

3

ISSN 0233-7673

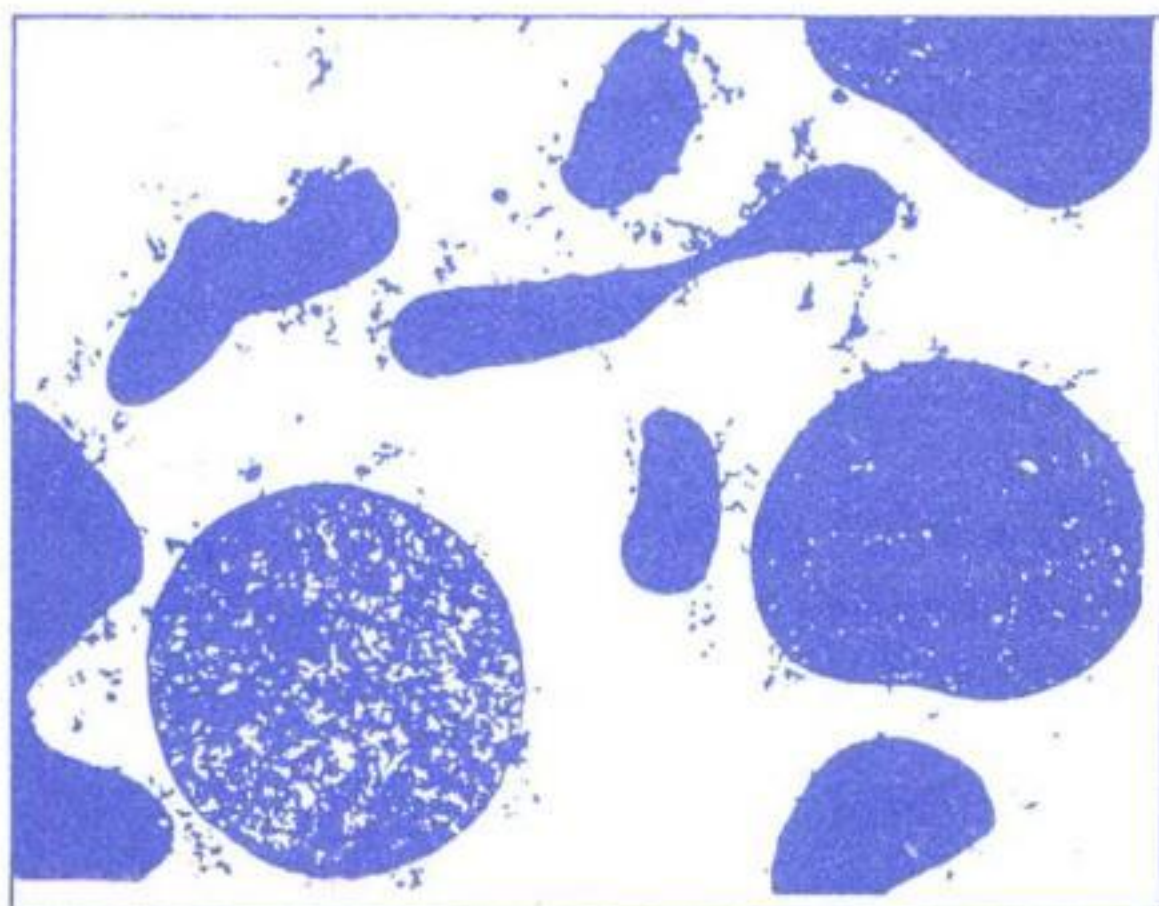
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1997

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЯВЛЕНИЯ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО
КРИОГЕМОЛИЗА *Е. А. Гордиенко, С. Е. Коваленко*

КОНФОРМАЦИОННЫЕ И ОБЪЕМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ЭРИТРОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТОГРЕВА В
ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ЭКВИЛИБАЦИИ ИХ С
КРИОПРОТЕКТОРОМ ПЭО-1500 *Л. А. Бабийчук*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ САХАРОЗОСОДЕРЖАЩЕГО РАСТВОРА ПРИ
ХОЛОДОВОМ ХРАНЕНИИ ЦЕЛОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ
Л. П. Кравченко, И. В. Шанина, А. М. Белоус, В. Сампсон

Главный редактор В.И.Грищенко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Editor-in-Chief V.I.Grishchenko

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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



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

1997

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

<i>Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е.</i> Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза	3
<i>Бабийчук Л.А.</i> Конформационные и объемные изменения эритроцитов в процессе замораживания-отогрева в зависимости от условий эквilibрации их с криопротектором ПЭО-1500	8
<i>Рамазанов В.В., Бондаренко В.А.</i> Влияние ионной силы на развитие чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку	15
<i>Карева Л.В., Луговой В.И.</i> Устойчивость лизосом, выделенных из печени и гепатоцитов крыс, к действию концентрационных факторов	19
<i>Безуглый Н.Д., Медведовский А.В.</i> Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих в растворах криопротекторов. III. Метод комплексной оценки потенциального повреждающего действия проникающих криопротекторов	22
<i>Кузнецов И.В., Гарбузенко О.Б., Кузьмис Э.А., Никитина Н.А., Перский Е.Э., Утевская Л.А.</i> Особенности обмена коллагена кожи позвоночных животных при температурной адаптации	27
<i>Никольченко А.Ю.</i> Влияние замораживания-оттаивания и длительного хранения при -196°C в присутствии некоторых криопротекторов на структурно-функциональные особенности церулоплазмينا	32
<i>Ченчик Т.А., Луговой С.В., Волков В.И.</i> Влияние экстремальных факторов на систему циклических нуклеотидов и простагландинов в сердце крыс различных линий	38
<i>Сергиенко Н.Г., Кратенко Р.И.</i> Особенности параметров связывания ^3H -серотонина с серотониновыми рецепторами первого типа в эпилептогенных структурах головного мозга крыс	42

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

<i>Кравченко Л.П., Шанина И.В., Белоус А.М., Сампсон В.</i> Эффективность сахарозосодержащего раствора при холодовом хранении целой печени крысы	45
<i>Ахмад М.М., Ковалев Г.М., Пиняев В.И., Чадаев В.Е.</i> Влияние гипотермии и обработки среды хранения дополнительным постоянным магнитным полем на кинетические характеристики спермиев человека	48

КРИОМЕДИЦИНА

<i>Малова Н.Г.</i> Структурно-метаболические изменения суставного хряща позвоночного сегмента после локального криовоздействия	52
--	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Межидов С.Х., Моисеев В.А.</i> О некоторых особенностях метода ЭПР-спинового зонда в криобиологии	55
<i>Марченко В.С.</i> Модификация кардиотропных эффектов норадреналина и ацетилхолина при гипотермии	56
<i>Юрченко Г.Г., Ахмад М.М., Крамар М.И.</i> Сохранность акросом у спермиев подвижной фракции эякулята человека, хранившихся в условиях гипотермии	57
<i>Межидов С.Х.</i> Подход к оценке цитотоксичности криопротекторов	59
<i>Бабийчук В.Г., Латогуз И.К.</i> Влияние краниocereбральной гипотермии крыс на сопряжение окислительного фосфорилирования и дыхания митохондрий в тканях миокарда	60
<i>Зинченко А.В., Соловьева А.С.</i> Влияние замораживания и температурного циклирования на процесс термоденатурации сывороточного альбумина быка	61
<i>Дзюба Б.Б.</i> Активация, реактивация и оплодотворяющая способность спермиев белого толстолобика (<i>Hypophthalmichthys molitrix Valenciennes</i>) после разбавления криозащитной средой	62
<i>Легач Е.И.</i> Синтез кортизола тканевыми и клеточными культурами коры надпочечных желез новорожденных и половозрелых свиней	63

<i>Кратенко Р.И.</i> Модуляция DL-триптофаном серотониновых рецепторов первого типа головного мозга крыс с высокой и низкой аудиогенной возбудимостью	65
<i>Ильченко В.А.</i> Иммунологические изменения в организме больных с послеродовой инфекцией под влиянием введения криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека	66
<i>Дзюба Б.Б., Дрокин С.И., Копейка Е.Ф.</i> Некоторые аспекты криоконсервации спермы пеллигаса (<i>Mugil soiyu</i>)	67
<i>Палагина И.А.</i> Влияние дисперсных азокрасителей на биосинтез нуклеиновых кислот	68

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Gordienko E.A., Kovalenko S.E.</i> Basic rules of the event of posthypertonic cryohemolysis	3
<i>Babiyshuk L.A.</i> Conformational and volumetric changes in red cells in the process of freeze-thawing depending on the conditions of their equilibration with a PEO-1500 cryoprotectant	8
<i>Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.</i> Effect of ionic strength on erythrocytes sensitivity to hypertonic shock	15
<i>Kareva L.V., Lougovoy V.I.</i> Resistance of lysosomes, isolated from the liver and hepatocytes of rats, to the action of concentration factors	19
<i>Bezugly N.D., Medvedovsky A.V.</i> Osmotic response of mammalian oocytes and embryos in cryoprotective solutions. III. A method of complex evaluation of potential damaging action of penetrating cryoprotectants	22
<i>Kuznetsov I.V., Garbuzenko O.B., Kuzmis A.E., Nikitina N.A., Persky E.E., Ulevskaya L.A.</i> Peculiar features of collagen exchange in the skin of the vertebrate animals during temperature adaptation	27
<i>Nikolchenko A.Yu.</i> Effect of freeze-thawing and long-term storage at -196°C in the presence of some cryoprotectants on the structural-functional peculiarities of ceruloplasmin	32
<i>Chenchik T. A., Lugovoy S.V., Volkov V.I.</i> Action of extreme factors on the system of cyclic nucleotides and prostaglandins in the hearts of rats of various lines	38
<i>Sergiyenko N.G., Kratenko R.I.</i> Peculiar features of the parameters of binding of ^3H -serotonin with serotonin receptors of the first type in the epileptogenic structures of the rat brain	42

CRYOMEDICINE

<i>Malova N.G.</i> Structure-metabolic changes of the articular cartilage of the vertebral segment following local cryotreatment	45
--	----

CRYOCONSERVATION OF BIOSYSTEMS

<i>Kravchenko L.P., Shanina I.V., Belous A.M., Sampson V.</i> Efficiency of a sucrose-containing solution in cold storage of the whole rat liver	48
<i>Ahmad M.M., Kovalev G.M., Pinyayev V.I., Chadayev V.D.</i> Effect of hypothermia and treatment of storage medium by constant magnetic field on kinetic characteristics of human spermia	52

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Mezhidov S.Kh., Moiseyev V.A.</i> On some peculiarities of the method of EPR-spin probe in cryobiology	55
<i>Marchenko V.S.</i> Equilibration of cardiotropic effects during hypothermia	56
<i>Yurchenko G.G., Ahmad M.M., Kramar M.I.</i> Survival of acrosomes in spermia of motile fraction of the human ejaculate, stored under hypothermic conditions	57
<i>Mezhidov S.Kh.</i> The approach to evaluating cytotoxicity of cryoprotectants	59
<i>Babiyshuk V.G., Latoguz I.K.</i> Effect of craniocerebral hypothermia of rats on the conjugation of oxidative phosphorylation and respiration of mitochondria in myocardial	60
<i>Zinchenko A.V., Solovyeva A.S.</i> Effect of freezing and temperature cyclation on the process of thermal denaturation of bovine serum albumin	61
<i>Dzuba B.B.</i> Activation, re-activation and fertilizing ability of spermia of white carp (<i>Hypophthalmichthys molitrix Valenciennes</i>) following dilution with cryoprotective medium	62
<i>Legach V.I.</i> Synthesis of cortisol by tissue and cell cultures of the adrenal gland cortex of newborn and adult pigs	63
<i>Kratenko R.I.</i> Modulation of serotonin receptors of the first type by DL-tryptophan in the brain of rats with high and low audiogenic excitability	65
<i>Ilchenko V.A.</i> Immunologic changes in the organisms of patients with obstetric infection influenced by injection of cryopreserved cells of human embryonic liver	66
<i>Dzyuba B.B., Drokin S.I., Kopeika E.F.</i> Some aspects of cryopreservation of <i>Mugil soiyu</i> fish sperm	67
<i>Palagina I.A.</i> Effect of dispersed dying agents on biosynthesis of nucleic acids	68

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

Адрес редакции:

310015, Харьков,

ул. Переяславская, 23,

тел. (0572) 72-10-39

Научный редактор *В.И.Луговой*

Редактор *Л.А.Рябинина*

Компьютерный набор и верстка: *Л.А.Рябинина, А.М.Шаталов, И. Г. Пятигорская*

Подп. в печ. 08.10.97. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 6,0.

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, С.Е.Коваленко

ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЯВЛЕНИЯ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО КРИОГЕМОЛИЗА

С помощью построенной авторами количественной биофизической модели гипертонического криогемолиза (ГК) объясняются основные закономерности этого явления.

На основании приведенных в литературе данных [1], несмотря на некоторую их противоречивость, можно сформулировать твердо установленные закономерности явления гипертонического криогемолиза:

1) сама по себе экспозиция эритроцитов человека в гипертонических растворах NaCl, сахарозы и других не проникающих через клеточные мембраны веществ при постоянной температуре (в диапазоне 45–25 °С) вызывает гемолиз значительно меньший, чем гемолиз, возникающий в процессе следующего за этой экспозицией охлаждения до температуры ниже 13–8 °С;

2) эритроциты человека в изотонической среде не повреждаются при охлаждении в области положительных температур;

3) эритроциты человека становятся чувствительными к охлаждению до температуры ниже 13–8 °С, если охлаждению предшествует экспозиция клеток в гипертоническом растворе NaCl, сахарозы или другого не проникающего через клеточные мембраны вещества, осмолярность которого превышает определенное критическое значение (1200–1400 миллиосмолей), при температуре выше 13 °С;

4) зависимость чувствительности эритроцитов человека к процедуре ГК от осмолярности внеклеточного раствора, в котором взвешены клетки, достигает максимума при 2000 миллиосмолей, а затем с ростом осмолярности внеклеточного раствора до 3800 миллиосмолей падает;

5) чувствительность эритроцитов человека к охлаждению на второй стадии ГК растет с увеличением продолжительности изотермической экспозиции клеток в гипертоническом растворе NaCl сверхкритической концентрации на первой стадии ГК от нуля при нулевой продолжительности до максимума при значении этого параметра 1–10 мин, а затем по мере дальнейшего его увеличения снова падает до нуля; в гипертонических растворах сахарозы сверхкритической концентрации указанная чувствительность монотонно растет со временем выдержки клеток в этих растворах на первой стадии ГК;

6) более высокая скорость охлаждения на второй стадии ГК в диапазоне скоростей 60–0,3 °С/мин приводит к большему гемолизу, однако при “мгновенном” понижении температуры гемолиз не возникает;

7) чувствительность эритроцитов к процедуре ГК увеличивается (начиная с нуля) при повышении температуры, при которой осуществляется первая стадия, от 13 до 45 °С, и при уменьшении температуры, до которой производится охлаждение на второй стадии ГК от 13 до 0 °С или даже более низкой температуры, при которой, однако, в образце еще не возникает кристаллизация;

8) гемолиз начинается на второй стадии ГК, когда температура суспензии эритроцитов падает ниже 13 °С;

9) подвергнутые ГК (и, в частности, охлаждению до 0 °С на второй стадии) и 30-минутной экспозиции на ледяной бане эритроциты имеют большие, чем в контроле, суммарную массу, массу внутриклеточной воды, содержание меченой сахарозы и натрия внутри клеток, но меньшее, чем в контроле, содержание внутриклеточных ионов калия;



10) добавление к суспензии эритроцитов наряду с NaCl или сахарозой проникающего в клетки криопротектора (при одной и той же осмолярности внеклеточного раствора) снижает величину ГК;

11) эритроциты, подвергнутые воздействию гипертонической среды при температуре ниже 12 °С, а затем отогреты до температуры выше 20 °С, становятся менее чувствительными к последующей процедуре ГК, чем в отсутствие указанной предобработки;

12) истощение эритроцитов по АТФ снижает чувствительность клеток к ГК.

По данным литературы с явлением ГК могут быть связаны тем или иным образом следующие эффекты:

1) обезвоживание до минимально возможного объема и деформация клеток;

2) латеральная сепарация мембранных компонентов;

3) термотропные, структурно-фазовые превращения в мембране при температуре 13–8 °С;

4) нарушение свойства полупроницаемости клеточных мембран и исчезновение градиента растворенных веществ на мембране;

5) частичная потеря мембранами клеток липидов и других мембранных компонентов;

6) распад спектринактиновой сети или нарушение ее взаимодействия с мембранными белками.

Перечисленные эффекты по отдельности или в сочетании друг с другом фигурируют в обсуждении возможных причин и механизма явления ГК в работах разных авторов. Однако до настоящего времени ясного понимания первопричин и механизма этого явления не существует. С помощью построенной нами биофизической модели [3] можно объяснить сформулированные выше основные закономерности явления гипертонического криогемолиза.

Закономерность 1) объясняется следующим образом. Предварительная (до охлаждения) экспозиция клеток в гипертоническом растворе, осмотическое давление которого превышает осмотическое давление физиологического раствора примерно в 5 раз, приводит к натяжению мембраны клеток в результате втягивания отдельных ее участков в “гемоглобиновые карманы”. Этого натяжения, однако, в соответствии с расчетами недостаточно для образования разрыва в мембране (гемолиза) в течение времени эксперимента. Все же вследствие значительного разброса значений клеточных параметров в суспензии уже на этой стадии гемолизу подвергается небольшая часть клеток, причем тем большая, чем больше натяжение мембраны. В первую очередь разрушаются клетки с наименьшими значениями линейного натяжения поры и наибольшими значениями коэффициента поверхностного растяжения мембраны. Значения этих двух клеточных параметров, естественно, зависят от липидного и белкового состава мембран и прилегающих к ним слоев гликокаликса, а также, возможно, от степени их исходной дефектности, которые могут быть неодинаковыми для разных клеток. Охлаждение эритроцитов до температуры ниже 13–8 °С, если оно вызывает фазовый переход мембраны из жидкокристаллического в твердое гелеобразное состояние, приводит к дополнительному натяжению мембраны потому, что средняя площадь, приходящаяся на одну молекулу в мембране в отсутствие деформации, при фазовом переходе уменьшается. Суммарное натяжение мембраны на второй стадии ГК при определенных условиях превышает значение, необходимое для образования разрыва в мембране. Именно поэтому на первой стадии ГК (то есть на стадии изотермической экспозиции в гипертоническом растворе) гемолиз значительно меньший, чем на второй стадии этого явления.

Закономерность 2) в рамках построенной нами модели также находит простое объяснение. В соответствии с выдвинутыми нами представлениями изотропного натяжения мембраны, которое возникает в результате только фа-

зового превращения в ней на второй стадии моделируемого явления, даже в том случае, когда в исходной точке фазового перехода клетка имеет сферическую форму, самого по себе недостаточно для возникновения разрыва в мембране эритроцита. Поскольку при осмотическом давлении внеклеточного раствора, как было показано выше, не превышающем 1300 миллиосмолей, на первой стадии ГК натяжение мембраны отсутствует, то существенный гемолиз клеток при охлаждении в области положительных температур в изотонической среде и в гипертонических растворах с осмотическим давлением ниже 1300 миллиосмолей не наблюдается. Последнее утверждение тем более верно, если эритроциты, как это и есть в действительности, при температуре начала фазового превращения в мембране не имеют сферической формы. Очевидно, в этом случае изотропное натяжение мембраны вообще не возникает, если в течение всего перехода выполняется неравенство

$$\tilde{S}(T) = \tilde{S}_0 \left[\frac{T_2 - T}{T_2 - T_1} + \frac{a_s T - T_1}{a_f T_2 - T_1} \right] \geq (4\pi)^{1/3} [3V(T)]^{2/3}.$$

Закономерность 3) тоже логически вытекает из наших представлений о явлении ГК. Как показывают расчеты, суммарное натяжение мембраны, которое возникает как в результате экспозиции эритроцитов в гипертонических растворах, осмотическое давление которых превосходит 1300 миллиосмолей, так и в результате последующего фазового перехода мембраны из жидкого в твердое состояние на второй стадии ГК при определенных условиях становится настолько большим, что разрыв клетки оказывается неизбежным.

Закономерность 5) объясняется следующим образом. Необходимым условием возникновения разрыва в мембране в результате ГК является осуществление в ней фазового превращения указанного выше типа, которое имеет место только в том случае, если в мембране эритроцита произошло латеральное разделение компонентов, из которых она состоит [4]. Как следует из [1], такое разделение происходит в изотропно растягиваемой на гемоглобиновом сгустке мембране и протекает за время порядка 1-10 мин. Период, за который возникает чувствительность эритроцитов человека к ГК, отождествляется нами со временем, необходимым для завершения латерального разделения мембранных компонентов в изотропно растянутой мембране, которое, в свою очередь, является необходимым условием для осуществления фазового превращения в мембране при 13-8 °С. Таким образом, если продолжительность первой стадии ГК недостаточна для того, чтобы в мембране произошло латеральное разделение липидов на первой стадии и, следовательно, возникло фазовое превращение в мембране на второй стадии, гемолиз при охлаждении не возникает. Очевидно, с увеличением температуры изотермической экспозиции эритроцитов в гипертоническом растворе на первой стадии ГК продолжительность их сенсibilизации к последующему охлаждению уменьшается, так как с увеличением указанной температуры латеральная подвижность мембранных компонентов увеличивается, и наоборот. Тот факт, что по мере дальнейшего увеличения продолжительности изотермической экспозиции клеток в гипертоническом растворе сверхкритической (>1300 миллиосмолей) концентрации на первой стадии ГК чувствительность клеток к последующему охлаждению падает, в рамках построенной нами модели объясняется увеличением проницаемости мембран эритроцитов для катионов при контакте клеток с гипертоническими растворами соли, то есть утечкой ионов внутриклеточного калия из клеток и входом ионов внеклеточного натрия в них. В результате возникновения проницаемости клеточных мембран для в норме не проникающих сквозь них катионов объем клеток увеличивается, а натяжение мембран, втянутых в гемоглобиновый карман, очевидно, уменьшается со временем. Поэтому, если охлаждение клеточной суспензии, то есть вторую стадию ГК, начинать в более поздние моменты изотермической экспозиции клеток в гипертоническом растворе, то суммарное натяжение мембраны, возникающее в результате первой и второй его стадии, будет понижаться. Вместе с ним, очевид-

но, уменьшается и вероятность гемолиза клеток вследствие изотропного натяжения их мембран, то есть с увеличением продолжительности изотермической экспозиции эритроцитов в гипертоническом растворе хлорида натрия сверхкритической концентрации чувствительность эритроцитов человека к ГК падает.

Закономерность 6) также становится понятной в рамках построенной нами биофизической модели явления ГК. При достаточно медленной скорости охлаждения на второй стадии ГК ($T \geq -0,01$ K/c) натяжение мембраны не достигает критического, достаточного для образования разрыва в мембране, значения. С увеличением скорости охлаждения указанного выше значения натяжения мембраны при ГК растет и вероятность образования разрыва в мембране увеличивается. Однако, когда скорость охлаждения становится настолько высокой, что

$$\dot{T} \ll -\frac{T_1 - T_2}{\langle l \rangle (\sigma_{\max})},$$

где $\sigma_{\max}$ – максимальное натяжение мембраны в процессе ГК, а $\langle l \rangle$ определяется формулой [2]

$$\langle l \rangle = \frac{(kT)^{3/2} \sigma}{\pi \gamma D(0) \sqrt{4\sigma^3 - 3\Gamma(\gamma/R_0)^2}} \exp\left(\frac{\pi \gamma^2}{kT\sigma}\right),$$

вероятность разрыва мембраны падает до нуля, так как при таких скоростях охлаждения время нахождения мембраны в натянутом состоянии в процессе ГК становится меньшим, чем время, необходимое для образования поры в мембране.

Закономерность 8) объясняется тем, что, как было указано выше, само по себе натяжение мембраны эритроцита, которое возникает на первой стадии ГК, недостаточно для возникновения разрыва в ней. Только дополнительное натяжение, которое появляется в результате фазового превращения в мембране при температурах 13–8 °С, может привести к нарушению ее целостности и, следовательно, к гемолизу. При охлаждении до температур выше 13–8 °С фазовое превращение в мембране не происходит и дополнительное натяжение не возникает. Таким образом, вероятность нарушения целостности клеточной мембраны при охлаждении до более высокой температуры, чем 13–8 °С, значительно ниже, чем при охлаждении до более низкой температуры.

Закономерность 13) также объяснима. В эритроцитах, истощенных по АТФ, замедляется или прекращается работа калий-натриевого насоса, в результате чего пассивная утечка ионов калия из клеток и вход ионов натрия в них увеличиваются. Поэтому на основании соображений, аналогичных тем, которые были изложены при объяснении закономерности 5), можно прийти к заключению о том, что в этом случае чувствительность клеток к ГК уменьшается.

Закономерность 11), по-видимому, объясняется следующим образом. В процессе изотермической экспозиции в гипертонической среде при температуре ниже 13–8 °С процесс латерального разделения мембранных компонентов за время эксперимента не происходит, так как латеральная диффузия мембранных липидов и белков в мембране, перешедшей из жидкого в твердое состояние, сильно замедляется. Таким образом, при последующих кратковременном отогреве до температуры 20 °С и ГК повреждение клеток не наблюдается в результате последнего из-за отсутствия латерального разделения мембранных компонентов и, следовательно, фазового превращения в мембране на второй стадии ГК.

Добавление к суспензии эритроцитов наряду с хлоридом натрия или сахарозой проникающего в клетки криопротектора (при одной и той же осмолярности внесклеточного раствора) снижает повреждающий эффект ГК потому, что за счет сравнительно более быстрого проникновения криопротектора в клетки, чем катионов, объем клеток увеличивается быстрее, чем в отсутствие

криопротектора, и, таким образом, уменьшаются как натяжение мембраны, так и время ее нахождения в напряженном состоянии. При этом, очевидно, вероятность разрыва мембраны может существенно понижаться, причем тем больше, чем быстрее проникает криопротектор в клетки.

Закономерность 4) можно объяснить следующим образом. С одной стороны, с ростом осмолярности внеклеточного раствора (в области сверхкритических осмолярностей) натяжение мембраны на гемоглобиновом сгустке на первой стадии ГК увеличивается, а с другой стороны, увеличивается и проницаемость мембран эритроцитов для катионов. Второй из указанных эффектов приводит к уменьшению натяжения мембраны со временем экспозиции клеток на первой стадии исследуемого явления. В области небольших сверхкритических концентраций преобладает первый фактор, а в области более высоких концентраций – второй. При некоторой промежуточной концентрации (2000 миллиосмолей) гипертонического раствора, в котором клетки экспонируются на первой стадии ГК, чувствительность эритроцитов к нему максимальна. Проницаемость клеточных мембран для катионов при контакте эритроцитов человека с гипертоническими растворами очень высокой концентрации, по-видимому, становится настолько большой, что спустя уже небольшой промежуток времени с начала экспозиции клеток в высококонцентрированном растворе натяжение мембраны значительно падает до значений, которые даже при дополнительном увеличении за счет фазового перехода при последующем охлаждении не могут привести к разрыву мембраны за времена, сопоставимые с продолжительностью эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордиенко Е.А. Термодинамическая модель явления перераспределения мембранных компонентов в изотропно растянутом замкнутом бислое // Криобиология. – 1987. – № 3. – С. 11–15.
2. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И. О механизме осмотического лизиса эритроцитов // Криобиология. – 1986. – № 2. – С. 23–25.
3. Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е. Биофизическая модель явления гипертонического криогемолиза // Пробл. криобиологии. – 1996. – № 4. – С. 24–32.
4. Gottlieb M.H., Eanes E.D. On phase transition in erythrocyte membranes and extracted membrane lipids // BBA. – 1974. – 373, № 3. – P. 519–522.
5. Morris G.J., Watson P.F. Cold shock injury a comprehensive bibliography // Cryoletters. – 1984. – № 5. – P. 352–372.

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

Поступила 16.07.96

Є.О.ГОРДІЄНКО, С.Є.КОВАЛЕНКО

ОСНОВНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ЯВИЩА ГІПЕРТОНІЧНОГО КРІОГЕМОЛІЗУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

За допомогою розвинутої авторами кількісної біофізичної моделі гіпертонічного криогемолізу пояснюються основні закономірності цього явища.

E.A.GORDIENKO, S.E.KOVALENKO

BASIC RULES OF THE EVENT OF HYPERTONIC CRYOHEMOLYSIS

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

The authors speculate on the basic rules of hypertonic cryohemolysis, using a developed quantitative biophysical model of this event.

Л. А. Бабийчук**КОНФОРМАЦИОННЫЕ И ОБЪЕМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТОГРЕВА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ЭКВИЛИБАЦИИ ИХ С КРИОПРОТЕКТОРОМ ПЭО-1500**

Исследования конформационных изменений эритроцитов после замораживания-отогрева в зависимости от температурных условий предварительной эквilibрации клеток с криопротектором ПЭО-1500 показали, что в процессе замораживания-отогрева эритроцитов, эквilibрированных при 22 °С, усиливаются повреждения и необратимая трансформация переходных форм дискоцитов в гемолитические, происходящие уже на этапе их эквilibрации. Эквilibрация эритроцитов с криопротектором при 0 °С, способствующая сохранению нативной формы клеток, приводит к тому, что приобретенная стабильность формы сохраняется и в цикле замораживания-отогрева. Обнаружено, что характер изменений объема эритроцитов при температурно-осмотическом воздействии на них зависит от температуры эквilibрации клеток с криопротектором и коррелирует со степенью деформации формы клеток.

На повышение тоничности среды эритроцит реагирует как трехмерная система, изменяя свой объем и форму [9], причем температура может регулировать эти процессы, влияя на структуру мембраны [10]. В отличие от молекулярных изменений двумерного липидного матрикса, влияющих на состояние интегральных белков, изменения объема и формы клетки связаны прежде всего с модификацией белкового цитоскелета, стабилизирующего структуру мембраны и контролирующего динамическое поведение ее компонентов [11]. В условиях температурно-осмотического воздействия изменение свойств белков цитоскелета может явиться существенным фактором, определяющим стабильность или нестабильность клеток [1, 2].

Криопротектор полиэтиленоксид с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500), являясь осмотически активным веществом [3], вызывает изменение формы и объема эритроцитов, которое очень сильно зависит от температуры контакта клеток с криопротектором и способа его введения [4]. Проведенные нами ранее исследования конформационных изменений эритроцитов в зависимости от режимов инкубации их с криопротектором ПЭО-1500 убедительно свидетельствуют, что у клеток, эквilibрированных с криопротектором при 22 °С, повреждение и необратимая трансформация переходных форм дискоцитов в гемолитические происходят уже во время эквilibрации клеток с криопротектором. Эквilibрация эритроцитов с ПЭО-1500 при 0 °С способствует сохранению нативной формы клеток. Однако остается неясным, как проявляют себя обнаруженные изменения формы эритроцитов в процессе криоконсервирования. В связи с этим были проведены исследования конформационных изменений эритроцитов после замораживания-отогрева в зависимости от температуры предварительной инкубации их с криопротектором ПЭО-1500, а также исследован характер изменений объема эритроцитов в данных условиях.

Материалом исследования служили эритроциты донорской крови человека. Перед замораживанием эритроциты эквilibрировали с 30%-м раствором криопротектора ПЭО-1500 на 0,01 моль/л фосфатном буфере, содержащем 150 ммоль/л NaCl. Раствор ПЭО-1500 вводили в суспензию эритроцитов при 22 °С одномоментно по каплям и выдерживали 40 мин при данной температуре. При 0 °С криопротектор добавляли в течение 40 мин равными порциями. Соотношение объемов эритроцитовой массы и растворов криопротектора составляло 1:1. Замораживание осуществляли до -196 °С путем погружения контейнера в жидкий азот. Оттаивание производили на водяной бане при температуре 42–44 °С. Ультраструктуру эритроцитов изучали согласно [4] и исследовали в электронном микроскопе ЭВМ-100 АК при ускоряющем напряжении 50 кВ.



Рис. 1. Ультраструктура эритроцитов после замораживания-отогрева клеток, эквивилиброванных с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С. Сечения эритроцитов в форме "восьмерки", "гантели", эллипса (а). Х5000; "розовые" клетки овальной и сферической формы (б). Х5000

Морфометрический анализ плоских изображений сечений эритроцитов проводили в соответствии с рекомендациями [5].

Исследование ультраструктуры эритроцитов после замораживания-отогрева показало, что у клеток, предварительно инкубированных с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С, наблюдается хорошая сохранность ультраструктуры и формы. Значительная часть эритроцитов имеет форму двояковогнутой линзы, случайные сечения которой имеют вид "восьмерки", "гантели", вытянутого эллипса (рис. 1, а). Подавляющее большинство эритроцитов представлено "темными" клетками с гомогенным равномерно распределенным электронно-плотным содержимым. В отдельных полях зрения выявляются единичные поврежденные эритроциты с морфологическими признаками "выхода" части гемоглобина клеток в межклеточное пространство. Это так называемые



Рис. 2. Ультраструктура эритроцитов после замораживания-отогрева клеток, эквивилиброванных с криопротектором ПЭО-1500 при 22 °С. Округлые и эллипсоидные формы сечений эритроцитов (а). Х6000; "розовые" эритроциты с округлыми электронно-плотными образованиями (б). Х5000

"розовые" эритроциты, имеющие частично овальную и сферическую форму, срезы которых имеют вид круга, овала (рис. 1, б).

После замораживания-отогрева клеток, эквивилиброванных с криопротектором ПЭО-1500 при 22 °С, значительно возрастает количество сфероцитов и овалоцитов (рис. 2, а) как по сравнению с нормой (рис. 3, а и 3, б), так и по сравнению с клетками, инкубированными перед замораживанием с ПЭО-1500 при 0 °С (рис. 1, а и 1, б). Существенно увеличивается также и содержание "розовых" эритроцитов с частично "вымываемым" из цитоплазмы гемоглобином. Характерной особенностью ультраструктуры "розовых" эритроцитов является наличие в их цитоплазме многочисленных мелкозернистых структур и округлых, четко контурированных, осмиефильных образований, расположен-

ных как в непосредственной близости от плазмалеммы, так и в глубине клетки (рис. 2, б). В межклеточном пространстве выявляются группы локальных



Рис. 3. Ультраструктура эритроцитов донорской крови в норме. Различные формы сечений нормоцитов (а); Форма сечения дискоцитов с отростками и нормоцитов (б). X5000

скоплений мелких электронно-плотных зерен, вероятно, гранул гемоглобина, вымытых из цитоплазмы поврежденных эритроцитов.

На рис. 4 представлены графики распределений большего линейного размера сечений эритроцитов после замораживания-отогрева клеток без криопротектора (кривая 1) и эквilibрированных с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С (кривая 2) и 22 °С (кривая 3). Как следует из полученных данных, после размораживания клеток, эквilibрированных при 0 °С, наблюдается лучшая сохранность ультраструктуры эритроцитов. При этом график статистического распределения большего линейного размера сечений эритроцитов (кр. 2) мало отличается от такового, характерного для нормы (рис. 5). Координаты вершины графика в норме соответственно равны: 13,5% – ордината, 7,0 мкм – абсцисса. После размораживания эритроцитов, инкубированных при 0 °С, цифровые значения вершины графика распределения большего диаметра сечений этих клеток соответственно равны: 13% – ордината и 6,5 мкм – абсцисса. После замораживания-отогрева клеток, инкубированных с криопротектором ПЭО-1500 при 22 °С, график распределения большего диаметра сечений эритроцитов имеет пологий вид (рис. 4, кр. 3), расположен ближе к кривой 1, характеризующей статистическое распределение диаметров сечений эритроцитов при замораживании без криопротектора, и сильно отличается от графика в норме (рис. 5). Координаты вершины графика (кр. 3) соответственно равны: ордината – 8,5%, абсцисса – 6,0 мкм. Эти данные свидетельствуют, что замораживание-отогрев эритроцитов, инкубированных при 22 °С, сопро-

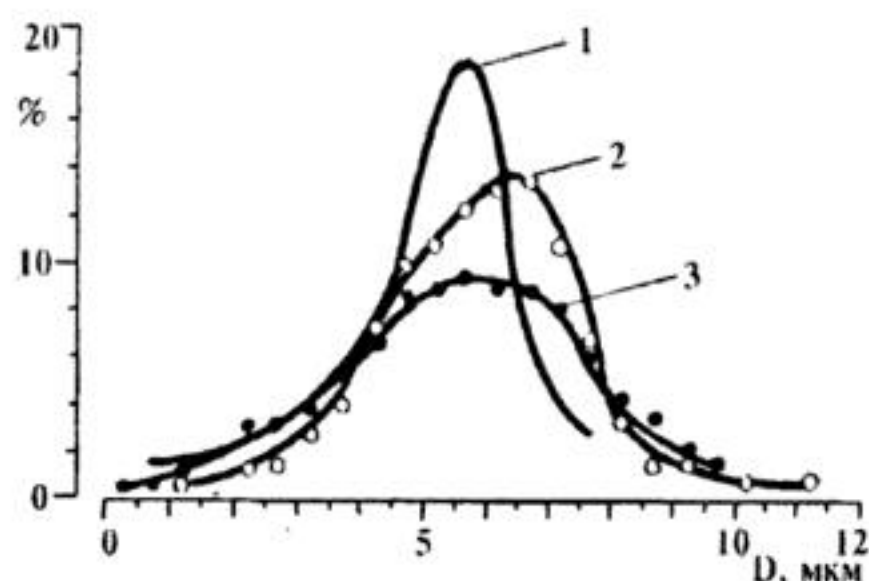


Рис. 4. Распределение большего линейного размера сечений эритроцитов при замораживании без криопротектора (1), после эквilibрации клеток с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С (2) и при 22 °С (3)

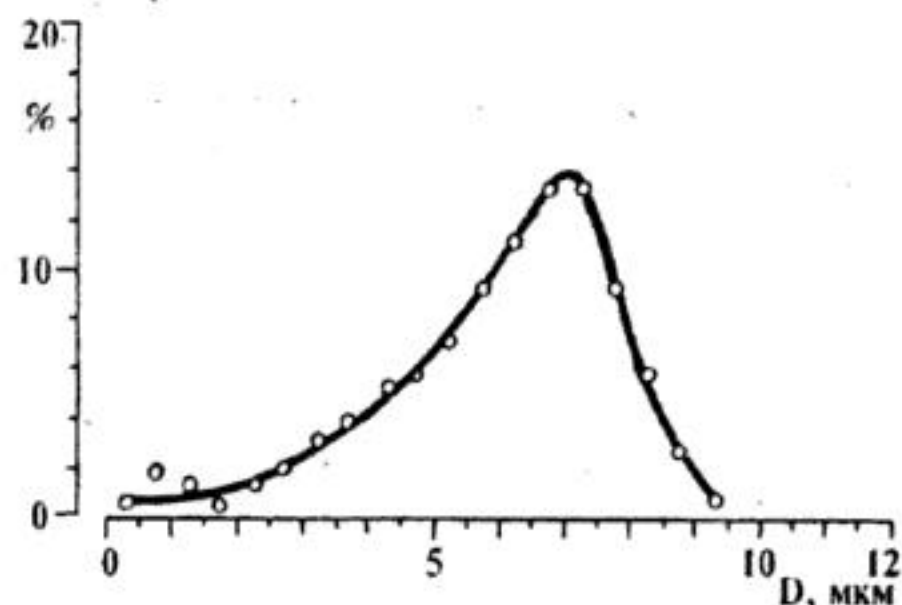


Рис. 5. Распределение эритроцитов в норме в зависимости от большего линейного размера сечений этих клеток. По оси ординат – количество сечений эритроцитов, %; по оси абсцисс – значения большего линейного размера сечений эритроцитов, мкм

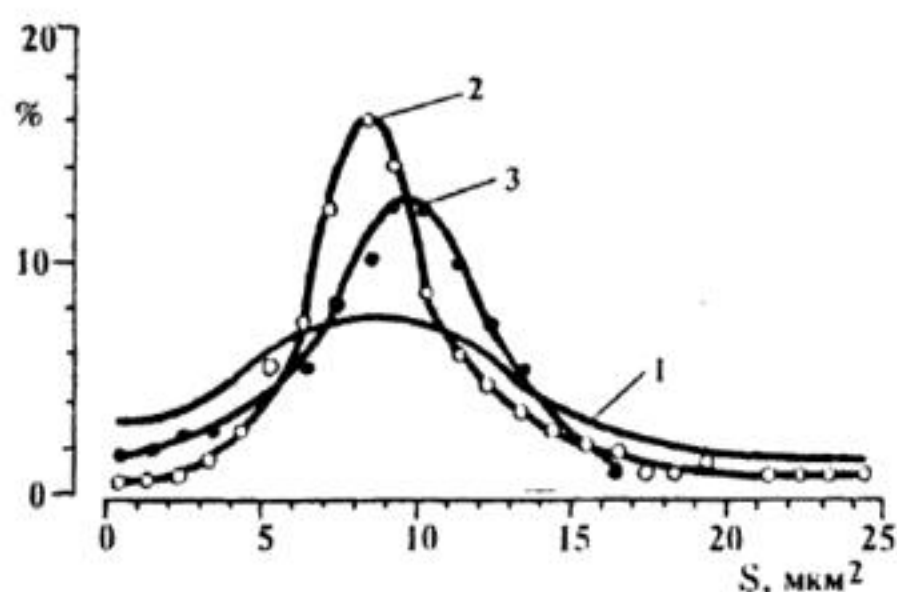


Рис. 6. Распределение площадей сечений эритроцитов при замораживании без криопротектора (1), после эквilibрации клеток с криопротектором при 0 °С (2), при 22 °С (3)

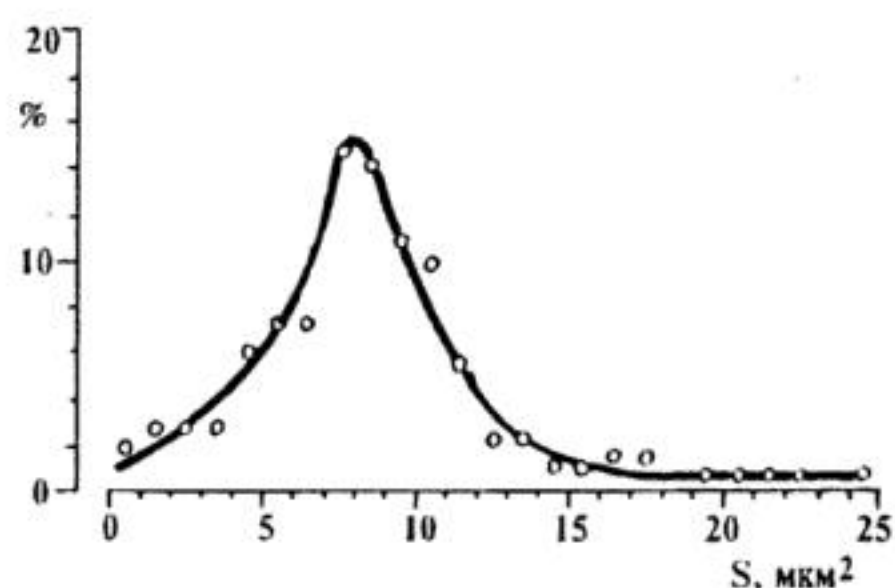


Рис. 7. Распределение эритроцитов в норме в зависимости от площади сечений этих клеток. По оси ординат – количество сечений эритроцитов, %; по оси абсцисс – площадь сечения эритроцитов, мкм²

вождается более выраженными повреждениями эритроцитов, чем у клеток, инкубированных с криопротектором при 0 °С.

