

З

ISSN 0233-7673

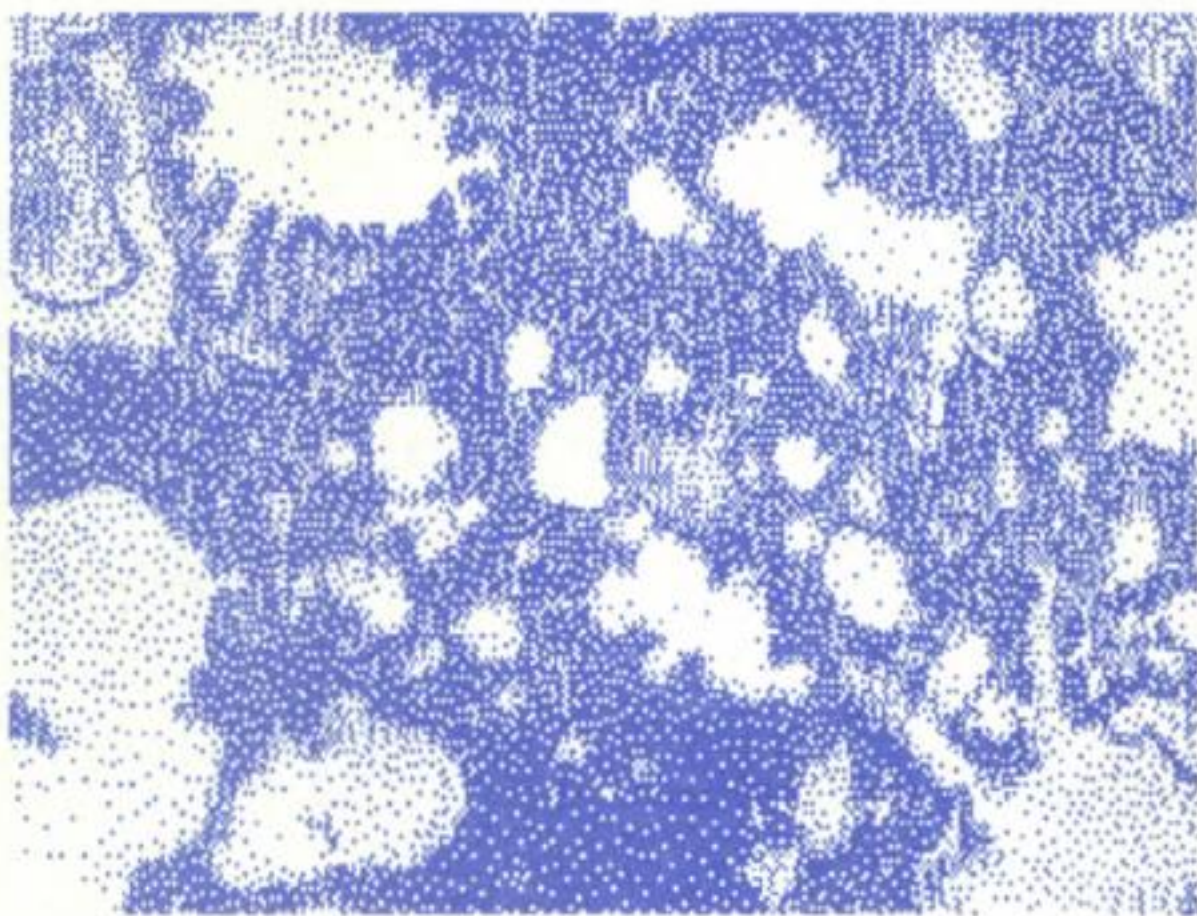
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1996

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



КИНЕТИКА ПРОЦЕССОВ МАССОПЕРЕНОСА ПРИ ИЗОТЕР-
МИЧЕСКОЙ ЭКСПОЗИЦИИ КЛЕТОК В КОМБИНИРОВАННЫХ
СРЕДАХ *Е.А.Гордиенко, Л.Ф.Розанов, А.А.Костяев, В.И.Резников,
И.Ф.Коваленко*

СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ АДАПТАЦИИ ЗИМНЕСПЯЩИХ
ЖИВОТНЫХ *В.Ф.Козлова, Т.Н.Юрченко*

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМЫ ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕЙ
КАМЧАТКИ ЧАВЫЧИ (*ONCORHYNCHUS TSHAWYTSCHA*) И
КЕТЫ (*ONCORHYNCHUS KETA*) *О.В.Желтоножко,
В.В.Желтоножко, В.В.Черепанов, А.Ю.Петренко*

Главный редактор **В.И.Грищенко**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

3

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

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1996

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф., Костяев А.А., Резников В.И., Коваленко И.Ф.* Кинетика процессов массопереноса при изотермической экспозиции клеток в комбинированных средах . . . 3
- Рамазанов В.В., Семенченко А.Ю., Воловельская Е.Л., Мельник Э.С., Бондаренко В.А.* Влияние прочности связи периферических белков с мембранами на гипертонический шок эритроцитов . . . 8
- Львова С.П., Михайленко И.К.* Интенсивность глюконеогенеза из разных субстратов в срезах печени сусликов в динамике зимней спячки . . . 12
- Божок Г.А.* Структурные детерминанты объемных изменений эритроцитов в условиях постгипертонического и яд-индуцированного лизиса . . . 16

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Пушкарь Н.С.**, Тодрин А.Ф. Исследование сверхбыстрого замораживания и отогрева эритро-массы . . . 22
- Сандомирский Б.П., Гальченко С.Е., Тыныныка Л.Н.* Влияние криопротекторов на уровень перекисного окисления липидов нативных и криоконсервированных фрагментов ткани печени новорожденных и половозрелых свиней . . . 26
- Желтоножко О.В., Желтоножко В.В., Черепанов В.В., Петренко А.Ю.* Криоконсервация спермы тихоокеанских лососей Камчатки чавычи (*Oncorhynchus tshawytscha*) и кеты (*Oncorhynchus keta*) . . . 30
- Львова Л.В., Тымчук С.М., Рябчун В.К., Павленко Е.В., Стрибуль Т.Ф.* Морфофизиологические показатели и активность амилаз семян сои, хранившихся при отрицательных температурах . . . 35
- Дворцовой В.К., Кирошка В.В.* Морфологическая оценка состояния эритроцитов при насыщении витрифицирующими концентрациями проникающих криопротекторов . . . 38

КРИОМЕДИЦИНА

- Кравченко Л.П., Шанина И.В., Белоус А.М.* Эффективность силибора при гипотермическом хранении изолированных гепатоцитов . . . 41
- Козлова В.Ф., Юрченко Т.Н.* Структурные аспекты адаптации зимнеявляющихся животных . . . 44
- Малахов В.А.* Широкодиапазонная КВЧ-терапия больных с начальной цереброваскулярной патологией . . . 52

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Пашаева Д.Э., Шейхова Р.Г., Эмирбекова А.А., Эмирбеков Э.З. Свободные и связанные аминокислоты мозга при гипотермии и последующем самосогревании животных</i>	54
<i>Строна В.И. Биосинтетические процессы в некоторых органах крыс при остром охлаждении и реабилитации</i>	56

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Gordienko E.A., Rozanov L.F., Kostyaev A.A., Reznikov V.I., Kovalenko I.F. Kinetics of the processes of mass transfer during isothermic exposure of cells in combined media</i>	3
<i>Ramazanova V.V., Semchenko A.Yu., Volovelskaya V.L., Melnik E.S., Bondarenko V.A. The effect of the strength of binding of peripheral proteins with membranes on the hypertonic stress of RBC</i>	8
<i>Lvova S.P., Mikhailenko I.K. The intensity of gluconeogenesis of various substrates in the liver slices of the ground squirrel in the time course of hibernation</i>	12
<i>Bozhok G.A. Structural determinants of the volume changes in RBC during posthypertonic and venom-induced lysis</i>	16

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

<i>Pushkar N.S., Todrin A.F. A study of the suprarapid freezing and thawing of the erythromass</i>	22
<i>Sandomirsky B.P., Galchenko S.E., Tynynyka L.N. The effect of cryoprotectants on the level of lipid peroxidation of the native and cryopreserved fragments of the hepatic tissue of the newborn and mature mice</i>	26
<i>Zheltonozhko O.V., Zheltonozhko V.V., Cherepanov V.V., Petrenko A.Yu. Cryopreservation of spermia of Kamchatka Pacific salmon (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>) and chum salmon (<i>Oncorhynchus keta</i>)</i>	30
<i>Lvova L.V., Tyumchuk S.M., Ryabchun V.K., Pavlenko E.V., Stribyl T.F. Morphophysiological features and activity of amilases of the soybean seeds, stored at negative temperatures</i>	35
<i>Dvortsevov V.K., Kiroshka V.V. Morphological evaluation of the state of RBC during saturation by the vitrifying concentrations of cryoprotectants</i>	38

CRYOMEDICINE

<i>Kravchenko L.P., Shanina I.V., Belous A.M. The efficiency of silibor during hypothermic storage of the isolated hepatocytes (IH)</i>	41
<i>Kozlova V.F., Yurchenko T.N. Structural aspects of adaptation of the hibernating animals</i>	44
<i>Malakhov V.A. A wide-range KHF-therapy of the patients with the primary cerebrovascular pathology (CVP)</i>	52

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Pashayeva D.E., Sheikhova R.G., Emirbekova A.A., Emirbekov E.Z. Free and bound amino acids in the brain during hypothermia and subsequent self-warming of the animals</i>	54
<i>Strona V.I. Biosynthetic processes in some organs of rats during acute cooling and rehabilitation</i>	56

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

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

Научный редактор В.И.Луговой

Редактор Е.Д.Пазыч

Компьютерный набор и верстка: Л.В.Смык, А.М.Шаталов

Подп. в печ. 26.11.96. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9. Тираж 350 экз. Цена договорная. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

**Е.А.Гордиенко, Л.Ф.Розанов, А.А.Костяев,
В.И.Резников, И.Ф.Коваленко**

КИНЕТИКА ПРОЦЕССОВ МАССОПЕРЕНОСА ПРИ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ ЭКСПОЗИЦИИ КЛЕТОК В КОМБИНИРОВАННЫХ СРЕДАХ

Численное моделирование осмотического поведения клеток, экспонируемых в криозащитных средах, содержащих проникающие и непроникающие компоненты, позволило оценить зависимость степени дегидратации и регидратации клеток, времени их регидратации и насыщения криопротектором, а также степени временного возрастания концентрации внутриклеточного электролита от исходных концентраций проникающего и непроникающего компонентов криозащитной среды, плотности суспензии, параметра проницаемости и объемной доли осмотически неактивных веществ клеток. В частности, показано, что увеличение плотности клеток в суспензии приводит к снижению не только уровня их обезвоживания, но и уровня насыщения клеток криопротектором и пикового значения концентрации внутриклеточного электролита. Степень регидратации клеток после насыщения криопротектором при увеличении концентрации непроникающего компонента криозащитной среды снижается, что позволяет варьировать уровень воды в насыщенной криопротектором клетке.

Подготовка биообъекта к замораживанию включает эквilibрацию в криозащитных средах, содержащих как проникающие, так и непроникающие компоненты. Концентрации этих компонентов, проницаемость мембран для молекул криопротектора и воды, отношение суммарного объема клеток, экспонируемых в криозащитной среде, к объему суспензии и время экспозиции определяют состояние объекта к моменту начала охлаждения-замораживания.

В связи с вышесказанным, особое значение приобретает изучение кинетики изменения клеточного объема, вне- и внутриклеточных концентраций проникающего и непроникающего компонентов при различных значениях упомянутых параметров.

Основой изучения кинетики процессов массопереноса на этапе экспозиции клеток в криозащитной среде может служить мембранная теория проницаемости, описываемая уравнениями термодинамики необратимых процессов [1]. Адаптируя уравнения термодинамики необратимых процессов к решению поставленной задачи, получаем следующую систему:

$$\begin{cases} \frac{dy}{dx} = \frac{e^x}{1-g_0y} \left\{ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} - g_0 \left[\sigma_1 \hat{\pi}_1^{in}(0) + \hat{\pi}_2^{in}(0) \right] - \right. \\ \left. - (1-g_0) \left[\sigma_1 \hat{\pi}_1^{out}(0) + \hat{\pi}_2^{out}(0) \right] + \frac{(1-\alpha)}{y-\alpha} \right\}; \\ \frac{d\hat{\pi}_1^{in}}{dx} = -e^x \left\{ \frac{A}{1-g_0y} \left[\hat{\pi}_1^{in} - g_0 \hat{\pi}_1^{in}(0) - (1-g_0) \hat{\pi}_1^{out}(0) \right] + \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} \frac{dy}{dx} \right\} \frac{1}{y-\alpha}; \\ \hat{\pi}_2^{in} = \frac{(1-\alpha)}{y-\alpha}; \quad x = \ln(1 + \hat{t}) \end{cases} \quad (1)$$

$$\hat{\pi}_1^{out} = \frac{1}{1-g_0y} \left[g_0 \hat{\pi}_1^{in}(0) + (1-g_0) \hat{\pi}_1^{out}(0) - \hat{\pi}_1^{in} g_0 y \right];$$

$$\hat{\pi}_2^{out} = \frac{1}{1-g_0y} \left[g_0 \hat{\pi}_2^{in}(0) + (1-g_0) \hat{\pi}_2^{out}(0) - g_0 \frac{\hat{\pi}_2^{in}(0) y (1-\alpha)}{y-\alpha} \right],$$

где $y = \frac{V}{V_0}$, V и V_0 — текущий и исходный объем клеток соответственно;

$\hat{t} = t/\tau_0$, t — время, $\tau_0 = (\gamma L_p \hat{\pi}_2^{in}(0))^{-1}$, γ — поверхностно-объемное отношение



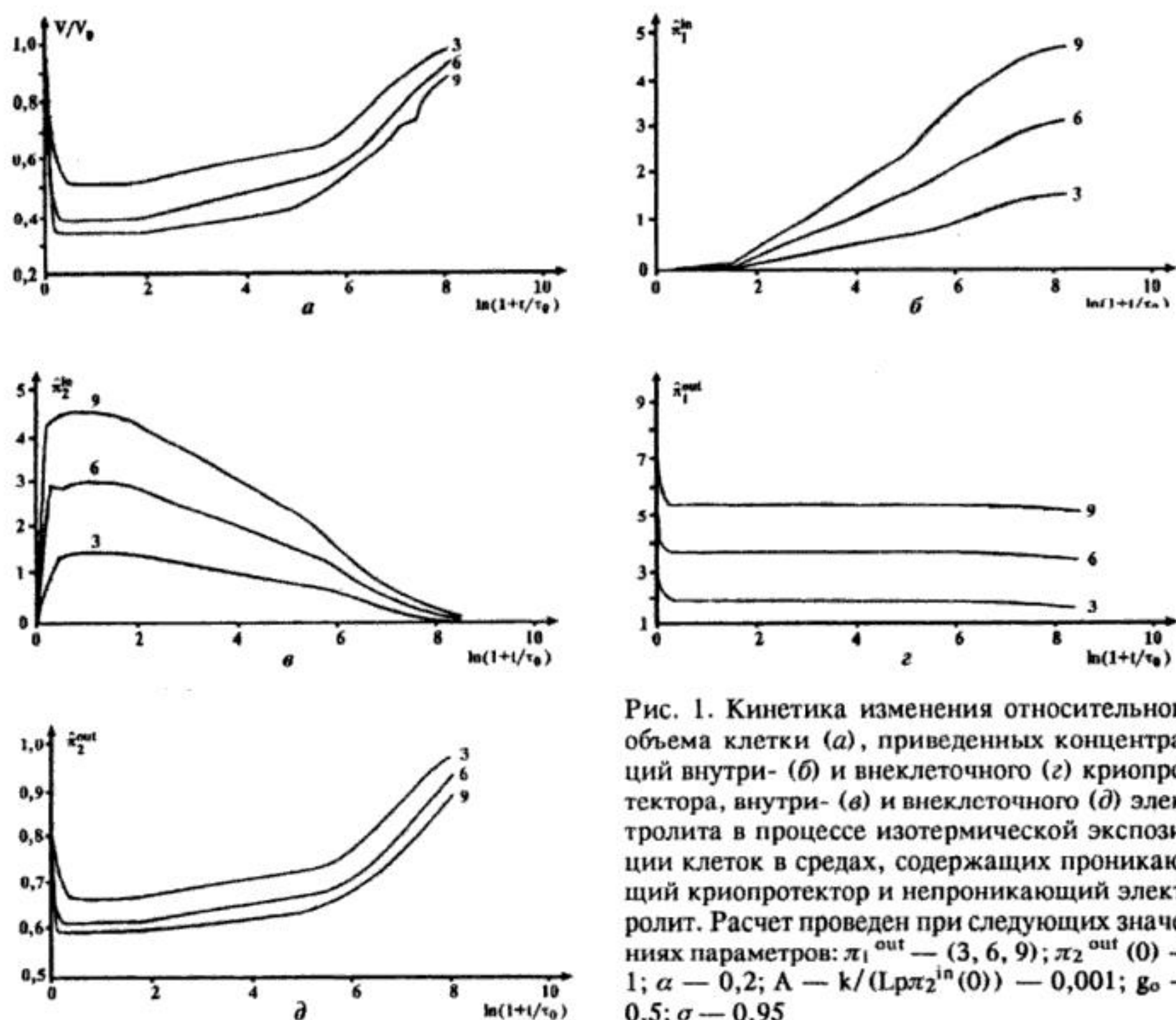


Рис. 1. Кинетика изменения относительного объема клетки (а), приведенных концентраций внутри- (б) и внеклеточного (г) криопротектора, внутри- (в) и внеклеточного (д) электролита в процессе изотермической экспозиции клеток в средах, содержащих проникающий криопротектор и непроникающий электролит. Расчет проведен при следующих значениях параметров: $\pi_1^{\text{out}}(0) — (3, 6, 9)$; $\pi_2^{\text{out}}(0) — 1$; $\alpha — 0,2$; $A = k/(L_p \pi_2^{\text{in}}(0)) — 0,001$; $g_0 — 0,5$; $\sigma — 0,95$

ние клетки; $\pi_2^{\text{in}}(0)$ — осмотическое давление физиологического раствора; L_p — коэффициент фильтрации клеточной мембраны; K_1 и σ_1 — коэффициенты проницаемости и отражения клеточной мембраны для первого (проникающего) компонента криозащитной среды; $\hat{\pi}_1^{\text{in}}(2) = \pi_1^{\text{in}}(2)/\pi_2^{\text{in}}(0)$, $\hat{\pi}_1^{\text{out}}(2) = \pi_1^{\text{out}}(2)/\pi_2^{\text{in}}(0)$, π_1^{in} и π_2^{in} (π_1^{out} и π_2^{out}) — осмотическое давление проникающего (1) и непроникающего (2) растворенных веществ внутри (in) и вне (out) клетки, а $\pi_1^{\text{in}}(0)$ и $\pi_2^{\text{in}}(0)$, $\pi_1^{\text{out}}(0)$ и $\pi_2^{\text{out}}(0)$ — их начальные значения; α — объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ; g_0 — отношение суммарного объема клеток к общему объему суспензии (в дальнейшем плотность суспензии); $A = \tau_0/\tau_1 \tau_1 = (\gamma K_1)^{-1}$.

Основные допущения, принятые при выводе этих уравнений:

1) трансмембранным перепадом гидростатического давления пренебрегаем в связи с тем, что при уменьшении объема клетки плазматической мембране энергетически выгодно деформироваться путем изгиба, а не растяжения; при деформации такого типа площадь поверхности мембраны остается неизменной, а перепад гидростатического давления на ней ничтожно мал по сравнению с перепадом давления, возникающем при латеральном растяжении или сжатии мембраны;

2) считается, что через клеточную мембрану проникают только растворитель (вода) и проникающий компонент (криопротектор), а остальные компоненты вне- и внутриклеточных растворов не проникают;

3) считается, что транспортные характеристики клеточной мембраны остаются при изотермической экспозиции неизменными и не зависят от состава вне- и внутриклеточных растворов. Приняты следующие начальные условия: $y(0) = 1$; $\pi_1^{\text{in}}(0) = 0$ — криопротектор в клетке отсутствует; $\hat{\pi}_2^{\text{in}}(0) = 1$ — по опре-

делению; $\hat{\pi}_1^{\text{out}}(0) = (3; 6; 9)$; $\hat{\pi}_2^{\text{out}}(0) = (0; 1; 2)$; $\alpha = (0; 0,2; 0,4; 0,6)$; $g_0 = (0; 0,25; 0,5; 0,75)$; $\sigma = (0,85; 0,95)$; $A = \tau_0/\tau_1 = K_1/L_p \pi_2^{\text{in}}(0) = (0,1; 0,01; 0,001)$.

Результаты численного решения на ЭВМ системы уравнений (1) при указанных значениях параметров показывают, что реакция клеток на экспозицию в гипертонических растворах содержит, как и ожидалось, две фазы: дегидратацию и регидратацию. Уровень дегидратации выраженно зависит не только от концентрации проникающего компонента, но и от плотности суспензии (рис. 1, а и 2, а). Чем меньше плотность суспензии, тем больше дегидратация, и наоборот.

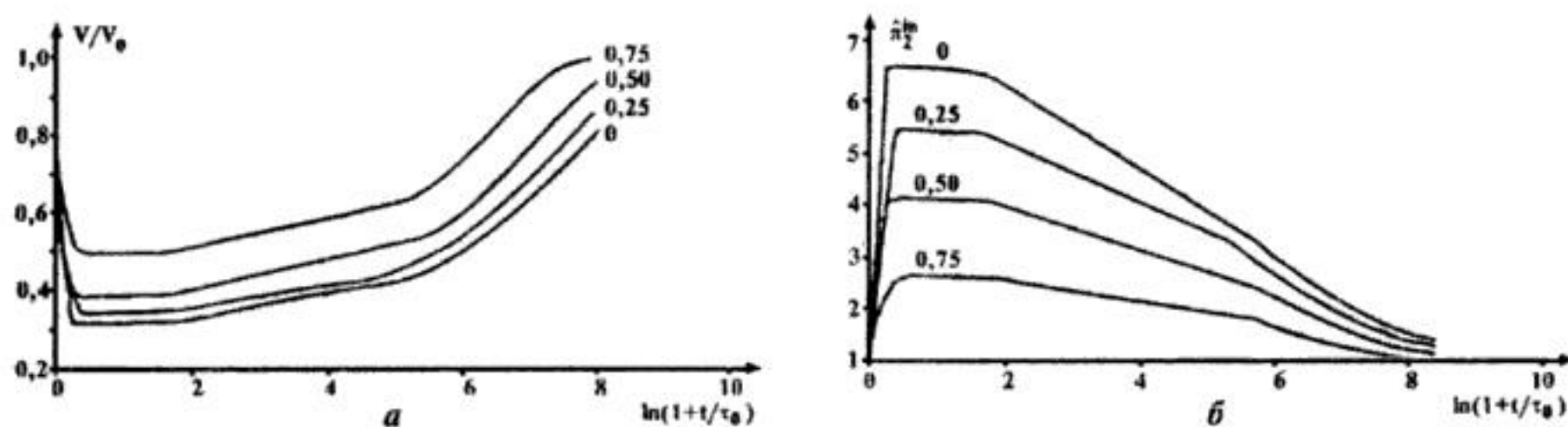


Рис. 2. Кинетика изменения относительного объема клетки (а), приведенной концентрации внутриклеточного (б) крипротектора в процессе изотермической экспозиции клеток в средах, содержащих проникающий крипротектор и непроникающий электролит. Расчет проведен при следующих значениях параметров: $\pi_1^{\text{out}}(0) = 6$; $\pi_2^{\text{out}}(0) = 1$; $\alpha = 2$; $A = 0,01$; $\sigma_0 = (0; 0,25; 0,5; 0,75)$; $\sigma = 0,95$

Из данных, приведенных на рис. 1, а-д, также следует, что пропорциональное увеличение исходной концентрации проникающего крипротектора во внеклеточной среде вызывает все менее значительное увеличение уровня дегидратации. В диапазоне больших концентраций обезвоживание растет менее выраженно, чем в диапазоне малых.



Рис. 3. Кинетика изменения относительного объема клетки (а), приведенных концентраций внутриклеточного (б) крипротектора и электролита (в) в процессе изотермической экспозиции клеток в средах, содержащих проникающий крипротектор и непроникающий электролит. Расчет проведен при следующих значениях параметров: $\pi_1^{\text{out}}(0) = 6$; $\pi_2^{\text{out}}(0) = 1$; $\alpha = 0,2$; $A = (0,001; 0,01; 0,1)$; $g_0 = 0,5$; $\sigma = 0,95$

Анализ фазы регидратации указывает на то, что ее продолжительность зависит не только от параметра проницаемости A , но и от исходной концентрации проникающего компонента криозащитного раствора (рис. 1, а и 3, а). В свою очередь, уровень регидратации зависит не только от времени и параметра проницаемости A , но и от концентрации непроникающего компонента во внеклеточной среде: чем она выше, тем меньше значение объема, который достигается клеткой после фазы регидратации (рис. 4).

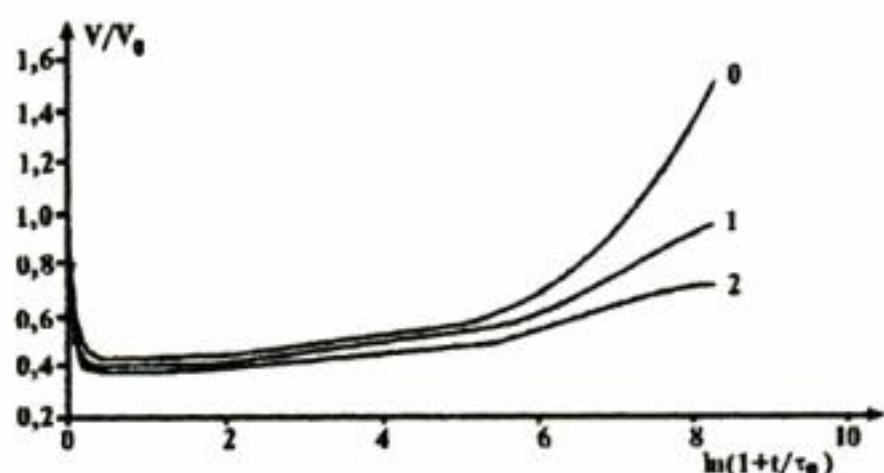


Рис. 4. Кинетика изменения относительного объема клетки в процессе изотермической экспозиции клеток в средах, содержащих проникающий крипротектор и непроникающий электролит. Расчет проведен при следующих значениях параметров: $\pi_1^{\text{out}}(0) = 6$; $\pi_2^{\text{out}}(0) = (0; 1; 2)$; $\alpha = 0,2$; $A = 0,001$; $g_0 = 0,5$; $\sigma = 0,95$

регидратации сильно коррелирует со временем насыщения клеток проникающим компонентом криозащитного раствора (рис. 1, а, б и 3, а, б), которое, как и время регидратации, зависит от исходной концентрации крипротектора во внеклеточной среде. Это соответствие, как известно, лежит в основе оценки проницаемости мембран клеток для разных крипротекторов по времени регидратации.

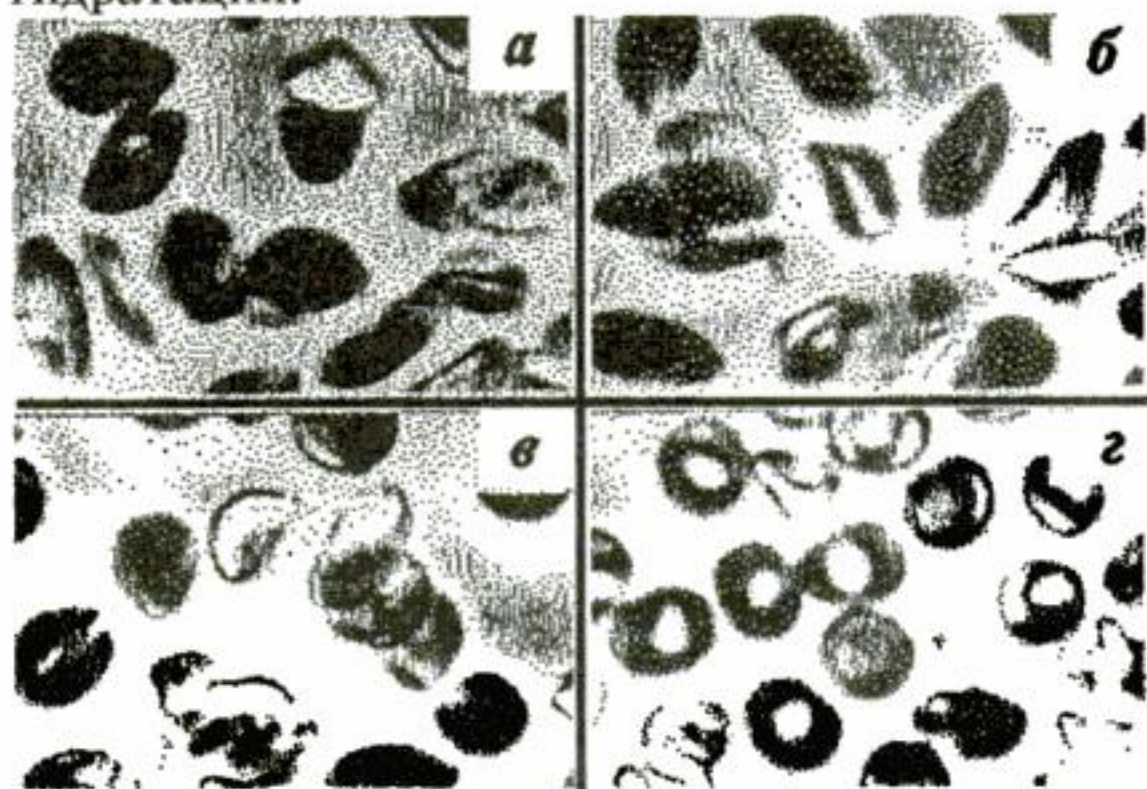


Рис. 5. Деформация и восстановление формы эритроцитов при экспозиции в 40%-м водном растворе глицерина, содержащем изотоническую концентрацию NaCl (а—8 с; б—24 с; в—44 с; г—178 с)

а). Плохая проницаемость клеток перитонеального экссудата мыши для глицерина может стать причиной нарушения проницаемости и набухания этих клеток еще на этапе эквilibрации (рис. 6, кривая б).

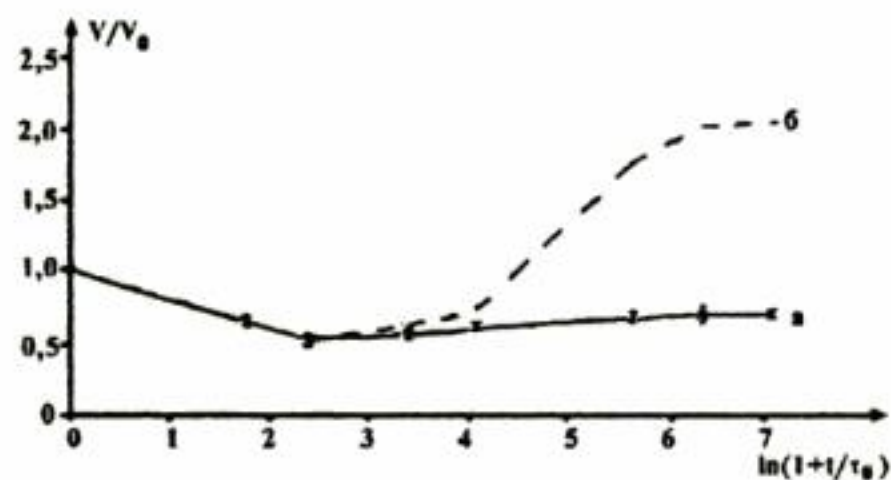


Рис. 6. Кинетика изменения относительного объема клеток перитонеального экссудата мыши в процессе экспозиции в водном растворе глицерина

Таким образом, использование для криозащиты комбинированной среды, включающей проникающий и непроникающий компоненты, позволяет на этапе эквilibрации не только достичь необходимой концентрации крипротектора в клетке, но и уменьшить содержание внутриклеточной воды за счет дегидратационного действия непроникающего компонента криозащитной среды, что способствует защите клеток от гипертонического стресса и снижает вероятность внутриклеточной кристаллизации.

Результаты численных экспериментов также показывают, что время

Такая оценка, проведенная методом микроскопии, показывает, что для насыщения эритроцитов человека растворами глицерина и полиэтиленгликоля со среднечисловой молекулярной массой 100 даже в концентрациях 30–40 % достаточно трех минут (рис. 5), в то время как клетки перитонеального экссудата мыши за время двадцатиминутной экспозиции не успевают уравниваться даже с 10%-м раствором глицерина (рис. 6, кривая

Численное моделирование позволяет изучить изменение такого трудно оцениваемого экспериментально параметра, как концентрация внутриклеточного электролита. Пик этой концентрации тем выше, чем выше концентрация внутриклеточного крипротектора (рис. 1, в), меньше плотность суспензии (рис. 2, в) и параметр проницаемости (рис. 3, в).

