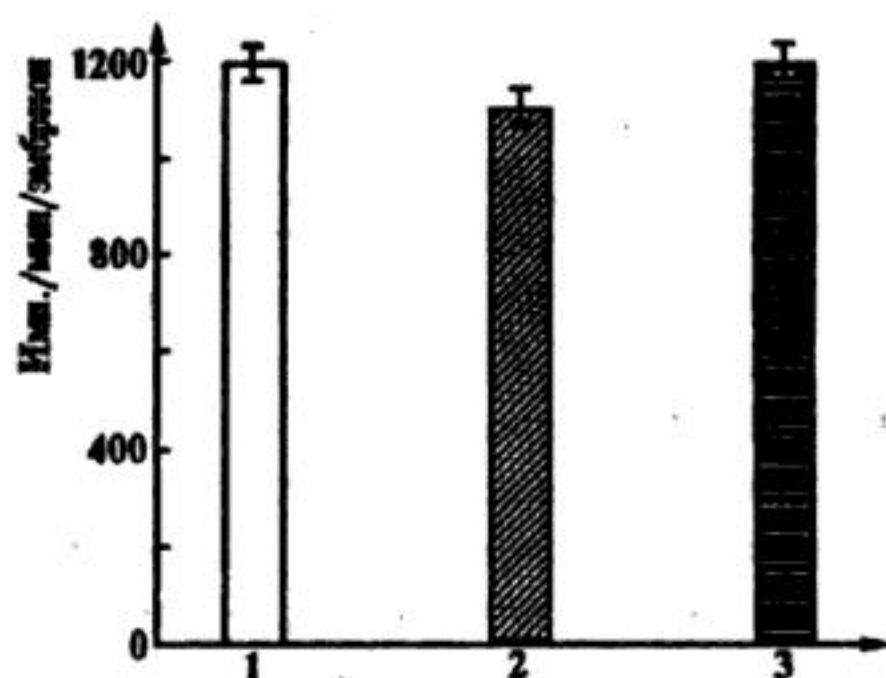


Рис. 3. Включение ^3H -тимидина в эмбрионы до и после криоконсервации: 1 – натив, 2 – после криоконсервации, 3 – культивирование после криоконсервации

При определении криочувствительности фермента спермы человека ГбФДГ установлено, что если активность в нативных спермиях составляла 100%, то в перенесших криоконсервирование – 99,7%; это свидетельствует о высокой криозащитной эффективности разработанного способа криоконсервации спермы человека. Данный способ криоконсервации спермы может быть применен при замораживании нормальных эякулятов и при некоторых видах патоспермии, что имеет не только практическое значение, но и является свидетельством высокой эффективности и надежности способа. По оплодотворяющей способности замороженно-оттаянная сперма не отличается от нативной. Способ криоконсервации спермы человека широко внедряется в клинических учреждениях Украины и России и эффективно используется при лечении бесплодия различной этиологии.

Высокая морфофункциональная сохранность как спермиев, так и эмбрионов, криоконсервированных разработанными способами, может быть объяснена удачным сочетанием сверхвысоких скоростей охлаждения с составом криоконсерванта, содержащего низкие концентрации криопротекторов и биологически активного вещества, стабилизирующего нативную структуру мембраны клеток. При этом, надо полагать, реализуются как гидратационные свойства молекул холина, так и их взаимодействие с компонентами мембран посредством обмена связанной воды, имеется в

виду уменьшение механических напряжений в мембране, возникающих при криоконсервации, и сглаживание структурных перестроек липид-липидных и

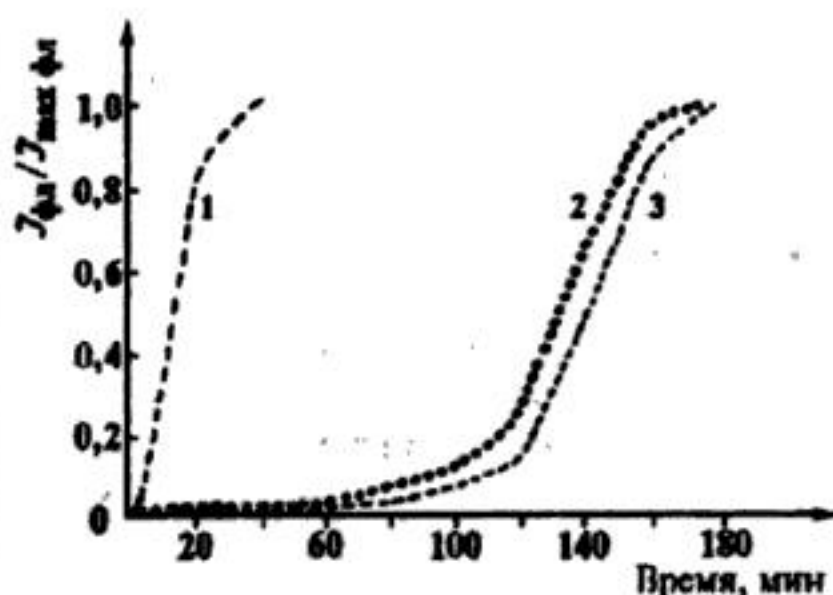


Рис. 4. Зависимость кинетики флуоресценции эмбрионов при флуорохромировании с АНС от степени их сохранности: 1 – эмбрионы после добавления детергента, 2 – эмбрионы после криоконсервации, 3 – эмбрионы до криоконсервации

липид-белковых комплексов, способствующих сохранению ее барьерной функции.

Не имея возможности изучить структуру льда микрокалориметрически или электронномикроскопически из-за неразрешимости чисто методических проблем, мы допускаем аналитическое объяснение полученных результатов. Известно, что биологические среды в зависимости от состава и скорости охлаждения могут быть заморожены путем аморфизации или иметь в своем составе незавершенные либо завершенные кристаллические структуры. При сверхбыстром охлаждении репродуктивных клеток, прежде всего хорошо обводненных крупных, по сравнению со спермиями, эмбрионов, образуется внутриклеточный мелкоструктурный лед, имеющий незавершенную форму с аморфными и витрифицированными областями, чему содействует состав криоконсерванта, в частности, наличие в нем 1,2-пропандиола, способствующего в большей мере, чем глицерин и ДМСО, стеклованию жидкой фазы. Кристаллы льда, надо полагать, не превышают в диаметре 0,5 микрон, следовательно, сами по себе не являются повреждающим фактором [14]. Однако исключительно высокая скорость образования зародышей кристаллов и их неспособность в этих условиях достичь более крупных размеров, прежде чем раствор достигнет равновесия, приводит к тому, что они имеют высокую площадь поверхности на единицу объема и, следовательно, определяют тенденцию к рекристаллизации. Поскольку внутриклеточный лед находится в метастабильном состоянии, последствия его отогрева зависят от скорости этого процесса. При быстром отогреве, предусмотренном в разработанных нами способах криоконсервации спермиев и эмбрионов в среде криоконсерванта многокомпонентного состава, не разовьется рекристаллизация, а произойдет безвредное для клеток плавление льда, что сохраняет биологическую их полноценность после размораживания.

Следует отметить, что тормозом развития рекристаллизации внутриклеточного льда являются предусмотренная в криоконсерванте для эмбрионов комбинация эндоцеллюлярных криопротекторов, повышение вязкости среды, за счет которых снижается диффузия молекул воды к стремящимся к росту кристаллам льда.

Отличительной особенностью указанных способов являются простота и кратковременность процедуры подготовки к замораживанию эмбрионов и спермиев, процесса охлаждения, применение криоконсерванта, содержащего низкие концентрации криопротектора и биологически активных веществ, высокая морфофункциональная сохранность после оттаивания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воскобойников Т.Н. Криоконсервация лимфоидных клеток под защитой криопротекторов из группы полиэтиленоксидов: Автореф. дис....канд. биол. наук. — Харьков, 1983. — 21 с.
2. Кошый С.В. Криопротекторы ряда алкоксизамещенных глицерина (синтез, физико-химические свойства): Автореф. дис....канд. хим. наук. — Харьков, ХГУ, 1992. — 23 с.
3. Смирнов И.В. Сохранение спермы сельскохозяйственных животных посредством глубокого охлаждения // Сов. зоотехника. — 1949. — № 4. — С. 93–98.
4. Bernard A., Amoedemhe D., Syaw R. et al. Effects of cryoprotectants on human oocytes // Lancet. — 1985. — № 2429. — P. 632–633.
5. Graham K., Roy H., Hammerstedt. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol // Cryobiology. — 1992. — 29, № 1. — P. 26–39.
6. Kasai K.V., Toyoda V. Fertilization and development *in vitro* mouse eggs from inbred strains and F₁ hybrids // Japan J. Anim. Reprod. — 1978. — 24. — P. 19–22.
7. Bui-Xuan-Nguyen N., Heyman G., Renard J.P. Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature // Theriogenology. — 1984. — 22. — P. 389–399.
8. Luyet B.J., Keane J. A critical temperature range apparently characterized by sensitivity of bull semen to high freezing velocity // Biodynamica. — 1955. — 7. — P. 281–292.

9. Massip A., Van Der Zwalm P., Seheffen B., Ectors F. La vitrification methode d'avenir pour la cryoprotection des embryos et des oocytes. Workshop on embryos and oocytes freezing // Annency, France, 1986. – P. 179–194.
10. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intercellular freezing // J. Gen. Physiol. – 1963. – 47. – P. 347–369.
11. Polge C., Willadsen S.M. Freezing eggs and embryos of farm animals // Cryobiology. – 1978. – 15, № 3. – P. 370–373.
12. Rall W.F. The role of intracellular ice in the slow warming injury of mouse embryos // Frozen storage of laboratory animals / Ed. by G.H. Zeilmaker. – Stuttgart, New York: Fischer, 1981. – P. 33–38.
13. Rubinsky B., Arav A., Devries A.L. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from Antarctic fish // Cryobiology. – 1992. – 29, № 1. – P. 69–79.
14. Stephenson T.L. Fundamental physical problems in the freezing and drying of biological materials // Recent Rescarches in Freezing Materials. – Blackwell: Oxford, 1960. – 121 p.
15. Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and 269°C // Science. – 1978. – № 245. – P. 411–414.
16. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing // Life Sciences. – 1972. – 11. – P. 1071–1079.

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

Поступила 23.01.93

В.І.ГРИЩЕНКО, Ю.В.КАЛУГІН, Н.А.ЛУЧКО

ДЕЯКІ АСПЕКТИ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ ЕМБРІОНІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м.Харків

Розглянуто деякі питання кріоконсервації спермій та ембріонів і обґрунтована необхідність застосування низьких нешкідливих концентрацій кріопротекторів. Викладено дані про розробку нових принципів кріоконсервації репродуктивних клітин, створених багатокомпонентними кріоконсервантами і використаними при надшвидкому охолодженні. Висока ефективність розроблених способів кріоконсервації спермій і ембріонів підтверджена комплексом фізіологічних та біохімічних досліджень цих видів клітин до і після їх кріоконсервації.

V.I.GRISCHENKO, YU.V.KALUGIN, N.A.LUCHKO

SOME ASPECTS OF EMBRYO AND SPERM CRYOPRESERVATION

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

The article describes certain problems of cryopreserving spermatozoa and embryos. The necessity of employing low non-hazardous concentrations of cryoprotective agents is substantiated. The data on the elaboration of the new principles of reproductive cell cryopreservation, using multicomponent cryopreservation media and suprahigh cooling rates, are presented. A high efficiency of the developed methods of sperm and embryo cryopreservation is confirmed by a range of physiological and biochemical tests of these cells prior to and after cryopreservation.

УДК 57.043:57.086.132:579

А.А.Цуцаева, И.П.Высеканцев, Л.М.Балыбердина,
Е.М.Князев

ВЛИЯНИЕ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ПРОЦЕССА ЛИОФИЛИЗАЦИИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

На жизнеспособность бактерий *E. coli* в процессе лиофилизации оказывали влияние возраст бактериальной культуры, состав защитной среды, скорость охлаждения. Исходная концентрация клеток, суспендированных в защитной среде, и замораживание до температур, ниже температуры начала сушки, на эффективность лиофилизации бактерий не влияли.