На рис. 6 приведены графики распределения площадей сечений эритроцитов в условиях замораживания без криопротектора (кр. 1), после замораживания-отогрева клеток, эквilibрированных с ПЭО-1500 при 0 °С (кр. 2) и при 22 °С (кр. 3). Анализ приведенных графиков распределений позволил установить, что после замораживания-отогрева клеток, эквilibрированных с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С, графики статистических распределений площадей сечений этих клеток практически не отличаются от таковых, характерных для нормы (рис. 7), и существенно отличаются от графика (рис. 6, кр. 1) после замораживания без криопротектора. Координаты вершины графика распределения площадей сечений эритроцитов в норме соответственно равны: 15% – ордината и 8,0 мкм² – абсцисса, а после замораживания клеток, инкубированных при 0 °С, координаты вершины графика (рис. 6, кр. 2): 15,5% – ордината и 8,5 мкм² – абсцисса.

После замораживания-отогрева эритроцитов, инкубированных с криопротектором ПЭО-1500 при 22 °С, график распределения площадей сечений этих клеток имеет пологий вид (рис. 6, кр. 3) и расположен ближе к кривой 1, характеризующей статистическое распределение площадей сечений эритроцитов после замораживания без криопротектора. Координаты вершины графика (рис. 6, кр. 3) равны: 12,3% – ордината и 9,5 мкм² – абсцисса. Эти данные свидетельствуют, что эквilibрация эритроцитов с криопротектором ПЭО-

1500 при 0 °С способствует сохранению нативной формы клеток после размораживания значительно в большей степени, чем эквilibрация при 22 °С.

На рис. 8 приведены графики распределений показателя фактора формы сечений эритроцитов в условиях замораживания-отогрева без криопротектора (кр. 1), после инкубации с криопротектором при 0 °С (кр. 2), при 22 °С (кр. 3). Эти графики распределений существенно отличаются друг от друга. Так, в условиях замораживания-отогрева без криопротектора, более 51% сечений эритроцитов имеют показатель фактора формы, принадлежащий интервалу значений $\lambda \in (1,0 - 2,0)$ усл. ед., что характерно для клеток в форме сфероцита, овала, которые утрачивают эластичность, теряют спо-

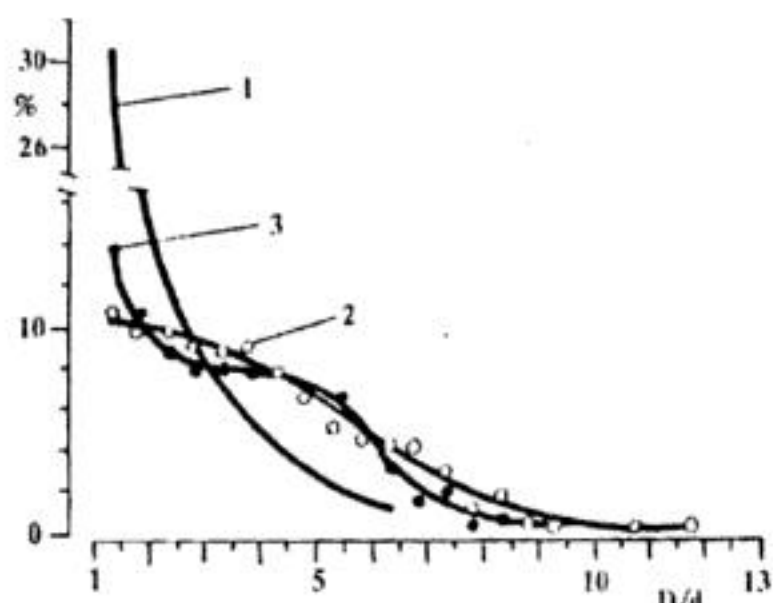


Рис. 8. Распределение показателя фактора формы эритроцитов при замораживании без криопротектора (1), после эквilibрации с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С (2) и при 22 °С (3)

лежащий интервалу значений $\lambda \in (1,0 - 2,0)$ усл. ед., что характерно для клеток в форме сфероцита, овала, которые утрачивают эластичность, теряют спо-

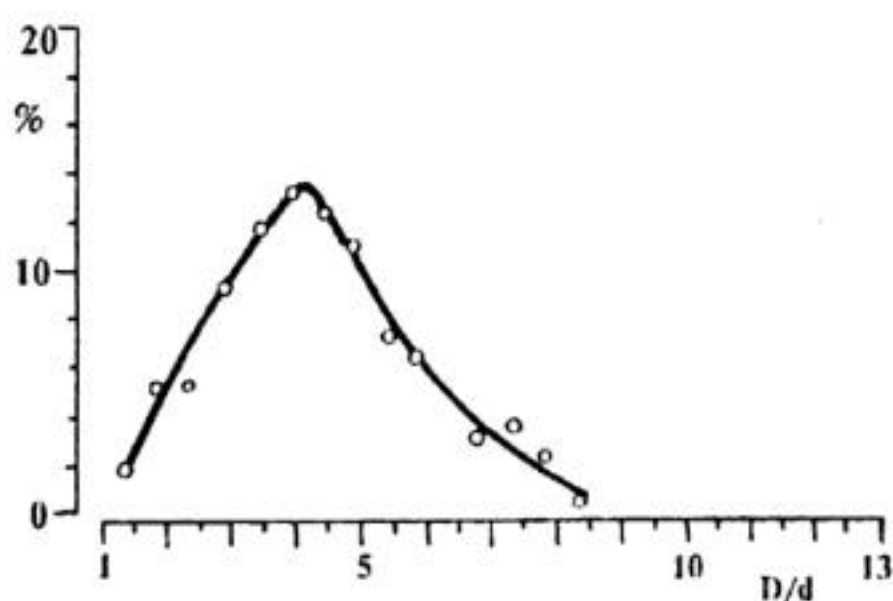


Рис. 9. Распределение эритроцитов в норме в зависимости от показателя фактора формы сечений этих клеток. По оси ординат — количество сечений эритроцитов, %; по оси абсцисс — показатель фактора формы сечений эритроцитов, усл. ед.

ближается к норме и составляет 50%.

В условиях воздействия на клетку осмотически активных веществ, в частности непроникающих криопротекторов и других физико-химических факторов, графики статистических распределений показателя фактора формы сечений эритроцитов имеют большое значение для оценки конформационных изменений клеток по типу “дискоцит — сфероцит” или “сфероцит — нормоцит”. Существует тесная взаимосвязь между показателем фактора формы сечений эритроцитов и деформируемостью этих клеток. Чем больше значение показателя фактора формы эритроцитов ($\lambda > 1$), тем больше потенциальная деформируемость клеток, тем больше реальная форма эритроцитов приближается к двояковогнутому диску. И, наоборот, чем меньше значение показателя ($\lambda < 1$), тем меньше остаточная деформируемость эритроцитов, тем больше форма этих клеток приближается к овалоциту и сфероциту.

Проведенные исследования позволили выявить тесную взаимосвязь между деформируемостью эритроцитов и температурой эквilibрации этих клеток с криопротектором ПЭО-1500. При температуре эквilibрации 0 °С более чем у 15% эритроцитов наблюдалась обратная трансформация по типу “деформированный дискоцит — “уплощенный” нормоцит”, в то время как при 22 °С происходит трансформация по типу “нормоцит — сфероцит”. В этих условиях в популяции эритроцитов увеличивается количество сфероцитов до 12%, в норме — 3%.

Повышение температуры эквilibрации эритроцитов с криопротектором ПЭО-1500 оказывает существенное влияние на ультраструктуру и деформируемость клеток после замораживания-отогрева. Так, после размораживания эритроцитов, эквilibрированных при 0 °С, наблюдается хорошая сохранность ультраструктуры и умеренная деформация этих клеток. Эквilibрация клеток при 22 °С и последующие замораживание-отогрев способствуют значительному росту количества в популяции сфероцитов, увеличению числа “розовых” поврежденных эритроцитов. Следовательно, степень сохранности клеток после криоконсервирования зависит от температуры эквilibрации их с криопротектором.

Таким образом, результаты, полученные с помощью электронно-микроскопических исследований конформационных изменений эритроцитов, позволяют заключить, что у клеток, эквilibрированных с криопротектором ПЭО-1500 при 22 °С, повреждения и необратимая трансформация переходных форм дискоцитов в гемолитические происходит уже во время эквilibрации клеток с криопротектором, а последующие замораживание-отогрев усиливают повреждение. Эквilibрация эритроцитов с криопротектором при 0 °С способствует сохранению нативной формы клеток, что может быть связано с тем, что низкая температура “фиксирует” объем и форму белкового цитоскелета,

способность к деформации и разрушаются при механических воздействиях. После замораживания-отогрева клеток, инкубированных с криопротектором ПЭО-1500 при 22 °С, около 30% всех сечений эритроцитов имеют фактор формы $\lambda \in (1,0 - 2,0)$ усл. ед., а после размораживания клеток, инкубированных при 0 °С, это количество сечений эритроцитов не превышает 20%. В норме (рис. 9) количество таких сечений эритроцитов равно 7%, а количество сечений эритроцитов, имеющих показатель фактора формы $\lambda > 4,0$ усл. ед., — более 50%. После размораживания клеток, инкубированных при 0 °С, количество клеток с $\lambda > 4,0$ усл. ед. при-

и приобретенная стабильность формы сохраняется и в цикле замораживания-отогрева. Это, в конечном итоге, и приводит к повышению устойчивости клеток к факторам криоконсервирования.

До настоящего времени многие физико-химические механизмы, связанные с перестройкой белков цитоскелета, и роль Ca^{2+} в этих процессах при осмотическом и низкотемпературном воздействии изучены в недостаточной мере. Наблюдения показывают, что гипертонические растворы различных непроникающих осмотически активных веществ (соли, сахара, полиэтиленгликоли и др.) вызывают в той или иной степени сжатие клетки, обусловленное частичной объемной дегидратацией цитоплазмы. Это означает, что содержимое клетки перешло в иную, более конденсированную форму, при которой динамическая структура белков цитоскелета и цитозоля претерпела фазовые и конформационные превращения. При этом происходят перестройки в системах транспорта Ca^{2+} и других ионов [5, 6, 7], которые участвуют в процессах регуляции объема клеток. При частичной дегидратации клеток в гипертонических растворах криопротекторов в цитозоле скорее всего формируется стабильный гель [8]. При этом, если исходная дегидратация, индуцирующая формирование геля, комбинируется с температурой 0°C , клетка изменяет свою устойчивость к действию замораживания. Поэтому процесс дегидратации является весьма важным фактором в структурной модификации состояния клетки в аспекте ее стабильности (или нестабильности).

Обнаруженная нами различная направленность модификации формы эритроцитов под воздействием криопротектора ПЭО-1500 при 0 и 22°C позволяет предположить, что реакция клеток на уменьшение объема при тех же условиях эквilibрации их с криопротектором будет различной. Исходя из этого, мы произвели анализ изменений объема эритроцитов в зависимости от температуры и способа введения криопротектора в суспензию клеток. Проведенные эксперименты показали (рис. 10), что постепенное добавление ПЭО-1500 к эритроцитам при 0°C приводит к частичной дегидратации кле-

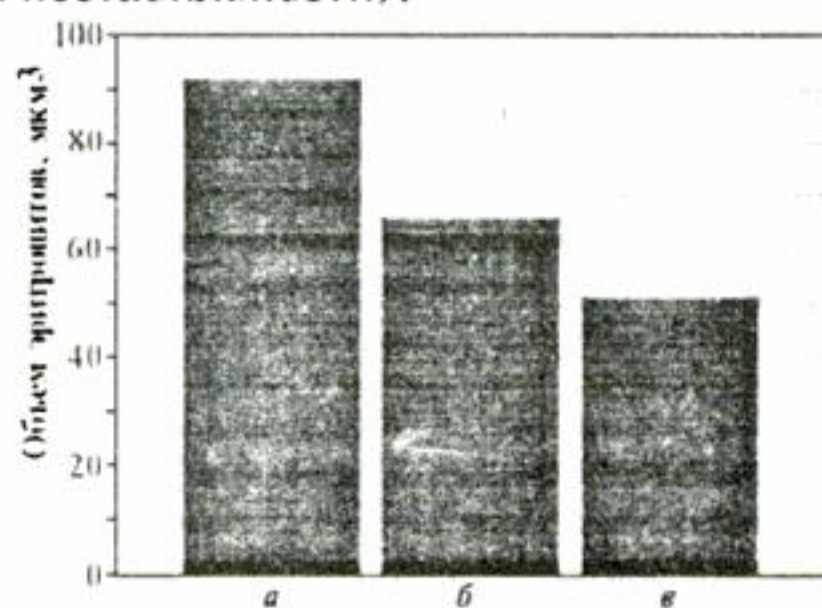


Рис. 10. Изменение объема эритроцитов, экспонированных с криопротектором ПЭО-1500 при различных температурах: а – нативные эритроциты, б – экспонирование эритроцитов при 0°C , в – экспонированные при 22°C

ток, о чем свидетельствует уменьшение их объема на $28,9\%$. Эквilibрация эритроцитов с ПЭО-1500 при 22°C сопровождается более значительной дегидратацией — уменьшение объема достигает $44,7\%$. При исследовании изменений объема эритроцитов, инкубированных с ПЭО-1500 при 0 и 22°C , после замораживания-отогрева обнаружено, что объем клеток в процессе криоконсервирования достоверно не изменяется и соответствует объему эритроцитов после добавления криопротектора.

Сопоставляя эти данные с результатами, полученными при изучении формы клеток, можно заключить, что в эритроцитах наблюдается тесная взаимосвязь между процессами деформации и дегидратации этих клеток. Чем более деформированы эритроциты, тем меньше их объем. После инкубации клеток с криопротектором ПЭО-1500 при 22°C наблюдалась значительная деформация клеток и значительная их дегидратация. При 0°C деформация клеток резко ограничена и уменьшение объема менее выражено. Таким образом, обобщая полученные результаты, можно сказать, что имеется корреляция между устойчивостью эритроцитов к замораживанию и характером изменений их объема и формы.

Модификация структуры белкового цитоскелета при повышении концентрации внутриклеточных электролитов в осмотически сжатых клетках может служить начальным этапом появления холодовой чувствительности эритроцитов. При уменьшении объема концентрация всех внутриклеточных ком-

понентов увеличивается, что само по себе может способствовать изменению молекулярной структуры цитоскелета. Осмотическое сжатие эритроцитов может привести к повышению локальной концентрации спектрина и изменению равновесия между димерными, тетрамерными и олигомерными формами этого белка в сторону формирования больших олигомеров [12]. При 0 °С результирующее состояние может быть весьма устойчивым, так как формирующаяся структура может стабилизироваться. Известно, что при 0 °С олигомерная структура спектрина сохраняется в течение нескольких часов, в то время как при 37 °С происходит быстрая диссоциация [13].

После инкубации эритроцитов с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С, когда объем клеток уменьшается на 28,9%, происходит, по-видимому, такая модификация структуры цитоскелета, которая приводит к резкому ограничению деформации формы и повышению устойчивости клеток к последующему замораживанию-отогреву.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бабійчук Л.А. и др. Единый механизм повреждения клеток при температурном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология. – 1985. – № 2. – С. 25–32.
2. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Дис. ... д-ра. биол. наук. – Харьков, 1989. – 546 с.
3. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. – Киев: Наук. думка, 1978. – 204 с.
4. Белоус А.М., Гулевский А.К., Бабійчук Л.А. и др. Роль белков цитоскелета в изменении стабильности клеток при температурно-осмотическом воздействии // Криобиология. – 1990. – № 4. – С. 3–14.
5. Орлов С.Н. Кальмодулин // Итоги науки и техники. – М.: ВИНИТИ. Сер. общие проблемы физ.-химич. биологии – 1987. – № 3. – С. 57–182.
6. Орлов С.Н., Покудин Н.И., Котелевцев Ю.В. и др. О механизме индукции ионного транспорта при сжатии эритроцитов // Внутриклеточная сигнализация. – М.: Наука, 1988. – С. 118–126.
7. Орлов С.Н., Покудин М.И., Рязский Г.Г. и др. О механизме регуляции транспорта ионов через плазматическую мембрану при уменьшении объема клеток // Биол. мембраны. – 1988. – 5, № 10. – С. 1030–1041.
8. Белоус А.М. Роль регуляторных систем, модулирующих состояние белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии // Пробл. криобиологии. – 1992. № 4. – С. 3–14.
9. Marikowsky Y., Khodadad J.K., Weinetein R.S. Influence of red cell shape on surface charge topography // Exp. Cell. Res. – 1978. – 116, № 1. – P. 191–197.
10. Glaser H. Factors influencing the form of human erythrocytes. – Biophys. Membrane Transp. Sch. Proc. – Part I. – Wroclaw, 1976. – P. 147–184.
11. Haest C.W.M. Interactions between membrane sceleton proteins and the intrinsic membrane domains // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – 48, № 4. – P. 331–352.
12. Morrow J.S., Marchesi V.T. Self-assamby of spectrin oligomers in vitro: a basis for a dynamic cytoskeleton // J. Cell. Biol. – 1981. – 88. – P. 463–468.
13. Ungewickell E., Gratzer W. Self-association of human spectrin // Europ. J. Bioch. – 1978. – 88. – P. 379–385.

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

Поступила 29.01.97

Л.О.БАБІЙЧУК

КОНФОРМАЦІЙНІ ТА ОБ'ЄМНІ ЗМІНИ ЕРИТРОЦИТІВ У ПРОЦЕСІ ЗАМОРОЖУВАННЯ-ВІДІГРІВАННЯ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД УМОВ ЕКВІЛІБРАЦІЇ ЇХ З КРІОПРОТЕКТОРОМ ПЕО-1500

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Дослідження конформаційних змін еритроцитів після заморожування-відігрівання в залежності від температурних умов попередньої еквілібрації клітин з криопротектором ПЕО-1500 показали, що в процесі заморожування-відігрівання еритроцитів, еквіліброваних при 22 °С, збільшуються пошкодження і необоротна трансформація перехідних форм дискоцитів у гемолітичні, які відбуваються вже на етапі їх еквілібрації. Еквілібрація еритроцитів з криопротектором при 0 °С, яка сприяє збереженню нативної форми клітин, приводить до того, що набута стабільність форми зберігається і в циклі заморожування-відігрівання. Виявлено, що характер змін об'єму еритроцитів при температурно-осмотичній дії на них залежить від температури еквілібрації клітин з криопротектором і корелює з ступенем деформації форми клітин.

L.A.BABIYCHUK

CONFORMATIONAL AND VOLUMETRIC CHANGES IN RED CELLS IN THE PROCESS OF FREEZE-THAWING DEPENDING ON THE CONDITIONS OF THEIR EQUILIBRATION WITH A PEO-1500 CRYOPROTECTANT

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

The investigations of the conformational changes in red cells following freeze-thawing depending on temperature conditions of pre-equilibration of cells with a PEO-1500 cryoprotectant have shown that in the process of freeze-thawing of red cells, equilibrated at 22 °C, the injuries and irreversible transformation of the transient shapes of discocytes into the hemolytic forms, occurring already at the stage of their equilibration, are intensified. Equilibration of red cells with a cryoprotectant at 0 °C, which facilitates maintenance of the native shapes of cells, results in the fact that the acquired stability of the shape is also maintained during freeze-thawing cycle. The nature of changes in the volumes of red cells during their temperature-osmotic exposure was found to depend on the temperature of cell equilibration with cryoprotectant, and correlates with the extent of the cell shape deformation.

УДК 57.043

В.В.Рамазанов, В.А.Бондаренко

ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ НА РАЗВИТИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ ШОКУ

Показано, что замена неэлектролитной среды на электролитную приводит к устранению зависимости чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку от времени прединкубации.

Чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку [2], как и к холодовому [1, 7], определяется главным образом осмолярностью среды инкубации независимо от того, чем вызвано осмотическое воздействие — гипертоническими растворами солей или неэлектролитов. Повышение концентрации раствора NaCl в гипертонической сахарозе приводит к снижению как холодовой чувствительности, так и уровня потери катионов калия эритроцитами [4]. Напротив, было показано, что гипертонический шок не зависит от ионного состава среды прединкубации, однако содержание солей при этом не превышало 50 ммоль/л [2]. Из вышесказанного можно предположить, что выход катионов калия не сказывается на гипертоническом шоке. Однако содержание соли определяет не только движение ионов через мембрану [4, 5], но и ионную силу раствора, которая также будет сказываться на осмотических свойствах клеток [9]. С учетом этого инкубация эритроцитов в электролитных и неэлектролитных средах позволит дифференциально проследить влияние факторов, связанных с действием осмотического стресса и ионной силы, на развитие гипертонического шока.

В работе использовались эритроциты донорской крови, отмытые раствором, содержащим 150 ммоль/л NaCl и 5 моль/л фосфата (pH 7,4). Гипертонический шок исследовали как было описано ранее [3]. Ингибитор анионного транспорта ДИДС (4,4'-динитроцианостильбен-2,2'-дисульфонат) добавлялся в среду при проведении опытов. Данный реагент способен модифицировать в мембране эритроцитов взаимодействие белка полосы 3 с белками цитоскелета [6].

На рис. 1 представлены результаты экспериментов по исследованию чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку в зависимости от времени прединкубации клеток в среде, содержащей различные концентрации са-

харозы. Прединкубация в изотоническом растворе сахарозы в течение 60 мин не вызывает роста уровня гемолиза после переноса в раствор 3 моль/л NaCl. Возрастание концентрации сахарозы в среде прединкубации вызывает появление компоненты повышения чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку, динамика которой зависит от осмолярности среды. Видно, что чем выше концентрация сахарозы в среде прединкубации, тем быстрее достигается максимальный уровень чувствительности к гипертоническому шоку. При концентрации сахарозы 0,86 моль/л уровень гипертонического шока максимальный, и времени, необходимого для его достижения, практически не требуется. Обращает на себя внимание то, что уровень гипертонического шока после прединкубации как в среде, содержащей изотоническую сахарозу, так и в среде, содержащей 0,86 моль/л сахарозу, не изменяется во времени. Данное обстоятельство указывает на то, что освобождение анионов хлора, потеря катионов калия [5] и возрастание внутриклеточного pH в указанных средах [8] не влияет на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку (рис. 1) в сравнении с холодовым шоком [4]. Как видно из данных, представленных на рис. 2, присутствие ингибитора анионного транспорта ДИДС в исходных растворах оказывает существенное влияние на кинетику развития чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку. При этом четко различается направленность действия ингибитора, зависящая от осмолярности среды. Так, присутствие ДИДС в среде, содержащей 0,27 моль/л сахарозу, значительно повышает чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку, тогда как присутствие ингибитора в среде, содержащей 0,5 моль/л сахарозу, не вызывает сдвига уровня гипертонического шока. Кроме того, присутствие ДИДС в средах, содержащих 0,7–0,86 моль/л сахарозу, вызывает снижение чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку в первые минуты прединкубации.

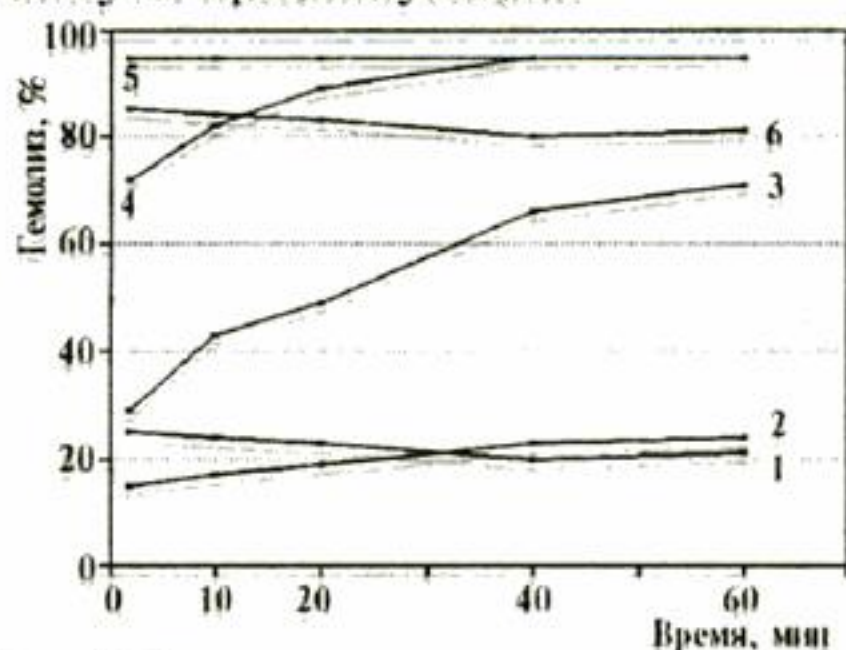


Рис. 1. Развитие чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl после инкубации при 37 °C в растворах, содержащих сахарозу (моль/л): 1 – 0,27, 2 – 0,5, 3 – 0,7, 4 – 0,8, 5 – 0,86, 6 – 1,1

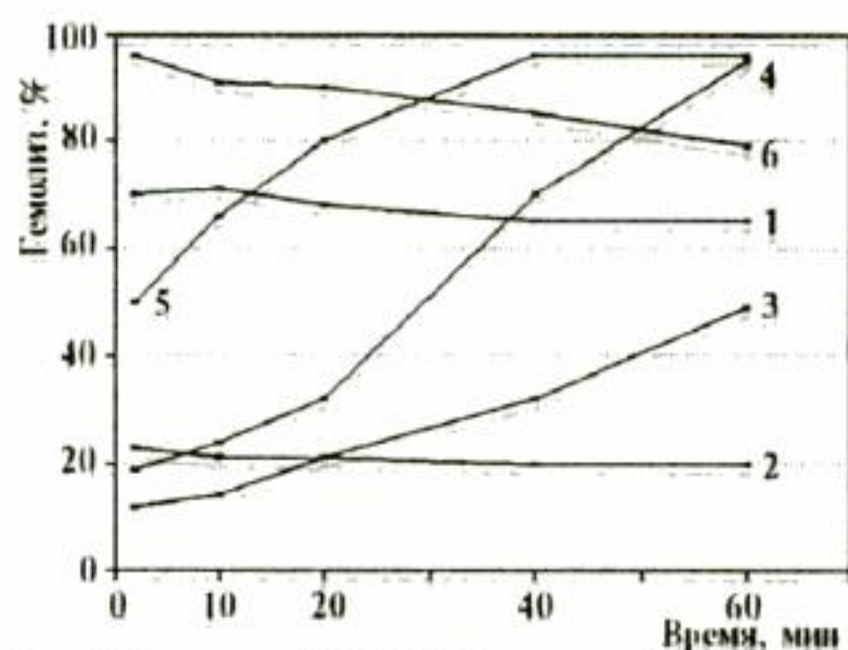


Рис. 2. Влияние ДИДС (30 мкмоль/л) на развитие чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl после инкубации при 37 °C в растворах, содержащих сахарозу (моль/л): 1 – 0,27, 2 – 0,5, 3 – 0,7, 4 – 0,8, 5 – 0,86, 6 – 1,1

Освобождение ионов хлора и калия из эритроцитов, инкубируемых в изотонической среде с низкой ионной силой, приводит к потере внутриклеточной воды и уменьшению объема клетки [5]. Однако последствия ионзависимого уменьшения объема в изотонической сахарозе во времени не сказываются на чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку (рис. 1). В условиях, когда осмолярность сахарозной среды прединкубации выше изотонической, появляется временная зависимость чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку, которая четко выражена после инкубации клеток в среде, содержащей 0,7 моль/л сахарозы (рис. 1). Максимальный гемолиз отмечается после инкубации эритроцитов в растворе, содержащем 0,86 моль/л сахарозы. Изменение осмотической чувствительности во времени уже не проявляется в отличие от чувствительности эритроцитов к охлаждению, которая

в указанном растворе имела зависимость от времени [4]. Во-первых, это указывает на то, что освобождение ионов хлора и калия не влияет на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку. Во-вторых, развитие чувствительности во времени, при возрастании концентрации сахарозы в среде прединкубации от 0,5 до 0,86 моль/л, указывает на существование механизма возрастания чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку, подобного таковому при холодовом шоке [1]. В данном случае можно предположить, что действие ДИДС на гипертонический шок не связано с ингибированием потоков хлора и калия, а опосредуется его влиянием на взаимодействие белка полосы 3 с белками цитоскелета [6].

Таким образом, устойчивость чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку во времени после инкубации клеток в среде, содержащей 0,27 или 0,86 моль/л сахарозы (рис. 1), разница в степени блокирования холодового и гипертонического шока ингибитором анионного транспорта [3], разнонаправленное действие ДИДС на гипертонический шок, зависящее от осмолярности среды, указывают на то, что перераспределение ионов хлора и калия из клетки в среду прединкубации эритроцитов не является главным фактором, контролирующим развитие чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку.

Исследование чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку

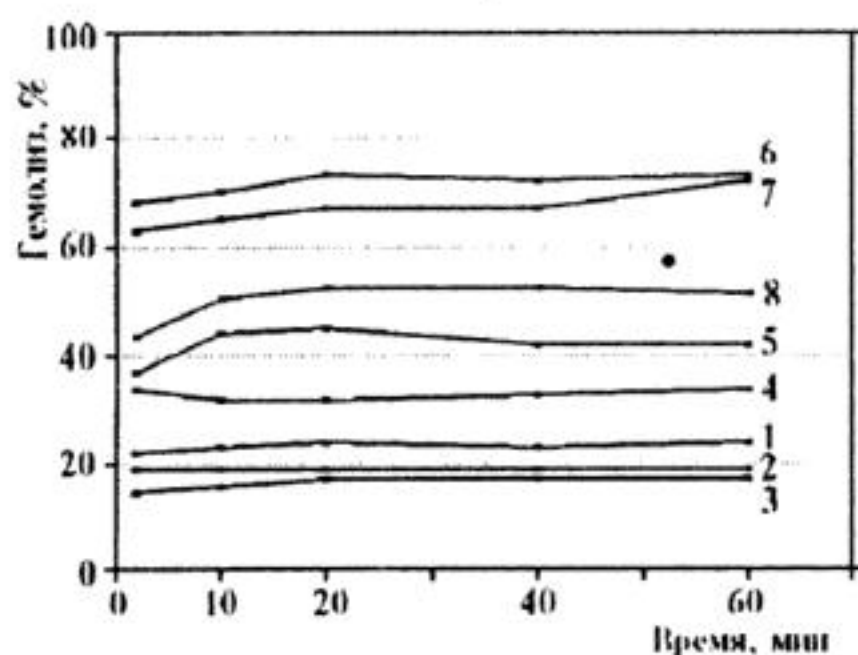


Рис. 3. Развитие чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl после инкубации эритроцитов при 37 °C в растворах, содержащих NaCl (моль/л): 1 – 0,15, 2 – 0,30, 3 – 0,45, 4 – 0,55, 5 – 0,65, 6 – 0,90, 7 – 1,20, 8 – 1,50

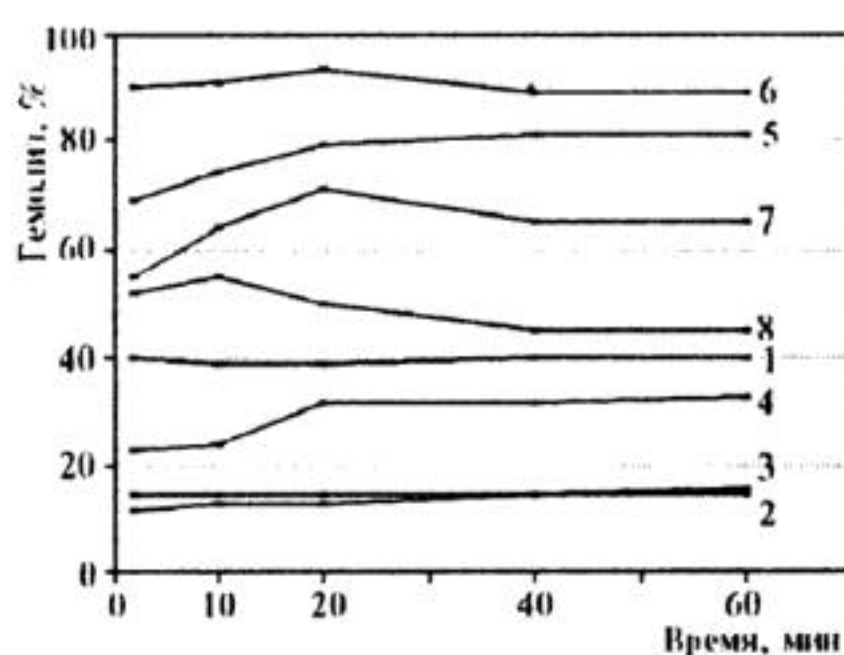


Рис. 4. Влияние ДИДС (30 мкмоль/л) на развитие чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl после инкубации эритроцитов при 37 °C в растворах, содержащих NaCl (моль/л): 1 – 0,15, 2 – 0,30, 3 – 0,45, 4 – 0,55, 5 – 0,65, 6 – 0,90, 7 – 1,20, 8 – 1,50

после инкубации клеток в растворах, содержащих различные концентрации NaCl, показывает, что максимальная чувствительность проявляется, когда они инкубируются в растворе, содержащем 0,9 моль/л NaCl (рис. 3). Динамика развития чувствительности во времени выражена очень слабо по сравнению с развитием процесса после инкубации клеток в сахарозных растворах (рис. 1). Так, чувствительность клеток, инкубируемых в растворах, содержащих 0,15–0,65 моль/л NaCl, не зависит от времени прединкубации. В растворах, содержащих 0,65–1,5 моль/л NaCl, отмечается только незначительный рост чувствительности к 20-й мин прединкубации, что каким-то образом должно быть связано с освобождением катионов калия к этому времени [3]. Присутствие ингибитора анионного транспорта ДИДС в среде прединкубации не приводит к значительным изменениям формы кинетических кривых чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку (рис. 4). Сравнивая характер развития этого процесса после инкубации эритроцитов в сахарозных растворах (рис. 2) с соответствующим процессом после инкубации клеток в растворах NaCl в присутствии ДИДС (рис. 4), следует указать на их сходный харак-

тер в условиях низких концентраций неэлектролита и электролита. В то же время при более высоких концентрациях соли в среде прединкубации, в области осмолярности, где происходит нарастание чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку, действие ингибитора приводит к росту уровня шока по сравнению с его действием в неэлектролитной среде в области роста осмотической чувствительности (рис. 1).

Таким образом, можно выделить отличия, которые возникают в развитии гипертонического шока при переходе от неэлектролитной среды прединкубации к электролитной. Во-первых, устраняется зависимость процесса от времени прединкубации, во-вторых, замена в среде прединкубации сахарозы на NaCl приводит к изменению направленности действия ДИДС с ингибирующего на сенсibiliзирующего в области высоких концентраций соли в среде прединкубации и к значительной редукции действия данного ингибитора в области низких концентраций соли.

Полученные результаты с использованием модификатора взаимодействия цитоскелета с мембраной ДИДС [6] позволяют предположить механизм, лежащий в основе развития чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку. Повышение концентрации сахарозы выше изоосмотической включает механизм, интенсивность развития которого зависит от осмолярности и ионной силы, а в его основе лежит перестройка взаимодействий цитоскелета с мембраной. При замене неэлектролитной среды на электролитную для такой перестройки практически не требуется времени. В этих условиях действие ДИДС будет ограничиваться временем связывания его в мембране. Поэтому в электролитных средах данный реагент выявляет свой дестабилизирующий эффект на мембрану, как и в изоосмотической сахарозе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Дис....д-ра биол. наук. – Харьков, 1988. – 446 с.
2. Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков. – 1989. – 16 с.
3. Рамазанов В.В. Вплив осмотичного стресу та модифікаторів цитоскелета на розвиток холодового та гіпертонічного шоку еритроцитів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків. – 1994. – 14 с.
4. Рамазанов В.В., Руденко С.В., Бондаренко В.А. Связь ионных потоков хлора и калия при осмотическом стрессе с холодовым шоком эритроцитов // Фундаментальные и прикладные проблемы криобиологии. – Харьков, 1993. – С. 106–111.
5. Bernhardt L., Hall A.C., Ellory J.C. Transport pathways for monovalent cations through erythrocyte membranes // Stud. Biophys. – 1988. – 126, № 1. – P. 5–21.
6. Hsu L., Morrison M. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components // Arc. Biochem. Biophys. – 1983. – 227, № 1. – P. 31–38.
7. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology. – 1971. – 8. – P. 489–500.
8. Sitaramam V. Selfpotential generated by unscreened fixed charges at the membrane saterface of the erythrocyte perturbs the lipid bilayer // Indian J. Biochem. Biophys. – 1988. – 25. – 2–4. – P. 172–179.
9. Wessels J.M.C., Veerkamp J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes. Differences in osmotic behaviour of erythrocytes after treatment with electrolyte and non-electrolyte solutions // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – 291, № 1. – P. 178–189.

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

Поступила 21.03.95

В.В.РАМАЗАНОВ, В.А.БОНДАРЕНКО

ВПЛИВ ІОННОЇ СИЛИ НА РОЗВИТОК ЧУТЛИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ДО ГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Показано, що заміна неелектролітного середовища на електролітний приводить до усунення залежності чутливості еритроцитів до гіпертонічного шоку від часу передінкубації.