Концентрация внеклеточного крипротектора (рис. 1, г) основные изменения претерпевает на этапе дегидратации клеток и слабо изменяется

на этапе их регидратации. В связи с этим измерение проницаемости клеток для криопротектора по данным изменения его концентрации в надосадочной жидкости мало эффективно.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что поведение клеток на этапе экспозиции в растворах, содержащих проникающий и непроникающий компоненты, может быть удовлетворительно описано с помощью уравнений термодинамики необратимых процессов. Отклонения связаны, главным образом, с возникновением проницаемости мембран для непроникающего компонента внеклеточного раствора вследствие гипертонического стресса и могут быть описаны более сложной системой уравнений, учитывающей вновь возникающую проницаемость. Тем не менее ясно, что возникновение проницаемости клеточных мембран для в норме не проникающих в клетку веществ должно привести к увеличению клеточного объема выше исходного значения (то есть к набуханию клеток) по механизму, сходному с механизмом коллоидно-осмотического лизиса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка. – 1994. – 143 с.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Кировский НИИ гематологии
и переливания крови МЗ и МП РФ

Поступила 05.09.96

Є.О.ГОРДІЄНКО, Л.Ф.РОЗАНОВ, А.О.КОСТЯЄВ, В.І.РЕЗНІКОВ, І.Ф.КОВАЛЕНКО

КІНЕТИКА ПРОЦЕСІВ МАСОПЕРЕНОСУ ПРИ ІЗОТЕРМІЧНІЙ ЕКСПОЗИЦІЇ КЛІТИН В КОМБІНОВАНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків
Кіровський НДІ гематології і переливання крові МОЗ і МП РФ

Чисельне моделювання осмотичної поведінки клітин при експозиції їх у криозахисних середовищах, які вміщують проникаючі та непроникаючі компоненти, дозволило оцінити залежність ступеня дегідратації і регідратації клітин, часу їх регідратації та насичення криопротектором, а також ступеня тимчасового зростання концентрації внутрішньоклітинного електроліту від початкових концентрацій проникаючого та непроникаючого компонентів криозахисного середовища, щільності суспензії, параметра проникності та об'ємної частки осмотично неактивних речовин в клітинах. Зокрема, показано, що зростання щільності клітин в суспензії веде до зниження не тільки рівня їх обезводнення, а й рівня насичення клітин криопротектором та пікового значення концентрації внутрішньоклітинного електроліту. Ступінь регідратації клітин після насичення криопротектором при зростанні концентрації непроникаючого компонента криозахисного середовища знижується, що дозволяє змінювати рівень води в насиченій криопротектором клітині.

E.A.GORDIENKO, L.F.ROZANOV, A.A.KOSTYAEV, V.I.REZNIKOV, I.F.KOVALENKO

KINETICS OF THE PROCESSES OF MASS TRANSFER DURING ISOTHERMIC EXPOSURE OF CELLS IN COMBINED MEDIA

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

Kirov Scientific-Research Institute of hematology and Blood Transfusion of the Ministry of Health of the Russian Federation

A numeric modelling of the osmotic behavior of cells, being exposed in cryoprotective media, which contain penetrating and non-penetrating components, made it possible to evaluate the dependence of the extent of dehydration and rehydration of the cells, the time of their rehydration and saturation with a cryoprotectant, and the extent of a temporary rise in the concentration of the intracellular electrolyte, on the original concentrations of the penetrating and non-penetrating components of the cryoprotective medium, suspension density, permeability parameter and volume portion of the osmotically inactive substances of the cells. It was shown, in particular, that an increase in the cell density in the suspension reduces not only the level of their dehydration, but also the levels of their saturation with oxygen and peak value of the concentration of the intracellular electrolyte. The extent of the cell rehydration after

saturation with a cryoprotectant after a rise in the concentration of the non-penetrating component of the cryoprotective medium is reduced, thus making possible to vary the regulate the level of water in a cryoprotectant-saturated cell.

УДК 57.043

**В.В.Рамазанов, А.Ю.Семенченко, Е.Л.Воловельская,
Э.С.Мельник, В.А.Бондаренко**

ВЛИЯНИЕ ПРОЧНОСТИ СВЯЗИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ БЕЛКОВ С МЕМБРАНАМИ НА ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ШОК ЭРИТРОЦИТОВ

Исследовали чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку после модификации взаимодействия белков с мембранами. Предположили, что повреждения эритроцитов при гипертоническом взаимодействии связаны с увеличением прочности связи периферических белков с тениями эритроцитов. Повышение стойкости клеток к гипертоническому шоку может сопровождаться снижением прочности связи указанных белков.

Характер модификации взаимодействий белков с мембраной при осмотическом воздействии на клетки является существенным фактором, который определяет устойчивость клеток к действию низких температур [1, 4]. Температурозависимые перестройки в мембранах, а также стабильность липидного бислоя при охлаждении в значительной степени определяются периферическими белками [2, 3]. Исследовалось влияние количественной модификации мембранных белков эритроцитов на чувствительность клеток к гипертоническому воздействию.

В опытах использовали эритроциты донорской крови. Для обработки модификаторами эритроциты суспендировали с 20%-м гематокритом в среде, содержащей (ммоль/л): KCl-90, NaCl- 45, сахарозу- 44, фосфат-10 (pH 7,4). Гемин добавляли в концентрации 300 мкмоль/л и инкубировали 10 мин (37 °C). Иодоацетамид (ИАА) добавляли в концентрации 5–20 ммоль/л и инкубировали 60 мин (37 °C). Эритроциты обрабатывали пара-хлормеркурийбензоатом (ПХМБ) в концентрации 1 ммоль/л в течение 60 мин (37 °C) после предварительной обработки клеток ИАА. Модифицированные эритроциты отмывали средой для обработки. Электрофоретическое исследование мембранных белков проводили по методу, описанному в [1]. Гипертонический шок эритро-

тов осуществляли в растворе, содержащем 3 моль/л NaCl.

Обработка эритроцитов ИАА в концентрации 2–20 ммоль/л не изменяет количественный или качественный состав мембранных белков (рис. 1, а). Напротив, обработка эритроцитов ПХМБ в концентрации 1 ммоль/л способствует росту количества белка полос 6 и 7. Последовательная обработка указанными реагентами выявляет более существенные изменения в белковом спектре мембран эритроцитов. Так, при возрастании концентрации ИАА в среде предобработки не только выявляются количественные изменения мембранных белков и гемоглобина, но и появляются

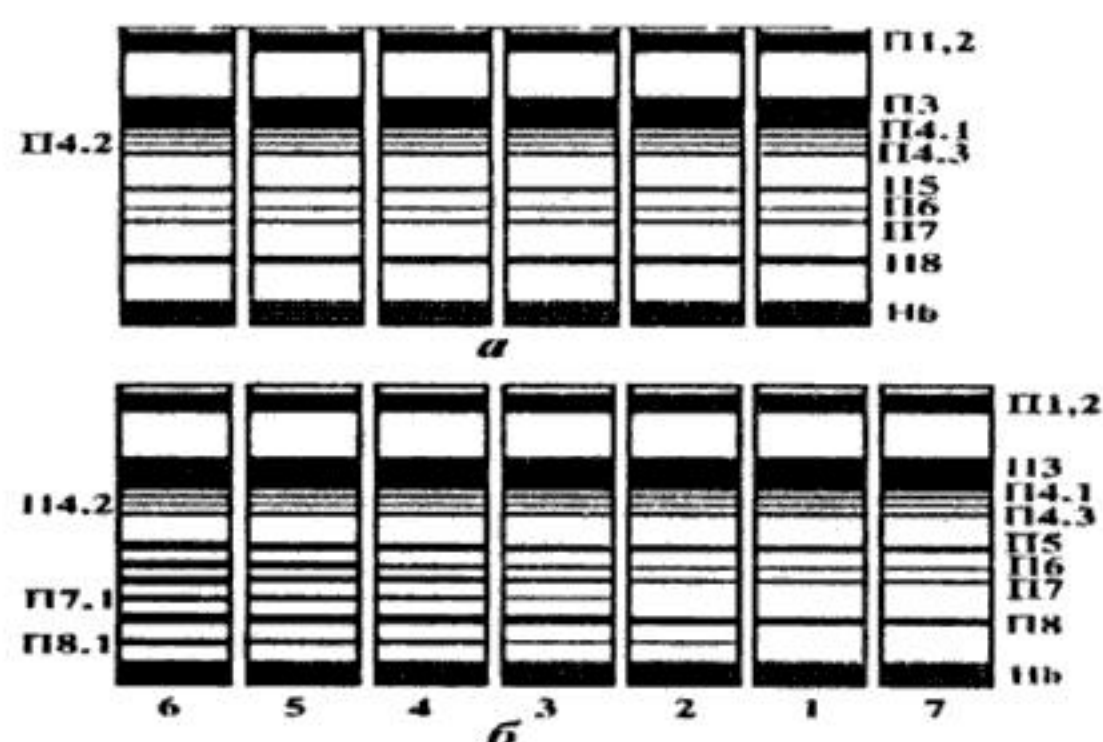


Рис. 1. Электрофорез мембранных белков после обработки эритроцитов: а — иодоацетамидом; б — иодоацетамидом + ПХМБ (1 ммоль/л). Концентрация иодоацетамида: 1 — контроль; 2 — 2 ммоль/л; 3 — 5 ммоль/л; 4 — 10 ммоль/л; 5 — 15 ммоль/л; 6 — 20 ммоль/л; 7 — эритроциты обрабатывались только ПХМБ. П1, 2 — спектрины; П3 — белок полосы 3; П4.1 — белок полосы 4.1; П4.3 — белок полосы 4.3; П5 — актин; П6 — белок полосы 6; П7 — белок полосы 7; П7.1 — белок полосы 7.1; П8 — белок полосы 8; П8.1 — белок полосы 8.1; Hb — гемоглобин

ся дополнительные белковые фракции. Происходит рост количества белка полос 6, 7 и 8, а также появляются белковые полосы 7.1 и 8.1. Отмечается возрастание способности мембран удерживать гемоглобин (рис. 1, б).

После обработки эритроцитов геминном электрофоретическое исследование также указывает на изменение количественного состава мембранных белков. Происходит потеря белка полос 4.3 и 8. Значительное количество белка полосы 7 диссоциирует из мембран. Кроме того, данная модификация приводит к тому, что тени эритроцитов теряют способность удерживать гемоглобин (рис. 2).

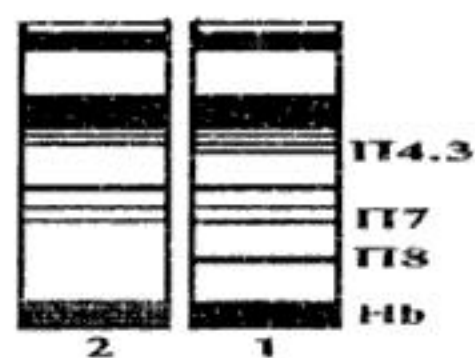


Рис. 2. Электрофорез мембранных белков после обработки эритроцитов геминном (300 мкмоль/л). 1 — контроль; 2 — гемин. P4.3 — белок полосы 4.3; P7 — белок полосы 7; P8 — белок полосы 8; Hb — гемоглобин

Таким образом, в зависимости от типа используемого реагента можно ослабить или усилить прочность связи периферических белков в мембранах эритроцитов. Обработка эритроцитов ИАА в интервале концентраций 2–20 ммоль/л не приводит к изменению чувствительности клеток к гипертоническому шоку (рис. 3, кривая 1). Если эритроциты дополнительно обрабатывались ПХМБ, то это приводило к росту чувствительности, уровень которой увеличивался при возрастании концентрации ИАА (рис. 3, кривая 2). В последующих экспериментах обработка эритроцитов ПХМБ производилась после предварительной обработки ИАА в концентрации 15 ммоль/л.



Рис. 3. Влияние обработки модификаторами на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl после инкубации при 37 °С в растворе, содержащем 0,15 моль/л NaCl. 1 — иодоацетамид (0–20 ммоль/л); 2 — иодоацетамид + ПХМБ (1 ммоль/л)

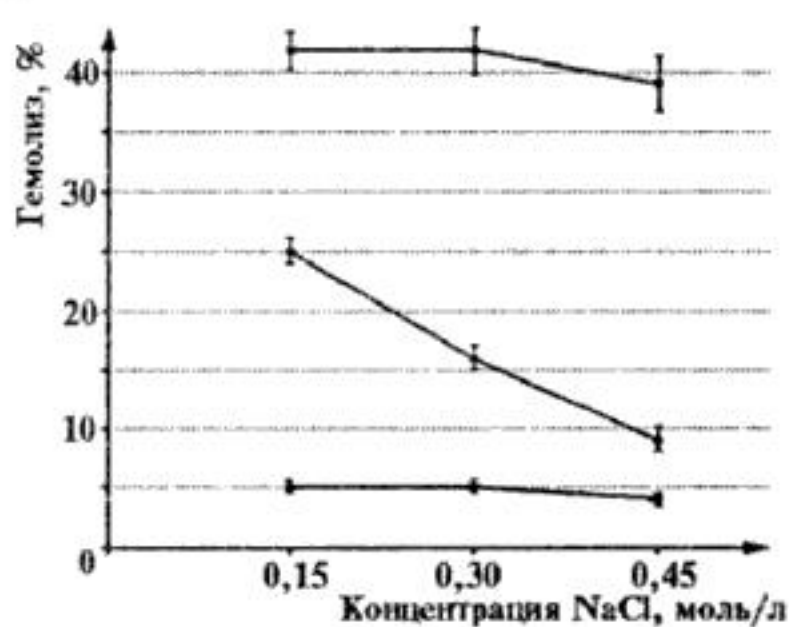


Рис. 4. Влияние обработки модификаторами на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl после инкубации при 37 °С в растворах NaCl. 1 — контроль; 2 — иодоацетамид (15 ммоль/л) + ПХМБ (1 ммоль/л); 3 — гемин (300 мкмоль/л)

Исследование гипертонического шока после инкубации эритроцитов в средах с нарастающей осмолярностью показывает, что возрастание концентрации NaCl в среде прединкубации до 0,45 моль/л приводит к снижению чувствительности клеток к гипертоническому шоку (рис. 4, кривая 1). В результате обработки эритроцитов ИАА и ПХМБ уровень гипертонического шока после инкубации клеток в растворах, содержащих 0,15–0,45 моль/л NaCl, возрастает (рис. 4, кривая 2), и в этом случае не выявляется эффекта снижения чувствительности, который отмечался для интактных эритроцитов при повышении концентрации NaCl в среде прединкубации до 0,45 моль/л (рис. 4, кривая 1). Напротив, обработка эритроцитов геминном значительно снижает уровень гипертонического шока во всем исследуемом ряду концентраций NaCl (рис. 4, кривая 3).

Таким образом, можно сказать, что рост чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку связан с ростом способности мембран удерживать периферические белки. Указанный факт может являться первопричиной развития повреждений при гипертоническом шоке. В осмотически обезвоженных клетках происходит концентрация периферических белков на поверхности

мембраны, а это может ограничивать адаптацию липидного бислоя мембраны при охлаждении [4]. Инкубация суспензии эритроцитов с ИАА приводит к подавлению активности глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы и снижению в клетках уровня АТФ, при этом не изменяется качественный или количественный состав мембранных белков [5]. Подобная обработка не приводит к сдвигу чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку (рис. 3). Дополнительная обработка клеток ПХМБ увеличивает содержание мембранных белков (рис. 1) и способствует росту чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку. Подобное увеличение количества белков в мембранах отмечается вследствие обработки клеток этилмалеимидом, при этом значительно уменьшается фильтруемость эритроцитов [5].

Известно также, что обработка теней эритроцитов ПХМБ в растворе с низкой ионной силой вызывает экстракцию анкирина, а также диссоциацию цитоскелета от мембраны [8]. Прединкубация теней эритроцитов в растворе, содержащем 0,1 моль/л NaCl, приводит к потере способности ПХМБ экстрагировать анкирин и откреплять цитоскелет от мембраны [7]. Из этого следует, что действие ПХМБ на цитоскелет интактных клеток ограничивается ионной силой среды инкубации. Как показывает электрофоретическое исследование, обработка эритроцитов ИАА и ПХМБ не приводит к потере белков цитоскелета, а способствует не только их удержанию, но и более прочному взаимодействию других периферических белков (рис. 1). Очевидно, что фракция мембранных SH-групп, блокируемых ИАА, не включается во взаимодействие белков с мембранами, при этом предобработка указанным реагентом способствует более целенаправленному взаимодействию ПХМБ с фракцией SH-групп, ответственных за взаимодействие белков с мембраной. Как было показано, действие гемина на эритроциты сопровождается нарушением взаимодействия белков цитоскелета, что в конечном итоге приводило к лизису клеток [10]. Однако обработка данным реагентом позволяет модифицировать взаимодействие белков цитоскелета без значительного гемолиза эритроцитов [10]. В нашем случае происходит потеря белка полос 4.3 и 8. Из мембраны диссоциирует значительное количество белка полосы 7. Кроме того, данная модификация приводит к тому, что тени эритроцитов теряют способность удерживать гемоглобин (рис. 2). Взаимодействие гемоглобина с мембраной эритроцитов происходит по двухступенчатому механизму [11]. Молекула гемоглобина взаимодействует электростатически с белком полосы 3, а затем гидрофобно с фосфолипидами. В гидрофобное взаимодействие гемоглобина с липидным бислоем включается гем [11].

При обработке клеток геминном последний может нарушать взаимодействие на уровне фосфолипидов мембраны, что и приводит к утрате способности теней удерживать гемоглобин. Полоса 7 включает белок, связанный с белками цитоскелета и по своим характеристикам соответствующий тропомиозину [6]. Известно, что тропомиозин ассоциирует с актином и стабилизирует его олигомеры [6]. Аффинность взаимодействия димеров спектрина и олигомеров актина в присутствии белка полосы 4.1 возрастает на девять порядков, при этом образованный спектрин-актиновый комплекс становится более устойчивым [6]. Это свидетельствует о том, что нарушение нативной структуры белка полосы 4.1 после взаимодействия с ним гемина приведет к потере механической устойчивости спектрин-актинового комплекса [11] и, следовательно, к потере некоторых компонентов цитоскелета. В то же время после обработки эритроцитов геминном потери белка полосы 4.1 из мембран не обнаруживается (рис. 2). Это можно объяснить тем, что данный белок также может связываться на внутренней поверхности мембраны с гликофорином С, гликофорином А, фосфатидилсерином и белком полосы 3 [6, 9]. Электрофоретический анализ не выявляет потери белка полосы 4.1 в мембранах, однако разрыв связи на уровне белок 4.1-спектрин должен привести к ограничению регуляторного

влияния цитоскелета на мембрану в условиях осмотического стресса. Вероятно, такое ограничение тормозит развитие гипертонического шока (рис. 4).

Таким образом, можно предположить, что механизм гипертонического повреждения эритроцитов связан с возрастанием прочности связи периферических мембранных белков и гемоглобина с мембраной. В то же время осмотически-индуцированное повышение устойчивости клеток к гипертоническому шоку может сопровождаться снижением прочности связи указанных белков. При этом взаимодействие белков с мембраной может контролироваться реактивностью специфической фракции SH-групп, а также взаимодействием белков цитоскелета между собой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис. ...д-ра биол. наук. – Харьков, 1988. – 30 с.
2. Репина С.В., Цымбал Л.В. Влияние цитоскелетных белков на температурозависимые перестройки в мембранах эритроцитов // Криобиология. – 1988. – № 2. – С. 49–51.
3. Рязанцев В.В. Стабилизация белками цитоскелета липидного бислоя липосом при охлаждении // Физико-химические процессы в криобиологических системах. – 1991. – С. 141–147.
4. Шпакова Н.М., Семенченко А.Ю., Бондаренко В.А. Модифицирующий эффект конканавалина-А и диамида на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку // Биохимия. – 1991. – 56. – № 5. – С. 923–929.
5. Allen D.W., Cadman S. Comparison of the effects of N-ethylmaleimide and iodoacetamide on red blood cell membranes // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1976. – 152. – № 3. P. 318–321.
6. Bennett V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – 988 – P. 107–121.
7. 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.
8. Ralston G.B., Crisp E.A. The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta. – 1981. – 649. – P. 98–104.
9. Rybicki A.C., Heath R., Lubin B., Schwarz R.S. Human erythrocyte protein 4.1 is a phosphatidylserine binding protein // J. Clin. Invest. – 1988. – 81, № 1. – P. 255–261.
10. Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // Biochem. Internat. – 1986. – 13. – № 3. P. 467–477.
11. Shaklai N. Interaction of sickle cell hemoglobine with erythrocyte membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – 78. – № 1. – P. 65–68.

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

Поступила 07.02.96

В.В.РАМАЗАНОВ, О.Ю.СЕМЕНЧЕНКО, Є.Л.ВОЛОВЕЛЬСЬКА, Е.С.МЕЛЬНИК,
В.А.БОНДАРЕНКО

ВПЛИВ МІЦНОСТІ ЗВ'ЯЗКУ ПЕРИФЕРИЧНИХ БІЛКІВ З МЕМБРАНАМИ НА ГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК ЕРИТРОЦИТІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Досліджували чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку після модифікації взаємодії білків з мембранами. Вважають, що пошкодження еритроцитів при гіпертонічному впливі пов'язане зі збільшенням міцності зв'язків периферичних білків з тіннями еритроцитів. Підвищення стійкості клітин до гіпертонічного шоку може супроводжуватись зниженням міцності зв'язку вказаних білків.

V.V.RAMAZANOV, A.YU.SEMENCHENKO, V.L.VOLOVELSKAYA, E.S.MELNIK,
V.A.BONDARENKO

THE EFFECT OF THE STRENGTH OF BINDING OF PERIPHERAL PROTEINS WITH MEMBRANES ON THE HYPERTONIC STRESS OF RBC

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

The authors investigated the sensitivity of RBC to hypertonic stress after modification of the interaction of proteins with membranes. It is thought that the RBC injury during hypertonic interaction relates to an increasing strength of binding of peripheral proteins with the RBC ghosts. A rise in the

resistance of cells to hypertonic stress may be accompanied by a reduction in the binding strength of the above proteins.

УДК 591.543.42:612,396

С.П.Львова, И.К.Михайленко

ИНТЕНСИВНОСТЬ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА ИЗ РАЗНЫХ СУБСТРАТОВ В СРЕЗАХ ПЕЧЕНИ СУСЛИКОВ В ДИНАМИКЕ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

Исследована интенсивность синтеза глюкозы из аланина, глутамата, аспартата, пирувата, оксалоацетата, сукцината, глицерина в срезах печени гибернирующих сусликов. Найдено увеличение интенсивности глюконеогенеза уже при погружении животных в спячку (18 °С). При наступившей зимней спячке разной длительности (неделя, 2, 3, 4 мес) активность глюконеогенеза заметно растет по мере удлинения сроков гибернации. В синтезе глюкозы в основном используется глицерин, оксалоацетат, довольно велика роль аминокислот.

Известно, что энергетические потребности гибернирующих млекопитающих удовлетворяются главным образом за счет окисления жира, который в значительных количествах накапливается в предгибернационный период [3, 10]. Вместе с тем поддержание функций эритроцитов и нервной ткани обеспечивается за счет утилизации глюкозы. Хотя перед спячкой и наблюдается депонирование глюкозы в виде гликогена в тканях, прежде всего в печени [10, 11], однако эти запасы относительно невелики (134 мкм глюкозы/г влажной ткани) и их, безусловно, недостаточно для всего срока гибернации. Поэтому при зимней спячке, когда поступление глюкозы с пищей отсутствует или ограничено, важную роль в поддержании ее гомеостаза приобретает синтез глюкозы из неуглеводных компонентов. Литературные материалы по этому вопросу весьма немногочисленны и касаются главным образом изучения активности некоторых ферментов глюконеогенеза или определения содержания гликогена в основном его депо — печени на одном из этапов спячки [1, 13–15]. Между тем активность многих метаболических процессов существенно изменяется в динамике гибернации [10], которая у млекопитающих через каждые 7–16 дней сопровождается пробуждением (период эутермии). В данной работе приводятся результаты экспериментов по изучению активности синтеза глюкозы из разных экзогенных субстратов в ткани печени в динамике зимней спячки сусликов.

Опыты проведены на малых сусликах *Citellus pygmaeus*. Исследовалась интенсивность глюконеогенеза в ткани печени у бодрствующих летом (июнь-июль) животных (37–38 °С); при впадении в зимнюю спячку, когда температура тела понижалась до 18–19 °С (октябрь); при непрерывной недельной (10 °С) гибернации (ноябрь); при 2-месячной (10 °С), 3–4-месячной (5 °С) гибернации (декабрь-февраль). При длительной зимней спячке животных забивали через 4–5 дней после окончания очередного цикла эутермии. Об интенсивности глюконеогенеза судили по приросту содержания глюкозы в срезах печени (100 мг на каждую пробу), инкубируемых в течение 1 ч при 37 °С в Кребс-Рингер-фосфатном буфере, $pH=7,3$. В одной серии экспериментов инкубацию вели и при 5 °С, т.е. при температуре тела гибернирующих животных. В качестве субстратов глюконеогенеза добавляли аланин, глутамат, аспартат, пируват натрия, оксалоацетат натрия, сукцинат натрия и глицерин в конечной концентрации 0,01 М [2]. Одну пробу срезов печени инкубировали без добавления субстратов. В этой пробе синтез глюкозы шел из эндогенных источников. Глюкозу определяли высокоспецифичным глюкозооксидазным методом; прирост глюкозы выражали в мкМ влажной ткани в час.

Глюконеогенез в ткани печени сусликов в летнее время характеризуется умеренной интенсивностью (табл. 1). Видимо, это связано с достаточно высо-

ким поступлением глюкозы с пищей и наличием значительных [5] резервов гликогена в этом органе. Из исследованных экзогенных субстратов в ткани печени сусликов в летний период наиболее активно в глюконеогенезе участвуют сукцинат и оксалоацетат (табл. 2), в то время как у незимнеспящих млекопитающих [6] использование сукцината незначительно. Кроме того, у сусликов, в отличие от крыс [2, 6], глюкоза достаточно активно синтезируется из глицерина. Аналогичная закономерность (т.е. увеличение использования в глюконеогенезе сукцината, оксалоацетата и глицерина) наблюдалась в наших экспериментах при адаптации крыс к периодическому действию холода. Видимо, эти изменения связаны с усилением использования в печени адаптированных к холоду и зимнеспящих животных запасных жиров и повышением активности флавиновых ферментов, в том числе сукцинатдегидрогеназы [10], которая через оксалоацетат быстро включает сукцинат в глюконеогенез [9].

Т а б л и ц а 1

Интенсивность глюконеогенеза в срезах печени малого суслика при зимней спячке (мкмоль глюкозы/г/ч) при 37 °С

Вариант опыта	Без суб- страта	Аланин	Глута- мат	Аспар- тат	Пируват	Оксало- ацетат	Сукци- нат	Глице- рин
Контроль, лето 37 °С	2,7± 0,21	7,5± 0,17	4,9± 0,9	8,5± 0,25	6,5± 0,5	10,5± 0,35	16,0± 0,5	5,1± 0,25
Зимняя спячка, октябрь-ноябрь:								
Погружение в спячку, °С, 18	4,0± 0,7	16± 0,7*	17,2± 0,86*	14,4± 0,62*	16,6± 0,86*	12,6± 1,64	16,2± 0,64	13,6± 1,15*
1 неделя, 10	5,6± 0,35*	24,7± 0,23*	20,5± 1,1*	19,1± 0,5*	21,4± 0,57*	24± 0,5*	17,2± 0,53	22,5± 0,63*
2 мес, 10	2,2± 0,22	16,7± 0,4*	18,5± 0,44*	17,5± 0,63*	22,8± 0,7*	23,5± 0,66*	14,9± 0,6	30,6± 0,48*
3 мес, 5	8,6± 0,58*	49± 3,78*	54± 2,4*	38,5± 1,9*	53,5± 3,0*	63,6± 4,0*	28,7± 1,16*	60,4± 4,0*
	(1,6± 0,2)	(4,7± 0,4)	(4,3± 0,3)	(2,4± 0,2)	(3,2± 0,35)	(7,1± 0,4)	(3,2± 0,3)	(6,3± 0,5)
4 мес, 5	9,3± 0,4*	59,5± 1,85*	67,2± 0,9*	47,2± 1,46*	64,2± 1,25*	76,7± 0,4*	33,9± 1,4*	72,7± 1,0*

Примечание. * — статистически достоверные ($p < 0,05$) изменения по сравнению с контролем. В скобках — интенсивность глюконеогенеза при температуре инкубации 5 °С.

Из табл. 1 видно, что при погружении в спячку, когда животные находятся в дремотном состоянии, а температура тела снижается до 19–18 °С, синтез глюкозы из неуглеводных субстратов усиливается. Это относится как к глюконеогенезу из эндогенных субстратов, так и к синтезу глюкозы из большинства экзогенных субстратов, включая сукцинат и оксалоацетат. Наиболее существенно (в 2–3 раза) возрастает интенсивность глюконеогенеза из глицерина, пирувата и аланина. Известно, что вхождение млекопитающих в спячку идет не одномоментно, а сопровождается значительными перепадами скорости метаболизма — от быстрой его минимизации к интенсификации. Подобная “раскачка” метаболизма требует значительных энергетических затрат [8]. В этих условиях существенно возрастает координирующая роль нервной системы, функции которой обеспечиваются за счет окисления глюкозы. Поэтому регуляторная роль глюконеогенеза, обеспечивающего поддержание гликемии, в этот период возрастает. Интересно, что синтез глюкозы в срезах печени сусликов в период вхождения в спячку идет примерно с одинаковой интенсивностью при использовании всех исследованных экзогенных субстратов (табл. 1, 2). При недельной гибернации сусликов (10 °С) в конце баута скорость глюконеогенеза еще более возрастает. Так, синтез глюкозы из экзогенных субстратов (исключая сукцинат) в 2–4 раза превышает его активность в летний период. Особенно заметно активизируется глюконеогенез из глицерина, аланина и глутамата. В литературе отмечается значительное усиление процесса глюконеогенеза при периодических пробуждениях зимнеспящих млекопитающих [15].

Т а б л и ц а 2

Активность синтеза глюкозы из экзогенных субстратов в ткани печени сусликов в динамике зимней спячки (прирост глюкозы в % относительно пробы без субстрата)

Вариант опыта	Аланин	Глутамат	Аспарат	Пируват	Оксалоацетат	Сукцинат	Глицерин
Контроль, лето	177,8	81,5	214,8	140,7	288,9	492,6	88,9
Зимняя спячка:							
Погружение в спячку, °С, 18	300	330	260	315	215	305	240
1 неделя, 10	341	266	241	282,1	328,6	207,1	301,8
2 мес, 10	659	741	695,4	936,4	968,2	577,2	129
3 мес, 5	469,8 (193,7)	527,9 (176,7)	347,7 (50)	522 (100)	639,5 (344)	233,7 (100)	602,3 (294)
4 мес, 5	539,8	622,6	407,5	590,3	724,7	264,5	681,7

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что интенсивный глюконеогенез может протекать в ткани печени и в период непрерывной спячки. Это согласуется с нашими результатами [7], выявившими усиление глюконеогенеза в ткани печени при непрерывной гибернации пойкилотермного животного. Следовательно, в наших экспериментах *in vitro* выявлена активизация глюконеогенеза в печени уже на начальных этапах гибернации. Это отчасти компенсирует убыль печеночного гликогена, однако далеко не в полной мере: количество гликогена в печени при недельной гибернации сусликов снижается примерно в 4 раза [10]. Одновременно наблюдается снижение уровня гликемии [4]. При длительной зимней спячке, сопровождающейся периодическими пробуждениями, содержание гликогена в печени поддерживается на более высоком уровне, чем в начале гибернации [5, 10]. Концентрация глюкозы в крови при этом нормализуется или даже несколько превышает контрольный уровень. Несомненно, что указанные изменения в значительной мере обусловлены снижением утилизации углеводов в связи со снижением метаболизма при низких температурах тела. Однако также несомненно и то, что убыль депонированного гликогена частично компенсируется за счет ресинтеза из неуглеводных компонентов.

Еще в 1970 г. Г.М.Даудова и М.С.Усатенко [1] наблюдали увеличение активности ряда ферментов глюконеогенеза в печени гибернирующих (5–6 °С) сусликов. Усиление синтеза глюкозы из пирувата, и особенно глицерина, отмечено в перфузируемой печени [13] и в гепатоцитах [12] гибернирующих хомяков. Вместе с тем сообщается [14] о снижении интенсивности глюконеогенеза в интактных гепатоцитах, выделенных из печени гибернирующих сусликов, а также о снижении в митохондриях печени пируваткарбоксилазы. Галстер и Моррисон [15] пришли к заключению, что углеводы, потраченные в период непрерывной спячки (7–16 дней), быстро восстанавливаются в период коротких (14–24 ч) пробуждений. При этом глюконеогенез идет на 3/4 за счет жиров, а на 1/4 за счет белков и лактата. Приведенные литературные материалы свидетельствуют об определенной противоречивости данных, касающихся активности глюконеогенеза в печени гибернирующих млекопитающих.

В экспериментах (табл. 1, 2) по определению интенсивности глюконеогенеза при 2–4-месячной спячке сусликов нами установлено, что активность этого процесса в срезах печени гибернирующих животных существенно выше, чем у бодрствующих. Это касается как интенсивности синтеза из эндогенных источников, так и его синтеза из всех экзогенных субстратов. Причем активность глюконеогенеза возрастает по мере удлинения сроков гибернации и при 4-месячной зимней спячке в 2–14 раз превышает активность процесса у бодрствующих летом животных. Необходимо отметить, что при гибернации в ткани печени поддерживается достаточно высокий уровень глюконеогенеза не только при оптимальной температуре (37 °С) инкубации срезов, но и в случае замеров, сделанных при 5 °С. Это в определенной мере согласуется с литературными материалами, полученными на срезах почек гибернирующих сусли-

ков (6–8 °C), в которых отмечено (в отличие от экспериментов в летний период) сохранение активности глюконеогенеза даже после 5-суточной экспозиции срезов при 0 °C [16]. При длительной зимней спячке наблюдается существенное изменение субстратной специфичности глюконеогенеза. Предпочитаемыми субстратами становятся глицерин и оксалоацетат. Достаточно активно синтезируется глюкоза также из аминокислот. Наименее интенсивный глюконеогенез в ткани печени гибернирующих сусликов наблюдается из сукцината.

