

1

ISSN 0233-7673

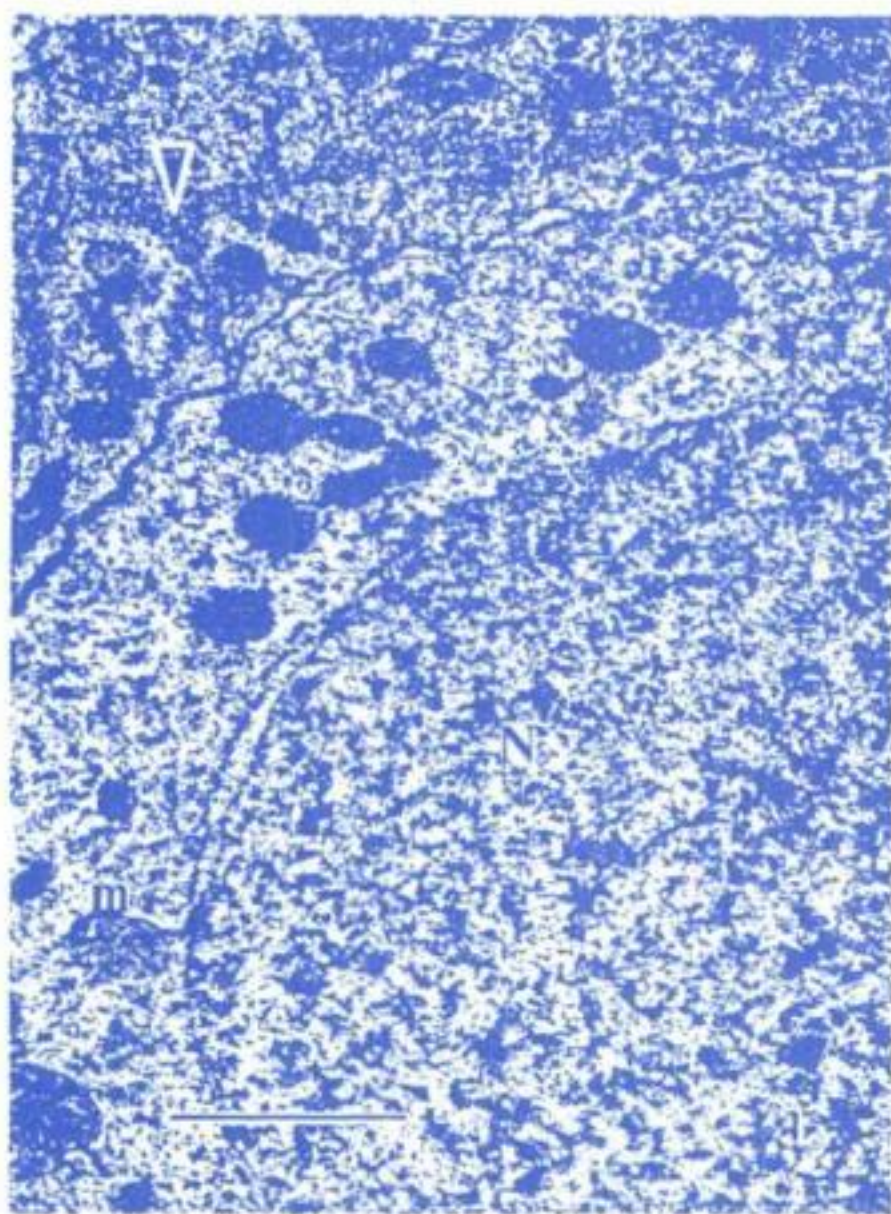
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1996

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



COMPARATIVE ULTRASTRUCTURE OF BRAIN, MUSCLE, AND MALPHIGIAN TUBULE FROM THE FREEZE-TOLERANT *EUROSTA SOLIDAGINIS* (FITCH) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) LARVAE AFTER CHEMICAL FIXATION AND HIGH PRESSURE FREEZING
S.D.Collins, A.L.Allenspach, R.E.Lee

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ТКАНИ ЯЙЦЕВОДА ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ ПРЯМОГО ПОГРУЖЕНИЯ В ЖИДКИЙ АЗОТ
В.И.Грищенко, Е.Ф.Исаченко, Ф.И.Осташко, В.В.Исаченко, К.Н.Хромушкин, М.И.Крамар, А.Г.Геродес, П.Т.Тодоров

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

1996

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Collins S.D., Allenspach A.L., Lee R.E.* Comparative ultrastructure of brain, muscle and malpighian tubule from the freeze-tolerant *Eurosta solidaginis* (Fitch) (Diptera: Tephritidae) larvae after chemical fixation and high pressure freezing 3
- Белоус А.М., Загнойко В.И., Гулевский А.К.* Биологическая активность и механизм действия пептидов, регулирующих процесс гибернации 12
- Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Марченко Л.Н., Алтуева Е.В.* К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 5. Гематоэнцефалический барьер как структурно-функциональное звено центральных нейротрансмиттерных механизмов терморегуляции 22
- Луговой В.И., Мазалов В.К., Чижевский В.В., Говоруха Т.П.* О механизме криозащитного действия полиэтиленоксидов при глубоком охлаждении теплокровного организма 29
- Рамазанов В.В., Бондаренко В.А.* Сравнительное исследование холодового и гипертонического шока эритроцитов в растворе NaCl 34
- Овсянников С.Е., Никитченко Ю.В., Мазалов В.К., Луговой В.И.* Перекисное окисление липидов в динамике самоотогрева после острого охлаждения организма крыс 37
- Репин Н.В., Шейкин В.И.* Водная диффузионная проницаемость мембран эритроцитов зимне-спящих сусликов *Citellus undulatus* 41

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Грищенко В.И., Исаченко Е.Ф., Осташко Ф.И., Исаченко В.В., Хромушкин К.Н., Крамар М.И., Геродес А.Г., Тодоров П.Т.* Криоконсервация эпителиальной ткани яйцевода человека путем прямого погружения в жидкий азот 46
- Шалин А.Ю., Мануильский В.Д., Власенко В.А.* Жизнеспособность семян пшеницы после криоконсервирования при ультранизких температурах в зависимости от степени их травмированности 50
- Межидов С.Х.* О роли осмотических факторов в повреждении клеток при их замораживании 54



S.D.Collins, A.L.Allenspach, R.E.Iee, Jr.

COMPARATIVE ULTRASTRUCTURE OF BRAIN, MUSCLE, AND MALPHIGIAN TUBULE FROM THE FREEZE-TOLERANT *EUROSTA SOLIDAGINIS* (FITCH) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) LARVAE AFTER CHEMICAL FIXATION AND HIGH PRESSURE FREEZING

The natural capacity of overwintering larvae of the goldenrod gall fly larvae, *Eurosta solidaginis* (Fitch) (Diptera: Tephritidae), to survive extensive internal ice formation including intracellular freezing within fat body cells has prompted numerous cryobiological investigations of this organism. The present study compares the ultrastructure of three physiologically important tissues, namely the brain, muscle, and Malpighian tubules, from the freeze-tolerant larvae using chemical fixation and cryofixation (high pressure freezing and freeze-substitution: HPF/FS). High pressure freezing gave superior results in nerve and Malpighian tissue; results were less satisfactory with muscle tissue. Nuclei of the HPF/FS prepared samples exhibited evenly dispersed chromatin and a nuclear membrane with few intermembranous dilations as «blebs». In contrast, nuclei of chemically fixed samples contained clumped chromatin and many dilations or «blebs» of the intermembranous space. Mitochondria of HPF/FS samples were turgid with smooth outer membranes, intact cristae and compact electron dense matrix; in contrast, many mitochondria in conventionally fixed samples contained ruptured membranes. Microtubules were visualized in both types of preservation; microfilaments were stabilized more effectively in microvilli of Malpighian tubule cells by cryofixation. Leaching, prevalent in chemically fixed tissues, was minimized in HPF/FS tissues. Extracellular matrices are better fixed using cryopreservation methods. These observations support the contention that HPF/FS is especially suitable for invertebrate tissues subjected to osmotic and/or other environmental stressors, infectious or immunological reactions, pathologies and general autolytic situations exist.

Larvae of the gall fly, *Eurosta solidaginis*, overwinter as a third instar within a ball gall on the stem of the goldenrod plant, *Solidago spp.* During late autumn, the larvae become freeze-tolerant (i.e. capable of surviving the freezing of 60% or more of their body water) by accumulating cryoprotectants such as glycerol, sorbitol, and trehalose [2]. The fact that this larvae survives extracellular freezing, and intracellular freezing of fat body cells [10, 16, 17] has prompted numerous investigations into the gall fly's biology [2, 9, 19]. Using HPF/FS, Morason et al. (1994) compared the ultrastructure of fat body cells from late third instar, freeze-tolerant *E. solidaginis* (containing natural cryoprotectants) to fat body cells of early third instar that are freeze-intolerant (containing little or no natural cryoprotectants). They reported that fat body cells from the freeze-tolerant larvae were better preserved than the fat body cells from the freeze-intolerant larvae. This superior cryopreservation was attributed to increased levels of natural cryoprotectants within the freeze-tolerant larvae that may reach one molal levels [15].

Traditionally, ultrastructural studies of insects use conventional chemical fixation for the investigation of insect structure-function relationships. The relatively slow rate of penetration (on the order of 1 to 2 μm per second) [11] of chemical fixatives into cells and tissues, however, leads to artifacts that limit interpretation of the data. Cryofixation techniques (high pressure freezing followed by freeze substitution) were designed to overcome the limitations of chemical fixation. The Balzers 010 High Pressure Freezing Machine enables optimal freezers in samples at high pressure (2100 bar) to depths of 500 μm [4, 13]. Criteria for optimal cryopreservation include: turgid or «plump» organelles (such as mitochondria and secretory vesicles); smooth, unbroken membranes; unextracted cytoplasm; and preservation of delicate and dynamic structures such as microtubules and water-soluble substances including extracellular products [1, 8, 12]. Optimally preserved samples also lack any noticeable reticulation (an ice-induced artifact) of nuclear or cytoplasmic matrix material even at high magnification (>30 K).

High pressure freezing has yielded promising results in both animal [1, 12] and plant [7, 8] tissue. Preservation of the cryoimmobilized tissue by freeze-substitution with osmium in acetone has proven effective in previous studies [1, 12].

A major problem faced in many investigations of invertebrate pathology and related anatomical studies is choosing a method of fixation that will accurately preserve labile ultrastructural characteristics in dynamic tissues, such as those involved in electrical transport phenomena or ones subjected to osmotic stress, and the problem of autolysis, often encountered in pathological investigations. In this study our objective was to compare the quality of fixation in different tissues using either conventional chemical methods or the more recent technique of high pressure freezing. To accomplish this we selected a diverse range of cell types that included brain, muscle, and Malpighian tubules from a naturally freeze-tolerant fly larvae so that we could compare the efficacy of these two methods of fixation in preserving the cell ultrastructure.

Collection, storage and preparation of larvae. Freeze-tolerant larvae were collected on 16 January, 1993 at the Ecological Research Center, Miami University, Oxford, Ohio. The larvae, still in their galls, were placed at -22°C freezer until needed. Prior to experimentation the larvae were removed from their galls, allowed to thaw, and were observed for signs of life (e.g. peristaltic movements and/or movement of the oral hook). The two optic lobes of the brain, the muscle which operates the oral hook, and parts of the yellow segment of the Malpighian tubules were removed and fixed according to one of the fixation protocols described below.

Chemical fixation protocol. Tissues were removed as the larvae was immersed in cold (4 °C) primary fixative of 4% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.6). Upon removal, tissues were transferred to cold primary fixative for 1.5 h. Time for tissue removal was approximately 5-10 min. Following a brief wash in 0.1 M cacodylate buffer (4 °C, pH 7.6), the tissues were post-fixed in 4 °C Millonig's osmium tetroxide solution for 1.5 h. The tissues were then rinsed in double distilled water at room temperature, dehydrated in a graded acetone series and embedded into Epon-Araldite resin.

High pressure freezing and freeze substitution (HPF/FS) protocol. Larvae were dissected in a cold (4 °C) 15% solution of dextran [12] in Grace's insect medium, neither of which has fixative properties. Tissues were removed, isolated and placed into planchettes [4] which had previously been coated with a 0.1% solution of soybean lecithin in chloroform. The planchettes were tightly packed with the sample and dissecting medium to avoid the introduction of trapped air bubbles.

Cryofixation of samples was performed using a Balzers HPM 010 high pressure freezing machine [13]. Immediately after the freezing event, this specimens (still in the planchettes) were placed in liquid nitrogen (LN2) until they were freeze substituted.

High pressure frozen samples were freeze substituted for 3 days at -78 °C in dry acetone containing 1.0% osmium tetroxide and 0.1% uranyl acetate in a customized aluminium chamber [1]. The solution was replaced daily. At the end of 3 days, the aluminium chamber was removed from the freezer and allowed to passively warm to room temperature (which required approximately 165 min) [1]. The samples were removed from the planchettes, rinsed in dry acetone for 5 min, infiltrated, and embedded in Epon-Araldite resin.

Microscopy Thin sections were prepared using a Reichert Ultracut E microtome equipped with a diamond knife. Sections were stained sequentially in uranyl acetate and lead citrate. Viewing and photography were performed on a JEOL 100S transmission electron microscope.

Cryofixed samples showed optimal freeze quality in peripheral areas of the tissues (approximately 30µm for brain tissue, for example). Cryopreservation was poor in deeper portions of the tissue.

Ultrastructural preservation of brain tissue after high pressure freezing and chemical fixation is represented in Fig. 1 and 2, respectively. The optimal cryopreservation of neural cells exhibited in Fig. 1 is commonly repeated. generally, plasma and nuclear membranes lacked the numerous undulations observed in chemically fixed tissues (Fig. 2); infrequently, however, they exhibited technique-dependent interruptions after HPF/FS (Figs. 1, 3 and 4). Septate junctions between cells (Fig. 3) were well preserved. The extracellular space, normally empty after conventional fixation, was uniformly packed with dense matrix (Fig. 1). Nuclear chromatin of HPF/FS preserved brain was uniformly dispersed (Figs. 1, 3 and 4) with no signs of the darkly stained aggregates of chromatin seen in the chemically fixed samples (Fig. 2). Granular substance was preserved in the nuclear intermembranous space of HPF/FS brain samples, but not in chemically preserved tissues. Nuclear membrane expansions or «blebs», characteristic of chemically fixed samples (Fig. 2), were not as prominent as in the HPF/FS samples.

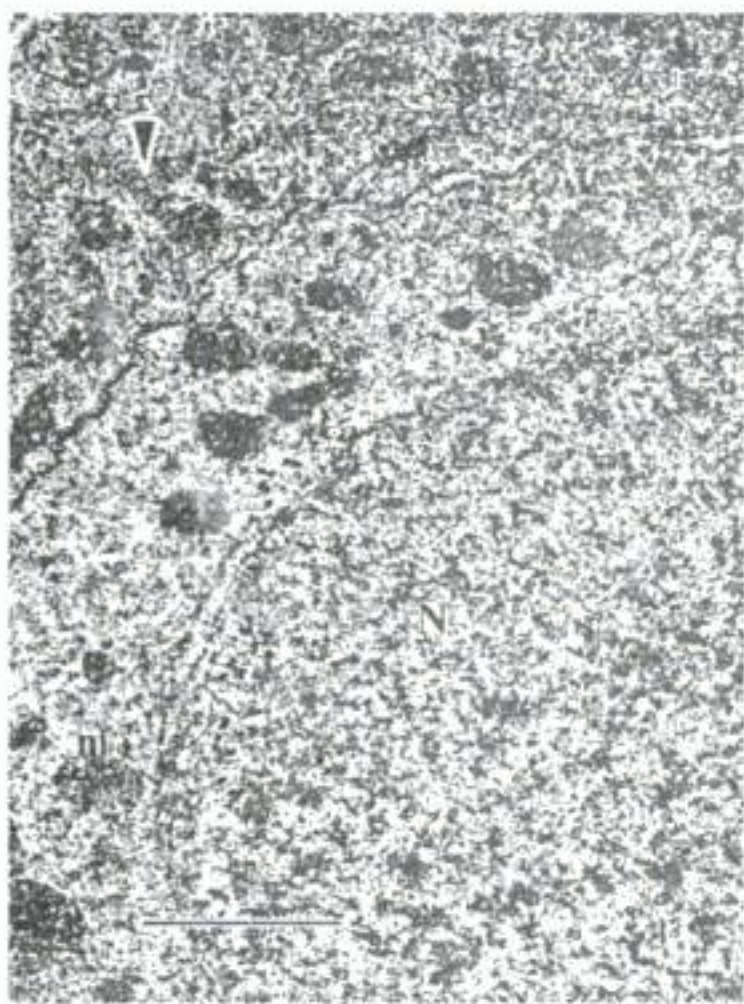


Fig. 1. Survey micrograph of portions of several brain cells, separated by extracellular matrix (arrowhead), cryofixed with the HPF/FS method. Note the evenly dispersed nuclear chromatin, and the presence of finely granular material within the nuclear intermembranous space. Cytoplasm is evenly granular and mitochondria (m) are intact with densely stained matrix material. Nucleus (N). X 18,800; bar = 1 μ m. Reduction during reproduction is 2/3

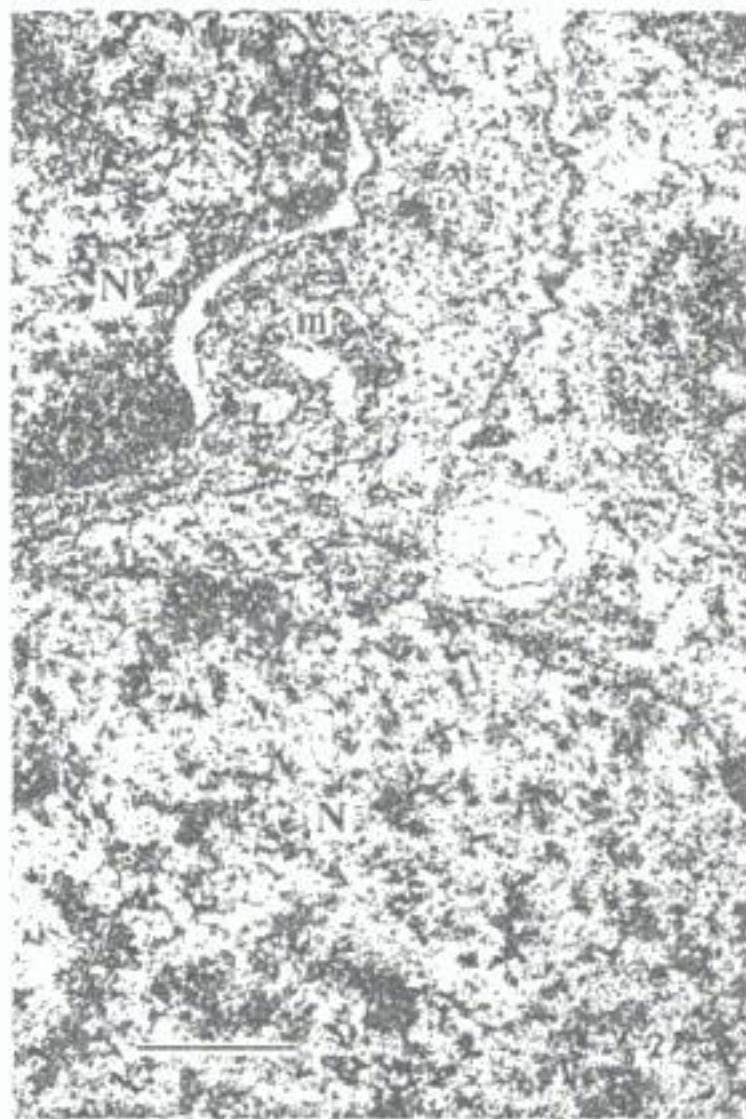


Fig. 2. Micrograph of portions of two adjoining brain cells fixed by the chemical fixation method. Note the clumping of the nuclear chromatin. The nuclear membrane contains many undulations and large expansions or «blebs». Plasma membranes and internal vesicles appear distinctly convoluted; some are surrounded by empty spaces or «halos». Mitochondria (m) lack uniform density within the matrix. Nucleus (N). X 15,000; bar = 1 μ m. Reduction during reproduction is 2/3

The cytoplasm of HPF/FS neural tissue was more densely packed with granular material as compared to chemically fixed brain. Mitochondria were moderately electron dense and characterized by intact cristae in HPF/FS samples (Figs. 1, 4). The cytoplasm was more closely apposed to all organelle membranes in the HPF/FS samples, whereas in chemically fixed samples some membranous structures shriveled and bordered by empty spaces or «halos» (Fig. 2). Microtubules were present in tissue preserved by both methods. Optimal freeze quality and preservation was evident surrounding segments of microtubules (Figs. 3, 4) and in the lamellar zone of the Golgi body (Fig. 4). Ice-induced reticulation of cytoplasmic ground substance was noticeable at depths below approximately 4 μ m in muscle and 30 μ m in brain tissue of HPF/FS samples.

Larval muscle seemed less suited to cryofixation than chemical fixation, however peripheral cytoplasm exhibited optimal freeze quality. Mitochondria were



Fig. 3. High magnification micrograph of a portion of a HPF/FS brain cell. Note the evenly dispersed nuclear chromatin. Microtubules (mt) are well preserved in the cytoplasm. Septate junctions can be seen connecting two cells (arrowheads). Nucleus (N). X 94,000; bar = 0.25 μ m. Reduction during reproduction is 2/3

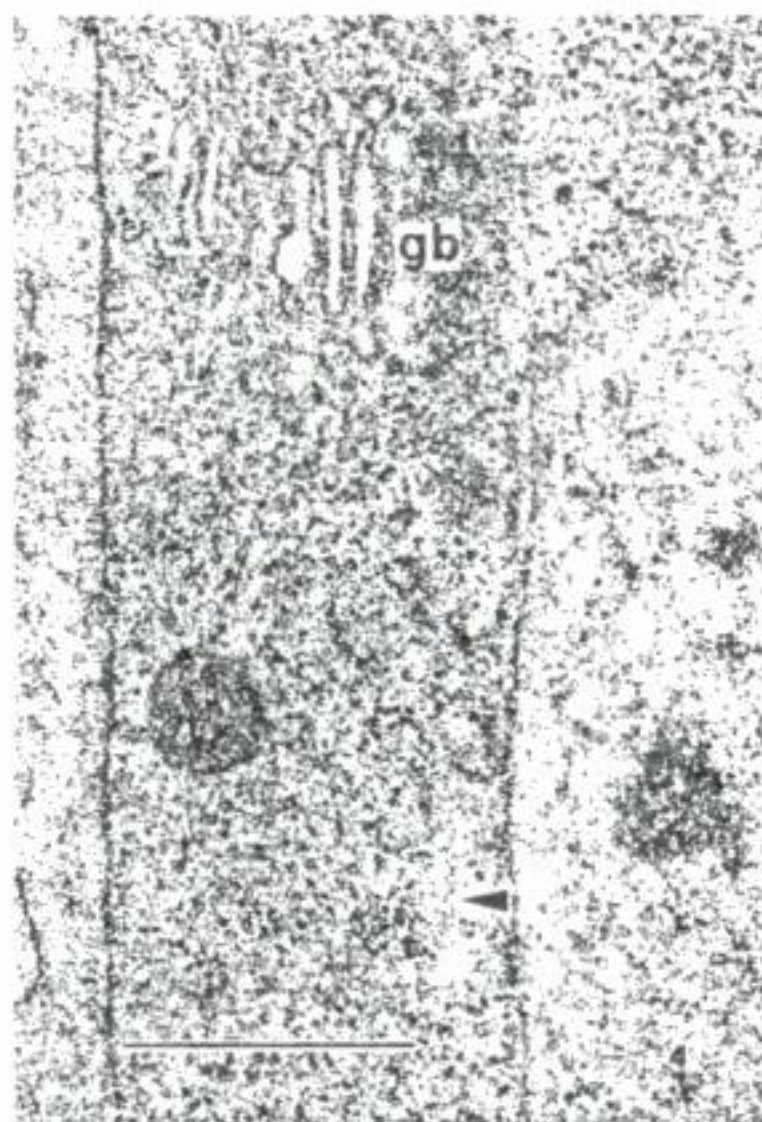


Fig. 4. Micrograph showing Golgi body (gb) within HPF/FS brain tissue. Golgi lamellae and vesicular membranes are smooth and neatly arranged. Note the unexpected cytoplasm, bounded on the left by uniformly packed extracellular matrix and on the right – by a nucleus with optimally cryopreserved chromatin. Many microtubules, viewed both longitudinally and in cross section (arrowheads), are indicative of a well-frozen cytoplasm. X 56,400; bar = 0.5 μ m. Reduction during reproduction is 2/3



Fig. 5. Cortical portion of a myofiber which has been high pressure frozen and freeze substituted. Mitochondria (m) have smooth outer contours, intact cristae, and well preserved matrix material. Unextracted ground substance is evident throughout most of sample. Sarcolemma (Sl). X 56,400; bar = 0.5 μ m. Reduction during reproduction is 2/3

characterized by intact cristae and densely stained matrix material (Fig. 5). The cytoplasmic ground substance was densely packed with no evidence of empty spaces or «halos» surrounding organelles (Fig. 5). Myofilaments located near the periphery of the HPF/FS samples were easily delineated (not shown), however at greater depths, approximately 3 μ m in some samples, the myofilaments showed ice-induced aggregation. This results was in contrast to the chemically preserved muscle tissue in which myofilaments were easily delineated throughout. Extraction of cytoplasmic ground substance was commonly observed in chemically fixed samples. Mitochondria were not well preserved in the chemically fixed muscle samples, much like that reported in neural tissue (Fig. 2), even in the more peripheral areas.

Comparable regions of Malpighian tubules, preserved by HPF/FS and chemical fixation, respectively, are shown in Figs. 6 and 7. The microvilli of HPF/FS samples were smooth and straight with microfilaments extending from the cortical cytoplasm into their tips (Fig. 8). Microvilli of chemically fixed samples appeared

disrupted, often curved, and failed to show evidence of microfilamentous extensions, even at higher magnifications (Fig. 9). A generous glycocalyx, composed of microfibrils and uniformly electron dense amorphous material, was retained in HPF/FS preserved tubules. The microvilli at the apical surfaces of the Malpighian tubule cells were completely embedded in glycocalyx (Fig. 8); This same extracellular material was lacking in chemically fixed cells (Fig. 7 and 9). Within the apical cytoplasm of the tubule cells, the cytoplasm of chemically fixed samples contained numerous small territories devoid of ground substance (Fig. 7); cryofixed cells contained uniformly preserved ground substance (Fig. 6). Mitochondria and membranous bodies (Fig. 6) contained smooth contours; the former were intensely osmiophilic (opaque) or they showed well preserved interior structures (Fig. 8). By contrast, chemically fixed organelles were often wrinkled (Figs. 7, 9).

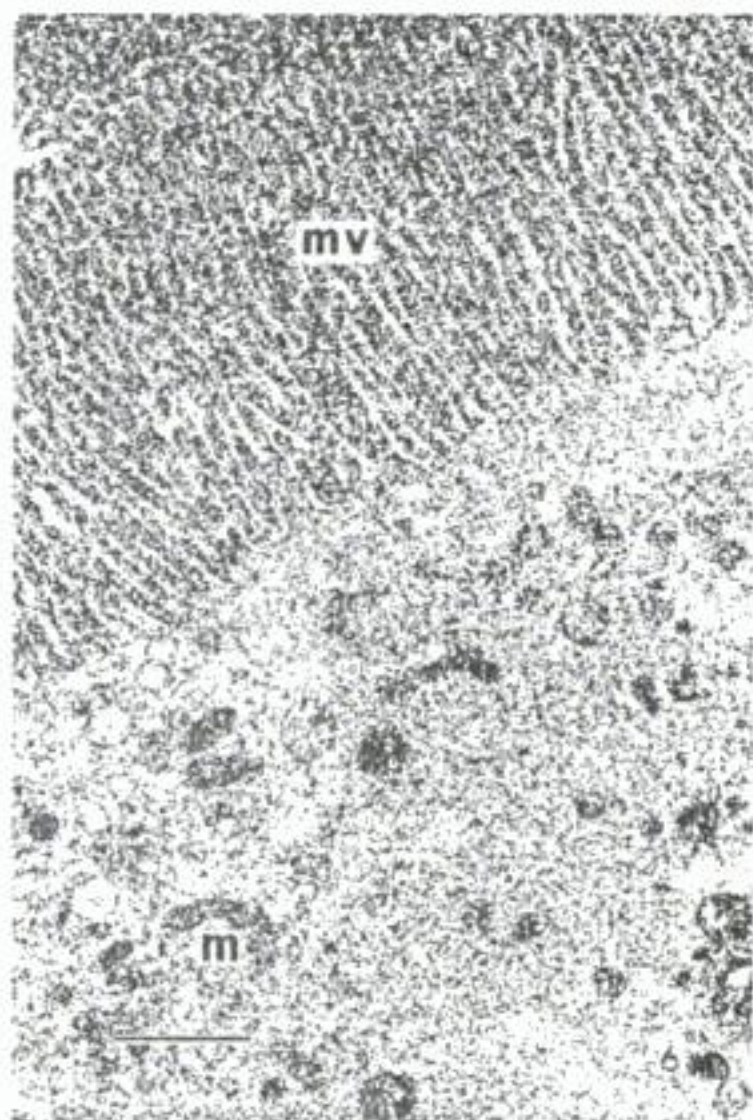


Fig. 6. Photomicrograph of the apical portion of a Malpighian tubule cell preserved by cryofixation. Note the erect microvilli (mv), the densely packed apical cytoplasmic compartment, and the robust mitochondria (m) with uniformly stained matrix. X 12,500; bar = 1 μ m. Reduction during reproduction is 2/3



Fig. 7. Photomicrograph of the apical portion of a chemically fixed Malpighian tubule cell, comparable to the region shown in Fig. 6. Note the irregular alignment of the numerous microvilli (mv) and the extensive leaching (empty area) which has taken place in the apical cytoplasm. Laminated bodies (lb), mitochondrion (m). X 9,500; bar = 1 μ m. Reduction during reproduction is 2/3

A previous study by Morasson et al. (1994) showed that fat body cells from freeze-tolerant larvae were better cryopreserved than fat body cells from freeze-susceptible larvae of *E. solidaginis*. The presence of naturally occurring cryoprotectants (namely glycerol, sorbitol, and trehalose) within the freeze-tolerant larvae apparently aided in prevention of ice-crystal damage. This paper compared the ultrastructure of brain, muscle, and Malpighian tubules from freeze-tolerant larvae fixed either by HPF/FS or conventional chemical techniques. This study was part of a long term objective to develop protocols to optimally preserve larval tissues in various metabolic states.

