3

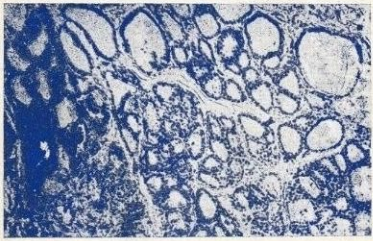
ISSN 0233-7673

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

1992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ЧУЙКО В.А. Функциональая активность трансплантата криоконсервированной при –196 °С щитовидной железы

ШПАКОВА Н.М., БОНДАРЕНКО В.А. Чувствительность эритроцитов к холодовому шоку в средах, содержащих соли и неэлектролиты

ОСЕЦКИЙ А.И., ГУРИНА Т.М., ЗАГНОЙКО В.И. Термопластические свойства замороженной плазмы крови зимоспящих животных

ТЕРЕНТЬЕВ А.Н., ЗИНЧЕНКО А.В., ЗИНЧЕНКО В.Д., МУСАТОВ З.И., ЩЕТИНСКИЙ М.И. Влияние некоторых криопротекторов на состояние воды в клетках *Y.Pestis* EV76 при замораживании–оттаивании

ГРИЩЕНКО В.И., ЛУЦКАЯ Л.И., ДАХНО Ф.В. Криоконсервирование ооцитов и эмбрионов человека



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

ДЕРЖАНИЕ

ОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

ко В. А. Функциональная активность трансплантата криоконсервированной —196 °С щитовидной железы 3

акова Н. М., Бондаренко В. А. Чувствительность эритроцитов к холодовому у в средах, содержащих соли и неэлектролиты 15

цкий А. И., Гурина Н. М., Загнойко В. И. Термопластические свойства замо-женной плазмы крови зимоспящих животных 20

иков А. М., Вепринцев Б. Н., Утешев В. К., Смолихина Т. И., Линник Т. П. яние переохлаждения и криопротекторов на внутриклеточную кристаллиза-в зародышах вьюна 27

ич И. М. Трансформация углеводных составляющих изопероксидаз пророст-кукурузы при холодовом стрессе 33

равара А. А., Цвиренко С. В., Ястребов А. П. Изучение действия холода на ояние системы крови красной полевки двух популяций, обитающих в раз-ных климато-географических зонах 38

ИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

щенко В. И., Луцкая Л. И., Дахно Ф. В. Криоконсервирование ооцитов мбрионов человека 43

ИОМЕДИЦИНА

хольский А. П., Данилевский Ю. Н., Миклашевич В. В., Мастицкий А. В., тивень Н. Ф., Худзинский В. М. Криодиатермокоагуляция при лечении боль-с опухолевидными заболеваниями слизистой оболочки полости рта и кожи а 50

ТКИЕ СООБЩЕНИЯ

дид О. А., Загнойко В. И., Моисеев В. А., Гулевский А. К. Влияние гипотер-на проницаемость мембран эритроцитов для феррицианидных ионов . . . 53

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН Украины, «Проблемы криобиологии» 1992 г.

h at a decreased thyroxine content by thyroidectomy was repaired after transplantation of the thyroid gland while the content of triode thyronin remained at a low level. Transplantation of thyroid gland resulted in a decrease of increased (by thyroidectomy) level of thyrotropic hormone in blood. The data on the reconstitution of thyroid and thyrotropic hormones correlated with the improvement of the state of patients thus indicating the efficiency of transplantation of cryopreserved thyroid gland.

УДК 57.043

Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ К ХОЛОДОВОМУ ШОКУ В СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ СОЛИ И НЕЭЛЕКТРОЛИТЫ

Изучались особенности развития холодового шока эритроцитов во времени в зависимости от состава среды, а также исследовалось влияние электролитов (1,20 моль/л NaCl) и неэлектролитов (0,86 моль/л сахарозы) на состояние клеток на этапе предварительной инкубации перед охлаждением. Показано, что в солевых средах (1,20 моль/л NaCl) увеличение продолжительности инкубации приводит к уменьшению чувствительности клеток к охлаждению, а в средах, содержащих неэлектролит (0,86 моль/л сахарозы), имеет место обратная зависимость, т. е. чувствительность эритроцитов к холодовому шоку возрастает со временем. Установлено, что в указанных условиях наблюдаются различия на этапе предварительной инкубации при 37 °С в динамике изменения барьерной функции мембраны, что проявляется в более высоком уровне освобождения ионов K^+ на начальных этапах инкубации в гипертоническом растворе NaCl.