Результаты наших экспериментов согласуются с литературными данными [12, 13], свидетельствующими о главенствующей роли глицерина в процессе ресинтеза глюкозы в печени зимнеспящих животных. Это неудивительно с учетом того, что глицерин в период гибернации образуется в больших количествах за счет активации липолиза запасных жиров. Его включение в глюконеогенез свидетельствует о высокой активности фосфоглицеролкиназы и α -глицеролфосфатдегидрогеназы. Активное использование аминокислот для синтеза глюкозы в ткани печени гибернирующих сусликов позволяет убедиться в сохранении активности аминотрансфераз, которые способствуют превращению аминокислот, образующихся при протеолизе белков (прежде всего мышечных), в кетокислоты и включению их в процесс глюконеогенеза.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что при гибернации в срезах печени происходит активный синтез глюкозы из неуглеводных предшественников, причем его интенсивность нарастает по мере удлинения сроков зимней спячки. Эти изменения, проведенные *in vitro*, хорошо согласуются с характером изменения содержания гликогена в печени и уровня глюкозы в крови гибернирующих сусликов [4, 5, 10, 11].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даудова Г.М., Усатенко М.С. Активность ферментов глюконеогенеза в печени сусликов *Citellus suslicus* // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1979. – 6, № 1. – С. 35–41.
2. Еришков С.М. Интенсивность глюконеогенеза и содержание углеводов в ткани печени крыс при гипокинезии // Вопр. мед. химии. – 1987. – № 2. – С. 87–90.
3. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих. – М.: Наука, 1985. – 260 с.
4. Львова С.П. Некоторые стороны углеводно-фосфорного обмена мозга и крови при зимней спячке и пробуждении от нее // Докл. АН СССР. – 1968. – 179, № 5. – С. 1225–1226.
5. Львова С.П. Содержание гликогена, фосфорилазная и глюкозо-6-фосфатазная активность в тканях суслика и лягушки при зимней спячке // Криобиология. – 1988. – № 1. – С. 39–43.
6. Львова С.П., Казиахмедова Х.К. Интенсивность глюконеогенеза в ткани печени крыс разного возраста // Укр. биохим. журн. – 1991. – 63, № 6. – С. 43–48.
7. Львова С.П., Магомедова М.Х. Интенсивность глюконеогенеза в ткани печени лягушки при искусственной гипотермии и зимней спячке // Пробл. криобиологии. – 1991. – № 4. – С. 40–43.
8. Пастухов Ю.Ф., Невретдинова З.Г. Изменения терморегуляции, сна и концентрации в крови тиреоидных гормонов в критический период вхождения в спячку суслика // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1991. – 27, № 2. – С. 211–217.
9. Ньюсхолм Э., Спарт К. Регуляция метаболизма. – М.: Мир, 1977. – 407 с.
10. Эмирбеков Э.З., Львова С.П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. – Ростов н/Д.: Изд-во Рост. ун-та, 1985. – 79 с.
11. Эмирбеков Э.З., Львова С.П. Энергетический метаболизм при гибернации у представителей разных филогенетических групп // Успехи физиол. наук. – 1991. – 22, № 1. – С. 97–112.
12. Craciun C., Dordea V., Craciun V. Studiu ultrastructura les hepatocytes des hamster en etad d'ectivite, acclimates au froid et en periode d'hibernation // Evol. and Adapt. – 1988. – № 3. – P. 249–267.
13. Dordea M., Pora E.A. Gluconeogenesis in the perfused liver of the hamster acclimated to cold and hibernation // Rev. roum. Biochem. – 1978. – 15, № 2. – P. 107–111.
14. Gehrich S.C., Aprill J.R. Hepatic gluconeogenesis and mitochondrial function during hibernation // Comp. Biochem. and Physiol. B. – 1988. – 91, N 1. – P. 11–16.
15. Galster W., Morrison P.R. Gluconeogenesis in arctic ground squirrel between periods in hibernation // Amer. J. Physiol. – 1975. – 228, № 1. – P. 325–330.
16. Green C.J., Fuller B.J., Simpkin S., Linsey B. Hibernating ground squirrels as a model for cold tolerance in preserved organs // Cryobiology. – 1987. – 24, № 6. – P. 580.

НИИ биологии Дагестанского ун-та, г. Махачкала

Поступила 27.02.95

С.П.ЛЬВОВА, І.К.МИХАЙЛЕНКО

ІНТЕНСИВНІСТЬ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗУ З РІЗНИХ СУБСТРАТІВ У ЗРІЗАХ ПЕЧІНКИ ХОВРАХІВ У ДИНАМІЦІ ЗИМОВОЇ СПЛЯЧКИ

НДІ біології Дагестанського університету, м. Махачкала

Досліджена інтенсивність синтезу глюкози з аланіну, глутамату, аспартату, оксалоацетату, сукцинату, гліцерину в зрізах печінки гібернуючих ховрахів. Знайдено збільшення інтенсивності глюконеогенезу вже при поринанні тварин у сплячку (18 °C). При зимовій сплячці різної тривалості (тиждень, 2, 3, 4 місяці) активність глюконеогенезу помітно зростає відповідно до збільшення строків гібернації. У синтезу глюкози, в основному, використовується гліцерин, оксалоацетат, досить велика роль амінокислот.

S.P.LVOVA, I.K.MIKHAILENKO

THE INTENSITY OF GLUCONEOGENESIS OF VARIOUS SUBSTRATA IN THE LIVER SLICES OF THE GROUND SQUIRREL IN THE TIME COURSE OF HIBERNATION

Scientific-Research Institute of Biology at the Dagestan State University, Makhachkala

The authors investigated the intensity of synthesis of glucose from alanine, glutamate, aspartate, piruvate, oxaloacetate, succinate, glycerol in the liver slices of the hibernating ground squirrels. They observed a rise in the intensity of gluconeogenesis already at the moment the animals entered hibernation (18C). In the time course of hibernation of various duration (one week, 2, 3, 4 months) the activity of gluconeogenesis increases significantly with the prolongation of the hibernation period. The synthesis of glucose utilizes mainly glycerol, oxaloacetate, and the role of amino acids is important.

УДК 612.111.22+612.118.221.3

Г.А.Божок

СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ОБЪЕМНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ПОСТГИПЕРТОНИЧЕСКОГО И ЯД-ИНДУЦИРОВАННОГО ЛИЗИСА

Представлены результаты исследований, свидетельствующие о некоторых сходных особенностях объемных изменений эритроцитов человека в цикле дегидратации—регидратации и при действии яда пчелы. В этих случаях установлены также структурные детерминанты объемных изменений, которые являются в определенной степени аналогичными. На основе анализа исследований и литературных данных обсуждается возможность участия общих Ca^{2+} -зависимых механизмов чувствительности клеток к повреждениям эндогенного (постгипертонический лизис) и экзогенного (яд-индуцированный лизис) характера.

Известно, что инкубация эритроцитов в гиперосмолярных растворах и последующий перенос их в изотонические среды сопровождаются гемолизом клеток, который получил название постгипертонический лизис (ПЛ). В настоящее время считается, что фактором, детерминирующим повреждение эритроцитов при медленном замораживании—оттаивании, является их дегидратация, которая возникает вследствие концентрирования внешнего раствора при кристаллизации водной фазы [15, 19].

Установлено, что изменение поверхностно-объемного отношения вследствие осмотической дегидратации приводит к кренированию эритроцитов в умеренно гипертонических средах или трансформации их в уплощенные неправильные диски при более высоких значениях тоничности среды (свыше 0,7 М) [23]. Последующая регидратация клеток в изотоническом растворе выражается в резких сдвигах их объема, обусловленных поступлением воды во внутриклеточное пространство. Образование локальных мембранных дефектов и увеличение трансмембранной проницаемости в момент регидратации приводят к включению в клетку непроникающих в норме веществ, например ионов Na и сахарозы [7]. Объем регидратированных клеток в этом случае может увеличиваться до 170 % по сравнению с нативными [18].

Модифицирующее влияние изменений осмолярности и, в частности дегидратации, проявляется прежде всего на уровне цитоскелета эритроцитов. В [13] описаны факты частичного открепления цитоскелета от мембраны в гипертонических условиях. В то же время некоторые эффекты гипертонической обработки клеток (увеличение количества молекул спектрина на единицу объема, перманентная механическая деформация цитоскелетных элементов) облегчают образование олигомерных форм [14] и неспецифических сшивок [22] в цитоскелете.

В экспериментах по дегидратации—регидратации эритроцитов было показано, что ПЛ зависит от температуры, осмолярности, ионной силы используемых сред, времени инкубации клеток в гипертонических и изотонических растворах, присутствия катионных добавок [1, 7, 20, 21, 24]. В каждом конкретном случае устойчивость эритроцитов к постгипертоническому повреждению будет определяться механическими свойствами цитогеля и характером ассоциации компонентов цитоскелета. Важную роль в стабилизации цитоскелета играют слабые, нековалентные взаимодействия, чувствительные к микроокружению [11]. Они могут являться точкой приложения биохимической регуляции состояния цитоскелета. С этой точки зрения недостаточно освещен вопрос, какие цитоскелет-мембранные белки участвуют в образовании и распаде таких связей, а следовательно, и определяют реактивность цитоскелета при температурных и осмотических воздействиях на клетку.

Исходя из предпосылки о важной роли цитоскелетных взаимодействий в механизме устойчивости эритроцитов к постгипертоническому повреждению, проведены исследования по изучению структурных детерминант клеточных объемных изменений, вызванных дегидратацией—регидратацией и действием яда медоносной пчелы (*Apis mellifera*).

Эритроциты получали из донорской крови II (A) группы. Клетки отмывали трижды в физиологическом растворе (0,15 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4). Плазму, лейкоцитарную пленку и надосадки удаляли путем аспирации. Упакованный осадок эритроцитов разводили физиологическим раствором до 60%-го гематокрита и хранили при температуре 0 °С. Объем эритроцитов измеряли методом спектроскопии импульсов сопротивления (СИС) [4].

Дегидратацию эритроцитов проводили в растворах сахарозы и NaCl (1,4 и 1,5 М) в течение 15 мин при 37 °С. Регидратацию проводили двумя способами: 1) разбавлением гипертонического раствора 10 мМ трис-буфером или 0,15 М NaCl. После 10 мин экспозиции клеток в регидратирующей среде проводили центрифугирование при 1200 g, в результате которого получали осадок регидратированных клеток; 2) переносом аликвоты дегидратированных клеток в раствор 0,15 М NaCl для измерения объемов регидратированных клеток и теней методом СИС. В некоторых регидратирующих растворах присутствовали катионы Ca^{2+} в концентрации 50 мМ.

Для изучения объемных изменений эритроцитов при действии яда пчелы (ЯП) эритроциты помещали в физиологический раствор, содержащий в своем составе различные концентрации яда пчелы. После перемешивания в течение 5 с методом СИС измеряли динамику изменения объемов образовавшихся при действии ЯП теней. Белые тени эритроцитов получали по методу [6]. Электрофоретическое разделение белков теней проводили в полиакриламидном геле (градиент пористости 4–22%) с использованием додецилсульфата Na согласно методу [9].

Изучение объемов регидратированных клеток показало зависимость этого параметра от значений ионной силы сред дегидратации и регидратации. В таблице

Изучение объемов и процента ПЛ эритроцитов, регидратированных в 0,15 М NaCl. Количество опытов $n=15$

Среда дегидратации	1,4 М сахароза		1,5 М NaCl	
Катионные добавки	-	30 мМ Ca^{2+}	-	30 мМ Ca^{2+}
V/V ₀	1,31±0,06	1,08±0,03	1,42±1,01	1,43±1,00
ПЛ, %	24±3,51	61±4,28	82±2,02	75±3,42

представлено отношение значения среднего объема регидратированных эритроцитов (V) к значению среднего объема нативных клеток (V_0). Можно отметить, что значительное увеличение ПЛ эритроцитов, дегидратированных в электролитной среде (NaCl), по сравнению с клетками, дегидратированными в неэлектролитной среде (сахароза), коррелирует с тенденцией к увеличению объемов регидратированных в NaCl эритроцитов. Дивалентные катионы Ca^{2+} , присутствующие в регидратирующем растворе, активируют ПЛ эритроцитов. Однако это справедливо лишь для тех случаев, когда клетки экспонировались в гипертоническом растворе сахарозы. Если дегидратация эритроцитов проводилась в гипертонии NaCl, катионы Ca^{2+} оказывали слабое ингибирующее влияние на уровень ПЛ.

Полученные величины ПЛ эритроцитов, регидратированных в присутствии Ca^{2+} , не находят своего отражения в тенденции изменения клеточных объемов. Эти расхождения могут свидетельствовать о том, что постгипертоническое повреждение не является следствием простого "нагружения" клеток на стадии дегидратации, т. е. коллоидно-осмотическим. Набухание эритроцитов в этом случае возникает как вторичный процесс по отношению к формированию поры, проницаемой для гемоглобина. Данные [1, 20, 21] свидетельствуют о наличии характерных признаков системы сайт-связываемый агент в условиях модифицирующего влияния катионов Ca^{2+} на ПЛ.

Было показано, что влияние дивалентных катионов Ca^{2+} на ПЛ и на мелиттин-индуцированный гемолиз эритроцитов имеет общие особенности [21]. Предположение, что одинаковые структурные компоненты мембранно-цитоскелетного комплекса участвуют в механизме формирования эндогенных и экзогенных мембранных дефектов, определило цель последующих экспериментов. Мелиттин, являющийся прямым гемолитиком, составляет 50% сухой массы яда пчелы [10]. В связи с этим в описываемых исследованиях был использован яд пчелы. В процессе проведения экспериментов установлено, что

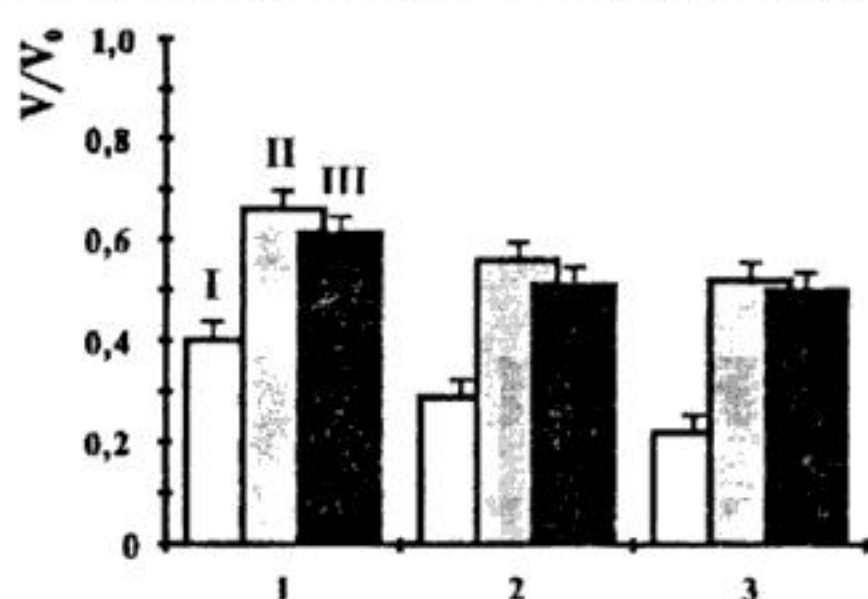


Рис. 1. Изменение объемов теней нативных эритроцитов при инкубации с ядом пчелы: I — на 1 мин; II — 30 мин, III — при повторной добавке яда, составившей 1,5 мкг/мл. Начальные концентрации яда, мкг/мл: 1 — 0,5; 2 — 0,75; 3 — 1,5

действие ЯП на нативные эритроциты не только является гемолизирующим, но и выражается в концентрационно-зависимом уменьшении объемов клеток (рис. 1). Причем метод спектроскопии импульсов сопротивления, позволяющий измерять объемы как клеток, так и теней, показал восстановление объемов эритроцитов, прогемолизировавших с ЯП через некоторый промежуток времени (до 30 мин). Повторная добавка ЯП не приводила к объемным сдвигам объектов. Это может свидетельствовать о рецепторном характере взаимодействия ЯП с мембраной эритроцитов.

Установленная особенность влияния ЯП на нативные эритроциты (сжатие—набухание) находит аналогию в характере объемных изменений эритроцитарных клеток в цикле дегидратации—регидратации. С этой точки зрения интересным было изучение структур мембранно-цитоскелетного комплекса, опосредующих яд-индуцированное сжатие клеток.

Оказалось, что уменьшение объемов эритроцитов при действии ЯП ингибируется хлорпромазином (рис. 2, б). Вещества фенотиазинового ряда, к которым относится хлорпромазин, являются блокаторами кальмодулин-зависимых клеточных процессов [2]. Также было установлено, что мелиттин из ЯП может непосредственно взаимодействовать с кальмодулином [12]. Учитывая, что кальмодулин влияет на сократимость цитоскелета эритроцитов [11], мож-

но обсуждать механизм показанного яд-индуцированного сжатия как кальмодулин-зависимого. В пользу этого говорит установленный факт активации сжатия эритроцитов с ЯП в присутствии $0,1 \text{ mM}$ концентрации Ca^{2+} (рис. 2, а). Другие дивалентные катионы — Zn^{2+} , Mg^{2+} — не обладали таким специфическим действием (данные не представлены).

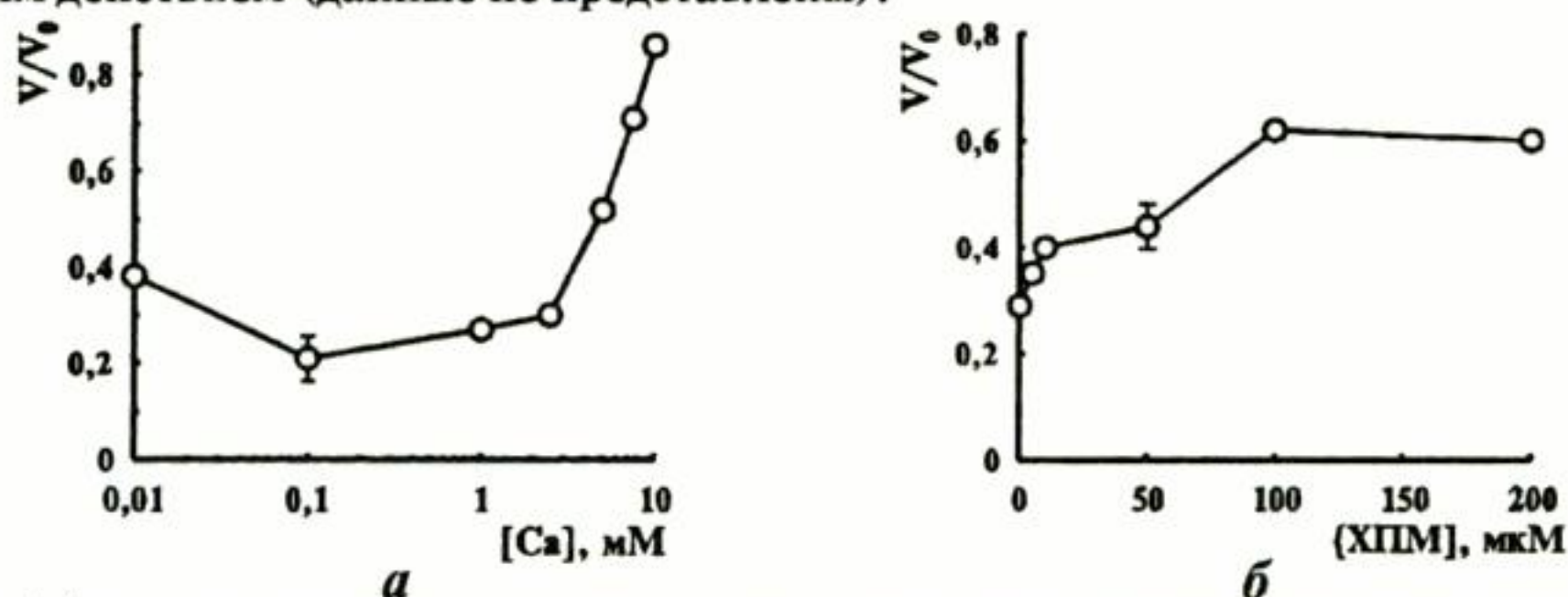


Рис. 2. Активирование яд-индуцированного сжатия нативных теней эритроцитов: а — катионами Ca^{2+} ; б — ингибирование сжатия хлорпромазином. Концентрация яда в гемолитической пробе — $1,5 \text{ мкг/мл}$

Известно, что мелиттин-индуцированный гемолиз эритроцитов ингибируется катионами Ca^{2+} [5, 17]. Сложившееся представление о механизме ингибирования мелиттинового лизиса клеток выражается в том, что блокирующие его вещества не влияют на формирование гемолитической поры. Эффект предотвращения трансмембранной проницаемости обусловлен электростатическими взаимодействиями с отрицательно заряженной поверхностью поры [17]. При концентрациях катионов, недостаточных для полного экранирования поры, развивается гемолиз эритроцитов. Однако специфическое действие катионов Ca^{2+} на яд-индуцированное сжатие клеток предполагает не только отсутствие блокирования гемолитической поры, но и проникновение катиона во внутриклеточную среду и взаимодействие с цитоскелетными элементами. Одним из элементов цитоскелета, регуляция конформации и взаимодействий которого осуществляется Ca^{2+} , является кальмодулин [2].

Изучение реактивности регидратированных эритроцитов к сжатию с ЯП показало отличия этого параметра от контроля (рис. 3). Активирующее влияние Ca^{2+} на яд-индуцированное сжатие наблюдалось как для нативных, так и для регидратированных клеток. Однако степень уменьшения объемов регидратированных эритроцитов была выше. Особенно это было характерно для клеток, дегидратированных в сахарозе и регидратированных в присутствии катионов Ca^{2+} . В этих же условиях дегидратации—регидратации происходила активация ПЛ эритроцитов (таблица). Увеличение реактивности к действию ЯП регидратированных таким образом эритроцитов можно объяснить поступлением Ca^{2+} во внутриклеточную среду в момент регидратации. Однако нельзя было отвергать предположение, что модифицирующее влияние дегидратации на мембранно-цитоскелетный комплекс касается таких его структурных компонентов, которые регулируют величину объемных изменений эритроцитов. Было проведено электрофоретическое разделение мембранных белков нативных и регидрати-

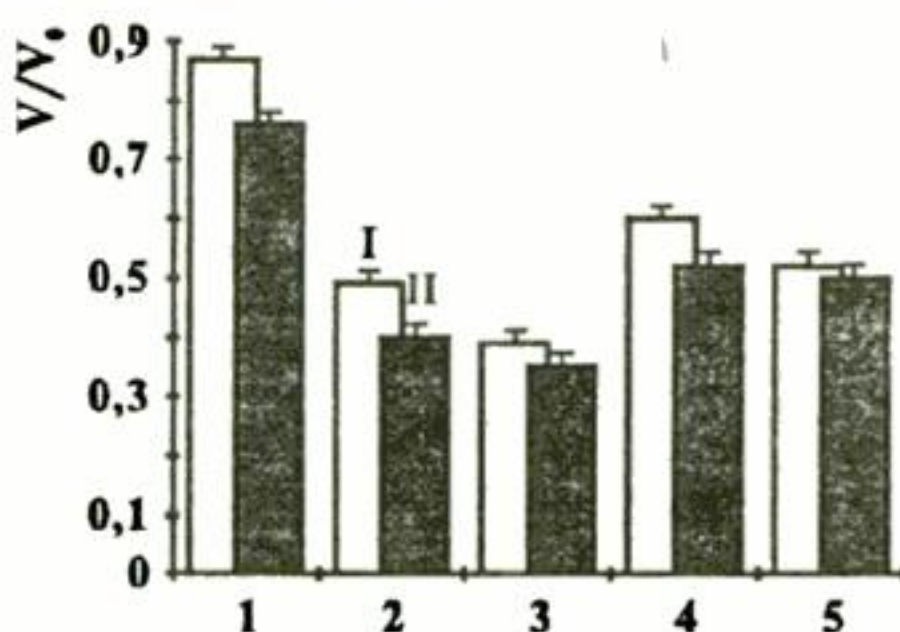


Рис. 3. Изменение объемов теней эритроцитов с $1,5 \text{ мкг/мл}$ яда пчелы: 1 — нативных; 2, 3, 4, 5 — регидратированных. Дегидратация эритроцитов: 2, 3 — в $1,4 \text{ M}$ сахарозе; 4, 5 — в $1,5 \text{ M}$ NaCl. Регидратация эритроцитов: 2 — в $0,27 \text{ M}$ сахарозе; 3 — в $0,27 \text{ M}$ сахарозе+ $0,15 \text{ M}$ NaCl; 4 — в $0,15 \text{ M}$ NaCl; 5 — в $0,3 \text{ M}$ NaCl. Гемолитическая проба: I — без катионов Ca^{2+} , II — в присутствии $0,1 \text{ mM}$ Ca^{2+}

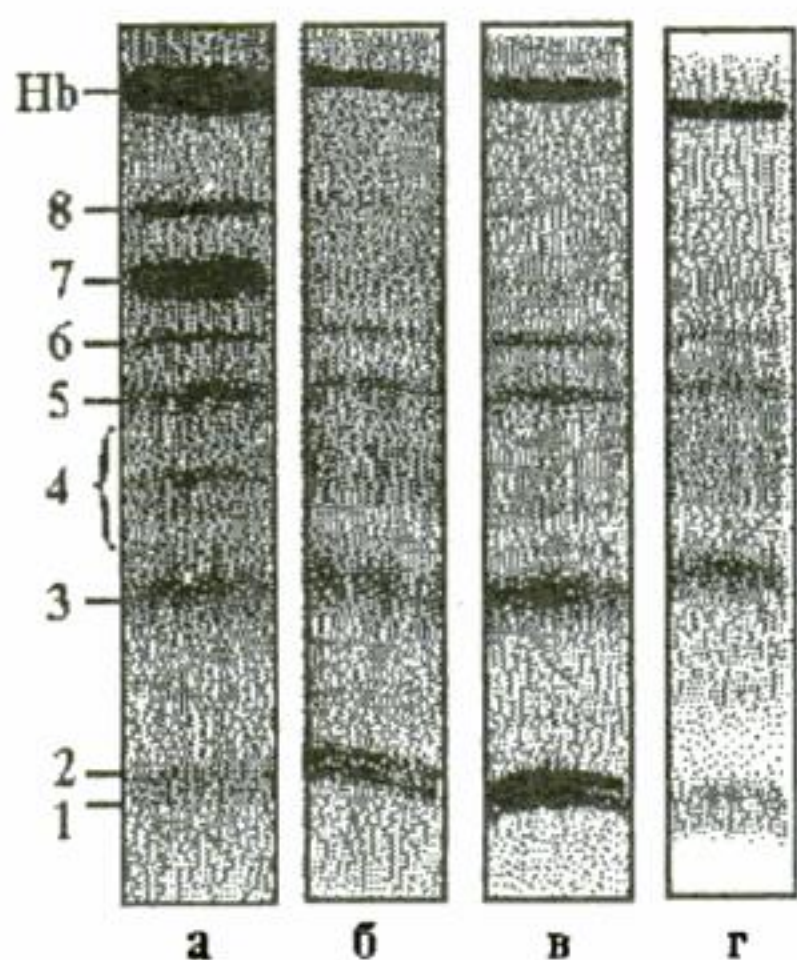


Рис. 4. Электрофоретическое разделение мембранных белков эритроцитов: а — нативных; б, в, г — регидратированных в присутствии 50 мМ Ca^{2+} . Дегидратация эритроцитов в 1,4 М сахарозе, регидратация в 0,27 М сахарозе+0,15 М NaCl. Цифрами обозначены окрашенные полосы, соответствующие белкам: 1, 2 — спектрин; 3 — белок полосы 3; 4 — белки зоны 4; 5 — актин; 6 — белок полосы 6; 7 — белок полосы 7; 8 — белок полосы 8; Hb — гемоглобин

ющих реагентов диссоциирует на мономеры с массой 18 кДа и мигрирует в зону 8. Интересен тот факт, что этот белок имеет сильное сродство к катионам Ca^{2+} , который может вызывать его конформационные изменения и агрегацию [16]. Вероятно, что использованные в опыте условия обработки клеток (регидратация в присутствии Ca^{2+}) модифицировали характер ассоциации и конформационный статус этого белка таким образом, что он становился чувствительным к изменению ионной силы растворов при получении белых теней.

Необходимо отметить, что в экспериментах по изучению белкового состава мембран эритроцитов, инкубированных с ЯП, было показано также отсутствие белка полосы 8 на гелях, из чего авторы [3] сделали заключение о возможном участии этого белка в связывании яда с плазматической мембраной эритроцитов.

Таким образом, наличие сходных реакций минорных белковых компонентов цитоскелет-мембранного комплекса эритроцитов на такие воздействия среды, которые сопровождаются изменением объемов клеток, указывает на сходство механизма регуляции клеточных ответов при повреждении эндогенного (ПЛ) и экзогенного (яд-индуцированный лизис) характера. Об этом свидетельствует наличие общих закономерностей в формировании гемолитической поры и блокировании ее дивалентными катионами при постгипертоническом и мелиттин-индуцированном лизисе [21].

Обобщая экспериментально полученные результаты и литературные данные, можно отметить следующие особенности объемных изменений эритроцитов при дегидратации—регидратации и яд-индуцированном лизисе:

дегидратация—регидратация и действие ЯП приводят к сходным тенденциям клеточных объемных изменений (сжатие—набухание);

регуляция объемных изменений эритроцитов при регидратации и действии ЯП опосредуется Ca^{2+} -зависимыми метаболическими процессами, в которых принимают участие кальмодулин и белок полосы 8;

рованных эритроцитов. Визуальный анализ белковых треков на гелях показал, что дегидратация—регидратация не оказывает влияния на основные структурные белки цитоскелета и мембраны — спектрин, актин, белок полосы 3 (рис. 4, а–г). Установлено некоторое уменьшение количества белка полосы 7 в регидратированных объектах. Однако этот эффект недостаточно стабильно воспроизводился в опытах, причем в некоторых случаях наблюдался и в мембранах нативных эритроцитов. Уменьшение количества белка полосы 7 в мембранах, полученных при отмывке в низкоионных условиях, отмечали также [8].

Другим специфичным эффектом, который наблюдался лишь в мембранах регидратированных с Ca^{2+} клеток, являлось уменьшение или отсутствие белка полосы 8 на электрофореграммах (рис. 4, б, в, г). В экспериментах по выделению и очистке белка полосы 8 [16] было установлено, что данный белок с молекулярной массой 68 кДа при электрофоретическом разделении в присутствии расшива-

существуют одинаковые изменения белкового состава мембран эритроцитов, обработанных ЯП и дегидратацией—регидратацией.

В криобиологическом аспекте белки цитоскелета являются точкой приложения осмотических и температурных воздействий. Конформационное и функциональное состояние белков мембранно-цитоскелетного комплекса находится под контролем разнообразных регуляторных механизмов клетки, включающих сигнальные системы (аденилатциклазу, вторичные “мессенджеры”) и минорные белки. При дегидратации—регидратации эритроцитов и их яд-индуцированном лизисе причины, вызывающие объемные изменения клеток, различные. Однако реактивность эритроцитов к тому или иному виду воздействия должна определяться особенностями их структурной организации и исходным метаболическим статусом. Полученные данные могут свидетельствовать, что механизмы ответов эритроцитов при дегидратации—регидратации и яд-индуцированном лизисе включают в себя Ca^{2+} -зависимые реакции цитоскелета, в которых принимают участие кальмодулин и белок полосы 8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пателарос С.В. Исследование катион-зависимого лизиса регидратированных эритроцитов крови человека // Пробл. криобиологии. – 1994, № 4. – С. 31–37.
2. Пермяков Е.А. Парвальбумины и родственные кальций-связывающие белки. – М.: Наука, 1985. – 191 с.
3. Руденко С.В., Семенченко А.Ю. Изменение объема эритроцитов и спектра мембранных белков, индуцированное мелиттином, фосфолипазой A_2 и пчелиным ядом // Биохимия. – 1995. – 60, № 5. – С. 734–745.
4. Akeson S.P., Mel H.C. Deformability and other rheological interactions of red blood cells in electronic cell sizing // Biorheology. – 1986. – 23. – P. 1–15.
5. Bashford C.L., Rodrigues L., Pasternak C.A. Protection of cell against membrane damage by haemolytic agents: divalent cations and protons act at the extracellular side // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – 983. – P. 54–64.
6. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. – 1971. – 10, № 12. – P. 2606–2517.
7. Farrant J., Morris G.J. Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury // Cryobiology. – 1973. – 10, № 2. – P. 134–140.
8. Fowler V.M., Bennett V. Tropomyosin: a new component of the erythrocyte membrane skeleton // Progr. Clin. Biol. Res. – 1984. – P. 47–55.
9. Gorg A., Postel W., Weser J. et al. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of urinary proteins // Science tools. – 1985. – 32, № 1. – P. 5–9.
10. Haberman E. Bee and wasp venom // Science. – 1972. – 117, № 28. – P. 314–322.
11. Haest C.W.M. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic membrane domains // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – № 4. – P. 331–352.
12. Itakura M., Iio T. Static and kinetic studies of calmodulin and melittin complex // J. Biochem. – 1992. – 112, № 2. – P. 183–191.
13. Line S.C., Derick L.H., Duguet M.A., Palek J. Separation of the lipid bilayer and the membrane skeleton during discocyte echinocyte transformation of human erythrocyte ghosts // J. Cell. Biol. – 1989. – 49, № 2. – P. 358–366.
14. Liu S.L., Derick L.N., Palek J. Dependence of the permanent deformation of red blood cell membranes on spectrin dimer-tetramer equilibrium: Implication for permanent membrane deformation of irreversibly sickled cells // Blood. – 1993. – 81. – P. 522–528.
15. Lovelock J.E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing // Biochim. Biophys. Acta. – 1953. – 10. – P. 414–426.
16. Mizukami H., Bartnicki D. E., Chaplin L. Band 8 protein of human erythrocyte membrane: another Ca^{2+} -binding protein // Progr. Clin. Biol. Res. – 1984. – P. 47–55.
17. Pasternak C.A., Alder G.M., Bashford C.L. et al. Cell damage by viruses, toxins and complement: Common features of pore-formation and its inhibition by Ca^{2+} // Biochem. Soc. Symp. – 1985. – 50. – P. 247–264.
18. Pegg D.E. Red cell volume in glycerol/sodium chloride/water mixtures // Cryobiology. – 1984. – 21. – P. 234–239.
19. Pegg D.E., Diaper M.P. On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes // Biophys. J. – 1988. – 54, № 3. – P. 471–488.
20. Rudenko S.V. Influence of cations on the inhibition of posthypertonic hemolysis of erythrocytes // Cryo-Letters. – 1994. – 15. – P. 33–40.