Chemical fixation of tissues has some serious limitations [4, 21]. One of the major drawbacks to chemical fixation is the relatively long penetration time of the fixative (calculated to be on the order of 1-2 μ m/sec) [11]. Slow penetration of fixatives allows time for membrane fusion in some instances, giving a false picture of dynamic process [21]. Ineffective cross-linking of cellular molecules by fixatives is another problem [3]. High pressure freeze fixation can overcome these limitations, rapidly immobilizing fragile membranes and dynamic activities (on the order

of milliseconds). Depending on the tissue type, optimal cryopreservation can be obtained to considerable depths [13, 20].

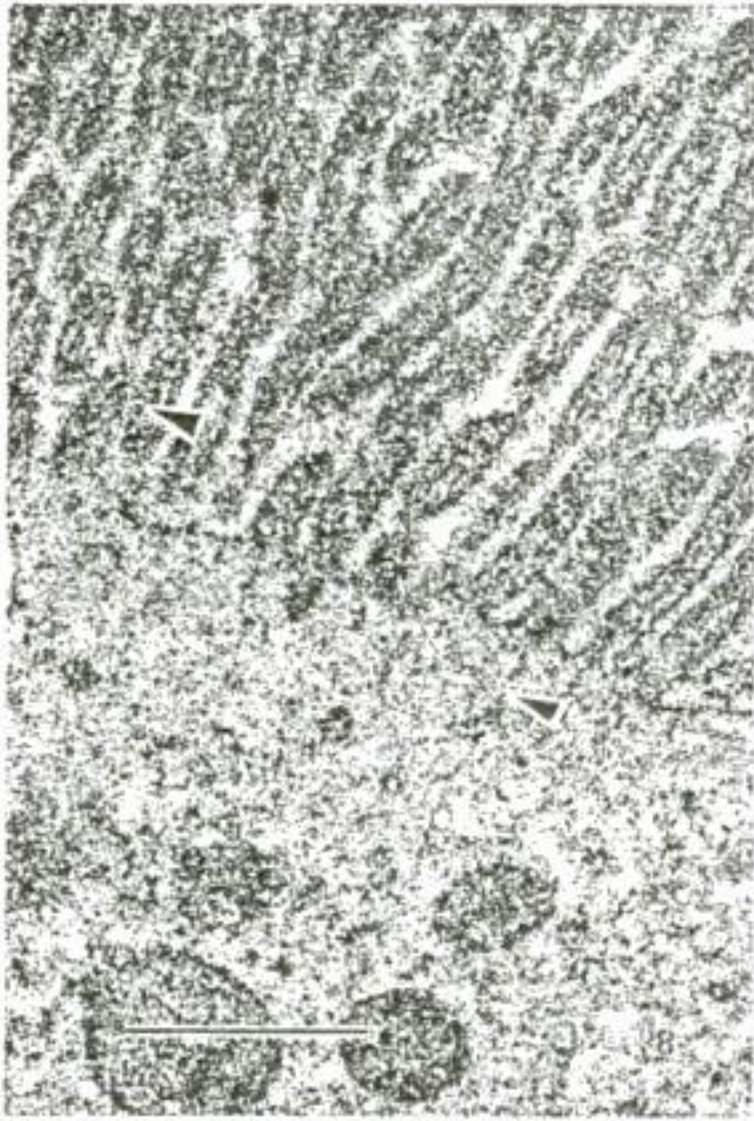


Fig. 8. A higher magnification micrograph of the apical portion of a cryofixed Malpighian tubule cell. Note the abundant microfibrillar glycocalyx surrounding the microvilli. Microfilaments (arrowheads), visible within the microvilli, extend into the cortical cytoplasm. Mitochondrial (m) structures are well preserved. X 47,000; bar = 0.5 μ m. Reduction during reproduction is 2/3



Fig. 9. A higher magnification micrograph of the apical portion of a chemically fixed Malpighian tubule cell. Note the irregular contours of some microvilli, the absence of glycocalyx and the lack of microfilaments. X 47,000; bar = 0.5 μ m. Reduction during reproduction is 2/3

The ultrastructural characteristics that reflected optimal freeze quality in this study included turgid organelles, smooth, unbroken membranes, unextracted cytoplasm, stabilized cytoskeletal elements (microtubules and microfilaments) and immobilized extracellular matrix constituents. Chemically fixed samples in the present experiment show wavy and sometimes broken membranes suggesting that tissues may have been intolerant of osmotic fluxes created by the slowly penetrating chemical fixative. Smooth, unbroken membranes and darkly stained cytoplasmic and mitochondrial matrix characterize HPF/FS samples. These characteristics of quality fixation were reported by Allenspach (1993) in a study of HPF/FS chick embryos and also in a study of plant tissue [8]. Turgid organelles were evidence [14] of excellent fixation quality in fat body cells of *E. solidaginis*, while the presence of «halos» in the peri-organellar space reflected a sub-optimal freeze quality. Tissues with naturally occurring cryoprotectants, such as the freeze tolerant larvae of *E. solidaginis*, are less likely to develop halos than tissues of freeze-susceptible larvae [14]. Nuclei and mitochondria in the HPF/FS samples of the present study were turgid but in chemically fixed samples they were shrunken and occasionally surrounded by empty space. Cytoplasmic ground substance was preserved in cryofixed tissues by the concomitant cross-linking of proteins by constituents of the freeze substitution fluid and the slow removal of microcrystalline ice by the solvent. Acetone, being a non-polar organic, is one of the least aggressive solutions for removing ice from the ground substance at ultra-cold temperatures [18]. The uranyl acetate and osmium tetroxide contribute to the cross-linking. The result is that macromolecules adequately cross-link to form a uniform ground substance.

There are, however, certain artifacts associated with the HPF/FS technique. Besides halos surrounding mitochondria, reticulation of ground substance and

chromatin indicates that tissues have been ineffectively fixed. Ordinarily, a successful cryofixation freezes the tissue water in the microcrystalline or vitrified state. Deeper portions of tissue samples freeze more slowly, however, allowing time for ice crystal growth. The crystals push aside the cytoplasmic matrix material; when the ice is removed «ice ghosts» are circumscribed by the translocated matrix. McDonald and Morpew (1993) define a superior quality fix to be one in which, at sufficiently high magnification, no reticulation is evident. In the present experiment, the depth of quality freeze in the brain (30 μm) was better than in muscle (3-4 μm). Malpighian tubule cells froze equally as well as brain tissue. We were not successful in obtaining optimal cryofixation throughout entire samples; that could probably be realized by selecting a more suitable planchette. We are confident, however, that the specimens under study and other invertebrate samples can be optimally cryofixed to much greater depths, based on work in highly hydrated chick embryos [1], sea urchin and insect embryo specimens [12].

Stabilization of the extracellular matrix was dramatically displayed in Malpighian tubule cells. In chemically fixed samples, the glycocalyx was completely absent surrounding the microvilli. Glycocalyx was prominent in the HPF/FS samples. Likewise, the extracellular matrix persisted in brain tissue prepared by HPF/FS, but not in chemically preserved tissues.

Another indicator of superior cryofixation was the preservation of cytoskeletal elements. Microtubules were cryoimmobilized as relatively straight or slightly curved structures with a uniform diameter. Microtubules in the chemically fixed samples were more undulate than those which were cryofixed. Microtubules are known to be a pressure-sensitive structures, but the ability of the microtubules to withstand the extreme pressure during the HPF/FS event has been attributed to the relatively short duration (sec) of intense pressure during the high pressure freezing event [12]. Preservation in microtubules in plant tissue fixed by HPF/FS has also been reported by Kiss et al. [8].

Stabilization of microfilaments within the microvilli of the *Drosophila* hindgut was used as an indicator of a good cryofixation by McDonald and Morpew [12]. Actin-like filaments were very prominent in microvilli and apical cytoplasm of Malpighian cells following HPF/FS. It is unclear why chemical fixation did not stabilize microfilaments of the microvilli.

The quality of fixation of muscle was disappointing by both methods. Although the HPF/FS technique was superior in fixing the mitochondria and cytoplasmic ground substance beneath the sarcolemma, the sarcomeres had a homogeneous appearance with little or no evidence of individual myofilaments so readily preserved in chemically fixed samples. Yet, chemically fixed samples contained cytoplasm that was badly extracted, and many mitochondria exhibited broken membranes. The choice of fixation, however, depends on the tissue of interest.

Many of the ultrastructural artifacts resulting from chemical fixation are similar to cellular changes in tissues of *Eurosta* larvae subjected earlier to a lethal freeze and cryoimmobilized by high pressure freezing (Collins, unpublished data). In that study, which compared ultrastructure in lethally versus non-lethally frozen larvae, clumping of nuclear chromatin, blebbing of the nuclear envelope, ruptured mitochondria, and extracted cytoplasm were all general ultrastructural features of tissues in larvae exposed to lethal low temperatures. Similar characteristics have been represented here in freeze-tolerant larval tissues which have been chemically fixed. Gilky and Staehelin [5] discussed the changes to membranes, especially vesiculation of the endoplasmic reticulum, as a result of glutaraldehyde fixation. Kellenberger et al. [6] addressed the likelihood of nuclear chromatin to aggregate in the presence of chemical fixatives.

From results presented here, and other works cited above, it appears that cryofixation may be the method of choice for stabilizing ultrastructure of fragile

and dynamic structures. For example, host-parasite structural interfaces with their secretory products, infectious intracellular parasitic system, osmotically sensitive hemocytes in infection-induced systems should be likely candidates for cryopreservation. They are characterized by intra- and extracellular secretory products, elaborate intercellular hydrolytic system and other intracellular membranous systems which, when chemically fixed, suffer from leaching or exhibit numerous membrane whorls and electron dense laminate bodies. In addition to preserving the native structure of these systems, cryofixation may improve immunocytochemical localization [7].

Acknowledgments

We thank Charles Burks and John Mugnano for their comments on an earlier draft of this manuscript. Support was provided by the NSF-IBN#9305809 (R.E.L.), by NSF grants DIR-8820387 (A.L.A.) and BSR-861424 to the Electron Microscope Facility. This study partially fulfilled requirements for the Master of Arts Degree to S.D.Collins.

REFERENCES:

1. Allenspach A.L. Ultrastructure of early chick embryo tissue after high pressure freezing and freeze substitution // *Microsc.Res.technique.* – 1993. – 24. – P. 369–384.
2. Baust J.G. and Nishino M. Freezing tolerance in the goldenrod fly (*Eurosta solidaginis*) / In «Insects at Low temperature», R.E.Lee Jr. and D.L.Denlinger, eds. – 1991. – Chapman and Hall: New York. – P. 269–275.
3. Bullock G.R. The current status of fixation for electron microscopy: a review // *J.Microscopy.* – 1984. – 133. – P. 1–15.
4. Dahl R., Staehelin L.A. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: theory and practice // *J.Electron Microsc. Technique.* – 1989. – 13. – P. 165–174.
5. Gilkey J.C., Staehelin L.A. Advances in ultrarapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure // *Ibid.* – 1986. – 3. – P. 177–210.
6. Kellenberger E., Johansen R., Maeder M., Bohrmann B., Stauffer E. et al. Artefacts and morphological changes during chemical fixation // *J.Microsc.* – 1992. – 168. – P. 181–201.
7. Kiss J.Z., McDonald K. Electron microscopy immunocytochemistry following cryofixation and freeze substitution // *Meth.Cell.Biol.* – 1993. – 37. – P. 311–341.
8. Kiss J.Z., Giddings Th.H., Staehelin L.A., Sack F.D. Comparison of the ultrastructure of conventionally fixed and high pressure frozen/substituted roots tips of *Nicotiana* and *Arabidopsis* // *Protoplasma.* – 1990. – 157. – P. 64–74.
9. Lee R.E., Dommel R.A., Joplin K.H., Denlinger D.L. Cryobiology of the freeze-tolerant gall fly *Eurosta solidaginis*: overwintering energetics and heat shock proteins // *Climate Research.* – 1995. – 5. – P. 61–67.
10. Lee R.E., McGrath J.J., Morason R.T., Taddeo R.M. Survival of intracellular freezing, lipid coalescence and osmotic fragility in fat body cells of the freeze-tolerant gall fly *Eurosta solidaginis* // *J.Insect Physiol.* – 1993. – 39. – P. 445–450.
11. Mersey B., McCully M.E. Monitoring of the course of fixation in plant cells // *J.Microsc.* – 1978. – 14. – P. 49–76.
12. McDonald K., Mophew M.K. Improved preservation of ultrastructure in difficult-to-fix organisms by high pressure freezing and freeze substitution: 1. *Drosophila melanogaster* and *Strongylocentrotus purpuratus* embryos // *Microsc.Res.Technique.* – 1993. – 24. – P. 465–473.
13. Moor H. Theory and practice of high pressure freezing / In «Cryotechniques in Biological Electron Microscopy» / R.A.Steinbrecht and K.Zielrold, eds. – 1987. – Springer, Berlin. – P. 175–191.
14. Morason R.T., Allenspach A.L., Lee R.E. Comparative ultrastructure of fat body cells of freeze-susceptible and freeze-tolerant *Eurosta solidaginis* larvae after chemical fixation and high pressure freezing // *J.Insect Physiol.* – 1994. – 40. – P. 155–164.
15. Morrissey R.E., Baust J.G. The ontogeny of cold tolerance in the gall fly, *Eurosta solidaginis* // *J.Insect Physiol.* – 1976. – 22. – P. 431–437.
16. Salt R.W. Survival of frozen fat body cells in an insect // *Nature.* – 1959. – 184. – P. 1426.
17. Salt R.W. Intracellular freezing in insects // *Nature.* – 1962. – 193. – P. 1207–1208.
18. Steinbrecht R.A., Muller M. Freeze-substitution and freeze-drying / In «Cryotechniques in Biological Electron Microscopy» / R.A.Steinbrecht and K.Zielrold, eds. – 1987. – Springer: Berlin. – P. 149–172.
19. Storey K.B., Storey J.M. Freeze tolerance in animals // *Physiol.Rev.* – 1988. – 68. – P. 27–84.
20. Studer D., Michel M., Muller M. High pressure freezing comes of age // *Scanning Microsc.Suppl.* – 1989. – 3. – P. 253–269.

Department of Zoology, Miami University,
Oxford, Ohio 45056 USA

Accepted by 09.02.96

СТИВЕН Д.КОЛЛИНЗ, АЛЛАН Л.АЛЛЕНСПАХ, РИЧАРД Э.ЛИ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ УЛЬТРАСТРУКТУРА МОЗГА, МЫШЦ И МАЛЬПИГиеВОГО КАНАЛЬЦА, ПОЛУЧЕННЫХ У МОРОЗОСТОЙКОЙ ЛИЧИНКИ *EUROSTA SOLIDAGINIS* (Fitch) (Diptera: Tephritidae) ПОСЛЕ ХИМИЧЕСКОГО ФИКСАЖА И ЗАМОРАЖИВАНИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ

Факультет зоологии, университет штата Майами, г.Оксфорд, Огайо, США

Естественная способность зимующей личинки золотистой мухи *Eurosta solidaginis* (Fitch) (Diptera: Tephritidae) выдерживать обильное внутреннее образование льда, включая внутриклеточное замерзание жировых клеток тела, дала толчок многочисленным криобиологическим исследованиям организма. В настоящем исследовании проводится сравнительный анализ ультраструктуры трех физиологически значимых тканей: мозга, мышцы и мальпигиевой трубочки, полученных от морозостойкой личинки с применением методов химического фиксирования и криофиксирования (метод высокого давления и замораживания-замещения: МВД/ЗЗ). Замораживание под воздействием высокого давления показало наилучшие результаты в нервной и мальпигиевой тканях, что касается мышечной ткани, то здесь полученные результаты оставляли желать лучшего. У ядер образцов, приготовленных с помощью МВД/ЗЗ, распределение хроматина оказалось равномерным, а в ядерной мембране присутствовали несколько внутримембранных дилатаций. И наоборот, в ядрах химически фиксированных образцов хроматин располагался скученно, а во внутримембранном пространстве содержалась масса дилатаций. Мембраны образцов МВД/ЗЗ были распухшими, наружные мембраны оставались гладкими, кристы сохраняли целостность и плотную электронную матрицу. И наоборот, во многих митохондриях у образцов, приготовленных обычным способом, целостность мембран оказалась нарушенной. Микротрубочки визуально обнаруживались при обоих типах консервации, микротрубочки стабилизировались более эффективно с помощью криофиксации в микроворсинках мальпигиевых канальцевых клеток. Защелачивание, преобладающее в химически фиксированных тканях, было сведено к минимуму у МВД/ЗЗ-тканей. Внеклеточные матрицы лучше фиксируются с применением методов криоконсервации. Проведенные наблюдения свидетельствуют в пользу предположения о том, что метод МВД/ЗЗ исключительно пригоден для работы с тканями беспозвоночных, которые подвергаются воздействию осмотических и/или других (неблагоприятных) факторов окружающей среды, инфекционных или иммунологических реакций, а также в случае возникновения каких-либо патологических или аутолитических ситуаций.

СТІВЕН Д.КОЛЛІНЗ, АЛЛАН Л.АЛЛЕНСПАХ, РІЧАРД Е.ЛІ

ПОРІВНЯЛЬНА УЛЬТРАСТРУКТУРА МОЗКУ, М'ЯЗ І МАЛЬПІГІЄВОГО КАНАЛЬЦЯ, ОДЕРЖАНИХ У МОРОЗОСТІЙКОЇ ЛИЧИНКИ *EUROSTA SOLIDAGINIS* (Fitch) (Diptera: Tephritidae) ПІСЛЯ ХІМІЧНОГО ФІКСАЖУ І ЗАМОРОЖУВАННЯ ПІД ДІЄЮ ВИСОКОГО ТИСКУ

Факультет зоології, університет штату Майамі, м. Оксфорд, Огайо (США)

Природна здатність зимуючої личинки золотистої мухи *Eurosta solidaginis* (Fitch) (Diptera: Tephritidae) витримувати сильне внутрішнє утворення льоду, включаючи внутрішньоклітинне замерзання жирових клітин тіла, дала поштовх для численних криобіологічних досліджень організму. У даному дослідженні проводиться порівняльний аналіз ультраструктури трьох фізіологічно значущих тканин: мозку, м'яз і мальпигієвої трубочки, отриманих від морозостійкої личинки з застосуванням методів хімічного фіксування і криофіксування (метод високого тиску і заморожування-замещення: МВД/ЗЗ). Заморожування під дією високого тиску показало найкращі результати в нервовій і мальпигієвій тканинах, що стосується м'язової тканини, то тут отримані результати залишали бажати кращого. У ядер зразків, які приготовані за допомогою МВД/ЗЗ, розподіл хроматину виявився рівномірним, а в ядерній мембрані були присутні декілька внутрішньомембранных дилатацій. І навпаки, в ядрах хімічно фіксованих зразків хроматин розміщувався скучено, а у внутрішньомембранному просторі містилась маса дилатацій. Мембрани зразків МВД/ЗЗ були розпухлими, зовнішні мембрани залишались гладкими, кристи зберігали цілісність і щільну електронну матрицю. І навпаки, у багатьох митохондріях у зразків, які приготовлені звичайним способом, щільність мембран виявилась порушеною. Микротрубочки візуально виявлялись при обох типах консервації, микротрубочки стабілізувались більш ефективно за допомогою криофіксації у

мікрворсинках мальпігієвих каналцевих клітин. Вилуговування, яке переважає в хімічно фіксованих тканинах, було зведено до мінімуму у МВД/33-тканинах. Позаклітинні матриці краще фіксуються з застосуванням методів кріоконсервації. Проведені спостереження свідчать на користь припущення, що метод МВД/33 виключно придатний для роботи з тканинами безхребетних, які піддаються дії осмотичних і/або інших (несприятливих) факторів оточуючого середовища, інфекційних або імунологічних реакцій, а також у випадку виникнення будь-яких патологічних або аутолітичних ситуацій.

УДК 591.543.42.05:577.1

А.М.Белоус, В.И.Загнойко, А.К.Гулевский

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ПРОЦЕСС ГИБЕРНАЦИИ

На основании обзора данных литературы, посвященных проблемам зимней спячки животных, показана важная роль регуляторных пептидов, обладающих ингибирующим действием на метаболизм и температуру тела гибернирующих животных. Обращается внимание на тот факт, что изучение природы, структуры и механизма действия регуляторных пептидов — “триггеров спячки” — может иметь большое значение для разработки новых методов лечения в медицинской практике.

На протяжении последних лет установлены важные факты существования в тканях зимнеспящих животных биологически активных веществ, обладающих антиметаболическим и гипотермическими эффектами [9, 10]. Первые сообщения о веществах эндогенной природы, оказывающих влияние на зимнюю спячку, ее возникновение и пробуждение, были сделаны более 50 лет назад [42, 45]. При этом широко обсуждалась роль многих эндогенных веществ в поддержании состояния зимнего оцепенения у млекопитающих [19, 20, 27, 29]. Наиболее важными в этом плане оказались три группы веществ: кортикостероиды, серотонин и его метаболиты, а также инсулин [18, 41, 55], хотя, как оказалось позже, они не играют решающей роли в индукции основного процесса зимней спячки — резкого снижения клеточного метаболизма [21].

Предполагалось [60], что источником “гормона гибернации” является бурая жировая ткань (БЖТ), поскольку экстракты из БЖТ гибернирующих ежей, введенные парентерально крысам и мышам, оказывали антиметаболический эффект и снижали температуру тела. Однако в дальнейшем при более строгой проверке роль БЖТ как индуктора зимней спячки не была подтверждена [25]. Поэтому в настоящее время общепризнано, что БЖТ не является источником гибернирующего “гормона”, хотя она активно принимает участие в терморегуляции как гибернирующих, так и негибернирующих животных.

В 1968 г. Сван и соавт. [59] сообщили, что экстракт из головного мозга двоякодышащей рыбы — эфиопского протоптера (*Protopterus aethiopicus*), находящейся в состоянии летнего оцепенения, содержит антиметаболический агент, при введении которого белым крысам наблюдается снижение скорости метаболизма на 35% и температуры тела на 5 °C [61]. В работе [5] также было показано, что при вхождении в состояние спячки снижение уровня метаболизма предшествует падению температуры тела. При выяснении природы выделенного из мозга двоякодышащих рыб фактора, вызывающего антиметаболический эффект и снижение температуры тела, оказалось, что им является пептид, подавляющий синтез ДНК, РНК и белка [33, 56]. В дальнейшем показали [61], что в экстрактах подкормки головного мозга находившихся в зимней спячке сусликов *Citellus tridecemlineatus*, имеется фактор, получивший название “антаболон”. Этот фактор в экспериментах *in vitro* и *in vivo* подавлял на 65% общий метаболизм (по потреблению O₂) у гомеотермных крыс. Добавление водного экстракта из ацетонового порошка ткани головного мозга гибернирующих сусликов (*Citellus Tridecemlineatus*) в культуру клеток китайского хо-

мяка подавляло включение ^3H -тимидина в осаждаемый кислотой материал, не влияя на транспорт и фосфорилирование нуклеозида [33].

Эндогенные антиметаболические агенты в настоящее время выделены из периферических тканей различных зимнеспящих животных. Так, из эпителиального слоя кишечника сусликов (*Citellus undulatus*) в состоянии спячки выделен активный фактор, вызывающий антиметаболический эффект после его внутрибрюшинного введения белым мышам. В дозе 0,5 мг/г этот фактор снижал температуру тела у мышей за 1 ч на 3,5 °С, а при дозе 2 мг/г температура тела падала до 33,6 °С и ниже. Максимальное снижение температуры тела мышей до 25 °С после введения экстракта кишечника гибернарующих сусликов в дозе 2 мг/г наблюдалось через 6–7 ч. Если введение экстракта кишечника суслика в дозе 0,5 мг/г не вызывало изменения уровня потребления O_2 у мышей, то после введения экстракта в дозе 1 мг/г уровень метаболизма снижался на 61 %, а в дозе 2 мг/г — на 76 %. При этом после введения мышам экстрактов из ткани кишечника гибернающего суслика вначале снижалось потребление O_2 , а затем падала температура тела.

Подобный фактор был обнаружен в крови сусликов [37], находившихся в состоянии зимней спячки. Концентрация этого фактора в крови начинала возрастать осенью и прогрессировала после наступления спячки. Введение диализата, полученного из оттаявшей после замораживания сыворотки крови спавших животных, вызывало спячку у эутермных взрослых особей того же вида, а также и у 6-недельных сусликов, которым в этом возрасте спячка вообще не свойственна [32]. Диализат вызывал также спячку при введении его гибернаторам другого вида — североамериканским лесным суркам (*Mormota monax*). Подобная спячка, искусственно провоцируемая введением сыворотки крови различных гибернарующих животных, развивалась у сусликов *Citellus tridecemlineatus* также и в летнее время [38, 39]. В этих работах было определено, что “фактор зимней спячки” не обладает видоспецифичностью, его молекулярная масса менее 10000 Да. По уточненным данным работы [60] молекулярная масса этого агента составляет 1000–1400 Да и по своей природе это низкомолекулярный пептид, общий для всех зимнеспящих грызунов [40]. Имеются данные о том, что вызывающий гибернацию фактор в плазме крови связан с альбуминовой фракцией, относительно термолабилен, чувствителен к протеазам и не атакуется нуклеазами [53], т.е. по своей природе “триггер спячки” — это, скорее всего, либо белок, либо гликопротеин.

Практический интерес вызывают данные [50] о том, что лиофилизированная альбуминовая фракция с молекулярной массой 70000 Да, полученная из крови гибернировавших сурков и введенная парентерально в дозе 3–4 мг, вызывала снижение жизнедеятельности и температуры тела у приматов — обезьян (*Nemestrimus* и *Simia rhesus*). При увеличении дозы до 8 мг температура мозга обезьян снижалась в среднем на 2,6 °С с восстановлением ее уровня к 10-му ч после инъекции, а частота сердцебиений падала до 43–50 уд./мин. При этом возникающая гипофагия сохранялась в течение 5–7 сут [54]. При внутривенном введении “триггера” в дозе 50 мг гипофагия пролонгировалась до 3 недель, а артериальное давление снижалось на 20–25 %. Введение “триггера спячки” сопровождалось также снижением клиренса креатинина [52, 58]. Инъекции альбуминовой фракции, выделенной из сыворотки крови сурков в летний период, не вызывали подобных эффектов или вызывали незначительные изменения изученных выше показателей.

При исследовании механизма действия “триггеров спячки” было обнаружено, что их эффект реализуется через мембранно-связанные рецепторы клеток, которые, по всей видимости, инициируют довольно сложные метаболические и физиологические перестройки в тканях и органах животных. Оказалось, что введение блокаторов опиатных рецепторов-налтрексона в дозе 200 мкг в боковой желудочек мозга или налоксона (30 мкг/кг внутривенно) устра-

няет явления гипофагии, гипотермию и брадикардию, а периоды сонливости животных резко сокращаются. Поэтому полагают, что альбуминовая фракция из сыворотки крови гибернирующих сурков является носителем опиатподобного пептида, регулирующего процесс вхождения животного в спячку. Высказывается гипотеза, что молекула “триггера” синтезируется главным образом у зимнеспящих животных, хотя приматы, не впадающие в оцепенение, по-видимому, имеют также рецепторные участки в мозге, которые способны реагировать с активной молекулой триггера [47, 48].

Исследование активности “триггера”, локализованного в растворимой альбуминовой фракции плазмы крови, показало, что при введении этого белка вместе с искусственной цереброспинальной жидкостью в желудочки мозга обезьян развивались летаргические и опиатподобные изменения в поведении животных на протяжении 3–5 ч. Температура тела этих животных снижалась на 3 °С, а частота сердечных сокращений — на 50%. Выделенный и частично очищенный “триггер спячки” представляет собой термолабильный пептид с молекулярной массой - 5000 Да, который связан и транспортируется фракцией альбумина. Внутривенная инъекция лиофилизированной фракции альбумина, содержащей указанный выше пептид, 13-полосным сусликам вызывала состояние спячки летом. После введения этих пептидов в желудочки мозга у животных развиваются брадикардия, гипотермия и торможение двигательных реакций. Эффекты “пептидов спячки” могут быть у животных устранены или замедлены в присутствии опиатподобных антагонистов.