Одним из альтернативных низкотемпературному консервированию способов хранения, удобных для транспортировки биологических объектов, является хранение их в лиофилизированном состоянии [1, 7]. При лиофилизации

большинства биологических объектов происходит частичная гибель клеток, а в ряде случаев — изменение их свойств [1, 9, 10]. В связи с этим возникла необходимость в выяснении причин отрицательного воздействия процесса лиофилизации на биологические объекты. Показано, что эффективность лиофилизации микроорганизмов зависит от ряда факторов: способа подготовки к лиофилизации, особенностей процессов замораживания, сублимации, регидратации [1, 7, 10]. Этап подготовки включает в себя определенные условия культивирования и возраст культуры, перевод микробных клеток в защитные среды разного состава, по данным некоторых авторов — концентрирование микробной массы [1, 7, 9, 10]. В связи с вышеизложенным целью данного исследования было изучение влияния на эффективность лиофилизации бактерий *E. coli* условий этапа подготовки, скорости и конечной температуры охлаждения.

Объектом исследования служили бактерии *E. coli* В (штамм получен из ВКПМ ГНИИгенетика, Москва). Бактерии выращивали при 37 °С с аэрированием в глюкозо-минеральной среде М 9 [6]. Во всех опытах, за исключением экспериментов по изучению влияния на эффективность лиофилизации возраста культуры, использовали бактерии, находящиеся в начале стационарной фазы роста. Стадии роста бактериальных культур определяли по методу, описанному в [2]. Бактерии осаждали центрифугированием и ресуспендировали в защитных средах до конечной концентрации $(1-5) \cdot 10^9$ клеток/мл. В качестве защитных сред использовали среду М 9 (№ 1) и среду М 9 с добавлением следующих веществ: № 2 — 1% тиомочевины; № 3 — 10% сахарозы; № 4 — 10% мальтозы; № 5 — 1,5% желатина; № 6 — 10% лактозы; № 7 — 10% сахарозы и 1% желатина; № 8 — 10% сахарозы, 1,5% желатина, 1% тиомочевины; № 9 — 10% сахарозы, 1,5% желатина, 1% тиомочевины, 10% гемодеза.

Бактериальные суспензии вносили в количестве 1 мм³ в пенициллиновые флаконы. Лيوфилизировали образцы в установке замораживания-высушивания УЗВ-2 (СКТБ с ОП ИПКиК АН Украины, Харьков). Замораживание до -25 °С со скоростями 0,2–2 °С/мин производили в установке УЗВ-2. Замораживание с более высокими скоростями, а также замораживание до температур -70 и -196 °С осуществляли на замораживателе биообъектов УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК АН Украины, Харьков). Образцы, замороженные в замораживателе УОП-6, переносили в специальных кассетах в предварительно охлажденную до -25 °С камеру установки УЗВ-2. Температура начала сушки -25 °С; сушку проводили при остаточном давлении в камере $1,7 \cdot 10^{-1}$ мм рт. ст.; досушивание образцов проводили при температуре 17–20 °С. Продолжительность сушек составляла 6–7 ч. Образцы высушивали до остаточной влажности 2–3,5%. После лиофилизации образцы хранили в течение суток при 4 °С, затем регидратировали при комнатной температуре дистиллированной водой. При определении количества жизнеспособных бактерий в контрольных образцах, замороженных до -196, -70, -25 °С, их отогревали на водяной бане при 37 °С. Количество жизнеспособных бактерий определяли чашечным методом Коха [8] по количеству колоний, сформировавшихся на мясопептонном агаре [4]. Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым методам [5]. Достоверность расчетов — 95%.

В первой серии экспериментов изучали количество выживших бактерий, лиофилизированных после замораживания до различных температур. Бактерии, суспендированные в среде № 7, замораживали со скоростью 2 °С/мин до температур -25, -70, -196 °С. После отогрева до -25 °С образцов, замороженных до -70 и -196 °С, все пробы лиофилизировали. Было установлено, что за-

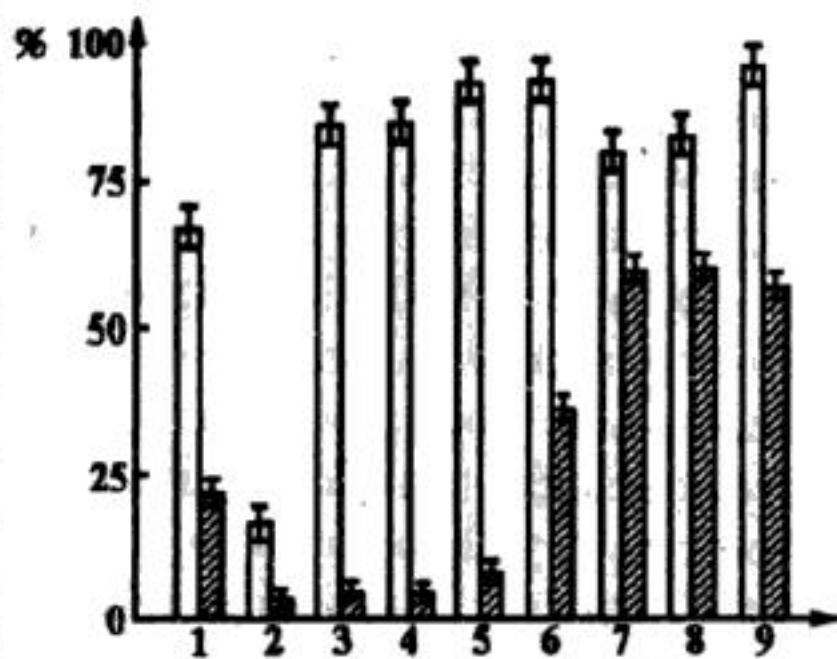
мораживание до указанных температур не влияло на жизнеспособность бактерий при последующей лиофилизации. Жизнеспособными сохранились соответственно 68,9; 69,6; 59,7% бактерий.

Во второй серии экспериментов исследовали жизнеспособность бактерий, лиофилизированных после замораживания с различными скоростями. Бактерии замораживали в среде № 7 со скоростями 0,2; 2; 5; 13 °С/мин до -70 °С с последующим погружением в жидкий азот, а также погружением в жидкий азот, после чего лиофилизировали. Часть контрольных проб отогревали сразу на водяной бане при 37 °С, другую — сначала в камере УЗВ-2 до -25 °С, а затем на водяной бане. Жизнеспособность бактерий из всех контрольных образцов, подвергавшихся замораживанию-отогреву, не отличалась между собой и составляла 72–79%. В то же время скорость охлаждения оказывала значимое влияние на эффективность лиофилизации. Жизнеспособность бактерий, лиофилизированных после замораживания со скоростями 0,2; 2; 5 °С/мин, была наиболее высокой (57–59%). Жизнеспособность бактерий, лиофилизированных после замораживания со скоростью 13 °С/мин и погружением в жидкий азот, снижалась соответственно до 37 и 28%.

В третьей серии экспериментов была изучена сохранность бактерий, лиофилизированных в различных защитных средах. Бактерии лиофилизировали после охлаждения в камере установки УЗВ-2 со скоростью 2 °С/мин. Наиболее высокую выживаемость бактерий наблюдали после лиофилизации в многокомпонентных средах № 7, 8, 9 (рис.). Жизнеспособность бактерий, лиофилизированных в среде М 9 без добавок и с однокомпонентными добавками (среды № 2, 3, 4, 5, 6), была достоверно ниже.

В четвертой серии экспериментов изучали жизнеспособность лиофилизированных бактерий из образцов с различной исходной концентрацией клеток, суспендированных в среде № 7. Показано, что количество жизнеспособных бактерий, выраженное в процентах, из образцов с исходной концентрацией 10^6 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} клеток/мл после лиофилизации достоверно не отличалось между собой.

В заключительной серии экспериментов исследовали чувствительность бактерий на разных стадиях роста периодической культуры к действию повреждающих факторов процесса лиофилизации. Бактерии на разных стадиях роста осаждали центрифугированием, ресуспендировали в среде М 9 до концентрации 10^9 клеток/мл и замораживали до -70 °С со скоростью 2 °С/мин с последующим погружением в жидкий азот. После отбора всех проб их лиофилизировали. После лиофилизации сохранялись жизнеспособными 13% бактерий из логарифмической фазы роста, 22% — из стационарной фазы, 8% — из фазы отмирания.



Выживаемость бактерий *E. coli* после лиофилизации в различных защитных средах: 1 — среда М 9; 2 — среда М 9 + 1% тиомочевины; 3 — среда М 9 + 10% сахарозы; 4 — среда М 9 + 10% мальтозы; 5 — среда М 9 + 1,5% желатина; 6 — среда М 9 + 10% лактозы; 7 — среда М 9 + 10% сахарозы и 1% желатина; 8 — среда М 9 + 10% сахарозы, 1,5% желатина и 1% тиомочевины; 9 — среда М 9 + 10% сахарозы, 1,5% желатина, 1% тиомочевины и 10% гемодеза.

□ — количество жизнеспособных бактерий после замораживания до -25 °С, % от контроля; ▨ — количество жизнеспособных бактерий после лиофилизации, % от контроля

Результаты проведенных исследований показывают, что начальные этапы процесса лиофилизации могут оказывать значимое влияние на сохранность бактерий *E. coli*. Так, чувствительность бактерий к действию повреждающих факторов процесса лиофилизации, как и криоконсервирования [3], зависит от морфофункциональных особенностей клеток, обусловленных возрастом периодической культуры. Клетки из стационарной фазы роста наиболее устойчивы к процессу лиофилизации, что следует учитывать при разработке технологий лиофилизации бактерий. При подборе защитных сред более эффективными оказались многокомпонентные среды. Существенное влияние на количество жизнеспособных бактерий в процессе лиофилизации оказывает скорость охлаждения. Наиболее высокое количество выживших бактерий наблюдалось при лиофилизации образцов, замороженных со скоростью от 0,2 до 5 °С/мин. Такое сочетание многокомпонентных защитных сред и медленных скоростей охлаждения обеспечивает, по-видимому, образование капиллярно-пористой структуры, благодаря которой осуществляется эффективный и равномерный процесс сублимации биологической системы.

Установленный факт отсутствия влияния конечной температуры охлаждения (до -25, -70, -196 °С) на эффективность последующей сублимации позволяет в условиях банков и коллекций микробных культур объединить низкотемпературное консервирование и лиофилизацию по следующей схеме: длительное хранение микробных культур при низких температурах в упаковках, пригодных для лиофилизации, и последующая сублимация перед транспортировкой потребителю.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Цветков Ц.Д. Научные основы технологии сублимационного консервирования. – Киев: Наук. думка, 1985. – 208 с.
2. Иерусалимский Н.Д. Основы физиологии микробов. – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – С. 195–204.
3. Криобиология и биотехнология / Под общ. ред. Цуцаевой А.А. – Киев: Наук. думка, 1987. – 216 с.
4. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – 344 с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
6. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – 436 с.
7. Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. – М.: Колос, 1971. – 270 с.
8. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С.Егорова. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1976. – 307 с.
9. Сидякина Т.М. Консервация микроорганизмов. – Пушкино: НИЦБИ АН СССР, 1985. – 63 с.
10. Lapege S.P. Preservation of microorganisms // Handb. Microbiol. Cleveland, Ohio. – 1973. – 1. – P. 713–724.

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

Поступила 20.07.93

А.О.ЦУЦАЄВА, І.П.ВИСЬКАНЦЕВ, Л.М.БАЛИБЕРДІНА, Є.М.КНЯЗЄВ

ВПЛИВ ПОЧАТКОВИХ ЕТАПІВ ПРОЦЕСУ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ЛІОФІЛІЗОВАНИХ БАКТЕРІЙ *ESCHERICHIA COLI*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м.Харків

На життєздатність бактерій *E. coli* у процесі ліофілізації впливали вік бактеріальної культури, склад захисного середовища, швидкість охолодження. Вихідна концентрація клітин, суспендованих у захисному середовищі, і заморожування до температур, що нижчі від температури початку сушіння, на ефективність ліофілізації бактерій не впливали.

EFFECT OF INITIAL STAGES OF THE PROCESS OF LYOPHILIZATION ON VIABILITY OF LYOPHILIZED BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

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

The age of bacterial culture, composition of protective medium and cooling rate affected viability of the bacteria *Escherichia coli* in the process of lyophilization. Initial concentration of cells, suspended in protective medium, and freezing down to the point below the temperature of the beginning of the drying did not influence the efficiency of bacteria lyophilization.

УДК 57.043:612.44/45

В.А.Чуйко, Л.Г.Карпенко, А.Н.Новиков, С.Т.Олейник

АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ОХЛАЖДЕНИЯ С ДИМЕКСИДОМ И ПРОПАДИОЛОМ

Представлены данные о влиянии двух режимов замораживания: контрольного и экспоненциального на активность аденилатциклазы в мембранах клеток адренокортикальной ткани. Показано, что экспоненциальный режим не имеет преимущества перед контрольным, так как не изменяет активность исследуемой системы.