Повышенная тоничность среды сенсибилизирует эритроциты человека к охлаждению в интервале температур 37 → 0 °С [2,8]. Это проявляется в нарушении целостности плазматической мембраны клетки на этапе предварительной инкубации перед охлаждением, определяемой по выходу из эритроцитов ионов K^+ [2]. Конкретный характер развития гипертонического холодового шока клеток зависит от условий, в которых находятся эритроциты перед охлаждением, то есть от состава, тоничности, температуры и *pH* среды. Например, как показано [2,8], присутствующие в среде соли и неэлектролиты различным образом влияют на развитие гипертонического холодового шока эритроцитов. Поэтому целью данной работы явилось изучение особенностей развития гипертонического холодового шока эритроцитов в зависимости от состава среды, а также влияния электролитов (1,20 моль/л NaCl) и неэлектролитов (0,86 моль/л сахароза) на состояние эритроцитов на этапе предварительной инкубации перед охлаждением.

Эритроциты получали из донорской крови II группы. После удаления плазмы эритромассу дважды отмывали физиологическим раствором, содержащим 0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, *pH* 7,4, и готовили суспензию эритроцитов с нужным гематокритом.

Для изучения влияния осмотических факторов суспензию эритроцитов в средах, содержащих 1,20 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, *pH* 7,4 или 0,86 моль/л сахарозу, 0,01 моль/л фосфатный буфер, *pH* 7,4, инкубировали при 37 °С в течение 0 ÷ 90 мин. После этого определяли выход ионов K^+ и измеряли гематокрит. Холодовой шок осуществляли переносом проб, проинкубированных при 37 °С различное время, в 0 °С на 15 мин (скорость охлаждения 1 ÷ 2 °С/с). Температуру контролировали с помощью медь-капелевого термоэлектрического преобразователя. После завершения инкубации пробы центрифугировали, и поглощение супернатанта определяли спектрофотометрически при 543 нм. Выход гемоглобина рассчитывали в процентах по отношению к 100 %-ному гемолизу.

Соли и неэлектролиты различно влияют на уровень развития холодового шока эритроцитов при охлаждении от 37 до 0 °С [2,8]. Так как уро-

перед охлаждением [2], неодинаковая чувствительность к охлаждению клеток, инкубируемых в средах с NaCl или сахарозой, может быть обусловлена различиями в характере развития процессов, связанных с нарушением осмотического равновесия на мембране и возрастанием клеточной проницаемости.

Известно, что даже при значительном повреждении мембраны освобождение ионов K^+ является медленным процессом [7], т. е. для изучения динамики этого процесса необходима относительно продолжительная инкубация эритроцитов. При исследовании проницаемости эритроцитов для ионов K^+ в среде, содержащей 0,86 моль/л сахарозу или 1,20 моль/л NaCl, клетки инкубировались при 37 °С в течение 0 ÷ 90 мин (табл. 1). Из полученных данных следует, что в начальной фазе инкубации более интенсивное освобождение ионов K^+ наблюдается в гипертонической солевой среде, а не в среде, содержащей неэлектролит (табл. 1). В среде, содержащей 1,20 моль/л NaCl, уровень освобождени ионов K^+ фактически выходит на плато к 50-ой минуте инкубации, в то время как в среде, содержащей 0,86 моль/л сахарозу, процесс развивается более плавно и возрастание уровня освобождения ионов K^+ наблюдается вплоть до 80-й минуты инкубации. С чем связаны различия в динамике освобождения ионов K^+ в процессе инкубации эритроцитов в растворах, содержащих 1,20 моль/л NaCl и 0,86 моль/л сахарозу, остается неясным.

