

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

3 | 87



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Грищенко (главный редактор), А. М. Белоус (зам. гл. редактора), Ю. П. Благой, Р. Г. Бутенко, Б. Н. Вепринцев, В. И. Гольданский, В. И. Луговой, Ф. И. Осташко, Е. Я. Панков, Л. А. Пирузян, Н. С. Пушкирь, Б. П. Сандомирский, А. С. Снурников, К. М. Сытник, А. М. Утевский, А. Г. Федотенков, А. А. Цуцаева, В. И. Шумаков, Т. Н. Юрченко

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

С. И. Аксенов (Москва), Н. Г. Бакрадзе (Тбилиси), М. Е. Бекер (Рига), П. В. Белошицкий (Киев), Д. М. Гродзинский (Киев), В. Н. Запорожан (Одесса), Л. В. Калакуцкий (Пушино, Моск. обл.), А. Д. Курбатов (Ленинград), В. А. Наер (Одесса), В. А. Никитин (Харьков), Г. П. Пинаев (Ленинград), Г. Б. Сергеев (Москва), М. А. Соловьева (Киев), Н. Г. Соломонов (Якутск), Н. Н. Тимофеев (Москва), В. М. Чередниченко (Харьков), В. В. Шенталь (Москва), Э. З. Эмирбеков (Махачкала)

EDITORIAL BOARD

V. I. Grishchenko (Editor-in-Chief), A. M. Belous (Associated Editor), Yu. P. Blagoj, R. G. Butenko, B. N. Veprintsev, V. I. Goldansky, V. I. Lugovoj, F. I. Ostashko, E. Ya. Pankov, L. A. Piruzyan, N. S. Pushkar, B. P. Sandomirsky, A. S. Snurnikov, K. M. Sytnik, A. M. Utevsky, A. G. Fedotenko, A. A. Tsutsayeva, V. I. Shumakov, T. N. Yurchenko

EDITORIAL COUNCIL

S. I. Aksenow (Moscow), N. G. Bakradze (Tbilisi), M. E. Beker (Riga) P. V. Beloshitsky (Kiev), D. M. Grodzinsky (Kiev), V. N. Zaporozhan (Odessa), L. V. Kalakutsky (Pushchino, Moscow region), A. D. Kurbatov (Leningrad), V. A. Naer (Odessa), V. A. Nikitin (Kharkov), G. P. Pinayev (Leningrad), G. B. Sergeyev (Moscow), M. A. Solovyeva (Kiev), N. G. Solomonov (Yakutsk), N. N. Timofeyev (Moscow), V. M. Cherednichenko (Kharkov), V. V. Shental (Moscow), E. Z. Emirbekov (Makhachkala)

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

3 1987

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1987

СОДЕРЖАНИЕ

- В координационном совете общесоюзной научно-технической программы по криобиологии и криомедицине* 3
- Калинина Л. В., Шляхтер Т. А., Круглова Э. Э.* Повышение холодоустойчивости свободноживущих амёб при действии экзогенного липида 4
- Грищенко В. И., Демина Л. Г., Чадаев В. Е., Лобынцева Г. С., Чуб Н. Н.* Создание банка криоконсервированной овариальной ткани человека для аллогенных трансплантаций в акушерско-гинекологической практике 7
- Гордиенко Е. А.* Термодинамическая модель явления перераспределения мембранных компонентов в изотропно растянутом замкнутом бислое 11
- Гулевский А. К., Нардид О. А.* Исследование проницаемости мембран эритроцитов при замораживании—оттаивании в среде непроницающего и проникающего криопротектора 15
- Карева Л. В., Луговой В. И., Кравченко Л. П.* Структурная устойчивость гепатоцитов на этапах криоконсервации с 1,2-пропандиолом 19
- Паращук Ю. С., Скидан Н. П.* Влияние криоконсервирования на спермии человека в норме и при патологии 22
- Кирпатовский В. И.* Повышение эффективности защитного действия криопротекторов на криоконсервированную почку с помощью предварительного введения фармакологических средств 25
- Воротилин А. М., Мирошников А. М., Гучок В. М., Зинченко В. Д.* Криопротекторные свойства эфиров этиленгликолей при замораживании эритроцитов человека 31
- Руденко С. В., Бондаренко В. А., Белоус А. М.* Особенности взаимодействия глицерина с липидными бислоями, содержащими холестерин 35
- Рязанцев В. В.* Сравнительная характеристика барьерных свойств эритроцитов в гипо- и гипертонических растворах солей 39
- Стабровский Е. М.* Роль серотонинергических структур гипоталамуса в регуляции функции эндокринных органов при холодовом стрессе 41
- Капрельянц А. С., Марченко Л. Н., Матяш И. П.* Влияние низких температур на ультраструктуру гепатоцитов кроликов при введении CCl_4 44
- Туракулов Я. Х., Атаханова Б. А., Кадырова Д. А., Исмаилов С. И.* Влияние тиреотропного гормона (ТТГ) на синтез белка в бесклеточной системе из клеток криоконсервированной щитовидной железы 48

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Микулинский Ю. Е., Котляров А. О., Цуцаева А. А.* Индукция синтеза белков, подобных белкам теплового шока, у *E. coli* под влиянием холодового воздействия 50