Ранее было установлено, что при замораживании адренокортикальной ткани со скоростью 1–3 °С/мин с 1%-м 1,2-пропандиолом (1,2-ПД) и 5%-м димексидом увеличивается базальная активность аденилатциклазы (АЦ) и сохраняется ее чувствительность к регуляторам NaF и синактену [1].

Целью настоящей работы явилось проведение сравнительного изучения влияния двух режимов замораживания: 1-го с постоянной скоростью 1–3 °С/мин и 2-го экспоненциального, скорость которого изменяется во время охлаждения, на активность аденилатциклазы в адренокортикальной ткани.

Замораживались фрагменты ткани коры надпочечников массой 1 г с помощью устройства УОП 6.00.00.00

(СКТБ с ОП ИПКиК АН Украины).

Первый режим замораживания (контрольный) осуществлялся со скоростью 1–3 °С/мин до –70 °С и со скоростью 100 °С/мин до –196 °С. Второй режим (экспоненциальный) характеризуется зависимостью изменения температуры от времени и выражается по формуле: $t = 1 - e^{\alpha \tau}$, где t – текущее значение температуры во времени; α – показатель экспоненты [2]. Изменения скорости охлаждения приведены в табл. 1. В качестве криопротекторов использовались димексид и 1,2-пропандиол в концентрациях 1, 5 и 10%. Отогрев образцов производился на водяной бане при 37 °С.

Активность аденилатциклазы исследовалась по методу [3] в фракциях плазматических мембран [4]. Содержание цАМФ определялось радиохимическим

Т а б л и ц а 1

Изменение скорости охлаждения при использовании экспоненциального режима замораживания

Температурный диапазон, °С	Скорость охлаждения, °С/мин
0÷–10	1
–1÷–20	2
–20÷–40	4
–40÷–70	10
–70÷–120	20
–120÷–160	20
–160÷–196	100

Т а б л и ц а 2

Влияние замораживания со скоростью 3 °С/мин и стимуляторов на активность АЦ в мембранах клеток коры надпочечников свиньи

Условия эксперимента	Активность АЦ, пмоль цАМФ/мг белка/мин		
	Базальная активность	NaF 40 ммоль	Синактен 1 мкмоль
Незамороженная ткань	0,04±0,01	1,30±0,36*	0,09±0,01*
Замораживание 3 °С/мин	0,13±0,07	0,53±0,21*	0,13±0,07
Замораживание 3 °С/мин с 1 %-м димексидом	0,21±0,03	2,04±0,38*	0,17±0,07
Замораживание 3 °С/мин с 5 %-м димексидом	0,20±0,06	3,16±0,97*	0,41±0,08*
Замораживание 3 °С/мин с 10 %-м димексидом	0,10±0,03	1,11±0,52*	0,10±0,01
Замораживание 3 °С/мин с 1 %-м 1,2-ПД	0,05±0,02	0,99±0,14*	0,12±0,01*
Замораживание 3 °С/мин с 5 %-м 1,2-ПД	0,17±0,07	1,19±0,50*	0,15±0,03
Замораживание 3 °С/мин с 10 %-м 1,2-ПД	0,35±0,09	8,80±1,19*	0,19±0,03

Примечание. * – достоверно к базальной активности.

методом с использованием наборов цАМФ “Амершам”. Данные по изучению влияния первого режима замораживания на активность АЦ приведены в табл. 2. Добавление 1 %-го димексида в качестве криопротектора приводит к увеличению базальной активности АЦ, способствует сохранению ее чувствительности к фториду, при этом отсутствует чувствительность к синактену. Увеличение концентрации димексида до 5 % вызывает повышение базальной активности данного фермента и способствует сохранению чувствительности как к фториду, так и синактену. Применение 10 %-го димексида не способствует сохранению чувствительности исследуемой системы к синактену. Замораживание адренокортикальной ткани с 1 %-м пропандиолом в данном режиме охлаждения сохраняло чувствительность АЦ к фториду и синактену. Увеличение концентрации 1,2-ПД до 5 и 10 % приводило к потере чувствительности АЦ-системы к синактену.

Т а б л и ц а 3

Влияние замораживания по экспоненциальной программе и стимуляторов на активность АЦ в мембранах клеток коры надпочечников свиньи

Условия эксперимента	Активность АЦ, пмоль цАМФ/мг белка/мин		
	Базальная активность	NaF 40 ммоль	Синактен 1 мкмоль
Незамороженная ткань	0,23±0,10	2,67±0,89*	0,38±0,17
Замораживание 3 °С/мин	0,98±0,41	11,56±4,90*	0,29±0,08
Замораживание 3 °С/мин с 1 %-м димексидом	1,02±0,48	6,07±2,34*	1,49±0,74
Замораживание 3 °С/мин с 5 %-м димексидом	0,16±0,07	13,08±4,82*	0,37±0,18*
Замораживание 3 °С/мин с 10 %-м димексидом	0,34±0,15	6,96±2,87*	0,22±0,05
Замораживание 3 °С/мин с 1 %-м 1,2-ПД	0,28±0,09	6,97±3,20*	0,44±0,14*
Замораживание 3 °С/мин с 5 %-м 1,2-ПД	0,43±0,12	10,19±5,05*	0,13±0,04
Замораживание 3 °С/мин с 10 %-м 1,2-ПД	0,84±0,12	7,55±3,33*	0,25±0,06

Примечание. * – достоверно к базальной активности.

При изучении АЦ мембран клеток аденокортикальной ткани, замороженной по экспоненциальной программе с 5%-м димексидом и 1%-м 1,2-пропандиолом, было установлено, что базальная активность АЦ-системы близка к уровню таковой в незамороженной ткани, а также сохраняется ее чувствительность к регуляторам (табл.3). Использование же других концентраций криопротектора не приводило к сохранению чувствительности аденилатциклазы к синактёну.

Таким образом, изучение двух режимов замораживания показало, что экспоненциальный режим не имеет преимуществ перед контрольным, так как не приводит к изменениям в активности аденилатциклазы аденокортикальной ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карпенко Л.Г., Чуйко В.А. Активность аденилатциклазы в мембранах клеток аденокортикальной ткани при замораживании с димексидом и 1,2-пропандиолом // Проблемы криобиологии. – 1993. – № 3. – С. 54–55.
2. Новиков А.Н., Ткаченко С.И., Стрибуль Т.Ф., Рындин В.Ф. О возможности использования экспоненциальных режимов охлаждения при криоконсервировании биологических объектов // Биофизика. – 1985. – XXX, № 6. – С. 1042–1045.
3. Bech K., Madsen S.N. Human thyroid adenylate cyclase in nontoxic goitre: sensitivity to TSH, fluoride and thyroid stimulating immunoglobulins // J. Clin. Endocrinol. – 1978. – 8. – P. 457–466.
4. 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, № 3. – P. 352–356.

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

Поступила 04.12.92

В.А.ЧУЙКО, Л.Г.КАРПЕНКО, О.М.НОВИКОВ, С.Т.ОЛІЙНИК

АКТИВНІСТЬ АДЕНІЛАТЦИКЛАЗИ В АДРЕНОКОРТИКАЛЬНІЙ ТКАНИНІ ПРИ РІЗНИХ РЕЖИМАХ ОХОЛОДЖЕННЯ З ДИМЕКСИДОМ І ПРОПАНДІОЛОМ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м.Харків

Названо дані про вплив двох режимів заморожування – контрольного і експоненціального – на активність аденилатциклази у мембранах клітин аденокортикальної тканини. Показано, що експоненціальний режим не має переваг перед контрольним, бо не змінює активність досліджуваної системи.

V.A.CHUIKO, L.G.KARPENKO, A.N.NOVIKOV, S.T.OLEYNIK

ADENYLATE CYCLASE ACTIVITY IN ADRENOCORTICAL TISSUE DURING VARIOUS MODES OF COOLING WITH DIMEXIDE AND PROPANEDIOL

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

The data on the influence of two modes of freezing – control and exponential – on the adenylate cyclase activity in adrenocortical tissue cell membranes are presented. Exponential mode of freezing is shown to have no advantages over control one, since it does not alter the activity of the system under study.

Е.В.Бердышев, М.А.Ващенко**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ И
ЛИПИДНОГО ПРЕПАРАТА КПС НА ОПЛОДОТВОРЯЮЩУЮ
СПОСОБНОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ МОРСКОГО ЕЖА
STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS, ПОДВЕРГНУТЫХ
ГЛУБОКОМУ ЗАМОРАЖИВАНИЮ**

Показано, что фактор активации тромбоцитов (ФАТ) в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-9}$ М способен увеличивать подвижность и оплодотворяющую способность сперматозоидов морского ежа как в обычных условиях, так и после низкотемпературной консервации. Выявлен стимулирующий эффект 0,25%-го раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) на подвижность и оплодотворяющую способность сперматозоидов морского ежа. Введение в раствор криопротектора (1,5 М ДМСО) препарата КПС (конечная концентрация 10 мкг/мл) также несколько увеличивало оплодотворяющую способность сперматозоидов после их криоконсервации и размораживания. Комбинированное применение препаратов КПС (до замораживания) и ФАТ (после размораживания), растворенного в 0,25%-м БСА ($1 \cdot 10^{-9}$ М), дало наибольший положительный эффект.

Криопротекторные свойства липидов и их комплексов были установлены еще в 1940 г. [19]. В дальнейшем большое число работ было посвящено изучению механизма криопротекторного действия различных липидов и их комплексов с белками [7, 11, 13, 14, 24, 27]. Недавно внимание эмбриологов привлек липид, обладающий очень высокой биологической активностью, так называемый фактор активации тромбоцитов — 1-0-алкил-2-0-ацетил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ФАТ) [8, 12, 25, 26]. Этот эндогенный медиатор иммунных реакций оказался способным стимулировать подвижность сперматозоидов [20], оплодотворение [15, 17, 21] и имплантацию эмбрионов млекопитающих [3, 23]. Сперматозоиды — основной объект криобиологии — после замораживания-оттаивания в большинстве случаев существенно уменьшают свою подвижность и оплодотворяющую способность. Применение веществ, стимулирующих их функции, может уменьшить повреждающий эффект замораживания.

В настоящее время тот факт, что морские ежи являются уникальным объектом с точки зрения возможности изучения влияния внешних факторов и различных веществ на оплодотворение и эмбриогенез, является общепризнанным [10]. Сперматозоиды морских ежей можно рассматривать как объект, на котором наиболее удобно отрабатывать методики замораживания-оттаивания и изучать влияние веществ разной природы на криоконсервацию клеток.

Успешная криоконсервация сперматозоидов морских ежей, в том числе дальневосточного вида *Strongylocentrotus intermedius*, описана уже давно [2, 4, 5]. Однако количественной оценки оплодотворяющей способности сперматозоидов морского ежа, подвергнутых замораживанию-оттаиванию, до сих пор сделано не было. Между тем только на основе количественного анализа можно сравнивать эффективность различных методов криоконсервации и применения разнородных криопротекторов и стимуляторов. В настоящей работе были поставлены две задачи: 1) оценить оплодотворяющую способность сперматозоидов морского ежа *S. intermedius*, подвергнутых глубокому замораживанию-оттаиванию по описанному ранее методу [2], 2) исследовать влияние двух препаратов липидной природы — ФАТ и КПС (препарат получен в лаборатории сравнительной биохимии Института биологии моря ДВО РАН и обладает, предположительно, мембраностабилизирующими свойствами) — на оп-

лодотворяющую способность сперматозоидов после их замораживания-оттаивания.

Морских ежей собирали в зал. Петра Великого (Японское море), в районе о-ва Попова. Нерест стимулировали введением в перивисцеральную полость животных 1 мл 0,5 М раствора KCl. Яйцеклетки и "сухую" сперму получали по общепринятой методике [1]. Морскую воду фильтровали через бумажный фильтр, с помощью ареометра определяли ее соленость и доводили соленость до 30% частично упаренной морской или дистиллированной водой. Приготавливали суспензию яйцеклеток на морской воде плотностью $1 \cdot 10^4$ кл/мл. Проводили контрольное оплодотворение; в опытах использовали яйцеклетки с процентом оплодотворения не ниже 98%. Яйцеклетки и "сухую" сперму хранили в холодильнике при 4°C в течение 2–3 ч.