Мощным гипотермическим агентом оказался также пептид с молекулярной массой 1000–1400 Да — бомбезин, выделенный из кожи лягушек-жерлянок (*Bombina sp.*) и головного мозга млекопитающих [23, 44]. Было показано [43], что микроинъекции бомбезина в различные отделы головного мозга крыс вызывали гипотермические эффекты различной степени выраженности. Возможно, что бомбезиновая гипотермия опосредуется торможением метаболизма. При определении содержания бомбезина в разных отделах мозга сусликов *Citellus lateralis* было установлено [51], что его содержание в гипофизе в 6 раз выше, чем у крыс, хотя его концентрация в коре больших полушарий исследованных животных одинакова.

В работе [49] было обнаружено, что введение хомячкам, находившимся в зимней спячке, в малых дозах антиопиатного агента — налоксона — повышает сердечную деятельность и вызывает преждевременное пробуждение. Поэтому считают, что эндогенные опиаты могут играть специфическую роль в организации зимней спячки, а также в механизме пробуждения. Близкие данные были получены Кромером [46] после введения соням (*Eliomys quercinus*) блокатора опиатных рецепторов — налтрексона. На то, что состояние гибернации может зависеть от опиоидных нейропептидов указывает и установленный на сусликах (*Citellus lateralis*) следующий факт: при зимней спячке у них резко снижается физическая зависимость от морфина. В то же время у сусликов в эутермном состоянии вырабатывается зависимость от морфина, и налоксон у них, независимо от сезона, вызывает четкие симптомы абстиненции. В работах показано [54], что депрессию, вызванную у обезьян (*Macaca mulata*) гибернационным триггером крови сурков, можно устранить введением опиатных антагонистов — налоксона и налтрексона. Поэтому считают, что триггерный фактор представляет собой эндогенный опиоидный пептид, который может связываться с рецепторами в ткани незимнеспящих млекопитающих. Позднее было [36] сообщено, что хроническое внутрижелудочковое введение налоксона сусликам (*Citellus lateralis*) вызывает дозозависимое сокращение циклов спячки в течение гибернационного периода. Наконец, было установлено [34], что связывание ³H-дигидроморфина *in vitro* тканью гиппокампа и теменной области коры больших полушарий гибернировавших сусликов не-

одинаково снижено в исследованных объектах, что также может объяснить отсутствие привыкания животных к морфину при спячке.

В дальнейшем было выяснено, что эндогенные антиметаболические агенты, играющие роль гистернативных триггеров, содержатся не только в мозге, но и в периферических тканях. Так, было показано, что после внутрибрюшинного введения мышам экстракта эпителиального слоя тонкой кишки двух видов сусликов (*Citellus undulatus* и *C. parryi*), находившихся в зимней спячке, у них наблюдался отчетливый гипометаболический эффект, который опережал наступающее снижение температуры тела [11]. Введение подобного экстракта, полученного из кишечника эутермных сусликов (*Citellus undulatus* и *Suclicus*), сопровождалось менее выраженным эффектом. По данным Ю.Ф.Пастухова и И.Е.Чепкасова [24], при введении кишечного экстракта гистернативов потребление O_2 снижалось на 80% в течение 3–4 ч, температура тела падала на 13,7 °С, уменьшались сократительный термогенез в мышцах и показатели брадикардии. Подобного рода эффекты были описаны позднее в других работах [14, 22].

По данным Д.А.Игнатъева и соавт. [13] состояние пролонгированной гипотермии (24–36 ч) можно вызвать инъекцией белым мышам фракции с молекулярной массой 1000–10000 Да, выделенной из тонкой кишки гистернирующего суслика (*Citellus undulatus*) в сочетании с искусственным 2-часовым гипоксическо-гиперкапническим воздействием. При введении мышам смеси серотонин-креатинин в тех же условиях состояние пролонгированной гипотермии отличалось меньшей устойчивостью, и животные оказались неспособными к переходу в нормотермное состояние. Возможно, эти отличия обусловлены более тонким и сбалансированным регуляторным влиянием “триггера спячки” на функциональные системы организма.

При изучении влияния низкомолекулярных фракций, выделенных из мозга и слизистой оболочки кишки сусликов (*Citellus undulatus*), находящихся в состоянии спячки [16, 19], на оплодотворение яйцеклетки морских ежей (*Strongulocentratus intermedius*), был выявлен четкий, зависящий от дозы тормозящий эффект их действия на процессы дробления и прохождения стадий развития.

Механизмы действия биологически активных веществ из кишечника гистернирующих животных на процесс развития морских ежей остаются пока неясными, хотя в работах [26, 30] предполагается, что это может быть связано как с ингибированием специфических механизмов синтеза ДНК, РНК и белков, так и с подавлением процессов энергообеспечения.

При исследовании [20, 30] влияния кишечного экстракта, выделенного из тонкой кишки зимнеспящего арктического суслика (*Citellus undulatus Pallas*), на формы покоя первичного сна (частотные характеристики биоэлектрической активности примордиального гиппокампа, электромиограмма, электроэнцефалограмма и электрокардиограмма) травяной лягушки *Rana temporaria* установлено, что распределение нормированной мощности частотных составляющих электроэнцефалограммы примордиального гиппокампа аналогично полученному в форме покоя P_2 первичного сна амфибий, что свидетельствует о функциональной гомологии P_2 и гипобиоза. Введение экстракта моделирует у травяных лягушек состояние, весьма напоминающее P_2 соответствующего гипобиотического сезона.

По предварительным данным [20], факторы, выделенные из кожи и кишечника травяных лягушек, находящихся в состоянии гипобиоза, вызывали у белых мышей эффект выраженного снижения метаболизма и температуры тела, аналогичный таковому после введения экстракта из кишечника зимнеспящего суслика. Делается вывод о том, что снижение метаболизма и температуры тела под влиянием экстракта из кишечника зимнеспящего суслика активи-

рует те специфические процессы вхождения в спячку, которые закреплены в эволюционном ряду млекопитающих [15].

Позднее в работах [4, 12] исследовалось влияние фракции 1000–10000 Да сыворотки крови гибернирующего и активного суслика на биоэлектрическую активность миокардиальных волокон и нейронов коры головного мозга крысы. Обнаружено, что инъекция сыворотки крови гибернирующего суслика приводила к появлению на электроэнцефалограмме высокоамплитудных низкочастотных волн диапазона 2,8–4,5 Гц. Полученный эффект может быть объяснен [8] усилением влияния тормозных интернейронов, синхронизирующих активность большого числа кортикальных клеток мозга. Согласно предложенной гипотезе вещества или факторы видонеспецифичны и поэтому могут поглощаться рецепторами как гибернирующих, так и негибернирующих млекопитающих. Например, при введении лягушкам экстракта, выделенного из тонкого кишечника зимнеящего арктического суслика, у них возникло состояние, близкое к одной из существующих форм покоя первичного сна амфибий.

Предполагается, что молекулы “триггера спячки” могут оказывать прямое действие на темпы синтеза белков в ходе подготовки активных животных к состоянию зимней спячки. Например, показано, что эритропоэтические ткани гибернирующих сусликов чувствительны к прямому влиянию молекулы “триггера”, включая в работу механизм, приводящий к повышенному синтезу молекул гемоглобина, легко связывающих O_2 в тканях, несмотря на то, что температура тканей при этом гораздо ниже физиологической. Считают, что “триггер” изменяет структуру и функцию не только кислородпереносящих белков эритроцитов, но и мембран клеток. Например, в состоянии гибернации в крови сусликов появляются особые формы эритроцитов, которые отличаются повышенной осмотической и деформационной пластичностью. Такие эритроциты более лабильны по сравнению с нормальными и поэтому легче проходят через спазмированные кровеносные сосуды во время процесса гибернации. Появление белков и липопротеинов, сохраняющих более высокую подвижность клеточных мембран и препятствующих быстрому изменению их барьерных свойств, имеет большое значение для выживания этих животных во время длительного гипотермического периода. Как известно, гибернирующие животные более устойчивы к действию ионизирующего излучения специфических бактериальных и протозойных начал, в процессе гибернации происходит также заметное ингибирование роста злокачественных новообразований.

В работе Б.К.Гаврилюк [5] для выявления особенностей влияния гуморальных факторов на клетки перевиваемой линии ВНК-2 проводились опыты с о средой, содержащей вместо сыворотки крови быка сыворотку крови зимнеящих животных, взятую в период спячки и бодрствования. При культивировании клеток ВНК-21 при температуре 37 °C в среде Игла с 10% сыворотки крови бодрствующего длиннохвостого суслика рост клеток происходил так же, как и в обычной среде с содержанием сыворотки крови быка. Если к среде Игла добавляли сыворотку спящего длиннохвостого суслика, то характер роста и развития клеток изменялся — клетки прикреплялись к поверхности стекла, растягивались и теряли способность к размножению. По-видимому, в сыворотке крови спящих животных отсутствуют ростовые факторы, содержащиеся в организме бодрствующих животных. Это косвенно подтверждается данными о наличии в крови зимнеящих эндогенных веществ, которые могут вызывать ингибирование синтеза ДНК, РНК и белков [33, 56], подавлять метаболизм в культуре клеток *in vitro* [33] и замедлять дробление оплодотворенных яйцеклеток [16, 19]. Можно также отметить и то, что клетки ВНК-21, инкубированные в среде с сывороткой спящего суслика, переживали в таком состоянии значительно более длительный срок, чем в среде с обычной сывороткой (до 3 недель при температуре 37 °C, до 6 недель при температуре 5 °C), а в среде с

сывороткой быка — соответственно 2 и 4 недели. Отсутствие ростовых факторов в сыворотке крови сусликов, пребывающих в спячке, способствует стабилизации клеток за счет их перехода в фазу $G_1 - G_0$, что позволяет пролонгировать сроки их переживания в условиях *in vitro*.

В работе [57] установлено, что внутривенное введение 13-полосным сусликам плазмы крови или ее альбуминовой фракции, выделенной у черных медведей в состоянии зимнего оцепенения, вызывает изменения, характерные для летней спячки. Сообщается [1, 2] также, что фракция 1000–10000 Да, выделенная из крови и мозга генотипически холодоадаптированного животного — якутской лошади, — влияет на синтез белка в тканях белых мышей, а также вызывает гипотермический и гипометаболический эффекты [1, 28].

Оказалось, что фракции веществ, выделенные из органов зимнеспящих животных (*Citellus undulatus*), имеют не только выраженные антиметаболические и гипотермические свойства, но и обладают способностью изменять проницаемость мембран и, в частности, — кардиомиоцитов. При этом снижение транспорта ионов K^+ происходит при значениях потенциалов, близких к потенциалу покоя, при высоких величинах потенциалов на мембране блокируются Ca^{2+} — и Na^+ -токи и увеличиваются K^+ -токи. При этом предсердные волокна при добавлении фракций гибернации имеют вид, характерный для сердечных клеток зимнеспящих животных. Предполагается, что вещества, содержащиеся во фракции 1300–2000 Да, содержат два компонента, один из которых блокирует транспорт Ca^{2+} , а другой — увеличивает длительность окончания фазы реполяризации. Известно, что практически все изменения ионной проницаемости, полученные в результате действия активных фракций, увеличивают устойчивость миокарда к аритмиям и фибрилляции и способны вызвать уменьшение частоты сокращения сердца. Исходя из этого, можно предположить, что, по крайней мере, частично свойства миокарда зимнеспящих связаны с присутствием в тканях указанных выше физиологически активных соединений. В таком случае изменения ионного транспорта, вызываемые действием триггерных веществ, содержащихся в различных фракциях, могут играть также существенную роль при “консервации” энергетических запасов, ионных градиентов и сбалансированного подавления метаболизма у спящих животных.

Данные, приведенные выше, подтверждаются в работе [5], где исследовалось влияние фракции 1000–10000 Да из тканей зимнеспящих сусликов на клеточный цикл и двигательную активность плазмодия *Physarum polycerphalum*. Выявлено существенное изменение обмена Ca^{2+} в результате влияния указанной выше триггерной фракции пептидов из *Citellus undulatus* на клеточный цикл плазмодия. Факторы, влияющие на уровень внутриклеточного Ca^{2+} , вызывают в фазе G_2 — клеточного цикла митотический блок, связанный с разобщением кальциевой и диацилглицеринной ветвей, участвующих в активации протеинкиназы C [3].

Позднее, при исследовании роли низкомолекулярной фракции с молекулярной массой от 1000 до 10000 Да из кишечника гибернирующих сусликов [6], показано, что она снижает транспорт воды, а также Ca^{2+} и Mg^{2+} в дистальном канальце почки тритона, в то время как налоксон устраняет этот эффект. Механизмы действия этих веществ до сих пор остаются невыясненными, хотя результаты позволяют предположить, что в клетках почечных канальцев тритона эффект осуществляется через описанные рецепторы, о чем уже упоминалось выше [35, 36, 46, 54, 58]. По мнению Кальтера и Фолька [45], к индукции состояния зимней спячки могут иметь отношение как гибернационный фактор крови (анаболон мозга), так и нейропептиды (опиаты, эндофрины и бомбезин). Роль специфических нейропептидов в индукции состояния зимней спячки в настоящее время общепризнана, а углубленное изучение их действия является предметом интенсивного исследования.

В последнее время белковая (полипептидная) природа “триггера” достаточно четко доказана в опытах с введением белков, обработанных протеазой и нуклеазой, выделенных из органов гибернирующих животных. У животных, получавших обработанный протеазой фактор, не удалось вызвать состояния гибернации, в то время как большинство животных, получавших препарат, обработанный нуклеазой, впадали в это состояние.

Утвердилось мнение, что гибернирующий “триггер” — это, скорее всего, эндогенный опиатподобный белок, синтез которого специфичен только для гибернирующих животных. Негибернирующие млекопитающие, по всей видимости, содержат в мозгу рецепторные участки, которые взаимодействуют с “триггером”, что вызывает у них состояние оцепенения. Исследования грубых белковых экстрактов из субкортикальной ткани мозга гибернирующих сусликов показали, что молекула “триггера”, появляющаяся в периферической крови, подобна или идентична по своей природе метаболическому депрессанту — антаболону [61]. По своей природе эта молекула является нейрогормоном, секретлируемым из мозга в кровяное русло. Выделившийся нейрогормон связывается в крови с циркулирующим альбумином, что предохраняет его от разрушения неспецифическими протеазами. Такой комплекс легко диссоциирует в тканях и влияет на биоэнергетику, синтез изоэнзимов белков и липопротеинов, состав и проницаемость мембран, работу генетического аппарата клеток. В настоящее время описаны свойства комплексов, способных инициировать состояние, близкое процессу гибернации как у зимне-, так и незимнеспящих животных. К их числу относятся такие соединения, как, например, нейротензин, бомбезин, опиаты, нейропептиды [35].

Нейротензин представляет собой 13-аминокислотный пептид, локализованный в ткани мозга. Внутривенная инъекция этого вещества крысам вызывает гипотермию тела и гипергликемию. У мышей нейротензин вызывает падение температуры тела на 3 °C в течение 30 мин. Бомбезин — 14-аминокислотный пептид — также локализован в ткани мозга млекопитающих. При внутривенном введении крысам в дозе 0,1 мг он более эффективен, чем нейротензин, вызывает гипотермию и значительное снижение потребления O₂. Имеются сведения об участии таких нейропептидов как лей- и метэнкефалины, а также β -эндорфины в поддержании состояния зимней спячки.

Считается, что в организме зимнеспящих животных помимо факторов, индуцирующих спячку, существуют вещества, регулирующие пробуждение — так называемые “антитриггеры”. Высказано мнение [48], что изменение соотношения триггеров и антитриггеров играет важную роль в регуляции процесса наступления спячки и ее прерывания. Согласно триггер-антитриггерной гипотезе зимней спячки [62], к весне в организме усиленно продуцируются недифференцируемые молекулы антитриггера с большой молекулярной массой, которые образуют комплекс с молекулами триггера, инактивируя их. Инактивация триггера позволяет достаточно быстро повысить температуру тела и ускорить процессы метаболизма [17].

Таким образом, сейчас доказано наличие веществ эндогенной природы [26], инициирующих модификацию метаболизма при вхождении животного в состояние спячки и вызывающих у незимнеспящих млекопитающих ряд специфических для спячки явлений.

Эти данные представляют несомненный интерес для раскрытия молекулярных основ резистентности зимнеспящих животных и использования принципов их функционирования в медицинской практике. На этой основе японскими учеными разработано средство для перорального применения, повышающее устойчивость человека к холодовому воздействию. В качестве активного начала этого средства используются низкомолекулярные пептиды, состоящие из 2–10 аминокислот, получаемые действием протеаз на костную и мышечную ткани класса оленьих. Аналогичным действием обладают полипептиды, со-

державшие в качестве активного фактора антагонист рецептора адепозина. Для повышения холодоустойчивости к указанным выше препаратам добавляют питательные добавки, состоящие из различных сочетаний и количеств высококалорийных углеводов, белков и жиров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахременко А.К., Загнойко В.И., Игнатъев Д.И. Влияние фракции 1–10 КД из мозга холодоадаптированного животного на синтез белка в тканях белых мышечных // Механизмы зимней спячки. – Махачкала: Б. и., 1990. – С. 23.
2. Ахременко А.К., Николаева Р.Н., Сафронова В.Е. Гипотермические и гипометаболические эффекты фракций, выделяемые из мозга и крови якутской лошади // Механизмы зимней спячки. – Махачкала: Б. и., 1990. – С. 24–25.
3. Белявский М.А., Матвеева Н.Б., Бейлина С.И. Действие низкомолекулярных фракций из тканей зимоспящих на клеточный цикл и двигательную активность // Механизмы зимней спячки. – Пушкино: Б. и., 1987. – С. 133–138.
4. Воробьев В.В., Игнатъев Д.А., Круман И.И., Ярков А.В. Влияние фракции 1000–10000 Д сывотки гибернирующего и активного суслика на биоэлектрическую активность коры головного мозга крысы // Механизмы зимней спячки. – Пушкино: Б. и., 1987. – С. 127–132.
5. Гаврилюк Б.К. Устойчивость к пониженной температуре культур клеток и тканей, выделенных из органов зимоспящих животных // Криобиология. – 1985. – № 3. – С. 28–30.
6. Гончаревская О.А., Монин Ю.Г., Крамарова Л.И. и др. Роль низкомолекулярной фракции, выделенной из кишечника гибернирующих сусликов, в регуляции транспорта электролитов и воды в почечном канальце // ДАН СССР. – 1988. – 298, № 1. – С. 228–231.
7. Гулевский А.Г., Терещенко О.С., Загнойко В.И. и др. Влияние фракции 1–10 кД из мозга якутской лошади на Ca^{2+} -транспортирующие системы в везикулах сарколеммы кардиомиоцитов // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1992. – № 9. – С. 274–278.
8. Гусельников В.И. Электрофизиология головного мозга. – М.: Высш. шк., 1976. – 423 с.
9. Загнойко В.И., Гулевский А.К., Щенявский И.И. и др. Ионный гомеостаз эритроцитов животных, находящихся в зимней спячке в условиях гипотермии // Цитология. – 1990. – 32, № 9. – С. 926–927.
10. Загнойко В.И., Гулевский А.К., Щенявский и др. Особенности структурно-функционального состояния эритроцитов гомойотермных и гетеротермных животных в условиях гипотермического хранения // Журн. эвол. биохимии и физиологии. – 1991. – 27, № 4. – С. 432–436.
11. Иваницкий Г.Р., Колаева С.Г., Пастухов Ю.Ф. и др. Эффект выраженного снижения метаболизма у теплокровных эндогенными веществами из тканей зимоспящих в состоянии спячки // ДАН СССР. – 1982. – 267, № 2. – С. 978–990.
12. Игнатъев Д.А., Колаева С.Г., Михалева И.И. и др. Результаты тестирования некоторых биологически активных фракций, выделенных из тканей зимоспящих // Механизмы зимней спячки. – Пушкино: Б. и., 1987. – С. 106–118.
13. Игнатъев Д.А., Колаева С.Г., Крамарова Л.И., Кравченко И.И. Гипотермическое влияние на мышечной фракции 1–10 кД тонкой кишки гибернирующего суслика (*Citellus undulatus*) в условиях гипоксии и гиперкапнии // Журн. эволюц. биохимии. – 1989. – 25. – С. 318–323.
14. Игнатъев Д.А., Колаева С.Г., Михалева И.И. и др. Действие веществ, содержащихся во фракции мозга и тонкой кишки гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*), на возбудимость миокардных волокон // Механизмы зимней спячки. – Пушкино: Б. и., 1987. – С. 146–151.
15. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих. – М.: Наука, 1985. – 269 с.
16. Колаева С.Г., Крамарова Л.И., Иваницкий Г.Ф. и др. Влияние низкомолекулярных фракций, выделенных из мозга и слизистой оболочки кишечника сусликов (*Citellus undulatus*) на оплодотворенные яйцеклетки морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* // ДАН СССР. 1984. – 279, № 3. С. 755–757.
17. Корякина Л.А., Кудрявцева Н.Н., Арав В.И. Влияние внутрижелудочного введения биогенных аминов на выход краснощечных сусликов из зимней спячки. – // Механизмы зимней спячки млекопитающих. – Владивосток: Изд-во ДНЦ АН СССР. – 1977. – С. 105–111.
18. Колпаков М.Г., Колаева С.Г., Красс П.М. и др. Механизм сезонных ритмов кортикостероидной регуляции зимоспящих. – Новосибирск: Наука, 1974. – 256 с.
19. Крамарова Л.И., Колаева С.Г., Бронников Г.Е. Низкомолекулярные вещества кишечника зимоспящих сусликов (*Citellus undulatus*) ингибиторы развития оплодотворенных яйцеклеток морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* // Механизмы зимней спячки. – Пушкино: Б. и., 1987. – С. 138–145.
20. Крамарова Л.И., Колаева С.Г., Крамарова Л.И. и др. Влияние экстракта кишки зимоспящего суслика (*Citellus undulatus*) из формы покоя первичного сна травяной лягушки // Криобиология и криомедицина. – 1984. – Вып. 15. – С. 36–40.
21. Крамарова Л.И., Колаева С.Г., Пастухов Ю.Ф. и др. О роли нейропептидов в индукции состояния зимней спячки // Журн. общей биологии. – 1984. – 45, № 3, С. 400–409.

22. Круман И.И., Игнатъев Д.А., Комелевская С.М. Гипотермический эффект фракции сыворотки крови сусликов (*Citellus undulatus*) // Механизмы зимней спячки. – Пушино: Б. и., 1987. – С. 118–126.
23. Пантелеев П.А. Биоэнергетика мелких млекопитающих. – М.: Наука, 1983. – 271 с.
24. Пастухов Ю.Ф., Чепкасов И.Е. Изменение терморегуляции у белых мышей при действии эндогенных веществ из ткани кишечника зимоспящих // Физиол. журн. СССР. – 1983. – 69, № 11. – С. 1485–1490.
25. Попова Н.К., Науменко Е.В., Колпаков В.Г. Серотонин и поведение. – Новосибирск: Наука, 1978. – 304 с.
26. Слошм А.Д. Руководство по физиологии // Экологическая физиология животных. – 1979. – № 1. – С. 183–187.
27. Сухова Г.С., Игнатъев Д.А., Арменко А.К. и др. Кардиотропная, гипометаболическая и гипотермическая активность пептидных фракций из тканей зимоспящих и холодоадаптированных животных // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1990. – 26, № 5. – С. 623–629.
28. Терещенко О.С., Биологическая активность и механизм действия фракции полипептидов 1–10 кД с тканей гибернирующих и холодоадаптированных животных: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1994. – 16 с.
29. Фольк Г.Э., Огейнер М.С. Сравнительная физиология “фактора” зимней спячки в крови млекопитающих // Механизмы зимней спячки млекопитающих. – Владивосток: Изд-во ДНЦ АН СССР, 1977. – С. 86–90.
30. Хомутецкая О.У., Аристакесян Е.А. % Сапопокова Г.Г. Влияние кишечного экстракта выделенного из тонкой кишки зимоспящего арктического суслика *Citellus undulatus* на формы покоя первичного сна травяной лягушки. – Л.: Наука, 1986. – С. 100–104.
31. Щенявский И.И. Исследование механизмов холодоустойчивости эритроцитов длиннохвостых сусликов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1994. – 16 с.
32. Abbotts B., Wang L., Glass J. Absence of evidence for a hibernation trigger in blood dialysate of Richardsons ground squirrel // Cryobiology. – 1979. – 16. – P. 179–183.
33. Amorese P.A., Swan H., Bamburg J.R. Extracts from the brains of hibernating and alert ground squirrels: Effects on cells in culture // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – Neurobiology. – 1982. – 79. – P. 6375–6379.
34. Beckman A.L., Dean R., Wamsley J.K. Hippocampal and cortical opioidbinding: changes related to the hibernating state // Brain Res. – 1986. – 386, № 1/2. – P. 223–331.
35. Beckman A.L., Flados-Eckman C., Stanton T.L. Physical dependence on morphine fails to develop during the hibernating state // Science. – 1981. – 212, № 4502. – P. 1527–1529.
36. Beckman A.L., Flados-Eckman C. Antagonisms of brain opioid peptide action reduced hibernation bout duration // Brain Res. – 1985. – 382, № 2. – P. 201–205.
37. Berger S. Extracts from blood of hibernation ground squittels // Fed. Proc. – 1975. – 34, № 1. – P. 97–102.
38. Dawe A.R., Spurrier E.A. The blood-borne “trigger” for natural mammalian hibernation in the 13-lined ground squirrel and the woorechuck // Cryobiology. – 9, № 3. – P. 163–172.
39. Dawe A.R., Spurrier W. Hibernation indused in ground squirrels by blood transfusion // Science. – 1969. – P. 298–299.
40. Dawson T.J. Induction of mammalian hibernation trigger // Essays on Temperature Regulation: Amsterdam North-Holland Publ. – 1975. – P. 1–18.
41. Galster W., Morrison P. Gluconeogenesis in arctic ground squirrels by blood transfusion // Science. – 1969. – 163. – 298 P.
42. Gulevsky A.K., Zagnoiko V.I., Schenyavsky I.I. et al. Peculiarities of structure-functional states of erythrocytes of homoiothermal and heterothermal animals on hypothermal storage // Cryo-Lett. – 1992. – 13, № 2. – P. 109–116.
43. Hawkins M.F., Avery D.D., Wunder B.A., Swan H. Centrally-administered bombesin: effects on body temperature, metabolic rate, and temperature setpoint // Cryobiology. – 1981. – 18, № 1. – P. 102–103.
44. Hensel H., Bruck K., Rath P. Homeothermic organisms // Temperature and life. – Berlin – N.Y., 1973. – P. 505–732.
45. Kalter V.G., Folk G.E. Humoral induction of mammalian hibernation // Comp. Biochem. Physiol. – 1979. – 63 A, № 1. – P. 7–13.
46. Kromer W. Naltrexone influence on hibernation // Experientia. – 1980. – 36, № 5. – P. 581–582.
47. Lyman C.P., Chatfield P.O. Phusiology of hibernation in mammals // Physiol. Rev. – 1955. – 35. – P. 403–447.
48. Mammalian hibernation, 1, (Proc. Ist. Int. Symp.) – Bull. Mus. – Comp. Lool. – Harward coll. – 1960. – 124. – 549 P.
49. Margules D., Goldman B., Finck A. Hibernation: an opioid-dependent state // Brain Res. Bull. – 1979. – 4, № 6. – P. 721–724.
50. Mecker R.B., Myers R.D., Mc-Caled M.L. et al. Physiology of hibernation in mammals // Physiologist. – 1979. – 22. – P. 86.

51. Muchlinski A.E., Ho Fand J., Chew P., Yamada T. The concentrations of four neuropeptides in various brain areas of summer active and hibernating *Spermophilus lateralis* // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1983. – 74 C, № 1. – P. 185–189.
52. Oeltgen P.R., Bloin R.A.O., Spurrier W.A., Myers R.D. Hibernation “trigger” alters renal function in the primate // *Physiol. Behav.* – 1985. – 34, № 1. – P. 79–81.
53. Oeltgen P.R., Oeltgen J.K. Protease and heat inactivation of a hibernation induction trigger // *Fed. proc.* – 1980. – 39, № 3. – Pt. 2. – P. 1181–1192.
54. Oeltgen P.R., Walsh J.W., Hamman S.R. et al. Hibernation trigger opioid-like inhibitory action on brain function of the monkey // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1982. – 17. – P. 1271–1274.
55. Pastuchov N., Chepikoso J., Slovicov B. et al. Role of serotonin in preparation for hibernation in active ground squirrels // *Acta Universitatis Carolinae. – Biologica.* – 1979. № 9. – P. 209.
56. Reinhardt F.G. Suppression of DNA-synthesis by peptides from the brain of estivating lung-fish *Protopterus annectens* // *Owen – Acta Universitatis Carolinae. – Biologica.* – 1981. – № 9. – P. 103–106.
57. Ruit K.A., Bruce D.S., Ching P.P. Hibernation induction trigger // *Living in the cold* // *Abstr. Inter. Symp. California Stanford Univ.* – 1985. – P. 235.
58. Spurrier W.A., Oeltgen P.R., Myers R.D. Hibernation problem // *Living in the cold* // *Abstr. Inter. Symp. California Stanford Univ.* – 1985. P. 236.
59. Swan H., Jenkins D., Knox K. Anti-metabolic extract from the brain of *Protopterus aethiopicus* // *Nature.* – 1968. – 217. – P. 671–673.
60. Swan H., Reinhardt F.G., Caprio D.L. et al. Hypometabolic brain peptide from vertebrates capable of torpor // *Cryobiology.* – 1981. – 18, № 6. – P. 598–602.
61. Swan H., Schatte C. Anti-metabolic extract from the me brain of the hibernating ground squirrel *Citellus tridecemlineatus* // *Science.* – 1977. – 195. – P. 84–85.
62. Wang L.C.H. Mammalian hibernation // *The effects of low temperatures on biological systems.* – London. – 1985. – P. 349–385.