21. Rudenko S.V., Patelaros S.V. Cation-sensitive pore formation in rehydrated erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta. – 1995. – 1235. – P. 1–9.
22. Svoboda K., Schmidt C.F., Branton D., Block S.M. Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton // Biophys. J. - 1992. – 63, № 3. – P. 784–793.
23. Williams R.J., Takahashi T. Erythrocyte metastability: Microscopic observation of thermal shock hemolysis // Cryo-Letters. – 1984. – 5, № 2. – P. 111–116.
24. Woolgar A.E., Morris G.J. Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on post-hypertonic haemolysis of human red blood cells // Cryobiology. – 1973. – 10. – P. 82–86.

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

Поступила 06.02.96

Г.А.БОЖОК

СТРУКТУРНІ ДЕТЕРМІНАНТИ ЗМІН ОБ'ЄМУ ЕРИТРОЦИТІВ В УМОВАХ ПОСТГІПЕРТОНІЧНОГО ЛІЗИСУ, ЯКИЙ БУВ ВИКЛИКАНИЙ ОТРУТОЮ БДЖОЛИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Представлені результати досліджень, які свідчать про деякі подібні особливості об'ємних змін еритроцитів людини в циклі дегідратації-регідратації та при дії отрути бджоли. У цих випадках виявлені також структурні детермінанти об'ємних змін, які у певній мірі аналогічні. На основі аналізу досліджень та літературних даних обговорюється можливість участі спільних Ca^{2+} -залежних механізмів чутливості клітин до пошкоджень ендogenous (постгіпертонічний лізис) та екзогенного (лізис з отрутою бджоли) характеру.

G.A.BOZHOK

STRUCTURAL DETERMINANTS OF THE VOLUME CHANGES IN RBC DURING POSTHYPERTONIC AND VENOM-INDUCED LYSIS

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

The report presents the results of the investigations, which testify to certain similar peculiarities of the volume changes in the human RBC in a dehydration-rehydration cycle and after the action of bee venom. The authors determined the structural determinants of the volume changes in both cases, which are to some extent similar. On the basis of the review of the authors' own studies and the data available in the literature a possible involvement of the common Ca^{2+} -dependent mechanisms of the cell resistance to the injury of the endogenous (posthypertonic lysis) and exogenous (venom-induced lysis) nature is discussed.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 615.387:611.018.51

Н.С.Пушкарь, **А.Ф.Тодрин**

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕРХБЫСТРЫХ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТОГРЕВА ЭРИТРОМАССЫ

Описаны способы и устройства для сверхбыстрых замораживания и отогрева мелкодисперсных клеточных суспензий, представлены результаты экспериментов по замораживанию-отогреву эритромаcсы с различными концентрациями криопротекторов. Показано, что описанные способы и устройства дают возможность криоконсервировать эритроциты как при небольших концентрациях криопротекторов типа ПВП или сахарозы, так и без криопротектора при сверхвысоких скоростях охлаждения и нагрева в любых количествах и в стерильных условиях.

В настоящее время криоконсервирование клеточных суспензий, в частности эритромаcсы, при криогенных температурах производится с использованием криопротекторов, предохраняющих клетки от гибели при замораживании [1]. Однако необходимо заметить, что ни один криопротектор не обеспечивает стопроцентное выживание консервированных клеток или их полную пригодность для трансфузии. При использовании любого криопротектора большая или меньшая часть клеток погибает. В зависимости от продолжительности и условий экспозиции все криопротекторы могут оказывать на клетки

губительное воздействие [1, 2]. К тому же почти все криопротекторы перед переливанием необходимо удалять из суспензии с помощью неоднократной отмывки, так как они токсичны для организма. Сохранность клеток определяется только после отмывки их от криопротектора.

Имеются данные [8], что можно замораживать биообъекты без криопротектора, однако для этого необходимо, чтобы скорость охлаждения была порядка 10^4 К/с, что может быть достигнуто при охлаждении образца, минимальный размер которого не превышает 0,3 мм. Предполагается, что при таких скоростях охлаждения внутриклеточное содержимое должно не кристаллизоваться, а переводиться в аморфное состояние. Однако до недавнего времени такое ультрабыстрое понижение температуры считалось нереальным при замораживании объемов эритроцитов, необходимых для переливания [3].

Необходимо отметить, что образцы, имеющие аморфную структуру, особенно подвержены кристаллизации при нагреве. Избежать кристаллизацию в таких образцах можно лишь при сверхбыстром (несколько тысяч градусов в секунду) повышении температуры [7].

Неоднократно предпринимались попытки замораживать биообъекты без криопротектора, однако либо предлагаемые способы не позволяли замораживать большие объемы [4, 9], либо не обеспечивали стерильных условий при замораживании [5]. Нам удалось разработать способы и устройства, позволяющие замораживать и отогревать эритроциты со сверхвысокими скоростями охлаждения и нагрева в больших объемах в стерильных условиях.

Способ замораживания заключается в том, что в цилиндрический контейнер, установленный вертикально в емкости с жидким азотом, вводится вращающийся диск, совершающий возвратно-поступательное движение вдоль оси контейнера. На вращающийся диск во время его движения вверх подается суспензия эритроцитов, которая под действием центробежной силы распыливается на капли (распыление вращающимся диском позволяет получить капли размером до 30 мкм). Капли, срываясь с кромки диска, попадают на поверхность контейнера и замерзают. Замерзшие капли сбрасываются с поверхности контейнера и попадают в специальный сборник. После этого процесс распыления повторяется, что позволяет каждый раз замораживать капли эритроцитов на чистой высокотеплопроводной поверхности, а объем замораживаемого материала в одном эксперименте ограничивается только объемом сборника, который может быть любым.

Следует отметить, что эритроциты без постоянного перемешивания с течением времени оседают. Это приводит к изменению теплофизических характеристик по высоте столба суспензии, в результате чего невозможно получить одинаковые скорости охлаждения для всего замораживаемого объема. Поэтому клетки с помощью центрифугирования отделяются от внеклеточной среды, а непосредственно перед распылением они смешиваются. Для реализации данного способа было разработано и изготовлено устройство, схема которого представлена на рис. 1.

Эритроциты, предварительно отделенные от остальных элементов крови центрифугированием, помещают в дозатор 6, внеклеточную среду — дозатор 7. Клетки и внеклеточная среда по трубопроводам 9 поступают в смеситель 8, после заполнения которого подача

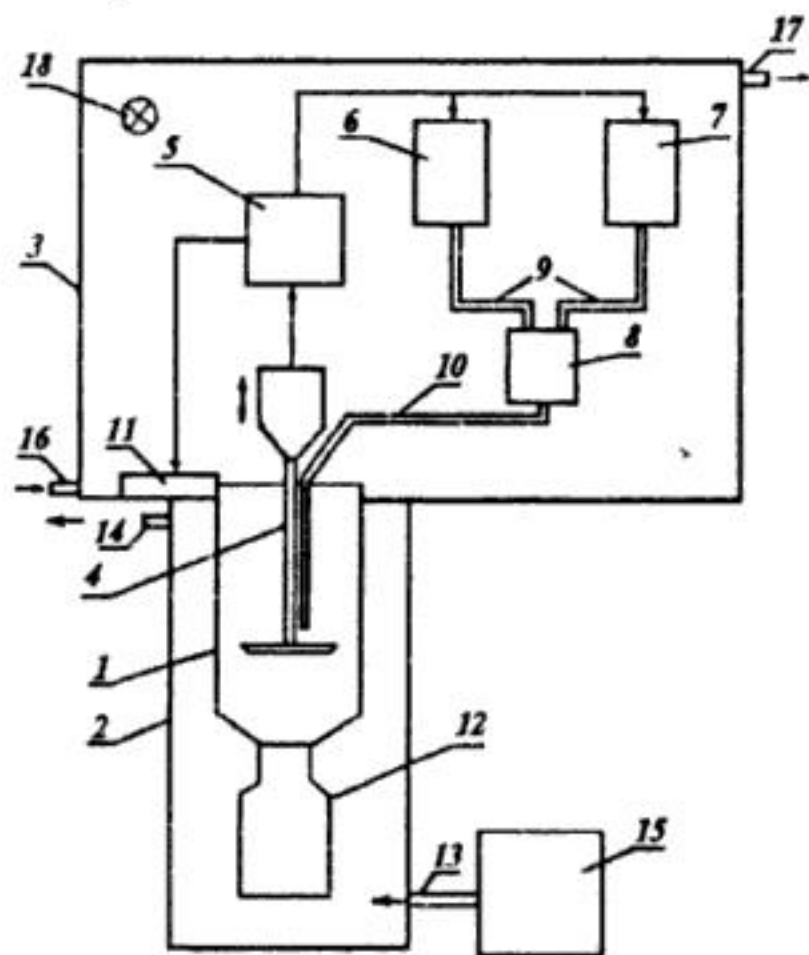


Рис. 1. Схема устройства для замораживания клеточных суспензий распылением

жидкостей прекращается, а корпус 3 герметично закрывается и заполняется инертным газом или теплыми парами азота через патрубок 16, вытесняя из него воздух через патрубок 17 для предотвращения конденсации влаги в контейнере 1, затем включается источник ультрафиолетового излучения 18. После этого включают систему 15 подачи криоагента, подавая через патрубок 13 криоагент в термостатированную емкость 2, отработанный криоагент выводится через патрубок 14. Одновременно в смесителе 8 осуществляется постоянное перемешивание эритроцитов с внеклеточной средой. После охлаждения контейнера 1 включается распылитель 4 биообъекта. Когда распылитель 4 достигает нижней точки движения, прерыватель 5 включает дозаторы 6 и 7 системы подачи биообъекта, которые подают эритроциты и внеклеточную среду в определенных пропорциях в смеситель 8, откуда уже перемешанная эритро-масса вытесняется и по трубопроводу 10 подается на диск распылителя 4. Под действием центробежной силы эритро-масса распыляется на капли, которые затвердевают на поверхности контейнера 1. После достижения распылителем 4 верхней точки зоны распыления прерыватель 5 отключает дозаторы 6 и 7 системы подачи биообъекта, прекращая подачу эритро-массы на распыли-тель 4, и одновременно включает приспособление 11 для съема эритро-массы, замороженной в виде гранул, со стенок контейнера 1. Полученные гранулы поступают в грануло-сборник 12. Затем цикл распыления и замораживания по-вторяется.

Для реализации данного способа нами было разработано и изготовлено устройство, схема которого представлена на рис. 2.

Рис. 2. Схема устройства для размораживания гранул

Во всех проведенных экспериментах параметры отогрева оставались постоянными: расход гранул — $0,3 \text{ см}^3/\text{с}$; частота вращения стакана — 500 об/мин; температура стенки стакана — 40°C . Для экспериментов использовалась консервированная донорская кровь со сроками хранения $2 \div 6$ сут при температуре 4°C , которая перед экспериментом центрифугировалась при 3000 об/мин в течение 10 мин, надосадов удалялся, после чего оставался эритроконцентрат с показателем гематокрита $0,82 \div 0,85$.

Варьирование скорости охлаждения осуществлялось изменением размера капли и скорости ее полета в момент попадания на поверхность контейнера. Это достигалось изменением частоты вращения распыливающего диска, его диаметра, расхода распыливаемой жидкости, диаметра контейнера.

Поскольку непосредственно измерить скорость охлаждения замораживаемых капель невозможно, средняя скорость охлаждения определялась теоретически по методике, предложенной в [6], а сохранность клеток — по относительному гемолизу спектрометрическим способом. Перед исследованием на гемолиз клетки не отмывались.

Для замораживания эритроцитов в качестве внеклеточных жидкостей применялись плазма крови, изотонический и гипертонические растворы NaCl, а также их смеси с различными криопротекторами: сахарозой, ПЭО-1500, ПВП молекулярной массой 12500 (таблица).

Результаты экспериментов

Внеклеточная среда	Показатель гематокрита, %	Средняя скорость охлаждения, К/с	Гемолиз, %
Эритроконцентрат	82	5500	$41,5 \pm 3$
	20	2600	$52,5 \pm 4$
	20	5700	$28,5 \pm 3$
Плазма	40	5600	$29,7 \pm 2,1$
	20	10700	$43,2 \pm 4,3$
	20	115000	70 ± 7
0,9 % NaCl	20	2800	$47,4 \pm 3,7$
	20	6400	$29,2 \pm 1,7$
	20	10250	$43,2 \pm 3,6$
	20	112000	$81,7 \pm 5,3$
1,2 % NaCl	20	18000	24 ± 2
3:2 0,9 % NaCl: 1,5 М сахарозы	20	25800	$11 \pm 1,2$
3:2 0,9 % NaCl: 1,5 М сахарозы	20	9500	$16,5 \pm 2,5$
10 % ПЭО-1500	30	8500	25 ± 2
15 % ПЭО-1500	30	14500	$17,3 \pm 1,7$
30 % ПЭО-1500	30	16000	3 ± 1
10 % ПВП	30	8400	$14,3 \pm 1,8$

Как видно из результатов экспериментов, достигнут максимум сохранности эритроцитов, замороженных без криопротектора, при скоростях охлаждения порядка 6000 К/с. Что же касается эритроцитов, замороженных с криопротектором, то видно, что максимальное защитное действие на клетки при сверхвысоких скоростях охлаждения оказывает ПЭО-1500 с начальной концентрацией 30 %. При этом надо заметить, что при данных скоростях охлаждения, в отличие от [4], ПВП с начальной концентрацией 10 % оказался более эффективным, чем 10 %-й раствор ПЭО-1500.

Были также проведены исследования сохранности эритроцитов, замороженных без криопротектора, после двукратной их отмывки от свободного гемоглобина с помощью изотонического раствора NaCl. Так, после отмывки замороженных эритроцитов с начальным гемолизом 63 % были получены клетки с гемолизом 5 %, а при начальном гемолизе 30 % конечный гемолиз не превышал 2 %.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать вывод, что описанные выше способы и устройства дают возможность криоконсервировать эритроциты в больших объемах без применения криопротекторов, а также в присутствии небольших концентраций криопротекторов типа ПВП или сахароза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы криобиологии / Под общ. ред. Н.С.Пушкаря и А.М.Белоуса. – Киев: Наук. думка, 1981. – 608 с.
2. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция // Биохимия мембран. Кн. 3. – М.: Высш. шк., 1987. – 80 с.
3. Виноград-Финкель Ф.Р., Гинзбург Ф.Г., Федорова Л.И. Ультрабыстрое замораживание эритроцитов для их долгосрочного хранения // Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. – М.: Наука, 1967. – С. 322–327.
4. Гальченко С.Е. Особенности криоконсервирования биологических объектов с применением больших скоростей охлаждения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1990. – 16 с.
5. Киселев А.Е., Подольский М.В., Смирнова Л.И. и др. Ультрабыстрое замораживание крови человека в виде гранул и изучение ее серологических свойств // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1971. – № 8. – С. 27–31.
6. Клименко А.В., Колосов М.Ю., Пеньков Ф.М. Замораживание капель на подложке // Теплофизика высоких температур. – 1988. – 26, № 1. – С. 131–136.
7. Пушкар Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. – Киев: Наук. думка, 1977. – 285 с.
8. Пушкар Н.С., Капрельянц А.С., Панков Е.Я. Ультраструктура клетки при низких температурах. – Киев: Наук. думка, 1978. – 144 с.
9. Dempsey G.P., Bullivant S. A copper block method for freezing non-cryoprotected tissue to produce ice-crystal-free regions for electron microscopy // J. Microscopy. – 1976. – 106. Pt. 3. – P. 251–260.

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

Поступила 27.07.95

М.С.ПУШКАР, О.Ф.ТОДРИН

ДОСЛІДЖЕННЯ НАДШВИДКИХ ЗАМОРОЖУВАННЯ Й ВІДІГРІВАННЯ ЕРИТРОМАСИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Описані способи та пристрої для надшвидких заморожування й відігрівання дрібнодисперсних клітинних суспензій, наведені результати експериментів по заморожуванню-відігріванню еритромаси в різними концентраціями криопротекторів. Показано, що наведені способи та пристрої дають можливість криоконсервувати еритроцити як з малими концентраціями криопротекторів типу ПВП або сахароза, так і без криопротектора при надвисоких швидкостях охолодження та нагрівання в будь-яких кількостях та стерильних умовах.

N.S.PUSHKAR, A.F.TODRIN

A STUDY OF THE SUPRARAPID FREEZING AND THAWING OF THE ERYTHROMASS

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

The authors describe the methods and means of the suprarapid freezing and thawing of finely dispersed cell suspensions, and present the results of the experiments on freeze-thawing of the erythromass with various concentrations of cryoprotectants. The given means and methods are shown to provide for cryopreservation of RBC both under low concentrations of the cryoprotectants of a PVP- or sucrose type, and without a cryoprotectant at suprahigh rates of cooling and heating in the required amounts and under sterile conditions.

УДК 615.361.36.014.413:577.117:57.043

Б.П.Сандомирский, С.Е.Гальченко, Л.Н.Тыныныка

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ НАТИВНЫХ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ ТКАНИ ПЕЧЕНИ НОВОРОЖДЕННЫХ И ПОЛОВОЗРЕЛЫХ СВИНЕЙ

Изучался уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) по накоплению малонового диальдегида (МДА) в нативных и криоконсервированных фрагментах ткани печени новорожденных и половозрелых свиней в зависимости от скоростей охлаждения и времени экспонирования пече-

ночных фрагментов с криопротекторами. На основании экспериментальных данных сделаны выводы о том, что уровень ПОЛ зависит от времени экспонирования печеночных фрагментов с криопротекторами различных концентраций (ПЭО-400, ПЭО-1500 и ДМСО) и скорости охлаждения. Показано, что уровень ПОЛ нативных фрагментов ткани печени меньше всего активируется при использовании ДМСО и ПЭО-1500 и времени эквilibрации не более чем 15 мин при комнатной температуре, а криоконсервированных фрагментов ткани печени — при использовании ДМСО и ПЭО-1500 и скорости охлаждения 100 °С/мин.

Известно, что процессам перекисного окисления липидов принадлежит существенная роль в регуляции метаболизма мембранных липидов, изменении физико-химических свойств и проницаемости мембран в физиологических условиях. Соотношение между содержанием кислорода и активностью систем продуцирования активных форм кислорода определяет запуск дальнейшего разветвления цепных свободнорадикальных реакций в системе ПОЛ [1, 2, 4].

Проявлению повреждающего действия свободных радикалов и перекисных соединений препятствует антиоксидантная система, основная роль в которой принадлежит антирадикальным и антиперекисным ферментам. Таким образом, имеется четкая корреляция между “мощностью” антиоксидантной системы и уровнем ПОЛ [5].

Уровень ПОЛ является одним из важнейших тестов на степень повреждения клеток биообъекта, в данном случае фрагменты ткани печени новорожденных и половозрелых свиней, которые могут использоваться в клинике в составе биологически активных фильтров при экстракорпоральной очистке крови, что позволяет существенно расширить арсенал средств лечения токсических состояний различного происхождения [6].

Цель данного исследования — определение уровня ПОЛ в нативных и криоконсервированных фрагментах ткани печени новорожденных и половозрелых свиней в зависимости от применяемых скоростей охлаждения, криопротекторов и их концентрации. Поиск оптимальных режимов криоконсервирования и подбор соответствующего криопротектора необходимы для получения относительной сохранности криоконсервированных фрагментов печени, пригодных для клинического применения.

Следует отметить, что большое количество работ посвящено изучению морфологической сохранности ткани печени после контакта с криопротекторами, различных скоростей охлаждения, а также всестороннему исследованию изолированных клеток печени — гепатоцитов [1, 4]. Выделение гепатоцитов — довольно трудоемкий и сложный процесс, помимо этого много клеток гибнет при выделении, нарушаются целостность клеточной мембраны, ее барьерные функции. Особенно трудно выделить большое количество клеток для клинических целей из крупного органа, например печени свиньи, а также получить стерильный материал, пригодный для использования в клинической практике. Эти трудности могут быть преодолены, если использовать при криоконсервировании фрагменты печени, которые можно получить без применения ферментов, а стерильный материал — из печени новорожденных поросят и, возможно, половозрелых свиней.

Объектом исследования в данной работе служат фрагменты ткани печени новорожденных и половозрелых свиней. Забор ткани печени половозрелых свиней осуществлялся на Харьковском мясокомбинате, а новорожденных поросят — в операционной вивария ИПКиК НАН Украины. Ткань печени измельчали на фрагменты, размером 1–3 мм, при комнатной температуре в физиологическом растворе, фрагменты отмывали несколько раз в десятикратном объеме этого же раствора.

В работе были использованы следующие криопротекторы: полиэтиленоксид-400 (ПЭО-400), полиэтиленоксид-1500 (ПЭО-1500), диметилсульфоксид (ДМСО) в конечных концентрациях 20 и 10%. Замораживание проводили с

помощью программного устройства для замораживания биологических объектов.

После экспонирования нативных фрагментов ткани печени новорожденных и половозрелых свиней в растворах криопротекторов в течение 15 и 30 мин при комнатной температуре определяли уровень ПОЛ по накоплению малонового диальдегида, который оценивали также в пробах, отогретых на водяной бане при температуре 37 °С после 15-минутной экспозиции и замораживания со скоростями охлаждения 1, 10 и 100 °С/мин.

МДА определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [7]; ТБК-окрашенные продукты спектрофотометрически — по максимальному поглощению на длине волн 532–535 нм. Количество МДА определяли в пересчете на массу ткани печени в нмоль/г ткани печени.

Т а б л и ц а 1

Уровень ПОЛ по накоплению МДА (нмоль/г ткани) в фрагментах ткани печени новорожденных поросят в зависимости от скоростей охлаждения и используемых криопротекторов

Криопротекторы	Время экспонирования, мин		Скорость охлаждения, °С/мин		
	15	30	1	10	100
ПЭО-400 20%-й	9,0±1,1	10,4±0,3	30,5±1,4	29,1±0,7	29,4±0,7
ПЭО-400 10%-й	8,1±0,2	9,7±0,4	25,2±0,8	23,5±0,3	20,3±0,1
ПЭО-1500 20%-й	7,2±0,4	8,2±0,5	20,8±0,6	20,3±0,3	19,6±0,1
ПЭО-1500 10%-й	7,1±0,4	8,0±1,3	18,7±0,2	18,1±0,8	15,4±0,1
ДМСО 20%-й	5,9±1,4	6,0±0,8	17,8±0,2	17,5±0,8	14,4±0,8
ДМСО 10%-й	6,1±0,3	6,1±0,2	16,7±0,1	15,9±0,2	14,0±0,2
NaCl 0,9%-й	6,7±0,7	7,2±1,1	29,1±0,1	25,5±0,1	27,4±0,1

Как видно из табл. 1 и 2, уровень ПОЛ имеет тенденцию к снижению уровня МДА при увеличении скорости охлаждения. Общий уровень ПОЛ в фрагментах ткани печени новорожденных поросят несколько выше уровня ПОЛ в фрагментах ткани печени половозрелых свиней. Можно предположить, что система ПОЛ взрослых животных более адаптирована к различным повреждающим факторам внешней среды, чем новорожденных. Возможно, поэтому из табл. 1 и 2 видна небольшая разница уровней ПОЛ в печени животных.

Т а б л и ц а 2

Уровень ПОЛ по накоплению МДА (нмоль/г ткани) в фрагментах ткани печени половозрелых свиней в зависимости от скоростей охлаждения и используемых криопротекторов

Криопротекторы	Время экспонирования, мин		Скорость охлаждения, °С/мин		
	15	30	1	10	100
ПЭО-400 20%-й	7,5±0,2	9,0±1,4	23,5±0,1	20,8±1,3	18,7±1,3
ПЭО-400 10%-й	6,7±5,9	8,4±1,3	19,9±1,0	19,0±1,4	17,2±1,3
ПЭО-1500 20%-й	5,9±1,1	7,1±0,4	15,9±1,0	15,1±1,4	13,4±1,1
ПЭО-1500 10%-й	5,5±0,8	7,0±0,9	15,1±1,1	15,0±0,1	12,0±1,0
ДМСО 20%-й	4,5±1,0	5,0±1,1	13,3±1,1	12,6±1,3	10,9±1,1
ДМСО 10%-й	4,8±0,7	5,1±0,5	12,9±0,1	11,6±1,2	10,5±1,1
NaCl 0,9%-й	5,5±0,1	6,9±0,4	20,0±1,1	17,9±1,2	17,1±1,4

Минимум активации ПОЛ в фрагментах ткани печени наблюдается при скоростях охлаждения порядка 100 °С/мин при использовании криопротектора ДМСО, а также при замораживании без криопротектора.

Уровень ПОЛ в нативных фрагментах ткани печени новорожденных и половозрелых свиней после экспонирования с криопротекторами с увеличением времени экспонирования повышается незначительно. По данным, приведенным в табл. 1 и 2, оптимальное время хранения фрагментов ткани печени при комнатной температуре без криопротекторов не более 15 мин. Раствор ДМСО в концентрациях 10 и 20 % проявляет слабые антиоксидантные свойства. Так, уровень МДА составляет 5,5±0,1 нмоль/г ткани печени у взрослых и 6,7±0,7 — у новорожденных животных через 15 мин хранения при комнатной температуре, а в аналогичных условиях в 10%-м растворе ДМСО — 4,8±0,7 и 6,1±0,3 нмоль/г соответственно. Растворы криопротекторов ПЭО-

1500 в концентрации 20 % и ПЭО-400 в концентрации 10 и 20 % способствуют ПОЛ в фрагментах ткани печени, что снижает их уровень жизнеспособности.

Имеются сведения [3], что ПЭО-400 в 10 %-й концентрации угнетает активность НАД Н-дегидрогеназного комплекса дыхательной цепи. Кроме того, данный криопротектор в той же концентрации оказывает токсическое действие на митохондрии клеток печени крыс при инкубации их с ПЭО-400 более чем 15 мин при температуре 4 °С [3]. Поэтому при криоконсервировании фрагментов ткани печени с 10 и 20 %-ми растворами ПЭО-400 и 20 %-м раствором ПЭО-1500 повышают уровень ПОЛ будет не только процесс криоконсервирования, но и сами криопротекторы. Следовательно, при криоконсервировании данного биообъекта наиболее эффективно использовать криопротектор ДМСО в концентрациях 10 и 20 % и ПЭО-1500 в концентрации 10 %.

Таким образом, сравнивая уровни ПОЛ фрагментов ткани печени новорожденных и половозрелых свиней в зависимости от времени экспонирования с криопротекторами ПЭО-400, ПЭО-1500 и ДМСО в концентрациях 10 и 20 % выявлено, что наиболее приемлемо использовать 10 и 20 %-е растворы ДМСО и 10 %-й раствор ПЭО-1500. Вместе с тем уровень ПОЛ отражает только один аспект повреждения и защиты клеток и тканей при криоконсервировании. Поэтому для разработки технологии криоконсервирования указанных выше биообъектов необходимы дальнейшие исследования с привлечением как специфических, так и интегральных методик оценки их жизнеспособности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. – М.: Медицина, 1989. – 398 с.
2. Булгаков В.Г., Биленко М.В. Состояние перекисного окисления липидов и ферментной системы транспорта кальция в саркоплазматическом ретикулуме ишемизированного миокарда // Бюл. экспер. биол. – 1988. – № 9. – С. 272–274.
3. Гордиенко А.Д., Кудкоцева Е.В. Изучение функционального состояния митохондрий в клеточных суспензиях, экспонированных в растворе криопротектора // Криобиология и криомедицина. – 1980. – Вып. 7. – С. 32–34.
4. Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор. – Новосибирск: Наука, 1988. – 192 с.
5. Ломоносова Е.Е., Пикулев А.Т., Кучеренко В.Т. Механизм антиоксидантной защиты печени крыс при действии ароматических аминов // Биохимия. – 1992. – 57, № 7. – С. 1077–1082.
6. Сандомирский Б.П., Исаев Ю.И. Оценка жизнеспособности криоконсервированных трансплантатов // Ожоговая болезнь: Докл. VI Респ. науч. конф. "Патогенез и лечение термических поражений и их последствий у детей" (Харьков, октябрь 1988 г.): Тез. докл. – Киев: Наук. думка, 1988. – С. 206–207.
7. Whiteley G.S., Fuller B.J., Hobbs K.E. Lipid peroxidation on liver tissue specimens stored at subzero temperatures // Crio-Letters. – 1992. – 13. – № 2. – P. 83.

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

Поступила 14.03.96

Б.П.САНДОМИРСКИЙ, С.Є.ГАЛЬЧЕНКО, Л.М.ТИНИНИКА

ВПЛИВ КРІОПРОТЕКТОРІВ НА РІВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ НАТИВНИХ І КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ НОВОНАРОДЖЕНИХ ТА СТАТЕВОЗРІЛИХ СВИНЕЙ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м.Харків

Вивчався рівень перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) по накопиченню малонового діальдегіду (МДА) в нативних та кріоконсервованих фрагментах тканини печінки новонароджених і статевозрілих свиней в залежності від швидкостей охолодження та часу експонування печіночних фрагментів з кріопротекторами. На основі експериментальних даних були зроблені висновки, що рівень ПОЛ залежить від часу експонування печіночних фрагментів з кріопротекторами різних концентрацій (ПЕО-400, ПЕО-1500 і ДМСО) і швидкості охолодження. Показано, що рівень ПОЛ нативних фрагментів тканини печінки менш за все активується при використанні ДМСО і ПЕО-1500 та експонуванні не більше 15 хв при кімнатній температурі, а кріоконсервованих — при використанні ПЕО-1500 і ДМСО та швидкості охолодження 100 °С/хв.

THE EFFECT OF CRYOPROTECTANTS ON THE LEVEL OF LIPID PEROXIDATION OF THE NATIVE AND CRYOPRESERVED FRAGMENTS OF THE HEPATIC TISSUE OF THE NEWBORN AND MATURE MICE

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

The level of lipid peroxidation (LPO) was studied by the values of accumulation of malondialdehyde (MDA) in the native and cryopreserved fragments of hepatic tissue of the newborn and mature mice depending on the rates of cooling and time of exposure of hepatic fragments with cryoprotectants. The experimental data thus obtained make it possible to conclude on the LPO level to be dependent on the time of exposure of hepatic fragments with cryoprotectants in various concentrations (PEO-400, PEO-1500 and DMSO) and cooling rate. The LPO level of the native fragments of the hepatic tissue was shown to be in the least activated at room temperature by DMSO and PEO-1500, when the time of exposure was not more than 15 min, and that of the cryopreserved fragments of the hepatic tissue – when applying DMSO and PEO-1500, and the cooling rate of 100 °C.

УДК 57.043

**О.В.Желтоножко, В.В.Желтоножко, В.В.Черепанов,
А.Ю.Петренко**

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМЫ ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕЙ КАМЧАТКИ ЧАВЫЧИ (*ONCORHYNCHUS TSHAWYTSCHA*) И КЕТЫ (*ONCORHYNCHUS KETA*)

Результаты криоконсервации спермы тихоокеанских лососей Камчатки — кеты и чавычи — под защитой диметилсульфоксида (ДМСО) показывают их чувствительность к режиму замораживания и составу среды. Режим криоконсервации, включающий экспоненциальное замораживание до -25 °C с последующим переносом в жидкий азот и отогрев на водяной бане при температуре 40 °C, оказался малоэффективным для сохранения функциональной активности спермиев лососей. Замораживание со скоростью 30 °C/мин до -70 °C позволяет сохранить значительное число подвижных клеток. Лучшие результаты получены на модифицированной среде Штайна, при использовании которой активность деконсервированных спермиев составляла около 35 %. Результаты экспериментов не выявили существенных видовых различий в криоустойчивости спермы данных видов лососей.