Концентрацию сперматозоидов определяли с помощью спектрофотометра Spescol 10, оснащенного приставкой EK1, пользуясь графиком зависимости коэффициента пропускания (540 нм) суспензии сперматозоидов от концентрации клеток. Для построения графика использовали серию последовательных 10-кратных разбавлений суспензии спермы, приготовленной на 10%-м растворе уксусной кислоты в морской воде [16]. Концентрацию сперматозоидов в каждой суспензии определяли микроскопически, с использованием камеры Фукса-Розенталя.

Для количественного анализа оплодотворяющей способности сперматозоидов использовали модифицированный метод Диннела с соавторами [9]. "Сухую" сперму нескольких ежей по отдельности разбавляли морской водой до концентрации сперматозоидов $2,5 \cdot 10^8$ кл/мл. Через 30 мин под микроскопом определяли образец спермы с наибольшей подвижностью сперматозоидов, который использовали в дальнейшей работе. Исходную суспензию сперматозоидов разбавляли морской водой до концентрации $2,5 \cdot 10^7$ кл/мл. Морскую воду и аликвоты полученной суспензии от 4 до 240 мкл вносили в пенициллиновые склянки так, чтобы получить суммарный объем 0,9 мл. Через 1 ч после первоначального разбавления "сухой" спермы к сперматозоидам добавляли тестируемые вещества или морскую воду (10 мкл), а еще через 20 мин — 100 мкл суспензии яйцеклеток (около 1000 клеток). Таким образом, конечное число сперматозоидов, приходящихся на одну яйцеклетку, варьировало в широких пределах и составляло 100, 500, 1000, 2000, 4000 и 6000. Через 20 мин после внесения яйцеклеток отбирали аликвоты по 200 мкл и переносили их в планшеты для иммуноферментного анализа, в ячейки которого предварительно было внесено по 5 мкл 2,5%-го раствора глутаральдегида на морской воде. Процент яйцеклеток с оболочкой оплодотворения подсчитывали при помощи инвертированного микроскопа.

В работе использовали бычий сывороточный альбумин — БСА (фракция 5, Sigma Chemical Co, США), лиофилизированный препарат C16:0-ФАТ (Novabiochem, Бельгия) и полусинтетический ФАТ, полученный из липидов морской звезды *Asterias amurensis*, как описано в [6]. Для перевода полусинтетического ФАТ в водный раствор аликвоту его хранимого раствора в метаноле отбирали в полипропиленовую пробирку, растворитель отдували в токе воздуха или аргона, к остатку добавляли 0,25%-й раствор БСА в морской воде и смесь энергично перемешивали в течение 10 мин. Препарат КПС получали в соответствии с разработанным в лаборатории сравнительной биохимии Института биологии моря ДВО РАН технологическим регламентом.

При замораживании спермы *S. intermedius* в качестве криопротектора использовали 97%-й ДМСО, предоставленный Тихоокеанским институтом био-

органической химии ДВО РАН. Глубокое замораживание спермы *S. intermedius* осуществляли в основном, как описано в [2]. "Сухую" сперму (0,04 мл) разбавляли в полипропиленовой пробирке емкостью 1,5 мл охлажденной (0 °С) морской водой до 0,4 мл и к этой взвеси сперматозоидов добавляли 0,8 мл 2М раствора ДМСО в морской воде, охлажденного до 0 °С, порциями по 0,2 мл через каждые 5 мин. В опытах с КПС в 2М раствор ДМСО предварительно вносили препарат КПС, растворенный в ДМСО в таком количестве, чтобы концентрация КПС в 2М ДМСО составляла 15 мкг/мл. Таким образом, конечная концентрация КПС в среде со сперматозоидами (1,2 мл) была 10 мкг/мл. По окончании внесения ДМСО сперматозоиды выдерживали в течение 30 мин при 0 °С, после чего пробирку помещали в охлажденную до 0 °С камеру замораживающей установки конструкции Крастса и Хохлова и охлаждали до -7 °С со скоростью 1 °С/мин, выдерживали при этой температуре 5 мин и индуцировали кристаллообразование прикосновением к наружной стенке пробирки охлажденного в жидком азоте пинцета. Затем пробирку охлаждали до -42 °С со скоростью 1 °С/мин, переносили ее в жидкий азот и выдерживали в нем не менее 1 ч. Для размораживания образца пробирку помещали в воду с температурой 18–20 °С. Содержание ДМСО в пробе уменьшали постепенным разбавлением морской водой (3·0,1 мл, 5·0,3 мл и 5·0,5 мл с интервалом 2 мин, а затем до концентрации сперматозоидов $2,5 \cdot 10^8$ кл/мл). Оплодотворяющую способность сперматозоидов определяли, как описано выше, за исключением того, что аликвоты взвеси сперматозоидов и тестируемые вещества вносили в пенициллиновые склянки сразу после отмывки сперматозоидов.

Т а б л и ц а 1

Влияние концентрации спермы, водорастворимого C16:0-ФАТ, БСА и ФАТ-БСА на оплодотворение яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, %

Препарат	Концентрация сперматозоидов, $\times 10^6$ кл/мл				
	0,1	0,5	1,0	2,0	4,0
Морская вода*	—	$10,7 \pm 7,3$	$18,7 \pm 0,9$	$56,7 \pm 14,5$	$86,3 \pm 6,4$
Морская вода**	0	$1,5 \pm 0,4$	$11,0 \pm 0,1$	$19,5 \pm 4,6$	$39,5 \pm 2,0$
C16:0-ФАТ, М					
$1 \cdot 10^{-7}$	0,5	0,5	$1,0 \pm 0,8$	$2,5 \pm 1,7$	$9,5 \pm 3,7$
$1 \cdot 10^{-8}$	0,5	$4,0 \pm 0,1$	$4,5 \pm 2,0$	$20,0 \pm 2,4$	$55,0 \pm 6,6$
$1 \cdot 10^{-9}$	1,0	$5,5 \pm 1,2$	$14,5 \pm 6,1$	$31,5 \pm 1,2$	$66,5 \pm 6,9$
Морская вода***	$3,5 \pm 2,0$	$1,5 \pm 1,2$	$5,5 \pm 1,2$	$17,5 \pm 3,7$	$77,0 \pm 10,6$
БСА, 0,25 %-й раствор	$5,3 \pm 2,2$	$39,7 \pm 6,4$	$48,0 \pm 10,3$	$71,3 \pm 8,3$	$94,7 \pm 2,0$
ФАТ-БСА, $1 \cdot 10^{-9}$ М	$11,0 \pm 3,2$	$45,7 \pm 10,6$	$61,0 \pm 6,4$	$69,0 \pm 16,3$	$96,3 \pm 0,9$

Примечание. * — представлен один из трех близких по значениям экспериментов; ** — контрольные значения для опыта с C16:0-ФАТ; *** — контрольные значения для опыта с БСА и ФАТ-БСА. Каждое значение — среднее из значений двух экспериментов, проведенных в трех параллелях каждый, $\pm$ — стандартная ошибка.

Для анализа эмбрионального развития морского ежа (от оплодотворения до появления плутеуса) использовали стандартную методику [1]. Яйцеклетки (около 1000 клеток) помещали в стерильную бакпечатку, содержащую 5 мл морской воды, затем добавляли ФАТ, БСА и ФАТ-БСА в нужной концентрации и через 30 мин инкубации — суспензию сперматозоидов, нормальную или подвергнутую замораживанию-оттаиванию. В последнем случае яйцеклетки

после оплодотворения трижды отмывали от избытка сперматозоидов декантацией. На стадиях оплодотворения, первого деления дробления, бластулы, гаструлы и плутеуса подсчитывали процент нормальных зародышей и личинок.

Предварительное выдерживание сперматозоидов морского ежа *S. intermedius* в течение 1 ч после активации их морской водой приводило к существенному снижению подвижности спермиев во всех исследованных образцах спермы (подвижность оценивали визуально). Оплодотворяющая способность таких сперматозоидов сильно зависела от их концентрации в среде: при соотношении сперматозоиды:яйцеклетки в интервале от 500 до 4000 спермиев на одну яйцеклетку процент оплодотворения менялся от 10 до 86 (табл. 1).

Необходимо отметить, что оплодотворяющая способность у разных особей морского ежа различна (табл. 1). На это обстоятельство указывали и авторы метода [9], которые рекомендовали производить отбор спермы с нужными характеристиками. Однако мы пришли к выводу, что более целесообразно использовать широкий интервал концентраций сперматозоидов в среде. В результате получен широкий интервал значений процента оплодотворения, что позволило выявить как стимулирующий, так и понижающий (в случае высоких концентраций ФАТ) оплодотворяющую способность спермиев эффекты исследованных препаратов.

Предварительные (без замораживания спермы) опыты с лиофилизированным препаратом C16:0-ФАТ, способным растворяться в воде, показали, что ФАТ стимулировал оплодотворение в концентрации $1 \cdot 10^{-8} - 10^{-9}$ М, а в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М и выше был токсичен. Токсичность ФАТ обуславливается его детергентными свойствами [22], однако концентрация, при которой ФАТ оказался токсичным для сперматозоидов морского ежа, много ниже по сравнению с таковой для сперматозоидов млекопитающих [18,20].

С практической точки зрения более выгодно использование не дорогого и труднодоступного водорастворимого C16:0-ФАТ, а полусинтетического ФАТ, который можно получать по разработанной нами методике из липидов морских беспозвоночных в необходимых количествах [6]. Полусинтетический ФАТ также обладал и стимулирующим, и токсическим свойствами, как и водорастворимый ФАТ. Кроме того, был обнаружен стимулирующий эффект 0,25%-го раствора БСА, в котором растворяли полусинтетический ФАТ (табл. 1). При визуальной оценке воздействия 0,25%-го раствора БСА и раствора ФАТ в БСА ($1 \cdot 10^{-9}$ М) на сперматозоиды, частично снизившие свою активность после выстаивания в течение 1 ч, было обнаружено, что БСА и в еще большей степени ФАТ-БСА незамедлительно стимулировали подвижность сперматозоидов морского ежа. Возможно, увеличение активности сперматозоидов является одним из механизмов стимулирующего действия этих веществ на оплодотворение у морского ежа.

Глубокое замораживание спермы морского ежа с использованием 1,5 М ДМСО на основе процедуры, предложенной в [2], показало, что эта методика позволяет получить после размораживания живые спермии, однако их подвижность и оплодотворяющая способность очень низки. Для того, чтобы добиться хотя бы средних значений процента оплодотворения, пришлось более чем на порядок увеличить концентрацию сперматозоидов по сравнению с вариантом для свежей спермы. Это изменение параметров привело к тому, что в некоторых случаях при наибольшей концентрации сперматозоидов ($7,5 \cdot 10^7$ кл/мл) происходило не увеличение процента оплодотворения, а, напротив, его уменьшение по сравнению с наблюдавшимися при концентрации сперматозоидов $5 \cdot 10^7$ кл/мл (табл. 2). Этот факт можно объяснить тем, что при такой

высокой концентрации сперматозоидов уже начинает сказываться токсический эффект гидролитических ферментов, высвобождающихся из поврежденных при замораживании сперматозоидов.

Т а б л и ц а 2

Влияние концентрации сперматозоидов, БСА, ФАТ-БСА, КПС и КПС+ФАТ на оплодотворение яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* (%) после глубокого замораживания спермы

Препарат	Концентрация сперматозоидов, $\times 10^6$ кл/мл			
	10	25	50	75
Морская вода	$3,0 \pm 1,2$	$9,3 \pm 0,9$	$17,7 \pm 2,2$	$16,0 \pm 6,1$
Морская вода*	$1,0 \pm 0,6$	$4,0 \pm 1,2$	$5,7 \pm 0,3$	$13,0 \pm 1,5$
БСА, 0,25%-й раствор	$4,0 \pm 1,7$	$7,0 \pm 1,2$	$10,3 \pm 2,1$	$13,7 \pm 0,7$
ФАТ-БСА, $1 \cdot 10^{-9}$ М	$5,3 \pm 2,4$	$9,7 \pm 1,4$	$17,0 \pm 4,9$	$16,3 \pm 2,9$
Морская вода**	$3,3 \pm 1,3$	$8,0 \pm 1,7$	$18,3 \pm 3,7$	$16,3 \pm 4,8$
КПС, 10 мкг/мл	$4,3 \pm 0,7$	$9,7 \pm 1,8$	$11,3 \pm 3,4$	$18,3 \pm 0,9$
ФАТ, $1 \cdot 10^{-9}$ М	$5,0 \pm 0,6$	$13,3 \pm 0,9$	$16,3 \pm 2,3$	$20,0 \pm 3,5$
КПС + ФАТ	$4,7 \pm 2,6$	$16,0 \pm 2,5$	$22,7 \pm 2,2$	$31,3 \pm 2,7$

Примечание. * – контрольные значения для эксперимента с БСА и ФАТ-БСА; ** – контрольные значения для эксперимента с КПС, ФАТ и КПС + ФАТ. Каждое значение – среднее из значений двух экспериментов, проведенных в трех параллелях каждый, $\pm$ – стандартная ошибка.