© Издательство «Наукова думка», «Криобиология», 1987

This One



60NP-1FD-7TCQ

материал, защищенный авторским правом

CONTENTS

<i>In the Coordination Council of the All-Union Scientific-Technical Program for Cryobiology and Cryomedicine</i>	3
<i>Kalinina L. V., Shlyakhter T. A., Kruglova E. E. Increasing the cold tolerance of freely living amoebae by exogenous lipid</i>	4
<i>Grishchenko V. I., Demina L. G., Chadayev V. E. Lobyntseva G. S., Chub N. N. Creation of bank of human cryopreserved ovarian tissue for allografting in obstetrics and gynecology</i>	7
<i>Gordiyenko E. A. A thermodynamic model of the phenomenon of redistribution of membrane components in isotropically stretched closed bilayers</i>	11
<i>Gulevsky A. K., Nardid O. A. The investigation of permeability of erythrocyte membranes frozen-thawed in media of non-permeable and permeable cryoprotectants</i>	15
<i>Kareva L. V., Lugovoj V. I., Kravchenko L. P. Structural stability of hepatocytes during cryopreservation with 1,2-propane diol</i>	19
<i>Parashchuk Yu. S., Skidan N. P. The effect of cryopreservation on normal and pathologic human spermatozoa</i>	22
<i>Kirpatovsky V. I. Increasing the cryoprotective effect of cryoprotectants on cryopreserved kidneys by pharmacologic pretreatment</i>	25
<i>Vorotilin A. M., Miroshnikov A. M., Guchok V. M., Zinchenko V. D. Cryoprotective properties of ethylene glycol ethers during freezing of human erythrocytes</i>	31
<i>Rudenko S. V., Bondarenko V. A., Belous A. M. Peculiarities of the interaction between glycerol and lipid bilayers containing cholesterol</i>	35
<i>Ryasantsev V. V. The comparative investigation of erythrocyte barrier properties in hypo- and hypertonic salt solutions</i>	39
<i>Stabrovsky E. M. Role of serotonergic structures of hypothalamus in the regulation of endocrine organ functions under cold stress</i>	41
<i>Kaprelyants A. S., Marchenko L. N., Matyash I. P. The effect of low temperatures on the ultrastructure of rabbit hepatocytes after injection of CCl₄</i>	44
<i>Turakulov Ya. Kh., Atakhanova B. A., Kadyrova D. A., Ismailov S. I. The effect of thyrotropic hormone (TTH) on the protein synthesis in a cell free system of thyroid cells</i>	48

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Mikulinsky Yu. E., Kotlyarov A. O., Tsutsayeva A. A. The synthesis of proteins similar to thermal shock proteins, induced in E. coli by cold</i>	50
<i>Sidyakina T. M., Ledakov V. S., Chumakova M. Yu. An automatic system for support of the level of liquid nitrogen in KHB-0.5 refrigerators</i>	

Адрес редакции:
310015, Харьков, 15,
ул. Переяславская, 23.
Научный редактор В. А. Чуйко
Ответственный секретарь редакции
Ф. А. Приходько
Редактор З. В. Линевиц
Технический редактор В. Н. Волкова
Корректор Н. П. Спичак

Сдано в набор 13.04.87. Подп. в печ. 22.06.87. БЦ 16763. Формат 70×108/16. Выс. печ. Усл. печ. л. 5,17. Уч. изд. л. 5,42. Усл. кр.-отг. 5,6. Тираж 1000 экз. Заказ № 7-155. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16. 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 977.

В КООРДИНАЦИОННОМ СОВЕТЕ ОБЩЕСОЮЗНОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ ПО КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЕ

Выполнение заданий по криобиологии и криомедицине в рамках программы ГКНТ СССР становится основным содержанием работы многих научных учреждений страны на ближайшее время. В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР (г. Харьков) проведено заседание координационного совета общесоюзной научно-технической программы по криобиологии и криомедицине. С докладом о работе научных учреждений в 1986 г. выступил председатель совета член-корреспондент АН УССР В. И. Грищенко. Он подчеркнул значение фундаментальных и прикладных исследований в решении задач биологии и медицины, связанных с влиянием холода на биологические объекты. Возросло количество научных учреждений, в которых проблемы криобиологии являются предметом глубокого изучения. Подтвердилась правильность решения об объединении усилий учреждений министерств и ведомств для выполнения фундаментальных и прикладных исследований в области применения холода в народном хозяйстве в рамках всесоюзной программы. В 1986 г. организации в соответствии с заданиями вели научно-исследовательскую и опытно-конструкторскую работу по следующим основным направлениям: исследование механизмов криоповреждения, репарации и криорезистентности биологических структур; изучение научных основ криозащиты, теоретическое обоснование и разработка методов применения в клинике холода и криоконсервированных объектов, разработка технологических процессов и аппаратуры для криоконсервирования биологических объектов; создание аппаратуры для холодового лечения патологических состояний.