V.V.RAMAZANOV, V.A.BONDARENKO

EFFECT OF IONIC STRENGTH ON ERYTHROCYTES SENSITIVITY TO HYPERTONIC SHOCK

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

It has been found that substitution of nonelectrolyte medium to electrolyte medium leads to the disappearance of erythrocyte sensitivity to hypertonic shock depending from the preincubation time.

УДК 611.36.018.1:57.086:57.043:576.311.344:577.152.3

Л.В.Карева, В.И.Луговой

УСТОЙЧИВОСТЬ ЛИЗОСОМ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕЧЕНИ И ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС, К ДЕЙСТВИЮ КОНЦЕНТРАЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

Проведено сравнительное изучение стабильности лизосом по уровню солиобилизации маркерных кислых гидролаз к действию различных концентраций тритона X-100 и сахарозы. Органеллы выделяли по классической схеме из гомогената печени и изолированных гепатоцитов белых крыс. Установлено, что лизосомы, полученные из этих источников, характеризуются примерно одинаковым уровнем освобождения маркерных ферментов, что дает основание рекомендовать эти органеллы для экспериментальной работы.

К настоящему времени в ряде основательных работ [1, 3, 4] достаточно убедительно обосновано использование изолированных гепатоцитов в качестве адекватной цитологической модели для успешного решения многих медико-биологических, в том числе и криобиологических, проблем. Однако в числе последних до сих пор остается неясным, в какой мере сама по себе процедура выделения изолированных клеток печени из целого органа или из клеточной суспензии отражается на стабильности внутренней организации клеток, и могут ли быть выделенные из изолированных гепатоцитов фракции субклеточных частиц, в частности лизосомы, объектом, приемлемым и сопоставимым для последующих биохимических или цитофизиологических исследований. Известно, что лизосомы представляют собой очень лабильные внутриклеточные мембранные образования и подвержены дестабилизации под влиянием не всегда учитываемых экспериментальных условий и факторов [5], применяющихся в процессе выделения гепатоцитов из ткани органа. Поэтому целью данного исследования является сравнительное изучение стабильности лизосом, выделенных из печени и из суспензии изолированных гепатоцитов, по данным исследования активности лизосомальных маркерных ферментов.

В опытах использовали 18 белых беспородных крыс обоего пола массой 200–230 г, находившихся на стандартном водно-пищевом рационе вивария в течение летнего сезона года. Для эксперимента брали одновременно по 2 крысы, печень одной из них использовали для получения гомогената ткани и выделения из него в 0,25 М растворе сахарозы субклеточных фракций — ядер, митохондрий, лизосом, микросом и надосадочной жидкости — по классической схеме Де Дюва, как описано в работе [5]. Из печени второй крысы получали суспензию изолированных гепатоцитов [2], из которых выделяли субклеточные фракции по указанной выше схеме. Удельную активность кислых гидролаз гомогената и субклеточных фракций выражали в мкмольх соответствующего субстрата на 1 мг белка за 1 мин инкубации в течение 30 мин при 37 °С [5]. Стабильность изолированных лизосом и степень загрязнения этими органеллами других субклеточных фракций оценивали по уровню неседиментируемой активности маркерных ферментов лизосом — кислой РНК-азы, кислой фосфатазы, катепсина Д — и рассчитывали ее в процентном отношении к общей активности гомогената ткани печени и субклеточных фракций после

предварительной обработки их 0,1 %-м раствором детергента тритона X-100. Все результаты обработаны статистически по методу Фишера-Стьюдента.

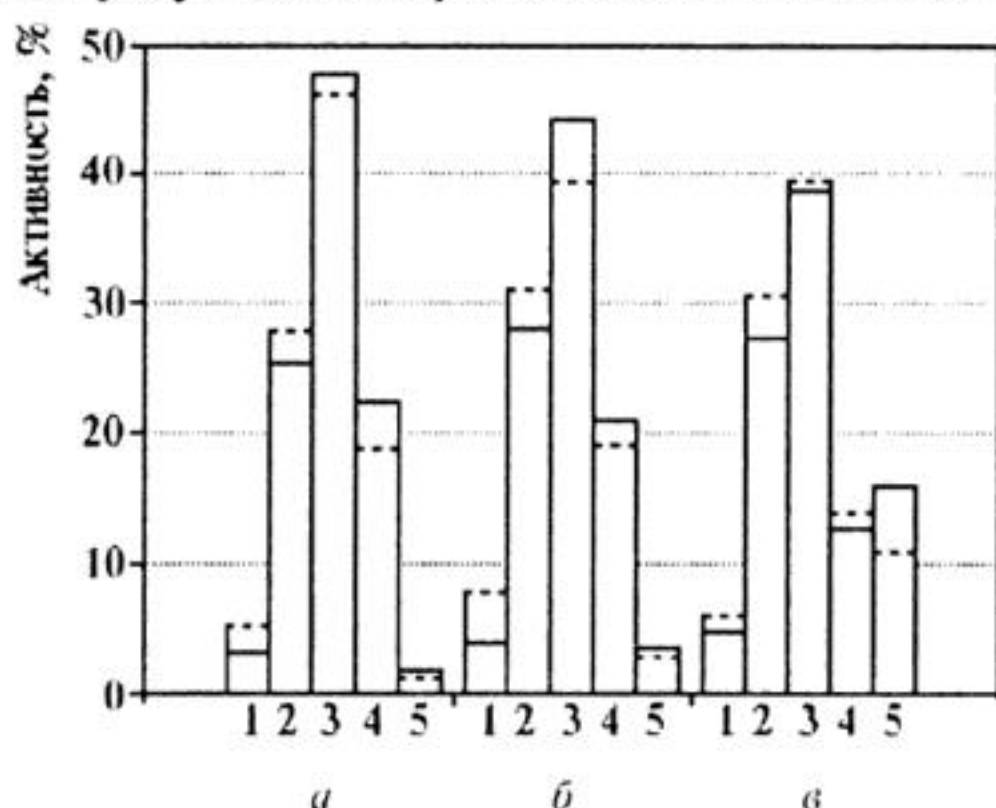


Рис. 1. Неседиментируемая активность (% к общей) кислых гидролаз в различных субклеточных фракциях, полученных из целой печени (---) и изолированных гепатоцитов (—): 1 – ядра; 2 – митохондрии; 3 – лизосомы; 4 – микросомы; 5 – надосадочная жидкость; а – кислая фосфатаза, б – кислая РНК-аза, в – катепсин Д

Как видно из представленных данных (рис. 1, а, б, в), активность маркерных ферментов лизосом, независимо от источника получения субклеточных фракций (печень или изолированные гепатоциты) определялась в основном во фракции лизосом (от 41,7 до 47,6 % от общей активности в гомогенате), что согласуется с данными А.А.Покровского и В.А.Тутельяна [5], отметившими локализацию около 40% активности кислых гидролаз в обогащенной лизосомами фракции органелл клеток. Менее значительная активность лизосомальных гидролаз обнаружена в других субклеточных фракциях, что, по мнению [5], обусловлено загрязнением их в

процессе выделения фракций лизосомами, которые отличаются значительным полиморфизмом, особенностями морфогенеза и в связи с этим их разнообразием по плотности и седиментационным характеристикам. Этими же особенностями можно объяснить и различия относительной активности отдельных ферментов, определяемых в субклеточных фракциях из печени и из изолированных гепатоцитов, хотя отмеченные различия в любом случае не превышали 5% уменьшения или увеличения активности гидролаз, и при этом качественно сохранялась общая картина изменения их активности по отдельным фракциям.

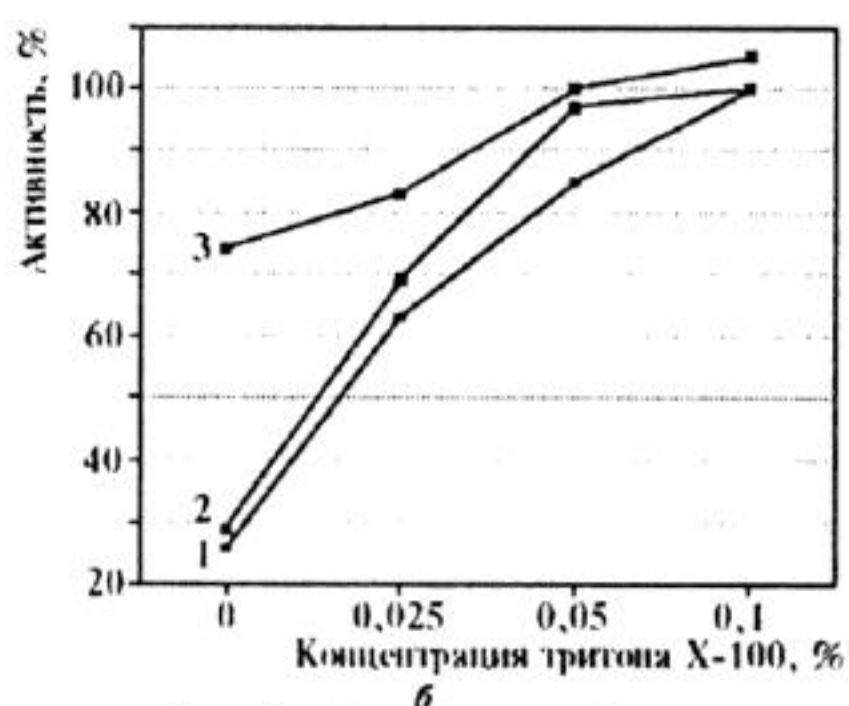
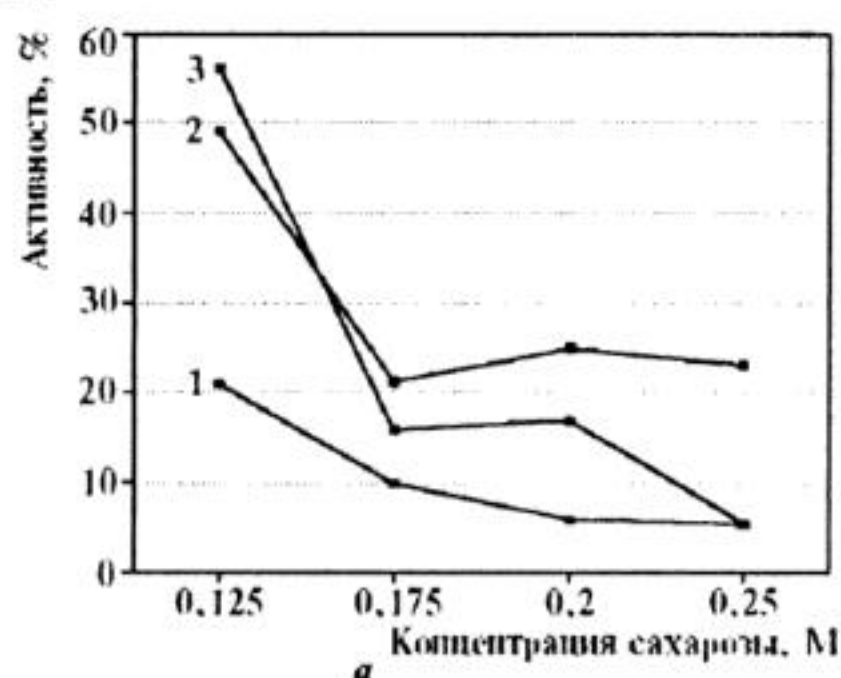


Рис. 2. Неседиментируемая активность кислых гидролаз (% к общей) после инкубации лизосом, выделенных из изолированных гепатоцитов, в растворах с различной концентрацией сахарозы (а) и тритона X-100 (б): 1 – кислая фосфатаза, 2 – кислая РНК-аза, 3 – катепсин Д

Следовательно, изложенные результаты позволяют утверждать, что лизосомы, выделенные из суспензии гепатоцитов, по данным изучения активности их маркерных ферментов вполне сопоставимы с таковыми, полученными из целой печени классическим способом. Однако остается неясным, в достаточной ли мере мембраны лизосом, выделенные из изолированных гепатоцитов, оказываются стабильными к действию повреждающих факторов. Поэтому представлялось целесообразным изучить осмотическую реакцию таких лизосом к действию растворов сахарозы с различной осмолярностью (рис. 2, а)

и действию различных концентраций детергента тритона X-100 (рис. 2, б) по уровню освобождения из изолированных органелл маркерных ферментов после инкубации лизосом в этих растворах в течение 15 мин при 25 °С.

Из рис. 1 и 2 видно, что экспозиция лизосом в растворах с указанными веществами приводит к повышению неседиментируемой активности всех изучавшихся гидролаз по мере снижения содержания сахарозы в растворе и повышения концентрации тритона X-100. В целом общая картина изменений активности гидролаз при действии растворов с различной концентрацией сахарозы и детергента соответствует подобной для интактных лизосом и описанных в литературе [5]. Вместе с тем следует обратить внимание на некоторое отклонение линейного характера зависимости неседиментируемой активности различных ферментов от концентрации сахарозы и тритона X-100, а также их неодинаковый уровень солюбилизации в этих растворах, что можно объяснить, исходя из имеющихся данных о различной степени прочности связи их с мембраной или с матриксом органелл, проявляющейся в различной степени структуризации индивидуальных ферментных белков и изоэнзимов [5].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что лизосомы, выделенные из изолированных гепатоцитов, практически не отличаются от таковых, выделенных из печени, и вполне могут быть приемлемы для последующих экспериментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства* / Под ред. Л.Д. Лукьяновой. – М.: Наука, 1985. – 269 с.
2. *Луговой В.И., Кравченко Л.П., Карева Л.В. и др. Метод получения изолированных клеток печени* // Криобиология и криомедицина. – Киев: Наук.думка, 1983. – Вып. 13. – С.36–39.
3. *Маргулис М.С., Ерухимов Е.А. Использование изолированных живых гепатоцитов для лечения печеночной недостаточности* // Хирургия. – 1985. – № 3. – С. 150–153.
4. *Петрейко А.Ю., Грищук В.П., Сукач А.П. и др. Энергетическое состояние гепатоцитов сытых крыс, выделенных с помощью ЭДТА и вибрации* // Биохимия. – 1989. – 54, № 12. – С. 1952–1955.
5. *Покровский А.А., Тутельян В.А. Лизосомы*. – М.: Наука, 1976. – 382 с.

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

Поступила 16.09.96

Л.В.КАРЕВА, В.И.ЛУГОВИЙ

СТІЙКІСТЬ ЛІЗОСОМ, ЯКІ ВИДІЛЕНІ З ПЕЧІНКИ І ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ, ДО ДІЇ КОНЦЕНТРАЦІЙНИХ ФАКТОРІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Проведено порівняльне вивчення стабільності лізосом за даними рівня солюбілізації маркерних кислотних гідролаз до дії різних концентрацій тритона X-100 та сахарози. Органели виділяли за класичною схемою з гомогенату печінки та з ізольованих гепатоцитів білих щурів. Виявлено, що лізосоми, отримані з цих джерел, характеризуються майже однаковим рівнем звільнення маркерних ферментів, що обґрунтовує використання цих органел для експериментальної роботи.

L.V.KAREVA, V.I.LOUGOVOY

RESISTANCE OF LYSOSOMES, ISOLATED FROM THE LIVER AND HEPATOCYTES OF RATS, TO THE ACTION OF CONCENTRATION FACTORS

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

The authors conducted a comparative study of the resistance of lysosomes, as judged by the level of solubilization of marker acidic hydrolases, to the action of various concentrations of Triton X-100 and sucrose. The organelles were isolated routinely from the homogenate of the liver and isolated hepatocytes of white rats. It was found that the lysosomes, harvested from these sources, are characterized by approximately similar level of release of the marker elements, which allows to recommend these organelles to be used in experiments.

Н.Д.Безуглый, А.В.Медведовский**ОСМОТИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ЯЙЦЕКЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ В РАСТВОРАХ КРИОПРОТЕКТОРОВ.****III. Метод комплексной оценки потенциального
повреждающего действия проникающих криопротекторов**

Изучено влияние проницаемости цитоплазматических мембран к воде и криопротекторам, концентрации защитных веществ, температуры и осмотического состава зародышей на величину максимальных изменений клеточного объема. Предложен метод комплексной оценки повреждающего действия проникающих криопротекторов.

Как известно, при добавлении криопротекторов в среду для замораживания, а также при их выведении после оттаивания клетки испытывают изменения клеточного объема, которые объясняются осмотической активностью защитных веществ. Результаты аналитического моделирования осмотической реакции эмбрионов млекопитающих в растворах криопротекторов приведены в I-й и II-й частях настоящей статьи [3, 4]. Целью данного исследования являлась разработка методических и технологических подходов для оптимизации использования криопротекторов. В качестве объектов исследования в этой части работы были выбраны эмбрионы коровы, так как они наиболее интенсивно используются в современных биотехнологиях воспроизводства, где их низкотемпературная консервация является неотъемлемым этапом.

Роль проницаемости цитоплазматических мембран к воде и криопротекторам для методов применения проникающих защитных веществ. Известно, что изменения клеточного объема при эквilibрации эмбрионов в растворах криопротекторов перед замораживанием, а также выведение последних после оттаивания могут при определенных условиях привести к осмотическому лизису. Как было показано в работах [1, 9], выведение криопротектора намного опаснее насыщения. Поэтому остановимся более подробно на этом технологическом этапе. Осмотический лизис имеет место в том случае, если клеточный объем достигнет своего критического значения. Для эмбрионов коровы значение критического относительного объема составляет 2,70 для эмбрионов, не подвергаемых криоконсервации [12], и 2,47 — для замороженно-оттаянных эмбрионов [2]. Очевидно, что величина и скорость изменения клеточных объемов зависит от проницаемости цитоплазматических мембран к веществам, участвующим в осмотических процессах. К этим веществам относятся вода и проникающие криопротекторы. Вода проникает через цитоплазматические мембраны быстрее всех известных криопротекторов, и для эмбрионов коровы коэффициент проницаемости к воде составляет $L_p=0,52$ мкм/мин атм [1]. Причиной возникновения потоков воды внутрь и вне клетки является градиент осмотических давлений на мембране, который, в свою очередь, определяется суммарной концентрацией растворенных веществ в растворе и клетке. При выравнивании этих концентраций потоки воды прекращаются. Проникающие криопротекторы также проникают в эмбрионы в течение осмотической реакции. Проницаемость цитоплазматических мембран эмбрионов коровы к криопротекторам составляет $1,65 \cdot 10^{-3}$ см/мин для ДМСО, $2,2 \cdot 10^{-3}$ см/мин для глицерина [3, 4], $8,2 \cdot 10^{-3}$ см/мин для пропиленгликоля и $11,8 \cdot 10^{-3}$ см/мин для этиленгликоля [8].

Для выяснения влияния проницаемости криопротекторов на величины изменений клеточных объемов мы проанализировали поведение эмбрионов в растворах различных криопротекторов. Для этого нами решались уравнения Кедема-Качальского для различных сочетаний изменяемых параметров. В этой части статьи используются те же условные обозначения, что и в предыдущих частях [3, 4]. Для численного решения этих уравнений нами было разра-

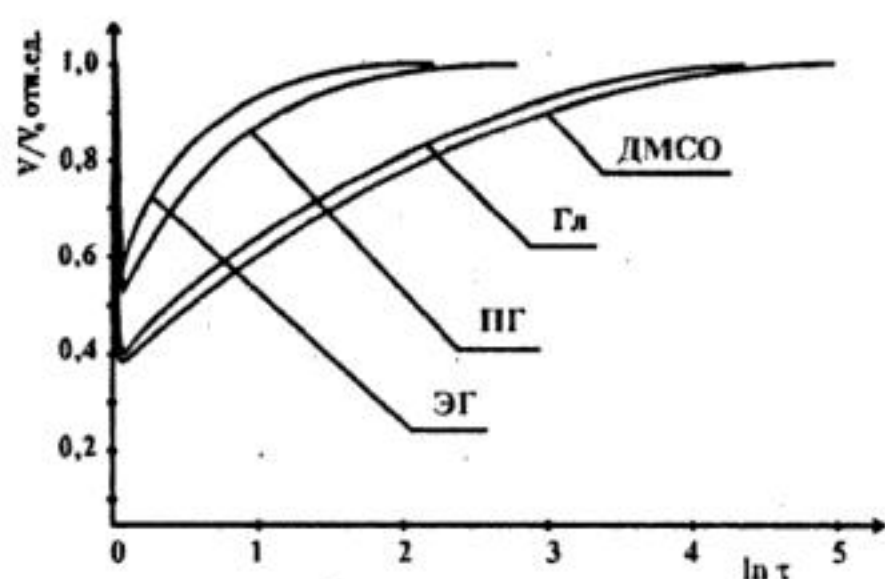


Рис. 1. Изменение относительного объема эмбрионов коровы при насыщении их 1,2 М растворами различных криопротекторов

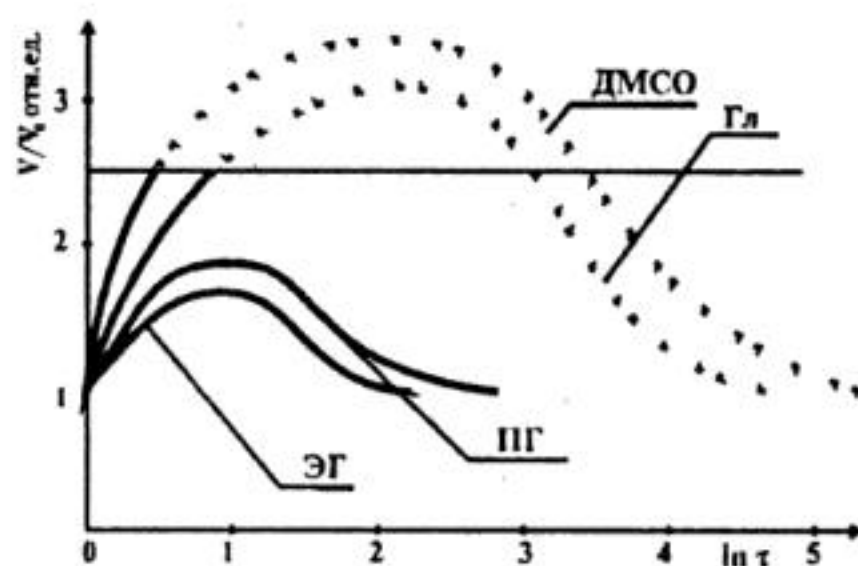


Рис. 2. Изменение относительного объема эмбрионов коровы при переносе их из 1,2 М растворов различных криопротекторов в изотонические условия

ботано оригинальное программное обеспечение. В качестве криопротекторов использовались диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин (Гл), пропиленгликоль (ПГ) и этиленгликоль (ЭГ). Для каждого криопротектора нами были рассчитаны изменения клеточного объема при насыщении эмбрионов коровы в его 1,2 М растворе и при переносе эмбрионов из этого раствора в изотонические условия. На рис. 1 и 2 приведены графические интерпретации этих расчетов, из которых следует, что максимальные изменения клеточного объема имеют место при применении медленнопроникающих (по отношению к воде) криопротекторов, а минимальные — при использовании быстропроникающих криопротекторов. С нашей точки зрения, механизм этого явления состоит в следующем. Как было установлено ранее [1, 6], при использовании медленнопроникающих криопротекторов процесс осмотической реакции в их растворах может быть условно разбит на две части. Первая — это процесс переноса воды, а вторая — перенос криопротектора. Это разделение правомочно, так как для указанных криопротекторов время проникновения криопротекторов в десятки и сотни раз больше, чем время транспорта воды. В этом случае сначала, вследствие циркуляции воды, уравниваются концентрации растворенных веществ вне и внутри клетки, а затем путем диффузии выравниваются вне- и внутриклеточные концентрации криопротектора. Вследствие значительной разницы в скоростях этих процессов по окончании переноса воды эмбрионы претерпевают значительные изменения клеточных объемов. В случае быстропроникающих криопротекторов, по нашему мнению, скорости их проницаемости сравнимы со скоростью транспорта воды, и наблюдается картина встречных потоков воды и проникающего вещества. Другими словами, выравнивание осмотического давления происходит не только за счет транспорта воды, но и за счет перераспределения проникающего вещества. Оба процесса накладываются друг на друга и происходят одновременно. Благодаря этому эмбрионы не претерпевают значительных изменений клеточных объемов.

Из вышеизложенного следует, что чем выше проницаемость криопротектора через цитоплазматические мембраны, тем быстрее происходит осмотическая реакция и тем меньшие изменения клеточных объемов претерпевают эмбрионы. С точки зрения низкотемпературной консервации это означает, что применение быстропроникающих криопротекторов более целесообразно в силу их большей осмотической безопасности.

Влияние концентрации и температуры раствора на повреждающее действие криопротекторов. Существенным фактором, влияющим на процессы переноса веществ при осмотической реакции, является концентрация криопротектора, в котором эквилибрируются эмбрионы. Для выяснения влияния концентрации криопротектора на величины минимального при насыщении и максимального при выведении клеточных объемов, а следовательно, и на возможность возникновения осмотических повреждений мы промоделиро-

вали поведение эмбрионов в растворах указанных выше криопротекторов. Для проверки соответствия расчетных данных реальным изменениям объема были проведены выборочные эксперименты для каждого криопротектора в разных концентрациях. В каждом эксперименте использовалось не менее десяти эмбрионов. Во всех случаях расхождение расчетных и экспериментальных значений не превышало 10%. Измерения изменений клеточных объемов проводились планиметрическим методом с использованием полуавтоматической установки для изучения осмотической реакции эмбрионов млекопитающих [2]. В основу работы установки положено автоматическое измерение изменений клеточного объема по изображениям эмбриона, зафиксированным и обработанным с помощью персонального компьютера.

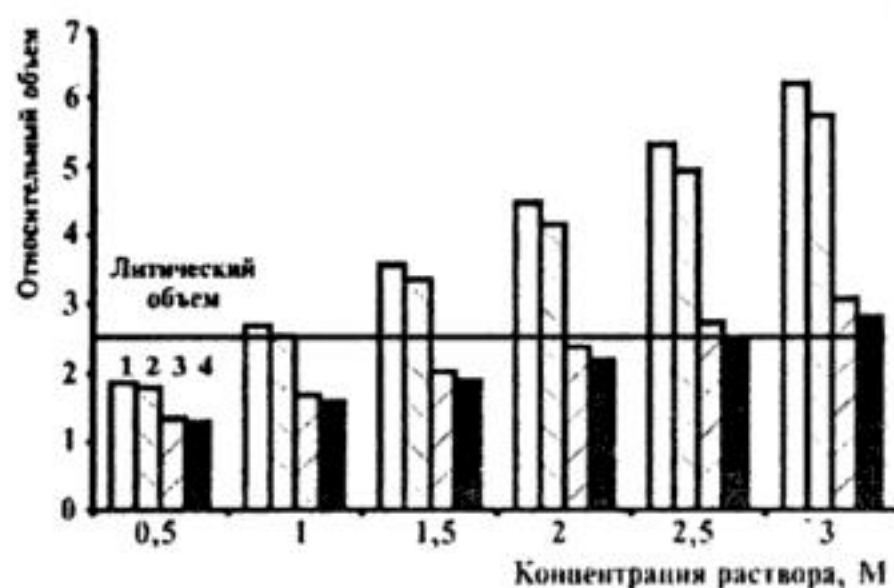


Рис. 3. Максимальные клеточные объемы эмбрионов коровы при переносе их из растворов указанных концентраций криопротекторов в изотонические условия: 1 – ДМСО, 2 – Гл, 3 – ПГ, 4 – ЭГ

ния клеточного объема достигают критических значений (3,58 для ДМСО и 3,35 для Гл) и наступает осмотический лизис. Для устранения именно этого опасного явления экспериментаторы применяют или многоступенчатые методики [13, 14] или гипертонические растворы непроницающих веществ [1, 10, 11]. В случае быстропроницающих криопротекторов также имеет место увеличение изменений клеточных объемов. Однако при концентрациях, необходимых для выживания эмбрионов в процессе замораживания, их объемы не достигают критических. Критическими являются концентрации 2,5 М и выше. Эти результаты позволяют предположить возможность пересадок эмбрионов, замороженных с использованием быстропроницающих криопротекторов, без предварительного удаления последних.

На транспорт веществ через цитоплазматические мембраны существенное влияние оказывает температура. Это связано с температурной зависимостью коэффициентов проницаемости к воде L_p и к криопротектору P согласно закону Аррениуса:

$$L_p = L_p(T_0) \exp \frac{\Delta E_{act}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right). \quad (1)$$

Из этого выражения несложно получить зависимость относительной проницаемости $\gamma = P/L_p$ от температуры:

$$\gamma = \gamma_0 \exp \left(\frac{\Delta E_p - \Delta E_{H_2O}}{R} \right) \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right), \quad (2)$$

где: γ_0 – относительная проницаемость при температуре T_0 , ΔE_p и ΔE_{H_2O} – энергии активации транспорта криопротектора и воды соответственно.

Из анализа выражения (2) следует, что температурная зависимость величины изменений клеточного объема при осмотической реакции определяется разностью энергий активаций транспорта воды и конкретного вещества. Если эти величины равны, то изменения объема не зависят от температуры. В противном случае наблюдается температурная зависимость величины изме-

Влияние концентрации раствора на величину максимальных изменений клеточных объемов иллюстрирует рис. 3. Выведение всех изученных криопротекторов в концентрации 0,5 М безопасно. В то же время следует указать, что для быстропроницающих (в нашем случае ПГ и ЭГ) и медленнопроницающих (ДМСО и Гл) криопротекторов картина существенно различается. Эти различия начинают проявляться при концентрации криопротектора 1 М. Для медленнопроницающих криопротекторов в концентрациях, обеспечивающих достаточную криозащиту при выведении криопротектора, изменения

нений клеточного объема при осмотической реакции. Так, для глицерина, у которого энергия активации для эмбрионов коровы достоверно не отличается от энергии активации воды ($\Delta E_p = 63,3 \pm 10$ кДж/моль и $\Delta E_{H_2O} = 71,6 \pm 10$ кДж/моль [7]), не наблюдается зависимости величины максимального объема эмбрионов от температуры. Влияние температуры проявляется только в изменении общей длительности осмотической реакции. В случае, когда энергия активации вещества меньше чем у воды, наблюдается уменьшение максимальных изменений клеточного объема, а в случае, когда энергия активации вещества больше чем у воды, наблюдается их рост. Таким образом, установлено, что температура оказывает влияние не только на длительность уравнивания, но и на величину изменений клеточного объема.

Из вышеизложенного следует, что один и тот же криопротектор при различных температурах может вести себя или как быстро-, и или как медленнопроникающий, но, как правило, чем выше температура, тем выше и относительная проницаемость криопротектора. При физиологической температуре наблюдаются минимальные изменения клеточного объема и с этой точки она является оптимальной. Однако при физиологических температурах резко возрастает токсическое действие многих криопротекторов [5]. Именно этим объясняется необходимость применения ДМСО при температурах близких к 0 °C [14]. Как следует из вышесказанного, при таких условиях ДМСО ведет себя как медленнопроникающий криопротектор и, следовательно, вызывает значительные изменения клеточного объема, которые могут привести к осмотическим повреждениям. Поэтому и приходится использовать многоступенчатые методики применения ДМСО. Таким образом, возникает вопрос об оптимальной температуре применения криопротекторов. С нашей точки зрения, наиболее часто такой температурой является комнатная. В этом случае уменьшается токсическое действие криопротекторов по сравнению с физиологической температурой и повышается их проницаемость по сравнению с субнулевыми температурами. С технологической точки зрения эта температура также является оптимальной, так как не требует специальных устройств для термостатирования эмбрионов. Именно такая температура и используется при криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота.

Влияние осмотического состава клеток на изменение клеточного объема. Существенное влияние на изменение клеточного объема оказывает осмотический состав клеток. Применительно к эмбрионам коровы, у которых по мере развития количество осмотически активной воды увеличивается [2], это означает, что эмбрионы разных стадий развития по-разному могут быть чувствительны к изменениям клеточного объема. В табл. приведены значения максимальных клеточных объемов эмбрионов коровы с различным содержанием осмотически активных веществ при их переносе из 1,2 М раствора глицерина в изотонические условия. Из данных, приведенных в этой таблице, следует, что при постоянстве критического объема эмбрионы коровы, содержащие различное количество осмотически активной воды, будут по-разному реагировать на перепад осмотического давления. Эта ситуация имеет место при практической криоконсервации, так как количество осмотически активной воды варьирует у эмбрионов сельскохозяйственных животных в широких пределах [2].

Максимальные клеточные объемы эмбрионов коровы при различном содержании осмотически активных веществ

Относительный объем осмотически активной воды	Максимальный относительный объем
0,6	2,59
0,7	2,85
0,8	3,11
0,9	3,38
0,95	3,51

С развитием эмбриона уменьшается количество осмотически неактивных веществ в клетке, а относительное количество воды возрастает. Таким образом, эмбрионы продвинутых стадий развития (поздняя морула, бластоциста) могут быть более чувствительны к осмотическим изменениям объема,

имеющим место при выведении криопротекторов, чем ранние эмбрионы (на стадиях от зиготы до ранней морулы) и, следовательно, будут требовать более щадящих режимов использования криопротекторов.

Изложенные выше результаты изучения механизма повреждающего действия проникающих криопротекторов описывают зависимость эффективности использования криопротектора от температуры, концентрации, коэффициентов проницаемости и отражения, а также от осмотического состава замораживаемых объектов. С нашей точки зрения, представленная система может быть использована как метод комплексной оценки возможного повреждающего действия проникающих защитных веществ. Она охватывает влияние основных технологических параметров (температура и концентрация среды для замораживания), осмотических свойств самого криопротектора (молярный объем, коэффициенты отражения и проницаемости) и осмотических свойств эмбрионов (относительное количество осмотически активной воды). Предлагаемый нами метод может быть использован для повышения технологичности применения криопротекторов, при поиске новых защитных веществ или замораживании новых биологических объектов. Мы же использовали его для повышения технологичности низкотемпературной консервации эмбрионов коровы при использовании криопротекторов с различной проницаемостью, чему будет посвящена следующая часть настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безуглый Н.Д. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих при криоконсервации: Автореф. дис....канд. биол. наук. – Харьков, 1984. – 25 с.
2. Безуглый Н.Д. Низкотемпературная консервация яйцеклеток и эмбрионов в биотехнологии воспроизводства сельскохозяйственных животных: Автореф. дис. д-ра с.-х. наук. – Харьков, 1995. – 36 с.
3. Безуглый Н.Д., Гордиенко Н.А. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих в растворах криопротекторов. Часть I. Общее описание изменений клеточного объема // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 3. – С. 40–46.
4. Безуглый Н.Д., Гордиенко Н.А. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих в растворах криопротекторов. Часть II. Оптимизация методик применения защитных веществ // Пробл. криобиологии. – 1996. – № 2. – С. 39–45.
5. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наук. думка, 1984. – 431 с.
6. Гордиенко Е.А., Брошштейн В.Л. К механизму лизиса. I. Математическая модель // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. – Киев: Наук. думка, 1974. – С. 13–15.
7. Гордиенко Н.А. Защитное действие глицерина при замораживании эмбрионов млекопитающих для их микрохирургического разделения и трансплантации: Автореф. дис....канд. биол. наук. – Харьков, 1991. – 25 с.
8. Медведовський О.В. Підвищення технологічності низькотемпературної консервації ембріонів корови при використанні криопротекторів з різною проникністю: Автореф. дис....канд. с.-г. наук. – Харків, 1996. – 24 с.
9. Anderson E., Ducibella T., Ukena T., Karvonsky M. Ultra-structural developmental changes // In the freezing of mammalian embryos. General discussion. Ciba Found. Symp. – Amsterdam – Elsevier. – 1977. – P. 226–228.
10. Leibo S.P. A one-step method for direct nonsurgical of frozen-thawed bovine embryos // Theriogenology. – 1984. – 21, № 5. – P. 767–775.
11. Renard J.P., Heyman Y., Leymonie P., Plat J.C. Sucrose dilution: a technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw // Theriogenology. – 1983. – 19. – P. 145.
12. Schneider U., Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos // Theriogenology. – 1984. – 21. – P. 68–79.
13. Willadsen S.M., Trounson A.O., Polge C. et al. Low temperature preservation of cow eggs // Egg transfer in cattle. – Luxembourg. – Commission of the European Communities. – 1976. – P. 117–124.
14. Wilmut I. Effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of mouse embryos during cooling and thawing // Life Sci. – 1972. – 173. – P. 1071–1079.

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

Поступила 17.06.96

М.Д.БЕЗУГЛИЙ, О.В.МЕДВЕДОВСЬКИЙ

ОСМОТИЧНА РЕАКЦІЯ ЯЙЦЕКЛІТИН ТА ЕМБРІОНІВ ССАВЦІВ У РОЗЧИНАХ КРІОПРОТЕКТОРІВ. III. Метод комплексної оцінки потенційної пошкоджуючої дії проникаючих кріопротекторів

Інститут тваринництва УААН, м. Харків, п/в Кулиничі

Вивчено вплив проникності цитоплазматичних мембран до води та кріопротекторів, концентрації захисних речовин, температури та осмотичного складу зародків на величину максимальних змін клітинного об'єму. Запропоновано метод комплексної оцінки пошкоджуючої дії проникаючих кріопротекторів.

N.D.BEZUGLY, A.V.MEDVEDOVSKY

OSMOTIC RESPONSE OF MAMMALIAN OOCYTES AND EMBRYOS IN CRYOPROTECTIVE SOLUTIONS. III. A METHOD OF COMPLEX EVALUATION OF POTENTIAL DAMAGING ACTION OF PENETRATING CRYOPROTECTANTS

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

The authors investigated the action of permeability of the cytoplasmic membranes to water and cryoprotectants, concentration of protective substances, temperature and osmotic composition of embryos on the magnitude of maximum changes of the cell volume. A method of complex evaluation of the damaging action of penetrating cryoprotectants is proposed.

УДК 612.07.2+577.1

**И.В.Кузнецов, О.Б.Гарбузенко, А.Э.Кузьмис,
Н.А.Никитина, Е.Э.Перский, Л.А.Утевская**

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА КОЛЛАГЕНА КОЖИ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ТЕМПЕРАТУРНОЙ АДАПТАЦИИ

Проведено сравнительное исследование изменений основных этапов обмена коллагена кожи, обеспечивающих его стабильность на молекулярном и надмолекулярном уровнях в процессе температурной адаптации у холоднокровных животных (рыбы – гамбузии) *in vivo* и теплокровных (млекопитающие – белые крысы) *in vitro*. Показано, что в обоих случаях основные этапы обмена изменяются сходным образом, обеспечивая положительную корреляцию между термостабильностью коллагена и температурой окружающей среды. Эти изменения в основном связаны с посттрансляционными и постсинтетическими модификациями коллагена (гидроксилирование остатков пролина, гликозилирование, поперечное связывание). В экспериментах на коже крыс *in vitro* продемонстрировано также, что при снижении температуры инкубационной среды интенсифицируются распад более термостабильного и синтез менее термостабильного коллагена. Сделан вывод о том, что у млекопитающих сохраняется реликтовый механизм температурной адаптации коллагенового каркаса.

Среди комплекса факторов, обеспечивающих температурную адаптацию животных, большой интерес представляет механизм, поддерживающий соответствие между структурной стабильностью коллагена — основного конструкционного компонента соединительной ткани — и температурой окружающей среды. Хорошо известно, что температура денатурации коллагена, которая определяется его структурной стабильностью, у холоднокровных животных близка к верхнему пределу температуры среды обитания, а у теплокровных — к температуре их тела [3, 6]. Эта зависимость обусловлена особенностями обмена коллагена, необходимым этапом распада которого является денатурация фрагментов, образующихся после его расщепления тканевыми коллагеназами при температуре тела. Обнаружена положительная корреляция температуры денатурации коллагена как с суммарным содержанием в нем иминокислот, так и с относительным количеством остатков оксипролина [1, 2]. При этом следует отметить, что суммар-

ное содержание иминокислот в коллагене ныне живущих животных различных видов является результатом длительной молекулярной эволюции и закреплено генетически. В то же время количество оксипролина в коллагене определяется лишь интенсивностью гидроксилирования остатков пролина, происходящего под действием пролилгидроксилазы в процессе посттрансляционной модификации.