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

Поступила 18.05.95

А.М.БІЛОУС, В.І.ЗАГНОЙКО, О.К.ГУЛЕВСЬКИЙ

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ І МЕХАНІЗМ ДІЇ ПЕПТИДІВ, ЯКІ РЕГУЛЮЮТЬ ПРОЦЕС ГІБЕРНАЦІЇ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

На підставі огляду даних літератури присвячених проблемам зимової сплячки тварин показана важлива роль регуляторних пептидів, які мають інгібуючу дію на метаболізм і температуру тіла гібернуючих тварин. Звертається увага на те, що дослідження природи, структури і механізму дії регуляторних пептидів — “триггерів сплячки” може мати велике значення для розробки нових методів лікування в медичній практиці.

A.M.BELOUS, V.I.ZAGNOIKO, A.K.GULEVSKY

BIOLOGICAL ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION OF PEPTIDES WHICH REGULATE THE PROCESS OF HIBERNATION

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

Using the reported data on the problems of hibernation of animals, an important role of peptides, which exercise inhibiting action on the metabolism and body temperature of the hibernating animals, was supported. Attention is drawn to the fact that a study of the nature, structure and mechanism of action of the regulatory peptides — “triggers of hibernation” — may be useful in the development of the new methods in medical practice.

**Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, Л.Н.Марченко,
Е.В.Алтуева**

**К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОХЛАЖДЕННОГО
МОЗГА. Сообщение 5. Гематоэнцефалический барьер как
структурно-функциональное звено центральных
нейротрансмиттерных механизмов терморегуляции**

Исследованы структурно-функциональные механизмы повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для терморегуляторных нейротрансмиттеров. Развиваются представления о роли ГЭБ в центральных нейромедиаторных процессах обеспечения температурного гомеостаза. Обосновывается гипотеза об участии вторичных мессенджеров и цитоскелетных структур в избирательном транспорте из крови в мозг норадреналина и ацетилхолина при ритмических холодовых воздействиях.

С 60-х годов не уменьшается количество работ, посвященных сложной нейромедиаторной организации функциональных систем, обеспечивающих температурный гомеостаз [2, 15, 16], но до сих пор ни в одной из существующих нейротрансмиттерных моделей центральной терморегуляции не учитывалось состояние механизмов проницаемости ГЭБ. Возможно, именно поэтому они мало применимы к специфическим гипометаболическим состояниям организма типа зимней спячки, сна, адаптации к гипотермии и т.п., возникающим при экстремальных или систематически действующих факторах внешней среды. В этой связи, по нашему мнению, давно назрела необходимость в разработке научной концепции ГЭБ как основы сверхмедленной управляющей системы организма [4, 9] и важного звена центральной терморегуляции при искусственной и естественной гипотермии [10]. Однако в настоящее время механизм проницаемости ГЭБ для большинства термокомпетентных нейромедиаторов и регуляция специфических нейротрансмиттерных процессов терморегуляции остаются неясными. Как известно, центральные механизмы обеспечения теплопродукции организма во многом опосредуются моноаминами и ацетилхолином [2, 15, 16], которые в физиологических условиях обычно не проникают через ГЭБ [2–4] и вряд ли имеют систему специфических переносчиков. Если считать, что ГЭБ все же в некоторых условиях может включаться в терморегуляторные нейрофизиологические механизмы, необходимо выяснить, как может быть обеспечена избирательность проницаемости при относительной неспецифической активации ГЭБ в условиях температурных воздействий. В своей работе мы попытались подойти к решению этой проблемы.

Эксперименты проведены на белых крысах массой 200–250 г. Изучали влияние ритмических холодовых воздействий на каудальные терморецепторы длительностью 1 с с частотой 0,1 Гц (0,1 Р) на секрецию и проницаемость ГЭБ для ^3H -норадреналина (^3H -НА) и ^3H -ацетилхолина (^3H -АХ), определяли коэффициент секреции (K_c) и коэффициент проницаемости (K_p). Определяли содержание цАМФ и цГМФ с использованием наборов реактивов и по методическим рекомендациям фирмы «Amersham», Англия. Регистрировали биоэлектрическую активность (ЭЭГ) и электрокардиограмму (ЭКГ) во 2-м стандартном отведении на электроэнцефалографе BST-1. Электронногистохимические исследования образцов гипоталамуса проводили традиционными методами [17]. Методические подробности описаны ранее [3, 4, 9, 10].

Гематоэнцефалический барьер, как любая другая функциональная система организма, осуществляет регуляцию с помощью сложного комплекса прямых и обратных связей, что предполагает наличие колебательного контура с собственной частотой. В своих исследованиях мы усилили колебательные процессы в исполнительных механизмах барьера ритмическим холодовым

раздражением каудальных терморцепторов, используя одну из природных особенностей ГЭБ – наличие резонансных явлений в диапазоне 0,1–0,2 Гц [4, 9].

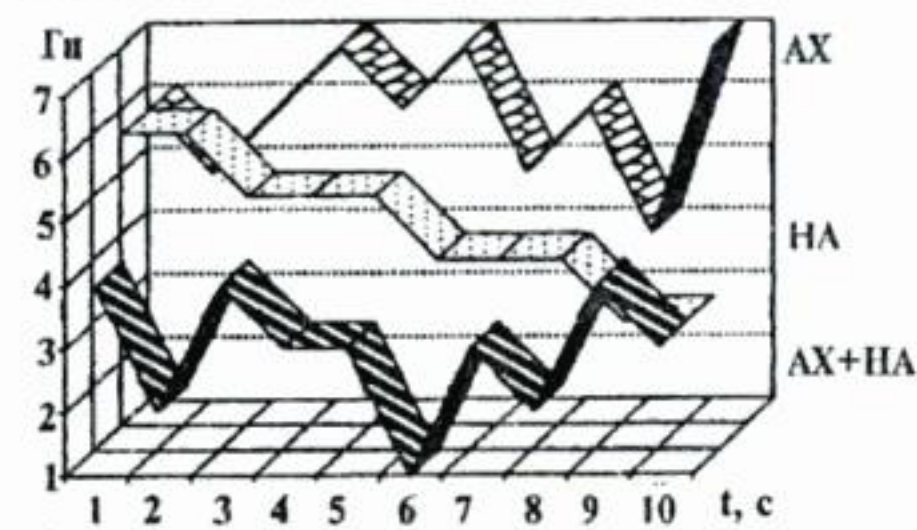


Рис. 1. Динамика ЧСС при системном введении нейромедиаторов на фоне 0,1Р. По оси X — время воздействия после введения ацетилхолина (АХ), норадреналина (НА), ацетилхолина и норадреналина одновременно (АХ+НА); по оси Y — ЧСС (количество R зубцов в секунду)

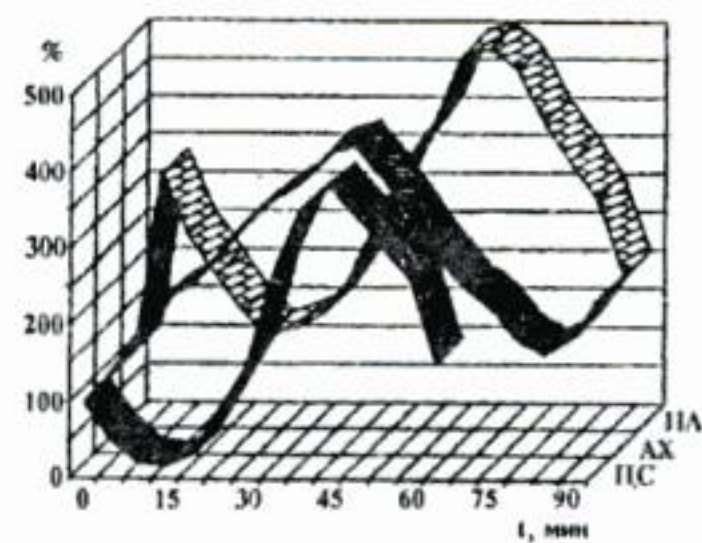


Рис. 2. Изменение проницаемости ГЭБ и цитоскелетных элементов эндотелиоцитов при 0,1 Р. По оси X — время воздействия; по оси Y — изменения относительно нормы, принятой за 100%. НА — проницаемости ГЭБ для норадреналина (НА), ацетилхолина (АХ), ЦС — длины микротрубочек цитоскелета эндотелиоцитов

Результаты экспериментов показали, что на 50–60-й мин воздействия при системном введении АХ и НА наблюдается центральный эффект на частоту сердечных сокращений (ЧСС), т.е. АХ не снижает, а повышает, а НА не увеличивает, а понижает ЧСС (рис. 1). Это может свидетельствовать об увеличенной проницаемости ГЭБ для данных нейромедиаторов, что и подтвердили прямые эксперименты. При этом максимумы проницаемости для ³H-НА и ³H-АХ оказались на разных этапах 0,1 Р (рис. 2), что противоречит представлениям о неспецифическом прорыве ГЭБ в подобных условиях [5]. Электронно-микроскопический анализ образцов гипоталамуса позволил выявить повышение на начальном этапе охлаждения активности норадренергических синапсов (табл.), которые усиливают доминирующий нейротрансмиттерный процесс терморегуляторных механизмов [15]. В этот момент необходима поддержка функции центральных нейротрансмиттерных систем норадреналином из крови в качестве локального нейрогормона, что обеспечивается повышением проницаемости ГЭБ для НА уже на 5-й мин воздействия (рис. 2). Продолжение гипотермического воздействия приводит к активации АХ нейронов (табл.), инициирующих увеличение теплопродукции [15]. Этому процессу способствует высокая проницаемость ГЭБ для АХ на 50-й мин 0,1Р и НА на 65-й мин воздействия (рис. 2).

Влияние ритмических холодовых воздействий на ультраструктурные характеристики гематоэнцефалического барьера

Параметры	Время воздействия, мин			
	0	20	40	60
1. Относительная длина аблюминальной мембраны эндотелиоцитов	0,5±0,03	0,55±0,03	0,53±0,04	0,48±0,02
2. Относительная длина люминальной мембраны эндотелиоцитов	0,46±0,03	0,36*±0,02	0,42±0,03	0,42±0,03
3. Относительная длина латеральной мембраны эндотелиоцитов	0,04±0,005	0,09*±0,006	0,05±0,003	0,1±0,008
4. Диаметр осмиефильных клатриновых везикул, нм	66±6	66±6	66±6	66±6
5. Диаметр осмиефобных клатриновых везикул, нм	150±15	150±15	150±15	150±15
6. Расстояние между микротрубочками эндотелиоцитов, нм	96±6	96±6	66±6	86±6
7. Количество эндотелиоцитов с фагоцитирующим перицитом, %	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	33±4
8. Количество активных норадренергических синапсов С-типа, %	32±5	80*±9	70*±8	60*±6
9. Количество активных ацетилхолинергических синапсов S-типа, %	25±3	30±4	75*±8	55*±6

Примечание. * — различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Видимо, функциональное состояние ГЭБ может влиять на ацетилхолинергические и норадреналинергические механизмы обеспечения теплопродукции, причем посредством достаточно хорошо изученных биохимических реакций. Увеличение при 0,1 Р секреции нейротрансмиттеров должно приводить к активации системы вторичных и ретроградных мессенжеров: Ca^{2+} [2, 3], NO, цАМФ и цГМФ [9]. При этом, очевидно, активируются соответствующие протеинкиназы, регулирующие процессы фосфорилирования цитозольных и цитоскелетных белков, создавая условия для повышенной проницаемости ГЭБ [8, 9].

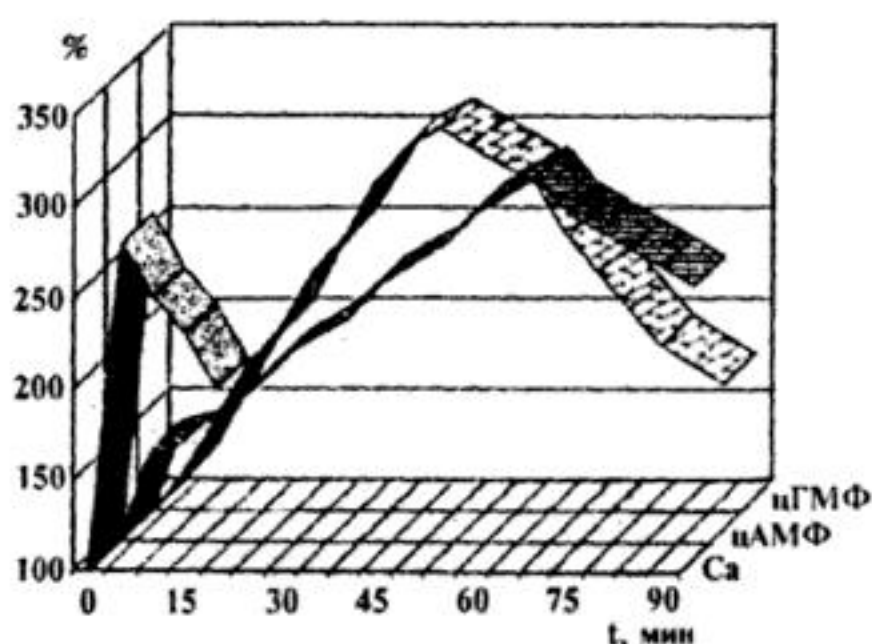


Рис. 3. Динамика содержания и аккумуляции вторичных мессенжеров головного мозга крыс при 0,1 Р. По оси X: время воздействия; по оси Y: цГМФ — содержание циклического гуанинмонофосфата, цАМФ — содержание циклического аденозинмонофосфата, Ca — аккумуляция кальция. Контрольные значения приняты за 100 %

ротрубочек [11], относительная длина которых возрастает почти на порядок (рис. 2). На этом этапе воздействия отмечается максимум проницаемости ГЭБ для АХ (рис. 2). Далее, когда содержание цГМФ начинает снижаться, а цАМФ продолжает повышаться, происходит уменьшение длины микротрубочек, развивается второй максимум проницаемости для ^3H -НА и т.д. Таким образом, в самом общем виде можно предположить, что повышение проницаемости ГЭБ для НА каким-то образом связано с деполимеризацией тубулина, а увеличение проницаемости барьера для АХ — со сборкой микротрубочек.

В следующей серии экспериментов мы попытались выяснить конкретные механизмы, обеспечивающие относительную избирательность проницаемости ГЭБ для АХ и НА при гипотермических воздействиях. Ранее нами было показано, что повышение проницаемости ГЭБ при 0,1 Р для НА обеспечивается высокоспецифическим рецептор-индуцированным транцитозом [10]. Важным этапом и своеобразным электронно-микроскопическим маркером этого процесса является образование так называемых “одетых” или клатриновых везикул [6–8], содержание которых при 0,1 Р существенно увеличивается [10]. Детальный анализ электронограмм исследованных образцов гипоталамуса показал неоднородность популяции этих везикул, которые в одной и той же эндотелиальной клетке существенно различались размерами — от 50 до 250 нм и электронной плотностью. К 50-й мин воздействия при максимальной проницаемости ГЭБ для АХ увеличивается количество более крупных и менее электронно-плотных клатриновых везикул (табл.), а на 65-й мин 0,1 Р отмечается появление мелких осмиофильных “одетых” пузырьков (рис. 4). Процессы везикулярного транспорта в общих чертах универсальны для разных клеточных систем [6–8, 12]. Поэтому можно предположить, что осмиофильные клатриновые везикулы могут быть переносчиками НА, а осмиофобные —

Действительно, в первые минуты 0,1 Р существенно возрастает секреция ^3H -НА [10], увеличиваются содержание цАМФ и аккумуляция Ca^{2+} (рис. 3), начинается разборка микротрубочек цитоскелета, относительная длина которых к 20-й мин воздействия снижается в 3 раза (рис. 2). Процесс может осуществляться за счет цАМФ-зависимого фосфорилирования высокомолекулярных белков [1, 14], ассоциированных с микротрубочками, а также тубулина [7, 8]. Данный этап 0,1 Р характеризуется первым максимумом проницаемости для ^3H -НА. Дальнейшее охлаждение приводит к увеличению активности ацетилхолинергических процессов (табл.), стимулируется накопление цГМФ (рис. 3), опосредующее полимеризацию тубулина мик-

АХ, аналогично тому как синапсы С-типа с электронно-плотными везикулами считаются моноаминергическими, а S-типа со светлыми синаптическими пузырьками — ацетилхолинергическими [18]. В таком случае разница в величине транспортных везикул могла бы способствовать избирательной проницаемости ГЭБ для термокомпетентных нейромедиаторов.

На сегодня из всех гипотез механохимическая концепция везикулярного транспорта [7, 8] наиболее разработана и представляется нам перспективной для обсуждаемой проблемы. Транспорт “одетых” везикул осуществляется по нитям цитоскелета к району экзоцитоза. Поэтому вначале необходимо было выяснить локализацию мест конечного этапа транскитоза АХ и НА. Увеличение эндоцитоза при 0,1 Р [10] приводит к естественному сокращению относительной длины люминальной мембраны, однако при этом длина аблюминального контура существенно не возрастает, в то время как латеральная мембрана эндотелиоцитов, образуя плотные контакты, удлиняется в 1,5–2 раза (табл.). Транскитоз везикул предполагает сочетание эндо- и экзоцитоза, на стороне эндоцитоза до завершения рециклизации должно происходить уменьшение, а со стороны экзоцитоза — увеличение мембраны эндотелиоцита [8]. В нашем случае при неизменной длине аблюминального контура транскитоз может осуществляться, например, за счет временных трансэндотелиальных

каналов или постоянного водного пространства в районе плотных контактов, на стороне которых возрастает длина мембраны. Можно предположить, что эти два возможных пути определяют селективную проницаемость ГЭБ для АХ и НА. Высказанное предположение косвенно подтверждается центральными эффектами АХ и НА при системном введении нейромедиаторов. Такое влияние нейротрансмиттеров на динамику изменения ЧСС при 0,1 Р должно в известной степени отражать особенности проницаемости ГЭБ. При введении НА на фоне 0,1 Р ЧСС снижается линейно и сохраняется на пониженном уровне 5–10 мин (рис. 1). В подобных условиях при введении АХ изменение ЧСС носит синусоидальный характер: периоды повышения ритмики сменяются периодами снижения ЧСС с частотой 0,1–0,5 Гц (рис. 1). Можно предположить, что процессы повышения проницаемости ГЭБ для НА и АХ разнесены в пространстве и времени. Если проницаемость ГЭБ для НА на основе его центральных эффектов на ЧСС хорошо объясняется наличием системы относительно постоянно существующих каналов, то динамика ЧСС при системном введении

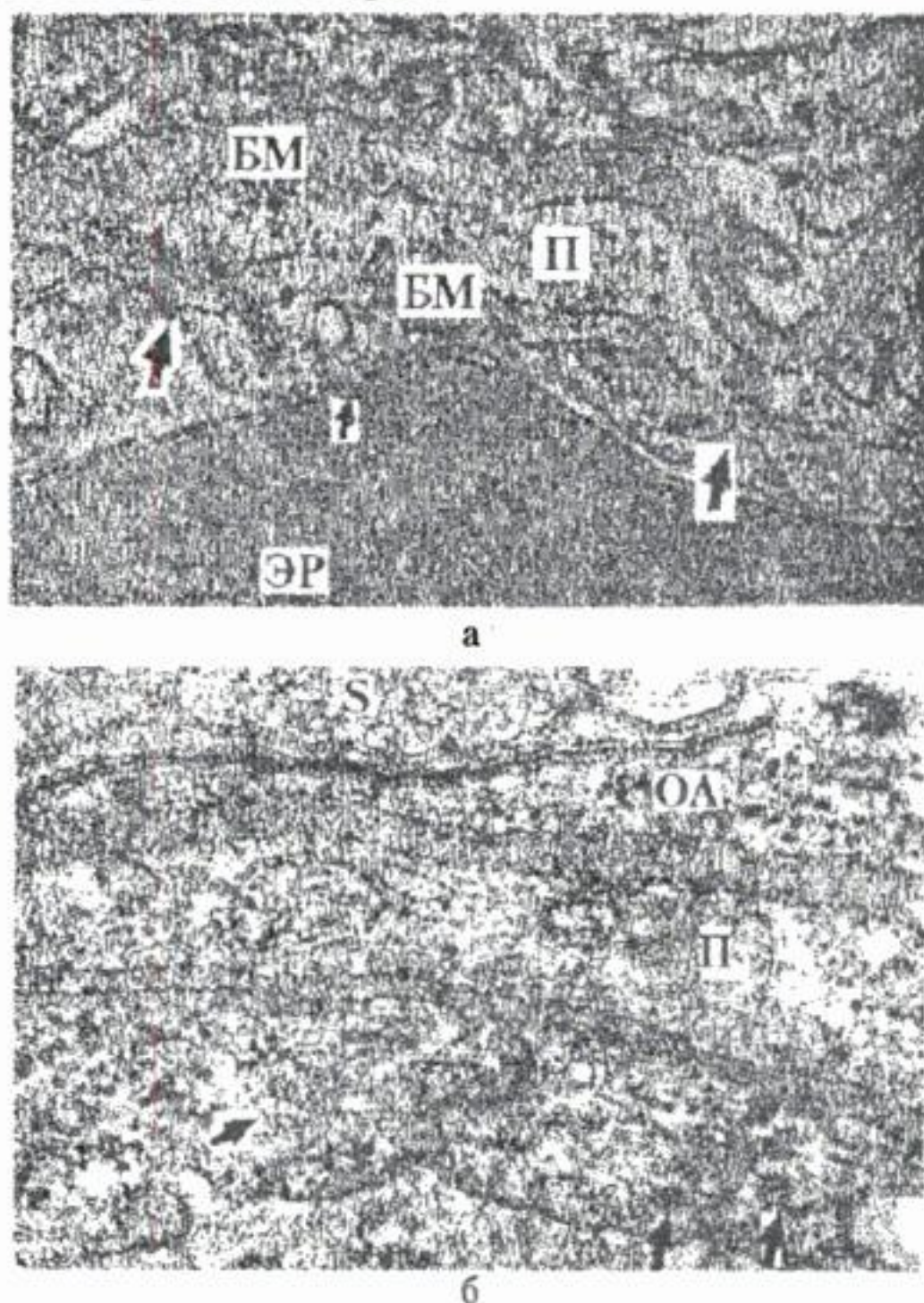


Рис. 4. Фрагменты стенки капилляра из переднего (а) и заднего (б) отделов гипоталамуса крысы, 60 мин 0,1 Р. X 150 000: а — формирование “одетой” ацетилхолинергической везикулы (малая стрелка) и слияние люминальной и аблюминальной мембраны эндотелиоцита (большая стрелка) с образованием фенестроподобной структуры; б — клатриновые норадренергические везикулы и микротрубочки в цитоплазме эндотелиоцита. П — перицит; ОА — отростки астроцитов; S — синаптический бутон. Уменьшение при репродуцировании 3/5

АХ, напротив, свидетельствует о том, что проницаемость ГЭБ для АХ могла быть обеспечена “временными” каналами, пропускающими АХ с секундной ритмикой.

Анализируя роль цитоскелетной сети в избирательном транспорте, следует обратить внимание на важное, хотя не бесспорное положение о том, что активная роль в генерации движения принадлежит системе актин-миозин, тогда как пассивная — микротрубочкам, по которым, как по “рельсам”, движутся везикулы и органеллы [6–8]. По нашему мнению, определяющим избирательность трансцитоза элементом цитоскелета являются микротрубочки, хотя в эндотелиоцитах они выявляются намного реже, чем другие элементы, особенно в условиях гипотермии [12]. Это может быть связано с высокой чувствительностью к изменению температуры одной из популяций микротрубочек (происходит разборка, деполимеризация [8, 12]). Остальные 65% устойчивых к холоду фракций [7] все же подвержены разрушающему действию тубулина при осмиевой фиксации [12]. Исследования топографии микротрубочек свидетельствуют об их преимущественной ориентации вдоль длинной оси эндотелиоцитов [12] (рис. 4). Мы полагаем, что при 0,1 Р микротрубочки, помимо участия в контроле формы клеток [6], играют основную роль во внутриклеточной компартментализации, определяя фрактальную геометрию трансцитоза [9] и формирование путей предпочтительного перемещения эндосом.

В настоящее время описаны два основных типа генерации движения везикул [7, 8]. Первый механизм предполагает, что движение эндосом происходит вследствие скольжения одной цитоскелетной нити относительно другой. В этом случае контактные участки могут быть гомологичного и гетерологичного типов. Если одна цитоскелетная нить ассоциирована с клеточной мембраной, а другая с мембранами везикул, то при скольжении нити частицы будут двигаться толчками в ту или иную сторону, а длина нити не изменится. Однако такого рода следствия, вытекающие из данного механизма, не соответствуют результатам наших электронно-микроскопических исследований, в которых, в частности, показано существенное изменение длины микротрубочек при 0,1 Р (рис. 2). Кроме того, трудно представить, как при такой организации трансцитоза могла бы обеспечиваться относительная избирательность переноса.

Существует иная возможность генерации движения везикул путем управляемой сборки-разборки цитоскелетных цепей, при этом длина нити должна изменяться, что согласуется с результатами наших экспериментов. Действительно, как отмечалось, в начале охлаждения увеличивается уровень цАМФ и происходит разборка тубулиновых нитей (рис. 2, 3). Морфометрия электроннограмм показывает, что диаметр осмиофильных, вероятно норадренергических, “одетых” везикул существенно меньше расстояния между микротрубочками (рис. 4, табл.). Поэтому существует возможность их транспорта «на гребне волны» деполимеризации внутри разрушающегося тубулинового «туннеля» вплоть до момента потери контакта микротрубочек с плазмалеммой. В результате этого в зоне плотных контактов эндотелиоцитов будет происходить модификация подвижности и кластеризации интегральных белков мембраны [8, 9], обуславливая известный феномен активации экзоцитоза после усиления эндоцитоза [9]. При этом норадреналин может поступать в открытую часть плотных контактов, которые, по нашему мнению, могут играть роль постоянных каналов.

Продолжение гипотермического воздействия может приводить к цГМФ-зависимому встречному процессу сборки тубулиновых нитей, что вызывает изменение расстояния между микротрубочками (оно меньше диаметра осмиофильных, предположительно ацетилхолинергических, “одетых” везикул (табл.). Поэтому они могли бы “сшивать клатриновыми иглами” нити тубули-

на и двигаться навстречу деполимеризационной волны, которая, достигнув клатриновой пробки, освободит ацетилхолинергические везикулы от “клатриновой шубы”. На этой стадии они, в отличие от норадренергических пузырьков, открыты для слияния с временными водными каналами, обильно образующимися к 30–60-й мин 0,1 Р [10] (рис. 4, 5). В дальнейшем, когда уровень цГМФ снижается, а цАМФ-зависимая деполимеризация микротрубочек продолжает усиливаться (рис. 2, 3), отмечается второй пик проницаемости ГЭБ для НА (рис. 2). При этом увеличение латеральной мембраны становится критическим (табл.), что, возможно, приводит к запредельному растяжению плотных контактов. В этот момент из дубликатуры базальной мембраны проникают отростки фагоцитирующих перицитов (рис. 5, табл.), которые утилизируют из каналов оставшиеся запасы транспортируемых нейромедиаторов. Очевидно, в результате этого проницаемость ГЭБ для АХ и НА снижается и завершается первый цикл в каскаде центральных механизмов регуляции теплопродукции.