Успешно развиваются фундаментальные исследования механизмов криоповреждений биологических объектов на различных уровнях их организации с целью создания принципиально новых технологических процессов криоконсервации клеток крови, печени. В экспериментах на животных с циррозом печени показано, что криодеструкция стимулирует процессы пролиферации гепатоцитов. Успешно использован криохирургический метод для лечения больных панкреатитом. Проведена криодеструкция неоперабельных гемангиом печени с хорошими послеоперационными результатами. Изучены ультраструктурные изменения клеток и компонентов межклеточного вещества хряща при криовоздействии, создана экспериментальная модель деструктивно-дистрофического процесса в суставе. Показано, что криоаппликация в области кожно-мышечной раны у крыс способствует интенсивному очищению ее от гнойно-некротических масс, формированию грануляции и эпителизации. Разработан способ холодового предупреждения ишемии и прогнозирования жизнеспособности конечности. Предложена новая модель артроза и испытана эффективность низкотемпературного воздействия на данный патологический процесс. Изготовлена опытная серия эндоскопических криоэлектрокоагуляторов для лечения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки. Выявлено, что после криовоздействия происходит почти полное восстановление структуры ткани яичника и сохраняются репродуктивные функции животных. По проблеме криоконсервации репродуктивных тканей получены положительные результаты подбора оптимальных режимов культивирования консервированной овариальной ткани и способов ее аллотрансплантации. При исследовании влияния гипотермии на организм обнаружены существенные измене-

ния функции синаптического аппарата ЦНС. Разработан метод крио-церебральной гипотермии, который успешно использован для лечения больных с психическими нарушениями. С этой целью введен в эксплуатацию гипотерм многоцелевого назначения. Создается криоаппаратура для лапароскопических холодовых воздействий, выпущена опытная партия криоинструментов для гастродуоденоскопов. Изготовлены действующие макеты трех замораживателей для эмбрионов животных, макет прибора для контроля за процессом сушки, замораживатели для роговицы и щитовидной железы. Задания в рамках научно-технической программы выполняются успешно, хотя имеется отставание в проведении некоторых исследований и внедрении их результатов в народное хозяйство. Медленно ведутся работы по созданию аппарата для гипотермии и оксигенации полости рта, металлических контейнеров. Следует ускорить внедрение новых технологических процессов криоконсервации крови, интенсифицировать исследования, направленные на создание эффективных криозащитных соединений, не требующих удаления из деконсервированной суспензии.

Одной из первоочередных задач является ускорение тем НИР и ОКР, которые позволят осуществить внедрение результатов исследований в народное хозяйство. Необходима максимальная концентрация усилий с целью более ускоренного решения поставленных государственных задач в рамках программы на период до 1990 г.

Конкретные предложения по улучшению координации исследований, выполняемых в различных учреждениях страны, перспективам выполнения заданий, предусмотренных программой, и внедрению их результатов в народное хозяйство высказали А. М. Утевский, А. Б. Рикберг, Л. Т. Малая, Э. З. Эмирбеков, Ю. П. Благоев, С. И. Аксенов, А. К. Гулевский, Б. П. Сандомирский, А. Д. Таранская, В. Е. Прокопов.

В. И. Грищенко

УДК 57.043

Л. В. Калинина, Т. А. Шляхтер, Э. Э. Круглова

ПОВЫШЕНИЕ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТИ СВОБОДНОЖИВУЩИХ АМЕБ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКЗОГЕННОГО ЛИПИДА

Известно, что повреждения, вызываемые холодным стрессом (внезапным понижением температуры внешней среды), являются феноменом общеприродного значения [6]. Разработка способов повышения устойчивости клеток к этому фактору — задача теоретическая и практическая. Вероятно, криоповреждения возникают в первую очередь в липидном матриксе мембранного аппарата клеток [7]. Это подтверждается тем, что агенты, взаимодействующие с липидами мембраны, изменяют уровень их холодоустойчивости. Так, *Tetrahymena pyriformis*, высокочувствительный к холодному воздействию вид одноклеточных, не способен к существованию при $5 \div 0^\circ\text{C}$ более чем в течение недели [5]. Продлить до 22-х недель срок жизни этих простейших при пониженной температуре удастся путем обогащения среды культивирования экзогенными липидами, такими как фитостерол, неочищенный соевый лецитин, отдельные жирные кислоты [5, 7]. Обнаружено [2] повышение устойчивости спермиев быка к замораживанию после предварительной обработки препаратом яичного желтка. Эта обработка модифицирует липидный состав мембран спермиев, повышая, в частности, содержание в них холестерина и лецитина. В последнее время в литературе рассматривается возможность изменения функциональных свойств клеток при контакте их с липосомами [3].

Для того, чтобы уяснить природу защитного действия тотального препарата яичного желтка, в частности исключить возможное влияние других

входящих в его состав компонентов, например белков, в настоящей работе использованы униламеллярные липосомы из яичного лецитина с холестерином. Для наблюдения за ответом клеток на действие холода в присутствии экзогенного липида были выбраны низшие эукариоты, свободноживущие холодочувствительные амёбы, *Amoeba borokensis*. Кроме того, мы определяли фосфолипидный состав и содержание холестерина у *A. borokensis* в норме и после обработки липосомами. В литературе [8] мы нашли лишь одну работу, содержащую общие сведения о составе плазматической мембраны крупных свободноживущих амёб. В этой работе определено процентное содержание липидов 2-х штаммов *A. proteus* без детального исследования их состава.