Холоднокровные животные средней полосы (рыбы, амфибии и др.) в течение года испытывают перепады температуры, достигающие десятков градусов. Естественно, должны существовать механизмы адаптации коллагена к таким значительным изменениям температуры внешней среды. Можно предположить, что одним из таких механизмов является изменение активности пролилгидроксилазы. С температурой денатурации коллагена хорошо коррелирует температура “плавления” содержащих коллаген тканей, которая, однако, существенно выше за счет межмолекулярных взаимодействий. На надмолекулярном уровне термостабильность коллагенового каркаса зависит не только от температуры его денатурации, но и от его концентрации, определяемой соотношением синтеза и распада и от его структуры, определяемой степенью поперечного связывания и рядом других модификаций, в частности гликозилированием.

В связи с этим целью данной работы было изучение особенностей основных этапов обмена коллагена, обеспечивающих его стабильность на молекулярном и надмолекулярном уровнях в процессе температурной адаптации. Опыты были проведены на холоднокровных животных *in vivo* и теплокровных *in vitro*, т. е. в условиях, когда снята характерная для последних температурная регуляция.

В качестве представителей холоднокровных использовали рыб-гамбузий обыкновенных из природной популяции, обитающей в водоеме-охладителе ГРЭС. Для опытов отбирали особей обоего пола с длиной тела 19–24 мм, которых разделяли на две группы и помещали в аквариумы с температурой воды 14 и 24 °С соответственно. Плотность животных составляла 5 особей на 1 л. Животные получали сухой корм (дафнии) 1 раз в сутки. На 40-е сут в аквариум вносили ^{14}C -пролин отечественного производства с таким расчетом, чтобы его радиоактивность в воде составляла 14 МБк/л. На 5-е сут рыб умерщвляли и в эксперимент брали кожу спины, очищенную от чешуи и подкожного жира. Как показатели обмена были выбраны: интенсивность синтеза, которую определяли по радиоактивности ^{14}C -Опро и интенсивность гидроксилирования остатков пролина в коллагене, которую оценивали по отношению радиоактивности ^{14}C -Опро / ^{14}C -Про + ^{14}C -Опро [4]. Измерения радиоактивности проводили на счетчике БЕКМАН ЛС 7800. Аналитическое определение оксипролина проводили методом [8]. О степени поперечного связывания коллагена в надмолекулярных структурах судили по двум показателям — растворимости коллагена в 1 М растворе NaCl и по количеству денатурированного коллагена, переходящего в раствор при нагревании образцов кожи в воде при 60 °С в течение 30 мин.

В эксперименты с теплокровными были взяты 3-месячные крысы-самки линии Вистар, содержащиеся на стандартном рационе вивария. Объектом исследования была кожа спины, очищенная от шерсти и подкожного жира. Образцы гомогенизировали и инкубировали в течение 6 ч при различных температурах (от 10 до 40 °С) в растворе Кребса-Рингера с добавлением Н-пролина с радиоактивностью 0,4 МБк на 10 мл инкубационного раствора, содержащего 500 мг сырой ткани [5]. Затем из образцов 1 М раствором NaCl извлекали растворимый коллаген типа I. В полученном растворе изучали те же параметры обмена коллагена, что и в экспериментах на рыбах. Кроме того оценивали уровень общего распада коллагена в гомогенате — по количеству свободного оксипролина, вышедшего из образцов в инкубационный раствор в процессе аутоколлагенолиза. Измеряли также степень общего гликозилирования коллагена — по количеству гексоз, связанных с коллагеном, экстрагируемым 1 М раствором NaCl [7].

Результаты исследований, проведенных на рыбах, представлены на рис. 1. Согласно полученным данным, при более высокой температуре наблюдается значительно более высокая (в 4 раза) удельная радиоактивность оксипролина в образцах, что свидетельствует об интенсификации синтеза коллагена (рис. 1, а). Параллельно существенно (на 35 %) увеличивается и степень гидроксирования пролина в коллагене (рис. 1, б). Таким образом, при более высокой температуре интенсивность ключевого этапа посттрансляционных модификаций коллагена — гидроксирования остатков пролина — также повышается. Характерно, что степень гидроксирования пролина, измеренная в наших экспериментах, лежит в пределах 27–36 %, что хорошо соответствует

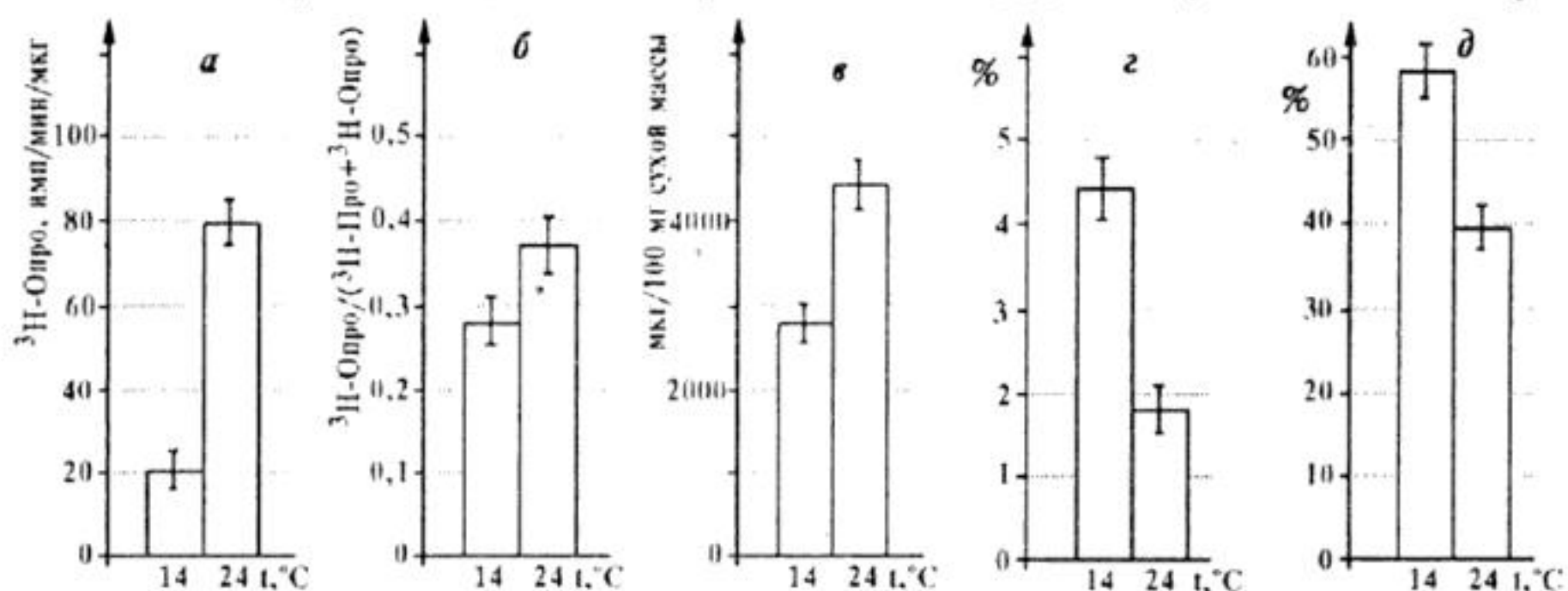


Рис. 1. Температурная зависимость: а — удельной радиоактивности коллагена, вышедшего из кожи рыб в экстракционный раствор 1 М NaCl; б — гидроксирования коллагена, вышедшего из кожи рыб в раствор при экстракции 1 М NaCl; в — концентрации оксипролина в коже гамбузий; г — растворимости коллагена, вышедшего из кожи рыб в экстракционный раствор 1 М NaCl; д — растворимости коллагена, вышедшего в раствор из кожи рыб при нагревании

средним значениям степени гидроксирования пролина в коллагене рыб средних широт.

Измерения концентрации оксипролина в коже гамбузий, содержащихся при различных температурах воды, показали, что при 24 °C она значительно выше (на 35 %), чем при 14 °C (рис. 1, в). Этот эффект, очевидно, является результатом более высокой интенсивности синтеза коллагена при повышенной температуре воды. При более высокой температуре воды происходит и интенсификация поперечного связывания коллагена в коже. Об этом свидетельствует снижение выхода из кожи рыб денатурированного коллагена при нагревании ткани в воде при 60 °C, а также растворимого коллагена при его экстракции 1 М раствором NaCl (рис. 1, д, г).

Вся совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что даже кратковременное повышение температуры среды обитания вызывает у рыб “быструю” структурную перестройку коллагеновых образований. Она заключается в росте структурной стабильности коллагена как на молекулярном уровне (повышение степени гидроксирования пролина в коллагене), так и на надмолекулярном уровне (увеличение концентрации коллагена и степени его поперечного связывания) и определяется согласованными изменениями интенсивности последовательных стадий обмена коллагена.

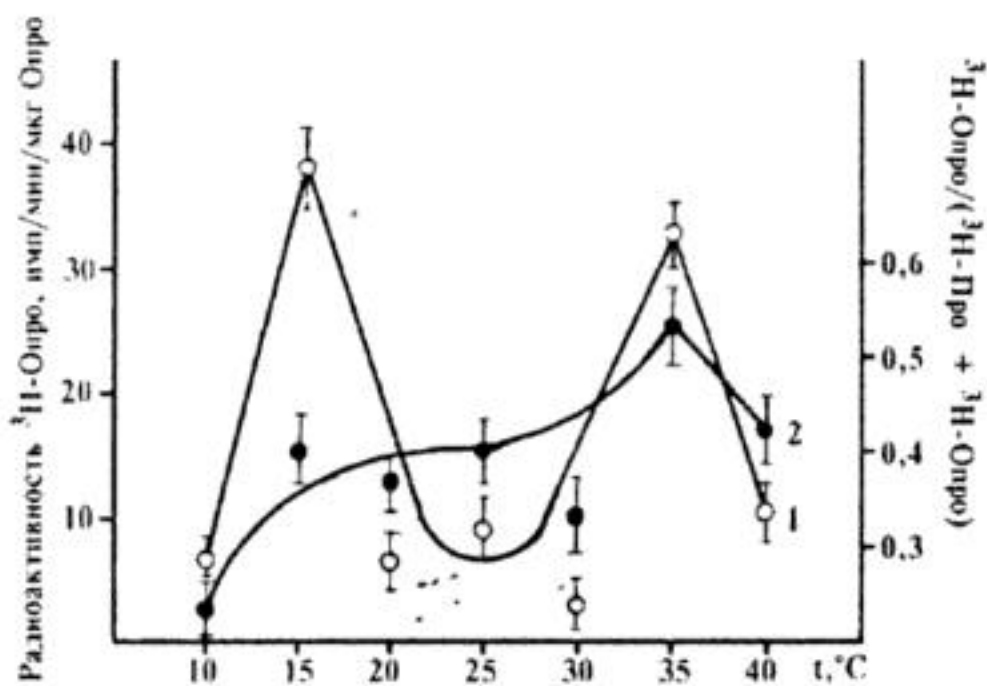


Рис. 2. Температурная зависимость радиоактивности $^3\text{H}\text{-Oпро}$ в коллагене, вышедшем из кожи крыс при экстрагировании 1 М NaCl (1), и степени его гидроксирования (2)

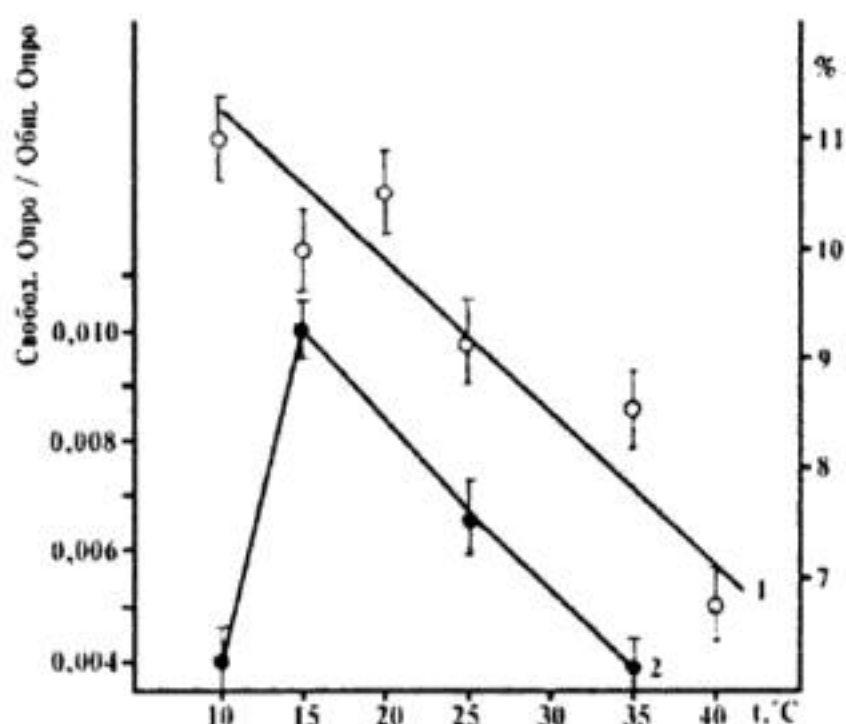


Рис. 3. Температурная зависимость растворимости коллагена, экстрагированного из кожи крыс 1 М NaCl (1), и его аутоколлагенолиза (2)

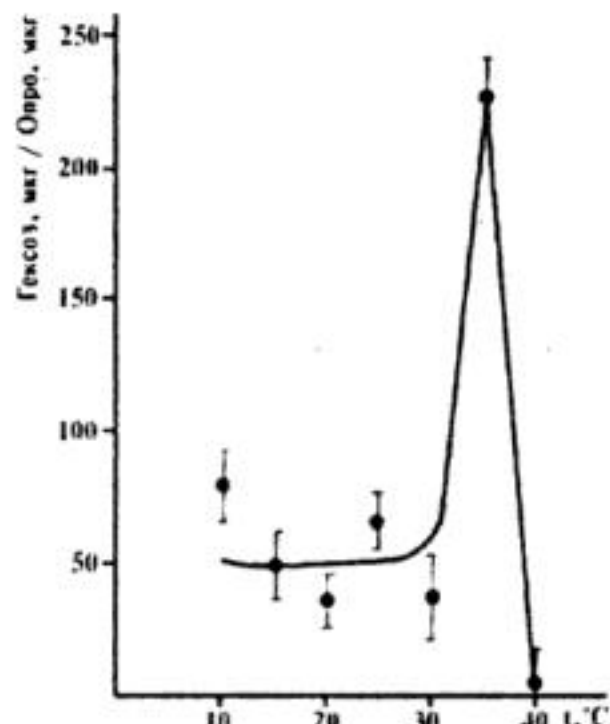


Рис. 4. Температурная зависимость степени гликозилирования коллаген-полисахаридных комплексов, извлеченных из кожи 1 М раствором NaCl

Данные второй серии экспериментов, проведенных на коже крыс, представлены на рис. 2–4. Как видно, максимальная удельная радиоактивность Опро обнаруживается при 15 и 35 °C, что свидетельствует о наибольшей интенсивности синтеза коллагена при этих температурах (рис. 2, 1). Интенсивности гидроксирования пролина и общего гликозилирования коллагена имеют в этом температурном интервале один максимум — при 35 °C (рис. 2, 2 и 4). В то же время интенсивность распада коллагена при этой температуре минимальна. Ее максимальное значение наблюдается при 15 °C (рис. 3, 2). С повышением температуры инкубации растворимость коллагена в 1 М растворе NaCl линейно снижается (рис. 3, 1).

Как было указано выше, термостабильность коллагена соответствует верхнему пределу температуры среды обитания у холоднокровных или температуре тела у теплокровных. Структурные параметры коллагена кожи теплокровных, оптимальные для его функционирования при температуре тела, определяются особенностями его обмена, которые возникли в ходе эволюции. Эти особенности сохраняются в процессе инкубации кожи при 35 °C — температуре, близкой к температуре тела. По-видимому, при более низких температурах инкубации структурные параметры коллагеновых образований, сформированных *in vivo*, уже не соответствуют изменившимся условиям среды, и они должны быть заменены новыми. Первый этап такой замены — разрушение старых коллагеновых структур. Действительно, интенсивность коллагенолиза (рис. 3, 2) растет со снижением температуры инкубации, достигая максимума при 15 °C. Одновременно, при 15 °C наблюдается максимальный синтез коллагена, который должен войти в состав нового матрикса (рис. 2, 1). Вследствие этого вновь формирующиеся надмолекулярные коллагеновые образования имеют меньшую структурную стабильность, что отвечает более низкой температуре окружающей инкубационной среды. При этом степень гидроксирования пролина при 15 °C меньше таковой при 35 °C. Степень общего гликозилирования коллагена — модификации, также вносящей вклад в структурную стабильность надмолекулярных образований, при 15 °C в 2,5 раза меньше, чем при 35 °C (рис. 4). Показателем этого является значительно более высокая растворимость коллагена при 15 °C (рис. 3, 1), что свидетельствует об уменьшении степени его связывания в надмолекулярных структурах при этой температуре.

Результаты проведенных экспериментов показывают, что влияние температуры окружающей среды на основные этапы обмена коллагена и у рыб *in vivo* и у млекопитающих *in vitro* имеет сходный характер: при повышении температуры формируются более термостабильные коллагеновые образования, при понижении температуры — менее термостабильные.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что у млекопитающих сохранился реликтовый механизм адаптации структуры коллагенового каркаса к температуре окружающей среды, свойственный холоднокровным, который, однако, остается не востребуемым ввиду постоянства температуры их тела.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурджанадзе Т.В. Филогенетический аспект стабилизации структуры коллагена: Автореф. дис.... д-ра. биол. наук. – Тбилиси, 1990. – 31 с.
2. Есипова Н.Г., Айзенхабер Ф., Айзенменгер Ф., Туманян В.Г. Новая трактовка термодинамической роли иминокислот в коллагене. Разрешение термодинамического парадокса // Биофизика. – 1992. – 37, вып. 1. – С. 68–72.
3. Есипова Н.Г., Григолава Н.В., Щеголева Т.Ю. и др. Почему температура денатурации коллагена должна быть близка к температуре развития вида? // Биофизика. – 1981. – 26, вып. 2. – С. 355–356.
4. Замаева Т.В. Определение ^{14}C -оксипролина как метод для изучения синтеза коллагена в модельных системах // Совр. методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 265–270.
5. Лебедев Д.А. Метод изучения обмена коллагена в коже человека // Вопросы мед. химии. – 1978. – № 5. – С. 708–712.
6. Никитин В.П., Перский Е.Э., Утевская Л.А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. – Киев: Наук. думка, 1977. – 242 с.
7. Dubous M., Gilles K.A., Hamilton J.K., et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. – 1956. – 28, № 3. – P. 350–356.
8. Stegemann H., Stalder K. Determination of hydroxyproline // Clin. Chim. Acta. – 1967. – 18, № 2. – P. 267–273.

Харьковский гос. ун-т

Поступила 06.08.96

І.В.КУЗНЕЦОВ, О.Б.ГАРБУЗЕНКО, А.Е.КУЗЬМІС, Н.А.НІКІТІНА, С.Е.ПЕРСЬКИЙ,
Л.А.УТЕВСЬКА

ОСОБЛИВОСТІ ОБМІНУ КОЛАГЕНУ ШКІРИ ХРЕБЕТНИХ ТВАРИН ПРИ ТЕМПЕРАТУРНІЙ АДАПТАЦІЇ

Харківський державний університет

Проведено порівняльне дослідження змін головних етапів обміну колагену шкіри, що забезпечують його стабільність на молекулярному та надмолекулярному рівнях у процесі температурної адаптації холоднокровних тварин (риби – гамбузії) *in vivo* та теплокровних (ссавці – білі щури) *in vitro*. Показано, що в обох випадках головні етапи обміну змінюються подібним чином, забезпечуючи позитивну кореляцію між термостабільністю колагену та температурою навколишнього середовища. Ці зміни в основному пов'язані з посттрансляційними та постсинтетичними модифікаціями колагену (гідроксилювання залишків проліну, глікозилювання, поперечне зв'язування). В експериментах на шкірі щурів *in vitro* продемонстровано також, що при зниженні температури інкубаційного середовища інтенсифікуються розпад більш термостабільного та синтез менш термостабільного колагену. Зроблено висновок, що у ссавців зберігається реликтовий механізм температурної адаптації коллагенового каркасу.

I.V.KUZNETSOV, O.B.GARBUZENKO, A.E.KUZMIS, N.A.NIKITINA, E.E.PERSKY,
L.A.UTEVSKAYA

PECULIAR FEATURES OF COLLAGEN EXCHANGE IN THE SKIN OF THE VERTEBRATE ANIMALS DURING TEMPERATURE ADAPTATION

Kharkov State University

The authors conducted a comparative analysis of the changes in the basic stages of the skin collagen exchange, which provide for its stability at the molecular and supramolecular levels in the process of temperature adaptation in cold-blooded animals (Gambusia fish) *in vivo* and warm-blooded animals (mammalian white rats) *in vitro*. It was shown that in both cases the basic stages of the exchange are altered in a similar manner, thus providing for a positive correlation between collagen thermal stability and environmental temperature. These changes relate, mainly, to posttranslation and postsynthetic modifications of collagen (hydroxylation of proline residues, glycosylation, cross-linking). The experiments with the rat skin *in vitro* also demonstrated that lowering of the temperature of the incubation medium results in the intensification of degradation of a more thermally stable and synthesis of a less thermally stable collagens. The authors conclude that mammals still maintain a relict mechanism of temperature adaptation of the collagen structure.

А. Ю. Никольченко**ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ И
ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ПРИ -196°C В ПРИСУТСТВИИ
НЕКОТОРЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СТРУКТУРНО-
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА**

Приведены результаты исследования влияния замораживания и длительного хранения при температуре -196°C на функциональную активность церулоплазмينا (ЦП) в сыворотке крови. Активность ЦП значительно снижается при замораживании-оттаивании и низкотемпературном хранении этого белка без криопротекторов. Присутствие криопротекторов, особенно ПЭГ-400, предохраняет ЦП от потери функциональной активности.

Церулоплазмин (ЦП) — медьсодержащий гликопротеид, принадлежащий к α_2 -глобулиновой фракции сыворотки крови. Имеющиеся методы криоконсервирования позволяют хранить сыворотку в течение нескольких лет почти без изменения свойств сыворотки, за исключением некоторых ее компонентов [1]. Такими наиболее криоустойчивыми компонентами сыворотки являются в первую очередь белки α_2 -глобулиновой фракции [17], к которым относится и церулоплазмин. В связи с этим представляет интерес изучение криоустойчивости этого белка, поскольку результаты подобных исследований могут найти применение в разработке теории криозащиты биологических объектов. Кроме того, белки α_2 -глобулиновой фракции, в частности ЦП, выполняют в организме ряд важных функций и их исследование имеет большую перспективу в клинической практике [2, 6].

В организме ЦП является полифункциональным белком, основная функция которого состоит в транспорте ионов меди из печени с током крови к различным клеткам других органов и тканей [10]. Помимо этого, ЦП проявляет антиоксидантную активность [15], принимает участие в неспецифической защите организма при многих патологических процессах [3, 13]. Введение ЦП животным с привитыми опухолями приводит к торможению роста опухоли на 25-50%. Очевидно, что повышение содержания ЦП путем введения экзогенного препарата может играть определенную роль в активизации защитных сил организма при различных патологиях, в том числе и при злокачественном росте [3]. Поэтому определение ЦП в сыворотке крови имеет очень большое клинико-диагностическое значение. Изменение концентрации этого белка в крови служит чутким показателем многих инфекционных болезней, заболеваний печени и нервной системы [6].

Целью данного исследования было изучение влияния замораживания-оттаивания и длительного хранения церулоплазмينا при -196°C в присутствии криопротекторов и без них на энзиматическую активность этого гликопротеида.

Для исследования структурно-функциональных свойств использовали определение активности церулоплазмينا в сыворотке крови модифицированным методом Ревина [6]. Умножая значение оптической плотности на коэффициент пересчета 87,5 для р-фенилендиамина и на 10 (коэффициент пересчета для 1 мл сыворотки), получали величину активности церулоплазмينا, выраженную в ммоль продукта реакции (окисленного р-фенилендиамина), который образуется в присутствии 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации.

Свежую незамороженную сыворотку донорской крови 24 проб, в которых активность ЦП находилась в пределах нормы (300–380 ммоль/л ч), погружали в жидкий азот (данная серия проб была контрольной). Затем сыворотку этих же доноров переносили в пластмассовые емкости объемом 1 мл и помещали в жидкий азот, где эти пробы хранились 1, 6, 12 и 24 мес соответственно. По истечении указанных сроков низкотемпературного хранения серии проб извлекали из жидкого азота и определяли в них активность ЦП описанным выше

методом. В одной серии проб определяли активность ЦП непосредственно после замораживания-отогрева, не подвергая эти пробы сыворотки низкотемпературному хранению. Четыре других серии тех же образцов донорской крови были приготовлены следующим образом. В сыворотку добавлялись криопротекторы: глицерин в концентрации 10%, ДМСО в концентрации 7,5%, полиэтиленгликоль молекулярной массы 400 (ПЭГ-400) в 15%-й концентрации и полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1000 (ПЭГ-1000) в 10%-й концентрации. Эти пробы также помещались в жидкий азот и хранились 6, 12 и 24 мес, после чего в сыворотке этих проб определялась активность ЦП. Экспериментальные данные обработаны статистически по методу Стьюдента-Фишера, а также методом дисперсионного анализа на компьютере типа IBM/ASI с использованием пакета статистических программ "Stadia".

В серии опытов по замораживанию без криопротекторов и разных сроков хранения ЦП в жидком азоте полученные данные свидетельствуют о падении энзиматической активности этого гликопротеида под влиянием низких температур (-196°C). Как выяснилось, на структурно-функциональные свойства влияет как сам процесс замораживания-оттаивания, так и длительность низкотемпературного хранения сыворотки.

На рис. 1 показано изменение активности ЦП при разных сроках низкотемпературного хранения. Как видно из этих данных, происходит значительное ($P<0,001$) понижение активности ЦП непосредственно после замораживания проб крови. При этом (табл.) по сравнению с контролем, принятым за 100%, активность ЦП понижалась на 13,5%. После месяца хранения ЦП при -196°C ($P>0,05$) статисти-

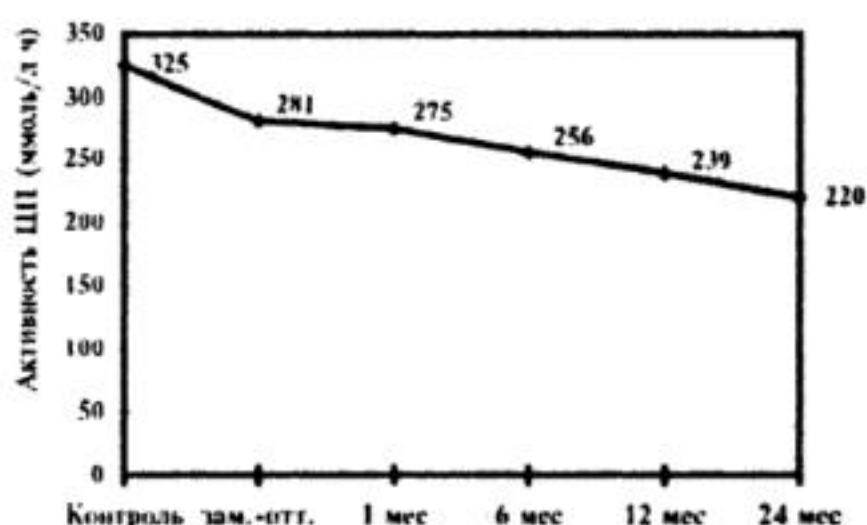


Рис. 1. Энзиматическая активность ЦП при разных сроках низкотемпературного хранения без криопротекторов. Контролем является активность ЦП в свежей сыворотке крови, не подвергавшейся замораживанию и хранению

стически достоверного снижения активности этого белка не наблюдается, по сравнению с образцами, которые только замораживались. Дальнейшее понижение активности ЦП происходит при более длительных сроках низкотемпературного хранения (0,5 года и выше). Активность ЦП сыворотки, хранившейся 0,5 года без криопротекторов снизилась на 21,2%. При хранении в течение года активность понизилась на 28,8%, а у проб, хранившихся 2 года, средняя активность ЦП упала на 32,3% от таковой в контроле. Обработка полученных данных по методу Стьюдента-Фишера показала статистически достоверную разницу при сравнении результатов каждого срока замораживания между собой и с контролем ($P<0,001$).

В литературе есть данные о том, что белки α_2 -глобулиновой фракции среди других плазменных белков наиболее чувствительны к низкотемпературным воздействиям [1]. Церулоплазмин, как известно, относится к этой фракции [10].

Методом ЭПР установлено [8], что атомы меди в ЦП неоднородны по своему валентному состоянию и могут существовать в двух парамагнитных и диамагнитной формах. Диамагнитное состояние выражено в том, что ионы меди могут существовать в виде окисленных пар $\text{Cu}^{2+} - \text{Cu}^{2+}$ и служить акцепторами электронов. Парамагнитные формы отличаются по спектральным свойствам и обозначаются как тип I Cu^{2+} и тип II Cu^{2+} . Тип I Cu^{2+} — это так называемая "голубая медь", включает два атома

Снижение активности ЦП после замораживания-оттаивания и разных сроков низкотемпературного хранения без криопротекторов, %

Сроки замораживания, мес	%
Контроль	100
Замораживание-оттаивание	86,5
1	84,6
6	78,8
12	71,2
24	67,7

меди, ответственные за голубую окраску белка и имеющие максимум абсорбции при 610 нм. Два атома типа II Cu^{2+} — “не голубая медь” (максимум абсорбции при 310–350 нм). Эти ионы меди прочно связаны с белком и ответственны за энзиматические свойства и связывание анионов [10]. В работе [9] авторы обнаружили существование двух форм Cu^{2+} -центров типа II у ЦП, которые несколько отличаются по спектрам ЭПР. Новая форма Cu^{2+} -центров типа II у ЦП проявляется в виде перегиба или слабой линии в спектрах ЭПР вблизи 330 мТ. Появление этого перегиба, сопровождающегося уменьшением относительного вклада Cu^{2+} -центров типа I в спектр ЭПР и симбатным обесцвечиванием белка, было зарегистрировано в процессе хранения препарата ЦП.

Так как принцип метода определения активности ЦП базируется на окислении р-фенилендиамина при участии ЦП, то снижение активности этого гликопротеида должно быть связано с изменением конформации молекулы ЦП, в результате которого каталитический центр белка либо закрывается другими доменами, либо связывает анионы вследствие гиперсолевого эффекта, который индуцируется при действии низких температур, и происходит восстановление Cu^{2+} -центров типа I и II. Известно [10], что третичная структура ЦП может быть представлена в виде очень плотно упакованной глобулы, в которой домены группируются по 3 и располагаются на 2 уровнях. Два из этих доменов в каждом слое сближены. В центральном и С-концевом сегментах имеются 2 группы вероятных аминокислотных лигандов Cu^{2+} -центров типа I. Этот центр, по-видимому, достаточно нестабилен и подвержен восстановлению [9].

Принято считать, что главным источником стабильности нативной структуры служит тенденция неполярных групп не вступать в контакт с водой, приводящая к возникновению гидрофобных взаимодействий и образованию внутри- и межмолекулярных водородных связей. При снижении температуры следует ожидать усиления образования водородных связей. Это может приводить к усилению внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий, в результате которых может произойти как перестановка расположения цепей в белковой глобуле, так и агрегация белковых молекул [7], что в той или иной степени приводит (в нашем случае) к падению активности белка. Конформация ЦП и его Cu^{2+} -центров типа II существенно зависят от окружения белка. В организме заметный вклад в это влияние вносят физиологическое состояние человека и наличие патологических процессов. В наших экспериментах на окружение белка оказывают влияние низкие температуры, в результате чего белок подвергается действию “эффектов раствора” и кристаллов льда. Изменение в окружении ЦП проявляются двояко: изменяются параметры Cu^{2+} -центров типа II и меняется относительный вклад Cu^{2+} -центров типа I в результате их частичного обратимого восстановления в Cu^{+} -ионы. Причем значительный вклад в структурные изменения ЦП вносит сам процесс замораживания-оттаивания. Об этом свидетельствует значительное понижение активности ЦП непосредственно после замораживания-оттаивания проб крови на 13,5% (табл.).

Падение активности ЦП может быть вызвано рядом причин. Было установлено, что в поддержании определенной конфигурации белка и в связывании атомов меди участвуют остатки Туг и His. При этом, остатки Туг участвуют в поддержании активной формы молекулы ЦП, в то время как остатки His принимают непосредственное участие в связывании с атомами меди в каталитическом центре [8]. Таким образом, можно предположить наличие влияния факторов криоконсервирования на изменение расположения Туг в молекуле ЦП, в результате которого нарушаются структурно-функциональные свойства этого белка.

При исследовании образцов сыворотки, которые были заморожены с различными криопротекторами, наилучшая сохранность молекулы церулоплазмина выявилась при консервировании сыворотки в присутствии криопротектора ПЭГ-400. Средняя активность ЦП через 0,5, 1 и 2 года хранения составила: $320 \pm 3,94$; $317 \pm 3,84$ и $311 \pm 3,89$ ммоль/мл ч соответственно (рис. 2).

При сравнении средней активности ЦП в пробах разных сроков хранения с контролем не выявлено достоверных различий в активности ЦП до замораживания (контроль) и после хранения проб с ПЭГ-400 в течение 1 мес, 0,5 и 1 года ($P > 0,05$). Не выявлено также достоверных изменений при сравнении между собой результатов всех сроков криоконсервирования (1, 6, 12 и 24 мес) в присутствии ПЭГ-400 ($P > 0,05$). Статистически достоверные различия были получены при сравнении активности ЦП в контроле лишь с таковой после 2 лет хранения с ПЭГ-400 ($P < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что криопротектор ПЭГ-400 достаточно хорошо предохраняет исследуемый белок от воздействия низких температур. Криоконсервирование сыворотки с криопротектором ПЭГ-400 способствует сохранению ее активности без достоверного снижения. Однако при более длительном хранении (до 24 мес) происходит незначительное снижение активности ЦП ($P < 0,05$).

Проведенный нами дисперсионный анализ градаций влияния криоконсервирования в присутствии криопротектора ПЭГ-400 показал, что влияние фактора (замораживание и его сроки) на отклик (активность ЦП) статистически незначимо. Это подтверждает, что криопротектор ПЭГ-400 достаточно эффективно сохраняет исследуемый белок.

При изучении влияния других криопротекторов были получены следующие результаты. Замораживание-оттаивание и хранение сроком 1 мес в присутствии всех использованных криопротекторов (глицерин, ДМСО, ПЭГ-400 и ПЭГ-1000) достоверно не снижало энзиматической активности ЦП по сравнению с контролем ($P > 0,05$).

После полугодового хранения проб в присутствии 10%-го раствора глицерина средняя активность ЦП составила $315 \pm 3,54$ ммоль/мл ч (рис. 2).

Активность ЦП при замораживании сыворотки с глицерином оказалась в целом ниже, чем с ПЭГ-400 (рис. 2). Наиболее выраженными были различия в активности ЦП при сравнении результатов хранения этого белка в течение 1 и 2 лет в глицерине и в ПЭГ-400, однако эти различия не являлись статистически значимыми (12 мес, $P > 0,05$; 24 мес, $P > 0,05$). При исследовании энзиматической активности ЦП, хранившегося с глицерином, достоверные различия выявлены лишь при сравнении контроля с этим показателем при 12 и 24 мес хранения ($P < 0,01$ и $P < 0,001$ соответственно). При сравнении между собой результатов разных сроков низкотемпературного хранения в присутствии глицерина в активности ЦП не были выявлены статистически достоверные различия, за исключением разницы в активности проб, хранившихся 6 и 24 мес ($P < 0,05$).

Применение дисперсионного анализа показало достоверное влияние замораживания и разных сроков криоконсервирования проб крови в присутствии глицерина на активность ЦП в пределах от 16 до 21 %.

ДМСО способствует несколько большей сохранности молекулы ЦП, чем глицерин, только на ранних этапах криоконсервирования (до 6 мес). При более поздних сроках криоконсервирования активность ЦП под защитой ДМСО становится немного меньше, чем под защитой глицерина. Эти различия, наблюдаемые при сопоставлении средних величин активности ЦП (рис. 2), оказались статистически недостоверными ($P > 0,05$). Также не обнаружено статистических различий между средней активностью ЦП у проб, хранившихся 0,5 года и год с ДМСО и с ПЭГ-400 ($P > 0,05$). Значимой разница оказалась лишь после 24 мес хранения ($P < 0,01$). После полугодового хранения проб с ДМСО, как и в случае с глицерином, средняя активность ЦП достоверно не отличалась от таковой в контроле. Достоверными были различия и при сравнении значений активности ЦП в контроле со значениями, полученными после 12 и 24 мес замораживания (в обоих случаях $P < 0,001$).

Дисперсионный анализ, как и в случае с глицерином, выявил статистически значимое влияние фактора замораживания и его градаций (сроков низкотемпературного хранения) на активность ЦП, замороженного в присутствии ДМСО. Данные дисперсионного анализа показали, что при хранении ЦП

с ДМСО сила влияния фактора проявилась в пределах от 25 до 29%, а при хранении с глицерином — от 16 до 21%.

Таким образом, по степени своего влияния на структурно-функциональную сохранность церулоплазмينا ДМСО практически не отличается от глицерина. На это указывает и отсутствие статистических различий, отмеченное выше, при сравнении средних активностей ЦП по каждому сроку криоконсервирования у проб, хранившихся с глицерином и с ДМСО.

Различие в действии этих двух криопротекторов заключается в том, что при малых сроках замораживания ДМСО несколько лучше предохраняет исследуемый гликопротеид, чем глицерин. Но с увеличением времени низкотемпературного хранения протекторное влияние ДМСО на ЦП становится менее значительным по сравнению с влиянием глицерина. Как известно [12], глицерин, формирующий прочные связи с водой, стабилизирует гидратную структуру вокруг белков, предупреждая тем самым возможность их криоденатурации в процессе замораживания. При вымораживании свободной и частично связанной воды из биомакромолекул глицерин связывается с гидрофильными участками белков и формирует защитную оболочку вокруг белка. Поскольку при замораживании дегидратация приводит к пространственному сближению макромолекул и модификации активных SH-групп, глицерин как осмотически деформирующий агент препятствует жесткой дегидратации молекул связанной воды белка и тем самым препятствует критическому сближению макромолекул. Очевидно, подобным действием на биомакромолекулы обладает и ДМСО. При взаимодействии с водой глицерин разрушает ее льдоподобный каркас, однако при этом формирует гидратную оболочку вокруг молекул воды [11]. Формирование такой оболочки способствует стабилизации гидратных решеток белков за счет перехода молекул свободной воды в связанное состояние.

ДМСО в своем составе содержит функциональную группу $O=S-CH_3$ [4], поэтому он обладает высокой способностью вступать в реакции с солями и оксидами фосфата, серы, формирует связи с мочевиной, стеариновой кислотой и другими органическими соединениями. По-видимому, защитный эффект ДМСО на ЦП более проявляется в том, что с водой ДМСО образует устойчивые водородные связи, а с ионами — комплексные соединения, что влияет на активность окислительных реакций. Вероятно, по этим причинам ДМСО лучше предохраняет ЦП на ранних стадиях его хранения, а глицерин — при более длительных сроках.