Тихоокеанские лососи, нерестящиеся в реках Камчатского полуострова (чавыча, кета, горбуша, нерка, кижуч, сима), имеют большое народнохозяйственное значение, но находятся под угрозой исчезновения в результате ухудшения экологической обстановки и нерационального использования их рыбодобывающими предприятиями. В связи с этим целесообразно в кратчайшие сроки попытаться сохранить генетическое разнообразие естественных популяций этих видов. Наиболее эффективным решением этой задачи является сбор коллекции образцов половых продуктов максимального количества популяций рыб и их криоконсервация.

Методология криоконсервации спермы рыб и, в частности тихоокеанских лососей, за рубежом достаточно хорошо разработана, так как они представляют национальное достояние таких развитых стран, как США, Япония и Канада. Установлено, что наиболее эффективным криопротектором для спермы лососей является диметилсульфоксид в концентрации 7–15 % [1, 2, 4], что сперму следует смешивать с криозащитной средой в соотношении 1:2 — 1:4 [1, 4]. Наибольший процент подвижных спермиев (до 40 %) получен при замораживании в парах жидкого азота со скоростью около 30 °C /мин [4] или погружении в сухой лед [1] с последующим переносом и хранением в жидком азоте [1, 4]. Однако данные, полученные на тихоокеанских лососях в других странах, не могут быть автоматически перенесены на рыб, нерестящихся в реках Камчатки, так как они отличаются ареалом обитания, спектром питания и проч.

Цель настоящей работы — изучение влияния различных сред и скоростей замораживания на функциональную активность спермы некоторых видов тихоокеанских лососей (кеты и чавычи) после криоконсервации.

Объектом исследования служила сперма двух видов тихоокеанских лососей — кеты (*Oncorhynchus keta*) и чавычи (*Oncorhynchus tshawytscha*), выловленных в реках Камчатки Паратунка и Быстрая (левый приток р. Большой Западного побережья) соответственно. Образцы спермы объемом 15–30 мл были получены непосредственно после вылова самцов и доставлены в лабораторию на льду в течение 1 ч. Активность (процент подвижных клеток в поле зрения микроскопа) и время движения спермиев определяли визуально под микроскопом. Окончанием времени движения считали остановку 90 % подвижных спермиев. В качестве среды активации использовали: 1) воду, взятую из реки обитания данных производителей; 2) 10 мМ раствор NaHCO_3 ; 3) среду Хаммора, содержащую 75 мМ мочевины, 100 мМ NaCl , 2 мМ CaCl_2 .

Для криоконсервации сперму лососей смешивали медленно по каплям в течение 5 мин в соотношении 1:4 с одной из трех криозащитных сред: 1) модифицированная среда Отта и Хортон [4] (125 мМ NaCl , 5 мМ KCl , 1,5 мМ CaCl_2 , 50 мМ NaHCO_3 , 3 мМ NaH_2PO_4 , 1,7 мМ MgSO_4), 5 мМ фруктозы); 2) модифицированная среда Штайна [1] (130 мМ NaCl , 5 мМ KCl , 20 мМ NaHCO_3 , 5,5 мМ глюкозы); 3) сахарозо-солевая среда [5]. Все среды содержали 12,5 % ДМСО и 12,5 % яичного желтка. Таким образом, после смешивания со спермой их конечная концентрация составляла 10 %. Суспензию клеток эквilibрировали в криозащитной среде в течение 20 мин, разливали в полиэтиленовые ампулы объемом 1 мл и замораживали по одной из программ: режим 1 — в парах жидкого азота до температуры -70°C с последующим погружением в жидкий азот; режим 2 — в спиртовой бане, охлажденной до температуры -25°C , эквilibрировали в ней 20 мин и переносили в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при 40°C . Скорость охлаждения и отогрева контролировали с помощью термопары.

Активность нативной спермы кеты и чавычи не отличалась при использовании различных активаторов. Процент подвижных клеток в любой из исследованных сред составлял $81 \pm 3\%$. Вместе с тем время движения спермы зависело как от состава активатора, так и от вида рыб (рисунок). В речной воде движение спермы вначале было чрезвычайно интенсивным, а затем быстро замедлялось. Время движения спермы в речной воде было минимальным, видимо, вследствие быстрого истощения энергии на первой стадии.

Учитывая, что физико-химические свойства воды в различных реках в разные времена года варьируют в широких пределах, ее нельзя использовать в качестве стандартного раствора для определения функциональной активности спермы. В 10 мМ растворе NaHCO_3 характер движения был схожим с характером движения в речной воде, хотя время движения было достоверно больше. Время движения спермы кеты и чавычи в указанных выше средах не отличалось (рисунок). В активаторе Хаммора первая стадия интенсивного движения была выражена в меньшей степени: спермии двигались линейно с приблизительно равной скоростью достаточно долго. Это позволило наиболее точно определить время движения спермы и выявить видовые различия в этом показателе — сперма кеты в активаторе Хаммора двигалась дольше, чем сперма чавычи (63 ± 5 и 44 ± 3 с соответственно, рисунок). В связи с этим сравнение па-

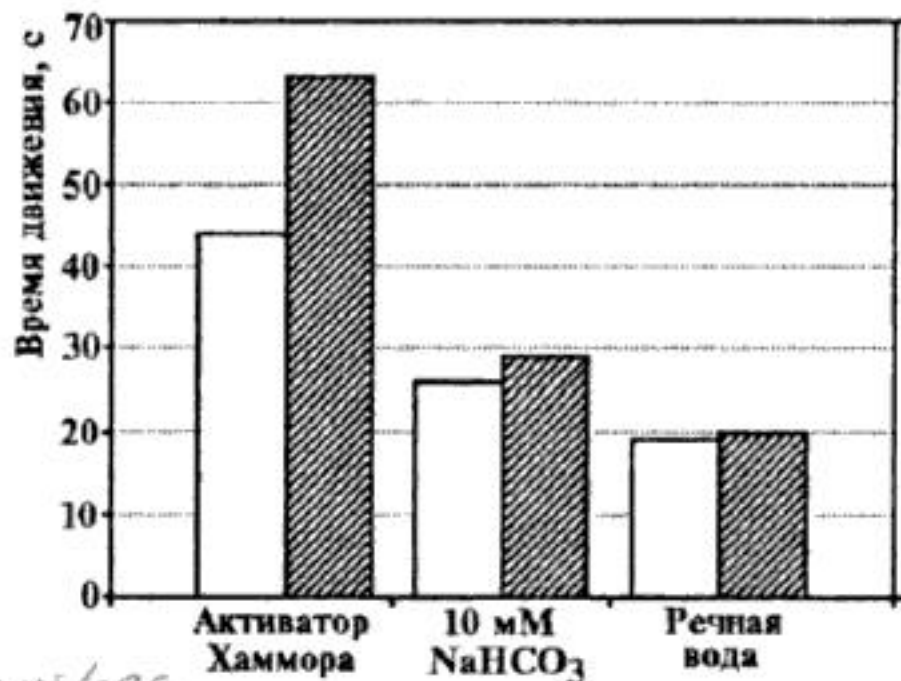


Рисунок. Время движения спермы чавычи и кеты в различных активаторах

раметров спермы (процент подвижности клеток и время движения) после эквilibрации с криозащитными средами и криоконсервации проводили в активаторе Хаммора.

Основой для криозащитной среды выбрали сахарозо-солевую среду, широко используемую для криоконсервации суспензий клеток животных [3, 5], а также среды, предложенные Оттом, Хортоном [4] и Штайном [1] для низкотемпературного консервирования спермы лососей. Медленное смешивание спермы с криозащитными средами Штайна и сахарозо-солевой не снижало число подвижных клеток. После смешивания со средой Отта и Хортон активностъ спермиев чавычи снижалась на 14 %, а кеты — на 10 %. Вместе с тем разбавление спермы этой средой приводило к значительному увеличению времени ее движения. Механизм этого явления требует дальнейших исследований. Последующая эквilibрация спермы в исследованных криозащитных средах в течение 20 мин не вызывала изменений в показателях функциональной активности обоих видов лососей (таблица).

Влияние сред и режимов замораживания на активностъ и время движения спермы кеты и чавычи

Режим замораживания	Среда Отта		Среда Штайна		Сахарозо-солевая среда	
Условия замораживания	Активностъ, %	Время движения, с	Активностъ, %	Время движения, с	Активностъ, %	Время движения, с
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>						
До замораживания *	70±2	88±2	80±2	41±6	78±4	40±7
Режим 1 **	27±2	43±7	33±2	35±4	24±2	23±4
Режим 2	3±1	5±1	5±2	7±3	2±1	5±2
<i>Oncorhynchus keta</i>						
До замораживания	73±6	98±9	78±3	64±4	74±8	63±5
Режим 1	30±5	39±4	35±4	38±2	27±4	28±4
Режим 2	6±2	9±2	8±3	10±2	4±1	6±2

Примечание. * — после эквilibрации с криозащитной средой; ** — режимы охлаждения описаны выше.

Замораживание спермы кеты и чавычи проводили по двум режимам. В основе одного из них лежит быстрое экспоненциальное охлаждение до умеренно низких температур: $-23 \div -25^{\circ}\text{C}$ с остановкой до переноса в жидкий азот, служащей для снижения переохлаждения и/или плавления внутриклеточных кристаллов льда (в случае их образования), а также для выравнивания осмотического давления во внутри- и внеклеточных средах. Этот режим хорошо зарекомендовал себя при криоконсервации клеток животных [3, 5], однако на сперме до настоящего времени он испытан не был. Другой режим, наоборот, наиболее часто применяется для криоконсервации спермиев рыб и, в частности, лососевых [1, 4]. Он может быть осуществлен охлаждением над поверхностью азота в течение 5 мин или погружением суспензии в сухой лед перед перенесением в жидкий азот, но в любом случае обеспечивает охлаждение до -70°C со скоростью около $30^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Режим криоконсервации, включающий экспоненциальное замораживание до -25°C с последующим переносом в жидкий азот и отогрев на водяной бане при 40°C , оказался малоэффективным для сохранения функциональной активности спермиев лососей: подвижность клеток после криоконсервации в любой среде не превышала 11 % для кеты и 7 % для чавычи. При использовании этого режима время движения спермиев в активаторе было в 8–10 раз меньше, чем в контроле.

Криоконсервация, включающая замораживание до -70°C со скоростью $30^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, позволила сохранить значительное число подвижных клеток. При этом активностъ деконсервированных спермиев чавычи в средах Отта и Хортон, Штайна и сахарозо-солевой составляла 39, 41 и 30 % соответственно по отношению к значениям, полученным до замораживания (после эквilibрации с криопротектором). Хотя доля подвижных клеток после криоконсерва-

ции в первых двух средах при таком сравнении достоверно не отличается, но по отношению к нативным клеткам среда Штайна демонстрирует почти 2-кратное преимущество: она позволяет сохранить 40 % подвижных клеток, а среда Отта и Хортон — 21 %. Близкие результаты по количеству подвижных клеток были получены и на сперме кеты.

Время движения спермы чавычи после криоконсервации по режиму 1 в средах Штайна, Отта и Хортон значительно не отличалось, а в сахарозо-солевой — было значительно меньше. Однако, учитывая, что эквilibрация в среде Отта и Хортон в 2 раза увеличивает время движения спермиев, криоконсервация в среде Штайна и по этому показателю более предпочтительна (изменения во времени движения клеток до и после криоконсервации минимальны — около 15 %, а в среде Отта и Хортон — 50 %). Время движения спермиев кеты после криоконсервации в различных средах отличается в меньшей степени, чем спермы чавычи, но носит сходный характер. Интересно отметить, что выявленное в работе более продолжительное движение нативной спермы кеты по сравнению с чавычей не проявляется после криовоздействия (таблица).

Таким образом, методические подходы (среда и режим охлаждения), хорошо зарекомендовавшие себя на клетках животных, не могут быть перенесены на сперму рыб. Если время движения деконсервированных спермиев в сахарозо-солевой среде хоть и было минимальным, но сравнимо с другими средами, то режим охлаждения, включающий остановку в зоне умеренно низких температур, не позволил сохранить значительное количество подвижных спермиев. Последний вопрос вызывает определенный интерес для криобиологии, поскольку его решение позволит выяснить природу различной криочувствительности биологических объектов. Термограммы охлаждения показывают три существенных различия в рассматриваемых режимах: 1) скорости охлаждения до точки кристаллизации; 2) температуре кристаллизации; 3) скорости замораживания в температурном диапазоне $-30 \div -70^\circ\text{C}$. Значительная роль скорости замораживания в криоповреждении спермы лососей кажется маловероятной, поскольку в недавно проведенной работе [2] показано, что сперма рыб может быть частично сохранена при скоростях охлаждения после температуры кристаллизации от 20 до $154^\circ\text{C}/\text{мин}$. Термограммы режимов охлаждения, используемых в данной работе, показывают, что кристаллизация при охлаждении в парах азота происходит при $-10 \div -12^\circ\text{C}$, а при охлаждении в спиртовой бане — при -17°C . Варьирование температуры остановки от -12 до -30°C с последующим погружением в жидкий азот позволило снизить величину переохлаждения среды, но не привело к положительному результату — в препаратах встречались лишь одиночные подвижные клетки, следовательно, температура -25°C является оптимальной температурой остановки, поскольку позволяет сохранить до 12 % подвижных спермиев. Приведенные результаты позволяют предположить, что сперма рыб чувствительна к физико-химическим факторам, реализующимся на первом этапе охлаждения, и, следовательно, методический подход, включающий быстрое охлаждение в спиртовой бане до умеренно низких температур с остановкой до перенесения в жидкий азот, не является перспективным для низкотемпературной консервации спермы тихоокеанских лососей.

Приведенные исследования показывают, что криоконсервация спермы тихоокеанских лососей, включающая их эквilibрацию с криозащитной средой, содержащей в качестве криопротектора 10 % ДМСО, замораживание со скоростью $30^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -70°C , хранение при -196°C и отогрев на водяной бане при 40°C , позволяет получить деконсервированную сперму кеты и чавычи с активностью до 35 %. Лучшие результаты получены на модифицированной среде Штайна. Результаты экспериментов не выявили существенных ви-

дових различий в криоустойчивости спермы данных видов тихоокеанских лососей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Штайн Г. Криоконсервация гамет рыб // Пробл. криобиологии. – 1991. № 3. – С. 42–45.
2. Gwo J.C. Cryopreservation of Yellowfin Seabream (*Acanthopagrus Latus*) Spermatozoa (Teleost, Perciformes, Sparidae) // Theriogenology. – 1994. – 41, № 5. – P. 989–1004.
3. McGann, L.E., Farrant, J. Survival of tissue culture cells frozen by a two-step procedure to -196°C . 1. Holding temperature and time // Cryobiology. – 1976. – 13. – P. 261–268.
4. Ott A.G. Horton H.F. Fertilization of steelhead trout (*Salmo quairdneri*) eggs with cryopreserved sperm // J. Fish. Res. Board. Can. – 1971. – 28, № 12. – P. 1915–1918.
5. Petrenko A.Yu., Grischuk V.P., Roslyakov A.D. et al. Survival, metabolic activity and transport of potassium ions of rat hepatocytes after rapid freeze-thawing under protection of dimethylsulfoxide and separation in Percoll density gradient // Cryo- Letters. – 1992. – 13. – P. 87–98.

Камчатский НИИ рыболовства и океанографии,
Петропавловск-Камчатский (Россия)

Поступила 17.09.96

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

О.В.ЖЕЛТОНОЖКО, В.В.ЖЕЛТОНОЖКО, В.В.ЧЕРЕПАНОВ, О.Ю.ПЕТРЕНКО

КРИОКОНСЕРВАЦІЯ СПЕРМИ ТИХООКЕАНСЬКИХ ЛОСОСЕЙ КАМЧАТКИ ЧАВИЧІ (*ONCORHYNCHUS TSHAWYTSCHA*) ТА КЕТИ (*ONCORHYNCHUS KETA*)

Камчатський науково-дослідний інститут риболовства і океанографії, Петропавловськ-Камчатський (Росія)

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Результати криоконсервації сперми тихоокеанських лососей Камчатки — кети і чавичі — під захистом диметилсульфоксиду (ДМСО) показують їх чутливість до режиму заморожування і складу середовища. Режим криоконсервації, який включає експоненціальне заморожування до -25°C з подальшим перенесенням у рідкий азот і відігрівання на водяній бані при температурі 40°C , виявився малоефективним для зберігання функціональної активності спермій лососей. Заморожування зі швидкістю $30^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -70°C дозволяє зберегти значну кількість рухомих клітин. Кращі результати отримані на модифікованому середовищі Штайна, при використанні якого активність деконсервованих спермій складала біля 35 %. Результати експериментів не виявили істотної видової різниці в криостійкості сперми даних видів лососей.

O.V.ZHELTONOZHKO, V.V.ZHELTONOZHKO, V.V.CHEREPANOV, A.YU.PETRENKO

CRYOPRESERVATION OF SPERMIA OF KAMCHATKA PACIFIC SALMONS CHINOOK SALMON (*ONCORHYNCHUS TSHAWYTSCHA*) AND CHUM SALMON (*ONCHORHYNCHUS KETA*)

Kamchatskiy Scientific-Research Institute of Fishery and Oceanography,
Petropavlovsk-Kamchatskiy (Russia)

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

The results of experiments on cryopreservation of the spermia of the Pacific Kamchatka salmon — chum salmon and chinook salmon — under protection of dimethyl sulfoxide (DMSO) testify to their susceptibility to the mode of freezing and composition of the medium. The mode of cryopreservation, which involves exponential freezing down to -25°C with subsequent transfer into liquid nitrogen and thawing on water bath at 40°C , turned out to be poorly effective for the purpose of maintaining the functional activity of the salmon spermia. Freezing with the rate of $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ down to -70°C allows to maintain a considerable amount of motile cells. The best results were produced with a modified Stein medium, the application of which resulted in the activity of the thawed spermia being of 35%. The results of the experiments did not demonstrate any particular species-dependent differences in the cryoresistance of the spermia of the given salmon species.

**Л.В.Львова, С.М.Тымчук, В.К.Рябчун, Е.В.Павленко,
Т.Ф.Стрибуль**

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗ СЕМЯН СОИ, ХРАНИВШИХСЯ ПРИ ОТРИЦАТЕЛЬ- НЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Изучали влияние хранения при отрицательных температурах на морфофизиологические показатели и амилолитическую активность семян двух сортов сои. Было показано наличие изменений, которые в значительной степени обусловлены сортовой специфичностью. Использование предварительной криообработки является нецелесообразным, поскольку увеличивает количество морфофизиологических аномалий.

Важными факторами, определяющими сохранность семян при длительном хранении, особенно в генетических целях, являются влажность и температура. При неблагоприятных условиях хранения наблюдаются изменение ферментативной активности, накопление токсичных продуктов метаболизма, а также хромосомные мутации, которые могут проявляться в виде морфологических аномалий развития [1]. В этой связи представляет определенный интерес изучение некоторых морфофизиологических параметров и амилолитической активности семян сои с различной влажностью, хранившихся в течение длительного времени при отрицательных температурах.

Семена сои сортов Белоснежка и Харьковская-35 урожая 1992 года выдерживали в течение двух лет при температурных режимах: -1 , -20 °C без предварительной криообработки и -20 °C с предварительной криообработкой. Морфофизиологические показатели и амилолитическую активность определяли в пятидневных проростках. Семена проращивали в рулонах фильтровальной бумаги в термостате при температуре 29 °C. Для контроля использовали семена, хранившиеся при комнатной температуре. Лабораторная всхожесть определяет долю проросших семян, при этом учитывается число проростков, у которых длина ростка не менее 0,5 см, а длина главного зародышевого корешка более 1 см. Аномальными считаются проростки, у которых отсутствует либо росток, либо корешок. Активность общей амилазы, α - и β -амилаз определяли в семядолях по методике А.И.Ермакова [3]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по методике Б.А.Доспехова [2].

Анализ экспериментальных данных (табл. 1) показывает, что лабораторная всхожесть контрольных групп семян в значительной степени зависит от влажности семян, но в то же время определяется и сортовой специфичностью, что хорошо видно при сравнении этого показателя для семян Белоснежки и Харьковской-35 с влажностью 4,3 и 4,5% соответственно. В большинстве случаев хранение семян при отрицательных температурах не оказывает значительного воздействия на лабораторную всхожесть. Исключением является некоторое увеличение лабораторной всхожести семян Белоснежки с влажностью 4,3%, хранившихся при температурах -1 и -20 °C, и семян Харьковской-35 с влажностью 5,5%, хранившихся при -20 °C. Следует отметить, что в ряде случаев характер изменения массы сухих проростков отличался от характера изменения лабораторной всхожести в зависимости от температурных режимов хранения.

Предварительная криообработка приводила к значительному увеличению числа слабых проростков, однако, если у Харьковской-35 лабораторная всхожесть снижалась незначительно, то у Белоснежки наблюдалось резкое снижение значения этого параметра, сопровождавшееся увеличением доли проростков с морфологическими аномалиями.

Изменение температурного режима хранения оказывало воздействие не только на морфологические параметры, но и на амилолитическую активность

(табл. 2). Так, хранение семян Харьковской-35 при отрицательных температурах приводило к уменьшению общей амилазной активности независимо от исходной влажности семян. Этот эффект был обусловлен снижением активности α -амилазы, поскольку активность β -амилазы возрастала по сравнению с контролем. У семян Белоснежки изменение общей амилазной активности определялось как температурой, так и влажностью семян. У семян с исходной влажностью 6,9% наблюдалось снижение общей амилазной активности, в то время как при влажности 4,3% этот показатель возрастал. Обнаруженное явление, по всей вероятности, обусловлено генетически детерминированными различиями биохимического состава семян.

Т а б л и ц а 1

Морфофизиологические показатели семян сои

Сорт	Влаж- ность, %	Режим хранения, °С	Лабора- торная всхо- жесть, %	Доля слабых пророст- ков, %	Доля аномаль- ных про- ростков, %	Доля непророс- ших се- мян, %	Масса сухих проростков, г	
							норм.	аном.
Харьковская-35	5,5	Контр.	82,5	3,5	12,5	5,0	30,8	10,4
		-1	76,0	5,5	16,0	8,0	23,2	13,5
		-20	86,5	2,0	11,0	2,5	15,3	9,0
		-20+к/о	78,0	62,5	10,0	12,0	14,8	12,3
Белоснежка	4,5	Контр.	85,0	2,5	10,0	4,5	22,6	7,1
		-1	85,0	2,0	11,0	4,0	20,0	9,1
		-20	82,0	4,0	15,0	3,0	12,3	8,2
		-20+к/о	80,0	70,0	4,0	16,0	16,4	16,4
	6,9	Контр.	76,0	6,5	15,0	9,0	23,8	8,5
		-1	70,0	5,5	22,0	8,5	17,0	8,0
		-20	73,0	4,0	20,0	6,5	16,3	8,7
		-20+к/о	39,0	19,5	52,0	9,0	16,6	10,0
	4,3	Контр.	67,0	3,5	23,5	9,5	17,7	9,1
		-1	72,0	7,0	18,5	9,5	26,6	12,7
		-20	72,5	4,5	19,5	8,0	20,2	9,4
		-20+к/о	33,0	16,0	53,0	14,0	20,0	10,2
НСР 05			0,2	0,6	0,6	1,0	1,4	0,8

Примечание. НСР 05 — наименьшая существенная разница на уровне значимости 0,05; к/о — криообработка.

У семян, подвергнутых криообработке, характер изменения общей амилазной активности определялся исходной влажностью семян, в то время как снижение активности α -амилазы по сравнению с контролем наблюдалось у семян как с высокой, так и с низкой исходной влажностью. Достоверной корреляции амилазной активности с массой проростков не обнаружено, хотя в некоторых вариантах уменьшение амилазной активности сопровождалось снижением массы проростков.

Т а б л и ц а 2

Амилазная активность проростков с морфологическими аномалиями

Сорт	Влаж- ность, %	Амилолитическая актив- ность, мг крахм./мл ферм.	Режим хранения, °С			
			контроль	-1	-20	-20+к/о
Харьковская-35	5,5	Общая	64,00	48,00	58,54	60,00
		α	60,00	45,71	49,76	68,28
		β	4,00	2,29	1,72	4,50
	4,5	Общая	65,33	52,50	60,00	64,74
		α	61,71	45,71	45,37	54,86
		β	3,62	6,79	14,63	9,88
Белоснежка	6,9	Общая	52,00	54,60	57,07	44,21
		α	49,70	36,00	43,90	42,86
		β	2,30	18,60	13,17	1,35
	4,3	Общая	61,67	55,50	54,60	68,52
		α	58,28	52,86	36,00	52,46
		β	3,39	2,64	18,60	16,06
НСР 05			1,4	1,6	0,9	0,8

Сравнительный анализ данных, приведенных в табл. 2 и 3, показал, что основной вклад в общую амилазную активность у нормальных и аномальных проростков вносит α -амилаза. Общая амилазная активность

проростков Харьковской-35 с морфологическими аномалиями была меньше по сравнению с нормальными проростками для всех вариантов хранения, за исключением семян с влажностью 4,5%, хранившихся при -1 °С. У Белоснежки аналогичный эффект наблюдался для α -амилазы, но при этом исключение составляли семена, хранившиеся при -20 °С. Достоверной корреляции между амилолитической активностью и массой проростков не установлено.

Т а б л и ц а 3

Амилолитическая активность нормально развитых проростков

Сорт	Влаж- ность, %	Амилолитическая актив- ность, мг крахм./мл ферм.	Режим хранения, °С			
			контроль	-1	-20	-20+к/о
Харьковская-35	5,5	Общая	70,00	52,50	61,46	63,13
		α	68,11	50,00	52,10	58,29
		β	1,89	2,50	9,36	4,84
	4,5	Общая	68,00	52,50	67,32	71,05
		α	65,14	48,57	55,61	61,71
		β	2,85	3,93	11,71	9,34
Белоснежка	6,9	Общая	53,33	52,50	46,83	48,95
		α	53,14	50,00	43,90	48,00
		β	0,19	2,50	2,93	0,95
	4,3	Общая	61,33	65,10	72,00	61,58
		α	60,00	55,71	70,00	58,29
		β	1,33	9,39	2,00	3,29
НСР 05			1,6	0,8	0,8	0,6

Таким образом, проведенные исследования показали, что изменение морфологических показателей и амилолитической активности семян сои, хранившихся при отрицательных температурах, в значительной мере обусловлено сортовой специфичностью. Использовать предварительную криообработку нецелесообразно, так как она вызывает увеличение количества морфологических аномалий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Данович К.Н., Соболев А.М., Жданова Л.П. и др. Физиология семян. – М.: Наука, 1982. – 318 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1987. – 335 с.
3. Ермаков А.И., Арасимович Н.П., Ярош Н.П. и др. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.

Ин-т растениеводства им. В.Я.Юрьева УААН, г. Харьков

Поступила 13.09.95

Ин-т проблем криобиологии

и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Л.В.ЛЬВОВА, С.М.ТИМЧУК, В.К.РЯБЧУН, Є.В.ПАВЛЕНКО, Т.Ф.СТРИБУЛЬ

МОРФОФІЗІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ТА АКТИВНІСТЬ АМІЛАЗ НАСІННЯ СОЇ, ЯКЕ ЗБЕРІГАЛОСЯ ПРИ НЕГАТИВНИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Інститут рослинництва ім. В.Я.Юр'єва УААН, м. Харків

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчали вплив зберігання при негативних температурах на морфофізіологічні показники та амілолітичну активність насіння двох сортів сої. Було показано наявність змін, які в значній мірі обумовлені сортовою специфічністю. Використовувати попередню криообробку недоцільно, бо вона збільшує кількість морфофізіологічних аномалій.

L.V.LVOVA, S.M.TYUMCHUK, V.K.RYABCHUN, E.V.PAVLENKO, T.F.STRIBYL

MORPHOPHYSIOLOGICAL FEATURES AND ACTIVITY OF AMILASES OF THE SOYBEAN SEEDS, STORED AT NEGATIVE TEMPERATURES

Yuryev Plant Cultivation Institute of the Agrarian Academy of Sciences, Kharkov
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

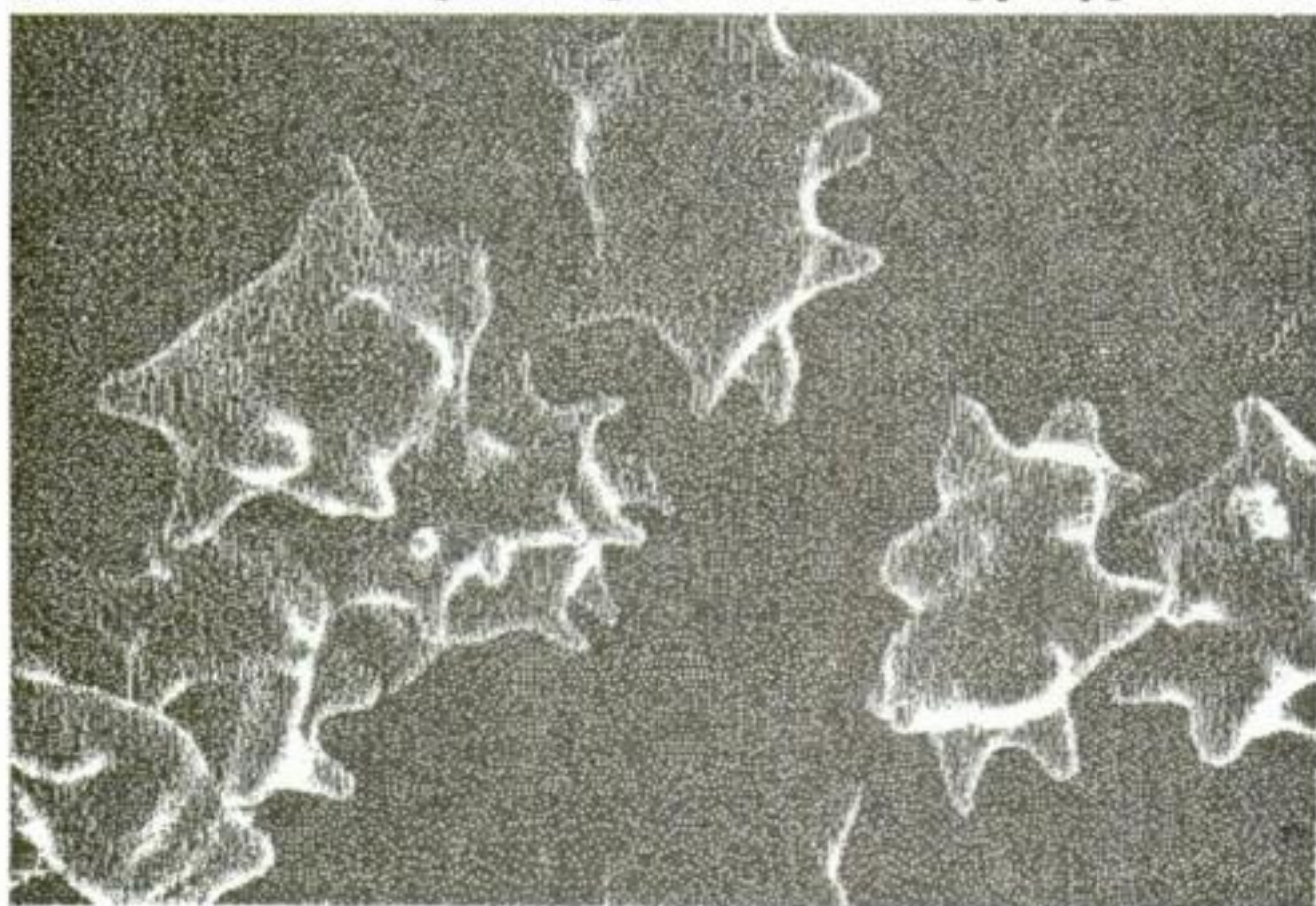
The authors investigated the effect of storage at negative temperatures on the morphofunctional indices and amilalytic activity of the seeds of two soybean species. They managed to observe the changes, which are mainly species-dependent. A preliminary cryotreatment was found ineffective since it increased the amount of the morphological abnormalities.