В качестве исходного материала в работе использованы свободноживущие пресноводные амёбы, *Amoeba borokensis* (штамм BOR) и *Amoeba proteus* (штамм WAR), из коллекции амёб Института цитологии АН СССР. Штамм BOR является природным изолятором, выделенным в 1974 г. из пресноводного водоема в окрестностях биостанции Борок. Этот штамм особенно удобен для проведения биохимических исследований, так как благодаря его нетипичному для свободноживущих амёб высокому темпу деления (1 деление за 20—22 ч) удается в сравнительно короткий срок получить большую биомассу. Штамм WAR получен в 1968 г. из ПНР (Варшавский университет). Массовые культуры амёб велись при температуре $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ в чашках Петри по методу Прескотта и Джеймса [6]. Корм (*Tetrahymena pyriformis*, штамм GL—1) давали ежедневно амёбам BOR и 3 раза в неделю амёбам WAR. Суспензию амёб получали центрифугированием на больших скоростях. Осадок взвешивали и проводили экстракцию липидов по методу Фолча. Разделение фосфолипидов для их количественного определения осуществляли методом двухмерной тонкослойной хроматографии. Препарат униламеллярных липосом, имеющих диаметр около 500 Å, готовили из яичного лецитина или лецитина с холестерином [1]. Яичный лецитин предварительно очищали из технического продукта Олайнского комбината (Латвийская ССР) на колонке с окисью алюминия. Для получения липосом из лецитина с холестерином (молярное отношение 1 : 1) в 1 мл этанола растворяли 28 мг лецитина и 14 мг холестерина. Конечная концентрация лецитина в препаратах липосом была 2 мг/мл, а холестерина — 1 мг/мл раствора Прескотта. Обработку амёб липосомами проводили следующим образом: 50 мкл раствора Прескотта с находящимися там 50 или 100 амёбами из массовой культуры помещали в 1,5 мл пробирки («Эпиндорф»), добавляли 300 мкл суспензии липосом и оставляли при комнатной температуре на 5 мин, 2 или 24 ч. По истечении этого времени пробирки с находящимися в суспензии липосом амёбами переносили в ледяную баню и оставляли на 24 или 36 ч. По возвращении в комнатную температуру амёб отмывали от липосом путем переноса клеток в свежий раствор Прескотта (5 мл) и подсчитывали число жизнеспособных клеток. Критерием жизнеспособности служило наличие токов цитоплазмы в клетках через 30 мин после переведения их в комнатную температуру. Чтобы понизить процесс эндоцитоза у амёб [4], клетки предварительно в течение 3 ч выдерживали при нулевой температуре и лишь затем добавляли охлажденную до 0°C суспензию лецитиновых липосом.

Ранее нами было показано [6], что амёбы BOR проявляют значительно более высокую, чем амёбы WAR, чувствительность к холодовому стрессу — резкому понижению температуры до -5 или -10°C в отсутствие фазового перехода вода—лед. В настоящей работе проведено сравнительное изучение реакции амёб этих же штаммов на понижение температуры до 0°C , чтобы убедиться в том, что и при более мягком холодовом воздействии между штаммами сохраняется разница в холодоустойчивости. Клетки содержались при этой температуре 24 и 36 ч. Через 30 мин после отмены холодового воздействия подсчитывали долю особей с токами цитоплазмы. По результатам тестирования обнаружено, что доля жизнеспособных клеток *A. borokensis*, выдерживавшихся при 0°C 24 ч, составляла $(18,5 \pm 7,3) \%$, 36 ч — $(9,8 \pm 3,1) \%$, а *A. proteus* — 100 %. Через 24 ч доля выживших клеток оста-

валась на том же уровне. Полученные данные подтвердили ранее сделанный нами вывод о том, что *A. borokensis* является холодоустойчивой культурой, поэтому в дальнейшем опыты по изменению холодоустойчивости клеток с применением липосом мы проводили именно с этим штаммом. Предварительные попытки повысить холодоустойчивость амёб путем инкубации их в среде с препаратом яичного желтка не привели к положительным результатам — раствор желтка даже в низких концентрациях (5—10 %) был для амёб токсичным; кроме того, мутность раствора не позволяла проводить наблюдение за отдельными клетками. По сравнению с препаратом яичного желтка липосомы из яичного лецитина и лецитина с холестерином оказались нетоксичными — амёбы жили в растворе с липосомами более 3-х суток. В результате обработки клеток липосомами из лецитина оказалось, что при всех исследованных нами экспозициях контакта амёб с липосомами при

Холодоустойчивость амёб *A. borokensis*, обработанных липосомами

Препарат липосом	Время предварительной обработки липосомами, ч	Выживаемость после пребывания при 0 °С, % ($x \pm t_{0,5} \cdot m_x$)	
		24 ч	36 ч
Липосомы из яичного лецитина	0 (контроль)	18,5 ± 7,3	9,8 ± 3,1
	5 мин	78,3 ± 8,1	73,3 ± 8,9
	2	68,8 ± 7,7	73,3 ± 10,4
	24	83,3 ± 22,4	66,6 ± 2,8
Липосомы из яичного лецитина с холестерином	2	—	80,0 ± 5,7
	24	58,0 ± 14,1	—

комнатной температуре выживаемость их повышалась как через 24 ч, так и 36 ч пребывания при 0 °С. Обработка амёб липосомами из яичного лецитина с холестерином также повысила долю особей, сохранивших жизнеспособность (таблица). В другой серии опытов (эти данные в таблице не приводятся), в которой амёбы предварительно выдерживались при нулевой температуре около 3 ч, а затем в среду добавляли охлажденную до 0 °С суспензию лецитиновых липосом, было получено повышение доли живых клеток от (9,8 ±

± 3,1) % в контроле до (60,4 ± 12,6)% в опытной серии. Заметим, что само по себе трехчасовое пребывание при 0 °С не влияет на жизнеспособность амёб (по возвращении в нормальные температурные условия у 100 % особей восстанавливаются токи цитоплазмы). В этом варианте опыта контакт амёб с липосомами происходил при низкой, нефизиологической температуре, подавляющей эндоцитоз [4].