Низкотемпературное хранение проб крови в присутствии ПЭГ-1000 обнаружило несколько лучшие результаты, чем в присутствии глицерина и ДМСО. Однако дисперсионный анализ показал, как и в

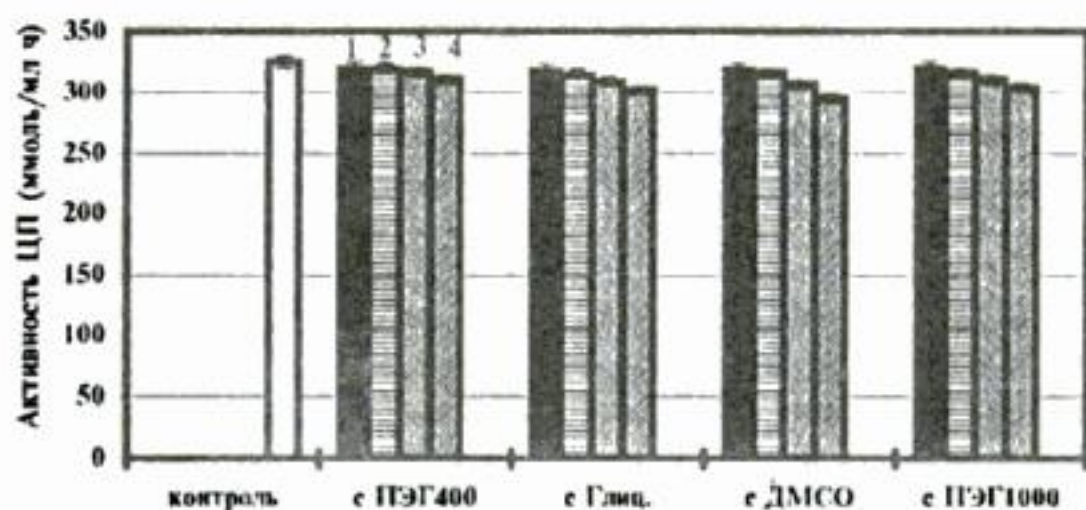


Рис. 2. Энзиматическая активность ЦП после разных сроков хранения (1 — 1, 2 — 6, 3 — 12, 4 — 24 мес) в жидком азоте в присутствии криопротекторов. Контролем является активность ЦП в свежей сыворотке крови, не подвергавшейся замораживанию и хранению

несколько лучше, чем ПЭГ-1000, предохраняет ЦП от падения его активности после различных сроков замораживания. Это видно из диаграммы (рис. 2). Дисперсионный анализ влияния криоконсервирования ЦП в присутствии ПЭГ-1000 выявил, что влияние этого фактора достоверно с вероятностью $\beta > 0,999$. Причем сила влияния составила не менее 10%, но не более 16%.

случае с ДМСО и глицерином, наличие влияния замораживания и сроков криоконсервирования на активность ЦП при хранении проб с криопротектором ПЭГ-1000. Несмотря на то, что статистически достоверная разница при сравнении активности ЦП во всех сроках замораживания с ПЭГ-1000 и с ПЭГ-400 отсутствует ($P > 0,05$), ПЭГ-400 не-

Наилучшую сохранность ЦП при консервировании в присутствии ПЭГ-400, по-видимому, можно объяснить тем, что полимерные криопротекторы, в частности ПЭГ-400 и ПЭГ-1000, образуют связи с молекулами воды, входящими в координационную сферу макромолекулы, и этим самым значительно повышают вязкость микроокружения [1]. При этом в водной среде происходит формирование мицеллярных структур, которые разворачиваются, и сольватация такой системы увеличивается, а вязкость жидкой фазы повышается. В силу этого, а также в результате непосредственного взаимодействия реакционноспособных групп белков и молекул связанной воды, структура биомacroмолекул стабилизируется. Причем эти криопротекторы не нарушают структуру белковой молекулы, а влияют лишь на свойства ее поверхностного водно-белкового слоя [12]. Есть данные о том [16], что вытесняющая способность ПЭГ зависит от молекулярной массы. По отношению к бычьему сывороточному альбумину наилучшей комплементарностью обладает ПЭГ до молекулярной массы 500, а после 600 и до 3000 вытесняющая способность по отношению к данной гидрофобной области снижается. По-видимому, этим объясняется несколько лучшая сохранность ЦП после низкотемпературного хранения этого белка с ПЭГ-400, чем с ПЭГ-1000 (рис. 2).

Анализ полученных результатов позволил сделать следующие выводы:

1) церулоплазмин, подвергаясь низкотемпературному воздействию, значительно теряет свою активность. На потерю активности ЦП влияет как замораживание-оттаивание, так и длительное хранение этого белка при низких температурах;

2) присутствие различных криопротекторов (глицерина, ДМСО, ПЭГ-400 и ПЭГ-1000) в пробах крови, подвергавшихся криоконсервированию, существенно предохраняет ЦП от потери его функциональной активности;

3) различные криопротекторы несколько отличаются по степени своего влияния на сохранность ЦП. Наилучшим образом энзиматическая активность ЦП сохраняется в присутствии 15%-го ПЭГ-400. Данные дисперсионного анализа позволяют расположить исследуемые криопротекторы по степени их защиты от деструктивного влияния криоконсервирования на функциональную активность ЦП следующим образом: ПЭГ-400 > ПЭГ-1000 > глицерин > ДМСО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 430 с.
2. Бейсембаева Р.У. Гаптоглобин и его клиническое значение // Клиническая медицина. – 1986. – № 1. – С. 13–16.
3. Бердинских Н.К., Волощенко Ю.В., Ливиниц В.И. и др. Влияние церулоплазмينا на рост экспериментальных опухолей и пролиферативную активность клеток // Эксперим. онкология. – 1984. – 6, № 3. – С. 63–66.
4. Верстаков Е.С., Ястремский П.С., Кестлер Ю.М., Гончаров В.В. Диэлектрические и структурные свойства водных растворов ДМФА и ДМСО // Журн. структурной химии. – 1980. – 21, № 5. – С. 91–95.
5. Захарова Е.Т., Васильева В.Б., Горбунова В.Н. Выделение и физикохимическая характеристика церулоплазмينا крыс // Биохимия. – 1983. – 48, вып. 10. – С. 1709–1720.
6. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – 336 с.
7. Луговой В.И., Моисеев В.А. Влияние низких температур на растворимые ферменты // Итоги науки и техники / ВИНТИ, сер. "Биофизика", Т. 9. – С. 53–79.
8. Мошков К.А., Каримова Х.М., Нейфах С.А. Молекулярная организация церулоплазмينا по данным исследования ограниченного протеолиза и электронной микроскопии // Биоорганическая химия. – № 3. – С. 395–407.
9. Рыльков В.В., Тарасов М.Ю., Мошков К.А. Новая форма медьсодержащих центров в церулоплазмине человека // Биохимия. – 1990. – 55, № 8. – С. 1367–1374.
10. Сорокина Д.А., Залевская И.И. Структурно-функциональные свойства белков. – Киев: Вища школа, 1990. – 216 с.
11. Троицкий Г.В., Матвеева М.Г., Татин С.Ю. Эффект, оказываемый пертурбантами (этиленгликолем, глицерином, сахарозой) на конформацию иммуноглобулинов // Материалы IV Всесоюзной конф. по спектроскопии биополимеров. – Харьков. – 1981. – С. 176–178.

12. Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А. Влияние криопротекторов на биологические системы. – Киев: Наук. думка, 1989. – 238 с.
13. Goldsten I.M., Kaplan H.B., Edelson H.S., Weissmann H.B. Ceruloplasmin: a scavenger of superoxide anion radicals // J. Biol. Chem. – 1979. – 254, № 10. – P. 4040–4045.
14. Fink A.L. Enzyme-catalysed reactions in unfrozen, noncellular systems at subzero temperatures // Proteins at Low Temperatures. – American Chemical Society. – Washington, D.S. – 1979. – P. 55–82.
15. Kono Y., Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase // J. Biol. Chem. – 1982. – 257, № 10. – P. 5751–5754.
16. Lee J.C., Lee G.G.J. Preferential solvent interaction between proteins and polyethylene glycols // J. Biol. Chem. – 1981. – 256, № 2. – P. 625–631.
17. Wilson S., Guillan R.A., Hocker E.V. Studies of the stability of 18 chemical constituents of human serum // J. Clin. Chem. – 1972. – 18. – № 12. – P. 1498–1503.

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

Поступила 20.02.97

А.Ю.НИКОЛЬЧЕНКО

ВПЛИВ ЗАМОРОЖУВАННЯ-РОЗМОРОЖУВАННЯ ТА ТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ ПРИ -196°C У ПРИСУТНОСТІ ДЕЯКИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Наведені результати впливу заморожування та тривалого зберігання при температурі -196°C на функціональну активність церулоплазміну (ЦП) у сироватці крові. Активність ЦП значно знижується при заморожуванні-розморожуванні та в умовах низькотемпературного зберігання цього білка без криопротекторів. Присутність криопротекторів, особливо ПЕГ-400, охороняє ЦП від втрати функціональної активності.

A.Yu.NIKOLCHENKO

EFFECT OF FREEZE-THAWING AND LONG-TERM STORAGE AT -196°C IN THE PRESENCE OF SOME CRYOPROTECTANTS ON THE STRUCTURAL-FUNCTIONAL PECULIARITIES OF CERULOPLASMIN

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

The report presents the data on the effect of freezing and long-term storage at -196°C on the functional activity of ceruloplasmin (CP) in the blood serum. The CP activity is significantly reduced during freeze-thawing and low-temperature storage of this protein without cryoprotectants. The availability of cryoprotectants, PEG-400, in particular, prevents the loss of the CP functional activity.

УДК. 547.295.96:616.45-001./3:599.323.4

Т.А.Ченчик, С.В.Луговой, В.И.Волков

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА СИСТЕМУ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И ПРОСТАГЛАНДИНОВ В СЕРДЦЕ КРЫС РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ

Изучено влияние экстремальных факторов (эмоциональный стресс) на систему циклических нуклеотидов (ЦН) — цАМФ и цГМФ — и простагландинов (ПГ) — ПГЕ и ПГФ $_{2\alpha}$ — в сердце крыс линии Вистар (низковозбудимых (Н) и высоковозбудимых (В)) и линии Август. Установлены различия как в содержании ЦН и ПГ, так и в их соотношениях цАМФ/цГМФ и ПГЕ/ПГФ $_2$. Выявлено, что действие стресса вызывает значительные изменения в системе вторичных посредников, которые больше выражены у крыс линии Август (А).

Установлено, что универсальный для всех клеток молекулярный механизм передачи внеклеточного сигнала в клетку и его реализация в виде специфического функционального ответа опосредуется действием вторичных посредников, к которым прежде всего относятся ЦН, взаимодействующие с другими “вторичными посредниками”: кальцием, диацилглицеридом и инозитолтрифосфатом, продуктами превращения арахидоновой кислоты (проста-

гlandинами, лейкотриенами и др.) [2]. Внеклеточные циклические нуклеотиды выполняют роль гормонов системного действия, мобилизующих энергетические и функциональные возможности организма, а внутриклеточные циклические нуклеотиды являются универсальными посредниками регуляции биохимических процессов и функций клеток [5, 6]. Активация синтеза ПГ приводит к изменению активности фосфодиэстеразы и аденилатциклазы, вызывая изменения в содержании циклических нуклеотидов. В свою очередь, циклические нуклеотиды влияют как на синтез ПГ, так и на гидролиз фосфоинозитидов [3].

При изучении роли простагландинов в жизнедеятельности организма особого внимания заслуживает их выраженное влияние на сердце и сосуды, системную гемодинамику, реологию крови и микроциркуляцию. В настоящее время имеется значительное количество данных о регуляции ПГ различных функций сердечно-сосудистой системы в норме и при патологии [11]. Влияние стресса на сердечно-сосудистую систему у животных с различной возбудимостью нервной системы неодинаково и определяется генетическими особенностями нейроэндокринной системы. Известно, что процесс становления механизмов стрессорной реакции в онтогенезе крыс линий Вистар и Август характеризуется генетически детерминированными различиями чувствительности к пренатальному нарушению баланса гормонов коры надпочечников [1, 4].

Целью работы явилось изучение влияния экстремальных факторов на систему вторичных посредников ЦН и ПГ в сердце крыс с различной генетически детерминированной устойчивостью к действию эмоционального стресса. Тестирование и разделение крыс на группы проводили как описано ранее [8]. Для определения ПГ и ЦН применяли радиоиммунологический метод с использованием стандартных наборов реактивов (^3H) фирмы "Institute of isotopes" (Венгрия) и фирмы "Amersham" (Англия). Измерение радиоактивности проб проводили на жидкостно-сцинтилляционном счетчике СБС-2. Полученные данные в дальнейшем обрабатывались статистически, достоверность различий средних значений определяли по критерию Стьюдента.

Содержание изученных показателей в сердце крыс различных линий при действии экстремальных факторов ($M \pm m$; $n=6-10$)

Показатель	Н		В		А	
	Интактные	стресс	Интактные	стресс	Интактные	стресс
цАМФ, пмоль/мг	$0,725 \pm 0,034$	$0,857 \pm 0,047$	$0,849 \pm 0,036$	$1,4 \pm 0,095^*$	$0,815 \pm 0,051$	$1,21^* \pm 0,08$
цГМФ, пмоль/мг	$0,095 \pm 0,003$	$0,110 \pm 0,005$	$0,123 \pm 0,010$	$0,154 \pm 0,013$	$0,140 \pm 0,011$	$0,282 \pm 0,025^{**}$
К — цАМФ/цГМФ	7,6	7,8	7,1	9,3	5,8	4,3
ПГЕ, нмоль/мг	$4,35 \pm 0,44$	$10,06 \pm 0,57^{**}$	$5,64 \pm 0,09$	$7,61 \pm 0,33^*$	$3,95 \pm 0,19$	$6,26 \pm 0,52^{**}$
ПГФ $_{2\alpha}$, нмоль/мг	$6,81 \pm 0,33$	$8,16 \pm 0,46^*$	$7,61 \pm 0,31$	$13,81 \pm 0,78^*$	$10,61 \pm 0,57$	$21,76 \pm 1,06^{**}$
К — ПГЕ/ПГФ $_{2\alpha}$	0,64	1,2	0,74	0,55	0,37	0,28

Примечание. Разница достоверна относительно интактных животных; * — $P < 0,05-0,02$;

** — $P < 0,01-0,001$.

Исследования содержания ПГЕ и ПГФ $_{2\alpha}$ в сердце крыс с различной предрасположенностью к воздействию стресса показали различия в их содержании, характерные для каждой группы животных. Учитывая, что влияние ПГЕ и ПГФ $_{2\alpha}$ на медиаторные системы может определяться не только изменением их абсолютного содержания, но и соотношением между ними, рассчитывали коэффициент соотношения между ПГЕ и ПГФ $_{2\alpha}$ в изучаемых структурах мозга у исследованных групп животных (Н, В, А, таблица). Более высокий уровень ПГЕ в сердце отмечался у высоковозбудимых животных, а самый низкий — у животных группы А. Для содержания ПГФ $_{2\alpha}$ в сердце изучаемых групп животных характерна обратная зависимость, т. е. более высокий уровень ПГФ $_{2\alpha}$ был у животных группы А, низкие и почти равные количества ПГФ $_{2\alpha}$ выявлены у животных линии Вистар (как у низковолюбимых, так и у высоколюбимых крыс). После стресса содержание ПГЕ и ПГФ $_{2\alpha}$ в сердце у всех

групп животных повышалось, но эти изменения были различны. Более чем в 2 раза увеличивался уровень ПГЕ у группы Н, а в группах В и А повышение содержания ПГЕ в сердце после стресса было менее значительным. В группах В и А уровень ПГФ_{2α} в сердце в условиях стресса возрастал почти в 2 раза, а у низковоzbудимых животных это увеличение составило 16%. Соотношение между ПГЕ/ПГФ_{2α} в сердце было высоким у высоковозбудимых животных, а более низкое значение этого показателя было у группы А. После стресса самое высокое соотношение ПГЕ/ПГФ_{2α} в сердце было характерно для низковоzbудимых животных группы Н, а низкое — для группы А.

Можно предположить, что влияние стресса менее всего сказывается на состоянии системы простагландинов у животных группы Н, более всего — у животных группы А.

Анализ данных литературы показывает, что многие биологические эффекты простагландинов связаны с изменением уровня циклических нуклеотидов, причем направленность этих изменений в различных тканях неодинакова. В зависимости от вида ткани они могут либо стимулировать, что отмечается чаще всего, либо ингибировать синтез цАМФ. На тесную взаимосвязь простагландинов и циклических нуклеотидов указывают большинство исследователей, считая, что цАМФ опосредует действие простагландинов типа Е, а цГМФ — простагландинов типа F [10, 11].

Стресс заметно изменяет концентрацию циклических нуклеотидов и изменяет соотношение цАМФ/цГМФ. В настоящее время хорошо известно, что регулирующие эффекты циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) как вторичных посредников опосредованы действием различных медиаторов и биологически активных веществ. Внутриклеточное содержание циклических нуклеотидов и их соотношение косвенно отражают взаимодействие различных медиаторных систем. Увеличение или уменьшение концентрации цАМФ и цГМФ в клетке приводит к различным изменениям в метаболизме в зависимости от типа клетки и ее состояния в данный момент [6, 9]. Соотношение концентраций цАМФ и цГМФ в значительной степени опосредует функциональное состояние систем регуляции.

Анализ содержания циклических нуклеотидов у изученных групп животных в сердце в условиях стресса показал, что наиболее высоким уровнем как цАМФ, так и цГМФ характеризуются группы А и В. Под воздействием стресса изменение содержания циклических нуклеотидов у всех групп животных носило однонаправленный характер, однако степень выраженности этих изменений была различной. У низковоzbудимых животных увеличение содержания как цАМФ, так и цГМФ в условиях стресса было одинаковым (соответственно 15–14%). Для высоковозбудимых животных характерно большее увеличение уровня цАМФ в условиях стресса, чем цГМФ (40–20%). Другая зависимость изменения содержания циклических нуклеотидов под воздействием стресса в сердце отмечается у крыс линии Август. У них в большей степени увеличивался уровень цГМФ (на 50%) и немного меньше — цАМФ (на 32%). Результаты исследований показали, что более значительные изменения в содержании циклических нуклеотидов характерны для высоковозбудимых животных и животных линии Август.

Значительное увеличение уровня ЦН у животных с относительно более высокой предрасположенностью к развитию выраженных реакций со стороны сердечно-сосудистой системы (группы В и А), по-видимому, может быть связано с более интенсивным воздействием (повышением концентрации) гуморальных факторов, реализующих свои эффекты через систему цАМФ и цГМФ, изменением конформации или повышением сродства рецепторов, взаимодействующих с этими гуморальными факторами.

Полученные нами данные об изменении содержания ЦН, ПГ и в процессе развития стресс-реакции могут указывать на то, что у крыс линии Август сформирован и генетически детерминирован несколько иной тип реакции на

стресс, более быстро запускающий компенсаторные механизмы адаптации. Однако, по-видимому, это приводит к быстрому истощению резервных субстратов ферментативных реакций, и в результате крысы линии Август оказываются менее устойчивыми к воздействию экстремальных факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Костюк П.Г., Чазов Е.И. Внутриклеточная сигнализация: биологические и медицинские аспекты // Усп. физиол. наук. – 1988. – 19, № 4. – С. 3–11.
2. Маркель А.Л., Бородин П.М. Стресс как фактор регуляции генетической изменчивости // Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса. – Новосибирск: Наука, 1990. – С. 148–160.
3. Марков Х.М. Простагландины и сердце // Журн. патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1987. – № 6. – С. 6–13.
4. Меерсон Ф.З., Малышев И.Ю., Замоторинский А.В., Шнейдер А.Б. Феномен адаптационной стабилизации структур и роль белков теплового шока в его механизме // Вопр. мед. химии. – 1992. – 38, № 1. – С. 5–9.
5. Талако С.А. Циклические нуклеотиды и инозиттрифосфат как биохимические модуляторы проницаемости ионных каналов рецепторных доменов // Биохимия. – 1993. – 58, № 1. – С. 81–98.
6. Федоров Н.А., Радуловацкий М.Г., Чехович Г.Е. Циклические нуклеотиды и их аналоги в медицине. – М.: Медицина, 1990. – 176 с.
7. Хюльзер Д., Цемпель А. и др. Арахидоновая кислота обратимо блокирует высокопроницаемые межклеточные контакты // Биологические мембраны. – 1994. – 11, № 1. – С. 50–59.
8. Ченчик Т.А. Состояние системы инозитолфосфатов в условиях стресса в структурах головного мозга крыс различных линий // Пробл. криобиол. – 1997. – № 1-2. – С. 91–95.
9. Knardahl S., Hendley E.D. Cardiovascular responsiveness to stress in relation to behavior and hypertension // Clin. and Exp. Hypertens. A. – 1991. – 13, № 5. – P. 873–874.
10. Schror K., Thiemermann C. Eicosanoids in myocardial ischemia // Biomed. Biochim. Acta. – 1989. – 48, № 10. – P. 729–734.
11. Takewawa T., Ishitoya J., Nacai Y. Inhibitory effect of prostaglandin E, forskolin, and dibutyryl cAMP on arachidonic acid release and inositol phospholipid metabolism in quinea pig neutrophils // J. Biol. Chem. – 1986. – 261. – P. 1092–1098.

Ин-т терапии АМН Украины г. Харьков,
Харьковский гос. мед. ун-т

Поступила 26.06.97

Т.О.ЧЕНЧИК, С.В.ЛУГОВИЙ, В.І.ВОЛКОВ

ВПЛИВ ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ЧИННИКІВ НА СИСТЕМУ ЦИКЛІЧНИХ НУКЛЕОТИДІВ І ПРОСТАГЛАНДИНІВ У СЕРЦІ ЩУРІВ РІЗНОМАНІТНИХ ЛІНІЙ

Інститут терапії АМН України, м. Харків
Харківський державний медичний університет

Вивчено вплив екстремальних чинників (емоціональний стрес) систему циклічних нуклеотидів (ЦН) — цАМФ і цГМФ — і простагландинів (ПГ) — ПГЕ і ПГФ_{2α} — у серці щурів лінії Вістар низькозбудливих (Н) та високозбудливих (В) і лінії Август. Установлені відміни як у вмісті ЦН і ПГ, так і в їх співвідношенні цАМФ/цГМФ і ПГЕ /ПГФ₂. Виявлено, що дія стресу викликає чималі зміни в системі вторинних посередників, які були більш значимими у щурів лінії Август (А).

T.A.CHENCHIK, S.V.LUGOVOY, V.I.VOLKOV

THE EFFECT OF EXTREME INFLUENCES ON SYSTEM CYCLIC NUCLEOTIDES AND PROSTAGLANDINES IN HEART OF RAT DIFFERENT LINES

Institute of Therapy AMS of Ukraine, Kharkov
Kharkov Stat Medical University

The influence of extremal-factors on the system: cyclic nucleotides (CN) — cAMP, cGMP — and prostaglandines (PG) — PGE, PGF_{2α} — in the heart in the rats Vistar-line (with low and high excitability) and August-line rats has been studied. The differences of CN and PG between the animals groups in the heart has been obtained. The stress factors found to be a cause of considerable changes in the second messengers system, which more are expressed of rat line August.

Н.Г.Сергиенко, Р.И.Кратенко**ОСОБЕННОСТИ ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ
³Н-СЕРОТОНИНА С СЕРОТОНИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ
ПЕРВОГО ТИПА В ЭПИЛЕПТОГЕННЫХ СТРУКТУРАХ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**

На крысах линии Вистар с высокой и низкой возбудимостью головного мозга проведено исследование параметров связи серотониновых рецепторов первого и второго типов эпилептогенных структур относительно мозжечка как антиэпилептической структуры

В последнее время в ряде работ показано [1, 6], что повышенная возбудимость головного мозга является следствием изменения соотношений в уровнях активности различных нейромедиаторных систем головного мозга. Эффект нейромедиатора, как известно, достигается путем взаимодействия его с мембранными рецепторами. Этот процесс обеспечивает изменение функций эффекторной клетки. Серотонинергическая система мозга занимает важное место среди нейромедиаторных систем. Серотонин в организме выполняет не только функцию синаптического медиатора, но и является одним из регуляторов кровяного давления, фактором роста и гомеостаза и др. [3]. Установлено его антидиуретическое действие и влияние на проницаемость гематоэнцефалического барьера [3, 4]. Достоверно известно, что возрастание судорожной предрасположенности связано с угнетением серотонинергических механизмов в различных структурах головного мозга, а прямое введение серотонина в лимбическую систему приводит к повышению порога возникновения судорожных реакций [2, 6].

Доказано также, что на уровне центральной нервной системы в генезе судорожных состояний важную роль играют структуры лимбической системы мозга, обладающие минимальным, в сравнении с другими отделами судорожным порогом [6]. Возможно, что в перечисленных структурах имеет место меньшая выраженность эффектов нейромедиаторных систем, в том числе и серотонинергической, в сравнении со структурами, принимающими или опосредованно принимающими участие в формировании судорожной готовности. Мозжечок, который многие авторы относят к тормозным отделам мозга, имеет высокое содержание тормозных медиаторов — серотонина и глицина [2, 6].

Очевидно, что сила действия любого нейромедиатора зависит как от его концентрации в различных отделах головного мозга, так и от количества и состояния рецепторов, связывающих этот медиатор. В литературе имеется достаточное количество данных о содержании серотонина в структурах головного мозга, однако, о связывающей способности и количестве рецепторов серотонина данные противоречивы [1, 6]. В связи с этим целью данной работы явилось исследование параметров связывания ³Н-серотонина (³Н-5-НТ) с серотониновыми рецепторами в областях вентрального и дорсального гиппокампа, миндалевидного комплекса и в мозжечке у животных с высокой (В) и низкой (Н) судорожной готовностью головного мозга.

Эксперименты проводились на крысах линии Вистар, разделенных на две группы: с высокой (В) и низкой (Н) возбудимостью головного мозга по признаку наличия аудиогенных судорог при действии в течение 120 с электрического звонка с силой звука в 96 дБ. Исследование параметров связывания проводили с использованием радиолигандного метода — исследовали связывание меченого по водороду ³Н-5-НТ с грубой синаптосомальной фракцией нейронов головного мозга [1]. Свежую ткань мозга гомогенизировали в 50 объемах холодного буфера (50 нМ *трис*-HCl, рН 7,4). Образцы инкубировали при 37 °С в течение 10 мин для удаления эндогенного лиганда — серотонина и центрифугировали при 20000 g в течение 30 мин с последующей промывкой тем же буфером.

Эксперимент проводился в дубликатах. Для отделения комплекса “лиганд-рецептор” использовалось центрифугирование в пробирках Эппендорфа со средой разделения, в качестве которой выступала смесь сложных эфиров ортофталевой кислоты (дибутилфталата и динонилфталата в соотношении 1:55 с плотностью равной 1,013 г/см³ при 20 °С). В пробирки Эппендорфа вносили смесь эфира в количестве 100 мкл и инкубационную среду, содержащую ³H-5-НТ (удельная активность 20 Сi/мМоль, производство “AMERSHAM”, Англия) с диапазоном концентраций 2–40 нМоль, и аликвоты грубых синаптосомальных фракций, гомогенизированных в инкубационной среде. Последняя изготовлялась на буфере (50 мМоль *трис*-HCl, pH 7,5) с добавлением аскорбиновой кислоты (0,1 %), 4 мМоль CaCl₂, 10 мкМоль паргилина (ингибитора MAO) и 10 мкМоль амитриптилина (ингибитора обратного захвата медиатора).

Для определения неспецифического связывания реакцию проводили в присутствии немеченного серотонина, конечная концентрация которого составляла 100 мкМоль. После инкубации образцы помещали на 15 мин на лед для остановки реакции, а затем центрифугировали при 12 000 g в течение 15 мин. Осадок растворяли в 0,2 мл 0,1 н HCOOH. Затем раствор вносили в вials, наполненные сцинтиляционной жидкостью ЖС-8 (по 7 мл). Радиоактивность проб измеряли на счетчике СБС-2. Уровень специфического связывания составлял около 45% от общего. Параметры рецепторного связывания — константу диссоциации (K_d) и максимальное число связывающих мест (V_{max}), определяли согласно описанию Скэтчарда с применением машинной обработки результатов [5].

Установлено, что меченый серотонин связывается по двухцентровой модели с различными константами и числом мест связывания для обоих пулов рецепторов первого типа. При исследовании грубых синаптосомальных фракций мозжечка, областей миндалины, дорсального и вентрального гиппокампа головного мозга крыс были получены следующие результаты (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Параметры связывания ³H-серотонина (³H-5-НТ) с серотониновыми рецепторами первого типа головного мозга крыс с высокой (В) и низкой (Н) аудиогенной возбудимостью

Структура	K _{св} , нМ		V _{max} , фМ/мг	
	высокоаффинный пул	низкоаффинный пул	высокоаффинный пул	низкоаффинный пул
Мозжечок (Н)	0,664±0,0177	0,318±0,00793	162±7,44	151±7,33
Гиппокамп вентральный (Н)	0,218±0,0109	0,107±0,0052	154±9,52	151±9,44
Гиппокамп дорсальный (Н)	0,272±0,00535	0,135±0,00273	263±9,08	261±8,92
Миндалина (Н)	0,243±0,00466	0,12±0,0024	225±18,8	223±18,5
Мозжечок (В)	1,6±0,158	0,663±0,0503	123±6,29	93,2±6,2
Гиппокамп вентральный (В)	0,57±0,0288	0,272±0,0119	105±5,99	98,8±6,59
Гиппокамп дорсальный (В)	0,468±0,0195	0,229±0,00909	152±6,92	147±6,74
Миндалина (В)	0,181±0,00764	0,0896±0,00368	212±13,7	210±13,9

У крыс с низким уровнем аудиогенной судорожной готовности сродство первой системы рецепторов к меченому лиганду в гиппокампе вентральном, дорсальном и миндалине ниже на 68%, 58,8% и 63,1%, а сродство второй — ниже на 67,3%, 57,4% и 61,9% соответственно, чем в мозжечке. У животных с высоким уровнем возбудимости головного мозга сродство первой и второй системы рецепторов ниже на 61,4% и 57,2% в гиппокампе вентральном и на 67% и 62,7% в гиппокампе дорсальном, чем в мозжечке. В миндалине животных группы В сродство рецепторов к лиганду самое низкое — ниже на 87,6% и 85,8% относительно сродства 5-НТ рецепторов мозжечка. Из достоверных результатов отметим у низковозбудимых животных повышение количества мест связывания первой и второй системы рецепторов в дорсальном гиппокампе на 62,3%, 72,8% и в миндалине на 38,9% и 51,7% относительно таковых в мозжечке. У высоковозбудимых животных число мест связывания лиганда в

этих структурах больше на 23,6%, 57,7% и на 72,4%, 125,3% соответственно, чем число мест связывания ^3H -5-HT в мозжечке.

Очевидно, что возбудимость нейронов какой-либо структуры мозга будет зависеть от суммы силы действия различных нейромедиаторов на мембраны нейронов. В свою очередь, силу действия нейромедиатора (F) можно выразить как функцию его концентрации, числа мембранных рецепторов и их аффинности, т.е.

$$F = f(C, V_{\max}, K_{\text{св}}).$$

Если учесть, что концентрация медиатора в наших экспериментах была постоянной, а $K_{\text{св}} = 1/K_d$, то

$$F = f(V_{\max}, 1/K_d).$$

Поскольку форма взаимосвязи между F и данными показателями точно не установлена, можно предположить наличие здесь прямой линейной зависимости. Тогда,

$$F = V_{\max}/K_d.$$

Таким образом, была вычислена сила действия ^3H -серотонина на мембраны структур мозга крыс с различным уровнем аудиогенной судорожной готовности (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Сила действия экзогенного серотонина на структуры мозга крыс с высокой (В) и низкой (Н) аудиогенной возбудимостью

Структура	1-й пул	2-й пул
Мозжечок (Н)	106±3,18	48,02±2,96
Мозжечок (В)	178±24,4	61,79±6,43
Гиппокамп вентральный (Н)	32,4±1,27	16,16±0,984
Гиппокамп вентральный (В)	58,3±2,51	26,87±1,12
Гиппокамп дорсальный (Н)	71,3±3,19	35,24±1,83
Гиппокамп дорсальный (В)	72,3±2,47	33,66±1,07
Миндалина (Н)	54,7±3,15	26,76±2,23
Миндалина (В)	30,1±1,36	18,81±1,24

(мозжечок—100%) показало более низкие значения этих величин у животных группы В в областях дорсального гиппокампа и миндалевидного комплекса (рис. 1, 2).

Таким образом, низкое представительство серотонинцептивных систем в областях дорсального гиппокампа и миндалевидного комплекса у крыс с вы-

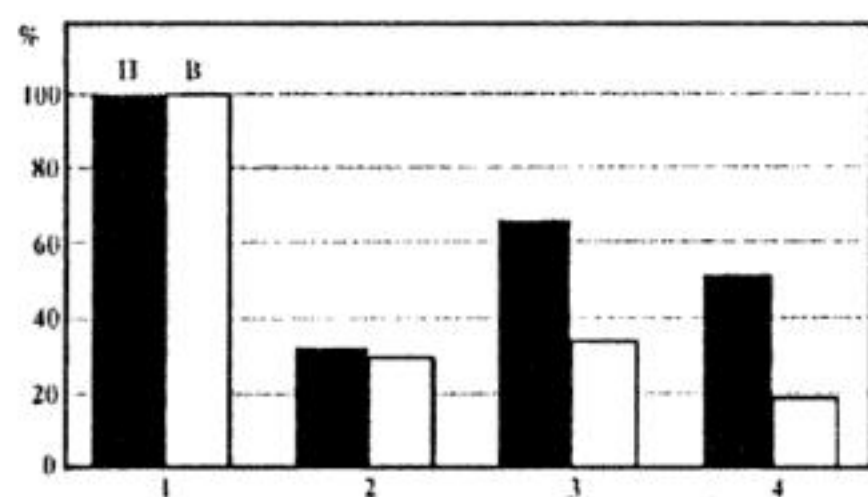


Рис. 1. Выраженность силы действия ^3H -серотонина на серотониновые рецепторы первого типа (высокоаффинный пул) эпилептогенных структур головного мозга крыс с высокой (В) и низкой (Н) аудиогенной возбудимостью относительно мозжечка: 1 — мозжечок, 2 — гиппокамп вентральный, 3 — гиппокамп дорсальный, 4 — миндалина

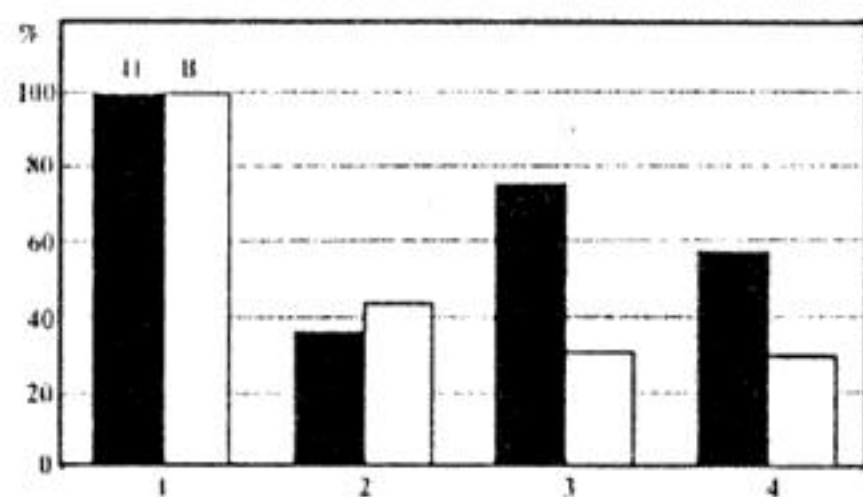


Рис. 2. Выраженность силы действия ^3H -серотонина на серотониновые рецепторы первого типа (низкоаффинный пул) эпилептогенных структур головного мозга крыс с высокой (В) и низкой (Н) аудиогенной возбудимостью относительно мозжечка: 1 — мозжечок, 2 — гиппокамп вентральный, 3 — гиппокамп дорсальный, 4 — миндалина

соким уровнем возбудимости является одним из важных моментов в формировании повышенной судорожной готовности головного мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гонкалов В.Г. Метаболизм та рецепция серотонину у щурів з різним рівнем аудіогеної судомої готовності головного мозку: Автореф. дис.... канд. біол. наук. – Харків. – 1993. – 24 с.
2. Захария Е.А. Предрасположенность организма к эпилептическим припадкам. – Киев: Здоров'я. – 1974. – 200 с.
3. Курский М.Ф., Балашеев Н.С. Биохимические основы механизмов действия серотонина. – Киев: Наук. думка. – 1974. – 294 с.
4. Попова Н.К., Науменко Е.В., Колпаков В.Г. Серотонин и поведение. – Новосибирск. – 1978. – 114 с.
5. Сергеев Н.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы физиологически активных веществ. – М.: Медицина. – 1987. – 400 с.
6. Сергиенко Н.Г., Грищенко В.И., Логинова Г.А. Биогенные моноамины и возбудимость головного мозга. – Киев: Наук. думка. – 1992. – 148 с.

Харьковский гос. мед. ун-т

Поступила 25.06.97

Н.Г.СЕРГІНКО, Р.І.КРАТЕНКО

ОСОБЛИВОСТІ ПАРАМЕТРІВ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ³H-СЕРОТОНІНА З СЕРОТОНІНОВИМИ РЕЦЕПТОРАМИ ПЕРШОГО ТИПУ В ЕПІЛЕПТОГЕННИХ СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРВ

Харьковский державний медичний університет

Проведено дослідження параметрів зв'язку серотонінових рецепторів першого та другого типу епілептогенних структур відносно мозочка як антиепілептичної структури. Зрівнювали щурів лінії Вістар з високою та низькою збудливістю головного мозку.

N.G. SERGIYENKO, R.I. KRATENKO

PECULIARITIES OF BINDING PARAMETERS ³H-SEROTONIN WITH SEROTONIN RECEPTORS OF THE FIRST TYPE IN EPILEPTOGENIC STRUCTURES

Kharkov State Medical University

A study of the parameters of binding by type 1 and type 2 serotonin receptors in epileptogenic structures in comparison to the cerebellum as a antiepileptic structure. Wistar rats with high and low brain excitability were compared.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 57.043:612.35.014.41

Л.П.Кравченко, И.В.Шанина, А.М.Белоус, В.Сампсон

ЭФФЕКТИВНОСТЬ САХАРОЗОСОДЕРЖАЩЕГО РАСТВОРА ПРИ ХОЛОДОВОМ ХРАНЕНИИ ЦЕЛОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Проведены исследования по изучению эффективности сахарозо-солевой среды при холодовом (0 °С) хранении печени крыс. Изучали следующие параметры: уровень МДА, активность GSH-редуктазы, перераспределение АЛАТ и содержание АТФ на этапах 30 мин, 3, 6 и 24 ч холодового хранения печени крыс. Показано, что при хранении печени крысы (0 °С) в сахарозо-солевой среде с силибором (мг/мл) в течение суток все изучаемые параметры сохраняются практически на уровне контроля при неизменном уровне АТФ. При этом применение антиоксиданта при холодовом хранении печени в данном растворе способствует подавлению процессов ПОЛ.