Таблица 1

Влияние продолжительности инкубации при 37 °С на уровень освобождения ионов K^+ из эритроцитов в 1,20 моль/л NaCl и 0,86 моль/л сахарозе ($n = 6$)

Время инкубации, мин	Среда инкубации	
	NaCl, 1,20 моль/л	Сахароза, 0,86 моль/л
	3,16±0,68	2,09±0,37
5	17,87±2,91	8,66±1,58*
10	36,03±5,34	17,88±6,34*
20	42,81±5,09	28,48±5,12*
30	51,76±3,94	36,87±7,08*
40	54,53±0,83	41,61±6,86*
50	58,51±4,05	51,07±3,86*
60	59,06±5,05	53,26±3,27
70	60,01±4,03	57,53±3,17
80	59,25±1,77	61,07±3,12
90	59,79±4,39	62,16±5,54

Примечание: * $P < 0,05$.

Известно, что сахароза является осмотическим буфером, способным ограничивать развитие процессов, связанных с нарушением барьерных свойств мембраны [1]. Поэтому более интенсивное освобождение ионов K^+ на начальных этапах инкубации в солевой среде может быть связано с отсутствием стабилизирующего влияния на мембрану компонентов наружного раствора. Наблюдаемые различия могут отражать также неодинаковую динамику достижения клетками равновесия по анионам Cl^-, что в конечном итоге отражается на *pH* внутриклеточной среды и объеме клеток [4].

Для оценки такого макроскопического параметра, как объем клеток, было произведено измерение гематокрита, выражаемого как относительный объем, достигаемый в средах, содержащих гипертонические растворы NaCl и сахарозы при 37 °С (рис. 1, *А* и *Б*). Полученные данные свидетельствуют, что при 37 °С относительное изменение объема эритроцитов более выражено в среде, содержащей 1,20 моль/л NaCl. Помимо этого, в процессе продолжительной (90 мин) инкубации наблюдаются две четко выраженные фазы изменения объема, первая из которых охватывает интервал 0÷40 мин, а вторая —50÷90 мин (рис. 1). Указанная особенность наблюдается независимо от состава гипертонической среды. Более выраженное относительное изменение объема в среде, содержащей 1,20 моль/л NaCl, может быть следствием быстрой потери ионов K^+ в первые 40 мин инкубации. Следует отметить, однако, что начальное обезвоживание клеток происходит относительно быстро, и амплитуда относительного изменения

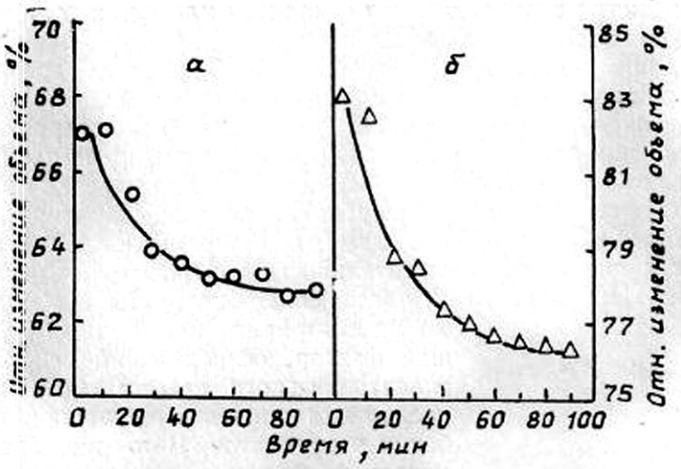


Рис. 1. Изменение объема эритроцитов в зависимости от продолжительности инкубации в присутствии 1,20 моль/л NaCl (*а*) и 0,86 моль/л сахарозы (*б*) при температуре 37 °С

объема в процессе длительной инкубации является небольшой (рис. 1). Так как осмотический отток воды охватывает период времени меньше 1 с [5], последующие изменения относительного объема клеток, по-видимому, отражают процесс, связанный с медленным достижением клетками равновесия по катионам [5] и, возможно, макроскопическую реорганизацию структуры, связанную с изменением ассоциации компонентов цитоскелета и мембраны.