Липидный состав амёб *BOR* мы определяли как в контрольных клетках, так и в тех, которые находились в контакте с препаратами липосом из яичного лецитина при комнатной температуре в течение 24 ч. В липидном экстракте *A. borokensis* контрольных серий обнаружены фосфолипиды: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и их лизоформы — лизофосфатидилхолин и лизофосфатидилэтаноламин. Основным фосфолипидом этого штамма является фосфатидилхолин, который составляет 41,4% от суммы всех фосфолипидов, фосфатидилэтаноламин — 19,6 %, лизофосфатидилхолин и лизофосфатидилэтаноламин составляют соответственно 18,2 и 20,8 %. Холестерина, по нашим данным, у амёб *BOR* в 15 раз меньше, чем фосфолипидов.

Механизмы взаимодействия липосом с клеткой подробно обсуждаются в ряде работ. По мнению некоторых авторов (см. обзор [3]), возможно слияние липосом с клеточной мембраной, в результате чего происходит включение липидов липосом в состав липидов наружной мембраны клетки. Возможно, что между клеточной и липосомальной мембранами происходит обмен липидами, то есть имеет место включение в мембрану клетки липидных компонентов и выход тех или иных компонентов из клеточной мембраны. Наконец, третья гипотеза предполагает включение липосом в клетки путем эндоцитоза [3,6]. Наши данные, полученные в опытах с амёбами, говорят

скорее в пользу первой из приведенных гипотез. Однако не исключено, что амёбы с модифицированной липосомами мембраной сохраняют способность к эндоцитозу и при низких температурах. Как бы там ни было, результатом взаимодействия липосом с клетками явилось повышение содержания фосфатидилхолина в липидном экстракте клеток амёб *BOR* от 40 % (контроль) до 85 % (после контакта с препаратом лецитиновых липосом).

Таким образом, обработка клеток *A. borokensis* униламеллярными липосомами из яичного лецитина и лецитина с холестерином значительно повышает их устойчивость к нулевым температурам по сравнению с контролем (таблица). Повышение холодоустойчивости имело место во всех вариантах опыта в пределах использованных нами экспозиций и не зависело от того, проводилась обработка клеток липосомами при 0 °С или при комнатной температуре.

1. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.— М. : Наука, 1980.— 320 с.
2. Катков И. М. Связь между состоянием мембранного аппарата спермиев и их физиологическими показателями после замораживания: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1985.— 24 с.
3. Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками.— М. : Наука, 1986.— 240 с.
4. Chapman-Andersen C. Membrane activity in freshwater *Amoeba* // J. Protozool.— 1972.— 19, N 2.— P. 225—243.
5. Cox D. Prolonged survival of *Tetrahymena* at 0—5 °C in citrated, lecithinized, defined media // J. Protozool.— 1970.— 17, N 2.— P. 150—152.
6. Morris G. J., Clarke A. Effects of Low Temperatures on Biological Membranes.— London : Acad. Press, 1981.— 432 p.
7. Nozawa Y. Environmental adaptation of *Tetrahymena* membranes : Significance of membrane lipids // Progress in Protozool.— 1974.— N 1.— P. 59—73.
8. O'Neil C. H. Isolation and properties of the cell surface mebrane of *Amoeba proteus* // Exp. Cell. Res.— 1964.— 35, N 4.— P. 477—496.

Ин-т цитологии АН СССР,
Ин-т эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова,
АН СССР, г. Ленинград

Поступила 28.12.86

УДК 612.621.38.014 : 57.043

В. И. Грищенко, Л. Г. Демина, В. Е. Чадаев, Г. С. Лобынцева, Н. Н. Чуб

СОЗДАНИЕ БАНКА КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ АЛЛОГЕННЫХ ТРАНСПЛАНТАЦИЙ В АКУШЕРСКО-ГИНЕКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Согласно данным литературы, аллотрансплантация овариальной ткани с успехом может быть применена как эффективный метод лечения гипоменструального синдрома и аменореи [2, 4], посткастрационного [2] и климактерического [3] синдромов, а также лечения привычных выкидышей [1]. Однако, несмотря на положительные результаты пересадки овариальной ткани, простоту и преимущества ее перед медикаментозными методами лечения некоторых форм акушерской и гинекологической патологии, аллотрансплантация до настоящего времени не нашла широкого применения в клинической практике из-за отсутствия надежных методов долгосрочного хранения яичника. Перспективность использования низких температур для длительного хранения биологических объектов не вызывает сомнения. В современной криобиологии достигнуты значительные успехи по криоконсервированию клеток крови, роговицы, кожи, щитовидной железы, хрящевой ткани. Экспериментальные исследования по консервированию яичников животных доказали принципиальную возможность их длительного хранения с сохранением жизнеспособности и гормонального статуса трансплан-

тата [6]. Нами разработан метод консервирования овариальной ткани человека с применением криопротекторов при сверхнизких температурах [8]. На базе Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР создан низкотемпературный банк ткани яичников для использования в клинической практике.

В задачу данного исследования входило изучение морфологической и функциональной сохранности овариальной ткани после хранения в низкотемпературном банке от нескольких дней до 4-х лет и анализ результатов аллотрансплантации криоконсервированной овариальной ткани (АКОТ) при некоторых видах гинекологической патологии, обусловленной гормональной недостаточностью.