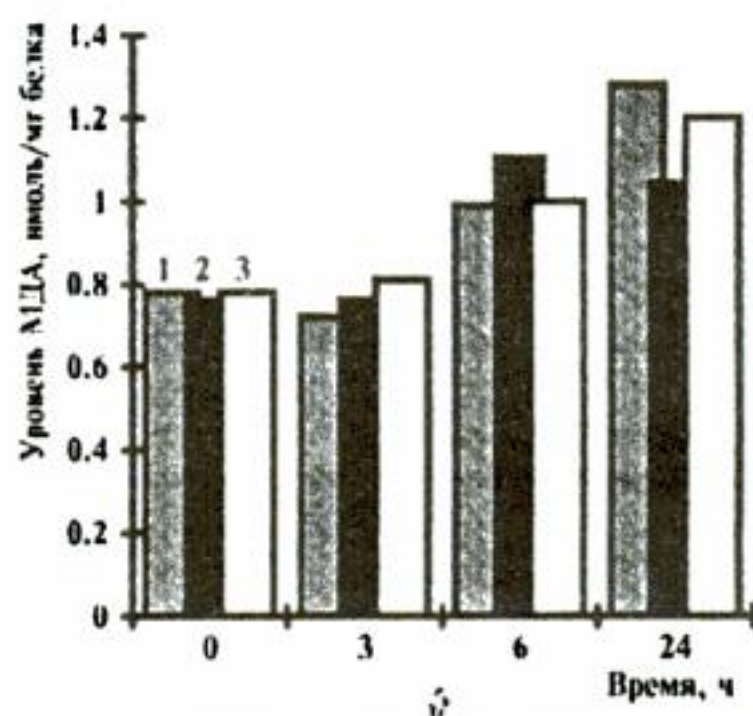
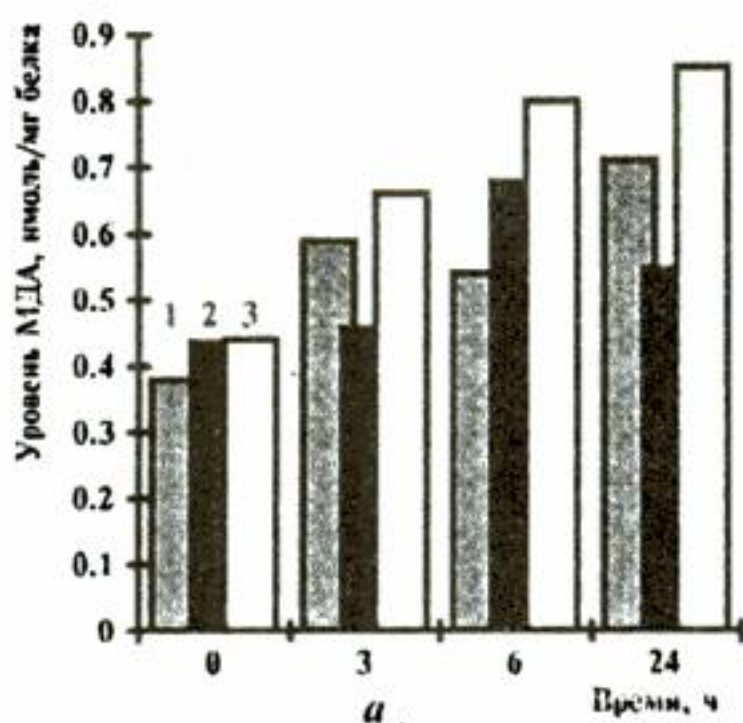
Несмотря на то, что использование консервированных при 0 °С органов в клинике получило успешное развитие, совершенствование гипотермических методов хранения целой печени продолжается. Первые пересадки донорской печени человеку были осуществлены в 60-х годах. Развитие безперфузионного метода холодового хранения печени началось с применения консервирующих растворов внеклеточного типа [6]. Позднее их заменили консервирующими растворами внутриклеточного типа [1], однако они также не обеспечивали длительного хранения печени донора при 0–4 °С. Было выяснено, что при использовании этих растворов происходит повреждение ткани печени за счет

резкого набухания клеток. Поэтому начался поиск и испытание различных компонентов, которые бы уменьшали диффузию ионов и воды в клетку при 0 °С. Успех был достигнут американскими исследователями, когда в состав консервирующего раствора для замены ионов хлора были введены глюконат и лактобионат (так называемый раствор UW) [4]. В дальнейшем UW нашел широкое применение в клинической практике при консервации печени, а также других органов [5]. Исследования показали, что более упрощенные модификации раствора UW и другие растворы могут быть также использованы при холодовом хранении целой печени [7].

В связи с этой задачей данной работы явилось изучение эффективности сахарозосодержащих растворов (ССР) при холодовом (0 °С) хранении печени крыс, так как ранее нами было показано, что ССР является наиболее эффективным при длительном (до 4 сут) холодовом хранении изолированных гепатоцитов крыс при 4 °С [2].

Печень анестезированных животных перфузировали *in vivo* охлажденным раствором соответствующего состава, затем переносили в бюксы и хранили на льду под слоем жидкости. Тестирование образцов проводили после 30 мин, 3, 6 и 24 ч хранения образцов при 0 °С. В гомогенате печени изучали следующие параметры: уровень малонового диальдегида (МДА) [8], активность GSH-редуктазы, перераспределение АЛАТ и содержание АТФ [3]. Стандартным раствором сравнения был раствор гипертонического цитрата.

Было установлено, что при холодовом хранении целой печени крыс в саха-



Продукция МДА в целой печени крыс после ее хранения при 0 °С: 1 – сахарозо-солевой раствор; 2 – сахарозо-солевой раствор+силибор; 3 – гипертонический цитрат; а – начальный уровень; б – спонтанный уровень

розосодержащем растворе с добавлением 1 % БСА и силибора (мг/мл) на уровне контроля сохраняются практически все изученные параметры на протяжении всего периода. При хранении печени в сахарозосодержащем растворе без добавления силибора в гепатоцитах повышается уровень процессов ПОЛ уже после 3 ч холодового хранения (рис.). Причем это наблюдается на фоне сохранения уровня АТФ (табл. 1). При хранении целой печени в растворе гипертонического цитрата наряду с активацией процессов ПОЛ отмечается уменьшение активности GSH-редуктазы (табл. 2) и АЛАТ (табл. 3) в ткани. В этом случае содержание АТФ также резко снижается к исходу 24 ч холодового хранения печени при 0 °С.

Т а б л и ц а 1

Уровень АТФ (нмоль/мг белка) в печени крыс после ее хранения при 0 °С

Среда хранения	Время хранения			
	30 мин	3 ч	6 ч	24 ч
ССР	2,01±0,40	2,12±0,42	2,09±0,43	1,87±0,43 <i>p</i> >0,05
ССР+силибор	2,23±0,27	2,07±0,49	2,23±0,27	2,28±0,58 <i>p</i> >0,05
Гипертонический цитрат	1,95±0,28	1,67±0,46	1,03±0,23	1,12±0,38 <i>p</i> <0,01

Применение сахарозосодержащего раствора при

холодовом хранении целой печени способствует прекращению активного перераспределения K^+ , Na^+ и воды через плазматическую мембрану клеток, что сохраняет пул энергетических субстратов. Введение антиоксиданта силибора в состав са-

харозосодержащего раствора в значительной степени подавляет процесс образования продуктов ПОЛ в ткани печени при холодовом хранении в течение суток.

На основании этого можно заключить, что вторичным фактором повреждения клеток на ранних этапах гипотермического хранения ткани печени при $0^\circ C$ при условии подавления осмотического нарушения, является снижение природного пула клеточных антиоксидантов.

Таким образом, применение сахарозосодержащих растворов при суточном хранении целой печени при $0^\circ C$ способствует сохранению энергетического статуса ткани. Применение антиоксиданта силибора при холодовом хранении печени в сахарозосодержащем растворе способствует подавлению ПОЛ.

Т а б л и ц а 2

Среда хранения	Время хранения			
	30 мин	3 ч	6 ч	24 ч
ССР	$1,12 \pm 0,25$	$0,83 \pm 0,26$	$1,28 \pm 0,27$	$1,43 \pm 0,17$ $p > 0,05$
ССР+силибор	$1,15 \pm 0,18$	$0,99 \pm 0,09$	$1,08 \pm 0,24$	$1,12 \pm 0,20$ $p > 0,05$
Гипертонический цитрат	$1,48 \pm 0,02$	$1,24 \pm 0,17$	$1,60 \pm 0,23$	$0,92 \pm 0,21$ $p < 0,05$

Т а б л и ц а 3

Активность АЛАТ в целой печени после холодового хранения при $0^\circ C$ (г/мг белка/мин)

Среда хранения	Время хранения			
	30 мин	3 ч	6 ч	24 ч
ССР	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$ $p > 0,05$
ССР+силибор	$0,8 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$ $p > 0,05$
Гипертонический цитрат	$0,8 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$ $p = 0,05$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collins G., Bravo-Shugartman M., Teasaki P. Kidney preservation for transplantation // Lancet. – 1969. – № 2. – P. 1219–1221.
2. Kravchenko L., Andrienko A., Belous A., Shanina I. Long-term storage of isolated liver cells at hypothermia // Cryolett. – 1994. – № 3. – P. 135–144.
3. De Luca M., McElroy W. Methods Enzymol. – 1978. – 57, № 3.
4. Southard J., Belzer F. Control of canine kidney cortex slice volume and ion distribution at hypothermia by impermeable anions // Cryobiology. – 1980. – № 17. – P. 540–580.
5. Southard J., Gulic T., Ametani M. et al. Important components of the UW-solution // Transplantation. – 1990. – 49, – № 2. – P. 251–257.
6. Starzl F. Experience in hepatic transplantation. – Philadelphia. W.B. Saunders. – 1969. – 167 p.
7. Tokunado J., Wicomb W., Concepcion W. et al. Successful 20-hr rat liver preservation with chlorpromazine in sodium lactobionate sucrose solution // Surgery. – 1991. – 110. – № 1. – P. 80–86.
8. Yagi K. Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. In: Yagi K., ed. Lipid peroxides in biology and medicine. – New York: Acad. Press. – 1982. – P. 223–242.

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

Поступила 18.11.96

Л.П.КРАВЧЕНКО, І.В.ШАНІНА, А.М.БІЛОУС, В.САМПСОН

ЕФЕКТИВНІСТЬ СЕРЕДОВИЩА, ЯКЕ ВМІЩУЄ САХАРОЗУ, ПРИ ХОЛОДОВОМУ ЗБЕРІГАННІ ЦІЛОЇ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Проведено дослідження щодо вивчення ефективності сахарозо-сольового середовища при холодовому ($0^\circ C$) зберіганні печінки щурів. Вивчали такі параметри: рівень МДА, активність GSH-редуктази, перерозподіл АЛАТ та вміст АТФ на етапах 3 хв, 3, 6 та 24 г холодового зберігання печінки. Показано, що при зберіганні печінки щурів ($0^\circ C$) в сахарозо-сольовому середовищі з силибором (мг/мл) на протязі доби всі параметри, які досліджувалися, зберігаються практично на рівні контролю при незмінному рівні АТФ. Застосування антиоксиданту силибору при холодовому зберіганні печінки в сахарозо-сольовому середовищі сприяє подавленню процесів ПОЛ.

EFFICIENCY OF A SUCROSE-CONTAINING SOLUTION IN COLD STORAGE OF THE WHOLE RAT LIVER

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

The authors conducted a study of the efficiency of a sucrose-saline medium during cold (0 °C) storage of the rat liver. The following parameters were studied: the level of MDA, GSH-reductase, redistribution of ALAT, and the content of ATP at the stages of 30-min, 3-, 6- and 24-hour cold storage of the rat liver. It was found that during the storage of the rat liver (0 °C) in a sucrose-saline medium with silibor (mg/ml) for one day all the parameters are maintained at the control level, and the level of ATP remains constant. Application of a silibor antioxidant during cold storage of the liver in a sucrose-saline solution facilitates inhibition of the LPO processes.

УДК 611.013.1:612.592:537.63

М.М.Ахмад, Г.М.Ковалев, В.И.Пиняев, В.Е.Чадаев

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ И ОБРАБОТКИ СРЕДЫ ХРАНЕНИЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ ПОСТОЯННЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМИЕВ ЧЕЛОВЕКА

Для выделения и хранения суспензии подвижных спермиев из эякулята использовали среду Эрла, подвергавшуюся и не подвергавшуюся воздействию искусственного дополнительного постоянного магнитного поля (ДПМП) с величиной индукции от 0,5 до 45 мТ. Было установлено, что выделение подвижной фракции спермиев из эякулята методом "всплывания" в среде Эрла, выдержанной в ДПМП, и последующее хранение ее в условиях гипотермии в этой среде позволяет пролонгировать при нормоспермии и олигоспермии сохранность подвижной фракции гамет, что имеет существенное значение в лечении бесплодия методами вспомогательной репродуктивной технологии.

Усилия специалистов по лечению бесплодия в браке в последние годы направлены на разработку методов лечения, обеспечивающих сохранение семейного генофонда даже при тяжелых формах нарушения сперматогенеза у мужчин. К числу таких методов относятся внутриматочная инсеминация подвижной фракцией спермиев, выделенной из эякулята мужа, и экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО). Руководствуясь данными ультразвукового мониторинга динамики роста фолликулов гинекологи-репродуктологи, как правило, назначают цикл искусственных внутриматочных инсеминаций, включающий две инсеминации через день. В эякуляте, полученном через сутки после предыдущей инсеминации, особенно при олиго-астено- и олигоастеноспермии, как количественные показатели, так и показатели кинезисграммы оказываются сниженными, эякулят содержит много юных клеток. Поэтому возникает необходимость сохранения спермиев эякулята, полученного для первой инсеминации.

Как показано в исследованиях [2, 3], у спермиев, полученных из эякулята с нормоспермией и хранившихся при 8–10 °C в атмосфере 5%-го CO₂, оплодотворяющая активность не снижается в течение 24–48 ч. В работе [1] показана возможность обеспечения сохранности оплодотворяющей активности спермиев быка на протяжении 4–5 сут при 2–4 °C при условии предварительного воздействия на гаметы или питательную среду ДПМП с индукцией от 0,5 до 107 мТ. Аналогичных работ на мужских гаметах человека в доступной литературе нет.

С учетом указанного в данной работе были поставлены задачи изучения зависимости эффективности гипотермического хранения подвижной фракции спермиев эякулята человека от состояния сперматогенеза и выяснения возможности использования искусственного дополнительного магнитного поля для стимуляции и сохранения кинетической активности гамет, хранившихся в условиях гипотермии.

Материалом исследования служили эякуляты пациентов из бесплодных супружеских пар. Подвижную фракцию спермиев из них выделяли методом “всплывания”. Полученную суспензию клеток хранили при 8 °С в атмосфере 5%-го CO₂. Использовали среду Эрла. Для получения ДПМП применяли “магнитный сосуд” [1], состоящий из 12 постоянных полосовых магнитов, соединенных между собой одноименными полюсами. Магнитная индукция их составляла от центра к полюсам 0–45 мТ. В этом сосуде выдерживали среду Эрла в полиэтиленовом флаконе в течение 4–18 ч. Кинетическую активность спермиев изучали с помощью камеры “Makler” (Израиль).

В I-й серии экспериментов была сделана попытка с помощью воздействия ДПМП повысить показатели подвижности спермиев в цельных эякулятах. Исследовали 25 эякулятов с астеноспермией, содержащих в 1 мл $35,7 \pm 3,9$ млн спермиев, и 37 эякулятов с олигоастеноспермией, концентрация спермиев в которых была $14,8 \pm 1,3$ млн в 1 мл. Эякуляты разделяли на два образца в пенициллиновых флаконах, после чего помещали один образец в зону южного, другой — в зону северного полюса магнитов. Использовали экспозиции 30 и 60 мин. При этом достоверно выраженной стимуляции или ингибиции подвижности клеток не было отмечено. Так, если до помещения в ДПМП подвижных спермиев при астеноспермии было $25,7 \pm 2,6\%$, то после пребывания образца эякулята в зоне южного полюса магнита в течение 30 и 60 мин этот показатель соответственно был $26,1 \pm 2,8$ и $27,0 \pm 2,9\%$, в зоне северного полюса — $25,3 \pm 2,4$ и $24,8 \pm 2,0\%$. При олигоастеноспермии до помещения в ДПМП эякулят содержал $23,1 \pm 2,1\%$ подвижных спермиев. В образце эякулята, находившемся в зоне южного полюса, таких клеток после 30-минутной экспозиции было $24,2 \pm 2,5\%$ и после 60 мин — $22,9 \pm 2,1$. Пребывание эякулята в области северного полюса магнитного устройства также достоверно не изменяло концентрации подвижных клеток в нем, показатели соответственно были: $23,8 \pm 2,7$ и $21,4 \pm 1,8$.

Во II-й серии экспериментов воздействию ДПМП подвергали среду Эрла, в которой выделяли и хранили подвижную фракцию гамет из эякулятов с нормоспермией. Эякуляты разделяли на 7 групп образцов. Подвижные клетки из I-й группы выделяли на среде, не подвергавшейся воздействию магнитного поля, при работе с остальными группами образцов для выделения подвижной фракции спермиев использовали среду, выдержанную в магнитном устройстве в условиях гипотермии соответственно 30 мин, 2, 4, 6, 12, 18 ч. Оказалось, что если для выделения подвижной фракции гамет из эякулята применить питательную среду, хранившуюся в ДПМП в течение 4 ч и более, количество выделенных подвижных клеток оказывается на $12,2 \pm 1,6$ большим, что достоверно выше, чем при использовании среды, не находившейся в ДПМП, причем эффект этот одинаков по выраженности при использовании среды как с 4-часовой, так и 6-, 12- и 18-часовой экспозицией в ДПМП.

Т а б л и ц а 1

Эффективность выделения подвижной фракции спермиев из эякулята методом всплывания

Концентрация спермиев в эякуляте, млн/мл ($M \pm m$)	Всего спермиев в эякуляте, млн ($M \pm m$)	Содержание подвижных спермиев, % ($M \pm m$)	Концентрация спермиев в выделенной подвижной фракции, млн/мл ($M \pm m$)	
			в среде Эрла без ДПМП	в среде, выделенной в ДПМП
$52,4 \pm 5,1$ (нормоспермия)	$183,4 \pm 8,1$	$71,5 \pm 6,8$	$72,0 \pm 2,7$	$84,2 \pm 3,9^*$
$16,8 \pm 1,7$ (олигоспермия)	$58,8 \pm 4,7$	$60,3 \pm 4,9$	$20,1 \pm 0,9$	$25,2 \pm 1,2^*$
$47,3 \pm 3,9$ (астеноспермия)	$165,6 \pm 6,5$	$28,7 \pm 3,1$	$29,5 \pm 2,1$	$38,4 \pm 2,5^*$
$16,1 \pm 1,6$ (олигоастеноспермия)	$56,4 \pm 3,9$	$27,2 \pm 2,4$	$12,1 \pm 1,2$	$16,9 \pm 1,5^{**}$

Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $0,1 > p > 0,05$ — при сравнении показателя концентрации спермиев в подвижной фракции, выделенной с применением ДПМП, с таковым без использования ДПМП.

В следующей серии экспериментов изучалась возможность повышения показателя подвижности спермы, в частности повышения концентрации клеток в подвижной фракции, выделенной при олиго-, астено- и олигоастеноспер-

мии. Исследования проводили на 27 эякулятах с нормоспермией, 39 — с олигоспермией, 43 — с астеноспермией и 51 — с олигоастеноспермией, объем эякулята составлял $3,5 \pm 0,4$ мл. Каждый эякулят разделяли на два одинаковых по объему образца. Из одного выделяли подвижную фракцию в среде, не подвергавшейся воздействию ДПМП, из другого — в среде Эрла, находившейся в ДПМП не менее 4 ч.

Полученные при этом результаты представлены в табл. 1. Из таблицы видно, что применение метода "всплывания" способствовало повышению фертильности спермы, так как количество подвижных гамет благодаря "отмывке" в среде Эрла существенно повысилось. Концентрация подвижных клеток в мл при использовании среды Эрла, выдержанной в ДПМП, выше концентрации подвижных гамет, выделение которых производили в среде, не подвергавшейся воздействию ДПМП. При нормо-, олиго- и астеноспермии различия были статистически достоверны, при олигоастеноспермии отмечалась тенденция к различию ($0,1 > p > 0,05$).

Т а б л и ц а 2

Динамика изменения количества подвижных спермиев в суспензии, выделенной и хранившейся при 8 °С в среде Эрла, не подвергавшейся воздействию ДПМП, млн/мл ($M \pm m$)

Характеристика сперматогенеза	Концентрация клеток в свежеполученной подвижной фракции спермиев, млн/мл ($M \pm m$)	Хранение при 8 °С, ч		
		24	48	72
Нормоспермия	$72,0 \pm 2,7$	$68,1 \pm 3,9$	$60,9 \pm 5,1$	$48,7 \pm 4,4^*$
Олигоспермия	$20,0 \pm 0,9$	$18,2 \pm 1,4$	$16,4 \pm 1,3$	$12,6 \pm 1,2^*$
Астеноспермия	$29,5 \pm 2,1$	$25,3 \pm 2,5$	$22,1 \pm 2,1$	$16,7 \pm 1,5^*$
Олигоастеноспермия	$12,1 \pm 1,2$	$8,0 \pm 0,9^*$	$7,1 \pm 0,8^*$	$5,9 \pm 0,6^*$

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении с показателем свежеполученной подвижной фракции гамет.

Выделенные из эякулятов суспензии подвижных спермиев хранили в условиях гипотермии на протяжении 3 сут, проверяя ежедневно содержание подвижных клеток в образцах. Динамика снижения подвижности спермиев в процессе гипотермического хранения без использования ДПМП представлена в табл. 2, с использованием ДПМП — в табл. 3. Как видно из представленных данных, в тех случаях, когда выделение подвижной фракции гамет производили в среде, не подвергавшейся воздействию магнитного поля, и в такой же среде помещали суспензию клеток в условия гипотермии, на протяжении 48 ч достоверного снижения концентрации подвижных клеток не было, за исключением эякулятов с олигоастеноспермией, где снижение концентрации отмечено уже через 24 ч. Спустя 72 ч достоверное снижение содержания подвижных спермиев наблюдали во всех образцах. Как видно из табл. 3, у спермиев, выделенных в среде, выдержанной в ДПМП, динамика снижения подвижности клеток была более замедленной. Так, спустя двое суток подвижность снизилась только в суспензии спермиев, полученных при олигоастеноспермии. При нормо- и олигоспермии подвижность гамет оказалась на исходном уровне и после 72 ч пребывания при 8 °С.

Т а б л и ц а 3

Динамика изменения количества подвижных спермиев в суспензии, выделенной и хранившейся при 8 °С в среде Эрла, выдержанной в ДПМП, млн/мл ($M \pm m$)

Характеристика сперматогенеза	Концентрация клеток в свежеполученной подвижной фракции спермиев, млн/мл ($M \pm m$)	Хранение при 8 °С, ч		
		24	48	72
Нормоспермия	$84,2 \pm 3,9$	$77,1 \pm 5,1$	$72,7 \pm 6,9$	$69,8 \pm 6,5$
Олигоспермия	$25,2 \pm 1,2$	$21,8 \pm 2,1$	$19,8 \pm 1,9$	$18,6 \pm 2,3$
Астеноспермия	$38,4 \pm 2,5$	$32,7 \pm 3,3$	$29,7 \pm 3,1$	$22,8 \pm 2,2^*$
Олигоастеноспермия	$16,9 \pm 1,5$	$14,1 \pm 1,3$	$10,2 \pm 1,0^*$	$8,1 \pm 0,9^*$

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении с показателем свежеполученной подвижной фракции гамет.

Таким образом, выделение подвижной фракции спермиев из эякулятов при использовании питательной среды, выдержанной в дополнительном ис-

кусственном постоянном магнитном поле, более эффективно, чем в среде, не подвергавшейся его воздействию. Использование гипотермии для краткосрочного хранения суспензии подвижных спермиев более эффективно при нормо- и олигоспермии, чем при астено- и олигоастеноспермии. Подвижность спермиев в среде Эрла, выдержанной в ДПП, при гипотермии сохраняется на исходном уровне в течение срока, вполне достаточного для использования материала эякулята в цикле лечения бесплодия методами вспомогательной репродуктивной технологии, в частности при искусственной инсеминации спермой мужа и экстракорпоральном оплодотворении (в случаях с реинсеминацией яйцеклетки или отсроченной инсеминацией в связи с необходимостью созревания ооцитов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковалев М.Г. Изменчивость некоторых признаков спермы быков-производителей под воздействием постоянного магнитного поля: Автореф. дис....д-ра с.-х. наук. – Ленинград–Пушкин. – 1990. – 31 с.
2. Крамар М.И. Влияние гипотермии на морфологические и функциональные свойства спермиев человека: Автореф. дис....канд. биол. наук. – Харьков. – 1990. – 17 с.
3. Чуб Н.Н., Терпячая И.В., Пиняев В.И., Луцкая Л.И. Изучение пенетрационной и оплодотворяющей способности спермиев человека, хранившихся в условиях гипотермии // Бесплодие. Вспомогательные репродуктивные технологии. – Киев. – 1995. – С. 184–186.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Белорусский НИИ животноводства,
Жодино, Минской обл.

Поступила 25.03.97

М.М.АХМАД, Г.М.КОВАЛЬОВ, В.І.ПІНЯЄВ, В.Є.ЧАДАЄВ

ВПЛИВ ГІПОТЕРМІЇ І ОБРОБКИ СЕРЕДОВИЩА ЗБЕРІГАННЯ ДОДАТКОВИМ ПОСТІЙНИМ МАГНІТНИМ ПОЛЕМ НА КІНЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМІЇВ ЛЮДИНИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків
Білоруський НДІ тваринництва, Жодино, Мінської обл.

Рухому фракцію спермійів із еякулята зберігали в умовах гіпотермії при 8 °С в 5%-му CO₂. Для виділення і зберігання її використовували середовище Ерла, яке зазнавало і не зазнавало впливу штучного додаткового постійного магнітного поля (ДПМП) з величиною індукції від 0,5 до 45 мТ. Було встановлено, що виділення рухомої фракції спермійів із еякулята методом "спливання" в середовищі Ерла, витриманої в ДПМП, і подальше зберігання в умовах гіпотермії у цьому середовищі дозволяє пролонгувати при нормоспермії і олигоспермії цілість рухомої фракції гамет, що має істотне значення в лікуванні безплідності методами допоміжної репродуктивної технології.

M.M.AHMAD, G.M.KOVALEV, V.I.PINYAYEV, V.D.CHADAYEV

EFFECT OF HYPOTHERMIA AND TREATMENT OF STORAGE MEDIUM BY CONSTANT MAGNETIC FIELD ON KINETIC CHARACTERISTICS OF HUMAN SPERMIA

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National
Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov
Belorussian Institute of Cattle Breeding, Zhodino, Minskaya region

A motile fraction of spermia from the ejaculate was stored under hypothermic conditions at 8 °C in 5%-CO₂. The Earle's medium, exposed and non-exposed to the action of the artificial additional magnetic field (AAMF) with the value of induction in the range of 0.5–45 mT, was used for its isolation and storage. It was found that isolation of the motile fraction of spermia from the ejaculate by a "floating-up" method in the Earle's medium, exposed to AAMF, and subsequent storage under hypothermic conditions in this medium makes it possible to prolong survival of the motile fraction of gametes during normospermia and oligospermia, which is of great importance in the treatment of infertility, using the methods of auxiliary reproductive technology.

СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СУСТАВНОГО ХРЯЩА ПОЗВОНОЧНОГО СЕГМЕНТА ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ

Изучен характер морфологических изменений дугоотростчатых суставов при моделировании спондилоартроза и при локальном криовоздействии. Установлено, что введение папаина в сустав приводит к развитию спондилоартроза с максимально выраженными нарушениями в суставных хрящах. Локальное криовоздействие на суставной хрящ в течение 1 мин при спондилоартрозе вызывает образование изогенных групп хондроцитов, которые рассматриваются как признак репаративного процесса в хрящевой ткани.

Низкие и сверхнизкие температуры для воздействия на биологические объекты используются давно [1, 2]. Особого внимания заслуживают методы локального криовоздействия, так как оно может быть четко дозированным. За последние десятилетия эти методы все шире используются в медицине, в частности, в ортопедии и травматологии [3]. К сожалению, если вопросы общего криовоздействия (особенно в связи с проблемами длительного сохранения биообъектов) изучаются интенсивно, то в вопросах локального криовоздействия преобладает эмпирический опыт клинических исследований. В связи со сложной иерархической многокомпонентной организацией органов с регулируемым температурным гомеостазом вопросы формирования низкотемпературного поля в зоне действия криозонда, первичных и вторичных эффектов выраженности ингибирующих и восстановительных проявлений должны решаться конкретно, применительно к органам систем, в то время как имеющийся опыт использования локального криовоздействия на опорно-двигательный аппарат ограничен. Целью работы явилось исследование характера морфологических изменений структур опорно-двигательного аппарата в норме и при некоторых патологических процессах, при локальном криовоздействии различной интенсивности.

Одним из распространенных патологических процессов в кости является дистрофически-деструктивный процесс в суставах — деформирующий артроз, вызывающий нарушение трофики клеток суставного хряща, нарушение и редукцию микроциркуляторного русла, препятствующий доступу регуляторных и пластических веществ к клеткам суставного хряща.

Для создания модели спондилоартроза у животных (66 кроликов), близкой по морфологическим показателям к заболеванию у человека, нами было выбрано два вида воздействий на дугоотростчатые суставы: механическая травма капсулы сустава и суставного хряща с помощью скальпеля (1-я серия экспериментов), внутрисуставное введение папаина в дугоотростчатый сустав кролика (2-я серия экспериментов). Животных оперировали под общим наркозом (раствор дроперидола 0,25% по 2,5 мл). После обработки операционного поля в поясничной области производили разрез длиной 6,0–8,0 см по срединной линии под остистыми отростками, с обеих сторон рассекали тораколумбальную фасцию, скелетировали долотом дуги позвонков и дугоотростчатые суставы. Криовоздействие на дугоотростчатые суставы осуществляли в 3-й серии экспериментов в течение 1 мин. Криовоздействие осуществлялось с помощью аппарата “Криозонд КМ-22”, температура аппликатора составляла 180°C. Морфологическое изучение тканей суставного хряща после локального криовоздействия проводилось на 14-, 30-, 60- и 180-е сут. Животных забивали путем введения воздуха в краевую вену уха и брали на исследование 4 сегмента в поясничном отделе. Ткани позвоночного сегмента фиксировали в 10%-м нейтральном формалине и выполняли стандартную гистологическую проводку. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизон. Микроско-

пические изменения суставного хряща изучали в динамике в поверхностной, средней и глубокой зонах на микроскопе "Биолам-И".

Результаты морфологических исследований свидетельствуют, что в 1-й и 2-й сериях опытов на 28-е сут в суставах развивался спондилоартроз, который выражался в нарушении гистоархитектоники, разволокнении суставной поверхности, появлении трещин, щелей, заполненных детритом и достигающих подхрящевой костной пластинки, целостность которой на отдельных участках была нарушена за счет прорастания сосудов, проникающих в глубокую зону хряща, в которой обнаруживались одиночные и изогенные группы клеток. Базальная линия также была изменена — либо утолщена, либо расслоена. В краевых отделах суставного хряща выявлялись гиперплазия клеток и обширные разрастания сетчато-волокнистой ткани, отмечаемой также и в расширенных межтрабекулярных пространствах, прилежащих к хрящу. Костные трабекулы в таких участках были истончены и не имели остеоцитов. Отдельные межтрабекулярные пространства были пусты или заполнены клеточным детритом. В папаиновой модели изменения структурной организации захватывали суставной хрящ и костную ткань. При травматическом моделировании скальпелем нарушения были менее выраженными и определялись только в суставном хряще, проявления их были неоднотипны от случая к случаю, что может быть следствием нестандартности повреждения.

Проведенные исследования позволяют прийти к заключению, что введение папаина в сустав приводит к развитию спондилоартроза с максимально выраженными нарушениями в суставных хрящах. Данная модель характеризуется определенной стандартной кинетикой развития и может быть использована для оценки действия лечебных факторов. В связи с этим в последующих экспериментах с локальным криовоздействием на патологически измененный сустав была использована разработанная нами папаиновая модель.

Результаты исследований состояния сустава в ранние сроки (14–30-е сут) после криовоздействия с экспозицией в 1 мин свидетельствуют о комплексе гистологических изменений, затрагивающих все компоненты сустава — суставной хрящ, субхондральную кость, синовиальную капсулу. Нарушения отмечены как в клетках, так и в матриксе анализируемых структур. При этом во все сроки исследования в суставном хряще четко выявлялся участок криоповреждения, который ограничивался пограничной зоной, не подвергавшейся низкотемпературному воздействию. В участке криовоздействия были обнаружены некоторые особенности, связанные с природой воздействующего фактора и отражающиеся на состоянии клеток. В поверхностной и частично средней зонах наблюдались клетки с лизированными ядрами и цитоплазматическим содержимым, а в более глубоких — клетки с пикнотичным ядром. В межклеточном веществе выявлялись изменения, связанные с неравномерной сорбцией красителя на отдельных участках при окраске гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по Ван-Гизон. Коллагеновые волокна поверхностной зоны были демаскированы, наблюдалась фрагментация. Вместе с тем, наряду с процессами деструкции, в хрящевой ткани отмечены явления репарации. Начиная с 14-х сут, в средней и глубокой зонах появлялись единичные округлые клетки с большим ядром и базофильной цитоплазмой. Количество таких клеток постепенно увеличивалось к 30-м сут в глубокой, а затем в средней зонах, образовывались изогенные группы хондроцитов, которые можно рассматривать как признак репаративного процесса в хрящевой ткани.

Макроскопически через 60 сут суставной хрящ после минутного криовоздействия имел ровный контур, поверхность была гладкой с матовым оттенком. Микроскопически изменения структуры определялись в межклеточном веществе поверхностной зоны. На отдельных участках отмечались микротрещины, а также микробугорки. Демаскирование пучков коллагеновых волокон наблюдалось в средней зоне. Места погибших клеток хондроцитов были замещены межклеточным веществом. Количество хондроцитов с деструктивно-дист-

рофическими изменениями значительно снижалось в поверхностной и средней зонах. В глубокой зоне определялись единичные лакуны хондроцитов с некротическими остатками клеток. Наряду с этим в средней и глубокой зонах увеличивалось количество новообразованных хондроцитов, вокруг которых формировались тонкие пучки коллагеновых фибрилл. Пролиферация клеток отмечалась практически во всех зонах суставного хряща и наиболее была выражена в глубокой зоне. В субхондральной кости значительных нарушений структуры не выявлялось. Отмечалось утолщение субхондральной кости. Таким образом, через 60 сут суставной хрящ после криовоздействия характеризовался комплексом гистологических изменений структурных компонентов, направленных в сторону восстановительного процесса.

Макроскопически через 180 сут анатомо-топографические отношения в суставе были четко выражены. Суставной хрящ имел гладкую поверхность и характеризовался микроскопически появлением клеток с базофильной цитоплазмой. Трещины и щели не определялись, поверхность была ровной и гладкой. В средней и глубокой зонах выражена активная пролиферация хрящевых клеток. Наряду с новообразованными хондроцитами определялись лакуны без хондроцитов, заполненные плотным содержимым. Очевидно, это было связано с тем, что в такие участки мигрировали макромолекулы межклеточного вещества, синтезируемые хондроцитами.

В части, не подвергавшейся криовоздействию, суставной хрящ имел характерное для нормы строение. В субхондральной кости криовоздействие не вызывало глубоких изменений. В ней наблюдались процессы перестройки, которые выражались в некотором утолщении субхондрального отдела и сужении костных каналов за счет новообразованной кости на поверхности костных трабекул.

Результаты проведенного исследования показали, что криовоздействие в течение 1 мин на суставной хрящ в более поздние сроки (60- и 80-е сут) в глубокой и средней зонах вызывает образование изогенных групп хондроцитов, которые рассматриваются как признак репаративного процесса в хрящевой ткани. Однако необходимо отметить, что восстановительный процесс в хряще после криовоздействия длителен. В наших исследованиях максимум клеточной активности определялся через 60 сут, после чего она стабилизировалась.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М. Проблемы регенерации тканей при местном криовоздействии // Пробл. криобиологии. – 1992. – № 1. – С. 14–18.
2. Малышкина С.В. Структурно-метаболические изменения суставного хряща после локального криовоздействия: Автореф. дис....канд. биол. наук. – Харьков, 1985. – 19 с.
3. Обозная-Печенежская Э.И., Грищенко В.И., Папков Е.Я. Криобиология обновления: факты и перспективы // Пробл. криобиологии. – 1993. – № 4. – С. 11–17.
4. Склярченко Е.Т., Тарабанова Л.В., Папков Е.П. Криотерапия при болевых синдромах, связанных с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями позвоночника // Ортопедия, травматология, протезирование. – 1986. – № 10. – С. 28–31.
5. Тарасенко В.И. Криовоздействие при артопластике тазобедренного сустава: Автореф. дис....канд. мед. наук. – Харьков, 1989. – 18 с.

Харьковский ин-т усовершенствования врачей

Поступила 10.10.96

Н.Г.МАЛОВА

СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ СУГЛОБОВОГО ХРЯЩА ХРЕБЕТНОГО СЕГМЕНТА ПІСЛЯ ЛОКАЛЬНОЇ КРІОДІЇ

Харківський інститут удосконалення лікарів

Вивчено характер морфологічних змін дуговідросткових хребтів при моделюванні спонділоартрозу і при локальній кріодії. Встановлено, що введення панайну в суглоб приводить до розвитку спонділоартрозу з максимально вираженими порушеннями в суглобових хрящах. Локальна кріодія на суглобовий хрящ на протязі хвилини при спонділоартрозі викликає утворення ізогенних груп хондроцитів, які розглядаються як ознака репаративного процесу в хрящовій тканині.

N.G.MALOVA

STRUCTURE-METABOLIC CHANGES OF THE ARTICULAR CARTILAGE OF THE VERTEBRAL SEGMENT FOLLOWING LOCAL CRYOTREATMENT

Kharkov Institute of Advanced Medical Training

The author studied the nature of morphological changes in the arciform-sheath joints during modelling of spondyloarthrosis and local cryotreatment. It was found that injection of papain into the joint results in the occurrence of spondyloarthrosis with maximum pronounced impairments in the articular cartilages. Local cryotreatment of the articular cartilage for 1 min during spondyloarthrosis prompts formation of the isogenic groups of chondrocytes, which are considered as a feature of the reparative process in the cartilaginous tissue.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 576.311.32

С.Х.Межидов, В.А.Моисеев

О НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЯХ МЕТОДА ЭПР-СПИНОВОГО ЗОНДА В КРИОБИОЛОГИИ

Известно, что некоторые парамагнитные вещества образуют комплексы с некоторыми криопротекторами [1]. Поэтому надо полагать, что в таких растворах эффективность уширения парамагнитным уширителем спектра спинового зонда будет уменьшаться. В связи с этим нами проведены исследования при высоких концентрациях различных веществ в том числе и в присутствии криопротектора 1,2-пропандиола (1,2-ПД).

При проведении экспериментов использованы препараты марки ХЧ, ЧДА и донорская кровь 3–5 сут хранения при 4 °С. Исследования проведены на приборе ЭПР "Bruker ER-100 D" (ФРГ). Модуляция магнитного поля — 0,5 Гс, диаметр кавитатора — 0,5 мм, концентрация зонда 2,2,6,6-тетраметил-4-оксо-пиперидин-1-оксид (ТЕМПОН) — $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л (при более высокой его концентрации происходит уширение спектра из-за спин-спиновой взаимодействия). Концентрации натрия хлорида (NaCl), сахарозы и калия хлорида (KCl) были 1,2 моль/л, а при сочетании NaCl с 1,2-ПД — 0,8 и 4,6 моль/л (35%) соответственно.

Перед экспериментом кровь отмывали 3 раза физиологическим раствором, приготовленным на 5 ммоль/л натрий-фосфатном буфере, с *pH* 7,4. Для получения необходимой конечной концентрации вещества его раствор добавляли к эритроmasse 25:1. После центрифугирования и удаления надосадка к эритроmasse добавляли 1:1 раствор исследуемого вещества с соответствующей концентрацией феррионид-калия (ФК) и зонда ТЕМПОН.

Расчет времени корреляции вращательной диффузии (τ) осуществляли по известной формуле [2].