При рассмотрении условий, имеющих место в процессе инкубации эритроцитов с 1,20 моль/л NaCl, следует ожидать, что в этом случае потеря ионов K^+ должна сопровождаться поступлением ионов Na^+ в клетку и, соответственно, возрастанием объема клеток на более поздних этапах инкубации. Полученные данные (рис. 1) показывают, что эритроциты, инкубируемые в солевых средах, не набухают даже в пределах относительно продолжительного выдерживания их в этих условиях. В целом это согласуется с известными данными о влиянии гипертонических растворов солей на характер распределения ионов между наружной средой и цитоплазмой эритроцитов [4]. Возможно, однако, что в указанных условиях происходит эквивалентный обмен K^+ на Na^+ без существенного изменения осмолярности внутриклеточного раствора по сравнению с осмолярностью наружной среды. Об этом свидетельствуют данные работы Вулгар [11], показывающие, что при нарушении структуры мембраны эритроцитов в гипертонических средах часть ионов Na^+ из наружной среды поступает в клетки. Подобная особенность изменения проницаемости мембраны, связанная с относительным сохранением макроскопических характеристик эритроцитов в процессе инкубации, может быть обусловлена специфическим характером модификации структуры и проницаемости мембраны при температуре инкубации 37 °С.

Известно, что при 37 °С роль трансмембранных дефектов, способных резко изменить проницаемость мембраны для ионов, в значительной степени ограничена [6]. Осмотическая резистентность эритроцитов, оцениваемая по их устойчивости к лизису в средах с пониженной тоничностью, также резко возрастает при повышении температуры до 37 °С [10]. Подобная специфика влияния температуры на процессы, вызывающие нарушение барьерной функции мембраны эритроцитов, связана со способностью белков цитоскелета поддерживать структурную непрерывность мембраны в условиях, когда происходят значительные изменения объема клеток [10]. Данные о температурной зависимости влияния дилаурилфосфатидилхолина, нарушающего барьерную функцию мембраны эритроцитов при 37 и 0 °С, показывают, что появление каналов утечки для ионов K^+ вблизи

0 °С сопровождается быстро развивающимся гемолизом клеток, в то время как при 37 °С наблюдается только освобождение ионов K^+ без гемолиза [9].

Таким образом, при температуре инкубации 37 °С переход эритроцитов к состоянию равновесия по катионам (отражающий появление долгоживущих дефектов бислоя, проницаемых для ионов Na^+) маловероятен. Более вероятно появление короткоживущих дефектов бислоя, проницаемых для ионов Na^+, на каком-то из этапов инкубации клеток. Поглощение части ионов Na^+ и сопутствующее этому процессу ингибирование дополнительного уменьшения объема клеток, сопровождающего потерю ионов K^+ и воды, может привести к снижению чувствительности эритроцитов к последующему охлаждению. Иными словами, поглощение части ионов Na^+ можно рассматривать как протектирующий фактор, ослабляющий действие гипертонического стресса по мере увеличения продолжительности инкубации эритроцитов. В то же время указанный механизм может не проявлять себя в случае, когда эритроциты инкубируются в сахарозе, что связано с относительно большим размером молекул этого неэлектролита и, соответственно, с менее выраженной способностью сахарозы проникать в клетки.

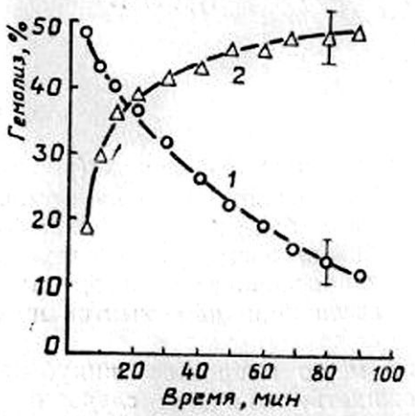


Рис. 2. Влияние продолжительности инкубации при 37 °С на гемолиз эритроцитов в средах, содержащих 1,20 моль/л NaCl *(1)* и 0,86 моль/л сахарозу *(2)*

Различия в уровне чувствительности эритроцитов к холодовому шоку в зависимости от продолжительности инкубации в присутствии 1,20 моль/л NaCl и 0,86 моль/л сахарозы видны из данных, представленных на рис. 2. В процессе гипертонической инкубации при 37° С в присутствии 1,20 моль/л NaCl чувствительность эритроцитов к холодовому шоку снижается. Обратная зависимость наблюдается, если клетки инкубировать в присутствии 0,86 моль/л сахарозы. В последнем случае по мере увеличения продолжительности инкубации чувствительность эритроцитов к холодовому шоку возрастает.