Низкий выход живых сперматозоидов при базовом режиме глубокого замораживания позволил продолжить эксперименты с ФАТ, а также оценить криопротекторный эффект препарата КПС; ФАТ в концентрации $1 \cdot 10^{-9}$ М увеличивал оплодотворяющую способность сперматозоидов, замороженных с использованием 1,5 М ДМСО (табл. 2). Визуальная оценка размороженной спермы под микроскопом показала, что БСА (0,25%-й раствор) и раствор ФАТ в БСА ($1 \cdot 10^{-9}$ М) стимулировали подвижность сперматозоидов, что указывает на сохранение у переживающих глубокое замораживание сперматозоидов морского ежа молекулярных основ для стимуляции ФАТ их подвижности и оплодотворяющей способности. Добавка к сперматозоидам на стадии эквilibрации препарата КПС, растворенного в ДМСО (до конечной концентрации 10 мкг/мл), привело лишь к небольшому увеличению оплодотворяющей способности сперматозоидов после их размораживания, однако комбинация препаратов КПС (10 мкг/мл – введение перед замораживанием) и ФАТ-БСА ($1 \cdot 10^{-9}$ М – после размораживания) дала наибольший положительный эффект (табл. 2). Результаты опытов с КПС указывают на его криопротекторный эффект для сперматозоидов морского ежа, однако этот вывод требует дополнительного экспериментального обоснования.

Анализ эмбрионального развития морского ежа показал, что предварительная инкубация яйцеклеток в присутствии БСА (0,25%-й раствор), ФАТ (10^{-8} – 10^{-9} М) и ФАТ-БСА не влияла на способность яиц к оплодотворению, которое было стопроцентным, и не вызывала каких-либо аномалий в развитии и изменении в скорости прохождения отдельных стадий эмбриогенеза. Яйцеклетки, оплодотворенные в присутствии $1 \cdot 10^{-9}$ М ФАТ спермой, подвергнутой глубокому замораживанию, также были способны развиваться без каких-либо заметных аномалий. Отсутствие нарушений в эмбриональном развитии эмбрионов морских ежей после оплодотворения яйцеклеток спермой, заморо-

женной в присутствии 1,5 М ДМСО, было показано и ранее [4]. Таким образом, ФАТ в физиологических концентрациях не влиял на раннее развитие морского ежа, в том числе и в случае использования для оплодотворения яйцеклеток сперматозоидов, подвергнутых глубокому замораживанию.

Роль ФАТ в механизме оплодотворения у животных и человека в последние годы привлекает все большее внимание ученых, однако механизм его действия на сперматозоиды во многом остается еще неясным, несмотря на огромный мировой опыт в области изучения ФАТ. Не исключено, что механизм воздействия ФАТ на сперматозоиды млекопитающих и морского ежа может быть во многом общим. Поэтому выяснение механизма действия ФАТ на сперматозоиды морских ежей может помочь не только в разработке новых способов их криоконсервации, но и в выяснении роли ФАТ в оплодотворении у млекопитающих и человека. Кроме того, работа с гаметам и эмбрионами морского ежа позволяет гораздо быстрее и проще проследить за многими процессами, чем при исследованиях на млекопитающих. Что же касается препарата КПС, то тут, безусловно, нужны дополнительные эксперименты для изучения механизма его действия на биомембрану, что позволит найти более эффективный способ его применения. Обнаруженный синергизм в действии ФАТ и КПС позволяет надеяться на это.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бузников Г.А., Подмарев В.К. Морские ежи (*Strongylocentrotus drobachiensis*, *S. nudis*, *S. intermedius*) // Объекты биологии развития / Под ред. М.С. Мицкевич, Т.А. Детлаф и др. – М.: Наука, 1975. – С. 188–216.
2. Гахова Э.Н., Беспалая Л.А. Методическое руководство по криоконсервации морских ежей. – Пущино: Ин-т биофизики АН СССР, 1990. – 164 с.
3. Acker G., Ytchquet F., Etienne A. et al. Role of platelet-activating factor (PAF) in the oviimplatation in the rat: effect of the specific PAF-acether antagonist, BN 52021 // Prostaglandins. – 1988. – 35. – P. 233–241.
4. Asahina E., Takahashi T. Survival of sea urchin spermatozoa and embryos at very low temperatures // Cryobiology. – 1977. – 14. – P. 703.
5. Asahina E., Takahashi T. Freezing tolerance and spermatozoa of the sea urchin // Cryobiology. – 1978. – 15. – P. 122–127.
6. Berdyshev E.V., Getmanova O.E. PAF-like activity of O-acetylated sphingomyelin // Biomed. Sci. – 1991. – 2. – P. 485–488.
7. Blackshaw A.W., Salisbury G.W. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-shock and its prevention // J.Dairy Sci. – 1957. – 40. – P. 1099–1106.
8. Braquet P., Rola-Pleszczynski M. Platelet activating factor cellular immune responses // Immunol. Today. – 1987. – 8. – P. 345–350.
9. Dinnel P.A., Link J.M., Stober Q.J. Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters // Arch. Environ. Contam. – 1987. – 16. – P. 23–32.
10. Fertilization and embryonic development in vitro / L. Mastroianni and J.D. Biggers, eds. – New York, London: Plenum Press, 1981. – 371 p.
11. Graham J.K., Foote R.H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing // Cryobiology. – 1987. – 24. – P. 42–52.
12. Harper M.J.K. Platelet activating factor: a paracrine factor in preimplantation stages of reproduction? // Biol. Reprod. – 1989. – 40. – P. 907–913.
13. Holt W.V., North R.D. The role of membrane-active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage // 1988. – 19. – P. 77–89.
14. Kampschmid R.F., Mayer D.T., Herman H.A. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa // J. Dairy Sci. – 1953. – 36. – P. 733–742.
15. Minhas B.S., Kumar R., Ricker D.D et al. Effects of platelet activating factor on mouse oocyte fertilization in vitro // Am. J. Obstet Gynecol. – 1989. – 161. – P. 1714–1717.
16. Nacci D., Jackim E., Walsh R. Comparative evaluation of three rapid marine toxicity tests: sea urchin early embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity test and microtox // Environ. Toxicol. Chem. – 1986. – 3. – P. 521–525.
17. O'Neill C., Collier M., Ammit A.J. et al. Supplementation of the vitro fertilization culture medium with platelet-activating factor // Lancet. – 1989. – 11. – P. 769–771.

18. Parks J.E., Hough S.R. Effect of platelet activating factor on the motility and acrosome reaction of bovine spermatozoa // Theriogenology. – 1990. – 34. – P. 903–912.
19. Phillips P.H., Lardy H.A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen // J. Dairy Sci. – 1940. – 23. – P. 399–404.
20. Ricker D.D., Minhas B.S., Kumar R. et al. The effect of platelet activating factor on the motility of human spermatozoa // Fert. Steril. – 1989. – 52. – P. 655–658.
21. Rouderbush W.E., Minhas B.S., Kumar R. et al. Platelet activating factor enhances in vitro fertilization of rabbit oocytes // Am. J. Obst. Gynecol. – 1990. – 163. – P. 1670–1673.
22. Sawyer D.B., Anderson O.S. Platelet-activating factor is a general membrane pertubant // Biochem. Biophys. Acta. – 1989. – 987. – P. 129–132.
23. Seidel G.E., Bowen R.A., Kane M.T. In vitro fertilization culture and transfer of rabbit ova // Fert. Steril. – 1976. – 27. – P. 861–870.
24. Simpson A.M., Swan M.A., White I.G. Action of phosphatidylcholine in protecting ram sperm from cold shock // Gamete Res. – 1986. – 15. – P. 43–56.
25. Snyder F. Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators // Am. J. Physiol. – 1990. – 259. – P. C 697–C 708.
26. Van der Weiden R.M.F., Helmerhorst F.M., Keirse M.J.N.C. Influence of prostaglandins and platelet activating factor on implantation // Hum. Reprod. – 1991. – 6. – P. 436–442.
27. Watson P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein // L. Reprod. Fert. – 1981. – 62. – P. 483–492.

Ин-т биологии моря ДВО РАН, г.Владивосток

Поступила 30.11.92

Є.В. БЕРДИШЕВ, М.О. ВАЩЕНКО

ВПЛИВ ФАКТОРА АКТИВАЦІЇ ТРОМБОЦИТІВ І ЛІПІДНОГО ПРЕПАРАТУ КПС НА ЗАПЛІДНЮЮЧУ ЗДАТНІСТЬ СПЕРМАТОЗОЇДІВ МОРСЬКОГО ЇЖАКА *STRONGILOCENTROTUS INTERMEDIUS* ПІСЛЯ ГЛИБОКОГО ЗАМОРОЖУВАННЯ

Інститут біології моря ДВО РАН, м.Владивосток

Показано, що фактор активності тромбоцитів (ФАТ) в концентрації $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-9}$ М здатний збільшувати рухомість і запліднюючу здатність сперматозоїдів морського їжака як у звичайних умовах, так і після низькотемпературної консервації. Виявлено стимулюючий ефект 0,25%-го розчину сироваткового альбуміну бика (БСА) на рухомість і запліднюючу здатність сперматозоїдів їжака. Введення у розчин кріопротектора (1,5 М ДМСО) препарату ДМСО (кінцева концентрація 10 мкг/мл) також дещо збільшувало запліднюючу здатність сперматозоїдів після їх кріоконсервації і розморожування. Комбіноване застосування препаратів КПС (до заморожування) і ФАТ (після розморожування), розчиненого у 25%-му БСА ($1 \cdot 10^{-9}$ М), дало найбільший позитивний ефект.

E.V.BERDYSHEV, M.A.VASHCHENKO

THE EFFECT OF PLATELET ACTIVATION FACTOR AND LIPID PREPARATION KPS ON THE SPERM FERTILITY OF SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS* SUBJECTED TO DEEP FREEZING

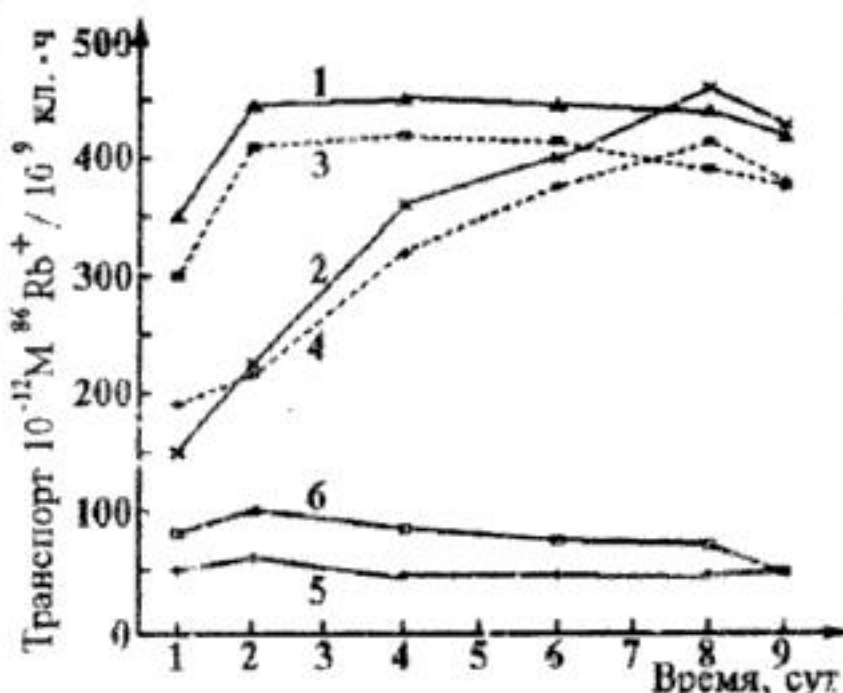
Institute of marine biology, Vladivostok

It has been found that the platelet activation factor (PAF) in a concentration of $1 \cdot 10^{-8}$ M to $1 \cdot 10^{-9}$ M is capable of increasing the motility and fertility of sea urchin spermatozoa both under usual conditions and after cryopreservation. A stimulating effect of 0.25% bovine serum albumin (BSA) on the motility and fertility of sea urchin spermatozoa has been found. The addition of cryoprotectant (1.5 M DMSO) and KPS (10 μ g/ml final concentration) to the solution increased somewhat the fertility of spermatozoa after cryopreservation and thawing. The best effect was observed when KPS (before freezing) and PAF (after freezing) solved in 0.25% BSA ($1 \cdot 10^{-9}$ M) were used.