На рис. 1 и 2 представлены спектры зонда ТЕМПОН в растворе NaCl и NaCl в присутствии 35%-го 1,2-ПД. Из рис. 1 видно, что для уширения спектра ТЕМПОН в растворе NaCl 1,2 моль/л необходима концентрация ФК 0,15 моль/л, в то время как в присутствии 1,2-ПД даже при концентрации ФК 0,2 моль/л нет полного уширения. В растворе KCl характер уширения имел практически такой же вид, что и в растворах NaCl, в то время как в растворе сахарозы отмечается полное уширение спектра зонда при концентрации ФК 0,15 моль/л. При изучении полуширины

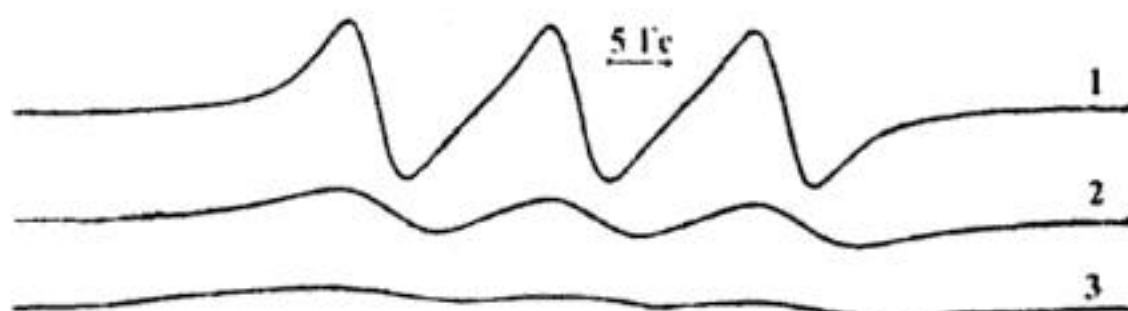


Рис. 1. Вид спектра зонда ТЕМПОН ($2 \cdot 10^{-3}$ моль/л) в растворе NaCl (1,20 моль/л) при концентрации ФК: 1 – 0,50; 2 – 0,10; 3 – 0,15 моль/л

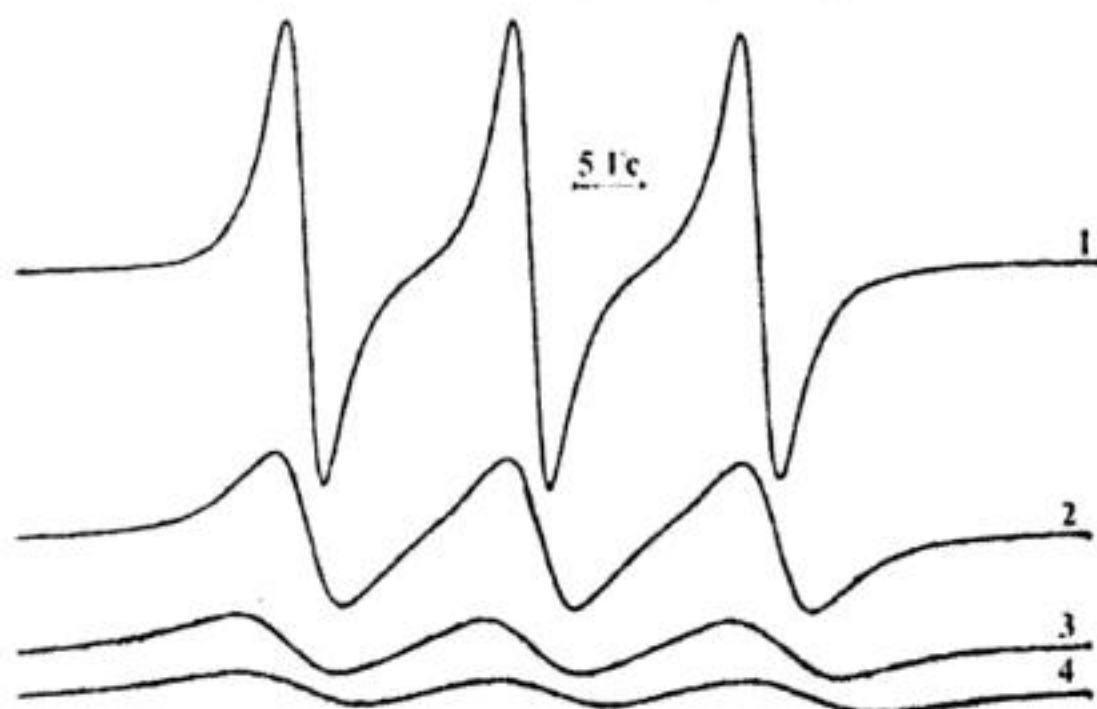


Рис. 2. Вид спектра зонда ТЕМПОН ($2 \cdot 10^{-3}$ моль/л) в растворе NaCl (0,80 моль/л) в присутствии 1,2-пропандиола при концентрации ФК: 1 – 0,50; 2 – 0,10; 3 – 0,15; 4 – 0,20 моль/л

центральной компоненты спектра зонда ТЕМПОН было установлено, что в растворе с 1,2-ПД требуется в 2 раза большие концентрации ФК для получения такого же уширения, как и в растворе с ПХ.

При проведении экспериментов на эритроцитах с использованием концентрации ФК 0,1 моль/л, которая по осмомолярности соответствует физиологическому раствору ПХ [3, 4], из общего спектра приходится вычитать спектр внеклеточной среды с учетом гематокрита. Такие исследования позволили установить, что значения τ при концентрациях ПХ и сахарозы 0,8 и 1,2 моль/л достоверно друг от друга не отличались. Так, при концентрации сахарозы 0,8 и 1,2 моль/л (ФК 0,2 моль/л) τ имело значения $11,3 \cdot 10^{-11}$ и $11,0 \cdot 10^{-11}$ соответственно. При концентрации сахарозы 1,2 моль/л и концентрации ФК 0,1 моль/л и учете вклада внеклеточной среды $\tau = 12,9 \cdot 10^{-11}$ с (погрешность $\pm 10\%$). Причиной слабого уширяющего действия ФК в растворе с 1,2-ПД, по-видимому, является увеличение радиуса параманитного сольватного комплекса за счет встраивания криопротектора в его гидратную оболочку.

Таким образом, при исследовании цитозоля эритроцитов при высоких концентрациях ПХ, КХ, сахарозы, а также 1,2-ПД необходимо использовать более высокие концентрации ФК или учитывать вклад зонда, находящегося во внеклеточной среде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веркин Б.И., Моисеев В.А., Пардид О.А., Пушкарь П.С. Комплексообразование ионов группы железа // Докл. АН СССР. – 1976. – 1224. – 6. – С. 1341–1345.
2. Лихтенштейн Г.И. Метод спинного зонда в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 255 с.
3. Межидов С.Х., Моисеев В.А., Пардид О.А. Исследование дегидратации эритроцитов методом спинного зонда // Биофизика. – 1989. – 34, № 6. – С. 993–996.
4. Mehlhorn J., Candau P., Packer L. Measurements of volumes and elektrochemical gradients with spin probes in membrane vesicles // Meth. enzymol. – 1982. – 88. – P. 751–762.

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

Поступило 23.07.96

УДК 612.826.4:57.043

В.С.Марченко

МОДИФИКАЦИЯ КАРДИОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ НОРАДРЕНАЛИНА И АЦЕТИЛХОЛИНА ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Известно, что целый ряд вегетотропных веществ, в эутермных условиях не проникающих через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), обладают противоположным действием при системном и центральном способах введения [1, 3]. Охлаждение организма может вызвать кардинальные перестройки нейродинамики мозга, приводящие к повышению проницаемости ГЭБ [1]. Поэтому на фоне гипотермии следует ожидать смену или эквипробацию знаков батмо-, дromo-, ино-, тоно-, хроно-кардиотропных эффектов [2] катехоламинов и, наоборот, — усиление симпатического действия парасимпатических веществ. В связи с этим было изучено влияние норадреналина (НА) и ацетилхолина (АХ) на частоту сердечных сокращений (ЧСС) при различных уровнях проницаемости ГЭБ охлажденного мозга. Эксперименты проводились на белых крысах массой 180–220 г. Функциональное состояние ГЭБ оценивалось радиоизотопным методом при ритмической гипотермии (РГ) с частотой воздействия на каудальные терморесепторы 0,1 Гц (0,1 РГ) [1].

Результаты исследований показали, что на 45-й и 65-й мин холодного воздействия при системном введении АХ и НА соответственно наблюдается центральный эффект на ЧСС, т. е. НА не повышает, а замедляет, а АХ не снижает, а учащает сердцебиение (табл.). Следует отметить, что при инъекции НА на фоне 0,1 РГ ЧСС уменьшается линейно, хотя и напоминает так называемую отрицательную лестницу (феномен Вудворда [2]). В подобных условиях при введении АХ изменения ЧСС носят квазисинусоидальный характер по типу положительной лестницы (феномен Боудичи [2]), причем периоды повышения ЧСС сменяются снижением сердечной ритмики, как правило, с частотой 0,1–0,2 Гц. Такое влияние нейротрансмиттеров на динамику изменения ЧСС при 0,1 РГ должно в известной степени отражать особенности проницаемости ГЭБ, что и подтвердили радиоизотопные исследования. При этом максимумы проницаемости для ^3H -НА и ^3H -АХ оказались на разных этапах 0,1 РГ в полном соответствии с моментом их центральных эффектов (табл.). Можно предположить, что процессы повышения проницаемости ГЭБ для АХ и НА разнесены в пространстве и времени. Проницаемость ГЭБ для НА на основе его центрального действия на сердечный ритм хорошо объясняется “шлюзным механизмом”, т. е. последовательным открытием системы постоянно существующих каналов (например, в области плотных контактов эндотелиоцитов). Динамика ЧСС при системном введении АХ, напротив, свидетельствует

о том, что его поступление в мозг могло быть обеспечено появлением временных трансэндотелиальных каналов, пропускающих нейромедиатор с секундной ритмикой.

Влияние ритмической гипотермии на проницаемость ГЭБ и ЧСС на фоне системного введения НА и АХ

Фармакофон	Параметры	Длительность 0,1 РГ, мин			
		0	45	65	85
ПА	ЧСС, % от нормы	115±5	110±4	60±5*	105±6
³ Н-ПА	Ки	0,13±0,04	0,2±0,05	0,5±0,04*	0,19±0,05
АХ	ЧСС, % от нормы	80±5	120±6*	80±5	75±5
³ Н-АХ	Ки	0,12±0,03	0,45±0,01*	0,18±0,05	0,2±0,06

Примечание. ПА – парадриналина гидротартрат (1 мг/100 г); ³Н-ПА – 5 мкл (1 мкК/1 мкл); АХ – ацетилхолин хлористый (10 мг/100 г); ³Н-АХ – 5 мкл (1 мкК/1 мкл); Ки – коэффициент проницаемости (отношение удельной радиоактивности мозга к удельной радиоактивности крови). * – Различия по сравнению с исходными значениями (0 мин) достоверны (P<0,01).

Таким образом, по нашему мнению, парадоксальные кардиотропные эффекты при гипотермии в значительной степени обусловлены повышенным уровнем проницаемости ГЭБ охлажденного мозга. Вероятность феноменов такого рода жизненно необходимо учитывать в практической криомедицине при проведении гипотермии с лечебной целью и можно использовать в экспериментальной криобиологии в качестве удобного и относительно дешевого инструмента исследования прижизненной динамики проницаемости ГЭБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Марченко В.С., Бабичук Г.А., Шило А.В. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3 // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 3. – С. 10–19.
2. Словарь физиологических терминов. – М.: Наука, 1987. – 488 с.
3. Stryken-Boudie H.A. Catecholamine receptors in nervous system. – Nijmegen, 1975. – 171 p.

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

Поступило 05.03.97

УДК 611.013.1:612.592:537.63

Г.Г.Юрченко, М.М.Ахмад, М.И.Крамар

СОХРАННОСТЬ АКРОСОМ У СПЕРМИЕВ ПОДВИЖНОЙ ФРАКЦИИ ЭЯКУЛЯТА ЧЕЛОВЕКА, ХРАНИВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ

Общепризнанным является мнение, что акросома — это модифицированная крупная лизосома, специфически измененная в процессе эволюции для обеспечения проникновения спермия в яйцеклетку. Цитоплазматическая мембрана и акросома являются наиболее хрупкими частями головки спермия, которые быстро повреждаются при действии неблагоприятных факторов среды, в том числе и низких температур [5]. Поэтому сохранность акросомы является одним из объективных показателей эффективности метода консервации спермиев.

В последние годы вспомогательные репродуктивные технологии, в частности искусственная инсеминация спермой мужа (ИСМ), экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), все более широко применяются при бесплодии, обусловленном мужским фактором. При этом в ряде случаев (необходимость повторной инсеминации при ИСМ, необходимость реинсеминации яйцеклеток или отсроченной инсеминации их после дозревания) возникает необходимость краткосрочного, в течение 1–3 сут, хранения гамет. При нормоспермии оказалось эффективным применение для этих целей гипотермии [3], которая обеспечивала сохранение в течение 48 ч морфофункциональных свойств спермиев, в том числе акросомального аппарата.

Целью данной работы было изучение влияния гипотермии на сохранность акросомы у спермиев из подвижной фракции эякулятов пациентов с олиго-, астено- и олигоастеноспермией, а также выяснение возможности prolongирования времени сохранности подвижной фракции гамет в морфологически полноценном состоянии с помощью использования питательной среды для их выделения и хранения, выдержанной в искусственном дополнительном постоянном магнитном поле (ДПМП).

Материалом исследования были подвижные спермии, выделенные методом “всплыпания” из эякулятов 107 пациентов из бесплодных супружеских пар. В работе использовали среду Эрла, выдержанную в ДПМП и не подвергавшуюся его воздействию. В работах [1, 2] убедительно показана возможность сохранения фертильности спермиев быка на протяжении 4–5 сут при 2–4 °С, если среду хранения предварительно выдержать в ДПМП. Для получения ДПМП использовали “магнитный сосуд” М.Г.Ковалева [1], любезно предоставленный нам автором. Магнитная индук-

ция от центра к полюсам "сосуда" составляла 0–45 мТ. Среду выдерживали в ДИМП 4–18 ч (эта экспозиция подобрана в предварительных опытах). Для оценки сохранности акросом спермиев применяли акроскопический тест [4].

Т а б л и ц а 1

Содержание клеток с поврежденной акросомой в цельном эякуляте и в подвижной фракции его при нормо- и патоспермиях, % ($M \pm m$)

Характеристика эякулята	Цельный эякулят	$p1$	Подвижная фракция спермиев				
			среда Эрла без ДИМП	$p1$	среда Эрла с ДИМП	$p1$	$p2$
Нормоспермия	$16,9 \pm 1,9$		$7,4 \pm 0,9$		$6,4 \pm 0,6$		$>0,05$
Олигоспермия	$25,7 \pm 2,1$	$<0,05$	$12,5 \pm 1,4$	$<0,05$	$9,1 \pm 1,1$	$<0,05$	$>0,05$
Астеноспермия	$29,1 \pm 3,1$	$<0,05$	$15,5 \pm 1,5$	$<0,05$	$11,9 \pm 1,4$	$<0,05$	$>0,05$
Олигоастеноспермия	$49,4 \pm 3,9$	$<0,05$	$20,2 \pm 2,4$	$<0,05$	$14,3 \pm 1,4$	$<0,05$	$>0,05$

Примечание. $p1$ – при сравнении с нормоспермией, $p2$ – при сравнении с использованием среды Эрла без ДИМП.

Как видно из представленных в табл. 1 данных, содержание спермиев с акросомальной патологией в эякуляте при нормоспермии составляло $16,9 \pm 1,8\%$, что достоверно не отличается от результатов других исследователей [4]. При олиго-, астено- и олигоастеноспермии содержание клеток с поврежденными акросомами было достоверно ($p < 0,05$) больше, чем в эякулятах с нормоспермией.

Исследование акросом спермиев из суспензии подвижной фракции позволило установить, что и в данном случае обнаруживаются клетки с акросомальной патологией, причем, как видно из таблицы, прослеживается та же закономерность, что и в цельном эякуляте. У гамет подвижной фракции, выделенной из эякулятов с патоспермией, акросомальная патология достоверно более выражена, чем у подвижной фракции клеток, выделенных из эякулятов при нормоспермии. При сравнении частоты встречаемости акросомальной патологии у гамет из подвижной фракции, полученной в среде Эрла, подвергавшейся и не подвергавшейся действию ДИМП, достоверные различия были отмечены лишь в случае выделения подвижной фракции из эякулята с олигоастеноспермией — в "оматричной" среде клеток с нарушенной акросомой было меньше.

В следующей серии экспериментов изучалось влияние гипотермии на сохранность акросомы спермиев подвижной фракции при нормо- и патоспермиях. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Влияние на сохранность акросом условий выделения из эякулята подвижной фракции спермиев и хранения ее при 8 °С

Характеристика эякулята	Содержание клеток с поврежденной акросомой во фракции подвижных спермиев, % ($M \pm m$)					
	Выделение и хранение в среде Эрла без ДИМП, ч			Выделение и хранение в среде с ДИМП, ч		
	24	48	72	24	48	72
Нормоспермия	$8,1 \pm 0,9$	$9,8 \pm 1,2$	$14,1 \pm 1,5^*$	$7,7 \pm 0,8$	$8,0 \pm 0,6$	$9,2 \pm 1,1$
Олигоспермия	$13,9 \pm 1,4$	$15,0 \pm 1,7$	$23,4 \pm 2,3^*$	$11,5 \pm 1,2$	$13,1 \pm 1,3$	$16,3 \pm 1,7$
Астеноспермия	$16,1 \pm 1,6$	$19,1 \pm 2,1$	$29,7 \pm 3,1^*$	$15,8 \pm 1,6$	$17,2 \pm 1,6$	$19,4 \pm 2,0^*$
Олигоастеноспермия	$23,7 \pm 2,1$	$29,2 \pm 2,0^*$	$34,0 \pm 3,2^*$	$23,1 \pm 2,4$	$28,9 \pm 3,0^*$	$32,7 \pm 2,7^*$

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении с показателем до воздействия гипотермии.

Как видно из табл. 2, если подвижная фракция спермиев была получена из эякулята с олигоастеноспермией, через 48 ч хранения при 8 °С акросомальная патология в ней была достоверно более выраженной, чем в свежеполученной фракции подвижных клеток. Это наблюдали в суспензии подвижных гамет, полученной в среде Эрла как с воздействием магнитного поля, так и без него. При нормо-, олиго- и астеноспермии у спермиев подвижной фракции эякулята, выделенной в среде, не подвергавшейся воздействию ДИМП, удельная масса спермиев с нарушенной акросомой увеличивалась спустя 72 ч хранения в условиях гипотермии. При исследовании подвижной фракции клеток, полученной и хранившейся в среде Эрла, выдержанной в ДИМП, при нормоспермии и олигоспермии достоверных различий в выраженности акросомальной патологии, в сравнении со спермиями из свежеполученной суспензии, во все сроки наблюдения не было. В то же время при астено- и олигоастеноспермии количество клеток с разрушенными акросомами достоверно возросло через 72 ч хранения при 8 °С.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что акросомальная патология более выражена при нарушениях сперматогенеза по сравнению с этим показателем при нормоспермии, что прослеживается при исследовании как цельного эякулята, так и выделенной из него подвижной фракции спермиев. Гипотермия обеспечивает сохранность акросомы подвижных спермиев при нормо- и олигоспермии более продолжительное время, чем при астено- и олигоасте-

носпермии, причем это время пролонгируется, если для выделения и хранения подвижной фракции спермиев использовать питательную среду, выдержанную в искусственном дополнительном магнитном поле.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковалев М.Г. Изучение влияния магнитного поля на разбавители семени быков // Животноводство. – 1975. – № 9. – С. 54–56.
2. Ковалев М.Г. Изменчивость некоторых признаков спермы быков-производителей под воздействием постоянного магнитного поля: Автореф. дис....канд. вет. наук. – Ленинград-Пушкин, 1990. – 31 с.
3. Крамар М.И. Влияние гипотермии на морфологические и функциональные свойства спермиев человека: Автореф. дис....канд. биол. наук. – Харьков, 1990. – 17 с.
4. Морозов Н.Г. Мужское бесплодие. Прецизионная диагностика // Кишинев: "Штиинца", 1990. – 85 с.
5. Смаглий Н.Ю. Биохимические свойства спермы человека при криоконсервировании и некоторых видах патологии: Автореф. дис....канд. биол. наук. – Харьков, 1990. – 17 с.

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

Поступило 25.03.97

УДК 612.111.17

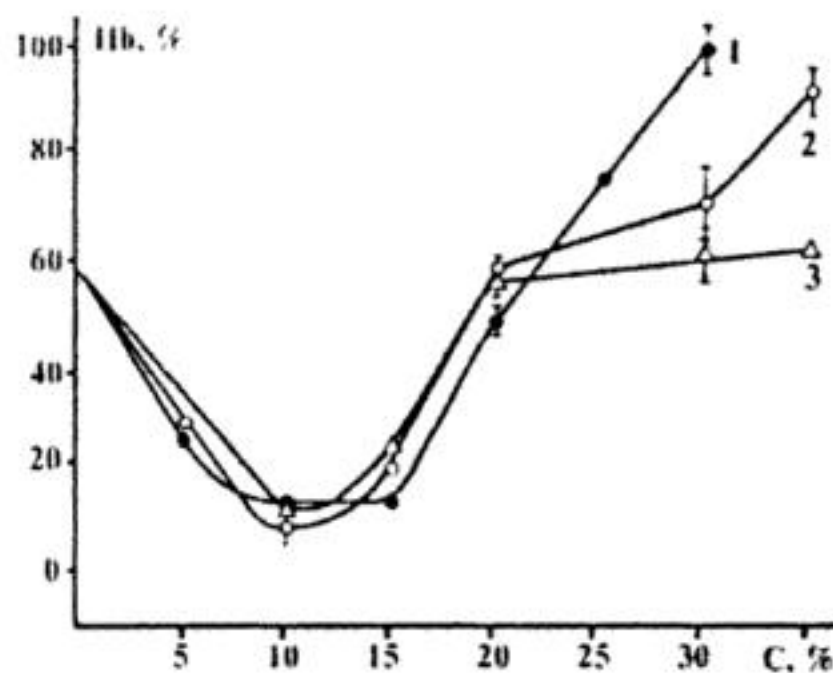
С.Х.Межидов

ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КРИОПРОТЕКТОРОВ

В настоящее время токсичность криопротекторов оценивают по его количеству в г/кг, которое вызывает гибель 50% подопытных животных (LD₅₀) [2]. Однако оценка цитотоксичности криопротекторов на клеточном уровне затруднена в силу того, что многие из них не оказывают разрушающего действия на клетки, и выявить нарушения на молекулярном уровне достаточно сложно, так как это требует трудоемких и дорогих исследований, а некоторые из нарушений оказываются обратимыми. В связи с этим был предложен подход для оценки цитотоксичности криопротекторов по их влиянию на сохранность клеток при воздействии на них раствором натрия хлорида 4 моль/л [1]. Но этот метод не вписывается в общепринятую схему оценки токсичности различных веществ [2]. В связи с этим предлагается оценить цитотоксичность криопротекторов по их влиянию на сохранность клеток при действии фактора, вызывающего разрушение около 50% (LD₅₀) клеток. В качестве такого фактора предлагается натрия хлорид, который широко используется в криобиологии.

Исследования проведены на эритроцитах донорской крови человека 3-5 сут хранения при 4 °С. Перед экспериментом эритроциты 3 раза отмывали физиологическим раствором натрия хлорида, приготовленным на натрий-фосфатном буфере с pH 7,4. Соотношение эритромаасса:раствор было 1:1, центрифугирование проводили при 1500 об/мин в течение 15 мин. Все использованные вещества были марки ХЧ или ЧДА.

При изучении влияния криопротекторов на сохранность клеток к ним предварительно добавляли растворы криопротекторов с соответствующей концентрацией (0,6% натрия хлорида, 3% сахарозы и натрий-фосфатный буфер с pH 7,4) и выдерживали при 20 °С 30 мин. Центрифугировали при 3000 об/мин 25–30 мин, отбирали надосажок и к эритромассе 1:100 добавляли гипертонический раствор натрия хлорида (LD₅₀=3,2 моль/л), который содержал такую же концентрацию криопротектора, что и надосажок от эритромаассы. Выдерживали эритроциты в растворе 10 мин, центрифугировали при 1500–3000 об/мин в зависимости от концентрации натрия хлорида, отбирали надосажок и определяли гемолиз на ФЭК-56М. Результаты исследований представлены на рисунке. Видно, что при концентрациях криопротекторов 5–15% гемолиз эритроцитов меньше, чем при их отсутствии. Это может быть связано как с влиянием малых концентраций криопротекторов на цитоскелетные белки, белок-липидные, липид-липидные взаимодействия, так и с увеличением концентрации крио-



Зависимость гемолиза эритроцитов от концентрации и вида криопротектора в присутствии натрия хлорида 3,2 моль/л (LD₅₀). Эритромаасса содержала соответствующий криопротектор с такой же концентрацией, что и добавленный раствор, а также натрий фосфатный буфер с pH 7,4: 1 – 1,2-НД, 2 – этиленгликоль, 3 – глицерин

протекторов внутри клетки в силу дегидратации, в то время как во внеклеточной среде она остается неизменной.

При концентрации криопротекторов 20% уровень гемолиза эритроцитов близок к значению, которое характерно для концентрации натрия хлорида, вызывающей повреждение 50% эритроцитов. Следует отметить, что при 20%-й концентрации криопротекторов отмечались первые признаки повреждения эритроцитов, хотя условия были физиологическими. Кроме того, уровень гемолиза эритроцитов имеет близкие значения для всех криопротекторов до 20%-й их концентрации. При концентрациях криопротекторов выше 20% отмечаются различия в гемолизе эритроцитов в зависимости от вида криопротектора. Так, глицерин практически не влиял на величину гемолиза эритроцитов при концентрациях выше 20%, в то время как в присутствии этиленгликоля в концентрации 35% происходило разрушение не менее 90% клеток, а в присутствии 1,2-пропандиола уже при 30% его концентрации происходило разрушение всех клеток (100%).

Таким образом, предлагаемый подход позволил расположить изученные криопротекторы по своему токсическому воздействию на эритроциты в ряд: глицерин < этиленгликоль < 1,2-ПД, и он может быть использован для предварительного тестирования токсичности криопротекторов для различных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1989. – 16 с.
2. Санюцкий И.В., Уланова И.И. Критерии вредности в гигиене и в токсикологии при оценке опасности химических соединений. – М.: Медицина, 1975. – 254 с.

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

Поступило 21.01.97

УДК 57.043

В.Г.Бабийчук, И.К.Латогуз

ВЛИЯНИЕ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ КРЫС НА СОПРЯЖЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ В ТКАНЯХ МИОКАРДА

Известно, что функциональное состояние миокарда, его насосная функция в основном обеспечиваются энергией за счет окислительного фосфорилирования. Можно предположить, что изменение в снабжении тканей миокарда кислородом при охлаждении должно отразиться на состоянии окислительного фосфорилирования и дыхании митохондрий в мышце сердца.

Опыты проводились на белых крысах-самцах линии Вистар массой 180 г. Для частичного блокирования реакций терморегуляции в ответ на охлаждение применяли инъекции 5%-го раствора тионентала натрия в сочетании с 20%-й гамма-оксимасляной кислотой. Краниоцеребральную гипотермию (КЦГ) проводили на установке для программного охлаждения. Дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий, выделенных из сердца, определяли полярографически.

Влияние КЦГ (32 °С) и наркоза на дыхание и сопряжение дыхания с окислительным фосфорилированием в митохондриях сердца крыс ($n=5$)

Вариант опыта	Дыхательный контроль		АДФ/О		Потребление O_2 , наноатом/мг белка/мин (v_3)	
	сукцинат	глутамат + малат	сукцинат	глутамат + малат	сукцинат	глутамат + малат
Контроль	$4,5 \pm 0,005$	$5,3 \pm 0,11$	$1,97 \pm 0,003$	$2,94 \pm 0,3$	$210,38 \pm 2,62$	$154,98 \pm 8,04$
КЦГ 32 °С	$1,72 \pm 0,12^*$	$2,4 \pm 0,05$	$1,17 \pm 0,08^*$	$1,33 \pm 0,1^*$	$102,0 \pm 6,5^*$	$98,13 \pm 6,69$
Наркоз 1,5 ч	$1,8 \pm 0,08^*$	$2,61 \pm 0,07^*$	$1,26 \pm 0,09^*$	$1,72 \pm 0,28^*$	$106,55 \pm 4,35^*$	$97,47 \pm 6,3^*$
КЦГ 32 °С 6 ч	$2,52 \pm 0,03^*$	$3,32 \pm 0,4^*$	$1,68 \pm 0,03^*$	$2,58 \pm 0,4$	$97,97 \pm 4,86^*$	$22,76 \pm 8,6^*$
Наркоз 7,5 ч	$3,91 \pm 0,04$	$4,04 \pm 0,04$	$2,03 \pm 0,05$	$2,93 \pm 0,05$	$207,23 \pm 4,71$	$6,52 \pm 4,71$

Примечание. v_3 – скорость потребления O_2 при добавлении АДФ; АДФ/О – показатель эффективности фосфорилирования. Дыхательный контроль по Ларди-Вердману; * – изменение достоверно по сравнению с контролем, уровень значимости $p < 0,05$.

Как следует из таблицы, применяемый наркоз снижает сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий, подтверждением чему служит уменьшение дыхательного контроля при окислении сукцината и глутамата с малатом. Понижение температуры тела экспериментальных животных до 32 °С не приводит к достоверным различиям показателей сопряжения этих процессов по сравнению с животными, которым проводился только наркоз. Продолжительное охлаждение животных в течение 6 ч увеличивало способность митохондрий ткани сердца к сопряжению дыхания с окислительным фосфорилированием, однако было ниже, чем в контрольной группе животных. У животных с наркозом прочность сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий ткани сердца возвращалась к норме спустя 7 ч. Аналогичная

динамика отмечена и при изучении коэффициента P/O , характеризующего количество образовавшихся молекул АТФ на атом поглощенного митохондриями кислорода. Результаты показывают, что КИГ крыс в течение 6 ч приводит к обратимым изменениям сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях миокарда. В данном случае рассеивание энергии в виде тепла не выражено столь значительно, как при общей глубокой гипотермии, а наблюдается адаптационный процесс с мягким разобщением дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях. Нами были исследованы также процессы электронного переноса между окислительно-восстановительными центрами, фиксированными на мембранах митохондрий. Оказалось, что при понижении температуры тела экспериментальных животных до 32°C восстановление радикалов в митохондриях тканей в течение первых 10–15 мин происходило с более высокой скоростью, чем в контрольной группе животных. Это, очевидно, можно объяснить угнетением дыхания при гипотермии, которая приводит к снижению расхода субстратов. Таким образом, при температуре тела 32°C снижается интенсивность энергообразования и обмена веществ в сердце, что позволяет пролонгировать время субстратного истощения, а также снизить потребность тканей миокарда в кислороде. Очевидно, в данном случае имеет место адаптационный процесс, заключающийся в "легком разобщении" дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий, которое отражает особенности обмена веществ в состоянии охлаждения и функции сердца как насоса.

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

Поступило 20.02.97

УДК 57.043:577.24

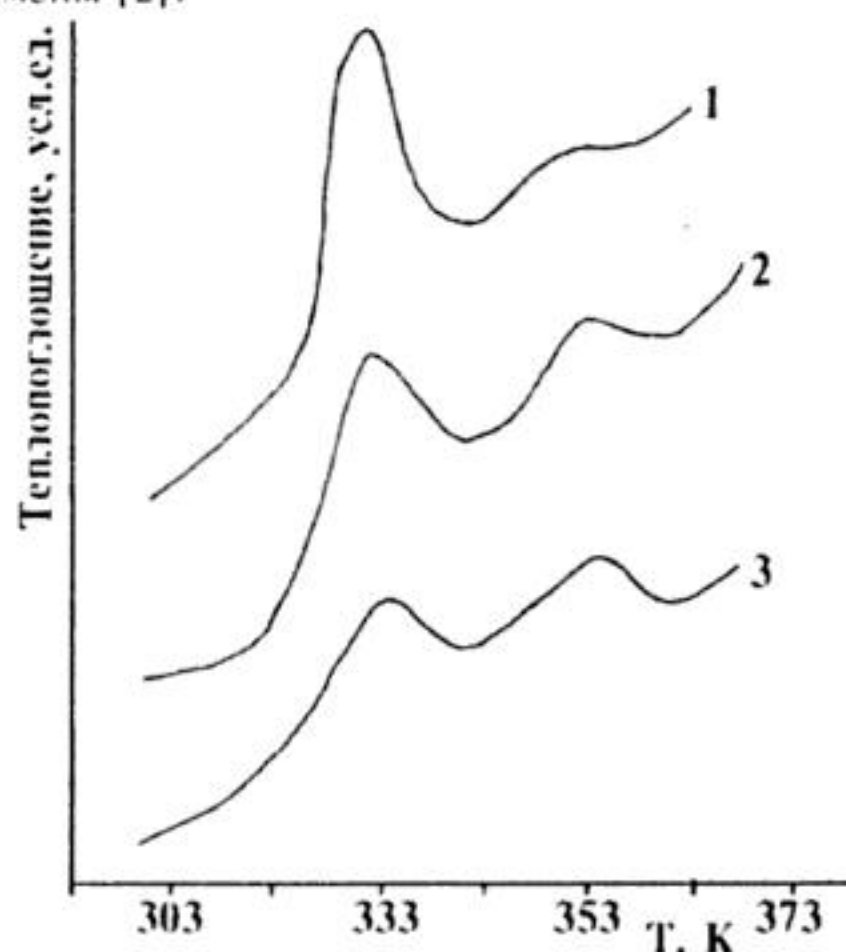
А.В.Зинченко, А.С.Соловьева

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ТЕМПЕРАТУРНОГО ЦИКЛИРОВАНИЯ НА ПРОЦЕСС ТЕРМОДЕНАТУРАЦИИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА БЫКА

Как известно, метод сканирующей микрокалориметрии является одним из прямых методов, в котором при исследовании тепловой денатурации доменная организация белка может проявляться непосредственно на термограмме. Недавними исследованиями нативной структуры альбумина при помощи метода микрокалориметрии [5] было установлено, что молекула сывoroточного альбумина имеет по крайней мере три в значительной мере независимые компактные структуры, которые можно рассматривать как структурные домены [2].

Процесс замораживания является фактором, который нарушает упорядоченную структуру белковой молекулы. Это проявляется в нарушении гидратной оболочки молекулы биополимера, так как при замораживании нарушается структура связанной воды, играющей особую роль в поддержании определенного конформационного состояния белковой молекулы [1]. Кроме того, при этом происходит стерическое сближение различных участков полипептидной цепи и даже отдельных полипептидных цепей и тогда создаются условия для окисления SH-связей до -S-S- [1], что также приводит к значительному изменению нативной конформации белковой молекулы. Изменения пространственной структуры белка сопровождаются изменением теплофизических параметров [6] и могут быть обнаружены методом сканирующей микрокалориметрии.

Целью настоящей работы было исследование процесса тепловой денатурации бычьего сывoroточного альбумина (БСА) после однократного охлаждения до температуры жидкого азота (77 K) и после циклирования температуры в твердой фазе при помощи метода сканирующей микрокалориметрии. В работе был использован лиофилизированный БСА фирмы "Serva", фракция 5. Исследуемые растворы белка готовили на 5 mM Na-фосфатном буфере, pH 7.4; концентрация исследуемых растворов БСА составляла 5 мг/мл. Концентрацию белка в растворе контролировали спектрофотометрически на УФ-спектофотометре Unicam 8000 (Великобритания), принимая $A_{0.1}^{280} = 0.54$ [4]. Однократное замораживание осуществлялось путем быстрого погружения образца в жидкий азот. Нагрев образца проводили на водяной бане до температуры 298 K. Цикли-



Термограммы денатурации БСА для нативного белка (1), однократно замороженного (2), после 170 циклов охлаждения и нагрева в диапазоне температур 77–173 K (3)

рование, т.е. периодическое понижение и повышение температуры образца, находящегося в твердой фазе, проводили в диапазоне температур 77–173 К. Для калориметрических измерений использовался прецизионный дифференциальный адиабатический сканирующий калориметр DASM-4 (СКББП, г. Пущино, Россия). Термограммы снимали при нагреве со скоростью 1 град/мин и избыточном давлении 2,5 атм.

Результаты исследований приведены на рисунке, где 1 – термограмма для нативного белка, 2 – однократно замороженного, 3 – после температурного циклирования. Калориметрическая кривая 1 для нативного белка по своей форме и значению температурного диапазона тепловой денатурации БСА совпадает с данными, приведенными в работах [2, 3]. Согласно результатам работ [2, 5] сложная растянутая по температуре структура термограмм денатурации БСА свидетельствует о малой компактности белка как целого. Максимумы на термограммах отражают разрушение отдельных компактных участков структуры — доменов. Как видно из рисунка, после однократного охлаждения-нагрева уменьшается интенсивность эффекта при 331 К и увеличивается интенсивность эффекта при 350 К.

Значения энтальпии и температурных максимумов денатурации доменов БСА

БСА, 5 мг/мл	T, К	T, К	ΔH , Дж/г
Без замораживания	331,0	350,0	6,61
После 1 замораживания	331,0	351,5	5,22
После 170 циклов	333,0	353,8	4,10

Температурное циклирование в количестве 170 циклов приводит к еще более выраженному уменьшению площади пика при температуре 331 К и увеличению площади пика при температуре 350 К. Одновременно наблюдается смещение пиков по температуре (табл.). Отсюда следует, что охлаждение-нагрев и тем более темпера-

турное циклирование в твердофазной матрице приводят к изменениям структурной организации молекул БСА, которые состоят в том, что относительное количество термостабильных доменов возрастает.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. — Киев: Наук. думка, 430 с.
2. Казыцина С.Ю., Сочава И.В. Проявление структурных переходов бычьего сывороточного альбумина в сканирующей калориметрии // Биофизика, 1990. — 35, № 2. — С. 212–215.
3. Степура И.И., Лапина Е.А., Чайковская Н.А. Исследование тепловой денатурации сывороточного альбумина человека в водно-спиртовых и водно-солевых растворах в присутствии органических лигандов // Молекулярная биология. — 1991. — 25, № 2. — С. 337–347.
4. Окулов В.И. Применение спектрофотометрии в ультрафиолете для исследования белков // Усп. биол. химии. — 1971. — 12. — С. 28–61.
5. Тиктопуло Е.И., Привалов П.Л., Борисенко С.Н., Троицкий Г.В. Микрокалориметрическое исследование доменной организации сывороточного альбумина // Молекулярная биология. — 1985. — 19, № 4. — С. 1072–1078.
6. Privalov P.L., Khenachishvili N.N. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure // J. Mol. Biol. — 1974. — 86. — P. 665–684.

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

Поступило 19.11.96

УДК 57.043:591.463.1:597.5

Б.Б.Дзюба

АКТИВАЦИЯ, РЕАКТИВАЦИЯ И ОПЛОДОТВОРЯЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ СПЕРМИЕВ БЕЛОГО ТОЛСТОЛОБИКА (*Hypophthalmichthys molitrix Valenciennes*) ПОСЛЕ РАЗБАВЛЕНИЯ КРИОЗАЩИТНОЙ СРЕДОЙ

Как известно, активация спермиев пресноводных рыб происходит при разбавлении гипотоничной средой, т.е. в естественных условиях, при попадании в пресную воду. Время движения спермиев видоспецифично и генетически детерминировано [4]. Применение активирующих растворов со ступенчатым понижением осмолярности позволяет восстанавливать двигательную активность спермиев после прекращения их движения. Это явление называется реактивацией [1, 5]. Механизмы реактивации спермиев изучены недостаточно. Так как процесс криоконсервации связан с обработкой спермы гипертоническими криозащитными растворами, нам представлялось целесообразным использование таких спермиев для исследования тонких механизмов активации и реактивации движения.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния активирующих сред с различной осмолярностью на подвижность, оплодотворяющую способность и объем спермиев белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix Valenciennes*).

Достижение поставленной цели было возможно при использовании следующих рыбоводных и биофизических методов: искусственное воспроизводство растительноядных рыб и спектро-

фотометрический метод изучения объема клеток. Поскольку данные, полученные путем регистрации изменения рассеяния луча света, позволяют судить о времени и интенсивности прохождения набухания, но не об изменении абсолютных значений объема клетки [2], мы обсуждали изменение расчетной величины относительной оптической плотности (разница значений экстинкции в моменты начала активации и прекращения набухания отнесенная к величине экстинкции в начале активации). Данный метод позволяет количественно охарактеризовать процесс изменения объема спермиев. Для удобства дальнейшего анализа нами использовалась временная расчетная характеристика изменения объема клеток – период полубухания (время достижения экстинкции, равной половине разницы между значениями в начале и конце процесса набухания).

Использованная в работе криозащитная солевая среда содержала 2М ДМСО [3]. Оплодотворение нативной и разбавленной криозащитной средой проводилось следующим образом: сперма активировалась испытываемым раствором и через 2 мин (когда движение спермиев прекращалось) суспензия добавлялась к икре (соотношение сперма:икра составляло 1:200), тщательно перемешивалась и активировалась дистиллированной водой. Через 10 ч развития (на стадии поздней гаструлы) подсчитывался процент оплодотворения.

В результате проведенных исследований установлено, что показатель относительного изменения оптической плотности в зависимости от осмолярности среды активации изменяется от $0,05 \pm 0,004$ при 260 мОсм до $0,45 \pm 0,1$ при 100 мОсм. Реактивация в нативных и разбавленных криозащитной средой образцах спермы наступала при использовании в качестве активатора растворов осмолярностью не менее 150 мОсм. Эти факты, указывают на то, что реактивация возможна лишь в тех случаях, когда уровень набухания клеток в период активации не превышает определенной величины. Разбавление криозащитной средой приводило к изменению показателя относительного изменения оптической плотности при активации движения средой 150 мОсм от $0,47 \pm 0,04$ в нативной до $0,35 \pm 0,04$ в разбавленной криозащитной средой сперме, а также к снижению времени полубухания от 18 ± 3 до 9 ± 1 с. Для изучения физиологических характеристик реактивированных спермиев была рассмотрена оплодотворяющая способность нативных и разбавленных криозащитной средой спермиев толстолобика. Оплодотворяющая способность реактивированных спермиев как нативных, так и разбавленных криозащитной средой снижалась прямо пропорционально осмолярности активатора и обратно пропорционально величине относительной оптической плотности в период активации движения. Следует отметить, что при использовании нативной и разбавленной криозащитной средой спермы при осеменении оплодотворение не наступало в случае использования активатора осмолярностью ниже 100 мОсм.