Данные, представленные на рис. 2, совпадают с результатами, полученными Такахаши и Вильямс [8]. Возрастание чувствительности эритроцитов к охлаждению в присутствии 0,86 моль/л сахарозы, наблюдаемые по мере увеличения продолжительности инкубации в гипертонической среде, содержащей неэлектролит, в определенной степени может отражать иную динамику модификации барьерной функции мембраны по сравнению с условиями, когда клетки инкубируются в присутствии NaCl (рис. 2). Максимальная сенсибилизация эритроцитов к охлаждению в присутствии 0,86 моль/л сахарозы соответствует второй фазе инкубации — 50÷90 мин, когда резко интенсифицируется процесс освобождения ионов K^+. Освобождение ионов K^+ в процессе инкубации эритроцитов в присутствии 1,20 моль/л NaCl к этому моменту практически достигает плато. В этом случае вторая фаза процесса, по мере увеличения продолжительности инкубации, характеризуется снижением чувствительности клеток к охлаждению.

Таким образом, гиперосмотические растворы NaCl и сахарозы неодинаково влияют на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку. Прогрессирующее возрастание чувствительности клеток, наблюдаемое в присутствии 0,86 моль/л сахарозы, может быть обусловлено возрастающей во времени утечкой ионов K^+ из эритроцитов без сопутствующего поглощения ионов из наружной среды. Последнее может усилить действие

гипертонического стресса на мембрану, что можно интерпретировать в терминах отрицательного давления, развивающегося в подобных условиях [3]. В то же время увеличение продолжительности инкубации в гипертонической среде, содержащей NaCl, может сопровождаться поглощением ионов Na^+, т. е. включать процесс, способный резко понизить чувствительность клеток к охлаждению. Несмотря на различия в равновесном объеме клеток в гипертонических растворах NaCl и сахарозы (0,86 моль/л) (рис. 1), чувствительность их к холодовому шоку практически одинакова [2]. Из этого следует, что минимальный объем, достигаемый эритроцитами при повышении тоничности среды, не является единственным фактором, определяющим чувствительность клеток к холодовому шоку, а сам механизм сенсибилизации к охлаждению имеет сложную основу и связан с одновременным действием различных факторов, включающих перераспределение ионов, изменение внутриклеточного *pH* и др.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Белоус А. М., Шрago М. И., Пушкарь Н. С.* Криоконсерванты.— Киев: Наук. думка, 1977.— 200 с.
2. *Бондаренко Т. П.* Роль липидов в повреждении мембран митохондрий и эритроцитов при охлаждении: Автореф. дис. ...канд. биол. наук.— Харьков, 1981.— 16 с.
3. *Дегтярев А. В.* Температурная модификация проницаемости фосфолипидных везикул в неравновесных осмотических условиях // Криобиология.— 1986.— № 4.— С. 44—45.
4. *Brumen M., Haser R., Svetina S.* Osmotic st tes of the red blood cell // Bioelectrochem. Bioenerg.— 1979.— **6**, N 2.— P. 227—243.
5. *Dalmark M.* Chloride and water distribution in human red cells // J. Physiol.— 1975.— **250**, N 1.— P. 65—84.
6. *Minetti M., Ceccarini M.* Protein-dependent lipid lateral phase separation as a mechanism of human erythrocyte ghosts resealing // J. Cell. Biochem.— 1982.— **19**, N 1.— P. 59—77.
7. *Sachs J. R., Knauf P. A., Dunham P. B.* Transport through red cell membranes // The Red Blood Cell.— New York: Acad. Press, 1974.— P. 613—705.
8. *Takahashi T., Williams R. J.* Thermal shock hemolysis in human red cells. 1. The effects of temperature, time, and osmotic stress // Cryobiology.— 1983.— **20**, N 5.— P. 507—520.
9. *Tanaka Y., Inoue S., Nojima S.* Interaction of dilauroylglycerophosphocholine with erythrocytes. Prehemolytic events and hemolysis // Biochim. Biophys. Acta.— 1980.— **600**, N 1.— P. 126—139.
10. *Tanaka K.—I., Ohnishi S. I.* Heterogeneity in the fluidity of intact erythrocyte membrane and its homogenization upon hemolysis // Biochim. Biophys. Acta.—1976.— **426**, N 2.— P. 218—231.
11. *Woolgar A. E.* Hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing in solutions containing sucrose: relationship with posthypertonic hemolysis and solute movement // Cryobiology.—1974.— **11**, N 1.—P. 44—51.