Материалом исследования служили сегменты яичников, полученные во время лапаротомий у больных фибромиомой матки. Забор овариальной ткани проводили у менструирующих женщин в возрасте до 45—50 лет. При этом учитывали отсутствие экстрагенитальной патологии различного генеза (инфекционные, генетические, эндокринные и другие заболевания). Подготовку, криоконсервирование и размораживание овариальной ткани проводили в асептических условиях. Гормоны в моче определяли микрофлюориметрическим методом. Морфологическую целостность деконсервированной ткани исследовали на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, пролиферативную способность оценивали методом культуры ткани. С этой целью на миллипоровые фильтры эксплантировали кусочки ткани (1 мм³), иссеченные из различных областей размороженного образца, и культивировали по методике для эмбриональной, лимфоидной и кроветворной тканей [6] в искусственной питательной среде с добавлением сыворотки АВ (IV). Монослойную культуру клеток овариальной ткани, полученную путем трипсинизации, изучали с помощью цейтраферной микрокиносъемки с применением микроскопа МБИ-13 в течение 14 дней. Культуру выращивали в пробирках Лейтона на 0,5 %-ной агаровой подложке в среде *RPMI-1640* с 20 % сыворотки человека.

Как показали исследования, морфологическая полноценность и гормональная активность криоконсервированной ткани яичников определяются, многими факторами: возрастом и физиологическим состоянием донора гистологическим строением исследуемой ткани (стромы, теки, клеток гранулезы), сроками хранения после изъятия из организма, способом криоконсервирования. Гистологическое изучение размороженных фрагментов яичников, монослойное и органотипическое культивирование свидетельствовали о том, что хранившаяся в низкотемпературном банке ткань, несмотря на некоторые изменения структуры, сохраняет способность к пролиферации и проявлению функциональных свойств, характерных для нативной ткани, независимо от длительности хранения. Создание низкотемпературного банка криоконсервированной овариальной ткани всесторонне обследованных доноров с различной группой крови и *Rh*-принадлежностью позволило провести тщательный бактериологический контроль препаратов. Как показали наши наблюдения, хронические воспалительные процессы в области малого таза, некротические изменения фиброматозных узлов могут служить источником инфицирования трансплантационного и культурального материала. Проведение гистологического исследования удаленных органов (матки, труб, яичников) исключало трансплантацию овариальной ткани с онкопатологией.

Трансплантацию криоконсервированной овариальной ткани осуществляли по тем же показаниям, что и в случаях применения незамороженной ткани [1, 2, 3, 4]. Ампулы с криоконсервированной тканью размораживались непосредственно перед операцией. Сегменты ткани яичника помещались в амниотическую оболочку, и формировался «мешочек» для трансплантации. Согласно данным литературы [5], амниотическая оболочка снижает силу иммунологического конфликта. В отличие от ранее предложенных методик, по нашему мнению, более рациональным, доступным и безопасным методом является пересадка в подкожно-жировую клетчатку передней брюш-

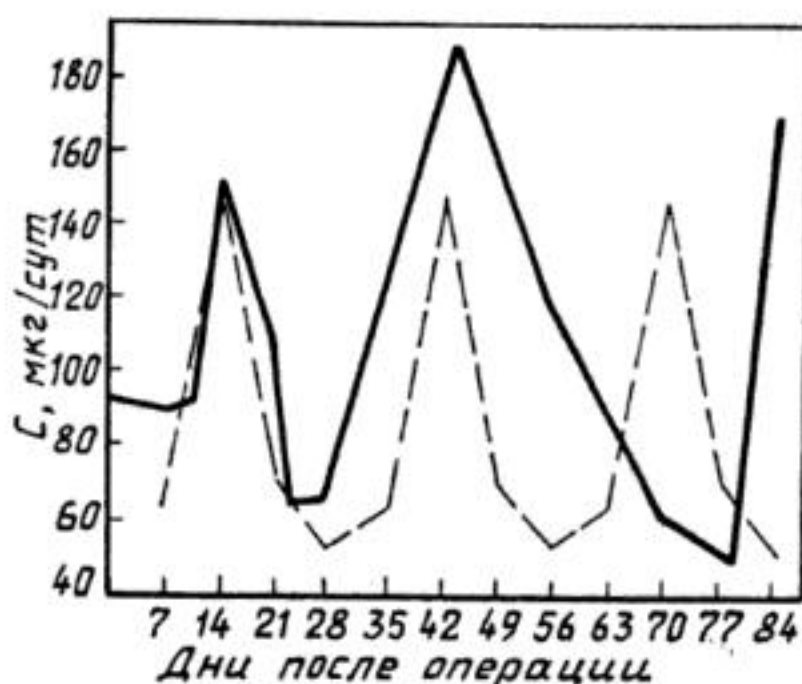
ной стенки или верхне-наружного квадрата ягодицы. АКОТ проведена 159 женщинам с различной патологией: гипоменструальный синдром или аменорея — 64 больных, посткастрационный синдром — 20, предклимактерический или климактерический патологический синдром — 23, бесплодие яичникового генеза — 20, невынашивание беременности эндокринного генеза — 32 больные. Срок наблюдения составил: до 1 года — 50, до 2 лет — 69, до 3 лет — 28, 4—5 лет — 12 больных. Следует подчеркнуть, что в 96% наблюдений в течение 3—5—10 лет до операции проводились различные виды консервативного лечения (циклическая гормональная терапия, применение седативных и общеукрепляющих средств, физиотерапевтическое и санаторно-курортное лечение, иглоукалывание, гипнотерапия и т. д.). Недостаточная эффективность указанных методов, а в 14 % наблюдений непереносимость гормональных препаратов послужили показанием для АКОТ.