В.К.Дворцовой, В.В.Кирошка

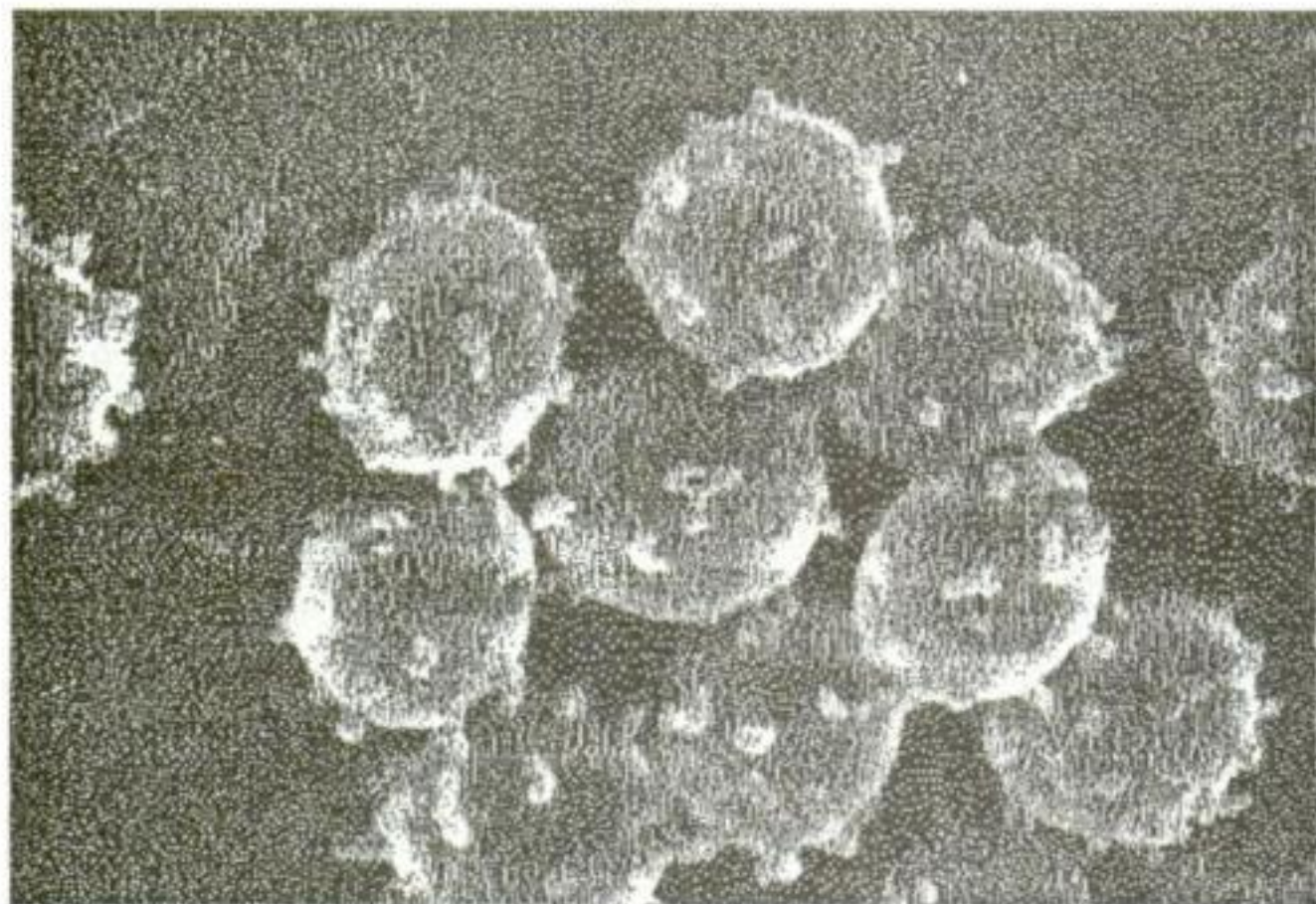
МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ НАСЫЩЕНИИ ВИТРИФИЦИРУЮЩИМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ ПРОНИКАЮЩИХ КРИОПРОТЕКТОРОВ

В работе представлены морфологические изменения эритроцитов, регистрируемые методом электронно-растровой микроскопии, при их насыщении витрифицирующими концентрациями проникающих криопротекторов. Показано, что морфология клеток изменяется по типу кренирования, характер которого зависит от физико-химических свойств криопротекторов. Отмывка от криопротекторов приводит к частичному восстановлению исходной формы.

Особенностью влияния криопротекторов на клетки является их способность изменять водный и электролитный баланс. На начальных этапах обработки клеток криозащитными соединениями имеет место дегидратация, уровень которой зависит от молекулярной массы криопротектора, скорости его проникновения в клетки, способности взаимодействовать со структурными элементами клетки и формировать ассоциаты в свободном объеме растворителя [1, 3, 6]. Осмотическая дегидратация вызывает генерализованную реакцию клеток, которая затрагивает все структурные элементы клетки. На этом



а



б

уровне наиболее информативным параметром клеточного ответа является форма клетки. Влияние криопротекторов на форму клеток не только опосредуется осмотическими механизмами, но может быть прямо связано с непосредственным влиянием этих соединений на липидные и белковые компоненты мембраны и цитоскелета [1, 2, 7, 8].

Объектом исследования служили эритроциты донорской крови человека, которые получали по общепринятым методикам [3]. Морфологические исследования проводили методом растрово-электронной микроскопии. Контрольные эритроциты и эритроциты, отмывые от криопротекторов, препарировали по традиционной методике, основанной на фиксации глута-

Рис. 1. Растрово-электронная микроскопия в присутствии 60%-й концентрации: а — этиленгликоля; б — 1,2-ПД в среде насыщения. Уменьшение при репродуцировании 3/5

ральдегидом [3]. Для препарирования эритроцитов, насыщенных растворами криопротекторов, использовали модифицированный метод фиксации [4]. Криопротекторами служили этиленгликоль (ЭГ) и 1,2-пропандиол (1,2-ПД).

Насыщение эритроцитов криопротекторами проводили ступенчато с шагом 10–20–40–60 % при температуре 4 °С в среде, содержащей 150 мМ KCl, 10^{-7} CaCl₂, 60 мМ сахарозы, 5 мМ фосфатного буфера, $pH = 7,4$; отмывку — ступенчато (60–50–40–30–25–20–15–10–7–5–3–1–0 % ЭГ и 1,2-ПД) при температуре 4 °С средой, содержащей 150 мМ KCl, 10^{-7} CaCl₂ и возрастающие концентрации сахарозы от 60 до 300 мМ.

Установлено, что морфологические изменения эритроцитов, насыщенных витрифицирующими концентрациями ЭГ и 1,2-ПД, носят неодинаковый характер. Общим в характере влияния ЭГ и 1,2-ПД является индукция морфологических изменений в направлении кренирования, что в соответствии с классификацией Бессиса [5] указывает на дегидратирующий характер действия криопротекторов — от дискоцита к кренированной форме (эхиноциту).

Морфологические различия форм эритроцитов очень четко проявляются при действии витрифицирующих концентраций ЭГ и 1,2-ПД (рис. 1). В среде с ЭГ сохраняются кренированные и характерные формы спикул. В то же время 1,2-ПД в 60%-й концентрации индуцирует морфологические изменения совершенно другого типа. В этом случае избыток поверхностной площади распределяется в цилиндрических отростках, которые хотя и соответствуют спикулам, но весьма близки к поверхностным везикулам. Такую форму можно рассматривать как более выраженный вариант перераспределения мембранного материала из спикул в плоские участки между ними. Помимо этого, в 60%-м растворе 1,2-ПД наблюдается исчезновение деформируемого клеточного контура. Клетки приобретают округлую форму, что может отражать наличие “разглаженных” структур при частичном набухании. Однако наиболее важно то, что ни в одном из анализируемых случаев мы не наблюдали появление “гипертонических” уплощенных форм, крайне чувствительных к восстановлению физиоло-

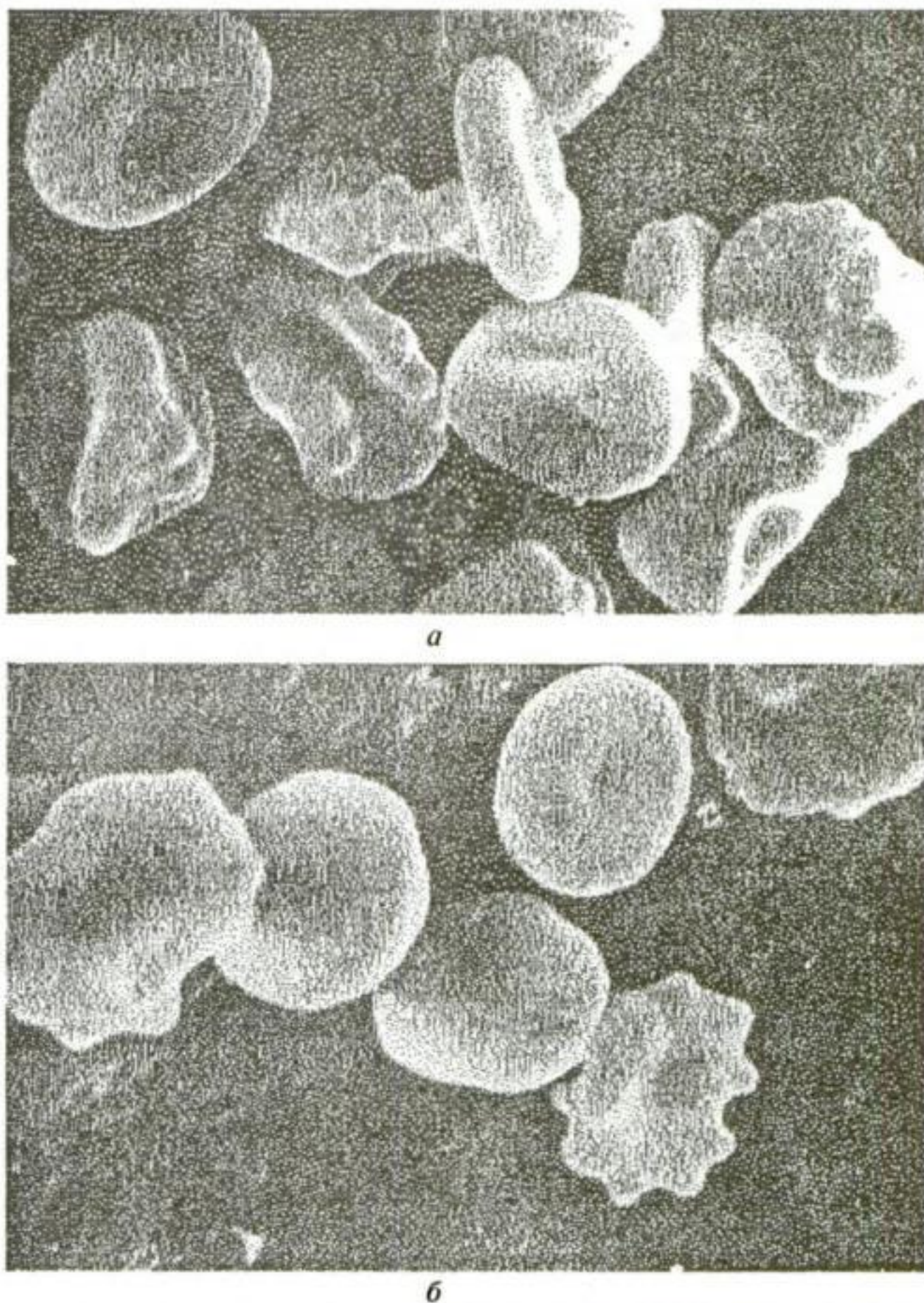


Рис. 2. Растрово-электронная микроскопия эритроцитов: *а* — после ступенчатой отмывки от 60%-х растворов этиленгликоля; *б* — 1,2-ПД растворами, содержащими возрастающие концентрации сахарозы. Уменьшение при репродукции 3/5

гических параметров среды, при которых развивается постгипертонический лизис. Тот факт, что ЭГ и 1,2-ПД индуцируют морфологические изменения, в пределах хотя и различающегося, но определенного кренированного типа, позволяет сделать вывод, что криопротекторы в используемых концентрациях препятствуют резко выраженным структурным изменениям эритроцитов, приводящим к появлению чувствительности к последующим изменениям осмотических и температурных условий среды. Об этом свидетельствуют полученные нами данные по отсутствию гемолиза клеток при их гипотермическом (4 °С) и низкотемпературном (-20 °С) хранении в течение 7 сут.

Тот факт, что используемые криопротекторы способны проникать в клетку и формировать внутреннюю фазу, не соответствующую физиологической норме, ставит на первый план проблему отмывки клеток от криопротекторов. Ступенчатая отмывка эритроцитов от ЭГ и 1,2-ПД в средах, содержащих возрастающие концентрации сахарозы, приводила в экспериментах к восстановлению формы, близкой к нативной, хотя часть клеток и сохраняла деформированный контур (рис. 2).

Таким образом, данные морфологического анализа, полученные с помощью растровой микроскопии, указывают на то, что криопротекторы вызывают частичную дегидратацию клеток. Однако при повышении концентрации до 60% наблюдаемые изменения морфологии становятся специфичными, что указывает на включение дополнительных механизмов модификации, помимо осмотических. Морфологическая картина клеток в присутствии витрифицирующих концентраций криопротекторов свидетельствует о том, что метод витрификации способен обеспечить сохранение интегративных связей в пределах биологической системы в условиях действия экстремальных факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 256 с.
2. Бойко Н.М., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Влияние криопротекторов на свойства поверхности мембран митохондрий, определяемых по распределению в двухфазных водных системах // Биохимия. – 1982. – 47, № 5. – С. 773–777.
3. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1988. – 28 с.
4. Скорняков Б.О., Говоруха Т.П., Репин М.В. Электронно-мікроскопічні дослідження в кріобіології // Вісн. АН УССР. – 1986. – № 9. – С. 30–37.
5. Bessis M. Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale // Red cell shape / Ed. by M.Bessis, R.I. Weecl, P.F. Leblond. – New York: Springer Verlag, 1973. – P. 1–25.
6. Burton R.F. Internal reference standards in ionic regulation and the predictability of ionic concentrations in animals // Comp. Biochem. Physiol. – 1986. – 83, № 4. – P. 607–613.
7. Marchesi J.T. The red cell membrane skeleton: recent progress // Blood. – 1983. – 61, № 1. – P. 1–12.
8. Rapatz G., Luyet B.J. Electron microscope study of erythrocytes in rapidly cooled suspensions containing various concentrations of glycerol // Biodynamica. – 1968. – 10. – P. 193–210.

Ин-т проблем кріобіології
і кріомедицини НАН України, г. Харків
В.К.ДВОРЦЕВИЙ, В.В.КІРОШКА

Поступила 17.09.96

МОРФОЛОГІЧНА ОЦІНКА СТАНУ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ НАСИЧЕННІ ВІТРИФІКУЮЧИМИ КОНЦЕНТРАЦІЯМИ ПРОНИКАЮЧИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Подані морфологічні зміни еритроцитів, які реєструвалися за методом електронно-растрової мікроскопії, при насиченні клітин вітрифікуючими концентраціями проникаючих криопротекторів. Встановлено, що морфологія клітин змінюється в напрямку кренування, характер якого залежить від фізико-хімічних властивостей криопротекторів. Відмивка від криопротектору приводить до часткового встановлення початкової форми.

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF THE STATE OF RBC DURING SATURATION BY THE VITRIFYING CONCENTRATIONS OF CRYOPROTECTANTS

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

The report deals with the study of the morphological changes of RBC, registered with a REM-method, during their saturation by the vitrifying concentrations of the penetrating cryoprotectants. The morphology of the cells was shown to change according to a heeling type, the nature of which is dependent on the physico-chemical properties of cryoprotectants. Washing of cryoprotectants resulted in a partial recovery of the original shape.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 615.361.014.41

Л.П.Кравченко, И.В.Шанина, А.М.Белоус

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИЛИБОРА ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ

Исследовано влияние фармакологических препаратов (силибора, аллопуринола и др.) на сохранность изолированных гепатоцитов крыс при длительном холодовом хранении. Показано, что только введение в среду силибора значительно сохраняет проницаемость плазматической мембраны клеток в течение 3 сут хранения. Другие препараты оказались малоэффективными и не подавляли набухание клеток. При исследовании механизма действия силибора было показано, что введение его в среду гипотермического хранения активно подавляет процессы ПОЛ.

Одной из экспериментальных моделей изучения тотальной ишемии клеток может быть гипотермическое хранение суспензии изолированных гепатоцитов (ИГ) при температуре 4 °С. Эта система также используется для длительного изучения эффективности различных фармакологических препаратов. Для этих целей предусматривается применение специального раствора для суспендирования гепатоцитов, который препятствует развитию первичных осмотических повреждений клеток при действии гипотермии и создает условия очень медленного "биохимического старения клеток" [3].

В задачу исследования входило изучение влияния ряда фармакологических препаратов на сохранность ИГ крыс при длительном холодовом хранении: силибора (антиоксиданта), аллопуринола (ингибитора ксантиноксидазы — фермента, регулирующего образование активных форм O₂), дексаметазона и аспирина (ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты), метионина и глутатиона (восстановителей металлов с переменной валентностью). Препараты были включены в состав среды хранения гепатоцитов в концентрации, являющейся оптимальной по данным [1, 8, 10, 11] для подавления процессов ПОЛ в биологических объектах. Влияние препаратов на сохранность гепатоцитов изучали на различных этапах их гипотермического хранения (30 мин, 24, 48, 72 и 96 ч) в сазарозо-солевом растворе (ССР) при температуре 4 °С. Жизнеспособность ИГ печени оценивали по степени исключения трипанового синего, МДА-образованию и уровню ДК [5], активности глутатион-редуктазы [4], а также поведению гепатоцитов в культуральных условиях [9]. ИГ выделяли из печени лабораторных белых крыс (200–250 г) неферментативным методом [6].

В предыдущих исследованиях [2] было показано, что ССР способен сохранять жизнеспособность ИГ на высоком морфофункциональном уровне в течение 48 ч. После этого срока хранения клетки печени могут выдерживать в условиях нормотермической инкубации в среде 199 [3], а при культивировании (CO₂-инкубатор, среда L-15, 24 ч) формировать растущий монослой ге-

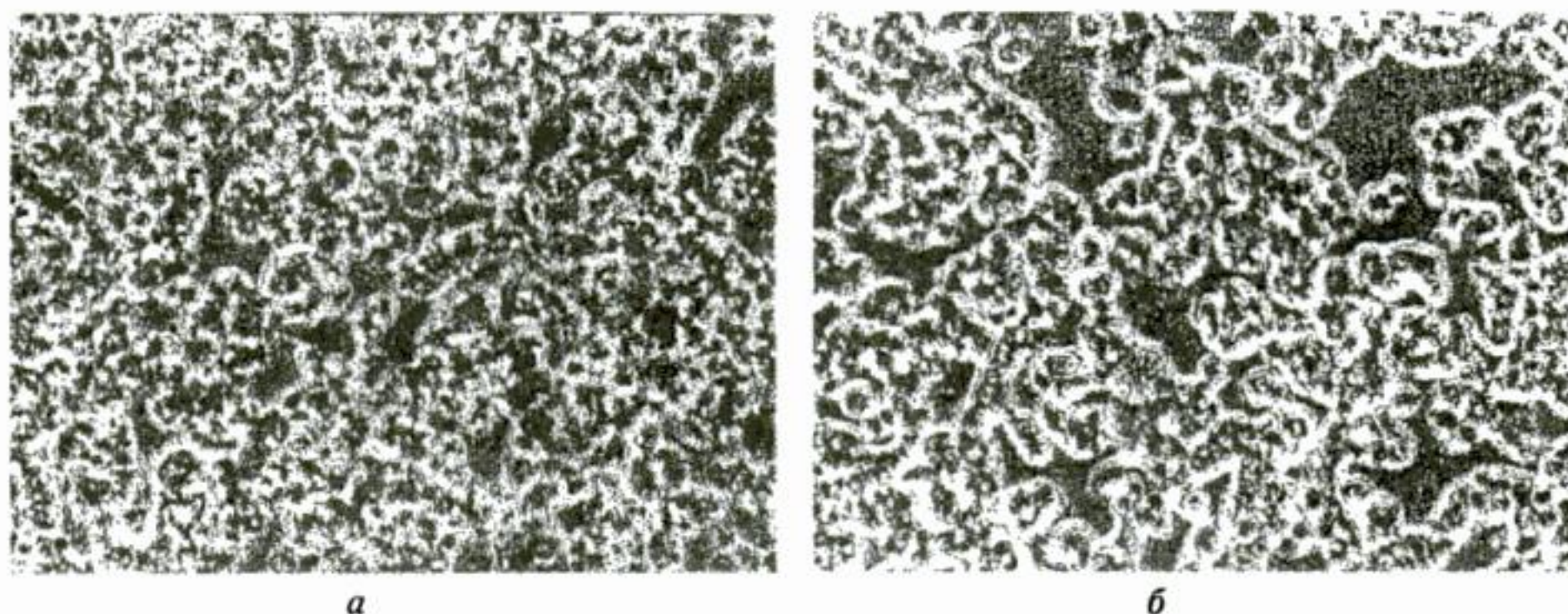


Рис. 1. Микроскопия культуры гепатоцитов: *а* — свежевыделенных: 24 ч после прикрепления (X 180); *б* — после 48 ч холодного хранения в сахарозо-содержащем растворе: 24 ч после прикрепления (X 180). Уменьшение при репродуцировании 3/5

патоцитов, характерный для контрольных проб (рис. 1, *а, б*). Спустя 48 ч холодного хранения ИГ при температуре 4 °С происходит заметное снижение как морфологических, так и биохимических показателей, которые резко ухудшаются к исходу 96 ч (табл. 1). Видимо, срок 48 ч холодного хранения ИГ является критическим для поддержания метаболического равновесия клетки, после чего процессы ишемии и катаболизма углубляются. Это связано с развитием окислительного стресса, снижением *pH* среды, распадом энергетических субстратов и других процессов, которые характерны для синдрома холодной ишемии [8] и их можно целенаправленно подавлять введением в среду метаболически активных препаратов.

Т а б л и ц а 1

Метаболические характеристики гепатоцитов на различных этапах холодного хранения при 4 °С в сахарозо-солевой среде

Параметры	Сроки хранения, ч				
	Контроль	24	48	72	96
Содержание АТФ, нмоль/млн кл.	25±3	22±2	20±3	16±3	12±2
Уровень МДА, нмоль/млн кл.	0,335±0,051	0,334±0,064	0,369±0,088	0,394±0,060	0,560±0,050
Уровень ДК, нмоль/млн кл.	0,425±0,090	0,459±0,083	0,495±0,093	0,476±0,089	0,565±0,080
Активность GSH-редуктазы, нмоль НАДН ₂ /млн кл.	0,478±0,038	0,485±0,054	0,380±0,033	0,235±0,035	0,280±0,023

Нами исследована эффективность действия некоторых фармакологических препаратов на сохранность ИГ при длительном холодном хранении.

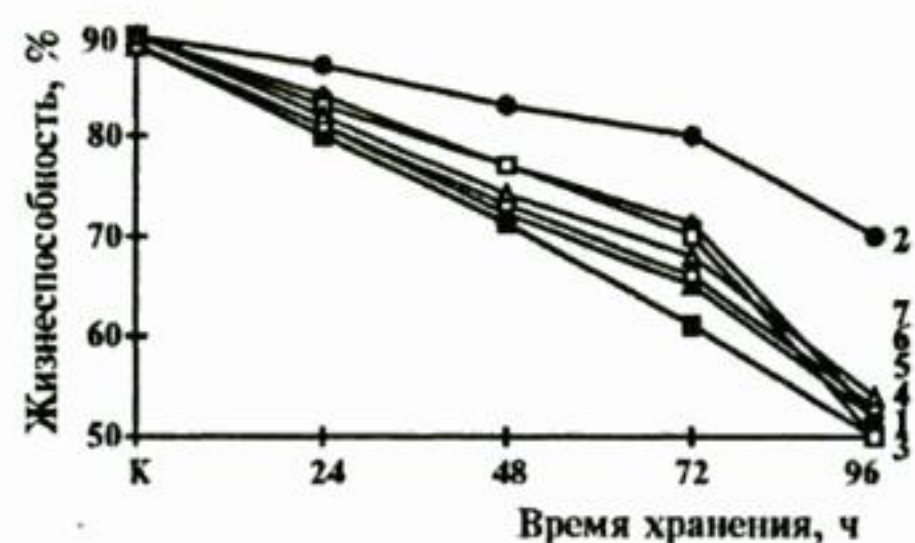


Рис. 2. Жизнеспособность изолированных гепатоцитов на различных этапах холодного хранения в средах, содержащих различные фармакологические препараты: 1 — сахарозо-солевая среда; 2 — сах.-сол. среда+силибор; 3 — сах.-сол. среда+аллопуринол; 4 — сах.-сол. среда+дексазон; 5 — сах.-сол. среда+аспирин; 6 — сах.-сол. среда+метионин; 7 — сах.-сол. среда+глутатион

Данные, представленные на рис. 2, показали, что только введение в ССР силибора значительно сохраняет проницаемость плазматической мембраны ИГ в течение 3 сут хранения при температуре 4 °С. При этом жизнеспособность ИГ была на уровне 70 %. Другие препараты (аллопуринол, глюкокортикоиды, аспирин, глутатион) оказались малоэффективными и не подавляли набухание клеток. Жизнеспособность ИГ после 3 сут холодного хранения с указанными выше препаратами была приблизительно одинаковой и составляла 50 %, что соответствовало этому показателю только для среды хранения клеток.

Т а б л и ц а 2

Уровень МДА (нмоль/млн кл.) в изолированных гепатоцитах после 4-суточного хранения в сахарозо-солевой среде с силибором

МДА-образование	Свежевыделенные клетки		После 4 сут хранения при 4 °С	
	ССР	ССР+силибор	ССР	ССР+силибор
Начальный уровень образования	0,21±0,05	0,24±0,05	0,56±0,05	0,21±0,03
Спонтанный уровень	0,42±0,06	0,25±0,02	0,75±0,06	0,32±0,04
<i>p</i>	< 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05
Аскорбат-инициированный уровень	0,86±0,05	0,65±0,02	1,60±0,29	0,56±0,12
<i>p</i>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Эффективность силибора была также выявлена при холодовом хранении ИГ в натрий-содержащих растворах (среда 199, среда L-15), которые были неэффективными для длительного хранения гепатоцитов при 4 °С [3]. В этом случае введение силибора в натрий-содержащие среды повышает устойчивость клеточных мембран гепатоцитов к действию длительной гипотермии (рис. 3). При исследовании механизма действия силибора было показано, что введение его в среду гипотермического хранения ИГ активно подавляет процессы перекисного окисления липидов. Как видно из табл. 2, МДА-образование в присутствии силибора ингибируется как при спонтанном, так и при инициированном ПОЛ. Факт развития ПОЛ в ИГ при холодовом хранении свидетельствует о снижении активности антиокислительной системы клеток за счет расходования, прежде всего, глутатион-содержащих ферментов и пула клеточных антиоксидантов. В связи с этим введение экзогенного антиоксиданта в среду холодового хранения ИГ значительно сдерживает развитие процессов ПОЛ, усиливающихся в условиях гипотермии.

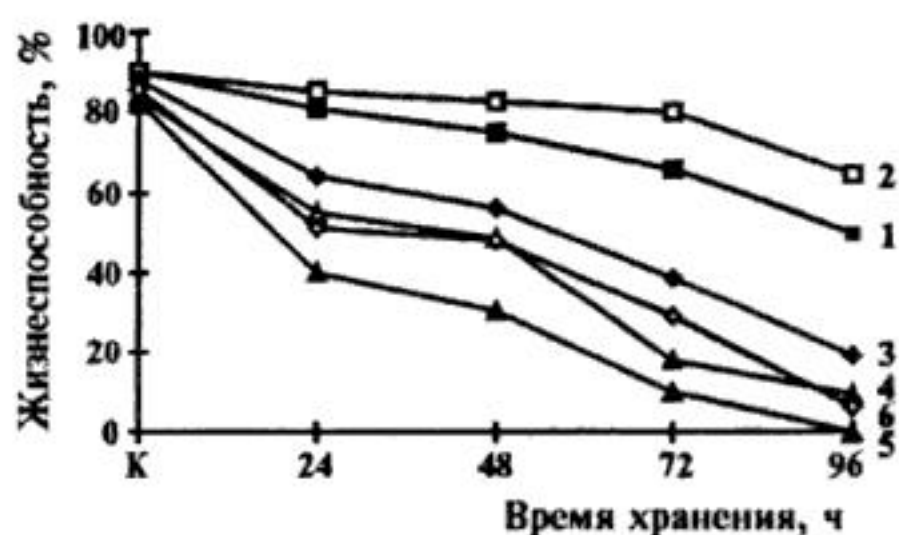


Рис. 3. Жизнеспособность гепатоцитов на различных этапах гипотермического хранения в средах различного состава: 1 — сахарозо-солевая среда; 2 — сахарозо-солевая среда+силибор; 3 — среда 199; 4 — среда 199+силибор; 5 — среда Лейбовица; 6 — среда Лейбовица+силибор

Т а б л и ц а 3

Метаболические характеристики изолированных гепатоцитов после холодового хранения (96 ч) при 4 °С в сахарозо-содержащем растворе с силибором

Исследуемые параметры	Холодовое хранение при 4 °С	Последующая нормотермическая инкубация, 30 мин
Жизнеспособность, %	92±2	90±3
Содержание АТФ, нмоль/млн кл.	12±2	21±2
Продукция глюкозы, нмоль/млн кл.	0,11±0,01	0,18±0,01
Уровень МДА, нмоль/млн кл.	0,29±0,02	0,33±0,03
Уровень ДК, нмоль/млн кл.	0,41±0,03	0,46±0,04
Активность GSH-редуктазы, нмоль НАДН ₂ /млн кл.	0,23±0,04	0,30±0,03

Из табл. 3 видно, что после 4 сут хранения клеток печени в ССР с силибором они сохраняли высокие метаболические характеристики, что свидетельствует о его стабилизирующем действии на структуры мембран и белки цитоскелета, которые контролируют объем и форму клеток. Такая возможность подтверждается в [7]. Аналоги силибора (силимарин, силибинин) могут связываться с мембраной клетки в местах соединения с белками цитоскелета и тем самым сохранять их структурно-функциональную целостность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биленко М.В. Биоокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. — М.: Медицина, 1982. — 232 с.

2. Кравченко Л.П., Андриенко А.Н. Условия длительного хранения изолированных гепатоцитов при 4 °С // Пробл. криобиологии. – 1993. – № 1. С. 33–38.
3. Кравченко Л.П., Белоус А.М., Шанина И.В. Влияние гипотермии на некоторые биохимические показатели изолированных гепатоцитов // Укр. биохим. журн. – 1994. – 66, № 4. – С. 108–113.
4. Методы биохимических исследований. – Л.: Ленингр. ун-т, 1982. – С. 181–186.
5. Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – 391 с.
6. А.с. 1463757 СССР, МКИ⁴ С 12 5/00. Способ получения изолированных клеток печени / Л.П.Кравченко, А.Н.Андриенко, О.А.Семенченко и др. – Опубл. 07.03.89. Бюл. № 9.
7. Faulstich H., Munter, Mfyer D. Phalloidin action. – Mechanisms of hepatocyte injury and death / Ed. by D.Keepler. – 1983. – MTR Press Limited. – P. 183–192.
8. Fuller D. Storage of cells and tissues at hypothermia for clinical use / Eds by K.Bowler, B.Fuller. – N.Y., Cambrige, 1987. – P. 341–362.
9. Fuller B., Cheetmen K. Culture of isolated rat hepatocytes after prolonged storage on ice — a better use of cell resources // *In vitro* Cell Dev. Biol. – 1990. – 26. – P. 931–932.
10. Kravchenko L., Belous A., Shanina I. Long-term storage of isolated liver cells at hypothermia // *Cryo-lett.* – 1994. – № 2. – P. 135–144.
11. Southard J., Gulic T., Ametani M. Importment components of the UW-solution // *Transplantation.* – 1990. – 49. – № 2. – P. 251–257.

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

Поступила 26.10.95

Л.П.КРАВЧЕНКО, І.В.ШАНІНА, А.М.БІЛОУС

ЕФЕКТИВНІСТЬ СИЛІБОРУ ПРИ ГІПОТЕРМІЧНОМУ ЗБЕРІГАННІ ІЗОЛЬОВАНИХ ГЕПАТОЦИТІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Досліджено вплив фармакологічних препаратів (силібору, алопуринолу та ін). на збереження ізолюваних гепатоцитів щурів при довгочасному холодівому зберіганні. Показано, що тільки внесення до середовища силібору значно зберігає проникність плазматичної мембрани клітин на протязі 3 діб зберігання. Інші препарати виявилися малоефективними та не стримували набухання клітин. При дослідженні механізму впливу силібору було показано, що введення його до середовища гіпотермічного зберігання активно стримує процеси ПОЛ.

L.P.KRAVCHENKO, I.V.SHANINA, A.M.BELOUS

THE EFFICIENCY OF SILIBOR DURING HYPOTHERMIC STORAGE OF THE ISOLATED HEPATOCYTES

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

The authors investigated the influence of some pharmacological preparations (silibor, allopurinol, etc.) on the survival of the isolated rat hepatocytes during long-term cold storage. It was shown that only the injection of silibor considerably increased the permeability of the cell plasma membrane during a 3-day storage. Other preparations turned out to be ineffective and did not inhibit cell swelling. When investigating the mechanism of the silibor action the authors managed to demonstrate that its injection into the medium for hypothermic storage actively inhibited the LPO processes.

УДК 591.543.42 + 611.018

В.Ф.Козлова, Т.Н.Юрченко

СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ АДАПТАЦИИ ЗИМНЕСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ

Представлены структурные основы гомеостаза гетеротермов при естественном гипобиозе. В состоянии оцепенения морфофункциональный статус организма животных характеризуется ситуационной перестройкой кровообращения, обезвоживанием тканей, общей физиологической атрофией органов с гипобиозом клеток паренхимы и реактивностью стромальных элементов, накоплением гликопротеинов и липидов во всех внутренних органах. Постулируется гомеостатирование энтеральной среды гибернирующих животных за счет эндогенных факторов.

Несмотря на всевозрастающий интерес исследователей к природным явлениям гипометаболических состояний гетеротермных животных, структур-

ные основы гомеостаза систем организма при естественном гипобиозе остаются нераскрытыми, хотя именно они обуславливают развитие комплекса компенсаторно-приспособительных реакций гетеротермов в ответ на действие низких температур [1, 8, 11, 12].

Методологической платформой для характеристики процессов, протекающих в организме при гибернации, избран системный морфофункциональный подход с позиций учения о гомеостазе, позволяющий раскрыть некоторые стороны механизма взаимодействия структур различных уровней организации с окружающей средой [6].