Б.Т.Стегний, В.В.Рязанцев

ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСПОРТА КАТИОНОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК FLK/BLV ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТОГРЕВА

Известно, что функциональная активность клеток коррелирует с интенсивностью функционирования систем мембранного транспорта ионов [1]. В частности, значительную роль в регуляции ионного гомеостаза клеток и поддержании нормального уровня физиологических процессов в них играет Na^+ -насос, который ассоциируется с Na^+ - K^+ -АТФ-азой [4]. Связь между внутриклеточным содержанием K^+ и пролиферацией четко прослеживается при исследовании ионного гомеостаза растущих клеточных культур [6]. Установлено, что в условиях ингибирования Na^+ - K^+ -насоса резко снижается скорость синтеза белка и ДНК в клетках [7]. В работе [2] было выявлено, что процесс криоконсервирования эритроцитов, клеток асцитной карциномы Эрлиха ведет к нарушению внутриклеточного содержания катионов, систем их транспорта, что является причиной вторичных изменений метаболизма. Вместе с тем процессы транспорта катионов после криоконсервирования ядродержащих клеток, в том числе клеточных культур, изучены мало. Целью настоящей работы является изучение транспорта K^+ в перевиваемой клеточной культуре после криоконсервирования. В работе использовали 3-4-суточную перевиваемую клеточную культуру FLK, хронически инфицированную вирусом лейкоза крупного рогатого скота (BLV), которую культивировали в среде 199 и Игла с глутамином и добавлением 10%-й сыворотки крови крупного рогатого скота. Сохранность клеток определяли суправитальной окраской 0,25%-м раствором трипанового синего. Перед замораживанием клетки в течение 3 ч инкубировали в ростовой питательной среде, дополнительно содержащей в своем составе 20% сыворотки крови, 30% кондиционированной питательной среды, компламин и гидрокортизон в конечной концентрации от 10^{-3} до 10^{-4} М, 2% глюкозы и ПВП-40000 (рН 7,2-7,4). Клетки в концентрации $20 \cdot 10^6$ клеток/мл в криозащитной среде, состоящей из среды 199, 30% сыворотки крови, 30% кондиционированной питательной среды, оксигилированного глицерина (со степенью полимеризации $n=3$), полученного в отделе криопротекторов ИПКиК АН Украины, 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида в конечной концентрации — по 5% каждого криопротектора. Клетки расфасовывали в полистироловые ампулы по 5 мл и выдерживали в криозащитной среде в течение 30-40 мин при 4°C , охлаждали на 1-м этапе до -30°C со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$, на 2-м — до -50°C со скоростью $4-5^\circ\text{C}/\text{мин}$, а на 3-м — погружали в жидкий азот. Размораживание проводили в водяной бане при 40°C . Транспорт $^{86}\text{Rb}^+$ изучали по [3]. Установлено, что после замораживания-отогрева уровень клеток, мембраны которых не пропускают трипановый синий, составляет 72% при 84% в контроле. Нами показано, что существует достаточно высокий уровень транспорта $^{86}\text{Rb}^+$ в нативные клетки (рис.). При этом 80-90% от общего поступления $^{86}\text{Rb}^+$ в клетки происходит энергозависимым способом, который тормозится ингибитором активного транспорта K^+ -строфантином G (убаином) в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. Наблюдается и поступление катиона в клетку пассивной диффузией, которая составляет 10-20% от общего транспорта. После криоконсервирования клеток наблюдается существенное снижение транспортных процессов катионов. В частности, регистрируется уменьшение на 48% общего транспорта $^{86}\text{Rb}^+$, причем в большей степени снижается убаинзависимый (АТФ-зависимый) транспорт на 54%, что, очевидно, связано с истощением энергетических субстратов клетки, падением уровня макроэргов в процессе замораживания-отогрева. Характерно также, что уровень пассивной проницаемости цитоплазматической мембраны для $^{86}\text{Rb}^+$ в размороженных клетках возрастает на 17% по сравнению с контролем, что связано с появлением неспецифических каналов утечки K^+ в цитоплазматической мембране. Восстановление клеток культуры, обладающих высоким уровнем биосинтетических процессов, позволяет предполо-



Динамика восстановления транспорта $^{86}\text{Rb}^+$ через цитоплазматическую мембрану клеток перевиваемой линии FLK, инфицированную вирусом лейкоза крупного рогатого скота, после замораживания-отогрева: 1 — общий транспорт катиона (контроль), 2 — общий транспорт катиона (замораживание), 3 — активный транспорт катиона (контроль), 4 — активный транспорт катиона (замораживание), 5 — пассивный транспорт катиона (контроль), 6 — пассивный транспорт катиона (замораживание)

жить нормализацию возникшего после низкотемпературного консервирования катионного дисбаланса и способность Na^+ -насоса транспортировать K^+ внутрь клетки против градиента концентрации. Судя по полученным нами данным, действительно, спустя 4 сут культивирования размороженных клеток происходит повышение уровня общего транспорта катиона на 40% по сравнению с его уровнем сразу же после криоконсервирования. И только лишь по истечении двух последовательных пересевов размороженных клеток *FLK* уровень общего и активного транспорта катиона через цитоплазматическую мембрану достигает исходного и даже превышает его. Пассивная же диффузия катиона остается после восстановления из замороженного состояния клеток повышенной по отношению к контролю на протяжении двух их последовательных пересевов. Таким образом, нарушенная после криоконсервирования система транспорта катионов способна к нормализации в процессе восстановления клеточной культуры, причем происходит это в основном за счет АТФ-зависимого входа $^{86}\text{Rb}^+$ в клетки, что свидетельствует об активации процессов репарации систем синтеза макроэргов и утилизации глюкозы. Кроме того, следует отметить, что процесс восстановления нарушенных в результате замораживания-отогрева барьерно-транспортных свойств цитоплазматической мембраны коррелирует с ранее полученными нами данными по динамике восстановления пролиферативной активности клеточных культур [5]. Это обстоятельство дает основание полагать, что изменение барьерно-транспортных свойств цитоплазматических мембран в результате действия низкотемпературного фактора на клеточные культуры предопределяет как нарушение биосинтетических и биоэнергетических показателей клетки, так и структурные изменения в самой плазматической мембране.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вереников А.А., Марахова И.И. Транспорт ионов у клеток в культуре. — Л.: Наука, 1986. — 292 с.
2. Гулевский А.К. Барьерно-транспортные свойства плазматических мембран в процессе криоконсервирования: Автореф. дис.... д-ра биол. наук. — Харьков, 1986. — 41 с.
3. Лішко В.К., Колчинська Л.І., Пархоменко М.Г. Талій натрієвий "насос" еритроцитів // Укр. біохім. журн. — 1973. — № 1. — С. 41–46.
4. Марахова И.И. Ионный транспорт и пролиферация клеток // Цитология. — 1991. — 33, № 11. — С. 67–77.
5. Стегний Б.Т. Криоконсервирование первичных клеточных культур и тканей для вирусологических исследований: Автореф. дис.... канд. вет. наук. — Владимир, 1982. — 28 с.
6. Трошин А.С., Вереников А.А., Виноградова Т.А., Ефимова Е.В. Плотность культуры и транспорт ионов через плазматическую мембрану у трансформированных клеток // Докл. АН СССР. — 1985. — 282, № 3. — С. 709–711.
7. Syank B.B., Smith N.E. Regulation of cellular growth by sodium pump activity // J. Cell. Physiol. — 1976. — 87. — P. 377–388.

Ин-т экспериментальной и клинической ветеринарной
медицины Украинской академии аграрных наук, г. Харьков

Поступило 14.12.93

УДК 57.043

И.В.Белочкина, Н.А.Волкова

АДГЕЗИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ ГЕПАТОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ ПОСЛЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния различных криопротекторов и скоростей замораживания на адгезивные свойства гепатоцитов новорожденных поросят. Гепатоциты поросят выделяли методом двухступенчатой коллагеназной перфузии [5]. Жизнеспособность клеток в суспензии определяли по их устойчивости к окрашиванию 0,2%-м раствором трипанового синего [3]. Посев гепатоцитов (300 тыс кл/мл) производили в среде 199 с 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) на чашки Петри, покрытые коллагеном. После 60-минутной инкубации клеток при 37 °С в условиях абсолютной влажности определяли эффективность их посева [2] как отношение количества прикрепившихся к подложке клеток к числу гепатоцитов, жизнеспособных по тесту трипанового синего, вносимых в культуральные чашки. Долю распластанных клеток оценивали спустя 1 сут после начала культивирования гепатоцитов в среде L-15 с 10% ЭТС и антибиотиками. Гепатоциты замораживали в сахарозной среде с 20% ЭТС, содержащей в качестве криозащитного агента ДМСО, ПЭО-400 или ПЭО-1500. Все криопротекторы брали в концентрациях 5, 10, 20%, производя отмывание клеток после деконсервирования. Суспензию гепатоцитов охлаждали со скоростью 1 °С/мин или 10 °С/мин до -70 °С в пластиковых ампулах объемом 1 мл, после чего переносили в жидкий азот. Отогрев производили на водяной

бане при 37 °С. В суспензии свежевыделенных гепатоцитов количество жизнеспособных клеток составляло (78±6) %. После отогрева наибольший процент непрокрашенных клеток, в среднем около 63% от контроля, получали в образцах, замороженных с 10% ДМСО, 20% ПЭО-1500 при двух применявшихся скоростях охлаждения и с 10% ПЭО-1500 при скорости замораживания 10 °С/мин. Малоэффективным в наших исследованиях оказался ПЭО-400: при всех режимах замораживания он обеспечивал около 30% от контроля жизнеспособных гепатоцитов. После отогрева гепатоциты, перенесшие все апробированные условия замораживания-оттаивания, по эффективности посева значительно уступали свежевыделенным клеткам (рис.1). Из суспензии натив-

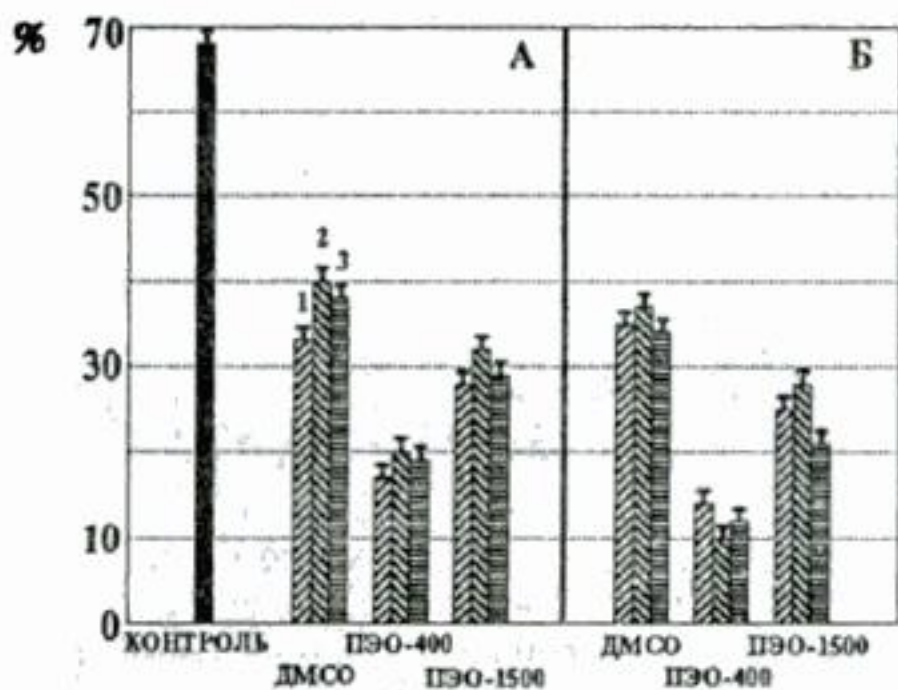


Рис. 1. Эффективность посева нативных и деконсервированных гепатоцитов поросят. Скорость замораживания: А – 1 °С/мин; Б – 10 °С/мин; 1 – 5%, 2 – 10%, 3 – 20%