Как показали проведенные клинико-лабораторные наблюдения, результаты АКОТ оказались аналогичными полученным при использовании нативной овариальной ткани [1, 2, 3, 4].

Более выраженный клинический эффект отмечен у больных, страдающих гипоменструальным синдромом. В 92 % случаев наступала нормализация менструального цикла. При изучении тестов функциональной диагностики в 83 % наблюдений пролиферативные изменения на кольпоцитограмме выявлялись на 3—5-е сутки после АКОТ. Впоследствии устанавливался скрытый двухфазный цикл в 43 % наблюдений, у 23 % женщин — двухфазный цикл, в 17 % отмечались регрессивные изменения. Важно отметить, что после АКОТ минимальные дозы гормонов приводили к стойкому терапевтическому эффекту. Изучение суточной экскреции эстрогенов с мочой в послеоперационном периоде показало наличие циклического характера их выделения.

Выявлено 2 пика экскреции суммарных эстрогенов: первый соответствовал овуляции, второй — расцвету желтого тела, он был менее выраженным. Следует отметить, что имеется значительное повышение экскреции суммарных эстрогенов в овуляторной фазе: так, если в норме она составляла $(146 \pm 1,1)$ мкг/л, то, по нашим данным, в I цикле — 153 мкг/л, во II — 188 мкг/л, в III — 176,6 мкг/л (рисунок). Повторная АКОТ проведена 4 больным через 1,5 и 2 года. Менее выраженный терапевтический эффект был получен у больных, страдающих тяжелыми длительными аменореями, что подтвердилось и динамикой результатов лабораторных исследований. После АКОТ имело место уменьшение вегетососудистых нарушений. У больных с общим и генитальным инфантилизмом, особенно с генетически детерминированными аменореями, происходило выраженное развитие вторичных половых признаков. Самостоятельный менструальный цикл установился в 19 % наблюдений, в остальных случаях назначались поддерживающие дозы таблетированных гормонов. В этой группе больных проведены повторные АКОТ через 1 год у четырех больных, через 2 года — у семи, через 3 года — у двух больных. Двум больным АКОТ проведена трижды, в одном случае ежегодно 4 раза с положительным клиническим эффектом. Менее стойкий клинический эффект АКОТ при тяжелых аменореях связан, вероятно, с яичниковой недостаточностью и нарушением рецептивности и морфологической структуры эндометрия.

С целью коррекции менструальной и генеративной функции АКОТ проведена 20 пациенткам с первичным бесплодием, обусловленным яичниковой недостаточностью. У 12 из них определялся гипоэстрогенный ановуляторный цикл, у 8 — недостаточность лютеиновой фазы. Все пациентки



Экскреция суммарных эстрогенов в послеоперационном периоде:
---- норма; — после АКОТ

на протяжении 4—7 лет принимали курсы циклической гормональной терапии, лечились по общепринятой схеме кломифен-цитратом, хорионическим гонадотропином. Лечение было неэффективным. У двух больных диагностирована лекарственная гиперстимуляция яичников, сопровождающаяся тошнотой, рвотой, болями внизу живота. После АКОТ у всех пациенток наблюдались положительные гормональные сдвиги, подтвержденные изменениями базальной температуры, изменением физических и реологических параметров цервикальной слизи, кольпоцитологическими исследованиями [7], ультразвуковым мониторингом сканированием яичников. Из них у пяти женщин наступила беременность, у двух закончилась нормальными родами, у одной произошел самопроизвольный аборт на десятой неделе беременности, у двух беременность продолжается.

АКОТ проведена 23 больным с патологическим климаксом, 16 из них до операции получали медикаментозное лечение, которое оказалось неэффективным. Начиная со 2—3-х суток послеоперационного периода все больные отмечали улучшение общего состояния. У 98 % пациенток отмечалось уменьшение вегетососудистых и неврологических нарушений, что избавляло от необходимости приема в дальнейшем симптоматических средств: транквилизаторов, снотворных, сердечных, спазмолитиков и др. Все больные отметили уменьшение силы, продолжительности и частоты, а затем исчезновение приливов, улучшение настроения, сна, аппетита, повышение работоспособности. Весьма важным обстоятельством считается тот факт, что у больных с климактерической миокардиодистрофией, развивающейся на фоне снижения секреции гормонов яичников, после АКОТ отмечалась положительная динамика и в 17 % случаев — нормализация электрокардиограмм. Объективно больные отмечали уменьшение и прекращение болей в области сердца, прекращение приступов стенокардии. Как правило, улучшение данных ЭКГ происходило при уменьшении вегетососудистых и нейроэндокринных нарушений. Следовательно, заместительную терапию с использованием АКОТ при климактерической миокардиодистрофии можно считать патогенетически обоснованной.