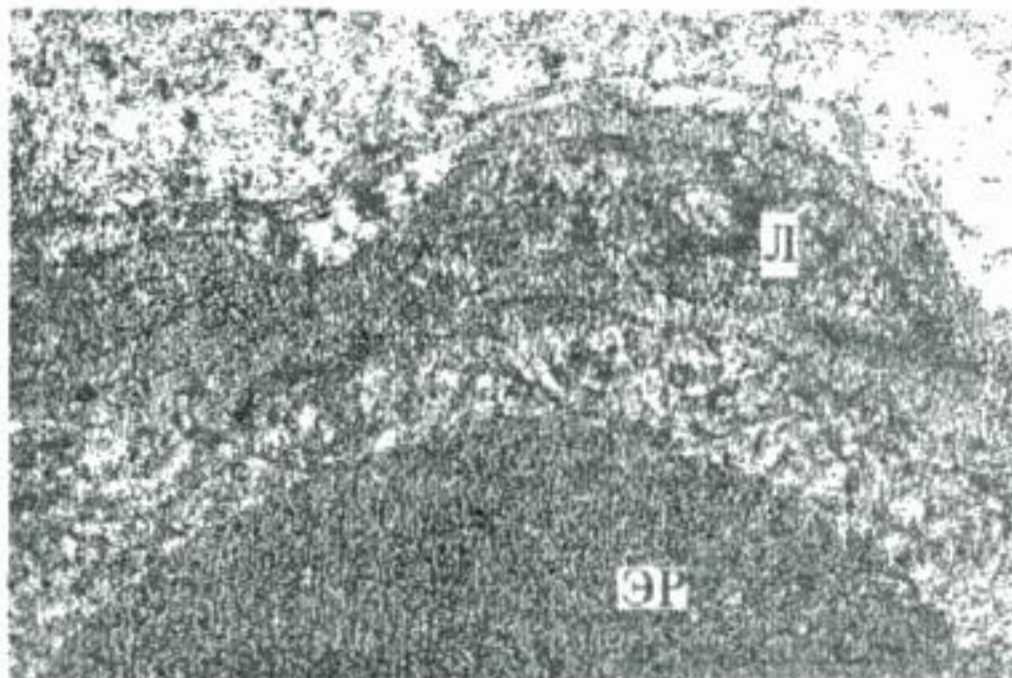


Рис. 5. Отложение пероксидазы хрена в лизосоме (Л) перицита и в месте контакта эндотелиоцита с фагоцитирующим перицитом 60 мин 0,1 Р. ЭР — эритроцит в просвете капилляра. X 100 000. Уменьшение при репродуцировании 3/5

Описанная гипотетическая модель избирательной проницаемости ГЭБ для термокомпетентных нейротрансмиттеров, опираясь на ряд прямых нейрохимических и электронно-микроскопических доказательств, может объяснять и некоторые следствия из электрофизиологических исследований на уровне целостного организма. Так, из предполагаемой схемы следует, что при одновременной активации сходной интенсивности симпатических и парасимпатических процессов ацетилхолин- и норадреналин-содержащие клатриновые везикулы будут с большей вероятностью сталкиваться при встречном транспорте и преодолевать ГЭБ совместно по временным водным каналам. Об этом, в частности, свидетельствует динамика ЧСС охлажденного организма, которая носит синусоидальный характер как при системном введении одного АХ, так и при насыщении крови одновременно НА и АХ (рис. 1).

Таким образом, вероятно, существует принципиальная возможность участия ГЭБ в нейротрансмиттерных процессах обеспечения температурного гомеостаза при искусственном охлаждении организма. Учитывая скорее физиологический, чем патофизиологический, характер используемого воздействия, можно предположить, что от функциональной активности ГЭБ зависят и некоторые специализированные нейромедиаторные механизмы центральной терморегуляции при естественной гипотермии. Данной проблеме будет посвящено следующее сообщение, завершающее этот цикл статей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аоки Ч., Сикевич Ф. Пластичность в развитии мозга // В мире науки. — 1989. — № 2. — С. 22–31.
2. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Ломакин И.И., Белостоцкий А.В. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. — Киев: Наук. думка, 1992. — 208 с.
3. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Пастухов Ю.Ф. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 1. Системное введение бомбезина повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера для нейромедиаторов // Пробл. криобиологии. — 1995. — № 1. — С. 3–9.
4. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Шило А.В. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 2. Ритмические холодовые

- воздействия повышают проницаемость гематоэнцефалического барьера для терморегуляторных нейромедиаторов // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 2. – С. 3–8.
5. Бобрик И.И., Шевченко Е.А., Черкасов В.Г. Развитие кровеносных и лимфатических сосудов. – К.: Здоров'я, 1991. – 207 с.
 6. Бредбери М. Концепция гемато-энцефалического барьера. – М.: Медицина, 1983. – 480 с.
 7. Глебов Р.Н. Свойства, структура и функции сократительных белков мозга и надпочечников. Механо-химическая природа секреторных процессов // Итоги науки и техники. Биол. химия. – 1982. – 17. – С. 147–286.
 8. Глебов Р.Н. Эндоцитоз и экзоцитоз. – М.: Высш. шк., 1987. – 95 с.
 9. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Шило А.В. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3. Оксид азота (II) — один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 3. – С. 10–19.
 10. Марченко Л.Н., Бабийчук Г.А., Марченко В.С. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 4. Ультраструктурные особенности и функциональная активность ГЭБ при ритмических холодовых воздействиях // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 4. – С. 3–12.
 11. Сосудистый эндотелий / Под ред. В.В.Куприянова, И.И.Бобрика, Я.Л.Караганова. – К.: Здоров'я, 1986. – 248 с.
 12. Учицзоно К. Возбуждение и торможение. Морфология синапсов. – К.: Наук. думка, 1980. – 216 с.
 13. Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. – М.: Мир, 1987. – 117 с.
 14. Aoki Ch., Siekevitz Ph. Ontogenetic changes in the cyclic adenosine 3',5' — monophosphate-stimulatable phosphorylation of cat visual cortex proteins, particularly of microtubule-associated protein 2 (MAP2) // J. Neuroscience. – 1985. – 5. – № 9. – P. 2465–2483.
 15. Bligh J. Neuronal model of hypothalamic temperature regulation: hypothalamus in temperature regulation // Recent studies of hypothalamic function. – Basel: S. Karger, 1974. – P. 315–327.
 16. Myers R. Hypothalamic control of thermoregulation: neurochemical mechanisms // Handbook of the hypothalamus / Ed. Morgane P.J., Pankepp J. – Dekker, N. Y., 1980. – 3. – P. 83–210.
 17. Trout J.J., Koenig H., Goldstone A.D., Lu C.Y. Blood-brain barrier breakdown by cold injury. Polyamine signals mediate acute stimulation of endocytosis, vesicular transport and microvillus formation in rat cerebral capillaries // Lab. Investigation. – 1986. – 55. – № 6. – P. 622–631.

Ин-т проблем криобиологии

Поступила 17.05.96

и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Г.О.БАБІЙЧУК, В.С.МАРЧЕНКО, Л.М.МАРЧЕНКО, О.В.АЛТУЄВА

ДО МЕХАНІЗМІВ РЕГУЛЯЦІЇ ПРОНИКНОСТІ ГЕМАТОЕНЦЕФАЛІЧНОГО БАР'ЄРУ ОХОЛОДЖЕНОГО МОЗКУ. Повідомлення 5. Гематоенцефалічний бар'єр як структурно-функціональна ланка центральних нейротрансмітерних механізмів терморегуляції

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Досліджено структурно-функціональні механізми підвищення проникності ГЕБ для терморегуляторних нейротрансмітерів. Розвинуто уявлення щодо ролі ГЕБ у центральних процесах забезпечення температурного гомеостазу. Обґрунтовується гіпотеза про участь вторинних месенжерів і цитоскелетних структур у виборочному транспорті із крові в мозок норадреналіну та ацетілхоліну при ритмічних холодових впливах.

G.A.BABIYCHUK, V.S.MARCHENKO, L.N.MARCHENKO, E.V.ALTUYEVA

MECHANISM OF REGULATING PERMEABILITY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER OF THE COOLED BRAIN. Report 5. The blood-brain barrier as a structure-functional link in the central neurotransmitting mechanisms of thermal regulation

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

The authors studied the structure-functional mechanisms of increasing the BBB permeability to the thermoregulatory neurotransmitters. Subsequently they speculate on the knowledge on the role of the BBB in the central neuromediator processes which provide for temperature homeostasis, and substantiate a hypothesis on the involvement of the secondary messengers and cytoskeletal structures in the selective transport of norepinephrine and acetyl choline from blood into the brain during rhythmic cold exposures.

**В.И.Луговой, В.К.Мазалов, В.В.Чижевский,
Т.П.Говоруха**

О МЕХАНИЗМЕ КРИОЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДОВ ПРИ ГЛУБОКОМ ОХЛАЖДЕНИИ ТЕПЛОКРОВНОГО ОРГАНИЗМА

Исследована возможность применения полиэтиленоксидов с целью коррекции функционального состояния организма после общего острого охлаждения. Представленные результаты свидетельствуют о том, что в механизме положительного влияния ПЭО-400 на патофизиологические показатели при общем остром охлаждении организма важную роль играет противоотечное, осмодиуретическое действие вещества в процессе развивающегося синдрома отека мозга экспериментальных животных. Отмечено, что введение ПЭО-400 изменяет проницаемость ГЭБ для ^3H -норадреналина. Это позволяет предположить возможное воздействие полиэтиленоксидов на нейротрансмиттерные реакции охлажденного мозга.

Влияние температуры ниже физиологической нормы на теплокровных животных, в том числе человека, нашло достаточно широкое освещение в ряде экспериментальных и клинических работ, в которых выявлены системные изменения организма как в случае применения гипотермии с медицинскими целями (лечебная гипотермия), так и в непредсказуемых, "аварийных" ситуациях [5, 7, 11]. В большинстве из упомянутых исследований изучение соответствующих системных реакций организма, как правило, ограничивается относительно длительным сроком акклимации или акклиматизации к холодовому фактору или к его последствиям, и лишь в некоторых работах [5] речь идет о структурно-функциональных изменениях в организме под действием кратковременного острого глубокого охлаждения. При этом предложенные схемы лечения последствий охлаждения организма включают методы традиционной эпипатогенетической терапии возникших изменений и не касаются использования с этой целью специфических криозащитных веществ, которые, вероятно, могут оказывать положительный терапевтический эффект. Подобное предположение основано на ранее полученных данных [6], свидетельствующих о том, что внутривенное введение растворов криопротекторных веществ из класса полиолов (полиэтиленоксиды с молекулярной массой 400 и 1500) вызывает значительное уменьшение патофизиологических проявлений экспериментального отека мозга, вызванного локальным холодным воздействием (-18°C) на головной мозг экспериментальных животных. Поэтому целью настоящего исследования является изучение возможности криозащитного действия полиэтиленоксида на ряд морфофункциональных показателей организма при общем глубоком остром охлаждении животных.

В опытах использованы 75 половозрелых белых крыс-самцов массой около 200 г. Острое охлаждение животных осуществляли без предварительной премедикации, помещая их в водяную баню с температурой воды от 37 до $0,5^\circ\text{C}$, где крысы плавали в течение 5–6 мин до достижения различной ректальной температуры (РТ), которую измеряли с помощью электротермометра ТПМ-1. Части животным за 15–20 мин до охлаждения в водяной бане *per os* вводили 15%-й раствор полиэтиленоксида (ПЭО-400) из расчета $0,5$ г вещества на кг массы животного. Таким образом, экспериментальные животные были разделены на три группы: 1) контрольные (интактные) животные; 2) животные, которые подвергались острому охлаждению; 3) животные, которым перед охлаждением вводили раствор ПЭО-400. В процессе охлаждения у экспериментальных животных измерялись уровень внутричерепного давления (ВЧД) и содержание воды в тканях мозга, которые определяли как описано в [6]. С целью выяснения степени проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для норадреналина подопытным крысам вводили меченый по Н медиатор из расчета $50 \mu\text{Ci/g}$ массы животного. После охлаждения животные

забивались декапитацией, у них брали кровь, а также участки мозговой ткани для морфологического и радиоизотопного исследований.

Коэффициент проницаемости (K_{Π}) ГЭБ определяли отношением содержания меченого ^3H -норадреналина в образцах ткани мозга (T) к его концентрации в крови (K_p) по формуле: $K_{\Pi} = \frac{T}{K_p}$. Фрагменты ткани мозга крыс фиксировали в 10%-м нейтральном формалине (24 ч), после чего обезвоживали в спиртах восходящей плотности и заливали в целлоидин. Окраска целлоидиновых срезов толщиной 5–7 мкм проводилась гематоксилином Эрлиха и эозином. Препараты смотрели на микроскопе МБР-3.

Статистическую обработку результатов исследований проводили по методу Фишера-Стьюдента.

Т а б л и ц а 1

Изменение ректальной температуры и выживаемости крыс после острого охлаждения их с применением ПЭО-400 и без ПЭО-400 в зависимости от температуры охлаждающей среды

Температура охлаждаемой воды, 0 °С	Ректальная температура, 0 °С		Смертность животных, %	
	Без ПЭО-400	+ПЭО-400	Без ПЭО-400	+ПЭО-400
37	36,1±0,5	36,6±0,2	0	0
22	35,8±0,4	36,2±0,8	0	0
9	21,5±1,3	31,4±0,7	70–80	0
3	19,6±1,2	24,6±1,2	100	0
0,5	17,3±0,5	23,3±0,4	100	0

Примечание. Ректальная температура у интактных (контрольных) крыс была на уровне (37,2±0,8) °С.

Как видно из представленных данных (табл. 1), охлаждение животных в воде приводит к значительному снижению у них РТ, которая достигала 17 °С при температуре водяной бани 0,5 °С. При этом наблюдалось существенное, почти в 2 раза, повышение ис-

ходного внутричерепного давления, которое сопровождалось увеличенным содержанием воды в ткани головного мозга экспериментальных животных. Отмечалась также, начиная с РТ 21,5 °С, значительная гибель подопытных крыс, которые по достижении РТ около 20 °С и ниже составляла почти 100% (табл. 1). После введения животным 5%-го раствора ПЭО-400 (табл. 2) не наблюдалось столь резкого и критического снижения у них РТ, как это имело место у животных без применения ПЭО-400, а также заметного повышения ВЧД и увеличения содержания воды в головном мозге. При этом отмечалась почти 100%-я выживаемость крыс в процессе эксперимента.

Т а б л и ц а 2

Внутричерепное давление (мм рт. ст.) и содержание общей воды в мозге крыс после острого охлаждения их с применением и без применения ПЭО-400 в зависимости от ректальной температуры

Без применения ПЭО-400			С применением ПЭО-400		
РТ, °С	ВЧД, мм рт. ст.	Вода, %	РТ, °С	ВЧД, мм рт. ст.	Вода, %
36,1±0,5	2,8±0,3	76,3±0,3	36,6±0,2	2,3±0,3	76,1±0,2
35,8±0,4	3,5±0,4	77,8±0,3	36,2±0,8	2,2±0,4	75,3±0,7
21,5±1,3	4,6±0,3	79,2±0,2	31,4±0,7	2,6±0,3	77,2±0,5
19,6±1,2	5,4±0,5	80,9±0,3	24,6±1,2	2,5±0,4	76,6±0,2
17,3±0,5	4,7±0,2	79,4±0,2	23,3±0,4	2,3±0,2	75,6±0,6
контроль (иск.)					
37,2±0,8	2,4±0,2	75,8±0,4	37,0±0,5	2,3±0,2	75,6±0,6

С этими данными согласуются и результаты гистологического морфологического исследования срезов головного мозга крыс. Так, микроскопически кора головного мозга контрольных животных характеризовалась типичной слоистой структурой из нейроцитов, которые имели округлые ядра с равномерным распределением хроматина и различную плотность цитоплазмы, а также очаговыми скоплениями нейроцитов в области подкорковых ядер. Между нейроцитами определялись тонкие капилляры, местами с узкой периваскулярной щелью. Мягкая мозговая оболочка, прилежащая непосредственно к

ткани мозга, представлена тонкими слоями соединительной ткани с умеренным кровенаполнением сосудов. Сосудистое сплетение желудочков — с четкой структурой эпендимальных клеток и расширенными, заполненными кровью сосудами. Кора мозжечка характеризовалась слоистой структурой из мелких и крупных нейроцитов. На границе молекулярного и зернистого слоя определялись крупные тела грушевидных клеток.

После плавания животных в холодовой бане при 3 °С микроскопически обнаруживалось расширение и кровенаполнение сосудов мягкой мозговой оболочки. Расширены и заполнены кровью часть сосудов подкорковых областей. Цитоархитектоника коры и подкорковых образований — без существенных изменений. Нейроциты имели округлые преимущественно просветленные ядра и неравномерно гипохромную цитоплазму. Отмечалось повышенное кровенаполнение сосудов мягкой мозговой оболочки в области мозжечка и местами повышение проницаемости сосудистого русла коры мозжечка с выходом эритроцитов за пределы стенки сосудов. Полученные данные свидетельствуют о выраженных изменениях микроциркуляторного русла коры головного мозга и мозжечка, характерных для отека мозга [4].

После предварительного введения препарата ПЭО-400, с последующим плаванием крыс в холодовой бане при 3 °С, микроскопически обнаруживалась четкая структура нервной ткани коры головного мозга: нейроциты имели ядра округлой формы с равномерно распределенным хроматином и различную плотность цитоплазмы. Сосуды мягкой мозговой оболочки и вещества мозга умеренно расширены и заполнены кровью вплоть до капиллярного русла, часть из которых окружены узким пространством, что свидетельствует об умеренном переваскулярном отеке. Перипеллюлярный отек отсутствует. Сосудистое сплетение с четкой структурой поверхностных эпендимальных клеток, умеренной отечностью стромы. Лишь изредка обнаруживались кровоизлияния под оболочкой с распространением на вещество мозга и выраженным кровенаполнением сосудов прилежащих участков коры мозга. Структура коры мозжечка без существенных изменений. Следовательно, предварительное введение препарата существенно уменьшало изменения микроциркуляторного русла, в частности, степень периваскулярного и перипеллюлярного отеков. Структура нейроцитов при данном воздействии не изменялась.

Таким образом, анализ представленных выше данных свидетельствует о том, что острое общее охлаждение теплокровного организма вызывает у экспериментальных животных развитие отека мозга, проявляющегося значительным повышением внутричерепного давления, задержкой воды в тканях головного мозга, существенными гистологическими изменениями клеток и сосудистых структур мозга. Введение животным 15%-го раствора ПЭО-400 вызывает нормализующее воздействие на указанные показатели, оказывает противоотечное действие и в целом повышает выживаемость экспериментальных крыс.

По мнению [6], противоотечное действие полиэтиленоксидов обусловлено их осмодиуретическим эффектом, который связан с дегидратирующим влиянием их на живые структуры, повышением коллоидно-осмотического давления плазмы крови, изменением реологических свойств крови и водно-солевого баланса организма. В целом подобная точка зрения относительно механизма влияния полиэтиленоксидов на патофизиологические сдвиги в организме при отеке мозга, вызванного локальным охлаждением головного мозга, достаточно экспериментально обоснована и может также служить для объяснения полученных нами данных положительного действия ПЭО-400 в условиях общего острого охлаждения животных. Вместе с тем этот же автор предполагает, что полиэтиленоксиды, кроме описанного выше действия, могут также влиять на центральные и периферические холинергические и адренергические структуры, играющие важную роль в реализации *in vivo* стрессорных реакций. В

пользу данной сентенции свидетельствуют результаты исследований [1, 8], подтверждающих значение нейротрансмиттерных адренергических механизмов в развитии реакций организма экспериментальных животных на гипотермию и существенную роль в этих процессах проницаемости ГЭБ. Показано [1], что ритмические холодовые воздействия способствуют "открытию" ГЭБ и участию гипоталамо-гипофизарных центров в осуществлении межнейрональных взаимодействий при подобного рода воздействиях. Проведенные нами опыты по определению проницаемости ГЭБ в условиях общего острого охлаждения крыс для ^3H -норадреналина подтверждают эти результаты (табл. 3) и свидетельствуют, что предварительное введение животным ПЭО-400 способствует повышению проницаемости ГЭБ для ^3H норадреналина в несколько раз по сравнению с животными, не подвергавшимися какому-либо воздействию.

Т а б л и ц а 3

Проницаемость для ^3H -норадреналина (имп/мин/г ткани) гематоэнцефалического барьера различных участков головного мозга крыс при остром охлаждении и после введения ПЭО-400

Структура мозга	Охлаждение, °С	Введение препарата б/охлаждения	Охлаждение + препарат
Передний гипоталамус	$0,22 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,02$
Задний гипоталамус	$0,21 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,03$
Кора мозга	$0,18 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,02$
Таламус	$0,22 \pm 0,05$	$0,44 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,01$

Примечание. В среднем проницаемость ГЭБ для мозга контрольных животных составляет $0,06-0,12$.

Введение ПЭО-400 на фоне охлаждения экспериментальных животных вызывает не столь значительное повышение проницаемости ГЭБ для отдельных структур головного мозга, что может быть

связано с определенным "пределом" реакции открытия ГЭБ на этапе охлаждения крыс. Эти факты не противоречат высказанному выше предположению о регулирующей роли ПЭО-400 в отношении участия полиэтиленоксидов в межнейрональных механизмах стрессорной реакции на охлаждение и о значении в этих процессах проницаемости ГЭБ; но имеющихся данных недостаточно для понимания влияния полиэтиленоксидов на конкретные структуры ГЭБ. Как известно [2], гематоэнцефалический барьер является анатомо-физиологическим образованием, основу которого составляют капилляры головного мозга, и его строение во многом определяется мембранными образованиями эндотелия капиллярной сети глиальных и функциональных элементов мозга. Важной особенностью этого эндотелия в данном случае, в отличие от эндотелия других сосудов, является то, что эндотелиальные клетки капилляров головного мозга связаны между собой плотными контактами, в них отсутствуют фенестрации, обуславливающие низкую капиллярную проницаемость для различных веществ [2]. Проницаемость через клеточный барьер веществ неэлектролитной природы, в том числе полиэтиленоксидов, во многом зависит от способности (коэффициента диффузии) их растворения в липидах, что в значительной мере определяет их цитотоксические и криопротекторные свойства [9]. Поэтому первичной точкой приложения действия полиэтиленоксидов могут быть мембранные структуры этого эндотелия, что в конечном счете проявляется изменением проницаемости ГЭБ и его регулирующей функции. Подтверждением подобного предположения являются недавние экспериментальные данные, указывающие на дегидратирующее влияние криопротекторов, в том числе полиэтиленоксидов, в отношении молекулярной структуры и физико-химических свойств компонентов мембранных образований различных клеток, в частности, изменения белок-липидных взаимодействий в них, смещения точки фазового перехода и сольватационных свойств липидного бислоя клеточных мембран [3, 10].

Итак, представленные результаты свидетельствуют о том, что в механизме положительного влияния ПЭО-400 на патофизиологические показатели

при общем остром охлаждении организма важную роль играет противоотечное, осмодиуретическое действие вещества в процессе развивающегося синдрома отека мозга экспериментальных животных. Вместе с тем, судя по приведенным данным литературы и собственным результатам, можно полагать, что полиэтиленоксиды могут включаться в регулирующие звенья нейротрансмиттерных реакций мозга и оказывать действие на проницаемость ГЭБ путем изменений молекулярно-клеточных структур мембранной системы капилляров мозга, однако для подтверждения подобного предположения необходимы дальнейшие экспериментальные исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Шило А.В. и др. К механизмам регуляции проницаемости ГЭБ охлажденного мозга. Сообщение 2 // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 2. – С. 3–9.
2. Бредбери М. Концепция гемато-энцефалического барьера. – М.: Медицина, 1983. – 179 с.
3. Василенко И.А., Тонконог Л.А., Балагуров А.М. и др. Структурная организация фосфолипидов в неводных полярных растворителях // Биол. мембраны. – 1988. – 5, № 4. – С. 428–438.
4. Кривицкая Г.Н., Гельфанд В.В., Попова Э.П. Деструктивные и репаративные процессы при очаговых поражениях головного мозга. – М.: Медицина, 1980. – 212 с.
5. Куликов В.Ю., Семенюк В.Ю., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор. – Новосибирск: Наука, 1988. – 191 с.
6. Мазалов В.К. Механизм действия криопротекторов ряда полиэтиленоксидов при холодовом и механическом воздействии на головной мозг: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1986. – 17 с.
7. Майстрах Е.В. Патологическая физиология охлаждения человека. – Л.: Наука, 1969. – 268 с.
8. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Ломако В.В. и др. Общий подход к проблеме повышения проницаемости ГЭБ и холодовой устойчивости организма // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 1. – С. 24–32.
9. Пичугин Ю.И., Новиков А.Н., Олейник С.Т. Лиотропный ряд криопротекторов // Криобиол. и криомед. – 1984. – Вып. 14. – С. 12–13.
10. Тонконог Л.А., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Влияние криопротекторов на структурное состояние липосом при охлаждении до -25°C // Укр. биохим. журн. – 1984. – 56, № 1. – С. 81–84.
11. Хочака С., Сомеро Д. Биохимическая адаптация. – М.: Мир, 1988. – 568 с.

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

Поступила 26.03.96

В.Й.ЛУГОВИЙ, В.К.МАЗАЛОВ, В.В.ЧИЖЕВСЬКИЙ, Т.П.ГОВОРУХА

ПРО МЕХАНІЗМ КРІОЗАХИСНОЇ ДІЇ ПОЛІЕТИЛЕНОКСИДІВ ПРИ ГЛУБОКОМУ ОХОЛОДЖЕННІ ТЕПЛОКРОВНОГО ОРГАНІЗМУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчена можливість застосування поліетиленоксидів з метою корекції функціонального стану організму після загального гострого охолодження. Надані результати свідчать про те, що в механізмі позитивного впливу ПЕО-400 на патофізіологічні показники при загальному гострому охолодженні організму важливу роль відіграє протинабрякова, осмодиуретична дія речовини в процесі розвитку синдрому набряку мозку експериментальних тварин. Відзначено, що введення ПЕО-400 змінює проникність ГЕБ для ^3H -норадреналіну. Це дозволяє припустити можливий вплив поліетиленоксидів на нейротрансмітерні реакції охолодженого мозку.

V.I.LOUGOVOY, V.K.MAZALOV, V.V.CHIZHEVSKY, T.P.GOVORUKHA

ON THE MECHANISM OF CRYOPROTECTIVE ACTION OF POLYETHYLENE OXIDES DURING PROFOUND COOLING OF A WARM-BLOODED ORGANISM

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

The authors investigated a possible application of polyethylene oxides for correction of the functional state of the organism after acute total cooling. The resulted submitted testify to the fact that an important role belongs to antiedematic, osmодиuretic action of PEO-400 in the process of the developing syndrome of the brain edema of experimental animals in the mechanism of the positive action of this substance on the pathophysiological features during acute total cooling of the organism. The injection of

УДК 57.043

В.В.Рамазанов, В.А.Бондаренко

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХОЛОДОВОГО И ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО ШОКА ЭРИТРОЦИТОВ В РАСТВОРЕ NaCl

Исследование холодовой и осмотической чувствительности эритроцитов при воздействии модификаторов мембраны позволяет предположить, что гипертонический шок не определяется ионным составом клетки.

Ранее было отмечено, что потеря K^+ эритроцитами в гипертонической не-электролитной среде не сказывается на чувствительности клеток к гипертоническому шоку [2]. В данной статье анализируются результаты, полученные при исследовании холодового и гипертонического шока после инкубации эритроцитов в гипертонической электролитной среде.

В работе использовали эритроциты донорской крови, отмытые раствором, содержащем 150 ммоль/л NaCl и 5 ммоль/л фосфат (pH 7,4). Эритроциты (20%-й гематокрит) обрабатывали иодоацетамидом (15 ммоль/л) 60 мин и ПХМБ (парахлормеркурийбензоат, 1 ммоль/л) 60 мин в среде, содержащей: KCl 90, NaCl 45, сахарозу 44, фосфат 10 ммоль/л (pH 7,4) при 37 °C.

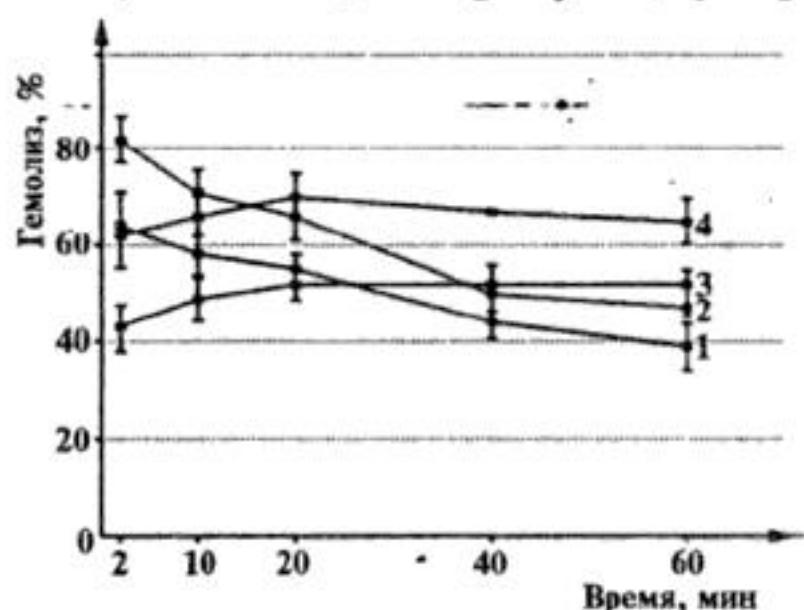


Рис. 1. Чувствительность эритроцитов к охлаждению до 0 °C (1, 2) и гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl (3, 4) после инкубации при 37 °C в растворе, содержащем 1,2 моль/л NaCl: 1, 3 — контроль; 2, 4 — ДИДС, 30 мкмоль/л

Холодовой и гипертонический шок исследовали как было описано ранее [1, 8]. ДИДС (4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфонат) добавлялся в среду в концентрации 30 мкмоль/л. Развитие чувствительности к холодовому и гипертоническому шоку после инкубации эритроцитов в растворе, содержащем 1,2 моль/л NaCl, имеет различную направленность (рис. 1). Если уровень холодовой чувствительности клеток во времени постоянно снижается, то уровень гипертонического шока остается неизменным. Присутствие в среде инкубации ингибитора анионного транспорта

ДИДС не вызывает изменения динамики развития чувствительности эритроцитов ни к холодовому, ни к гипертоническому шоку, хотя уровень гемолиза при этом в обоих случаях возрастает (рис. 1, кривые 2, 4).