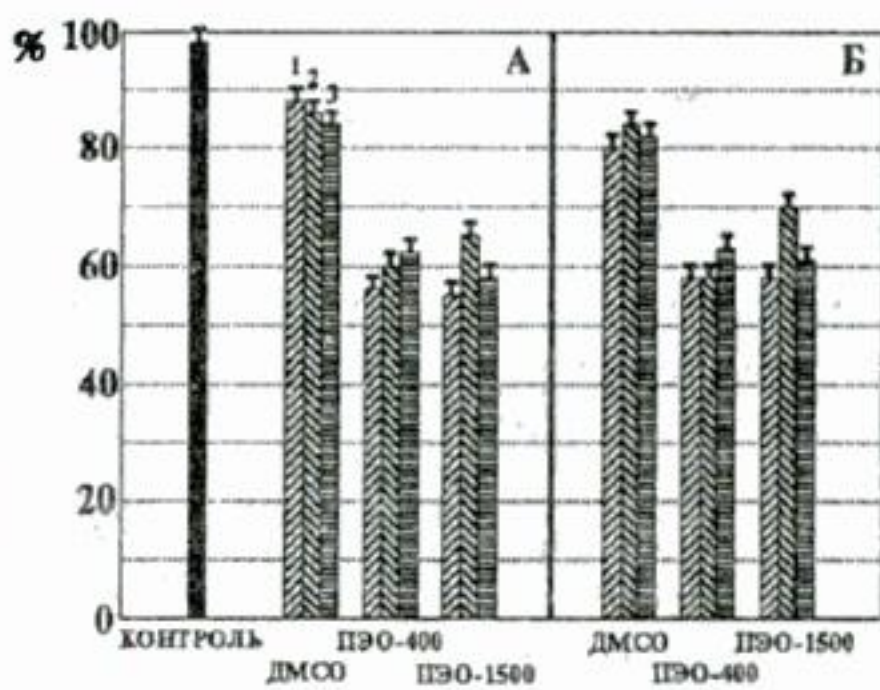


Рис. 2. Доля распластанных клеток в суточной культуре нативных и деконсервированных гепатоцитов поросят. Скорость замораживания: А – 1 °С/мин; Б – 10 °С/мин; 1 – 5%, 2 – 10%, 3 – 20%

ных гепатоцитов, внесенных в культуру, в течение часа после посева оседает и прикрепляется к подложке около 68% клеток. В опытных группах способность к прикреплению лучше сохраняют гепатоциты, замороженные в среде с ДМСО, независимо от его концентрации и скорости охлаждения суспензии, хотя эффективность их посева снижается почти до 40%. Клетки, замороженные во всех режимах с ПЭО-1500, обнаруживают эффективность посева на уровне около 30%. Обращает на себя внимание факт снижения на 10-15% эффективности посева гепатоцитов, замороженных под защитой 10% и 20% ПЭО-1500 со скоростью 10 °С/мин, по отношению к клеткам, при замораживании которых был применен ДМСО в концентрации 10% (скорости замораживания 1 °С/мин и 10 °С/мин). Следует указать, что показатели жизнеспособности по трипановому синему сравниваемых экспериментальных групп идентичны: прямой зависимости между эффективностью посева и устойчивостью клеточной мембраны к прижизненному красителю не выявлено. Использование в качестве криопротектора ПЭО-400 обеспечивает прикрепление менее 20% эксплантированных клеток. В течение последующих часов культивирования свежевыделенные прикрепившиеся гепатоциты распластываются на коллагеновой подложке. Клетки принимают полигональную форму, образуя при достаточной клеточной плотности монослой. Известно, что распластывание существенно для многих внутриклеточных процессов (синтез ДНК, РНК, пролиферация и др.) [1]. По способности к распластыванию гепатоциты, замороженные с ДМСО, независимо от его концентрации и скорости охлаждения, наиболее близки к нативным клеткам (80% распластанных гепатоцитов). После всех вариантов криоконсервирования с ПЭО-400 и ПЭО-1500 около 40% прикрепленных клеток теряют способность к распластыванию (рис.2). Полученные данные свидетельствуют о том, что криоконсервирование гепатоцитов вызывает в них ряд изменений, проявляющихся в условиях нашего эксперимента в снижении эффективности посева и способности к распластыванию в культуре. При этом нет абсолютной корреляции между жизнеспособностью клеток, определяемой по трипановому синему, и их способностью реализовывать свои адгезивные свойства *in vitro*: устойчивость плазматической мембраны к красителю не гарантирует сохранности адгезивных свойств. Предположительно это может быть связано с повреждением структур, опосредующих взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом. Наиболее значимым для сохранения адгезивных свойств гепатоцитов является вид использованного криопротектора. Не обнаружено влияния концентрации криопротекторов и использованных скоростей замораживания на эффективность посева гепатоцитов и их способность к распластыванию. При криоконсервировании гепатоцитов неонатальных поросят наиболее эффективен ДМСО в концентрации 10%, что согласуется с данными, полученными при замораживании гепатоцитов крыс [4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства* / Под ред. д.б.н. Л.Д. Лукьяновой. – М.: Наука, 1985. – 272 с.

2. Фуллер Б.Дж. Криоконсервирование изолированных гепатоцитов // Криобиология. – 1988. – № 3. – С. 18–21.
3. Baur H., Kasperek S., Plaff E. Criteria of viability of isolated liver cells // Hoppe-Seyler Ztschr. physiol. Chem. – 1975. – 356, № 6. – P. 827–838.
4. Fuller B.J., Morris G.J., Nutt L.A., Attenburrow V.D. Functional recovery of isolated rat hepatocytes upon thawing from -196 C // Cryo-Lett. – 1980. – 1, № 5. – P. 139–146.
5. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell. Biol. – 1975. – 13. – P. 29–83.

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

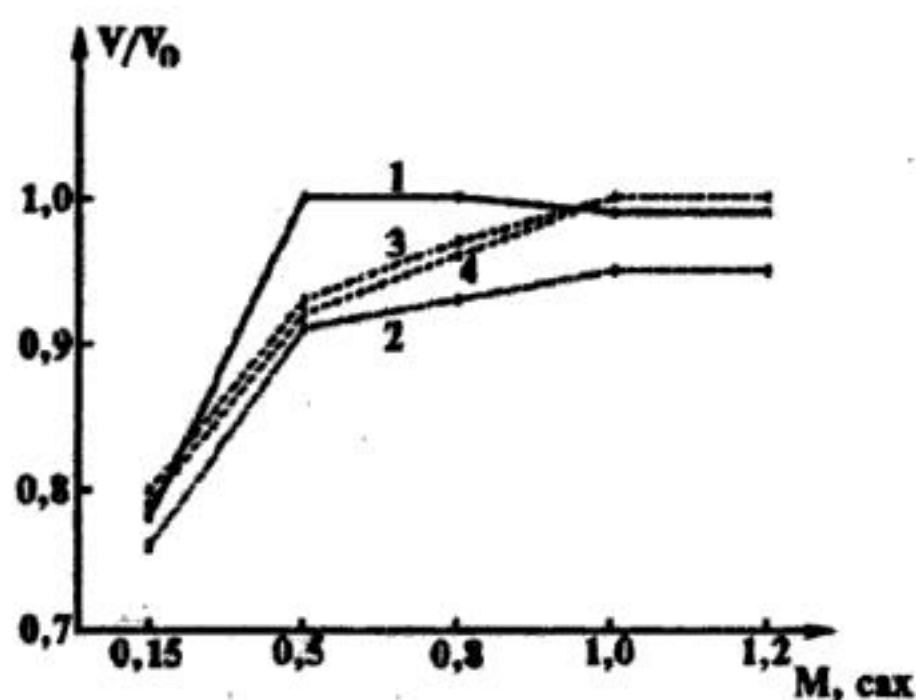
Поступило 04.01.94

УДК 577.352.3

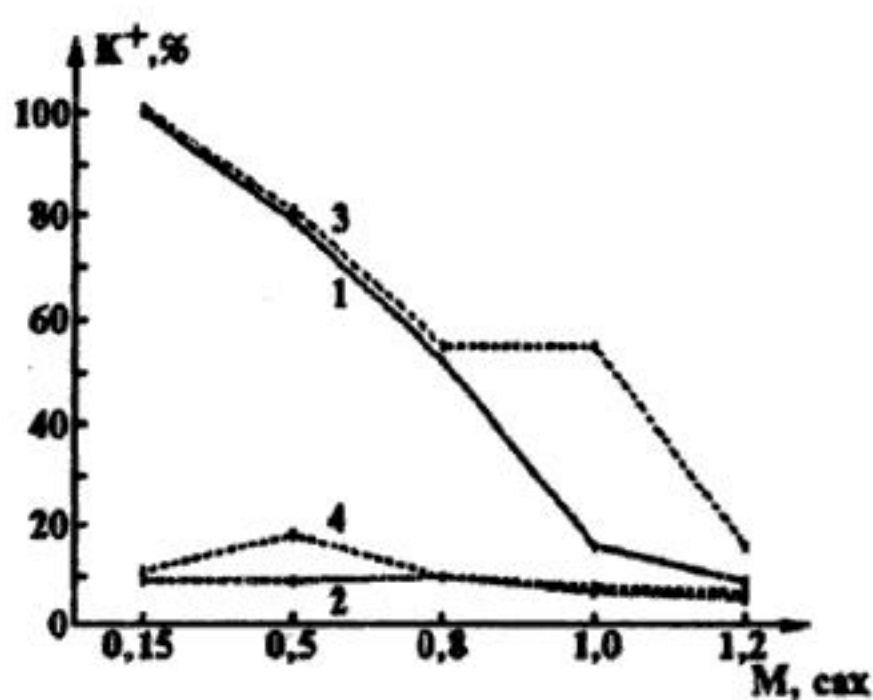
Н.М.Пересецкая

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЕМА И Ca^{2+} -ИНДУЦИРОВАННОГО ВЫХОДА КАЛИЯ В ИНТАКТНЫХ И РЕГИДРАТИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТАХ

Первые данные о существовании Ca^{2+} -индуцированного выхода K^+ , связанного с наличием в мембране эритроцитов Са-активируемых калиевых каналов, были получены Гардошем в 1958 г. Внутриклеточный Ca^{2+} , вызывая специфическое повышение калиевой проницаемости мембраны, индуцирует изменения мембранного потенциала [1] и объема клеток [4]. В свою очередь, параметры Ca^{2+} -индуцированной гиперполяризации зависят от осмолярности среды и объема эритроцитов [1]. Известно, что дегидратация клеток при переносе их в гипертонические растворы неэлектролитов и последующая регидратация в средах с физиологической тоничностью приводит к изменению формы и объема эритроцитов [2], что может быть связано с нарушением нативной структуры цитоскелета. В связи с этим представляет интерес исследование Ca^{2+} -индуцированного выхода K^+ в эритроцитах человека, модифицированных гипертоническими растворами сахарозы и последующей регидратацией в изотонических условиях. Эритроциты донорской крови трижды отмывали физиологическим раствором NaCl (150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4). Упакованные клетки хранили при 4 °C и использовали в течение 3 ч. 100 мкл упакованной эритромаcсы (гематокрит около 70%) смешивали с 1 мл раствора сахарозы различной концентрации и инкубировали 15 мин при 37 °C. После инкубации клетки регидратировали в 10 объемах изотонического раствора NaCl или KCl (150 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4) при 20–22 °C в течение 10 мин. Клетки осаждали при 3000 об/мин 3 мин и отмывали от внеклеточного калия 10 объемами физиологического раствора. Эритроциты доводили до гематокрита 3%-го в среде А (130 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 2 мМ MgCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4). В среду А добавляли Ca^{2+} до конечной концентрации 30 и 150 мкМ. Внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , необходимую для активации канала Гардоша, увеличивали с помощью ионофора А 23187 ("Калбиохем") в концентрации 5 мМ [5]. Клетки инкубировали в среде А с ионофором и Ca^{2+} при 37 °C 30 мин. Объем эритроцитов регистрировался методом спектроскопии импульсов сопротивления при прокачивании суспензии клеток со скоростью 1,8 мкл/с через микроотверстие диаметром 50 и длиной 50 мкм при токе 250 мкА [3]. Для измерения объема эритроцитов 5 мкл суспензии клеток в инкубационной среде переносили в 4 мл раствора NaCl. Содержание калия в клетках определялось калий-селективным электродом. Для этого суспензию клеток в среде А, содержащую ионофор и различные концентрации Ca^{2+} (гематокрит 3%-й), осаждали при 3000 об/мин в течение 3 мин и гемолизировали осадок в 2 мл дистиллированной воды. Из данных, представленных на рисунке (а), видно что в контрольных эритроцитах человека увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , индуцированное ионофором А 23187, приводит к уменьшению объема клеток. Увеличение потока входящего Ca^{2+} за счет повышения концентрации внеклеточного Ca^{2+} от 30 до 150 мкМ существенно не влияет на степень сжатия клеток. Уменьшение объема клеток коррелирует с потерей контрольными эритроцитами катионов K^+ , что является результатом активации Ca^{2+} -активируемых К-каналов [4] (рис. б). Предварительная обработка эритроцитов в гипертонических растворах сахарозы и ресуспендирование в изотоническом растворе NaCl приводит к прогрессирующему уменьшению изменений в объеме клеток в зависимости от степени дегидратации. Так, клетки, дегидратированные в 1 и 1,2 М растворах сахарозы и регидратированные в изотоническом растворе NaCl, практически не сжимаются при инкубации в среде, содержащей ионофор и Ca^{2+} . Поскольку содержание K^+ в клетках, дегидратированных в 1 и 1,2 М растворах сахарозы, составляет около 8% от контрольного, то, вероятно, выход K^+ , индуцированный увеличением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , является недостаточным для значительного изменения объема эритроцитов. Для увеличения внутриклеточной концентрации K^+ в регидратированных эритроцитах клетки ресуспендировали в изотоническом растворе KCl (рис. б), что способствовало сохранению значительного количества внутриклеточного K^+ . Активация каналов Гардоша в этих клетках, хотя и сопровождалась выхо-