Учитывая специфику зимнеспящих животных с эволюционно выработанной и генетически закрепленной периодической сменой температуры тела от 0 до 38 °С и переходом их гипометаболического состояния в гиперактивное и наоборот, понятие гомеостаза как динамического постоянства различных физиологических констант организма необходимо дополнить особенностями протекающих адаптационно-компенсаторных процессов, направленных на его сохранение. При этом важно подчеркнуть единство механизмов адаптации и компенсации при их противоположности, поскольку эти механизмы относительно так же, как и понятия структурные и функциональные, внутренние и внешние связи, в зависимости от того, что рассматриваем как систему и ее элементы. Адаптация происходит внутри элемента за счет перестройки его структуры для сохранения функции. Компенсация осуществляется более высоким системным уровнем, внешним относительно элемента, функции которого компенсируются. Но система, компенсируя функцию элемента, изменяет свою структуру, т.е. адаптируется сама. Следовательно, процесс адаптации направлен от более глубоких уровней системы к внешним и сопровождается компенсаторными реакциями этих более высоких уровней, направленными на прекращение адаптации [2].

Результатом адаптации гибернирующих животных является сохранение такого гомеостаза, при котором структурные компоненты всех уровней приводятся в соответствие с характером изменений среды, в частности, гипотермические условия обуславливают гипотрофию структур, ингибирование метаболизма и переход организма на новый уровень гомеостаза. Переход на новый уровень гомеостаза предполагает изменение не только промежуточных величин, но и области допустимых колебаний жизненно важных характеристик гомеостатических систем, в связи с чем к понятию "норма" следует относиться не как к среднему статистическому показателю, а более дифференцированно, с учетом конкретных условий окружающей среды.

Выяснению закономерностей развития морфофункциональных перестроек клеток, тканей и органов зимнеспящих животных посвящено настоящее сообщение. Эксперименты проведены в зимний период (январь, февраль) на половозрелых якутских длиннохвостых сусликах *Citellus undulatus*, находящихся в состоянии оцепенения (РТ 4–6 °С).

После декапитации и патолого-анатомического вскрытия у животных отбирали и фиксировали в 10%-м растворе формалина образцы внутренних органов (сердца, легких, печени, желудка, кишечника, почек, селезенки, надпочечников, головного мозга) для гистологического и гистохимического исследований. Образцы заливали в целлоидин-парафин, срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином. Для определения комплекса полисахаридных соединений ставилась сочетанная реакция по Моури. Гликозаминогликаны в структурах выявляли альциановым синим, гликопротеины — реактивом Шиффа. Нейросекреторное вещество в нейронах супраоптических и паравентрикулярных ядер гипоталамуса окрашивали альдегид-фуксин по Гомори. Фосфолипиды идентифицировали во всех органах суданом черным В, нейтральные жиры — суданом III и IV (на криостатных срезах).

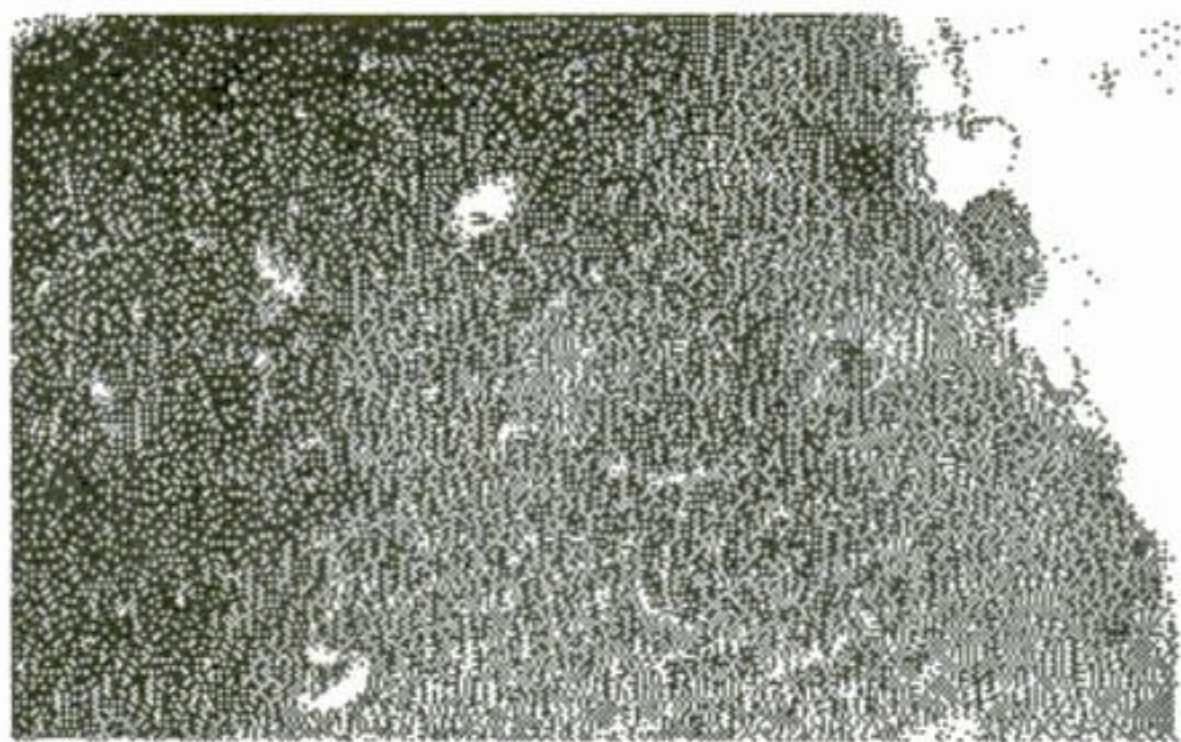


Рис. 1. Кора полушарий головного мозга спящего суслика: характерная цитоархитектоника. Гематоксилин и эозин. X 60

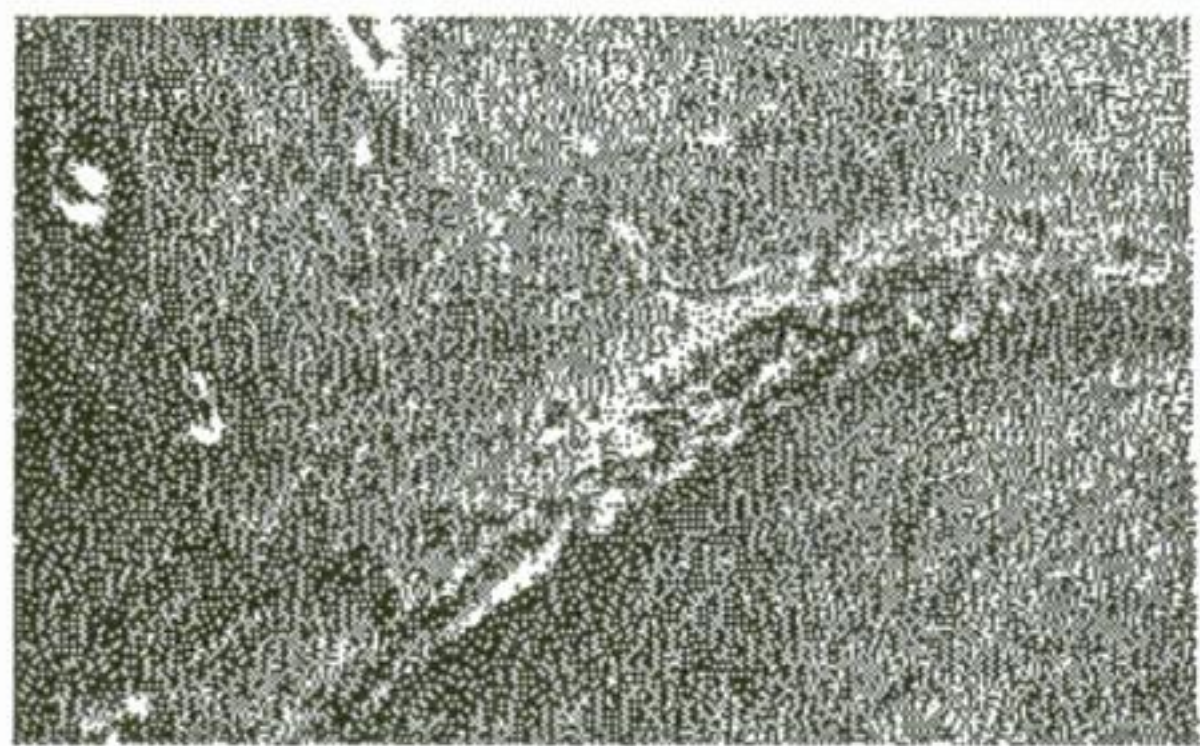


Рис. 2. Супраоптическое ядро гипоталамуса: высокая концентрация гиперхромных нейронов. Гематоксилин и эозин. X 60

ского и гистохимического исследований (рис. 1, 2). Зимняя спячка сусликов гомологична фазе медленного сна млекопитающих, нейрохимия этого состояния освещена в [8, 11]. Показана важная роль биологически активных веществ (серотонина, дофамина и др.) в регуляции функций мозга, сноподобных состояний и процессов терморегуляции, выявлены эндогенные криопротекторы и высокая толерантность нервной ткани зимнеспящих животных к охлаждению. Центральной системе принадлежит ведущая роль в обеспечении адаптивных механизмов циклов гибернации.

Микроскопическое исследование показало, что кора полушарий головного мозга спящих сусликов характеризуется обычной цитоархитектоникой и плотным расположением клеток (рис. 1). По комплексу морфологических показателей нейроны всех слоев коры на фоне реактивных нейроглиальных элементов, относящихся к системе макрофагов, малоактивны. Это проявляется в увеличении размеров и округлении клеток микроглии, выполняющих трофическую и защитную функции тканей внутренней среды. Высокой концентрацией нейронов отличаются крупно- и мелкоклетчатые ядра гипоталамуса. В паравентрикулярных и супраоптических ядрах преобладают ареактивные гиперхромные клетки без признаков дистрофии (рис. 2). Они содержат умеренное количество нейросекрета, значительное скопление которого обнаруживается в задней доле гипофиза. Ткань головного мозга богата липидами и гликопротеинами, особенно в периваскулярных зонах.

В связи с тем, что сердечно-сосудистой системе в выживаемости животных при гипотермии принадлежит определяющее положение, адаптивные реакции миокарда гетеротермов хорошо изучены [4, 5, 9]. Сердце зимнеспящих животных в отличие от теплокровных способно функционировать в ши-

Как показали результаты патолого-анатомического вскрытия, у спящих сусликов обнаружены пониженная свертываемость крови и перестройка кровообращения с депонированием крови во внутренних органах на фоне их общей физиологической атрофии и обезвоживания тканей. В подкожной клетчатке вокруг сосудов и органов отмечаются скопления бурого жира. Желудочно-кишечный тракт не имеет содержимого, его стенка складчатая, слизистая оболочка светлорозовая. Надпочечники нитевидной формы, небольших размеров. Отмечается кровенаполнение сосудов мягкой мозговой оболочки и тканей головного мозга, особенно обильно васкуляризированной гипоталамической области, что подтверждают данные гистологиче-

роком диапазоне температур: от 0 до 38 °С. При гистологическом и гистохимическом исследованиях наблюдались явления дегидратации и общей физиологической атрофии миокарда, проявляющейся в уменьшении объема и уплотненном расположении тканей. Сократительные кардиомиоциты хромофильны, имеют, как правило, вытянутые тонкие нитевидные ядра, интенсивно окрашивающиеся гематоксилином. В цитоплазме просматриваются поперечная исчерченность и умеренное количество гликопротеинов и липидов. Только атипичные миоциты имеют светлые овальные ядра и содержат значительное количество гликогена. Плотному расположению тканей способствует также редукция гемоциркуляторного русла миокарда вследствие уменьшения кровотока и спадения капилляров. Большинство крупных кровеносных сосудов сердца наполнено кровью с характерным центральным расположением эритроцитов и периферическим плазмы, но плазморрагий и диапедезных кровоизлияний в окружающей ткани не наблюдается в связи с изменением реологических свойств крови и достаточной прочностью стенок сосудов. Гистологически просматривается утолщение их медиа. Гистохимически определяется интенсивная окраска реактивом Шиффа базальных мембран кардиомиоцитов и сосудов, а также цитоплазмы фибробластов, что в комплексе с крупными светлыми ядрами свидетельствует об их активном функциональном состоянии. Это согласуется с данными электронной микроскопии относительно закономерностей структурных перестроек стромы миокарда сусликов при адаптации к зимней спячке [5].

В настоящее время практически не изучено морфофункциональное состояние легких гибернарующих животных. Нами установлено, что во время баутов у сусликов уменьшается дыхательная поверхность легких и происходит физиологическая редукция малого круга кровообращения, по морфологическим проявлениям близкая к состоянию

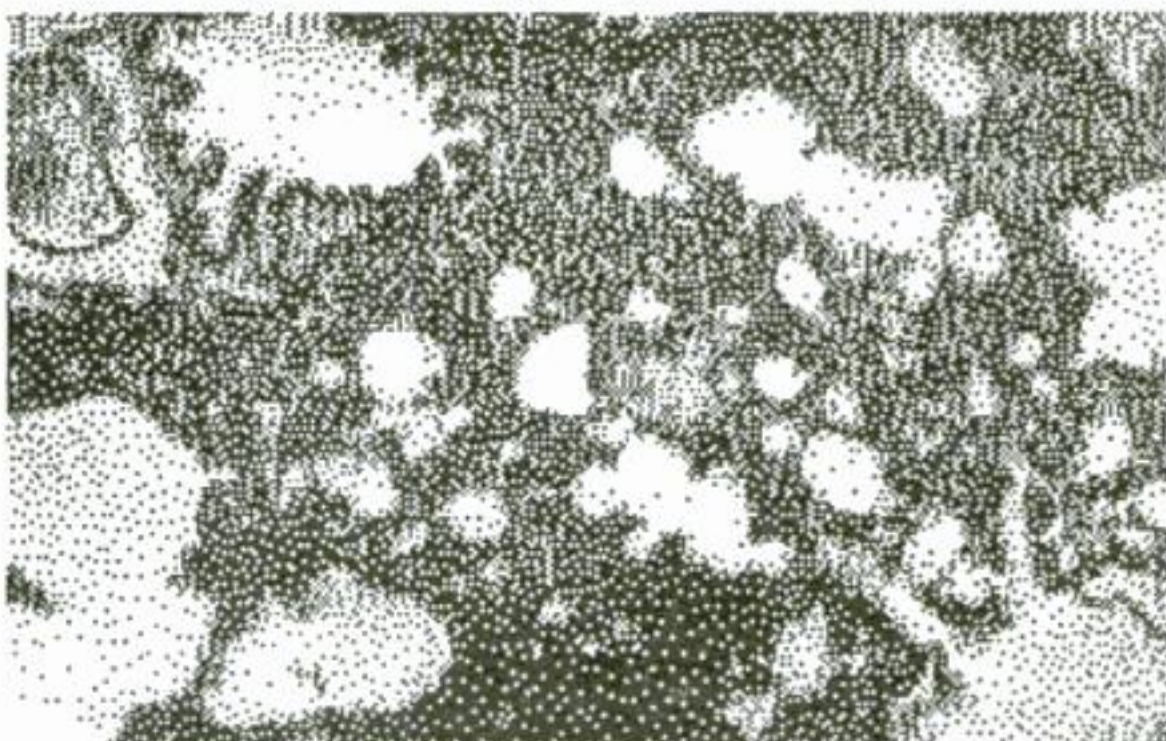


Рис. 3. Дистелектаз легкого спящего суслика. Гематоксилин и эозин. X 60

животных аридных и неаридных зон после длительной дегидратации. В легких, наряду с запусением ряда капилляров, отмечается гиперплазия гладкомышечных клеток сосудов сопротивления: мелких артерий и вен, артериол и венул. Утолщение интимы и медиа имеет место как в артериях мышечного типа уровня терминальных и респираторных бронхиол I и II порядка, так и в стенке артерий эластомышечного типа порядка междольковых и внутридольковых бронхиол, в артериях эластического типа, а также в междольковых и внутридольковых венах. Сосуды кровенаполнены. Перибронхиально и периваскулярно обнаруживаются скопления лимфоидной ткани. Строма легких богата нейтральным жиром и полисахаридными соединениями, а также лимфоцитами и макрофагальными элементами. Отмечаются складчатость слизистой оболочки бронхов и гипофункции их бокаловидных клеток. Они небольших размеров, слабо заполнены мукоидным секретом, который содержит гликопротеины и гликозаминогликаны. Респираторный отдел легкого характеризуется участками дистелектаза, что можно рассматривать как физиологическую атрофию альвеол (рис. 3). Спадение альвеол, как правило, связано с пониженной выработкой большими альвеолоцитами поверхностно-активного вещества — сурфактанта.

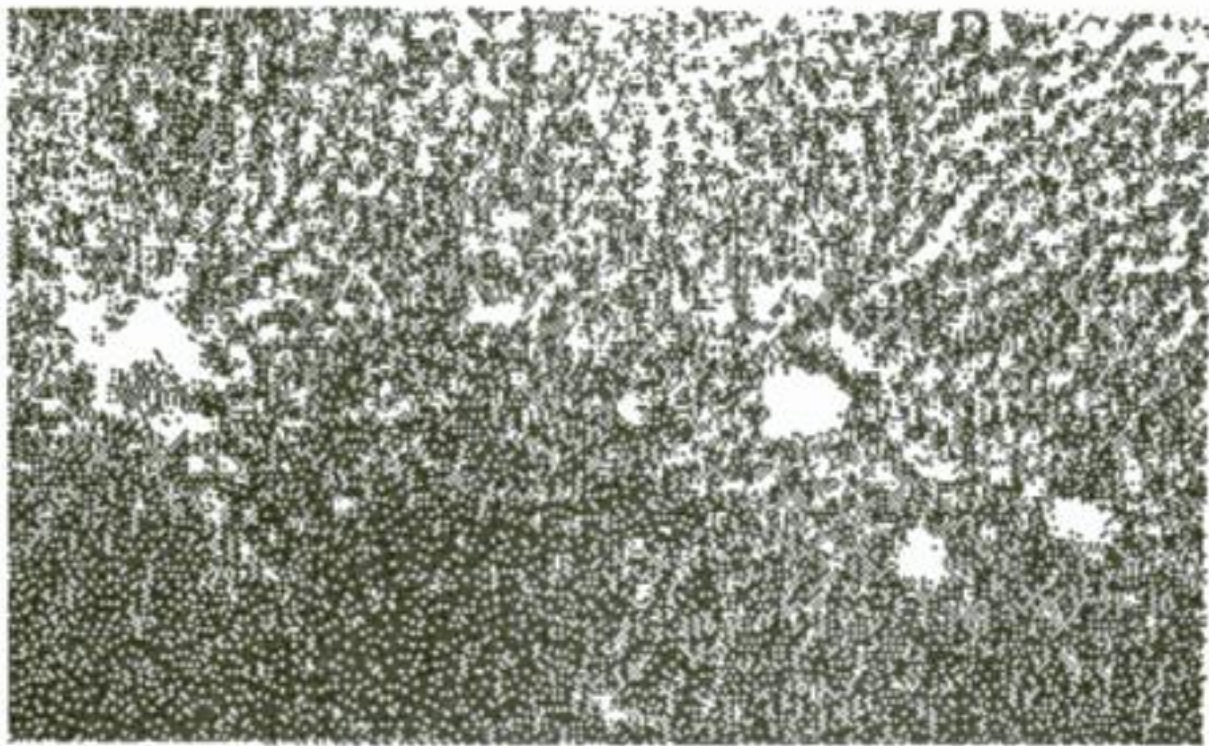


Рис. 4. Дегидратация ткани печени спящего суслика. Гематоксилин и эозин. X 60

ским состоянием. Она дегидратирована и содержит преимущественно однородные оптически плотные темные гепатоциты (рис. 4). По данным электронной микроскопии, у спящих сусликов возрастает мощность митохондриального и лизосомального аппарата гепатоцитов, рассматриваемая как важнейший элемент адаптации к холоду [3, 8]. В отличие от паренхимы функционально активными являются стромальные элементы органа, хотя разрастаний соединительной ткани в печени не отмечается, но периваскулярно встречается мелкоочажковая инфильтрация ткани лейкоцитами.

Поскольку длиннохвостые суслики во время спонтанных пробуждений не принимают пищу, происходит полное отключение полостного пищеварения в желудочно-кишечном тракте. В связи с этим возникает вопрос о механизме гомеостатирования энтеральной, а значит, и внутренней среды организма. Как показали исследования [7, 12], у спящих сусликов наблюдается комплекс изменений, характеризующих торможение функции эпителиоцитов желудка и развитие примембранного и внутриклеточного пищеварения. Гистологически в стенке желудка определяются четыре характерные оболочки со спавшейся слизистой и мощной трехслойной мышечной оболочкой. Покровный эпителий желудка слегка обезвожен, однороден, целостен, богат полисахаридными соединениями и обильно покрыт слизью, в состав которой входят гликопротеины и гликозаминогликаны, а также липиды. В фундальном отделе



Рис. 5. Складка слизистой оболочки желудка с "покоящимися" трубчатыми железами. Гематоксилин и эозин. X 60

слизистая оболочка содержит "покоящиеся" простые трубчатые железы с уплощенными главными, париетальными и энтерохромафинными клетками (рис. 5). Активно функционируют, в основном, слизистые шеечные клетки, а также стромальные элементы. Рыхлая соединительная ткань собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы богата эластиче-

Во время баутов у гетеротермов повышается роль печени как депонирующего и теплопродуцирующего органа с высоким энергетическим потенциалом. Морфологически это проявляется в кровенаполнении сосудов (кроме центральных вен) и прилежащих к ним синусоидов, увеличении запасов гликогена и липидов. Паренхима органа характеризуется гипобиотиче-

скими волокнами, лимфатическими фолликулами и плазматическими клетками. Отмечается кровенаполнение крупных кровеносных сосудов. Мышечная оболочка желудка находится в тонусе. Следует подчеркнуть, что эпителиальная выстилка слизистой оболочки не повреждена, однако в просвете желудка обнаруживается клеточный детрит, который вместе со слизью эпители-

оцитов формирует своеобразный пристеночный химус, по-видимому, поддерживающий питательный гомеостаз органа (рис. 6).

В двенадцатиперстной кишке спящих сусликов отмечается депонирование крови в мелких венах и сосудистых сплетениях слизистой оболочки и подслизистой основы, богатой липидами. Микроциркуляторное русло ворсинок кровенаполнено умеренно, лимфатические капилляры сжаты, соединительно-тканная основа органа уплотнена за счет легкого обезвоживания, однако клеточные элементы стромы находятся в активном состоянии. Особо следует отметить развитие популяции гладкомышечных клеток ворсинок, многие из которых берут свое начало от мышечной оболочки кишки и играют важную роль в процессе сокращения органа. В рыхлой волокнистой соединительной ткани подслизистой основы наблюдаются многочисленные бруннеровы железы и лимфатические фолликулы, а также плазматические клетки и эозинофилы. В неактивном, "покойном", состоянии находятся энтероциты. Они не повреждены, но уплотнены, каемчатые клетки в апикальной части содержат гликокаликс, бокаловидные клетки бедны секретом. В целом двенадцатиперстная кишка сокращена, в связи с чем ворсинки уменьшены в размере и приобретают листовидную форму (рис. 7).

Почка спящих сусликов характеризуется признаками редукции сосудистой системы и застойными явлениями междольковых, дуговых и внутридольковых артерий и вен, а также перитубулярной капиллярной сети мозгового вещества и прямых сосудов сосудистого пучка вместе с выносящими артериолами юкстамедуллярных нефронов. Отмечается утолщение базальных мембран сосудистых клубочков и капилляров почек, в которых базальный слой сливается с базальным слоем почечных канальцев, что создает дополнительную прочность. Они интенсивно окрашиваются реактивом Шиффа. Перестройка кровеносного русла наиболее проявляется в сосудах эластомышечного и мышечно-эластического типа в виде комплекса изменений: глубокой складчатости волокон соединительно-тканного каркаса, особенно внутренней эластической мембраны, утолщения мышечной оболочки и интимы, где появляется розеточное положение эндотелия. В юктагломерулярном комплексе наблюдаются гипертрофия и гиперплазия гладкомышечных клеток, которые, как известно, полипотентны и полифункциональны, поскольку могут как принимать участие в выработке эластических и коллагеновых волокон, так и проду-



Рис. 6. Складка слизистой оболочки желудка: покровный эпителий обильно покрыт слизью, в просвете желудка пристеночный химус. Окраска по Моури. X 60

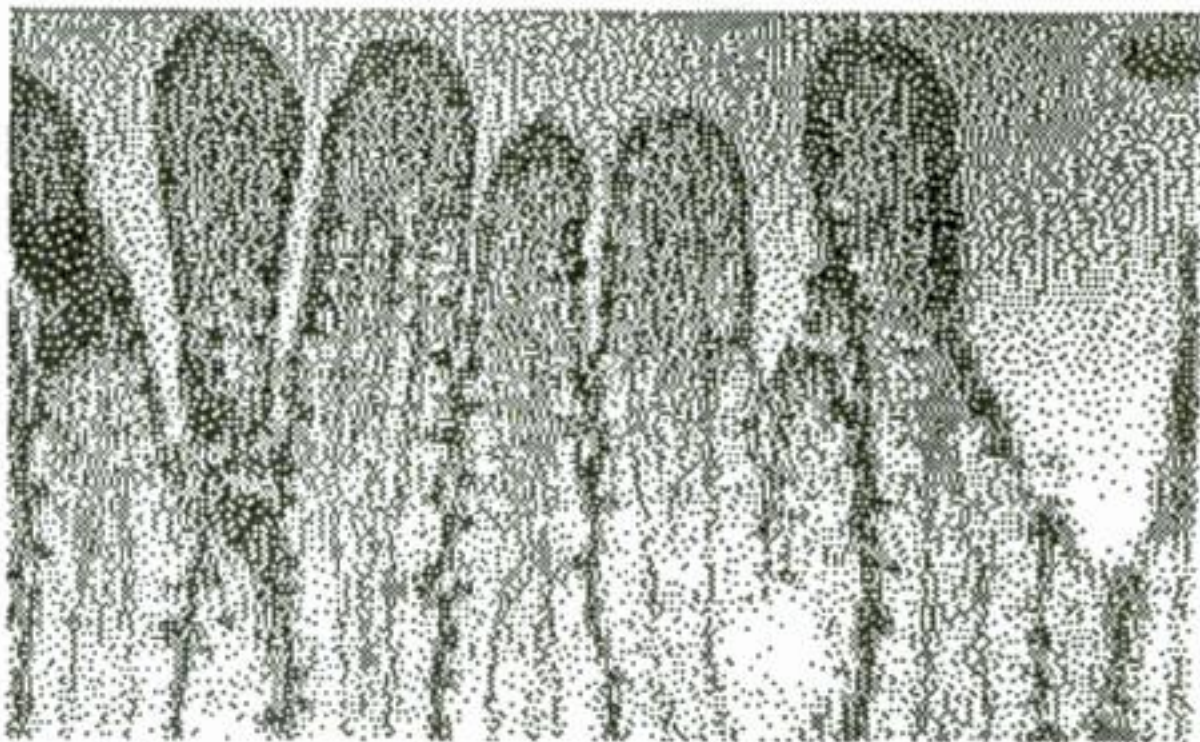


Рис. 7. Листовидная форма ворсинок 12-перстной кишки, бокаловидные клетки бедны секретом. Гематоксилин и эозин. X 60

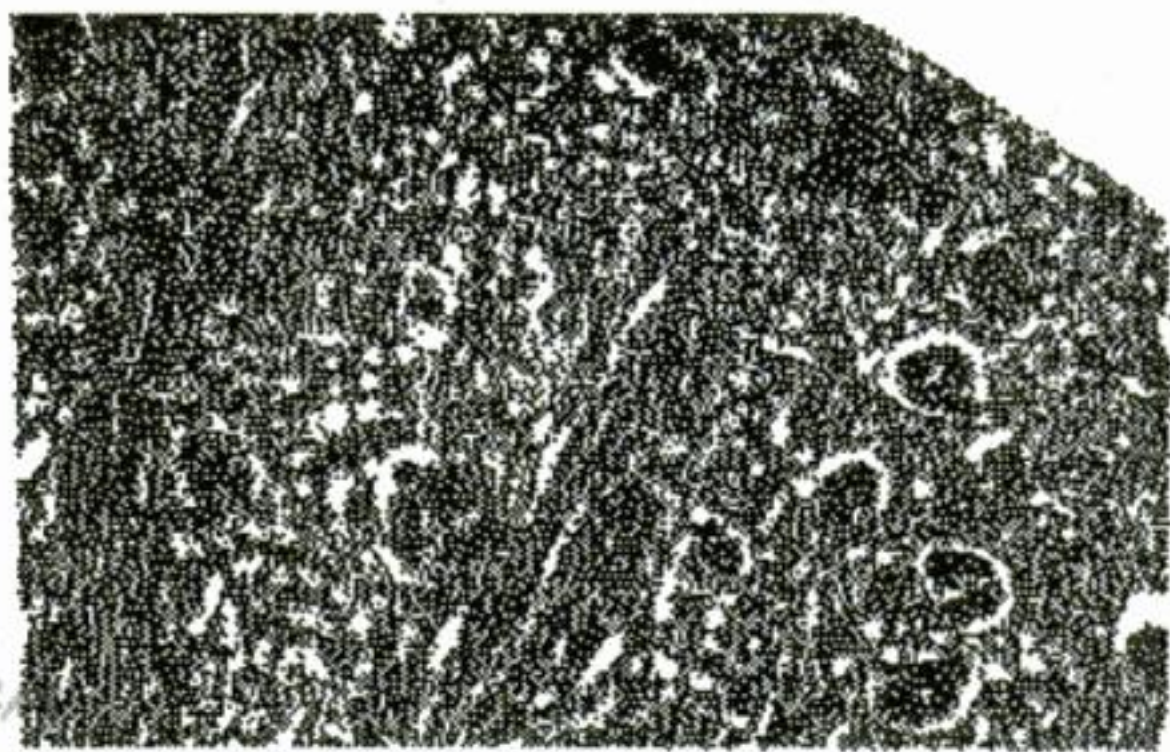


Рис. 8. Почка спящего суслика: эпителиальная выстилка канальцев уплотнена. Гематоксилин и эозин. X 60

просвет собирательных трубок без содержимого. Сосудистые клубочки сжаты, полость капсулы слегка расширена (рис. 8).

Селезенка спящих сусликов — настоящее, в полном смысле этого слова, “депо” крови. Венозные синусоиды красной пульпы настолько кровенаполнены, что потеряли свои границы и превратились в единый мощный резервуар, тем более, что кровь находится не только в сосудистой системе, но и в ретикулярной ткани пульпарных тяжей. При этом следует отметить незначительный распад эритроцитов в столь полнокровном органе. Наблюдаются гипертрофия стенок селезеночных и трабекулярных артерий и вен, развитие эластических и гладких мышечных волокон в трабекулах и капсуле как проявление компенсаторно-приспособительных процессов в организме животного, направленных на укрепление прочности системы. Островки лимфоидной ткани сконцентрированы

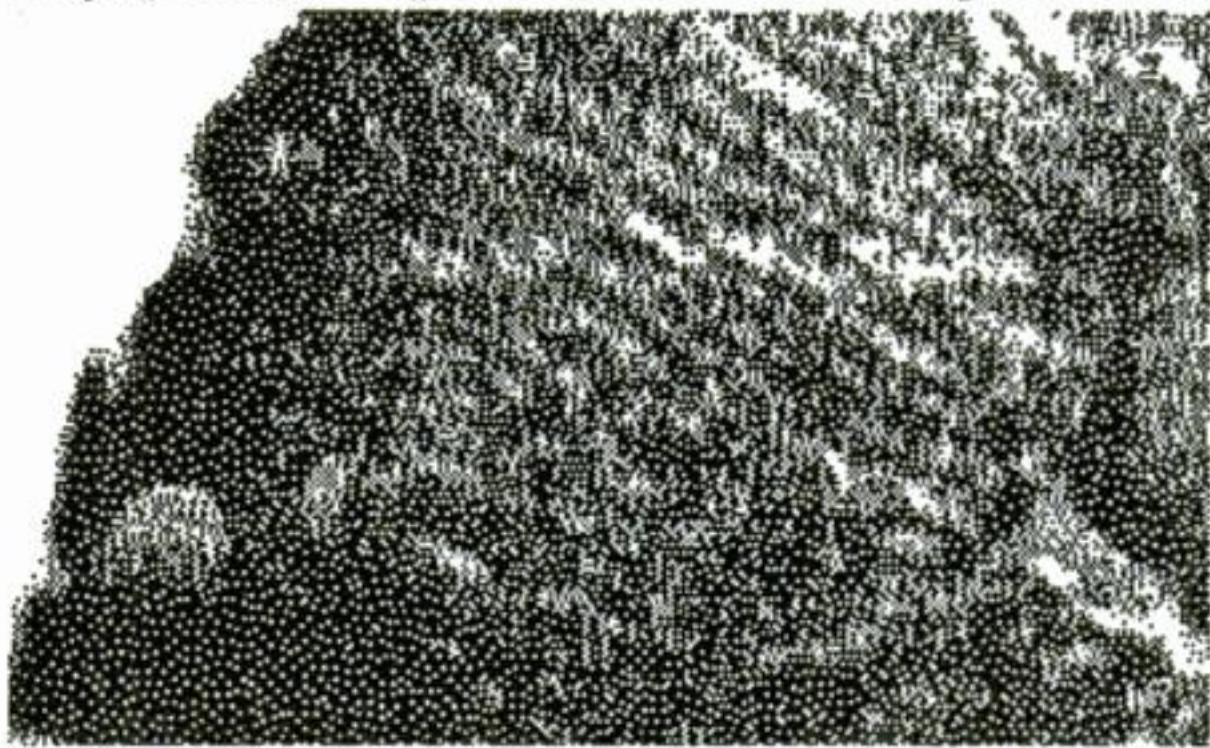


Рис. 9. Кортикальный слой надпочечника: пучковая зона богата липидами. Гематоксилин и эозин. X 60

соидными капиллярами. Развитые капсула и соединительно-тканная основа органа богаты фосфолипидами и гликопротеинами, клубочковая и пучковая зоны коры — нейтральными жирами (рис. 9). В окружающей капсулу ткани выявляется большое количество тучных клеток, окрашивающихся как реактивом Шиффа, так и альциановым синим в связи с наличием в их составе гликопротеинов и гликозаминогликанов. Кортикальное вещество надпочечников, особенно сетчатая зона, дегидратировано, хромафинные клетки мозгового вещества многоугольной формы, рыхло расположены вокруг полнокровных синусоидов. У некоторых животных обнаруживается скопление хромафинной ткани в виде параганглий.