Освобождение K^+ из эритроцитов, инкубируемых в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl, происходит экспоненциальным образом с выходом кинетической кривой на плато на 20-й мин инкубации (рис. 2). Присутствие ДИДС в среде инкубации вызывает некоторое возрастание уровня потери K^+ без изменения формы кинетической кривой. Очевидно, что в условиях высокой ионной силы среды действие ДИДС фактически сводится к росту чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку, тогда как в неэлектролитной среде его действие имеет противоположный характер [2].

Полученные результаты показали, что обработка эритроцитов указанным выше реагентом не приводит к изменению чувствительности клеток ни к гипертоническому, ни к холодовому шоку (рис. 3). Однако действие ингибитора анионного транспорта ДИДС, имевшее место в немодифицированных эритроцитах (рис. 1), практически полностью устраняется как при холодовом, так и при гипертоническом шоке (рис. 3). Данные результаты указывают на

то, что действие ДИДС, направленное на увеличение холодовой и осмотической чувствительности эритроцитов опосредуется взаимодействием белка полосы 3 с цитоскелетом. Однако направленность этого действия зависит от ионной силы среды прединкубации. В сахарозной среде присутствие ДИДС приводило к снижению холодового и гипертонического шока [2], а в растворах NaCl, наоборот, указанный реагент вызывал повышение холодовой и осмотической чувствительности клеток (рис. 1).

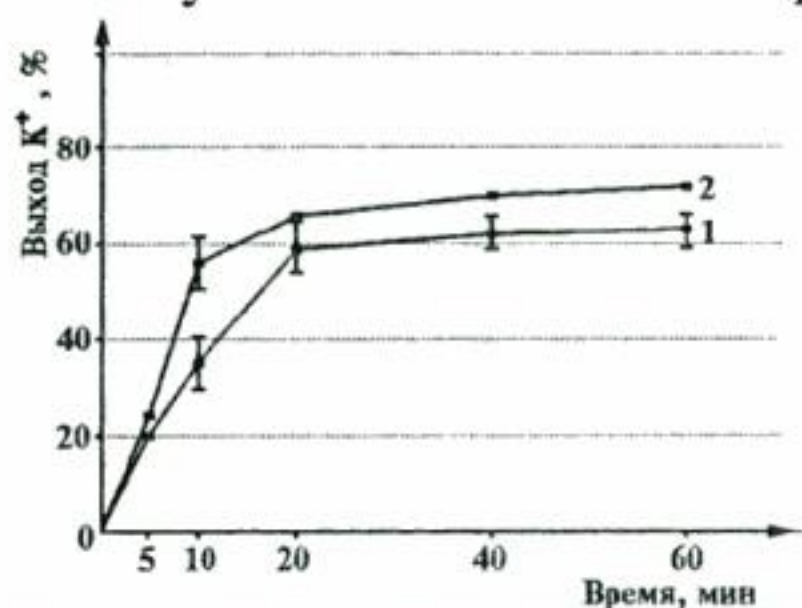


Рис. 2. Потеря катионов калия эритроцитами в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl: 1 — контроль; 2 — ДИДС, 30 мкмоль/л

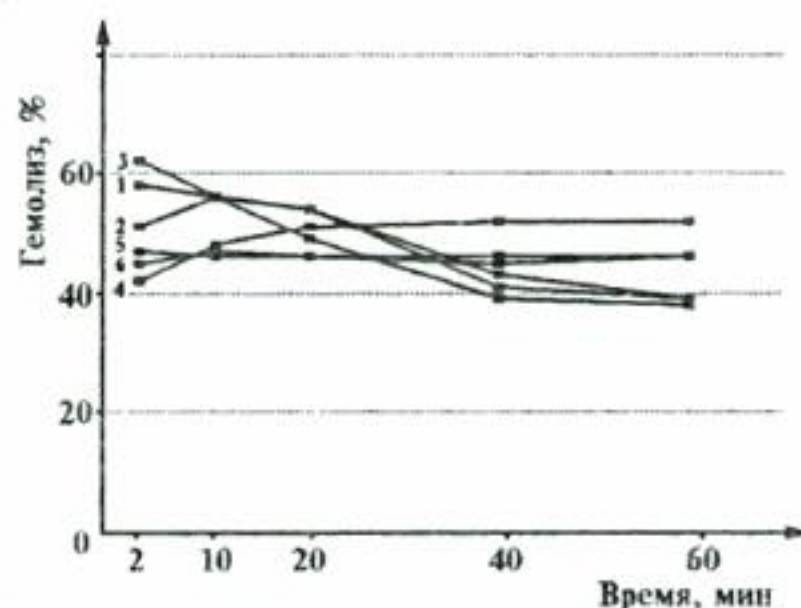


Рис. 3. Влияние обработки иодоацетамидом + ПХМБ на чувствительность эритроцитов к охлаждению до 0 °C (1, 2, 3) и гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl (4, 5, 6) после инкубации при 37 °C в растворах, содержащих 1,2 моль/л NaCl: 1, 4 — контроль; 2, 5 — иодоацетамид + ПХМБ; 3, 6 — иодоацетамид + ПХМБ + ДИДС

Таким образом, полученные данные о развитии холодового и гипертонического шока после инкубации эритроцитов в гипертонической солевой среде свидетельствуют о том, что увеличение чувствительности эритроцитов к холодовому и гипертоническому шоку в присутствии ДИДС сопровождается возрастанием уровня потери K⁺ (рис. 1, 2). В гипертонических растворах сахарозы присутствие ингибитора анионного транспорта вызывает снижение уровня гемолиза и освобождения K⁺ из клеток [2, 3]. Из этого следует, что освобождение K⁺ отражает зависимость направленности действия ДИДС на холодовую и осмотическую стабильность мембраны от ионной силы. При этом обработка эритроцитов ПХМБ не приводит к сдвигу их холодовой и осмотической чувствительности, хотя происходит устранение влияния ДИДС (рис. 3) так же, как и в растворах неэлектролитов [2].

В работе [8] было выявлено, что холодовая чувствительность эритроцитов в гипертоническом растворе NaCl имеет тенденцию к снижению во времени при увеличении продолжительности прединкубации при 37 °C. Данное обстоятельство связывают с уменьшением осмотического градиента на мембране вследствие проникновения Na⁺ в клетку в условиях нарушения барьерной функции мембраны [4, 5, 6]. Потеря K⁺ (рис. 2) и поступление Na⁺ в клетку [5] не оказывают существенного влияния на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку в сравнении с холодовым шоком (рис. 1). Представленные данные позволяют высказать предположение о том, что снижение во времени холодовой чувствительности эритроцитов в присутствии 1,2 моль/л NaCl не связано с уменьшением величины осмотического градиента на мембране, а определяется катионным составом клетки, так как чувствительность к гипертоническому шоку при этом не снижается. Действительно, в указанной среде происходит потеря K⁺ эритроцитами (рис. 2), как и в среде, содержащей 0,86 моль/л сахарозу [3]. Однако ни в первом, ни во втором случае [2] потеря катионов не сказывается на чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку. В то же время потеря K⁺ в среде, содержащей 0,86 моль/л сахарозу, может приводить к дополнительному росту чувствительности клеток к охлаждению [3]. Тогда как в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl, потеря K⁺ (рис. 2) сопровождается снижением чувствительности эритроцитов к ох-

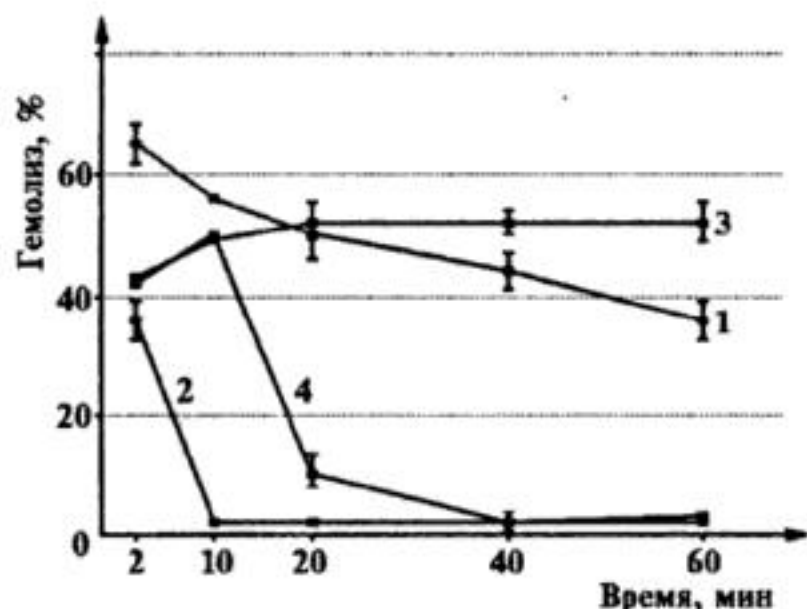


Рис. 4. Влияние нигирицина на чувствительность эритроцитов к охлаждению до 0 °C (1, 2) и гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl (3, 4) после инкубации при 37 °C в растворе, содержащем 1,2 моль/л NaCl: 1, 3 — контроль; 2, 4 — нигирицин, 10 мкмоль/л

лаждению (рис. 1). Данный эффект можно объяснить тем, что потеря барьерной функции мембран приводит к проникновению внеклеточного Na^+ в клетку [5]. Для проверки высказанного предположения был использован ионофор нигирицин, который при встраивании в мембраны образует каналы для K^+ и Na^+ , обеспечивая их движение по концентрационному градиенту. Исследование характера развития чувствительности эритроцитов к гипертоническому и холодовому шоку в присутствии нигирицина показывает (рис. 4), что уровень холодового шока максимально снижается на 10-й мин

прединкубации, тогда как уровень гипертонического шока полностью падает на 40-й мин. Известно, что степень повреждения эритроцитов при холодовом шоке может определяться исходным объемом клетки [7] так же, как и при гипертоническом шоке [1]. Поэтому можно предположить, что перераспределение катионов K^+ и Na^+ между клеткой и средой, которое происходит вследствие потери барьерной функции мембран, не приводит к изменению объема в условиях высокого осмотического давления, несмотря на то, что происходит замещение K^+ более осмотически активным Na^+ [4, 5]. Дополнительное образование нигирициновых каналов вследствие значительного проникновения Na^+ в клетку позволяет снять осмотический градиент на мембране, в результате чего эритроциты теряют чувствительность не только к холодовому, но и к гипертоническому шоку (рис. 4). Таким образом, как холодовой, так и гипертонический шок определяются величиной осмотического градиента на мембране клеток, однако действие этого фактора на холодовой шок зависит от ионного состава клетки. Данное предположение хорошо согласуется с тем, что потеря K^+ в среде, содержащей 0,86 моль/л сахарозу, не сказывается на чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку [2].

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. 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.
3. 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: Б. и., — 1993. — С. 106-111.
4. Farrant A.D., Morris G.J. Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing // Cryobiology. — 1973. — 10. — P. 126-133.
5. Farrant J., Woolgar A.E. Human red cell under hypertonic conditions: A model system for investigating freezing damage. 1. Sodium chloride // Cryobiology. — 1972. — 9. — P. 9-15.
6. Jung C.Y., Green F.A. Hypertonic cryohemolysis: Ionophore and pH effects // J. Membrane Biol. — 1978. — 39. — P. 273-284.
7. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology. — 1971. — 8. P. 489-500.
8. Morris G.J., Farrant J. Effects of cooling rate on thermal shock hemolysis // Cryobiology. — 1973. — 10. P. 119-125.

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

Поступила 21.03.95

В.В.РАМАЗАНОВ, В.А.БОНДАРЕНКО

ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ХОЛОДОВОГО ТА ГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ ЕРИТРОЦИТІВ У РОЗЧИНІ NaCl

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Дослідження холодової та осмотичної чутливості еритроцитів при дії модифікаторів мембрани дозволяє припустити, що гіпертонічний шок не визначається іонним складом клітинного середовища.

V.V.RAMAZANOV, V.A.BONDARENKO

COMPARATIVE STUDY OF THE COLD AND HYPERTONIC STRESS OF RBC IN THE NaCl SOLUTIONS

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

A study of the cold and osmotic susceptibility of RBC under the action of the membrane-modifying agents makes it possible to assume that hypertonic stress does not depend on the ionic composition of the cell.

УДК 599.323.4.0.84:622.59:577.115

**С.Е.Овсянников, Ю.В.Никитченко, В.К.Мазалов,
В.И.Луговой**

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ДИНАМИКЕ САМООТОГРЕВА ПОСЛЕ ОСТРОГО ОХЛАЖДЕНИЯ ОРГАНИЗМА КРЫС

Проведено исследование перекисного окисления липидов (ПОЛ) по скорости накопления малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах печени, сердца, головного мозга и содержанию гидроперекисей липидов в сыворотке крови крыс в процессе самоотогрева после острого охлаждения в воде с температурой 7 °С. Параллельно определяли в ткани печени содержание восстановленного глутатиона (GSH). Максимумы повышения уровня ПОЛ во всех исследованных тканях наблюдались в момент выхода организма из состояния гипотермии (через 3 ч) и через 24 ч самосогревания. Изменения уровня содержания GSH имели направленность, противоположную изменениям уровня ПОЛ. Сделан вывод, что характер развития процесса ПОЛ в постхолодовой период зависит не только от условий охлаждения организма, но и от условий и продолжительности самосогревания.

В настоящее время определенную роль в развитии различных холодовых патологий отводят активации свободнорадикального окисления липидов. В научной литературе имеются данные о том, что при действии холода в тканях повышаются интенсивность хемилюминесценции, скорость накопления МДА и диеновых конъюгатов, увеличивается содержание гидроперекисей липидов и флуоресцирующих липопигментов [1, 3, 4, 8, 10]. В ряде работ установлено уменьшение содержания α -токоферола GSH, снижение активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и пероксидазной активности микросом печени [1, 3, 4, 8]. Наряду с этим некоторые авторы показали, что в эритроцитах и гомогенатах тканей крыс, подвергнутых холодовому воздействию, содержание продуктов ПОЛ не изменяется [8] и даже снижается по сравнению с таковыми у контрольных животных [4]. Следует также отметить тот факт, что авторы работ, посвященных влиянию острого охлаждения на состояние ПОЛ биомембран, при проведении экспериментов использовали различные объекты исследования (гомогенаты тканей, митохондрии, микросомы, эритроциты и сыворотку крови крыс и кроликов) и различные модели охлаждения животных (в воде, иммерсионное, сухим воздухом), а условия отогрева часто вообще не указывали. Все это несколько затрудняет сравнение и анализ опубликованных результатов. Поэтому не исключено, что для выяснения вклада свободнорадикального перекисления липидов в патогенез заболеваний, вызванных переохлаждением организма, необходимо его системное изу-

чение в тканях жизненно важных органов животных. Результаты предварительных экспериментов позволили нам предположить, что уровень ПОЛ в процессе самосогревания после острого охлаждения во времени может отклоняться в ту или иную сторону и именно этим, возможно, и объясняется противоречивость результатов, полученных различными авторами.

Целью настоящей работы являлось системное исследование состояния ПОЛ биомембран печени, сердца, головного мозга и сыворотки крови крыс в динамике при одинаковых условиях острого охлаждения и самоотогрева животных. В работе использовали крыс-самок линии Вистар массой 200–220 г. За 12–14 ч до эксперимента животных лишали корма. Крысы охлаждались в процессе свободного плавания в воде с температурой 7 °С в течение 6–7 мин до ректальной температуры (РТ) 19–20 °С. Скорость охлаждения животных составляла 2,4–2,8 °С/мин. РТ измеряли при помощи прибора ТПМ-1М. После охлаждения крысы самосогревались при температуре окружающего воздуха 18–20 °С в течение 2, 3, 4 и 24 ч. Контролем служила группа интактных животных. После самоотогрева животных забивали декапитацией. Затем собирали кровь для получения сыворотки, быстро извлекали печень, сердце и головной мозг. Извлеченные органы охлаждали в 100 мМ *трис*-HCl-буфере (pH 7,4). Навеску охлажденной ткани продавливали через пресс, гомогенизировали в 100 мМ *трис*-HCl-буфере (pH 7,4) и фильтровали через нейлоновую ткань. Соотношение навески ткани и объема среды гомогенизации — 1:3. Еще одну навеску ткани печени замораживали в жидком азоте для определения содержания GSH. Уровень спонтанного, ферментативного и неферментативного ПОЛ в гомогенатах определяли по скорости накопления МДА. При изучении спонтанного ПОЛ среда инкубации содержала 100 мМ *трис*-HCl-буфер (pH 7,4) и 3,5–4,2 мг белка исследуемого гомогената в 1 мл. При неферментативном ПОЛ среда дополнительно содержала 0,5 мМ аскорбата и 12 мкМ соли Мора. В случае ферментативного ПОЛ среда содержала 100 мМ *трис*-HCl-буфер (pH 7,4), 1 мМ НАДФН, 4 мМ АДФ и 12 мкМ соли Мора. Реакцию проводили на водяной бане при температуре 37 °С с непрерывным барботированием воздухом. Время инкубации — 60 мин в случае спонтанного ПОЛ и 10 мин — в случае ферментативного и неферментативного ПОЛ. Определение МДА проводили как описано в работе [2], а его количество рассчитывали используя коэффициент экстинкции равный $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Содержание гидроперекисей липидов в сыворотке в крови определяли по методу [12]. Содержание GSH в ткани печени определяли как описано в работе [6]. Спектры поглощения определяемых веществ записывали на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР). Содержание белка в гомогенатах тканей определяли по методу Лоури в модификации Миллера [13]. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера с помощью микро-ЭВМ ДВК-3М.

Как видно из приведенных в табл. 1 результатов, скорость накопления МДА в гомогенатах всех исследованных органов в динамике самоотогрева организма после острого охлаждения существенно изменялась. При этом, лишь за исключением некоторых особенностей, характер изменений интенсивности уровня ПОЛ в печени, сердце и головном мозге был сходным. Так, в случае ферментативного ПОЛ статистически достоверное повышение скорости накопления МДА в гомогенатах исследованных органов наблюдалось только после 3 ч самоотогрева животных. Несколько иная картина была при неферментативном ПОЛ: в печени скорость накопления МДА повышалась уже после 2 ч самосогревания и оставалась практически на том же уровне до 4 ч; в сердце статистически достоверное увеличение уровня ПОЛ наблюдалось только после 3 ч самоотогрева, а в головном мозге существенных различий по сравнению с контролем не было обнаружено на протяжении всего изученного временного интервала. При неиндуцируемом ПОЛ скорость накопления МДА в

печени достоверно повышалась к 3 ч самоотогрева и оставалась неизменной в течение еще 1 ч; в головном мозге увеличение интенсивности ПОЛ было отмечено только после 3 ч самосогревания, а в сердце существенных изменений не наблюдалось. Подобные тканеспецифические особенности могут объясняться различиями количественного и качественного состава липидов, спектром антиоксидантных ферментов и неферментативных антиоксидантов, а в конечном счете — физиологической функцией органа. Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что содержание гидроперекисей липидов в сыворотке крови было максимальным также после 3 ч самосогревания животных, что свидетельствует о единой направленности развития процесса ПОЛ в организме после острого охлаждения.

Т а б л и ц а 1

Накопление МДА в гомогенатах органов крыс в динамике самосогревания после острого охлаждения организма ($Sx \pm X$; $n=6-9$)

Орган	Продолжительность самосогревания, ч	Накопление МДА при ПОЛ, нмоль/1 мг белка		
		спонтанном	ферментативном	неферментативном
Печень	Контроль	$2,40 \pm 0,07$	$3,96 \pm 0,24$	$6,14 \pm 0,60$
	2	$2,62 \pm 0,14$	$4,81 \pm 0,50$	$8,69 \pm 0,61^*$
	3	$2,96 \pm 0,10^*$	$5,08 \pm 0,34^*$	$8,70 \pm 0,43^*$
	4	$2,88 \pm 0,13^*$	$4,82 \pm 0,28$	$9,00 \pm 0,62^*$
Сердце	Контроль	$0,91 \pm 0,08$	$0,20 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,01$
	2	$1,01 \pm 0,15$	$0,41 \pm 0,12$	$0,33 \pm 0,07$
	3	$1,10 \pm 0,07$	$0,49 \pm 0,11^*$	$0,40 \pm 0,07^*$
	4	$1,09 \pm 0,11$	$0,39 \pm 0,19$	$0,26 \pm 0,04$
Мозг	Контроль	$2,94 \pm 0,14$	$3,24 \pm 0,24$	$4,55 \pm 0,36$
	2	$3,30 \pm 0,19$	$3,69 \pm 0,15$	$5,77 \pm 0,41$
	3	$3,47 \pm 0,14^*$	$4,13 \pm 0,27^*$	$5,41 \pm 0,33$
	4	$3,14 \pm 0,17$	$3,93 \pm 0,34$	$5,28 \pm 0,11$

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Как известно, GSH играет важную роль в системе антиоксидантной защиты клетки. От его содержания зависит активность ферментов этой системы — глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Кроме того, как считают некоторые авторы [3, 5], GSH участвует в регенерации основного неферментативного “тушителя” свободных радикалов — токоферола. Авторы работы [5] полагают, что по изменению содержания GSH можно косвенным образом судить об активности антиоксидантной системы в целом. Поэтому было целесообразным параллельно с показателями ПОЛ регистрировать содержание GSH в ткани печени. Эксперименты показали, что изменения содержания GSH в печени экспериментальных животных в процессе самосогревания также имели фазный характер. При этом наблюдалось статистически достоверное снижение содержания GSH после 3 и 24 ч самоотогрева, по сравнению с контролем (табл. 3). То есть изменения интенсивности ПОЛ и содержания GSH в печени крыс в постхолодовой период имели противоположную направленность.

Т а б л и ц а 2

Таким образом, наиболее заметные изменения интенсивности ПОЛ и содержания GSH наблюдались к 3 ч самосогревания животных. При наших условиях эксперимента именно к этому времени температура тела крыс достигала физиологических значений. Поэтому можно утверждать, что момент выхода организма из состояния гипотермии является критической точкой развития реакций компенсации-декомпенсации

Содержание гидроперекисей липидов (нмоль МДА/1 мл) в сыворотке крови крыс в динамике самосогревания после острого охлаждения организма ($Sx \pm x$; $n=6-9$)

Продолжительность самосогревания, ч	Содержание гидроперекисей липидов, нмоль МДА/1 мл
Контроль	$1,39 \pm 0,08$
2	$1,61 \pm 0,07$
3	$1,72 \pm 0,13^*$
4	$1,45 \pm 0,08$
24	$1,85 \pm 0,05^*$

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Т а б л и ц а 3

Содержание GSH в печени крыс в динамике самоотогрева после острого охлаждения организма ($Sx \pm X$; $n = 6-9$)

Продолжительность самсогрева, ч	Содержание GSH, мг %
Контроль	$59,74 \pm 5,88$
2	$58,63 \pm 9,03$
3	$43,59 \pm 2,66^*$
4	$75,73 \pm 9,40$
24	$44,55 \pm 0,81^*$

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

уровня GSH, по-видимому, является одной из таких реакций, которая через антиоксидантную систему защиты клетки понижает интенсивность ПОЛ. Однако по прошествии 24 ч после действия холодового фактора вновь наблюдалось повышение содержания гидроперекисей липидов в сыворотке крови (табл. 2) и снижение уровня GSH в печени экспериментальных животных (табл. 3), что свидетельствует о срыве компенсаторных реакций и, возможно, отражает развитие холодовой патологии.

Итак, было установлено, что развитие процесса свободнорадикального перекисления липидов после острого охлаждения зависит не только от условий и глубины охлаждения организма, но и от условий его отогрева и продолжительности постхолодового периода. Противоречивость данных, приведенных в ранее опубликованных работах, посвященных влиянию холода на ПОЛ, объясняется тем, что авторы их в своих исследованиях не учитывали эти факторы. Момент выхода организма из состояния гипотермии является критической точкой, в которой происходят максимальные изменения интенсивности ПОЛ и регуляторных реакций антиоксидантной системы. Однако для понимания молекулярных механизмов участия ПОЛ в возникновении и развитии холодовой патологии необходимы дальнейшие более детальные исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Василькова Т.У., Кухта В.К. Колькасць продуктаў перакіснага акіслення ліпідаў і стан антыакісляльнай ахоўнай сістэмы эрытрацытаў за умовах ахаладжэння арганізма // Весці БССР. Сер.біял.н. – 1988. № 5 – С. 64–67.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биомембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
3. Куликов В.Ю., Луценко М.Т., Коменкова Л.И. и др. Гидроперекиси жирных кислот, флуоресцирующие продукты и концентрация токоферола в тканях кроликов при действии на них холода // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1980. – 90, № 2. – С.661–662.
4. Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовый фактор. – Новосибирск: Наука, 1988. – 192 с.
5. Кулинский В.И., Колесниченко. Обмен глутатиона // Усп. биол. наук. – 1990. – 31. – С. 157–179.
6. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М.М.Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та 1982. – 272 с.
7. Патологическая физиология экстремальных состояний / Под ред. П.Д. Горизонтова и Н.Н. Сиротинина. – М.: Медицина, 1973. – 383 с.
8. Утню Л.Я, Липсбегга З.Э., Силова А.А. и др. Кардиопротекторные свойства производного 1,4-дигидропиридина глутапирона в условиях глубокой гипотермии // Бюлл. эксперим.биол. и мед. – 1989. – 108, № 11. – С. 558–561.
9. Уильмер Г., Брюк К., Вальдек Ф. и др. Физиология человека. – т. 4. – М.: Мир, 1986. – 312 с.
10. Шепелев А.П. Перекисное окисление липидов в бурой жировой ткани крыс при остром охлаждении // Физиол. ж. СССР – 1978. – 64, № 1. – С. 108–112.
11. Чумаков В.Н., Тамарина Н.З., Крупеникова Л.И. Состояние энергетических систем в печени и почках крыс при различной устойчивости животных к охлаждению // Биохимия. – Минск: Б. и., 1989 – С. 118–123.
12. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of tiobarbituric acid test for detecting lipid hidroperoxides // Lipids. – 1980. – 15, № 3. – P. 137–140.

действия холодового фактора. Данное положение подтверждается изменениями ряда физиологических характеристик организма [9]. Активация ПОЛ и снижение уровня GSH в тканях экспериментальных животных ко времени выхода их из состояния гипотермии является первичным ответом организма на холодовое воздействие. Вместе с тем с этого момента полностью включаются биохимические и физиологические механизмы компенсации нарушений, вызванных действием холода [7, 9]. Повышение

13. Miller B.L. Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem. – 1959. – 31, № 5. – P. 964–966.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
НИИ биологии при Харьковском гос. ун-те

Поступила 13.09.95

С.Є.ОВСЯННИКОВ, Ю.В.НІКІТЧЕНКО, В.К.МАЗАЛОВ, В.Й.ЛУГОВИЙ

ПЕРЕКИСНЕ ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ У ДИНАМІЦІ САМОВІДІГРІВУ ПІСЛЯ ГОСТРОГО ОХОЛОДЖЕННЯ ОРГАНІЗМУ ЩУРІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків
НДІ біології при Харківському державному університеті

Проведено дослідження перекисного окислення ліпідів по швидкості накопичення малонового діальдегіду у гомогенатах печінки, серця, головного мозку та вмісту гідроперекисей ліпідів у сироватці крові щурів у процесі самовідігріву після гострого охолодження у воді з температурою 7 °С. Паралельно визначали у тканині печінки вміст відновленого глутатіону (GSH). Максимуми підвищення рівня ПОЛ у всіх досліджених тканинах спостерігались в момент виходу організму зі стану гіпотермії (через 3 год) та через 24 год самозігрівання. Зміни рівня вмісту GSH мали напрямок, протилежний змінам рівня ПОЛ. Зроблено висновок, що характер розвитку процесу ПОЛ в постхолодовий період залежить не тільки від умов охолодження організму, але й від умов та тривалості самозігрівання.

S.E.OVSYANNIKOV, YU.V.NIKITCHENKO, V.K.MAZALOV, V.I.LOUGOVOY

LIPID PEROXIDATION DURING SELF-WARMING FOLLOWING ACUTE COOLING OF THE RAT ORGANISM

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

НДІ біології при Харківському державному університеті

The authors investigated lipid peroxidation (LPO) with regards to the rate of accumulation of malone dialdehyde (MDA) in the homogenates of the liver, heart, brain, and the content of the lipid hydroperoxides in the blood serum of the rats during self-warming after acute cooling in water at 7 °C. The content of the reduced glytathione (GSH) was evaluated simultaneously. The maximum peaks in the LPO levels in all the studied tissues were observed at the moment of the organism becoming hypothermic (in 3 hours) and after 24-hour self-warming. The direction of changes in the level of the GSH content was opposite to those in the level of LPO. It was concluded that the nature of the development of the LPO processes in the post-cold treatment period depends not only on the conditions of cooling of the organism, but on the conditions and duration of self-warming as well.

УДК 577.352.43:612.111

Н.В.Репин, В.И.Шейкин

ВОДНАЯ ДИФФУЗИОННАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЗИМНЕСПЯЩИХ СУСЛИКОВ *CITELLUS* *UNDULATUS*

Представлены температурные зависимости времени водного диффузионного обмена в эритроцитах зимне спящих сусликов, находящихся в состоянии гибернации, пробуждения и бодрствования. Графики Аррениуса трансмембранной диффузии воды имеют изломы при температурах около 10, 20 и 30 °С для эритроцитов животного в активном состоянии и прямую зависимость в гибернирующем состоянии. Приведены численные значения энергии активации диффузионного обмена молекул воды эритроцитами при указанных состояниях животного.