Зависимость сжатия эритроцитов, экспонированных с А 23187 и Ca^{2+} в зависимости от осмолярности среды дегидратации (а): 1, 2 – клетки регидратированы в изотоническом растворе NaCl ; 3, 4 – клетки регидратированы в изотоническом растворе KCl ; 1, 3 – среда инкубации содержит 30 мкМ CaCl_2 и 5 мкМ А 23187; 2, 4 – среда инкубации содержит 150 мкМ CaCl_2 и 5 мкМ А 23187



Внутриклеточное содержание K^+ в эритроцитах (в % по отношению к контролю), обработанных Ca^{2+} и А 23187, в зависимости от осмолярности среды дегидратации (б): 1, 2 – клетки регидратированы в изотоническом растворе NaCl ; 3, 4 – клетки регидратированы в изотоническом растворе KCl ; 1, 3 – среда инкубации не содержит CaCl_2 и А 23187; 2, 4 – среда инкубации содержит 30 мкМ CaCl_2 и 5 мкМ А 23187

дом ионов K^+ , не приводила к изменению объема эритроцитов, дегидратированных в растворах сахарозы с высокой осмолярностью 1 и 1,2 М (рис. а и б). Ранее было обнаружено [4], что селективный выход ионов K^+ при активации каналов Гардоша сопровождается уменьшением объема эритроцитов и их теней. Полученные данные о неизменности объема регидратированных эритроцитов в условиях активации калиевых каналов показывают, что гипертоническая обработка оказывает модифицирующее действие на эту транспортную систему.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И. и др. Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca^{2+} -индуцированных изменений мембранного потенциала // Биол. мембраны. – 1992. – 9, № 9. – С. 885–903.
2. Руденко С.В., Бондаренко В.А. Роль изменения объема эритроцитов при постгипертоническом лизисе // Моделирование криобиологических процессов. – Харьков: Б.и., 1988. – С. 55–67.
3. Akeson S.P., Mel H.C. Osmotic hemolysis and fragility // Biophys. and Biochem. Acta. – 1982. – 718, № 2. – P. 201–211.
4. Lunn M.C., Novak S.T., Freedman J.C. Calcium, cell shrinkage, and prolytic state of human red blood cells // Amer. Physiol. Society. – 1987. – P. C138–C152.
5. Whatmore J.L., Tang E.K.Y., Hickman J.A. Cytoskeletal proteolysis during calcium-induced morphological transitions of human erythrocytes // Experimental cell research. – 1992. – 200. – P. 316–325.

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

Поступило 24.11.93

УДК 611.013.11+615.361.013.11.014.413:615.849.19

Т.Л.Весич, М.И.Крамар

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА НАТИВНЫЕ И ПЕРЕНЕСШИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ СПЕРМИИ ЧЕЛОВЕКА

При криоконсервации репродуктивных клеток применение криоконсервантов и действие низких температур являются экстремальными факторами для гамет, в силу чего после их размораживания целесообразно прибегнуть к стимулирующему действию, направленному на ликвидацию возможных латентных повреждений путем развития репаративных процессов. С этой целью используются как физические, так и химические методы стимуляции гамет. В частности, к суспензии спермиев добавляют препараты каталазы, амилазы, простагландин F_2 , прибегают к обра-

ботке постоянным магнитным полем и ультразвуковыми колебаниями [5, 6]. В последние годы появились работы, свидетельствующие об активирующем действии лазерного излучения на биологическую активность различных клеток, тканей и в целом на организм [1, 2]. Отмечен также стимулирующий эффект низкоинтенсивного лазерного излучения на сперматогенез у мужчин [3] и предприняты первые попытки лазерной стимуляции спермиев различных животных [4]. В связи с этим мы провели исследования действия лазерного облучения на нативные спермии и после их криоконсервации, используя эякуляты нормоспермические и с различной степенью олигозооспермии. В эксперименте было исследовано 30 образцов спермы, статобработка проводилась методом Фишера-Стьюдента. Глубокое замораживание спермы осуществлялось в условиях сверхбыстрого ее охлаждения со скоростью 3000 °C/мин в объеме 0,7–1,0 мл после 20-минутной эквilibрации в глюкозо-желточно-цитратном криоконсерванте, содержащем низкую концентрацию глицерина. Нативную и размороженную сперму подвергали воздействию гелий-неонового лазера, варьируя интенсивностью и временем облучения. Для унифицирования условий эксперимента облучения гамет лазером осуществлялось термостатирование при температуре 37 °C и постоянное перемешивание с помощью магнитной мешалки. Результат стимулирующего действия лазера оценивали по данным спермограммы и переживаемости спермиев при температуре 20 °C.

Т а б л и ц а 1

Влияние лазерного облучения на подвижность сперматозоидов без замораживания

Интенсивность лазерного облучения, мВт/см ²	Подвижные сперматозоиды, %					
	до облучения			после облучения		
	1	2	3	1	2	3
1	75,7±3,2	57,2±2,1	39,4±2,2	76,0±3,1	57,1±2,0	39,3±2,1
1,5	76,0±1,0	57,3±1,8	38,5±2,0	76,1±1,2	57,2±1,9	39,0±2,0
2	79,4±3,4	46,6±5,3	40,8±1,8	91,2±3,5	69,4±5,2	45,8±1,9
6	76,4±3,7	47,5±2,1	41,6±1,1	86,4±3,9	68,3±2,0	46,6±1,2

Примечание. 1 – нормоспермия, 2 – олигозооспермия I–II-й степени, 3 – олигозооспермия III-й степени.

Результаты проведенных исследований показали (табл. 1, 2), что в случае облучения лучами лазера интенсивностью 1 и 1,5 мВт/см² как нативных спермиев, так и перенесших криоконсервацию стимулирующий эффект не отмечался в течение всего времени воздействия в пределах от 5 до 60 мин.

Т а б л и ц а 2

Влияние лазерного облучения на подвижность сперматозоидов после их размораживания

Интенсивность лазерного облучения, мВт/см ²	Подвижные сперматозоиды, %					
	после размораживания без облучения			после размораживания и облучения		
	1	2	3	1	2	3
1	54,5±2,3	38,1±1,22	23,3±3,5	54,5±2,2	38,0±1,0	23,1±3,3
1,5	55,3±1,2	35,2±1,4	21,5±1,9	55,3±1,1	35,2±1,6	22,0±1,8
2	52,5±1,8	35,7±2,5	18,6±1,6	58,0±1,6	45,0±2,6	26,3±1,1
6	55,3±1,1	36,8±2,0	16,5±1,9	61,2±1,2	46,0±2,1	21,2±1,8

Примечание. 1 – нормоспермия, 2 – олигозооспермия I–II-й степени, 3 – олигозооспермия III-й степени.

С увеличением интенсивности облучения клеток свыше 2 мВт/см² появлялся активирующий эффект, который с ее повышением имел место при меньшем времени воздействия. Так, в случае нормоспермии при интенсивности лазерного облучения нативных спермиев 2 мВт/см² его стимулирующий эффект отмечался, начиная с 20-минутной экспозиции, достигая максимума при 30-минутной экспозиции, что выражалось в достоверном увеличении процентного содержания активно движущихся клеток по сравнению с необлученными. Для достижения того же эффекта при 6 мВт/см² интенсивности требовалась 10-минутная экспозиция, а его максимум проявлялся после 15-минутного облучения клеток. Характерно, что наиболее выраженное стимулирующее воздействие на спермии отмечено при олигозооспермии I–II степени. Это может быть связано с развитием репаративных процессов, требуемых не только для ликвидации латентных поврежде-

ний, вызванных процессом криоконсервации, но и обусловленных данным видом патологии. Наименее результативное действие лазерного облучения отмечено в отношении нормальных спермиев, что обусловлено, вероятно, большей их криоустойчивостью и, следовательно, с не столь существенными повреждениями, полученными в процессе криоконсервации, для которых требуется меньшее развитие репаративных процессов. Менее выраженное позитивное действие лазерного облучения в отношении спермиев при олигозооспермии III-й степени по сравнению с I-й и II-й степенью связано, вероятно, с наличием у них более глубоких повреждений, явившихся следствием серьезных нарушений сперматогенеза. Таким образом, по стимулирующему эффекту лазерного облучения нативные и криоконсервированные спермии в зависимости от их морфофункционального статуса следует расположить в такой убывающей последовательности: олигозооспермия I–II-й степени, нормоспермия и олигозооспермия III-й степени. Как следует из анализа данных, приведенных в табл. 1 и 2, стимулирующий эффект лазерного облучения в отношении нативных и криоконсервированных спермиев подобен и находится в прямой зависимости от интенсивности и в обратной – от времени облучения. Различия в подвижности спермиев как нативных, так и перенесших криоконсервацию до и после лазерного облучения достоверны ($p < 0,05$) между подобными группами исследуемых гамет. Результаты проведенных исследований по изучению стимулирующего действия на нативные и криоконсервированные спермии, оцененные по их подвижности, коррелируют с данными, полученными при исследовании переживаемости гамет, которые также находятся в зависимости от интенсивности и времени облучения клеток. Проведенные исследования показали стимулирующий эффект лазерного облучения на спермии человека. Однако для выяснения механизма этого действия, особенно связанного с реабилитацией нативных спермиев и перенесших криоконсервирование с различными видами патологии, необходимо провести ряд дополнительных исследований с привлечением более информативных тестов определения их жизнеспособности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зубкова С.М. О механизме биологического действия гелий-неонового лазера // Биол. науки, 1978. – № 7. – С. 30–37.
2. Кавецкий Р.Е., Чудаков В.Г., Сидорик Е.П., Гамалей Н.Ф. Лазеры в биологии и медицине. – Киев: Наук. думка, 1969. – 230 с.
3. Ковалев Е.В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на сперматогенез у мужчин // Вопр. курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. – 1990. – № 5. – С. 33–36.
4. Николов И., Георгиев С. Влияние на лазерното излъчване върху семенна течност от бици при технологията за криоконсервация // Животновъдни науки. – 1986. – 23, № 11. – С. 3–7.
5. Lustig G., Lindohl P.E. Activation of motility in full and rabbit spermatozoa by ultrasonic treatment recorded by a photographic method // Int. J. Fert. – 1970. – 15, № 3. – P. 135–142.
6. Macmillan K.L. The effect of amylase, catalase and a decapacitating preparation on fertility of full semen diluted in ambient temperature extender // Austral. J. Biol. Sci. – 1970. – 23, № 3. – P. 691–695.

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

Поступило 08.12.93

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины в 1993 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук О.В.Бибенко “Влияние факторов криоконсервирования на генетический аппарат спермиев рыб”, посвященная изучению смертности диплоидных и андрогенетических гаплоидных эмбрионов, полученных с использованием нативной спермы, выдержанной разное время в средах с различной концентрацией разных криопротекторов при нескольких значениях температур. Установлена возможность мутагенного и селективного влияния факторов криоконсервации на генетический аппарат спермиев рыб. Полученные результаты позволяют при оценке качества материала, закладываемого на долгосрочное хранение, и при оптимизации способов криоконсервации рекомендовать обязательную оценку состояния генетического аппарата гамет рыб по гибели эмбрионов.

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

2¹⁹⁹⁴

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

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

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

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

ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1994. №2. 1-56 ИНДЕКС 70474