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

Поступила 02.09.91

Н. М. ШПАКОВА, В. А. БОНДАРЕНКО

ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ДО ХОЛОДОВОГО ШОКУ В СЕРЕДОВИЩАХ, ЯКІ МІСТЯТЬ СОЛІ І НЕЕЛЕКТРОЛІТИ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
АН України, м. Харків

Вивчались особливості розвитку холодового шоку еритроцитів у часі залежно від складу середовища, а також досліджувався вплив електролітів (1,20 моль/л NaCl) і неелектролітів (0,86 моль/л сахарози) на стан клітин на етапі попередньої інкубації перед охолодженням. Показано, що в солевих середовищах (1,20 моль/л NaCl) збільшення тривалості інкубації є причиною зменшення чутливості клітин до охолодження, а в середовищах, які містять неелектроліт (0,86 моль/л сахарози), має місце зворотня залежність, тобто чутливість еритроцитів до холодового шоку зростає з часом. Вста-

новлено, що в названих умовах спостерігаються відмінності на етапі попередньої інкубації при 37 °С в динаміці зміи бар'єрної функції мембрани, що виявляється у більш високому рівні звільнення йонів K^+ на початкових етапах інкубації у гіпертонічному розчині NaCl.

N. M. SHPAKOVA, V. A. BONDARENKO

THE SENSITIVITY OF ERYTHROCYTES TO COLD SHOCK IN MEDIA CONTAINING SALTS AND NONELECTROLYTES

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

Peculiarities of the development of cold shock in erythrocytes in time depending on the medium composition were studied as well as the influence of electrolytes (1.20 mol/l of NaCl) and nonelectrolytes (0.86 mol/l of sucrose) on the cells during preliminary incubation before cooling. It has been demonstrated that increasing the duration of incubation in salt media (1.20 mol/l of NaCl) may diminish the sensitivity of cells to cooling, the reverse is observed in media with nonelectrolytes (0.86 mol/l of sucrose), i.e. the sensitivity of erythrocytes to cold shock increases with time. It has been found that the differences are observed under mentioned conditions at the stage of preliminary incubation at 37 °C in the dynamics of changes in membrane permeability as indicated by a greater liberation of K^+ at the initial stages of incubation in the hypertonic solution of NaCl.

УДК 57.043:612.111:536.54

А. И. Осецкий, Т. М. Гурина, В. И. Загнойко

ТЕРМОПЛАСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЗАМОРОЖЕННОЙ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЗИМОСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ

В работе представлены результаты исследования низкотемпературной тепловой динамики белковых молекул методом термопластической деформации замороженных растворов плазмы крови. Показано, что метод очень чувствителен к изменению фазового состояния молекул и к малым добавкам в растворитель веществ, ингибирующих тепловую динамику поверхностных слоев белковых глобул. Этот эффект наглядно продемонстрирован на образцах плазмы крови зимоспящих животных. Показано, что ингибирование флуктуационной подвижности реакционно способных поверхностных слоев белковых глобул в плазме крови сусликов, находящихся в состоянии зимней спячки, объясняется синтезированием в этом состоянии естественных модификаторов, резко повышающих микровязкость среды в поверхностных слоях белковых глобул.

В экспериментальной биохимии традиционно большое внимание уделяется исследованию конформационной подвижности молекул белков как одному из основных факторов, определяющих их реакционную способность. Особую важность данная проблема приобретает при исследовании механизма холодовой адаптации гетеротермов, где структурно-функциональные свойства белковых молекул изменяются в зависимости от физиологического состояния животных. В имеющихся литературных источниках показано, что адаптационные изменения в организме связаны со снижением уровней углеводного обмена [10], биосинтеза белков и нуклеиновых кислот [5,6], угнетением биоэнергетических процессов [2]. Все эти явления могут быть связаны с изменением тепловой динамики белковых молекул. Эти изменения могут происходить по разным причинам, например, в силу изменения структуры самих молекул или за счет изменения состава и свойств среды, в которой они функционируют.

Традиционные методы изучения конформационной подвижности биомолекул, такие как рентгенодинамический анализ, рэлеевское рассеяние мессбауэровского излучения [4], использование спиновых [8] и люминесцентных меток [3], при решении этой проблемы не дают однозначных ре-