Работы, посвященные механизмам адаптации гетеротермных организмов, касаются главным образом изучения качественного и количественного состава липидов, функционирования мембранно-связанных ферментов и белковых комплексов, триггеров спячки, обеспечивающих сохранение жизнедеятельности клеток при пониженных температурах [3, 6, 7, 11, 18]. В то же время необходимо учитывать, что структурно-функциональные свойства указан-

ных выше систем зависят от степени их гидратированности. Взаимодействие воды с мембраной не только является фактором, обуславливающим ее структурные характеристики, но и зависит от физико-химических свойств и состояния компонентов мембраны. Считается, что трансляционная подвижность связанной воды характеризуется коэффициентом диффузии $10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$, что примерно соответствует значению этой величины у липидов, в то время как для объемной воды значение коэффициента равно $10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$ [14, 15]. То есть принцип взаимного влияния компонентов мембраны и воды является ключевым моментом регуляции структурных и функциональных свойств клеточных мембран.

Работы, посвященные изучению водного трансмембранного обмена в клетках зимнеящих, практически отсутствуют. Хотя известно, что во время спячки в организме животного сохраняются процессы жизнедеятельности, происходящие на фоне значительного снижения основного метаболизма и требующие определенного водного обмена. Естественно предположить, что для быстрого включения функции всех систем клетки и организма в целом при переходе из спячки в активное состояние требуется большая проницаемость мембран для воды, чем у гомойотермных организмов, т.е. мембраны клеток зимнеящих организмов (во время зимней спячки) должны обладать меньшим энергетическим барьером для трансмембранного обмена водой. Для проверки этого предположения в работе проведено изучение температурно-зависимого водного обмена через мембраны эритроцитов зимнеящих сусликов, находящихся в состоянии гибернации (ГС), пробуждения (ПС) и активном (АС) в диапазоне температур 4–38 °С.

Общепринятыми параметрами, характеризующими процесс диффузионного обмена молекул воды клеткой, являются величина энергии активации E , коэффициент проницаемости мембраны для воды L_p и время водного диффузионного обмена τ . Величины L_p и τ характеризуют степень проницаемости мембраны для воды и связаны между собой простым соотношением $\tau = \frac{V}{SL_p\pi_i}$, где V и S — объем и площадь поверхности клетки соответственно, π_i осмотическое давление физиологического раствора.

В данной работе время спин-спиновой релаксации определяли по двухимпульсной методике Хана, используя релаксметр спинового эха ЯМР [10] на частоте 15,9 МГц, подавая на образец последовательность 90 и 180 °С — импульсов, разделенных временным интервалом, после чего регистрировался сигнал спинового эха. Измерив амплитуды эхо-сигналов h_1 и h_2 при временах t_1 и t_2 , вычисляли время спин-спиновой релаксации протонов воды в суспензии эритроцитов по формуле:

$$\tau = \frac{2(t_2 - t_1)}{\ln(h_1/h_2)}.$$

Для измерения времени релаксации в клеточной суспензии эритроцитарную массу смешивали в соотношении 1:1 с солевым раствором, содержащим 30 мМ MnCl_2 . Температуру образцов в измерительной ячейке ЯМР-релаксометра поддерживали с точностью до $\pm 0,3$ °С. Погрешность определения времени водного диффузионного обмена не превышала 10%.

Изучение диффузии молекул воды в эритроцитах донора позволило установить, что: 1) значения времени τ и величины E в эритроцитах и замкнутых телях практически не отличаются [12]; 2) диффузия воды через мембрану не чувствительна к факторам, изменяющим состояние белков спектринового комплекса [9]; 3) на температурной зависимости τ для эритроцитов донора выявлено скачкообразное изменение времени водного диффузионного обмена в области температур 8–12 и 25–30 °С [4, 5, 13]; 4) на аррениусовой зависимости наблюдаются один-два излома, находящиеся, как правило, в области 8–12 и 25–30 °С [9]. Необходимо также отметить, что численные значения энергии

активации E несколько варьируют у разных авторов, в основном, для области температур 12–30 °С. Более однозначные данные приводятся для температур ниже 10–12 °С, при которых происходит скачкообразное изменение энергии активации в 2–3 раза, по сравнению с высокотемпературной областью. При этом энергия активации составляет несколько больше 40 кДж/моль. Для температур в интервале 12–30 °С значение E колеблется от 17,5 до 28 кДж/моль [1, 9].

Нами установлено, что в активном состоянии температурная зависимость времени водного диффузионного обмена в эритроцитах суслика (рис. 1) имеет четыре участка с характерными изменениями угла наклона прямой при температурах около 10, 22 и 30 °С с соответствующими значениями энергии активации. В области температур 6–10 °С среднее значение энергии активации равно $32,1 \pm 3$ кДж/моль, что много ниже соответствующих величин для эритроцитов донора, где, как показано в работе [17], энергия активации составляет 44–48 кДж/моль и близка к ее значению при диффузии молекул воды через липидные бислои.

Обращает на себя внимание несколько пониженное значение энергии активации в интервале температур 22–30 °С, составляющее около 10 кДж/моль. Слабую зависимость времени водного обмена от температуры в данном интервале обычно связывают со структурной “нестабильностью” мембраны эритроцитов в области температур 17–20 и 25–28 °С [6, 9]. Предполагается, что в области этих температур в эритроцитарной мембране происходит переход, проявляющийся в изменении состояния белкового компонента [9] или белок-липидных взаимодействий вследствие структурно-фазовых переходов в аннулярных липидах [16]. Некоторое возрастание энергии активации в области 30–38 °С вероятнее всего связано с завершением фазового перехода в наружном, более “высокотемпературном” монослое липидов.

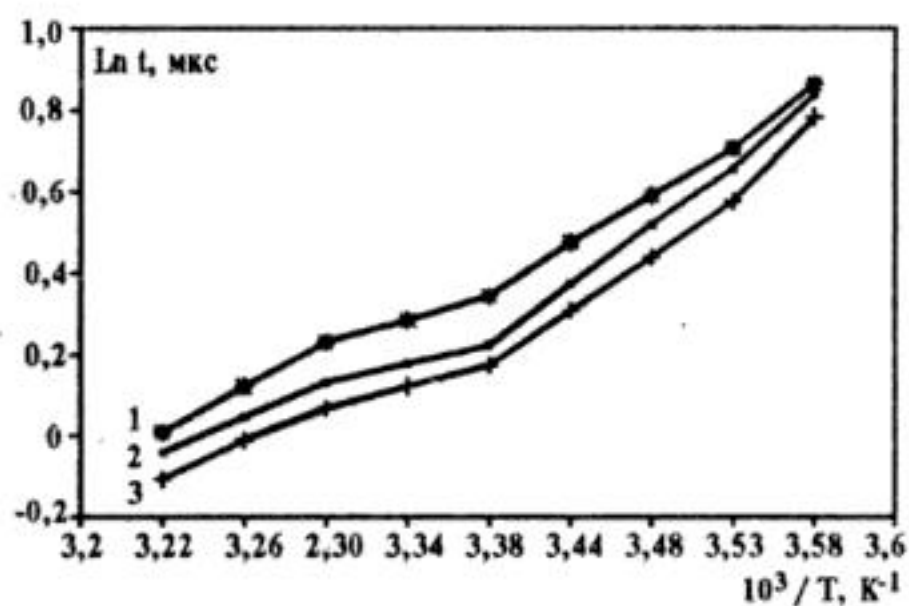


Рис. 1. Аррениусова зависимость времени водной диффузии воды в мембранах эритроцитов суслика в активном состоянии (37 °С) для 3 животных (1, 2, 3)

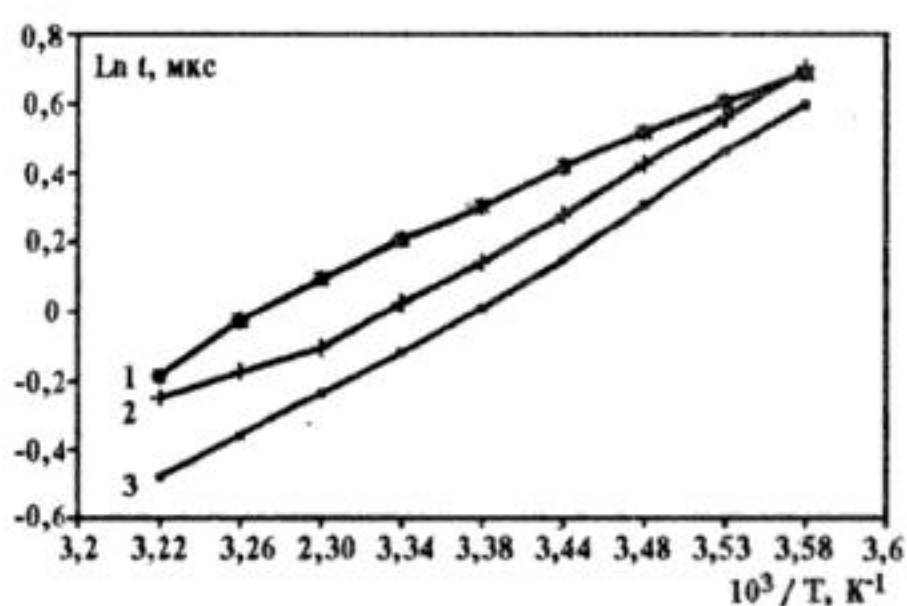


Рис. 2. Аррениусова зависимость времени диффузии воды в мембранах эритроцитов суслика в пробуждающемся (1, 2) и гибернирующем (3) состояниях

Подтверждением влияния фазовой гетерогенности липидов на диффузию молекул воды служат эксперименты по предварительному прогреву клеток до 30–40 °С [5], в которых показано, что время обмена возрастает при повышении температуры прогрева и достигает максимума при температурах 37–40 °С, что, по мнению авторов, связано с “расплавлением” большего числа “твердых” липидов. Естественно предположить, что в этих условиях диффузия воды с большей вероятностью может идти через водные поры — белковые комплексы, осуществляющие трансмембранный обмен водой. Отмеченный характер температурной зависимости выхода воды и изменения энергии активации этого процесса в интервале температур 6–38 °С достаточно хорошо согласуется с данными о термотропном структурном изменении мембранных белков эритроцитов активного суслика и донора, для которых при температурах около 5, 10, 15, 20, 30 °С наблюдаются длинноволновое смещение спектра, связанное с

растормаживанием релаксационной подвижности ближайшего микроокружения белковых хромофоров, а также изменение характера тушения триптофановой флуоресценции [8].

В состоянии пробуждения у животного отмечена некоторая неоднозначность в характере температурной зависимости времени водного обмена, которая была связана, вероятнее всего, с температурой тела животного при забое. На рис. 2 представлены зависимости для образцов крови, взятых при температурах ниже 15 и выше 20 °С. Видно, что при относительно монотонной зависимости в области температур 6–30 °С, что больше характерно для ГС, наблюдается различие в угле наклона кривых при 30–38 °С.

В гибернирующем состоянии зависимость диффузии воды в диапазоне 6–38 °С аппроксимируется практически прямой со слабо выраженным изломом в области температур около 20 °С и имеет средние значения энергии активации, равные примерно 23,3 и 25,4 кДж/моль для температур, больших и меньших 20 °С соответственно.

При анализе полученных результатов следует прежде всего отметить, что для гибернирующих животных типичен иной характер температурных зависимостей, нежели для гомойотермных организмов [4, 5, 13], а время диффузионного обмена молекул воды на порядок (в 7–8 раз) меньше, чем у эритроцитов донора. Одной из причин, оказывающей влияние на интенсивность водного обмена, является изменение соотношения объема клетки V и площади поверхности S . Проведенные исследования формы и объема клетки с помощью методов световой и электронной микроскопии, позволили определить, что эритроциты сусликов в норме имеют форму дискоцитов со средним размером порядка 6 мкм. Таким образом, уменьшение времени водного обмена по сравнению с донорскими клетками за счет изменения поверхностно-объемного соотношения маловероятно. Кроме того, наблюдается достоверное воспроизводимое различие численных значений τ в зависимости от состояния животного для каждого измерения в интервале температур 6–38 °С. Эритроциты суслика, взятые у спящего животного, всегда более проницаемы, чем в активном состоянии. Причин отмеченной закономерности может быть много. Некоторую роль здесь может играть холестерин, который в определенных концентрациях вызывает “разжижение” мембраны и изменение ее проницаемости. В работе [7] сообщается, что в крови зимне спящих в период подготовки и спячки количество общего холестерина снижается на 15%, а свободного — на 43%. Таким образом, зависимость времени диффузионного обмена воды в эритроцитах суслика, находящегося в состоянии спячки, имеет вид прямой и характеризуется неизменным значением энергии активации во всем исследованном интервале температур, что представляет собой достаточно интересный факт, подлежащий обсуждению с точки зрения адаптированности биологической системы (в данном случае организма, клетки) к пониженным температурам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. — М.: Наука, 1982. — 151 с.
2. Ахременко А.К., Загнойко В.И., Игнатъев Д.А. Влияние фракции 1–10 кД из мозга холодаадаптированного животного на синтез белка в тканях белых мышей // Механизмы зимней спячки. — Махачкала: Б. и., 1990. — С. 23.
3. Бронников Г.Е. Возможные пути регуляции энергетического метаболизма у зимоспящих. Кинетический подход // Механизмы зимней спячки. — Пущино: Б.и., 1987. — С. 24–32.
4. Гордиенко О.И., Емец Б.Г., Желякова Т.А., Шейкин В.И. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой // Биологические мембраны. — 1985. — 2, № 3. — С. 310–314.
5. Желякова Т.А. Состояние воды в биологических мембранах по данным методов ЯМР и СВЧ-дieleктрометрии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1991. — 23 с.
6. Кличханов Н.К., Сфиев А.А. Ацетилхолинэстераза мембран эритроцитов при искусственной и естественной гипотермии // Всесоюз. симп. “Механизмы зимней спячки”: Тез. докл. — Махачкала, 1990. — С. 5–55.

7. Львова С.П. Влияние гипотермических состояний на липидные компоненты в тканях суслика // Всесоюзн. симп. "Механизмы зимней спячки": Тез. докл. – Махачкала, 1990. – С. 65–66.
8. Репина С.В., Цымбал Л.В. Молекулярные аспекты температурной зависимости адаптации клеток // Биохимические аспекты холодовых адаптаций. – Харьков: Б. и., 1991. – С. 123–130.
9. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. – Минск: Наука и техника, 1981. – 215 с.
10. Шейкин В.И., Емец Б.Г., Климов А.Д. и др. ЯМР релаксометр для определения водной проницаемости биологических мембран методом парамагнитного допинга // Вестн. Харьковского ун-та, 1984. – № 225. С. 91–93.
11. Aloia R.C., Kaison J.R. Membrane function in mammalian hibernation // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – 988. – P. 123–146.
12. Benga G., Pop V.I., Popescu O. et al. Effects of temperature on water diffusion human erythrocytes and ghost-nuclear magnetic resonance studies // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – 905. – P. 339–348.
13. Benga G., Popescu O., Pop V.I. The proteins involved in water transport in human erythrocytes // Stud. Biophys. – 1989. – 134, № 1–2. – P. 139–142.
14. Drost-Hansen W. Phase transitions in biological systems: manifestations of cooperative processes in vicinal water // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1973. – 204, № 1. – P. 100–108.
15. Jahrig F., Bramhall J. The origin of a break in Arrhenius plots of membrane processes // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – 690. – P. 310–313.
16. Fink E.D., Scheider A.S. Mobility of water bound to biological membranes. A proton NMR relaxation study // Biochim. Biophys. Acta. – 1975. – 406. – P. 146–154.
17. Masey R.I., Karan D.M., Farmer R.E.L. Passive permeability of cell membranes // Biomembranes / Ed. Kreuzer F., Slegers J.F.G. – N.Y.: Plenum Press. – 1972. – 3. – P. 331–340.
18. Wang L.C.H. Life and low temperature: Mammalian hibernation // Cryobiology. – 1985. – 6, № 2. – P. 257–274.

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

Поступила 10.05.95

М.В.РЕПІН, В.І.ШЕЙКІН

ВОДНА ДИФУЗІЙНА ПРОНИКНІСТЬ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЗИМНЬОСПЛЯЧИХ ХОВРАХІВ *CITELLUS UNDULATUS*

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м.Харків
Харківський державний університет

Представлені температурні залежності часу водного дифузійного обміну еритроцитів зимньосплячих ховрахів, які знаходяться в трьох фізіологічних станах — гібернації, пробудження та неспання. Графіки Арреніуса для трансмембранного виходу води мають ізломи при температурах біля 10, 20 та 30 °C для еритроцитів тварин в активному стані і пряму залежність в гібернуючому стані. Приведені числові значення енергії активації водного обміну мембран еритроцитів для вказаних станів тварин.

N.A.REPIN, V.I.SHEIKIN

DIFFUSION OF WATER MOLECULES IN THE RBC MEMBRANES OF THE HIBERNATING GROUND SQUIRREL *CITELLUS UNDULATUS*

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

The authors submit temperature dependencies of time [period of water diffusion in the RBC of the hibernating ground squirrels, which were in the states of hibernation, arousal and alertness. The Arrhenius plots of the transmembrane water diffusion have breaks at temperature points of about 10, 20 and 30 °C for the RBC of the alert animal, and demonstrate a direct dependence in the state of hibernation. The report presents numeric values of the activation energy of the water molecule diffusion in the RBC during the above states of the animal.

**В.И.Грищенко, Е.Ф.Исаченко, Ф.И.Осташко,
В.В.Исаченко, К.Н.Хромушкин, М.И.Крамар,
А.Г.Геродес, П.Т.Тодоров**

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ТКАНИ ЯЙЦЕВОДА ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ ПРЯМОГО ПОГРУЖЕНИЯ В ЖИДКИЙ АЗОТ

Проведены эксперименты по замораживанию фрагментов эпителия яйцеводов человека путем прямого погружения в жидкий азот с использованием различных комбинаций проникающих и непроникающих криопротекторов. Установлены оптимальное соотношение криопротекторов эквилибирующей среды и некоторые параметры режима криоконсервации этого биобъекта.

Известно, что *in vitro* полученные и культивируемые эмбрионы млекопитающих снижают и даже совсем останавливают свое развитие на стадии от 8 до 16 бластомеров, наблюдается так называемый “блок дробления” [1, 9]. Для стимуляции развития зиготы млекопитающих различных видов от стадии двух пронуклеусов до поздних стадий довольно широко используется сокультивирование с эпителиальными клетками [2, 3]. Помимо культивирования эмбрионов до поздних стадий, эпителий яйцевода может быть использован также для поддержания активности и повышения оплодотворяющей способности спермиев при оплодотворении *in vitro* [8]. В литературе довольно подробно описан способ изоляции и культивирования клеток [7], а также фрагментов эпителия яйцевода [11]. Имеются немногочисленные литературные данные об использовании деконсервированных после конвекционного замораживания эпителиальных клеток, секреторная активность которых, в сравнении со свежими, практически не снизилась [2]. Данные же по изучению криоконсервации эпителиальных клеток конвекционным методом весьма ограничены. Что касается метода криоконсервации прямым погружением в жидкий азот, который довольно успешно используется при замораживании аналогичных тканевых структур (фрагментов трофобласта крупного рогатого скота [4]), то применительно к эпителиальным клеткам он не разработан.

Целью наших исследований был выбор методики замораживания эпителиальной ткани человека путем прямого погружения в жидкий азот. Фрагменты эпителия яйцевода получали с учетом методики, описанной следующим образом [11]. Четыре яйцевода были получены от двух женщин в возрасте 32 и 36 лет при хирургическом вмешательстве по поводу незлокачественных заболеваний матки и сохраненной функции яичников в лютеальную фазу менструального цикла (20-й и 23-й дни). Функциональная активность яичников была подтверждена наличием в них активных желтых тел. Яйцеводы в течение 2 ч были доставлены в лабораторию в 0,9%-м NaCl с 300 мкг/мл канамицина. Каждый из четырех яйцеводов после подсушивания путем легкого обжима между двумя листами фильтровальной бумаги отделили от сопутствующих тканей, фибральной и утеро-тубальной частей яйцевода с помощью лезвия, зажатого в пинцет. При этих манипуляциях использовалось лезвие с длиной режущей кромки от 9 до 12 мм. Затем яйцеводы трижды ополоснули в 0,9%-м NaCl со 150 мкг/мл гентамицина (“Chenoin”, Budapesht, Ungaria) и поместили каждый в 35-миллиметровую чашку Петри с макрокаплей (2 мл) питательной среды (ПС) TCM-199 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) с 20% фетальной сыворотки телят (“Sigma”). Затем яйцевод прижимали ко дну чашки Петри лезвием и рассекали вдоль. После полного рассечения соскабливали фрагменты эпителия (ФЭЯ). После завершения соскабливания яйцевод удаляли из капли, а эпителий с использованием 0,25-мл соломинки (INRA,

France) и шприца переносили в коническую пробирку ("Falcon", Oxnard, USA) с 5 мл ПС, дважды центрифугировали (2 мин, 200 g) с удалением супернатанта и добавлением свежей питательной среды. Третью отмывку произвели не центрифугированием, а осаждением фрагментов эпителия в течение 15 мин. Разделение эпителия на группы осуществляли следующим образом. Легким пощелкиванием пальцем по пробирке с осажденными ФЭЯ добивались образования суспензии в 1,5 раза менее плотной, чем та, которая образовалась после осаждения. Из средней части суспензии с помощью 0,25-мл соломинки и шприца отбирали 20 мкл суспензии, в которой находилось 25–35 ФЭЯ. Жизнеспособность ФЭЯ контролировали по движению ресничек (в норме — 5 колебаний/с). Частичек сопутствующих тканей и нежизнеспособных ФЭЯ в пробах обнаружили менее 3%, поэтому объекты замораживания переносили непосредственно в растворы криопротекторов. Все манипуляции по замораживанию закончили в течение 2 ч. Полученные фрагменты эпителия разделили на 136 групп, частицы каждой группы (по 25–30 шт.) заморозили в 0,25-мл пайетах (INRA, France) в 140 мкл ПС. Провели 2 серии экспериментов.

I-я серия. Сверхбыстрое замораживание ФЭЯ с использованием раствора сахарозы с одним из проникающих криопротекторов (все — "Sigma") или сахарозы с несколькими комбинациями двух проникающих криопротекторов. В экспериментах обеих серий растворы криопротекторов были приготовлены на ПС. Было заморожено 6480 ФЭЯ, разделенных на 108 экспериментальных групп, каждая группа была представлена двумя соломинками с ФЭЯ. Замораживаемый раствор для ФЭЯ 12 групп состоял из 30% одного из криопротекторов: диметилсульфоксида (ДМСО), этиленгликоля (ЭГ), пропиленгликоля (ПГ), глицерина (Г) и сахарозы в концентрациях 0,17, 0,25 и 0,7 М.

Замораживаемый раствор ФЭЯ двух групп состоял из 0,35 М сахарозы с добавлением 10% ПГ, 20% Г и 0,35 М сахарозы, 20% ПГ и 10% Г. Раствор одной группы состоял из 0,35 М сахарозы, 10% ПГ и 20% ГЛ + 15% ацетамида. Все манипуляции с ФЭЯ проводились при температуре 24 °С, промежуток времени от момента помещения в раствор до погружения в жидкий азот составлял по каждой из перечисленных групп 30 с, 1, 3, 5, 10 мин. Во второй части этой серии экспериментов 17 групп ФЭЯ были заморожены с 10-минутной эквilibрацией в 10% Г, помещением на 90 с в один из вышеупомянутых 17 растворов и погружением в жидкий азот. В качестве непроникающего криопротектора была испытана трегалоза (Dr. Theodor Schuchardt Co., Munchen, Germany). Две группы ФЭЯ были заморожены с 0,17 М этого криопротектора, 10% ПГ и 20% Г, 20% Г и 10% ПГ, по две группы ФЭЯ с таким же соотношением ПГ и Г были заморожены с 0,35 и 0,7 М трегалозы.

После выдержки в растворе криопротекторов ФЭЯ были помещены в 0,25-мл соломинку со 140 мкл замораживаемой среды и погружены в жидкий азот. Оттаивание соломинок проводили не менее чем через 24 ч после замораживания в водяной бане при 40 °С в течение 4 с. После этого ФЭЯ были помещены на 5 мин в 1 М сахарозу и перенесены в 300 мкл ПС, где через 20 мин от начала культивирования их жизнеспособность оценивали по двум показателям: процентному соотношению движущихся и неподвижных ресничек, наблюдаемых по периметру ФЭЯ (X 180) и количеству колебаний ресничек за 1 с.

II-я серия. Криоконсервация ФЭЯ путем прямого погружения в жидкий азот с использованием только проникающих криопротекторов (витрификация). Было криоконсервировано 56 соломинок с ФЭЯ, каждая пара из которых представляла одну экспериментальную группу (таблица). Эквilibрация проводилась в течение 5 мин при температуре 24 °С в растворах, приготовленных на ПС: 10% Г и 20% ДМСО; 10% Г и 20% ПГ; 10% Г и 20% ПГ, 10% ДМСО; 10% ЭГ; 10% ПГ; 10% Г. После этого ФЭЯ на 20 с помещались при 24 или 4 °С в 0,25-мл соломинку, содержащую 100 мкл витрифицируемой среды из 25% Г + 25% ПГ, и погружались в жидкий азот.

Оттаивание проводилось не менее чем через 24 ч от замораживания в водяной бане при 4 или 20 °С в течение 4 с. Криопротекторы выводили в 0,5 М сахарозе на протяжении 5 мин, после чего ФЭЯ помещали в питательную среду, и через 20 мин проводилась оценка их жизнеспособности так же, как и в экспериментах I-й серии. После оценки результативности сверхбыстрого замораживания (I-я серия экспериментов) было установлено, что все деконсервированные ФЭЯ были нежизнеспособными.

Выживаемость фрагментов эпителия яйцевода (%) в зависимости от условий витрификации клеток (n=1680)

Раствор эквilibра- ции	Температура вит- рифицирующего раствора, содер- жащего 25% Г+ 25% ПГ, °С				Температура водяной бани при оттаива- нии, °С
	24		4		
	а	б	а	б	
10% Г+	20	2	30	3	20
20% ДМСО	20	2	20	2	4
10% Г+	40	2	40	3	20
20% ЭГ	20	2	20	2	4
10% Г+	20	2	50	3	20
20% ПГ	20	2	30	2	4
10% ДМСО	30	2	30	3	20
	30	2	20	2	4
10% ЭГ	90	2	90	4	20
	90	2	90	2	4
10% ПГ	90	2	90	4	20
	60	2	60	2	4
10% Г	100	3	100	4	20
	80	2	100	3	4

Примечание. * – эквilibрация была проведена на протяжении 5 мин, температура раствора 24 °С; а – процент движущихся ресничек, наблюдаемых по периметру фрагмента эпителия яйцевода; б – количество движений ресничек за 1 с. Разности в показателях по всем группам достоверны (от $P < 0,05$ до $P < 0,001$).

страдает недостатком, связанным с невозможностью точно дозировать их количество на определенный объем культуральной среды. Однако мы считаем, что преимущества использованной нами методики, в сравнении с методикой формирования монослоя, заключается в том, что она более проста, а секреторная способность эпителиальных клеток ярче выражена, потому что они не переносят такого стрессового воздействия, как диспергация с использованием трипсина. Именно эти объекты, а не изолированные клетки эпителия мы выбрали для проведения наших экспериментов, так как облегчается контроль их жизнеспособности после деконсервации.

Ранее [11] дано описание характера развития ФЭЯ крупного рогатого скота. Нами достигнуты аналогичные результаты. Через 1 ч после получения ФЭЯ начинают компактизоваться, приобретая червеобразную форму, спустя 24 и 48 ч увеличивается округлость ФЭЯ, на 4-е сут культивирования начинают формироваться везикулы. Процесс развития ФЭЯ характерен тем, что частицы распадаются на все более и более мелкие, каждая из которых стремится принять округлую форму. На протяжении всего культивирования (21 день) не наблюдалось прикрепления ФЭЯ ко дну чашки Петри и формирования монослоя.

Визуальное наблюдение за осмотическими процессами при насыщении и выведении криопротекторов свидетельствует о том, что они сходны с таковыми у трофобластических фрагментов крупного рогатого скота. Срок эквilibрации в 10%-м глицерине (5 мин) был нами определен в ходе проведения

Результаты витрификации ФЭЯ (II-я серия экспериментов) представлены в таблице, из которой видно, что наиболее эффективен следующий режим витрификации ФЭЯ: 5-минутная их эквilibрация в 10% Г, перенос в витрифицируемый раствор, охлажденный до 4 °С, состоящий из 25% Г и 25% ПГ, через 20 с погружение в жидкий азот; оттаивание в водяной бане при 20 °С в течение 4 с; выведение криопротектора в 0,5 М сахарозе в течение 5 мин; перенос в питательную среду.