Данные результаты позволяют предположить, что способность спермиев к реактивации и оплодотворяющая способность реактивированной спермы белого толстолобика зависят от степени набухания клеток в период активации. Увеличение оплодотворяющей способности реактивированной спермы происходит при увеличении осмолярности среды активации. Разбавление криозащитной средой приводит к изменениям объемных характеристик спермиев толстолобика в период движения. Условия, при которых возможна реактивация нативной и разбавленной криозащитной средой спермы, не отличаются.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гинзбург А.С. Оплодотворение у рыб и проблемы полиспермии. – М: Наука, 357 с.
2. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф. Экспериментальное изучение кинетики гипотонического и кислотного гемолиза эритроцитов человека методом малоуглового рассеяния // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 1. – С. 32–38.
3. Бибенко О.В., Конейка Е.Ф. Влияние криоконсервации спермы карпа *Cyprinus carpio* на эмбриогенез // Криоконсервирование репродуктивных клеток и эмбрионов. – Харьков: Ин-т проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 1992. – С. 3–8.
4. Billard R. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of Various Salinities // Aquaculture. – 1978. – № 14. – P. 187–198.
5. Gallis J.L., Fedrigo E., Jatteau P. et al. Siberian sturgeon, *acipenser baeri*, spermatozoa: effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility // P. Williot, Ed. *Acipenser*, Cemagref Publ., 1991. – P. 143–149.

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

Поступило 11.03.97

УДК 611.453:57.085+616.453

Е.И. Легач

СИНТЕЗ КОРТИЗОЛА ТКАНЕВЫМИ И КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНЫХ ЖЕЛЕЗ НОВОРОЖДЕННЫХ И ПОЛОВОЗРЕЛЫХ СВИНЕЙ

Многочисленные препараты кортикостероидов, используемые при заместительной гормонотерапии эндокринной недостаточности, не всегда адекватны потребностям организма в тот или иной момент его жизнедеятельности, особенно в стрессорных ситуациях. При длительном приме-

нении синтетических кортикостероидов возникают тяжелые побочные эффекты, усугубляющие состояние больных. В связи с этим вопросы трансплантации таким больным надпочечных желез, имплантации фрагментов или культур ткани являются актуальными и перспективными [1, 2, 5, 6]. Наряду с успешно применяемыми ауто- и аллотрансплантациями надпочечных желез разработаны также методы ксеноимплантации культур надпочечных желез новорожденных и половозрелых свиней, способных синтезировать и выделять в среду глюко- и минералокортикоиды. В настоящей работе представлен анализ кортикостероидогенеза тканевых культур надпочечных желез новорожденных и половозрелых свиней, проведена их краткосрочная инкубация, установлены оптимальные для имплантации сроки культивирования.

Проведено 35 экспериментов на новорожденных и половозрелых свиньях. В стерильных условиях операционной выделяли надпочечные железы, очищали их от жирового слоя и измельчали на фрагменты размером 0,5–1 мм. Измельченную ткань помещали в пенициллиновые флаконы, в которых осуществляли 4-кратную отмывку в растворе Хенкса с добавлением антибиотиков в концентрации 500 ед/мл и 400 мкл/мл соответственно для пенициллина и стрептомицина, затем ткань надпочечников помещали в питательную среду культивирования (Среда 199 и 10% инактивированной сыворотки крови плодов коровы, пенициллин 100 ед/мл, стрептомицин 100 мкл/мл) [4]. Флаконы с культурой помещали в термостат при температуре 37,1 °С; первая замена питательной среды проводилась через 10–12 ч, а последующие — каждые сутки.

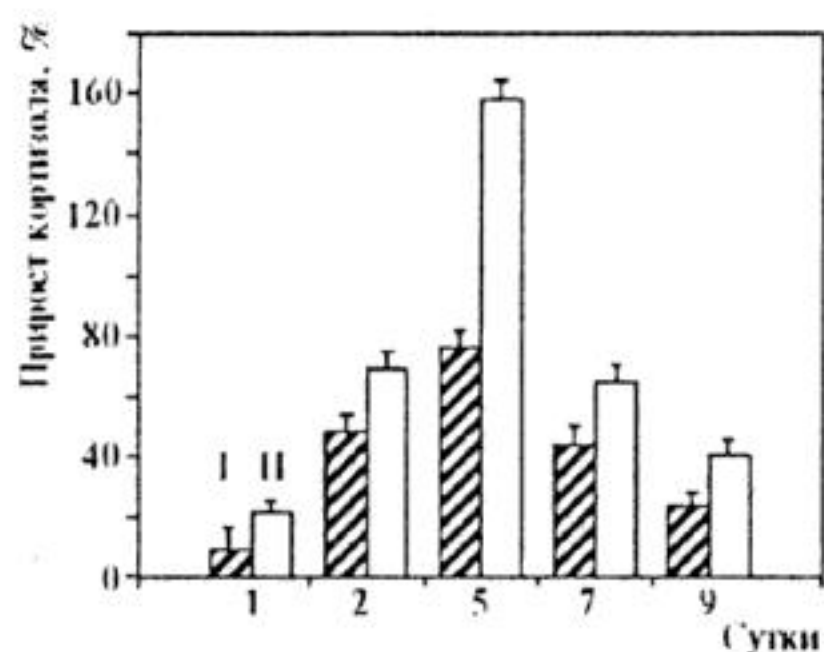


Рис. 1. Секреция кортизола клетками адreno-кортикальной ткани половозрелых свиней: I — без стимуляции, II — после добавления синактена

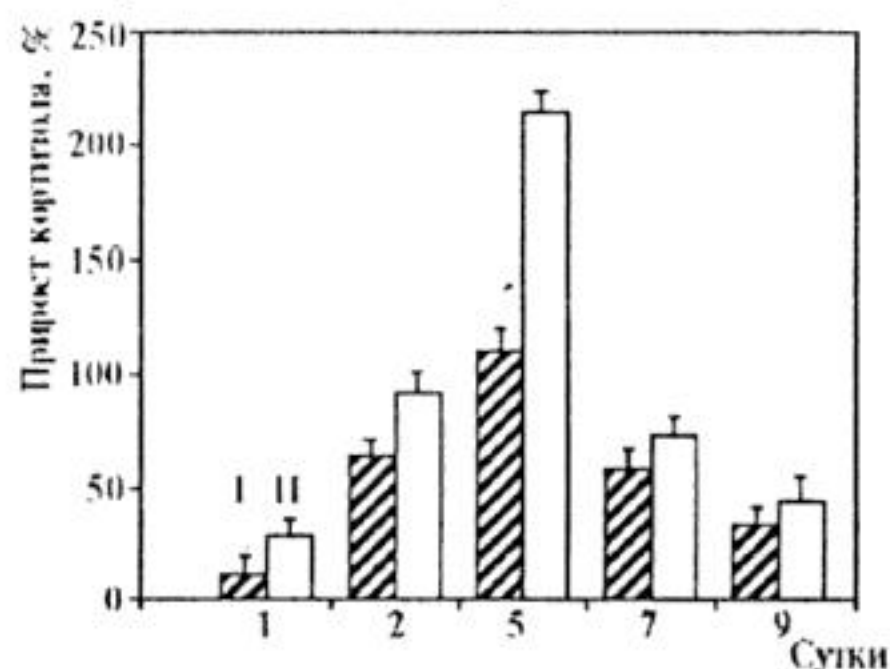


Рис. 2. Секреция кортизола клетками адreno-кортикальной ткани новорожденных поросят: I — без стимуляции, II — после добавления синактена

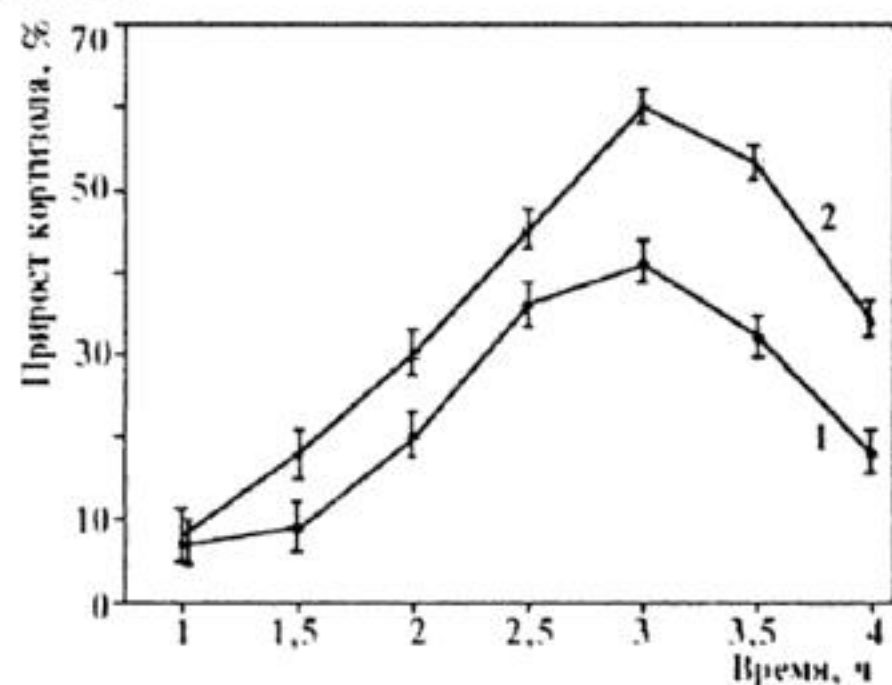


Рис. 3. Секреция кортизола клетками адreno-кортикальной ткани новорожденных поросят после краткосрочной инкубации: 1 — без стимуляции, 2 — после добавления синактена

6,4±0,7 нмоль/мл. Прирост уровня кортизола в 1-е сут был статистически недостоверен. В инкубационной среде культивирования на 5-е сут содержание кортизола составляло 23,1±2,04 нмоль/мл и было достоверно выше, чем во все другие дни эксперимента. На 7-е сут культивирования отмечено снижение уровня секреции кортизола адreno-кортикальной тканью, однако в среде с добавлением синактена содержание кортизола достоверно выше, и по сравнению с контролем составляло 14,9±1,02 нмоль/мл. Исследование временной динамики накопления кортизола после стимуляции синактеном при кратковременной инкубации биологического материала показало (рис. 3), что максимальный прирост кортизола отмечается на 3-м ч инкубации. Его уровень в 1,5 раза выше по сравнению с таковым, имевшим место в начале инкубации.

Данные, представленные на рис. 1–3 свидетельствуют в пользу того, что клетки адreno-кортикальной ткани в суспензионной культуре сохраняют свои функциональные характеристики — вырабатывают гормоны. А увеличение выброса кортизола (в 2 раза) после стимуляции синакте-

Для стимуляции секреции кортизола использовался синтетический аналог АКГГ синактен, концентрация которого в инкубационной среде составляла 0,2 ед/мл, контролем служили пробы без синактена. Инкубацию осуществляли на водяной бане с перемешивающим устройством при температуре 38 °С в течение 1, 2, 3, 4 ч. Содержание кортизола определяли флуориметрическим методом [3]. При исследовании секреции кортизола клетками адreno-кортикальной ткани новорожденных и половозрелых свиней в суспензионной культуре было установлено, что как в случае половозрелых свиней (рис. 1), так и новорожденных поросят (рис. 2) секреция кортизола после стимуляции синактеном почти в 2 раза выше, чем в культуре, где питательная среда не содержала синтетического аналога АКГГ. Содержание кортизола в инкубате ткани коры надпочечника в контрольной группе составляла

ном и рост данного процесса во времени (к 3 ч в 1,5 раза) дают основание считать, что клетки культуры сохраняют рецепторный аппарат связывания АКГГ. Полученные результаты дают основание предположить, что имплантация суспензионной культуры адренокортикальной ткани может оказывать положительный эффект при заместительной гормонотерапии, особенно в тех случаях, когда невозможна глюкокортикоидная терапия синтетическими препаратами из-за развития побочных явлений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артиневский А.А. Надпочечные железы: строение, функция, развитие. – Минск: Б.и., 1977. – С. 53–68.
2. Ким Джон Сан. Лечение некоторых форм гипокортицизма при помощи трансплантации органных культур коры надпочечников новорожденных поросят: Автореф. дис....канд. мед. наук. – Киев, 1986. – 24 с.
3. Резников А.Г. Унифицированный флюориметрический метод определения неконъюгированных 11-ОКС (гидрокортизона и кортикостерона) в плазме крови // Методы определения гормонов. – Киев: Наук. думка, 1980. – С. 255–258.
4. Турчин И.С. Изучение структуры и функции клеток эндокринных желез методом культур тканей: Автореф. дис....д-ра мед. наук. – Киев, 1975. – 30 с.
5. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь Н.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов. – Киев: Наук. думка, 1993. – С. 203–209.
6. Challis J.R.G., Mitchell B.F., Lye S.S. Activation of fetal adrenal function // S. Dev. Rhiziol. – 1987. – 6, № 1. – P. 93–105.

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

Поступило 26.03.97

УДК 611.84/88

Р.И.Кратенко

МОДУЛЯЦИЯ DL-ТРИПТОФАНОМ СЕРОТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПЕРВОГО ТИПА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ АУДИОГЕННОЙ ВОЗБУДИМОСТЬЮ

В настоящее время проблема регуляции возбудимости головного мозга является одной из важнейших в современной биологии и экспериментальной медицине. Патологически повышенная возбудимость мозга, высокая судорожная готовность, в частности, лежат в основе возникновения и развития эпилепсии, довольно частого (3–5 человек на 1000 населения [1]) и тяжело протекающего заболевания. Существует ряд теорий патогенеза судорожных состояний, однако на сегодняшний день наиболее общепризнанной считается нейромедиаторная теория. Нарушения взаимодействия между процессами возбуждения и торможения в ЦНС вследствие возникающего дисбаланса между уровнями функциональной активности различных систем нейротрансмиттеров вполне могут лежать в основе судорожных состояний [2, 3]. Результаты клинических исследований установили возможность купирования судорожных припадков у больных эпилепсией DL-триптофаном [4]. Предполагается, что терапевтический эффект DL-триптофана связан с увеличением концентрации тормозного и антиэпилептического нейромедиатора (серотонина) в головном мозге. Однако вполне возможно, что эта аминокислота оказывает положительный модуляторный эффект на центральное звено серотонинергической системы — серотониновые рецепторы [2]. Повышение сродства рецепторов к медиатору и увеличение их количества приводит к активации серотонинергических процессов мозга больного эпилепсией и купированию его судорожной готовности.

Целью работы явилось изучение модулирующего эффекта DL-триптофана на серотониновые рецепторы первого типа различных структур мозга. В качестве объектов исследований использовали самцов крыс линии Вистар 3-месячного возраста (в количестве 480), разделенных по реакции на аудиогенный раздражитель (звонок 96 дБ, 120 с) на две группы: с высокой (В) (модель эпилепсии) и низкой (Н) возбудимостью головного мозга [5]. Для экспериментов были взяты следующие области мозга: гиппокамп ventral и dorsal, миндалевидный комплекс — структуры лимбической системы, характеризующиеся низким судорожным порогом [2] и мозжечок — большинством исследователей приписываемый к тормозным отделам головного мозга [1]. Радиорецепторный анализ проводился на фракции грубого синтантосом [6] регионов мозга крыс. Кривую насыщения для серотониновых рецепторов первого типа строили по возрастающей концентрации ^3H -серотонина от 2 до 40 нМ. Параметры связывания меченого лиганда — максимальное число мест связывания ($B_{\text{макс}}$) и константу диссоциации комплекса “лиганд-рецептор” (K_d) определяли по графику Скоттгарда. Уровень специфического связывания составил 50% от общего, концентрация DL-триптофана — 1 мкМ/л.

Достоверное повышение аффинности рецепторов к ^3H -серотонину (снижение K_d) наблюдалось: у низковозбудимых крыс — в мозжечке на 20%, в гиппокампе ventral на 33%, в

гиппокампе дорсальном на 178%, в миндалине на 433%; у высоковозбудимых крыс — в гиппокампе дорсальном 81%, в миндалине на 28%. Достоверное повышение количества связывающих мест ^3H -серотонина наблюдалось: у низковозбудимых крыс — в мозжечке на 80%, в гиппокампе дорсальном на 39%, в миндалине на 100%; у высоковозбудимых крыс — в мозжечке на 61%, в гиппокампе вентральном на 105%, в гиппокампе дорсальном на 69%.

Исходя из вышесказанного можно сделать вывод, что DL-триптофан является модулятором для серотониновых рецепторов первого типа, однако модулирующий метаффиноидный эффект DL-триптофана (повышение аффинности рецепторов под действием модулятора) лучше выражен в структурах мозга низковозбудимых крыс, тогда как модулирующий неконкурентный эффект (повышение количества связывающих мест лиганда) у животных обеих групп примерно одинаков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захария Е.А. Предрасположенность организма к эпилептическим припадкам. — Киев: Здоров'я, 1974. — 200 с.
2. Сергиенко Н.Г., Гриценко В.И., Логинова Г.А. Биогенные моноамины и возбудимость головного мозга. — Киев: Наук. думка, 1992. — 148 с.
3. Сергиенко Н.Г., Мясоедов В.В., Гонкалов В.Г. Моноаминергические системы: медиаторно-рецепторные взаимодействия в генезе потенциальной судорожной готовности // Биологически активные вещества и возбудимость головного мозга. — Харьков. — 1993. — С. 3–7.
4. Сергиенко Е.И. Опыт лечения больных эпилепсией путем коррекции метаболизма триптофана // Биологически активные вещества и регуляция функций мозга. — Харьков. — 1992. — С. 85–87.
5. Крушинский Л.В. Формирование поведения животных в норме и патологии. — М.: Изд-во МГУ, 1960. — 162 с.
6. Гонкалов В.Г. Серотониновые рецепторы первого типа у крыс с различным уровнем аудиогенной возбудимости головного мозга // Биологически активные вещества и регуляция функций мозга. — Харьков. — 1990. — С. 46–48.

Харьковский гос. мед. ун-т

Поступило 25.06.97

УДК 57.043

В.А.Ильченко

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ БОЛЬНЫХ С ПОСЛЕРОДОВОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

Для лечения больных с послеродовой инфекцией применяли препарат криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека (ККЭПЧ) и определяли его эффективность на основании данных иммунологических изменений в организме. Были исследованы 2 группы больных. Лечение 1-й группы (30 женщин) проводилось по традиционной схеме консервативными методами с использованием гемотрансфузий, 2-й группы (40 женщин) — с использованием метода интравенозного введения ККЭПЧ без применения гемотрансфузий. Для приготовления препарата применялась эмбриональная печень 7–12 недель гестации, полученная при операции “искусственный аборт” в учреждении акушерско-гинекологического профиля. Препарат готовили по разработанной в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков) методике В.И.Гриценко, Г.С.Лобынцевой, И.А.Вотяковой. Препарат хранился в криобанке в криоконтейнерах по 1–2 мл при -196°C и по мере необходимости доставлялся в клинику в сосуде Дьюара. Перед употреблением препарат опускали на водяную баню с температурой 40°C ; вводили внутривенно медленно. С целью профилактики анафилактического шока за 10–30 мин до введения препарата рекомендовано введение 2 мл 1%-го раствора димедрола, 30 мг преднизолона. Препарат вводился на фоне комплексной общепринятой терапии однократно. Для оценки иммунного статуса применялся комплекс методик, разработанный в НИИ иммунологии им. Мечникова (г. Харьков).

До лечения Т-система иммунитета больных 1-й группы характеризовалась снижением суммарных Т-лимфоцитов ($1,43 \pm 0,19$), Т-хелперов (24,4), повышенным содержанием Т-супрессоров (16,5). Индекс соотношения Т-хелперов к Т-супрессорам равнялся $1,5 \pm 0,16$. Бласттрансформирующая способность лимфоцитов на ФГА определялась сниженной ($34,1 \pm 5,9$). Показатели В-системы находились в пределах нормы. После проведенного лечения у больных 1-й группы повысилось до нормы содержание общих Т-клеток ($59,5$ $p > 0,01$), Т-хелперов ($29,5$ $p > 0,01$), снизилось содержание Т-супрессоров (15,1), нормализовался иммунорегуляторный индекс ($2,0 \pm 0,1$ $p > 0,1$). Имелась статистически недостоверная тенденция к повышению бласттрансформирующей способности лимфоцитов на ФГА ($46 \pm 4,6$ $p > 0,05$) и IgM ($1,8 \pm 0,4$ $p > 0,1$). Остальные показатели В-системы иммунитета практически не изменились, находясь в пределах физиологической нормы.

Иммунологический статус у больных 2-й группы до лечения характеризовался более выраженным, чем в 1-й контрольной группе, угнетением клеточного звена иммунитета: определялось снижение содержания суммарных Т-лимфоцитов до $1,3 \pm 0,2$, Т-хелперов до $26,7$ $p < 0,05$, иммунорегуляторного индекса ($1,6 \pm 0,16$ $p < 0,1$), бласттрансформирующей способности лимфоцитов на ФГА ($15,3 \pm 2,1$ $p < 0,05$). Повышение Т-супрессоров $16,4$ $p < 0,01$. Показатели В-системы организма находились в пределах нормы.

В процессе комплексного лечения с применением ККЭПЧ выздоровление больных наступало быстрее (на $15,1 \pm 1,6$ сут), а улучшение общего состояния уже на $3,1 \pm 0,2$ сут, в 1-й группе больных выздоровление – на $20,2 \pm 2,6$ сут, а улучшение состояния – на $10 \pm 2,82$ сут.

Необходимо отметить, что несмотря на более выраженное нарушение иммунологического статуса, у родильниц 2-й группы значительно улучшились иммунологические показатели и изменения были статистически достоверными. Отмечалась нормализация показателей Т-системы: Т-лимфоциты ($2,2 \pm 0,2$), Т-хелперы ($38,8$ $p < 0,05$), Т-супрессоры ($14,6$ $p < 0,05$), иммунорегуляторный индекс ($2,7 \pm 0,3$ $p < 0,05$); значительно повысилась бласттрансформирующая способность лимфоцитов на ФГА ($48,4 \pm 0,3$ $p < 0,05$). Показатели В-системы существенно не изменились и оставались в пределах физиологической нормы за исключением повышения содержания ЦИК ($3,73 \pm 0,4$ $p < 0,05$).

Таким образом, несмотря на более тяжелое течение инфекционного процесса у больных 2-й группы, выраженное угнетение клеточного звена иммунитета, комплексная терапия с применением ККЭПЧ в более короткий срок приводит к улучшению общего состояния родильниц, восстановлению клеточного и гуморального звена иммунитета. Стимуляция защитных сил организма достаточно эффективна, что снижает риск возникновения осложнений.

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

Поступило 09.09.96

УДК 57.043

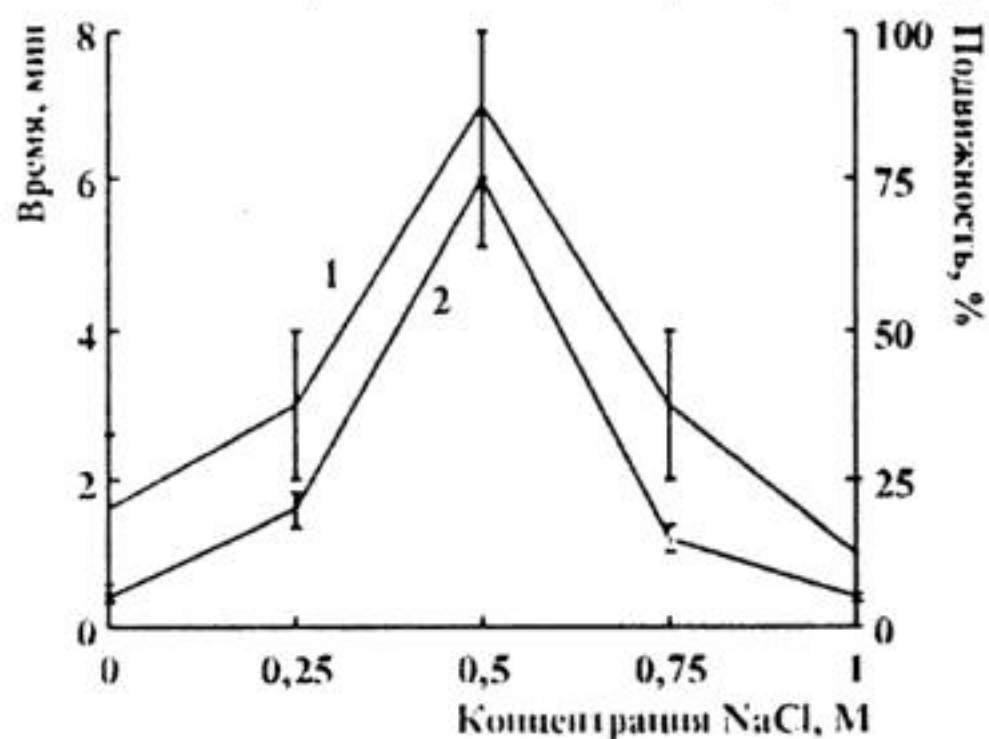
Б.Б.Дзюба, С.И.Дрокин, Е.Ф.Копейка

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ПЕЛИНГАСА (*Mugil soina*)

Спермии морских видов рыб активируются, как правило, в достаточно широком диапазоне осмотической внешней среды [1, 4]. Однако границы этого диапазона могут различаться [2]. Учитывая, что одним из повреждающих факторов замораживания-отогрева клеток является значительное изменение осмотического давления внеклеточной среды и цитоплазмы, представляется интересным изучение криорезистентности спермиев пелингаса — эвригалинного тихоокеанского вида кефалей, акклиматизированного вначале в Азовском море, а в настоящее время культивируемого в пресных водоемах Украины.

В данной работе определено, что основная часть спермиев пелингаса активируется в средах, в которых концентрация NaCl составляет 0—1 М (единичные подвижные клетки наблюдаются при активации даже 2 М NaCl), при этом optimum времени движения и процента прямолинейно движущихся клеток находится в области 0,5М NaCl (рис.). Необходимо отметить, что такой широкий диапазон осмотической активности для спермиев рыб является не типичным ни для соленоводных, ни для пресноводных видов [5]. Учитывая, что осмотическая криозащитная среда только в случае использования высоких концентраций криопротектора может находиться выше уровня, при котором возможна активация движения спермиев изучаемого вида, мы были вынуждены исследовать возможность криоконсервации движущихся спермиев пелингаса.

Для определения оптимальных условий криоконсервации были рассмотрены различные криозащитные среды, замораживание в которых проводили по 3-этапной программе [3] после предварительной инкубации разбавленной спермы на льду (вариант 1), а так же для сведения к минимуму времени движения спермиев до замораживания нами была предпринята попытка охлаждать сперму без предварительной инкубации (вариант 2). Для этого 1,5-мл ампулы с разбавленной спермой помещали на медный штатив, находящийся в парах жидкого азота при температуре -70°C . Через 10 мин штатив с ампулами погружали в жидкий азот. При таком режиме наблюдался экспоненциальный рост скорости охлаждения от 2 до $30^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Отогревали сперму в



Влияние различных концентраций NaCl на время движения и подвижность спермиев пелингаса: 1 — время движения, 2 — подвижность

водяной бане при 40 °С в течение 1 мин. Результаты отогрева спермы приведены в таблице. При 2-м варианте охлаждения было исследовано 3 среды (3М глюкоза; среда Конейки, 1986; спермальная плазма), содержащие 8% ДМСО.

Подвижность деконсервированных спермиев нелингаса, замороженных с использованием различных вариантов криоконсервации

Состав среды	ДМСО, %	Варианты криоконсервации	
		1	2
Сахароза 0,6 М	8	7,5±2,5	
	12	4,8±1,8	
	16	4,0±1,0	
Морская вода	12	6,3±2,2	
	16	0,5	
Глюкоза 0,3 М	8	38±8	72±9
	12	28±6	
	16	30±10	
Спермальная плазма	8	35±5	75±5
	12	40±10	
	16	30±10	
Среда Конейки, 1986	8	30±10	65±8

Как свидетельствуют представленные данные, более высокая сохранность клеток после отогрева наблюдается в тех условиях криоконсервации, когда образцы не преинкубировались с криозащитной средой, и время охлаждения было сведено к минимуму. Возможно, низкие результаты криоконсервации с использованием 3-этапной программы замораживания связаны с тем, что при инкубации и медленном охлаждении спермии нелингаса ис-

черпывают метаболические возможности движения, в то время как испытанная нами методика достаточно быстрого охлаждения позволяла избежать такого рода "расходования".

Для выяснения степени криорезистентности спермиев нелингаса нами был испытан наиболее простой вариант заморозки. Сперму разбавляли в 1М NaCl, содержащем 16% ДМСО, разливали в 1,5 мл полистиленовые ампулы и быстро погружали в жидкий азот. После отогрева этих образцов в сперме наблюдали прямолнейное движение 10–15% клеток в течение 1,5–2 мин. Таким образом в нашей работе показано: 1) достаточно высокая криорезистентность спермиев нелингаса; 2) возможность успешного криоконсервирования подвижных спермиев рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хлебович В.В. Критическая соленость биологических процессов. – Ленинград: Наука, 1974. – 236 с.
2. Баранов В.С., Божкова В.Н., Гравеский Э.Я. и др. Внешняя среда и развивающийся организм. VII.3. Соленостная резистентность гамет. М.: Наука, 1977. – 384 с.
3. Конейка Е.Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа // М.: Изд-во ВНИИРХ. – 1986. – С. 9.
4. Goodall J.A., Blackshaw A.W., Capra M.F. Factors affecting the activation and duration of motility of the spermatozoa of the summer whiting // Aquaculture. – 1989. – 77. – P. 243–250.
5. Perchee G., Chauvaud L., Suquet M. et al. Evolution des caracteristiques du mouvement et de la teneur en ATP au cours de la periode de mobilite des spermatozoides de carpe et de turbot, poissons teleostiens // C.R. Acad. Agric. Fr. – 1993. – 79. – P. 117–126.

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

Поступило 17.07.97

УДК 57.043

И.А.Палагина

ВЛИЯНИЕ ДИСПЕРСНЫХ АЗОКРАСИТЕЛЕЙ НА БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Дисперсные азокрасители (ДАК) на основе п-аминоазобензола — это новый класс органических красителей, широко применяемых для крашения полиэфирных волокон. С ДАК контактируют значительные контингенты работающих в условиях их промышленного синтеза и применения, что создает реальную угрозу развития профессиональных заболеваний. В экспериментальных исследованиях на животных установлено, что характерной особенностью красителей этого класса является способность вызывать такие отдаленные эффекты, как генотоксический, а отдельных из них — канцерогенный [3, 5, 6]. Однако молекулярные механизмы специфических проявлений биологического действия аминоазобензолов недостаточно изучены. В рамках разработки этой проблемы в настоящей работе изучено влияние ДАК на функциональное состояние генетического аппарата путем исследования особенностей биосинтеза и содержания ДНК и РНК в печени, костном мозге и семенниках крыс.

Объекты изучения — 5 марок ДАК (производные 4-нитро-4'-аминоазобензола): дисперсные Оранжевый 2К (ДО-2К), Красно-коричневый Ж (ДКК-Ж), Темно-синий 3 (ДТС-3), Рубиновый (ДР) и Красный 2С (ДК-2С). Биосинтез и количественное содержание ДНК и РНК иссле-

довались в клетках печени, костного мозга и семенников нелинейных крыс-самцов в условиях острого (однократное введение *per os* всех ДАК в дозе 5 г/кг, ДКК-Ж — 1,6 г/кг (1/2 DL₅₀)), а для ДКК-Ж и хронического (2,5 и 4 мес; 25,4 и 5,3 мг/м³) экспериментов *in vivo*. Для изучения синтеза ДНК и РНК животным за 2 ч до забоя внутрибрюшинно вводили ³H-тимидин (2 МБк/100 г массы) и ³H-уридин (1 МБк/100 г массы). Животных умерщвляли деканитацией спустя 6, 24 и 48 ч после острого и через 24 ч после хронического воздействия. Синтез ДНК и РНК определяли по уровню удельной радиоактивности, измеренной жидкостно-сцинтилляционным методом с помощью счетчика Бета-1 [1], концентрацию — по методу Д. Шмидта и С. Таннгаузера в модификации М.Г.Трудовой [2].

Установлено, что в условиях острого опыта для азокрасителей ДР, ДТС-3 и ДКК-Ж характерно двухфазное действие на биосинтез ДНК ядер клеток печени: через 6–24 ч после воздействия — ингибирование включения ³H-тимидина в ДНК на 52–58, 34–55, 38–42% с максимумом эффекта спустя 24 ч, сменяющееся в дальнейшем (через 48 ч) стимуляцией этого процесса на 132, 141 и 58% соответственно. Азокрасители ДК-2С и ДО-2К в аналогичных условиях опыта вызывали лишь индукцию биосинтеза ДНК в клетках печени (в 2 и 3 раза соответственно спустя 48 ч), минуя стадию ингибирования. С учетом этих критериев ДР и ДТС-3 обладают сильной, ДКК-Ж — умеренной степенью, а ДК-2С и ДО-2К слабо выраженной генотоксичностью.

Изученные ДАК также вызвали изменения содержания ДНК в ткани печени крыс. Спустя 24 ч после острого воздействия ДР, ДТС-3 и ДКК-Ж отмечалось повышение содержания ДНК 58, 47 и 60%, а через 48 ч после введения этих красителей, а также ДК-2С — резкое снижение концентрации ДНК (на 82, 71, 75 и 74% соответственно). При воздействии ДО-2К отмечено снижение в 2 раза концентрации ДНК в печени крыс через 24 ч и ее повышение в 2 раза через 48 ч.

Торможение биосинтеза ядерной ДНК с последующей стимуляцией этого процесса является следствием ковалентного связывания высокореактивных метаболитов азокрасителей с нуклеофильными сайтами ДНК и изменения ее структурно-функционального состояния, что характерно для ряда генотоксических / канцерогенных азосоединений, близких по химической структуре к изученным ДАК [4].

Другим важным органом-мишенью повреждающего действия ДАК на уровне клеточного генома являются семенники крыс, в клетках которых выявлено блокирование биосинтеза ДНК при остром воздействии ДР и ДКК-Ж (торможение включения ³H-тимидина в ДНК через 6–24 ч максимально на 36 и 29% соответственно). Повреждение ДНК гонад может привести к появлению генетически неполноценных сперматозоидов, несущих измененную генетическую информацию, и развитию наследственно обусловленной патологии. Следовательно, ДАК могут представлять генетическую опасность для потомства. Клетки костного мозга в такой постановке опыта оказались нечувствительными к воздействию ДАК. Существенных нарушений обмена РНК при остром воздействии ДАК не выявлено.

Способность азокрасителя ДКК-Ж оказывать влияние на генетический аппарат клеток на молекулярном уровне подтверждена в условиях хронического ингаляционного воздействия концентраций 25,4 и 5,3 мг/м³, на уровне которых выявлена выраженная дозозависимая индукция процесса включения ³H-тимидина в ДНК на 102–51 и 64–26% и ³H-уридина в РНК на 54–26 и 39–17% спустя 2,5 и 4 мес соответственно. На уровне концентрации 25,4 мг/м³ отмечено увеличение содержания ДНК (на 51%) и снижение содержания РНК (на 18%) в ткани печени крыс после 4 мес воздействия ДКК-Ж.

Таким образом, изученные ДАК проявляют активность в отношении генетического аппарата на молекулярном уровне, вызывая специфические изменения уровня биосинтеза ДНК (ингибирование / и (или) стимуляция), реже РНК (стимуляция) и изменения их содержания в клетках органов-мишеней (печени и семенников) крыс. Учет этих критериев может служить эффективным индикатором для выявления генотоксических соединений класса ДАК и близких к ним по структуре азосоединений, обладающих мутагенной и канцерогенной активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Остерман С.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммунофорезом и радиоизотопным методом. — М.: Наука, 1983. — 304 с.
2. Трудовой М.Г. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных // Современные методы биохимии / Под ред. М.Г. Трудовой. — М.: Медицина, 1977. — С. 313–316.
3. Chung K., Cerniglia C. Mutagenicity of azodyes: structure — activity relationships // Mutat. Res. Rev. Genet. Toxicol. — 1992. — 277, № 3. — P. 201–220.
4. Dipple A. DNA adducts of chemical carcinogens // Carcinogenesis. — 1995. — 16, № 3. — P. 437–441.
5. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 57: Occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants; some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines // IARC. — Lyon: who Int. Agency Res. Cancer., 1993. — 427 p.
6. Shubik P. Chemical carcinogens and human cancer // Cancer Lett. — 1995. — 93, № 11. — P. 3–7.

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ ЖУРНАЛА “ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ”

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

Журнал издается методом компьютерного набора. Для ускорения редакционной обработки и выхода в свет авторы могут присылать статьи, кроме напечатанного на бумаге варианта, также в виде файлов на дискетах. Текст статьи необходимо набирать с помощью программ редактирования текста, поддерживающих альтернативную кодировку (например ЛЕКСИКОН, MultiEdit, Microsoft Word) и не использовать программы типа ChiWriter. Рисунки должны быть выполнены в графическом редакторе типа Paintbrush, Paintshow и иметь расширение .pic, .pct, .pcx, .tif, .img, .gem, .cgm, .eps, .sld, .hpg, .wmf, .pnt.

В случае машинописного варианта статья печатается на машинке черной лентой через 2 интервала на белой бумаге форматом (210x297 мм). На странице не более 30 строк, в строке не более 60–62 знаков. Абзацный отступ равен 5 знакам. Левое поле страницы – не менее 25, правое – 10, верхнее – 20 мм.

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

В тексте обязательна расшифровка аббревиатур-терминов; ссылки на номера статей по списку литературы даются в квадратных скобках.

Таблицы печатают на отдельных страницах, помещают в рукописи вслед за страницей, содержащей первую ссылку на эту таблицу. Слово “Таблица” с указанием ее порядкового номера печатается в одну строку с ее названием. Примечания к таблице даются непосредственно под ней. Листы с таблицами включают в общую нумерацию страниц рукописи. На полях проставляют номера таблиц и рисунков против тех мест текста, где они должны быть заверстаны. Формулы и буквенные обозначения должны быть выполнены четко, крупно; индексы и показатели степени печатаются или вписываются ниже или выше строки. Прописные и строчные буквы в формулах, одинаковые по начертанию и отличающиеся только размером, подчеркиваются: прописные буквы – двумя черточками снизу, строчные – двумя черточками сверху. Следует особенно четко вписывать сходные по написанию буквы: *e* и *l*, *I* и *J*, *h* и *n*. Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые буквы, а также нуль, *sin*, *cos*, *exp* и т.д. размечаются на прямое начертание знаком $\square$. Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках). Разметка формул производится синей или фиолетовой пастой, греческие буквы подчеркиваются или обводятся красным карандашом, готические – синим. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) вписываются на поле (один раз с указанием их значения).

Рисунки в количестве не более 5 выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге (или в виде фотографий) размером не более 100x200 мм. На них наносятся только необходимые условные обозначения. Расшифровка их дается в подписи к рисунку или в тексте. На обороте рисунка указывается его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и журнала. Иллюстрации должны быть четкими, чтобы их можно было внести в память системы с помощью сканера.

Список литературы составляется в алфавитном порядке. В списке необходимо привести следующие сведения: фамилия и инициалы автора в оригинальной транскрипции, название статьи, журнала или книги и далее: для периодических изданий – год издания, том, номер, номера страниц; для монографий – место издания, название издательства, год издания, общее количество страниц.

Названия периодических изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНИТИ.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

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

Реферат к статье подается на русском и английском языках (авторы из Украины представляют также реферат на украинском языке) объемом до 0,3 стр.

Материалы направлять по адресу: 310015, Харьков-15, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, редакция журнала “Проблемы криобиологии”.

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

3 1997

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

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

Our Journal PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY is published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences in Russian and in English. The journal provides basic information to researchers investigating the various phenomena involved in the interaction between low temperatures and living cells or tissue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are 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

ИНДЕКС 70474

ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1997. N 3. 1-69