Анализируя особенности морфофункционального состояния внутренних органов спящих сусликов, можно заключить, что у гетеротермов с переходом организма на новый уровень гомеостаза выработался своеобразный механизм

цировать полисахаридные вещества, а также, пройдя стадию дедифференцировки, могут превратиться в клетки бурой жировой ткани. Следует отметить обилие липидов, гликопротеинов и в меньшей мере гликозаминогликанов в соединительно-тканной основе почки. Эпителиальная выстилка извитых и особенно прямых канальцев уплощена, уплотнена, дегидратирована,

рованы в “спокойных” лимфатических фолликулах со слабовыраженным герминативным центром, но мощной фолликулярной артерией.

Надпочечники спящих сусликов находятся в репрессированном состоянии. Они нитевидной формы с четко выраженной границей коркового и мозгового вещества, с кровенаполненными центрально расположенными синусоидными капиллярами.

адаптации к действию низких температур. На фоне общего гипометаболизма тканей, ареактивности гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса, сердечно-сосудистой и других систем у зимнеявляющихся животных происходит гомеостатирование энтеральной среды за счет эндогенных факторов, включая структурную перестройку желудочно-кишечного тракта и замену полостного типа пищеварения пристеночным и внутриклеточным. Эта закономерность характерна и для других органов. Так, в печени и в миокарде возрастает мощность лизосомального аппарата, играющего важную роль в лизосомальном пути внутриклеточного пищеварения в поддержании белкового гомеостаза гепатоцитов, кардиомиоцитов и других паренхиматозных элементов [3, 4, 7].

Скопления лимфоцитов, наблюдаемые в легких, селезенке, печени, желудочно-кишечном тракте и других внутренних органах, могут быть связаны с выполнением ими не только защитной, но и трофической функции по депонированию и вовлечению в метаболизм мобильного источника информационных биополимеров (нуклеиновых кислот, белков). В столь специфических условиях баута возрастает интегративная роль активных соединительно-тканевых элементов во всем их многообразии как ткани внутренней среды, которая, кроме опорной, защитной и трофической функций, по современным представлениям [10] обеспечивает ключевое положение кооперативного взаимодействия между всеми клетками и внеклеточными компонентами в осуществлении адаптации и гомеостаза органов.

Таким образом, у зимнеявляющихся животных в фазе оцепенения происходит адаптивная ситуационная перестройка клеток и тканей жизненно важных органов с гипобиозом клеток паренхимы и реактивностью стромальных элементов, накоплением в них липидов и гликопротеинов, обеспечивающих, наряду с другими важными характеристиками гомеостатических систем, расширение области допустимых колебаний функционирования организма в соответствии с изменяющимися условиями внешней среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 431 с.
2. Воложин А.И., Субботин Ю.К. Адаптация и компенсация — универсальный механизм приспособления. – М.: Медицина, 1987. – 176 с.
3. Говоруха Т.П., Козлова В.Ф., Репин Н.В. Морфологические изменения в печени сусликов при естественном гипобиозе // Пробл. кробиологии. – 1994. – № 4. – С. 27–31.
4. Жегунов Г.Ф. Особенности адаптации сердца зимнеявляющихся животных // Пробл. кробиологии. – 1993. – № 3. – С. 21–32.
5. Загоруйко Г.Е. Закономерности структурной перестройки стромы миокарда сусликов при адаптации к зимней спячке // Пробл. кробиологии. – 1991. – № 1. – С. 3–8.
6. Козлова В.Ф., Юрченко Т.Н. Теория гомеостаза в качестве методологической основы определения характера действия на организм химических и физических факторов // Кробиология. – 1990. – № 1. – С. 3–10.
7. Козлова В.Ф., Юрченко Т.Н. Морфофункциональное состояние желудочно-кишечного тракта сусликов в разные периоды зимней спячки // Фундаментальные и прикладные проблемы кробиологии: Сб. науч. тр. – Харьков, 1993. – С. 64–67.
8. Механизмы природных гипометаболических состояний: Сб. науч. тр. – Пушкино: ПНЦ ИБК АН СССР. – 165 с.
9. Покровский В.М., Шейх-заде Ю.Р., Воверейт В.В. Сердце при гипотермии. – Л.: Наука, 1984. – 141 с.
10. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). – М.: Медицина, 1981. – 312 с.
11. Эколого-физиологические характеристики природных гипометаболических состояний: Сб. науч. тр. – Пушкино, 1992. – 139 с.
12. Kozlova V.F., Yurchenko T.N., Govorukha T.P., Sharlaj T.M. Structural basis of homeostasis of heterothermic animals during natural hypobiosis // 31 st annual meeting program and abstracts "Cryo' 94". – Kyoto, Japan, 1994. – P. 34.

Ин-т проблем кробиологии
и кримиологии ИАН Украины, г. Харьков

Поступила 13.04.95

В.П.КОЗЛОВА, Т.М.ЮРЧЕНКО

СТРУКТУРНІ АСПЕКТИ АДАПТАЦІЇ ЗИМОВОСПЛЯЧИХ ТВАРИН

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Подані структурні основи гомеостазу гетеротермів при природному гіпобіозі. У стані оцепеніння морфофункціональний статус організму тварин характеризується ситуаційною перебудовою кровообігу, обезводненням тканин, загальною фізіологічною атрофією органів з гіпобіозом клітин паренхіми і реактивністю стромальних елементів, накопиченням глікопротеїнів і ліпідів у всіх внутрішніх органах. Постулюється гомеостатування ентерального середовища гібернуючих тварин за рахунок ендогенних факторів.

V.F.KOZLOVA, T.N.YURCHENKO

STRUCTURAL ASPECTS OF ADAPTATION OF THE HIBERNATING ANIMALS

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

The report presents the structural bases of homeostasis of heterotherms during natural hypobiosis. In the state of stupor the morphofunctional status of the animal organism is characterized by a situational rearrangement of circulation, dehydration of tissues, general physiological atrophy of the organs with the hypobiosis of the parenchyma cells and reactivity of the stromal elements, accumulation of glycoproteins and lipids in all the inner organs. The authors postulate a homeostatting of the enteral medium of the hibernating animals due to the action of the endogenous factors.

УДК 616.831 : 615.84

В. А. Малахов

ШИРОКОДИАПАЗОННАЯ КВЧ-ТЕРАПИЯ БОЛЬНЫХ С НАЧАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Особенностью метода монолечения больных с начальной цереброваскулярной патологией (ЦВП) широкодиапазонной КВЧ-терапией является эндоназальное облучение. Отмечены регрессия неврологического дефицита, оптимизация центральной и церебральной гемодинамики, улучшение микроциркуляции и микрореологических свойств крови, нормализация в системе циклических нуклеотидов.

Исследование воздействия электромагнитного излучения (ЭМИ) КВЧ-диапазона на биологические объекты — актуальная задача современной медицины. Экспериментальные данные и клинический опыт показывают, что при облучении ЭМИ КВЧ-диапазона малой интенсивности наблюдается нормализация нарушенных процессов в клетках и организме [1, 4].

В настоящее время имеются лишь единичные исследования, посвященные клинко-патогенетическому обоснованию использования КВЧ-терапии при цереброваскулярной патологии [2, 3]. Целью данного исследования явилось изучение возможности использования КВЧ-терапии у больных ЦВП, а также ее влияния на центральную и церебральную гемодинамику, микроциркуляцию и биоэлектrogenез головного мозга. Для лечения использовали прибор, основу которого составляет лампа обратной волны, непрерывная электронная перестройка ее осуществляется частотой 10 Гц в диапазоне 53–80 гГц [6]. Аппликаторы-облучатели обеспечивают плотность падающей энергии ЭМИ не более 10 мВт/см², которая регулируется встроенным аттенюатором в зависимости от типа аппликатора, вводимого эндоназально [6]. Монолечение КВЧ-терапией проведено 32 больным с начальными формами сосудистых заболеваний головного мозга (НФСЗГМ), к которым по критериям Е.В.Шмидта [7] относятся атеросклеротическая дисциркуляторная энцефалопатия I ст. (АДЭ I ст.) и начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга (НПНКМ).

Положительный клинический эффект КВЧ-терапии зарегистрирован у 78,0 % больных. При клинической оценке эффективности терапии регресс

очаговых симптомов в основных функциональных системах отмечен у 62,0 % больных.

Монотерапия начальных форм сосудистых заболеваний головного мозга НФСЗГМ, НПНКМ и АДЭ 1 ст. в течение 10–15 сеансов привела к регрессу клинической симптоматики: головная боль регрессировала в $60,8 \pm 5$ % случаев, кардиалгия — $4,9 \pm 4$ %, нарушение зрения — $38,1 \pm 8$ %, памяти — $38,5 \pm 8$ %. Исчезли жалобы на головокружение у $90,1 \pm 10$ %, шум в ушах — у $90,1 \pm 10$ % больных, пароксизмальные явления — у 40,5 % больных. Снижалось артериальное давление: систолическое на 14,5, диастолическое — на 5,5 мм рт.ст. Достоверно ($P < 0,05$) уменьшилось периферическое сосудистое сопротивление, нормализовались показатели систолической фазы деятельности сердца, мозговой фракции минутного объема ($15,6 \pm 0,6$ %) и церебральной гемодинамики в артериальном и венозном микроциркуляторном русле ($P < 0,05$). При исследовании влияния КВЧ-терапии на центральную и церебральную гемодинамику и микроциркуляцию методами тетраполярной реографии, реоэнцефалографии (РЭГ) и радиоциркулографии выявлено увеличение среднего прироста площади РЭГ волны на $9,6 \pm 4,5$ %. При этом наблюдалась оптимизация сократительной способности миокарда и периферического сосудистого сопротивления, что выражалось в снижении системного артериального давления, приводящем к улучшению мозгового кровообращения в микроциркуляторном звене ($P < 0,05$).

Изучение влияния КВЧ-терапии на микроциркуляцию проводилось у 32 больных с помощью конъюнктивальной биомикроскопии. Так, у 19 больных был выявлен феномен “внутрисосудистой агрегации” эритроцитов с регрессом у 16 больных после терапии. Отмечены улучшение капиллярного кровотока и его ускорение, окраска фона стала более розовой, уменьшились спазмы микрососудов, а также агрегация эритроцитов на $13,5 \pm 1,9$ % и степень выраженности сладж-синдрома.

По данным исследования вегетативного статуса у 13 больных уменьшилась активность эрготропных влияний ($P < 0,05$), отмечена нормализация вегетативной реактивности, обеспечения деятельности, адаптационных возможностей сердечно-сосудистой системы. Достоверно ($P < 0,05$) увеличилось содержание цАМФ в плазме крови на 36 % ($31,6 \pm 1,7$ пмоль/мл, до лечения — $2,9 \pm 1,8$ пмоль/мл) и снизилось содержание цГМФ на 13,8 % ($5,6 \pm 0,8$ пмоль/мл, до лечения — $6,4 \pm 0,9$ пмоль/мл), а также увеличился коэффициент цАМФ/цГМФ на 21,9 %.

В динамике КВЧ-терапии уменьшалась агрегация эритроцитов и нормализовалась их поверхностная цитоархитектоника. Биоэлектрическая активность мозга при КВЧ-терапии также сопровождалась тенденцией к уменьшению уровня церебральной активности (α -индекс после лечения — $48,6 \pm 2,6$ %, до лечения — $45,6 \pm 0,3$ %) и улучшению церебральной реактивности. В 54 % случаев электроэнцефалограмма характеризовалась организованным и гиперсинхронным типом — 1,4 по классификации Е.А.Жирмунской [8]. У больных не выявлено непереносимости КВЧ-терапии или каких-либо побочных реакций.

Таким образом, широкодиапазонная КВЧ-терапия заметно влияет на состояние сосудистого тонуса и особенно микроциркуляторного русла, улучшает реологические свойства крови, уменьшая агрегацию эритроцитов и нормализуя их поверхностную цитоархитектонику. Поэтому целесообразно включать эндоназальную КВЧ-терапию в комплексное лечение больных с цереброваскулярной патологией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гассанов Л.Г., Писанко О.И., Плясецкий В.И. и др. Экологические факторы медицинского направления // Электронная промышленность. — 1991. — № 3. — С. 64–66.

2. Карлов В.А., Родишадт И.В., Калашников Ю.Д. и др. Опыт применения КВЧ-терапии миллиметрового диапазона при сосудистых заболеваниях головного мозга. // Сов. медицина. – 1991. – № 3. – С. 20–21.
3. Нечитайло Ю.Д., Ескін О.Р., Крапивкіна та ін. Мікрохвильова резонансна терапія у хворих з ранніми проявами порушень мозкового кровообігу при вегетосудинній дистонії // Судинні захворювання головного мозку. – Харків: ХМІ, 1993. – С. 26–27.
4. Пресман А.С. Электромагнитные поля и живая природа. – М.: Наука, 1968. – 288 с.
5. Самохина А.А., Миндубаева Ф.А. Взаимосвязь системной и органной гемодинамики при микроволновом воздействии // Механизмы биологического воздействия электромагнитных излучений: Тез. докл. – Пущино, 1982. – С. 42–43.
6. Сулима Т.Н., Фисун А.И., Фурсов А.М. и др. Спектральный анализ влияния излучения миллиметрового диапазона на нейродинамическую организацию деятельности головного мозга // ДАН Украины. – 1994. – № 11. – С. 141–144.
7. Шмидт Е.В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга // Журн. невропатол. психиатрии. – 1985. – 85, № 9. – С. 1281–1291.
8. Жирмунская Е.А. Функциональная взаимосвязь больших полушарий мозга человека. – Л.: Наука, 1989. – 132 с.

Харьковский ин-т усовершенствования врачей МЗ Украины

Поступила 19.03.96

В.А.МАЛАХОВ

ШИРОКОДІАПАЗОННА КВЧ-ТЕРАПІЯ ХВОРИХ З ПОЧАТКОВОЮ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

Харківський інститут удосконалення лікарів МОЗ України

Особливістю методу монолікування хворих широкодіапазонною КВЧ-терапією є ендоназальне опромінення. Відзначені регресія неврологічного дефіциту, оптимізація центральної і церебральної гемодинаміки, поліпшення мікроциркуляції і мікрореологічних властивостей крові, нормалізація в системі циклічних нуклеотидів.

V.A.MALAKHOV

A WIDE-RANGE KHF-THERAPY OF THE PATIENTS WITH THE PRIMARY CEREBROVASCULAR PATHOLOGY

Institute of Advanced Medical Training, Kharkov

A distinguishing feature of the method of monotreatment of the patients with a wide-range KHF-therapy is the endonasal irradiation. There were reported the regression of the neurologic deficit, optimization of the central and cerebral hemodynamics, improvement of microcirculation and microrheologic properties of blood, normalization of the system of the cyclic nucleotides.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.822. 1:612.57

**Д.Э.Пашаева, Р.Г.Шейхова, А.А.Эмирбекова,
Э.З.Эмирбеков**

СВОБОДНЫЕ И СВЯЗАННЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ МОЗГА ПРИ ГИПОТЕРМИИ И ПОСЛЕДУЮЩЕМ САМОСОГРЕВАНИИ ЖИВОТНЫХ

Согласно существующим представлениям влияние гипотермии на метаболизм в большей мере определяется избирательностью биохимического активирования и ингибирования в головном мозге [2, 4]. Прямым эффектом охлаждения является изменение структуры мембран и активности ферментов, прежде всего, в мозге [5]. Изменение содержания нейроактивных веществ при гипотермии вторично сказывается на метаболизме мозга, модулируя активность ферментов и мембранных структур [4]. Большая часть таких аминокислот, как глутаминовая (Глу), аспарагиновая (Асп) и гамма-аминомасляная (ГАМК), в мозге находится в связанной с белками и мембранными структурами форме [7], модифицируя их. Процесс перехода свободных аминокислот в связанные может играть важную роль не только в обмене самих аминокислот, но и в функциональной деятельности мозга. Исходя из этого, мы исследовали содержание свободных и связанных Глу, Асп и ГАМК в мозге при разной глубине гипотермии и в постгипотермическом периоде. Эксперименты проводили на лабораторных белых крысах-самцах массой 150–200 г. Ректальную температуру животных снижали в специальных камерах с циркулирующей холодной водой (4 °С). Гипо-

термию проводили постепенно так, чтобы за 55–60 мин температура достигала 20–19 °С. Для изучения самосогревания гипотермированных (до 30, 20–19 °С) крыс оставляли в лаборатории до восстановления нормотермии и затем исследовали их через 3 ч и через 7 сут. После окончания эксперимента контрольных и подопытных животных быстро обезглавливали, извлекали большие полушария мозга. Мозг, очищенный от кровеносных сосудов, опускали в холодный раствор Рингера и гомогенизировали (в соотношении ткань — раствор 1:5), затем центрифугировали. В надосадочной жидкости определяли свободные аминокислоты, в осадке — связанные [7]. Для определения связанных аминокислот к осадку добавляли 1 мл раствора Рингера, затем 3,5 мл 15%-го ТХУ и оставляли на 30 мин при температуре 0–2 °С. К осадку добавляли 2,5 мл раствора Рингера и после ресуспендирования центрифугировали. Полученную надосадочную жидкость сливали с первой порцией центрифугата. После промывания эфиром определяли количество аминокислот электрофорезом на бумаге [3].

Содержание свободных и связанных дикарбоновых аминокислот и ГАМК в больших полушариях головного мозга крыс при гипотермии и последующем самосогревании (мкмоль/г свежей ткани), $M \pm m$; $n=5-6$

Группа животных	Глутамат		Аспартат		ГАМК	
	свободный	связанный	свободный	связанный	свободный	связанный
Контрольные (интактные)	8,15±0,15	1,39±0,13	5,90±0,11	1,37±0,09	5,18±0,61	0,99±0,09
Гипотермированные до 30 °С	7,80±0,76	1,55±0,05	2,89±0,18	1,42±0,11	7,20±0,69	2,20±0,53
	3,32±0,22	0,70±0,07	3,50±0,52	0,62±0,04	8,28±0,26	3,86±0,17
Самосогревшиеся после гипотермии 30 °С через 3 ч	7,44±0,22	1,42±0,05	6,30±0,22	1,20±0,06	5,90±0,23	1,25±0,03
	8,45±0,49	2,09±0,17	4,43±0,33	1,04±0,06	3,15±0,10	1,36±0,16
Самосогревшиеся после гипотермии 20–19 °С через 3 ч	3,37±0,16	2,32±0,09	1,43±0,02	1,66±0,04	5,53±0,04	1,62±0,08
	6,96±0,45	1,68±0,23	1,04±0,04	1,47±0,32	2,69±0,24	1,60±0,15

Нами обнаружено (таблица), что в начальной фазе гипотермии крыс (30 °С) в содержании свободной и связанной форм Глутамата изменение не происходит, общий фонд Аспартата снижается за счет свободной формы, а количество обеих форм нейромедиатора торможения — ГАМК значительно увеличивается. При дальнейшем снижении температуры тела крыс до 20–19 °С наблюдается резкое (в 2–2,5 раза) снижение содержания как свободной, так и связанной форм дикарбоновых аминокислот. При этом содержание в мозге свободной ГАМК увеличивается на 59,8 %, связанной — на 290 % по сравнению с таковым у интактных животных. Как показывают результаты (см. таблицу), при самосогревании после умеренной (30 °С) гипотермии через 3 ч происходит нормализация определяемых показателей, а через 7 сут наблюдаются увеличение содержания связанной формы Глутамата и ГАМК, снижение содержания свободной и связанной форм Аспартата. Некоррелятивные изменения в концентрации свободной и связанной форм исследуемых аминокислот при самосогревании после перенесенной гипотермии 20–19 °С через 3 ч и через 7 сут свидетельствуют о том, что при глубокой гипотермии в метаболизме аминокислот происходят значительные дискоординационные процессы, которые могут сохраняться 30–45 дней [11]. Исследовалось состояние глубокой гипотермии, вызванной трехкратным снижением температуры тела крыс до 20–19 °С, на фоне которого уменьшалось содержание как свободной, так и связанной форм: Глутамата (соответственно в 4,8 и 4,2 раза) и Аспартата (в 5,7 и 4,6 раза). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод: процесс ассоциации белков-ферментов и мембранных структур мозга с низкомолекулярными компонентами подвергается температурной регуляции. При низкой температуре синапсомы мозга аккумулируют нейротрансмиттеры [9], в мозге обнаружены чувствительные к холоду синапсомы [6]. При холодовой стимуляции нервных окончаний высвобождаются гормоны с белками. Ассоциация гормонов в синапсоме гипоталамуса зависит от температуры. В мозге обнаружена температурная зависимость транспорта Глутамата, Аспартата и ГАМК [8]. Таким образом, наши данные об изменении содержания свободных и связанных форм аминокислот в мозге при гипотермии свидетельствуют о нарушении не только метаболической, но и нейротрансмиттерной и модуляторной роли Глутамата, Аспартата и ГАМК в структурно-биохимической интеграции мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаев Р.А., Эмирбеков Э.З. Содержание свободных аминокислот в мозге при гипотермии и в разные сроки постгипотермического периода // Вопросы мед. химии. — 1980. — Вып. 6. — С. 402–408.
2. Грищенко В.И. Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тез. докл. междунар. конф. — Харьков, 1988. — С. 4–5.
3. Эмирбеков Э.З. Азотистый метаболизм мозга при гипотермии и зимней спячке. — Махачкала: Дагучпедгиз, 1969. — 136 с.

4. Эмирбеков Э.З. Адаптация биохимической активности мозга к низкой температуре тела. Организованный мозг // Материалы науч. конф. — М.: Б. и., 1993. — С. 62–64.
5. Эмирбеков Э.З., Львова С.П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. — Ростов н/Д: Изд-во Рост. ун-та, 1985. — С. 80.
6. Baker R.V., Vilhardt H., Hope D.B. Cold induced of hormone and proteine from nerve endings isolated from bovine neural-lobes // J. Neurochem. — 1975. — 24, № 5. — P. 1091–1093.
7. Elliot K.A.C., Khan R.T., Bilodean F., Lovell R.A. Bound Y-aminobutyric and other amino acids in brain // Can. J. Biochem. — 1965. — 43. — P. 407–416.
8. Emirbekov E.Z., Sershen H., Lajtha A. Lack of effects of hypothermia on cerebral amino acid uptake in vivo // Brain Res. — 1977. — 125. — № 7. — P. 187–191.
9. Kontro F., Oja S.S. Taurin uptake by rat brain synaptosomes // J. Neurochem. — 1978. — 33. — P. 507–517.

НИИ биологии
Дагестанского ун-та, г. Махачкала

Поступило 01.03.96

УДК 576.315.42.085.23:612.592

В. И. Строна

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В НЕКОТОРЫХ ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ОХЛАЖДЕНИИ И РЕАБИЛИТАЦИИ

Использование гипотермии в медицинской практике для лечения различного рода патологических состояний невозможно без экспериментального изучения и научного обоснования тех изменений, которые происходят в организме при различных уровнях при действии столь сильного стрессорного фактора. Несмотря на наличие информации о характере морфофункциональных изменений в органах и тканях охлаждаемых животных [1, 5], процессы биосинтеза в клетках различных органов при общей гипотермии, а также в период реабилитации мало изучены. Между тем изучение клеточного анаболизма в такой ситуации позволит глубже проникнуть в механизмы "холодовой травмы" и целенаправленно корректировать патологические изменения, вызванные действием холода. Цель работы — изучение процессов биосинтеза (ДНК, белки) в клетках сердца, печени и почек животных после острого охлаждения и через сутки после воздействия. Объектом исследования служили крысы-самцы линии Вистар массой 180–220 г. Охлаждение животных проводилось в воде с температурой 2–5 °С под контролем термометрии (как правило, такая температура достигается через 5 мин, после чего животные теряют способность удерживаться на воде и тонут). Животных извлекали из воды и помещали на иммобилизационном станке в комнату с температурой воздуха 20–22 °С, в которой происходило самонагревание животных до нормотермии. За 60 мин до забоя животным внутрибрюшинно вводили ³H-тимидин и ¹⁴C-гидролизат белка в дозе 50 мКи на 100 г массы. Как правило, за это время (после снятия действия холода) ректальная температура приближалась к норме. Животных забивали декапитацией, извлекали органы, которые подвергали биохимическим исследованиям. Вторую группу животных (после достижения нормальной температуры тела) помещали в клетку при обычных условиях вивария. Через сутки после глубокой гипотермии животных забивали с предварительным введением (на 60 мин) ука-

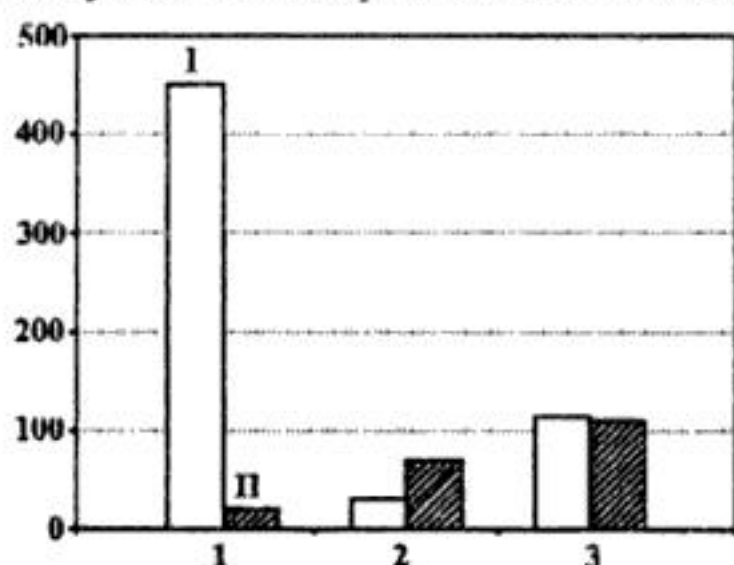


Рис. 1. Синтез ДНК (I) и белков (II) в органах крыс после острого охлаждения. По оси ординат — удельная радиоактивность (имп./мин на 1 мг вещества); по оси абсцисс: 1 — сердце, 2 — печень, 3 — почка

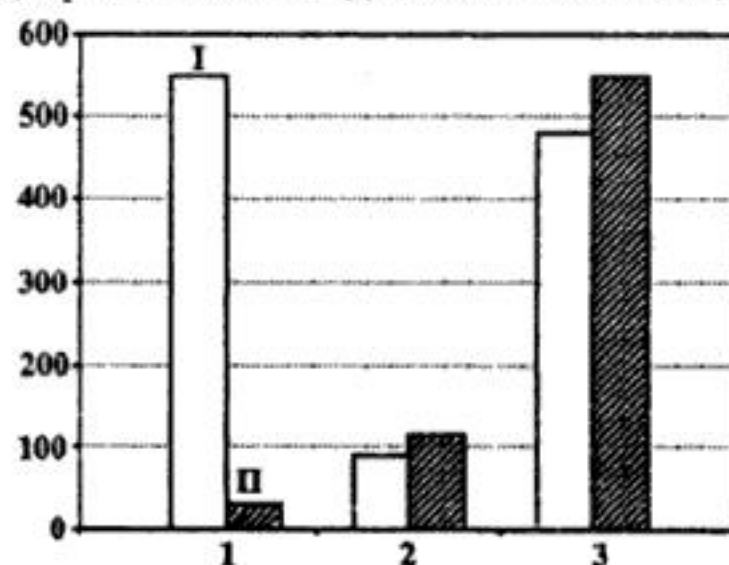


Рис. 2. Синтез ДНК (I) и белков (II) в органах крыс через сутки после глубокой гипотермии. По оси ординат — удельная радиоактивность (имп./мин на 1 мг вещества); по оси абсцисс: 1 — сердце, 2 — печень, 3 — почка

занных выше изотопов. Из каждого органа брали навеску ткани (100 мг), гомогенизировали ее в стеклянном гомогенизаторе до полного измельчения. Полученную взвесь клеток подвергали химическому фракционированию по модифицированному методу Шмидта-Тоннхаузера [7], удельную радиоактивность определяли во фракции ДНК и белков. Радиоактивность проб подсчитывали на бумажных фильтрах с помощью сцинтилляционного счетчика "Бекман" (США). Концентрацию этих компонентов находили спектрофотометрически и рассчитывали по формулам для

ДНК по [4] и белков [8]. Согласно полученным результатам можно сделать вывод о различной степени выраженности ответа изученных органов на холодовой стресс. При сравнении результатов интенсивности синтеза ДНК и белков в органах непосредственно после общего охлаждения крыс и через сутки очевидно, что эти процессы спустя сутки реабилитации активируются. Причем наиболее выраженная реакция наблюдается в ткани почки: синтез ДНК возрастает в 4,8 раза, а белков — в 5,5 раза (рис. 1, 3 и рис. 2, 3). В ткани сердца увеличение синтеза ДНК и белков менее выражено по сравнению с тканью почки, хотя направленность на активацию этих процессов после суточной реабилитации явно выражена. Синтез ДНК при этом возрастает на 21 %, белка — на 30 % (рис. 1, 1 и рис. 2, 1). После суточной реабилитации охлажденных животных анаболические процессы в печени по своей интенсивности менее выражены, чем в ткани почки, но значительно активнее, чем в ткани сердца. Так, удельная радиоактивность ДНК в остром периоде снижения температуры составляет в ткани печени 30 имп./мин на 1 мг ДНК (рис. 1, 2), через сутки — 90 имп./мин (рис. 2, 2), т.е. увеличивается в 3 раза. Интенсивность синтеза белков в восстановительном периоде возрастает на 170 %. Таким образом, очевидно, что через сутки после глубокой гипотермии в органах охлаждаемых животных активизируются процессы синтеза ДНК и белков, причем процесс этот более выражен в ткани почки. Возможно, это связано с тем, что при охлаждении и, как следствие, повреждении клеток в кровь выделяется “ишемический токсин” — вещество белковой природы, неблагоприятно влияющее на деятельность различных органов [3]. Поскольку почки в этой ситуации работают с повышенной нагрузкой по выведению различных шлаков из организма, возможна стимуляция клеточной активности ткани почки.

Тем не менее активация биосинтетических процессов в исследуемых органах, наблюдаемая через сутки, не свидетельствует о нормализации различных функций организма. Следовая реакция после глубокой гипотермии затягивается на месяцы. Так, по данным [2], у кроликов, которых охлаждали в течение 2 ч до температуры 24 °С интенсивность синтеза белков оказалась сниженной через 30 дней после охлаждения. Известно, что процессы образования белков тесно связаны с обменом нуклеиновых кислот. В опытах на кроликах обнаружено, что гипотермия вызывает в отдаленном постгипотермическом периоде нарушение синтеза нуклеиновых кислот: в сердце оно наблюдалось в течение месяца после охлаждения; в печени нормализация наступала намного позже [6]. Наши данные подтверждают это заключение: в течение суток после глубокой гипотермии интенсивность синтеза ДНК в сердце возрастала на 22, в печени — на 300 %, тогда как в почках — на 480 %. Сдвиги белкового обмена после охлаждения могут сохраняться длительное время. Причиной этого является, с одной стороны, снижение процесса синтеза белков, а с другой, — интенсификация процессов распада белковой молекулы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Луговой В.И., Мазалов В.К., Скорняков Б.А. и др. Динамика некоторых функциональных показателей сердечно-сосудистой системы и реологических свойств крови у крыс при остром охлаждении // Влияние охлаждения на биол. объекты: Сб. науч. тр. — Харьков. — 1990. — С. 91–94.
2. Никулин В.И. Интенсивность синтеза белков органов и тканей в раннем постгипотермическом периоде // Эксперим. хирургия и анестезиология. — 1959. — № 2. — С. 39–42.
3. Оксман Т.А., Далин М.В., Кованов В.В. Ишемический токсин // Докл. АН СССР. — 1971. — № 4. — С. 980–983.
4. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. — 1958. — 23, № 5. — С. 656–662.
5. Ткаченко С.И. Морфологическая характеристика изменения миокарда при общей гипотермии // Влияние охлаждения на биол. объекты: Сб. науч. тр. — Харьков. — 1990. — С. 155–157.
6. Явич М.П. Влияние гипотермии на обновление нуклеиновых кислот различных органов и тканей // Эксперим. хирургия и анестезиология. — 1959. — № 2. — С. 55–56.
7. Fleck A., Munro H. The procedure of ultraviolet adsorption measurement in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation // Biochem. Biophys. acta. — 1962. — 55, № 5. — P. 571–578.
8. Kalb V., Bernlor R. A new spectrophotometric Assay for Protein in cell Extracts // Anal. biochem. — 1977. — 82. — P. 362–371.

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

Поступило 28.03.96

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

3¹⁹⁹⁶

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

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

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

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

ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1996. №3. 1-56 ИНДЕКС 70474