При использовании ФЭЯ в качестве стимулятора развития эмбриона до поздних стадий наиболее широко используется методика формирования монослоя [7]. В этом случае количество клеток, необходимых для формирования монослоя, легко подсчитывается и регулируется. Методика соскабливания эпителиального слоя и культивирования фрагментов

предварительных исследований по насыщению ФЭЯ криопротекторами. Процесс насыщения 10% Г приводит к следующему: после внесения ФЭЯ в 10%-й Г движение ресничек прекращается и возобновляется через 30 с (начальная активность — 2 колебания в с), через 1–2 мин оно становится таким же, как и у свежих ФЭЯ; через 2–3 мин активность ресничек повышается до 6–7 колебаний за 1 с (у свежих — 5) и на 4-й мин выдержки снижается до 5; через 4 мин взвешенные до этого ФЭЯ осаждаются на дне чашки Петри; активность движения ресничек начинает снижаться через 20 мин пребывания в растворе. По-видимому, процесс насыщения ФЭЯ глицерином заканчивается к 4-й мин пребывания в растворе, а прекращение активности движения ресничек с последующим ее увеличением и затем стабилизацией связан с протеканием осмотических процессов в криобиологической системе. Последнее подтверждается следующим экспериментом. После выдержки ФЭЯ в 30%-м глицерине в течение 3 мин при переносе в питательную среду наблюдаются возобновление движения ресничек, их резкая активизация (7 колебаний в 1 с) с последующим прекращением движения и разрушением клеток ФЭЯ вследствие их гидратации. Время выведения криопротектора в 0,5 М сахарозе было определено при проведении предварительных исследований. Активность ресничек оптимизируется (5 колебаний в 1 с) после выдержки в 0,5 М сахарозе в течение 3–7 мин и последующего переноса в питательную среду. Для выведения криопротекторов можно использовать 1 М сахарозу, но в этом случае оптимальное время выведения криопротектора составляет 1–3 мин.

Результаты сверхбыстрого замораживания ФЭЯ (I-я серия экспериментов) позволяют сделать вывод о непригодности использования для криоконсервации ФЭЯ смеси проникающих и непроникающих кристаллообразующих криопротекторов. При сверхбыстром замораживании эмбрионов крысы, однако, были получены более высокие результаты, чем при витрификации [5], при использовании этих двух методов для криоконсервации фрагментов трофобласта [4], наоборот, более эффективным оказался метод витрификации.

В ходе предварительных исследований было установлено, что при переносе ФЭЯ, выдержанных 3 мин в 0,35 и 0,7 М сахарозе с криопротектором или в их смеси (I-я серия экспериментов) непосредственно в питательную среду жизнедеятельность ФЭЯ нормализуется. Непригодность сверхбыстрого замораживания для криоконсервации ФЭЯ, по-видимому, объясняется большим, чем при сверхбыстром замораживании эмбрионов, значением кристаллизации экстрацеллюлярной воды. При использовании сверхбыстрого замораживания ФЭЯ эффективным может быть введение в среду замораживания полимерных непроникающих криопротекторов [6].

Анализ результатов витрификации ФЭЯ, кроме основного вывода, позволяет сделать еще два. При повышении температуры витрифицируемого раствора (таблица) резко понижается жизнеспособность ФЭЯ, что, по-видимому, объясняется токсическим воздействием проникающих криопротекторов в высоких концентрациях. Длительное (при 4 °C) протекание процесса рекристаллизации также пагубно влияет на ФЭЯ, что не компенсируется снижением токсичности криопротекторов за счет скорости снижения температуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Betteridge K.J.* Embryo transfer in farm animals // *Agric. Monogr.* — Ottawa, Canada. — 1977. — 39 p.
2. *Ellington J.E., Carney E.W., Farrell P.B. et al.* Bovine 1-to 2-cell development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems // *Biol. Reprod.* — 1990. — 43. — P. 97–104.
3. *Eyestone W.H., First N.L.* Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in continioned medium // *J. Reprod. Fertil.* — 1989. — 85. — P. 715–720.
4. *Isachenko V.V., Ostashko R.I., Grishchenko V.I., Isachenko E.F.* Survival of trophoblastic fragments and vesicles after vitrification, ultrarapid freezing and storage at 4 °C // *Cryobiology.* — 1993. — 30. P. 432–437.
5. *Isachenko V.V., Ostashko F.I., Isachenko E.F.* Vitrification and ultrarapid freezing of rat embryos // *Theriogenology.* — 1992. — P. 227.

6. Kasai M., Komi J.H., Takakamo A. et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability // J. Reprod. Fertil. – 1990. – 89. – P. 91–97.
7. Ouhidi N., Menezo Y., Benet G., Nicollet B. Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species // Hum. Reprod – 1989. – 4. – P. 229–235.
8. Pollard J.W., Plante C., King W.A. et al. Fertilization capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells // Biol. Reprod. – 1991. – 44. – P. 102–107.
9. Thibault C. La culture *in vitro* de l'oeuf de vache // Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. – 1966. – 15. – P. 159–164.
10. Wintenberger S., Dauzier L., Thibault C. Le development *in vitro* de la brebis et de celui de la chevre // C.R.Seances Soc. Biol. Fil. – 1953. – 147. – P. 1971.
11. Xu K.P., Yadav B.R., Rorie R.W. et al. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells // J. Reprod. Fertil. – 1992. – 94. – P. 33–43.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
МПА “Эмбрион”, г. Харьков
Ин-т биологии и иммунологии воспроизведения
АН Болгарии, г. София

Поступила 20.02.95

В.І.ГРИЩЕНКО, Є.Ф.ІСАЧЕНКО, Ф.І.ОСТАШКО, В.В.ІСАЧЕНКО, К.Н.ХРОМУШКІН,
М.Й.КРАМАР, А.Г.ГЕРОДЕС, П.Т.ТОДОРОВ

КРІОКОНСЕРВАЦІЯ ЕПІТЕЛІАЛЬНОЇ ТКАНИНИ ЯЙЦЕПРОВОДА ЛЮДИНИ ШЛЯХОМ ПРЯМОГО ЗАНУРЕННЯ В ЗРІДЖЕНИЙ АЗОТ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

МПА “Ембріон”, м. Харків

Інститут біології та імунології відтворення АН Болгарії, м. Софія

Проведено експерименти по заморожуванню фрагментів епітелію яйцепроводів людини шляхом прямого занурення в зріджений азот з використанням різних комбінацій проникних і непроникних кріопротекторів. Встановлено оптимальні співвідношення кріопротекторів еквіліруючого середовища і деякі параметри режиму кріоконсервації цього біоб'єкту.

V.I.GRISCHENKO, E.F.ISACHENKO, F.I.OSTASHKO, V.V.ISACHENKO, K.N.KHROMUSHKIN,
M.I.KRAMAR, A.G.GERODES, P.T.TODOROV

CRYOPRESERVATION OF THE EPITHELIAL TISSUE OF THE HUMAN OVIDUCT BY DIRECT IMMERSION INTO LIQUID NITROGEN

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

MNPA “Embrion”

Institute of Biology and Reproductive Immunology of Academy of Sciences of Bulgaria, Sofia

The experiments were conducted on the freezing of the epithelial fragments of the human oviduct by means of a direct immersion into liquid nitrogen using various combinations of the penetrating and nonpenetrating cryoprotectants. The authors found the optimum ratio of the cryoprotectants of the equilibrating medium and some parameters of the mode of cryopreservation of this biosystem.

УДК 57.043

А.Ю.Шалин, В.Д.Мануильский, В.А.Власенко

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ ПОСЛЕ КРИО-КОНСЕРВИРОВАНИЯ ПРИ УЛЬТРАНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ИХ ТРАВМИРОВАННОСТИ

Проведено изучение влияния режимов кріоконсервации на 16 сортах озимой и яровой пшеницы. Установлено, что озимые пшеницы, кроме сорта Мирлебен, обладают высокой устойчивостью к кріоконсервации при температурах жидкого азота. У яровых пшениц такая устойчивость наблюдается только у мягкосеменных сортов. Твердосеменные сорта, как правило, после кріоконсервации снижают энергию прорастания и массу проростка. Изучение возникновения механических повреждений при кріоконсервации с помощью синтетических красителей не позволило ус-

тановить четкую корреляцию между снижением жизнеспособности семян и увеличением их травмированности. Делается вывод о том, что криоповреждения, возникающие при криоконсервировании, отличаются от повреждений, возникающих при механической уборке урожая.

Недостаточная экологическая обоснованность производственной деятельности в первую очередь оказывает неблагоприятное воздействие на растительный мир, вызывая климатические изменения, влияющие на глобальные изменения в биосфере: увеличение концентрации CO₂ в атмосфере, нарастание засушливых явлений, перфорирование озонового слоя. В результате этого уже в настоящее время происходит сужение ареалов отдельных видов, экспансия других, усиление мутационных процессов и т.п.

Для поддержания генетического образования биосферы требуются целенаправленное криоконсервирование и длительное хранение генетических ресурсов растений [2]. Однако проблема усложняется тем, что при отборе стандартов или образцов, представляющих полноту генетических характеристик в семенах, на их генетическую стабильность и жизнеспособность существенное влияние могут оказывать травматические повреждения зародыша и эндосперма. При криоконсервации в условиях жидкого азота такие повреждения могут усиливаться. В связи с этим целью данной работы являлось изучение влияния режимов криоконсервации на жизнеспособность культурных генотипов озимой и яровой пшеницы, семена которых при механизированных способах уборки подвержены различным травматическим повреждениям.

Для экспериментов были отобраны семена озимых мягких сортов пшеницы: Безостая 1, Донская полукарлик, Комсомольская 56, Мирлебен, Мироновская 61, Мироновская 808, Полесская 87, Тарасовская 29; мягких яровых сортов пшеницы: Коллективная, Мироновская яровая, Харьковская 6, Харьковская 12; а также твердых яровых сортов пшеницы: Народная, Харьковская 37, Харьковская 46 и Неодур. Критериями отбора таких сортов пшеницы было наличие максимума полезных признаков: устойчивость к неблагоприятным факторам среды, продуктивность, показатели качества зерна и др., широкое экологическое представительство, распространение в производстве и, как следствие, высокая селекционная ценность.

Т а б л и ц а 1
Жизнеспособность семян пшеницы после 3- и 6-месячной криоконсервации в жидком азоте

Сорт	Энергия прорастания, %			Масса сухого вещества корней проростка, мг			Масса сухого вещества проростка, мг		
	Конт-роль	Криоконсервация, мес		Конт-роль	Криоконсервация, мес		Конт-роль	Криоконсервация, мес	
		3	6		3	6		3	6
Озимая пшеница									
Безостая 1	96	94	98	5,3	3,8	4,6	8,3	5,9	8,3
Донская полукарлик	95	96	98	5,7	5,6	5,8	8,4	6,9	9,2
Комсомольская 56	98	94	98	5,3	3,3	4,1	7,9	5,3	6,5
Мирлебен	92	88	40	5,8	1,7	2,7	8,7	2,6	4,5
Мироновская 61	91	90	100	5,2	4,1	4,5	9,5	7,4	9,1
Мироновская 808	97	92	96	5,3	4,1	4,6	10,7	6,8	9,1
Полесская 87	99	94	96	5,4	2,3	2,8	9,3	3,7	6,1
Тарасовская 29	96	96	98	5,5	5,1	5,2	9,0	7,2	8,3
Яровая пшеница									
Коллективная	81	82	92	5,4	5,0	5,5	9,9	8,7	11,8
Мироновская яровая	91	82	88	5,1	3,5	4,7	9,4	4,9	9,6
Народная	79	68	28	5,2	3,4	3,3	9,6	6,1	7,7
Харьковская 6	86	84	72	5,2	3,2	3,5	10,2	5,3	7,2
Харьковская 12	85	82	76	4,8	3,1	3,8	9,5	6,4	8,0
Харьковская 37	79	80	61	6,4	3,4	3,3	10,5	6,5	6,4
Харьковская 46	80	82	40	5,5	2,6	2,2	10,7	4,5	5,3
± 0,95	1%			1,56					

В результате предварительных экспериментов были установлены режимы криоконсервации для выявления влияния травмированности семян на их

жизнеспособность после хранения в жидком азоте. Наиболее приемлемым оказалось замораживание семян при влажности 10–11% со скоростью 250–280 °С/мин до температуры –196 °С с последующим их хранением при этой температуре в течение 3 и 6 мес. Для проращивания семена отогревали при комнатной температуре. Лабораторную и полевую всхожесть, а также энергию прорастания определяли в соответствии со стандартизированными методиками [1]. Степень травмированности семян (с учетом макро- и микроповреждений) определяли с помощью растворов синтетических красителей [3]. Эксперименты проводили в 5-кратной повторности, в каждом образце было не менее 100 семян. Материалы опытов обработаны статистически.

Экспериментальные данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что на основании показателей энергии прорастания, массы корней проростка и массы всего проростка отобранные яровые и озимые пшеницы можно разделить по их чувствительности к условиям криоконсервации на 3 группы. К 1-й относятся сорта несколько увеличивающие или практически не изменяющие энергию прорастания и массу проростка по сравнению с контролем; ко 2-й — несколько снижающие эти показатели (в среднем на 20–30%) и к 3-й — сорта, у которых жизнеспособность семян через 6 мес криоконсервации снижалась более чем на 50%.

Для того чтобы выяснить возможные причины снижения жизнеспособности после криоконсервации, было проведено сопоставление изменений жизнеспособности проростков с изменениями их травмированности до и после криоконсервации. Для этого экспериментально были отобраны семена с различной степенью механического травмирования эндосперма и зародыша. После криовоздействия оказалось, что в ряде случаев происходит усиление механических и криоповреждений. Так, например, мягкая озимая пшеница сорта Мирлебен, имевшая на контроле 66% травмированных семян, после хранения 6 мес при температуре жидкого азота повреждена была больше — 76%. При этом повреждения возникали в результате образования микродефектов в зародыше семени: в контроле 6%, в опыте от 26 до 33%. Другие сорта мягкой озимой пшеницы даже при высоких уровнях травмированности (более 50%) существенно не изменяли энергию прорастания после криоконсервации.

Т а б л и ц а 2

Лабораторная и полевая всхожесть семян пшеницы, прошедших криоконсервацию различной продолжительности, %

Сорт	Лабораторная всхожесть, %			Полевая всхожесть, %		
	Контроль	Криоконсервация, мес		Контроль	Криоконсервация, мес	
		3	6		3	6
Озимая пшеница						
Безостая 1	97	100	90	50	60	82
Донская полукарлик	95	100	98	82	77	67
Комсомольская 56	99	94	98	55	55	55
Мирлебен	95	90	84	60	60	50
Мироновская 61	95	94	100	77	70	65
Мироновская 808	97	96	96	65	72	67
Полесская 87	99	96	98	75	82	72
Тарасовская 29	96	94	98	75	62	62
Яровая пшеница						
Коллективная	83	90	92	-	-	-
Мироновская яровая	92	86	84	-	-	-
Народная	92	78	80	-	-	-
Харьковская 6	88	92	92	-	-	-
Харьковская 12	91	88	94	-	-	-
Харьковская 37	88	86	81	-	-	-
Харьковская 46	83	88	76	-	-	-
Неодур	72	68	60	-	-	-
± 0,90	1,2%					

Изменение энергии прорастания и массы проростка после криоконсервации у сорта Мирлебен может быть связано с его повышенной реакцией на действие неблагоприятных факторов среды. Поэтому при криоконсервации семян этого сорта необходимо подбирать особые режимы.

При анализе данных по криоустойчивости семян мягких и твердых сортов яровой пшеницы оказалось, что мягкие пшеницы менее подвержены снижению жизнеспособности после криоконсервации по сравнению с твердосеменными сортами. У семян твердых яровых пшениц (Народная, Харьковская 37 и Харьковская 46) после хранения 6 мес в жидком азоте снижалась на 20–50% энергия прорастания и одновременно уменьшалась масса проростков. Сопоставление этих данных с уровнем травмированности семян до и после криоконсервации не позволяет выявить четкой корреляции исследуемых показателей.

Другим важным показателем, определяющим эффективность сохранения генетического материала при криоконсервации, является лабораторная и полевая всхожесть семян. Приведенные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что лабораторная и полевая всхожести у криоконсервированных семян озимой и яровых сортов пшеницы соответствуют энергии прорастания. При этом энергия прорастания и всхожесть семян у озимой пшеницы Мирлебен и яровых — Народная, Харьковская 37, Харьковская 46 и Неодур — были минимальными. Такого рода данные могут свидетельствовать о том, что криоповреждения семян после криоконсервации носят интегральный характер и связаны, прежде всего, с повреждением зародыша семени. Отсутствие видимых различий в опытах с определением травмированности семян и криоповреждениями, вероятно, указывает на различный характер повреждений, вызванных чисто механическими воздействиями и повреждениями, возникающими в процессе криоконсервации семян.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ижик Н.К. Полевая всхожесть семян. — Киев: Урожай, 1976. — 200 с.
2. Мануильский В.Д. Формирование криорезистентности и устойчивости растений к низким температурам. — Киев: Наук. думка, 1992. — 188 с.
3. Строна И.Г. Общее семеноведение полевых культур. — М.: Колос, 1966. — 361 с.

Работа выполнена в рамках проекта ГКНТ 02.04.05/008-93: “Разработать для Национального банка генетических ресурсов Украины систему длительного хранения семян путем криоконсервации и периодического восстановления их жизнеспособности в условиях искусственного климата” Государственной научно-технической программы 2.4 “Сохранение растительного и животного мира Украины”.

Мироновский ин-т пшеницы им. В.Н.Ремесло УААН,
п. Центральное, Киев. обл.

Поступила 13.03.95

А.Ю.ШАЛІН, В.Д.МАНУІЛЬСЬКИЙ, В.А.ВЛАСЕНКО

ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ НАСІННЯ ПШЕНИЦІ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ПРИ УЛЬТРАНИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД СТУПЕНЯ ЇХ ТРАВМОВАНOSTІ

Миронівський ін-т пшениці ім. В.Н.Ремесло УААН,
п. Центральне, Київ. обл.

Проведено вивчення впливу режимів кріоконсервування на 16 сортах озимої та ярової пшениці. Встановлено, що озимі пшениці, окрім сорта Мірлебен, мають високу стійкість до кріоконсервації при температурах жидкого азоту. У ярових пшениць така стійкість спостерігається тільки у м'яконасінневих сортів. Твердонасінневі сорти, як правило, після кріоконсервації знижують енергію проростання і масу проростку. Вивчення виникнення механічних пошкоджень при кріоконсервації за допомогою синтетичних барвників не дозволило встановити чітку кореляцію між зниженням життєздатності насіння та підвищенням їх травмованості. Таким чином, отримані результати свідчать про те, що кріоповшкодження, що виникають при кріоконсервуванні, відрізняються від пошкоджень, які виникають при механічному збиранні врожаю.

VIABILITY OF WHEAT SEEDS AFTER CRYOPRESERVATION AT ULTRALOW TEMPERATURES DEPENDING ON THE EXTENT OF THEIR INJURY

Mironov Institute of Wheat named after V.N.Remeslo, Kiev

The authors investigated the modes of cryopreservation using 16 varieties of winter and spring wheat. They found that winter wheat, with the exception of a Mirleben variety, possess high resistance to the action of cryopreservation at the liquid nitrogen temperatures. Among the varieties of spring wheat such resistance is identified only in a soft-seeded crops. Hard-seeded crops after cryopreservation demonstrate a routinely reduced sprouting energy and the sprout weight. A study of the mechanical injuries which are developed during cryopreservation using synthetic stains, failed to establish a distinct correlation between a reduction in the viability of the seeds and a rise in the extent of their injury. Thus, the results obtained testify to the fact that the cryoinjuries which are developed during cryopreservation, differ from the injuries, caused by mechanical harvesting.

УДК 612.111:57.043

С.Х.Межидов

О РОЛИ ОСМОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ПОВРЕЖДЕНИИ КЛЕТОК ПРИ ИХ ЗАМОРАЖИВАНИИ

Исследована зависимость гемолиза эритроцитов и t_c от концентрации натрия хлорида в присутствии 1,2-пропандиола (ПД) и глицерина. Установлено, что криопротекторы при температуре 20 °С не защищают клетки от повреждающего действия осмотического давления, хотя и увеличивают их гидратацию. Показано, что сдвиговые деформации на границе растущего кристаллического фронта приводят к разрушению эритроцитов.

До сих пор важная роль в повреждении клеток при замораживании (криоконсервировании) отводится повышению осмотического давления в результате вымораживания воды и концентрирования внеклеточных компонентов [1, 2, 6]. Защитное действие криопротекторов объясняется тем, что они связывают воду, уменьшают количество образовавшегося льда и концентрацию внеклеточных компонентов и, тем самым, увеличивают гидратацию клеток [1, 2, 6]. Однако известно, что при данной отрицательной температуре, наличии в растворе кристаллов льда и равновесном состоянии системы активность растворенных компонентов является величиной постоянной независимо от состава среды. Поскольку осмотическое давление определяется активностью растворенных компонентов, то и оно является постоянной величиной:

$$\pi = RT \times \ln a_i = \text{const},$$

где π — осмотическое давление; R — универсальная газовая постоянная; T — температура, К; a_i — активность i -й компоненты. Из вышеизложенного следует, что если повреждение клеток связано с осмотическим давлением, то оно не должно зависеть от наличия в среде криопротектора. Для проверки данного вывода проведены исследования по изучению зависимости гемолиза эритроцитов от концентрации натрия хлорида в присутствии криопротекторов.

При проведении экспериментов использован зонд 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил (ТЕМПОН), синтезированный по методике, описанной ранее [12], и эритроциты донорской крови человека, которые хранились 3–5 сут при температуре 4 °С. Клетки отмывали 3 раза в отношении 1:1 физиологическим раствором натрия хлорида, приготовленным на натрий-фосфатном буфере с $pH=7,2$ и центрифугировали при 3000 об/мин 15 мин, а в присутствии криопротекторов — 30 мин. После отмывки к эритромассе в отношении 1:1 добавляли раствор, содержащий 1,2-ПД — 56%, сахарозу — 4%, натрия хлорид — 0,5%. Конечная концентрация 1,2-ПД в надосадке при этом была $35 \pm 1\%$ (определена методом 1H -ЯМР). Через 30 мин (время проникновения 1,2-ПД даже при 0 °С не больше 15 мин) суспензию эритроцитов центрифугировали и удаляли надосадок. Затем эритромассу перемешивали и объемом 50

1,2-ПД по 15, 25, 35% и концентрации NaCl 0,4% моль/л τ имело значения соответственно $(9,6 \pm 0,4) \times 10^{-11}$, $(8,1 \pm 0,2) \times 10^{-11}$ и $(7,4 \pm 0,4) \times 10^{-11}$ с. Эти результаты согласуются с данными литературы о повышении гидратации клеток криопротекторами [1, 6]. Увеличение концентрации NaCl при данной концентрации 1,2-ПД вызывало увеличение τ , что согласуется с существующими данными о его зависимости от концентрации различных веществ [3, 8].

Таким образом, присутствие в среде 1,2-ПД и глицерина в 35%-й концентрации не повышает устойчивость эритроцитов к действию осмотического давления, хотя и увеличивает их гидратацию. Однако замораживание эритроцитов со скоростью $(4 \pm 1)^\circ\text{C}/\text{мин}$ в присутствии 35%-го 1,2-ПД с некоторыми высоко- и низкомолекулярными добавками позволяет замораживать и оттаивать эритроциты практически без гемолиза ($<1\%$). После отмывки и перевода клеток в физиологический раствор гемолиз не превышал 0,3%, что указывает на их высокую морфофункциональную сохранность. Кроме того, есть методы длительного хранения эритроцитов при температуре -30 и $-40 \div -60^\circ\text{C}$ [9, 10] с высокой сохранностью, хотя при этих температурах должно быть очень высокое осмотическое давление (большее чем то, которое создает раствор натрия хлорида при концентрации 4 моль/л), которое должно привести к повреждению всех клеток, однако этого не происходит. Такое защитное действие криопротекторов можно объяснить только тем, что осмотическое давление не достигает значений, характерных для данной температуры в условиях равновесия системы, или оно не может реализовать повреждающего воздействия в силу того, что мембрана и цитозоль образуют единую систему с очень высокой вязкостью, а это, в свою очередь, уменьшает скорость и величину деформаций сдвига как клетки, так и окружающей их среды. При малых концентрациях криопротектора и при его отсутствии скорость и величина деформации сдвига как клетки, так и среды носят выраженный характер, что приводит к разрушению клеток.

Причинами, препятствующими достижению осмотическим давлением величины, характерной для данной температуры, могут быть: 1) зависимость осмотического давления от вязкости среды в силу зависимости импульса (скорости) частиц от вязкости среды; 2) замедление скорости кристаллизации воды, уменьшающее концентрацию внеклеточных компонентов при данной температуре; 3) образование участков со стеклообразной структурой, вымораживание воды из которых затруднено из-за высокой вязкости среды и необходимости перестройки структуры всего стеклообразного участка, что может быть связано с большими энергетическими затратами.

Для проверки влияния сдвиговых деформаций на клетки провели следующий эксперимент. Суспензия эритроцитов была заморожена при -10°C в пробирках диаметром $(9,3 \pm 0,3)$ мм после добавления к ним 1:1 раствора, содержащего 1,2-ПД – 20%, поливинилпирролидон с молекулярной массой 12600 (ПВП-12600) – 10% и натрия хлорида – 0,5%. После отогрева гемолиза в надсадке не отмечено. Затем, с использованием тех же пробирок и крови того же состава криоконсерванта, при тех же температурах проведен аналогичный эксперимент, но, в отличие от первого эксперимента, после инициирования проволокой (путем трения) кристаллизации на дне пробирки проволоку не удаляли. При этом формировался растущий кристаллический фронт как на дне пробирки, так и на конце проволоки. Затем проволоку вращали с $\omega=60$ об/мин так, чтобы происходило тангенциальное смещение на границе растущих кристаллических фронтов, но не оказывалось существенного давления по нормали (проволока тонкая диаметром 0,3 мм). После оттаивания гемолиз эритроцитов превышал 10%. Следовательно, сдвиговые деформации в среде со смещением клеток относительно друг друга и окружающей среды приводят к повреждению эритроцитов.

Высказанные в данной работе остальные предположения о механизмах повреждения клеток требуют дальнейшего теоретического и экспериментального обоснования. Однако приведенные результаты экспериментальных исследований имеют важное значение для понимания механизмов повреждения и защиты клеток при замораживании и создания новых технологий криоконсервирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. Н.С.Пушкаря и А.М.Белоуса. – Киев: Наук. думка, 1981. – 608 с.
2. Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С. Криоконсерванты. – Киев: Наук. думка, 1979. – 198 с.
3. Бураченко А.Л., Троцкая Л.С. Исследование вращательной и трансляционной подвижности частиц в жидкой фазе методом электронного парамагнитного резонанса // Изв. АН СССР. Сер. хим. – 1966. – № 4. – С. 602–609.
4. Лихтенштейн Г.И. Метод спинового зонда в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 255 с.
5. Межидов С.Х., Моисеев В.А. Влияние температуры на гидратацию эритроцитов // Биофизика. – 1991. – № 1. – С. 294–298.
6. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. – Киев: Наук. думка, 1978. – 204 с.
7. Рождественская М.А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови // Актуальные вопросы переливания крови. – М.: Медгиз, 1955. – С. 55–58.
8. Стрюков В.Б., Королев Г.В. Исследование вращательной подвижности иминоксильного радикала в различных полимерах // Высокомолекулярные соединения. – 1969. – 11, № 2. – С. 419–425.
9. Суханов Ю.С., Семенова Н.В., Азовская С.А., Федорова Л.И. Криоконсервирование и деглицеринизация эритроцитов, хранившихся в электрохолодильниках при -30°C . Метод. рекоменд. – М.: МЗ СССР, 1987. – 29 с.
10. Терехов Н.Т., Петров М.М. Эффективные трансфузионные эритроцитные среды. – Киев: Здоровье, 1990. – 165 с.
11. Meryman H.T. In: The frozen cell. / Ed. by Wolstenholme G.E.W., O'Connor. London: Churchill, 1970. – P. 51–57.
12. Rozantsev E.G. Free nitroxide radicals. – N. Y.: Plenum press, 1970. – P. 235.

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

Поступила 15.12.94

С.Х.МЕЖИДОВ

ПРО РОЛЬ ОСМОТИЧНИХ ФАКТОРІВ У ПОШКОДЖЕННІ КЛІТИН ПРИ ЇХ ЗАМОРОЖУВАННІ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчена залежність гемолізу еритроцитів та τ_c від концентрації натрію хлориду в присутності 1,2-пропандіолу та гліцерину. Встановлено, що криопротектори при температурі 20°C не захищають клітини від пошкоджуючої дії осмотичного тиску, хоча і збільшують їх гідратацію. Показано, що зсувові деформації на межі зростаючого кристалічного фронту призводять до руйнування еритроцитів.

S.Kh.MEZHDIV

ON THE ROLE OF OSMOTIC FACTORS IN CELL INJURY DURING FREEZING

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

The given research deals with studying the dependence of the RBC hemolysis and τ_c on the concentration of sodium chloride in the presence of 1,2-propanediol and glycerol. It was found that at the temperature of 20°C cryoprotectants do not protect the cells against the damaging action of osmotic pressure, though they increase the extent of their hydration. Shift deformations at the boundary of the growing crystal front were shown to result in the destruction of the RBC.

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

1 1996

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

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

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

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

ИНДЕКС 70474

ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1996. №1. 1-56