В группе больных с посткастрационным синдромом (20 человек) улучшение общего состояния наступало спустя 3—5 суток после операции. Больные отмечали постепенное уменьшение, а затем исчезновение приливов, бессонницы, головных болей, улучшение сна, повышение работоспособности, уменьшение раздражительности, вегетососудистых и обменных нарушений. Длительность клинического эффекта АКОТ у этой категории больных отмечалась на протяжении от 0,5 до 1,5 лет. При возобновлении клинических проявлений заболевания трем больным проведена повторная трансплантация, трем — трехкратная пересадка овариальной ткани. АКОТ проведена 32 беременным, страдающим привычным невынашиванием беременности. В возрасте 21—25 лет было 17 женщин, 32—35 лет — 12, 36—38 лет — 3. В 14 случаях анамнез был отягощен двумя самопроизвольными абортами на 7—14-й неделе беременности, в 16 — тремя, в 1 — пятью выкидышами. У одной пациентки отмечалось 12 самопроизвольных абортов на 8—25-й неделе беременности. При изучении менструальной функции оказалось, что в 16 случаях имело место позднее начало менструации, 9 женщин отмечали нарушение менструальной функции в виде гипоменструального синдрома, 8 женщинам в связи с эндокринным бесплодием в течение 5—8 лет проводилась соответствующая терапия. Срок беременности при поступлении 6—7 недель был у 19 женщин, 8—9 недель, у 6, 11—12 недель у 7 больных. С самого начала беременность протекала с угрозой прерывания. Больным проводилось полное клинико-лабораторное обследование, исключаяющее такую причину прерывания, как иммунологическая несовместимость по системе резус, АВО, лейкоцитарная, инфекционные процессы, экстрагенитальная патология и др. При анализе кольпоцитогамм установлено наличие угрозы прерывания беременности на фоне пониженной продукции эстрогенов и прогестерона. В 28 наблюдениях на 3—5-й день после АКОТ состояние беременных улучшалось. Через 3—6 не-

дель 20 беременных выписались в удовлетворительном состоянии, 8 беременных дважды находились в стационаре с перерывами до 1,5—2 мес для проведения курсов профилактического лечения. В 87,5 % случаев беременность закончилась родами. Благоприятный исход беременности и родов у большинства наблюдаемых свидетельствует о положительном эффекте трансплантации.

Таким образом, проведенные клинико-лабораторные наблюдения показали, что длительность клинического эффекта АКОНТ зависит от многих причин: гормонального фона, на котором сделана операция, длительности заболевания и интенсивности лечения, выраженности нарушений нейрогормональной системы в регуляции менструального цикла, дистрофических изменений эндометрия. Длительность хранения фрагментов яичника в низкотемпературном банке не оказывала влияния на функциональную активность трансплантата. Создание банка всесторонне обследованного трансплантационного материала способствует широкому применению метода аллотрансплантации криоконсервированной овариальной ткани в комплексном лечении больных с указанной патологией.

1. Буглова Г. П., Жученко П. Г. Пересадка аллогенной ткани яичника как метод лечения привычных выкидышей // Тез. докл. V съезда акушеров-гинекологов СССР.— Киев : Б. и., 1971.— С. 74—75.
2. Грязнова И. М., Моломина Г. Г., Балиос Л. В. Лечение больных тяжелыми формами аменореи, гипоменструального и посткастрационного синдромов методом пересадки ткани яичника в амниотической оболочке // Акушерство и гинекология.— 1977.— № 2.— С. 30—33.
3. Дубинкина Е. П., Гробель В. Ф. Аллогенная пересадка яичника у больных с патологическим климаксом // Тр. 2-го Моск. мед. ин-та.— 1978.— Вып. 23.— С. 10—11.
4. Килимник А. М., Яблокова В. И. Пересадка яичника и эндометрия в гинекологической практике // Трансплантация органов и тканей : Тез. докл. VII Всесоюз. конф. по пересадке органов и тканей.— Ростов н/Д : Б. и., 1976.— С. 47.
5. Лурия Е. А. Органные культуры // Методы биологии развития.— М. : Наука, 1974.— С. 259—262.
6. Омельченко О. А. Функциональная морфология овариальной ткани в условиях низких температур (-196°C) под защитой полиэтиленоксида м. в. 400 и без него: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 1977.— 19 с.
7. Чадаев В. Е., Крамар М. И., Чуб Н. Н. Оценка гормональной активности аллотрансплантата овариальной ткани, хранившейся при низких температурах, по данным кольпоцитологического анализа // Криобиология.— 1985.— № 4.— С. 53.
8. А. с. 1017251 СССР, МКН³А 01 N1/00. Способ консервирования ткани яичника человека / В. И. Грищенко, Л. Г. Демина, Г. С. Лобынцева и др.— Оpubл. 14.01.83, Бюл. № 18.

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

Поступила 24.02.87

УДК 577.37

Е. А. Гордиенко

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЯВЛЕНИЯ ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕМБРАННЫХ КОМПОНЕНТОВ В ИЗОТРОПНО РАСТЯНУТОМ ЗАМКНУТОМ БИСЛОЕ

Обезвоживание бислойных липидных везикул или клеток и вызванная этим явлением деформация их мембран приводят к латеральному перераспределению мембранных компонентов [1]. Термодинамической движущей силой этого процесса является градиент средней кривизны изогнутого бислоя. Может ли оводнение липидных везикул или клеток, вызывающее растяжение бислойных мембран, привести к аналогичному явлению? Анализ простой физической модели, проведенный в этой работе, показывает, что латеральное перераспределение компонентов в деформируемой путем

растяжения двухкомпонентной мембране при определенных условиях становится энергетически выгодным. Физически это явление обусловлено тем, что средняя площадь s , которая приходится на молекулу в недеформированном мембранном монослое, немонотонно зависит от концентрации какого-либо из компонентов мембраны n (для определенности — первого), принимая минимальное значение $s_{\min}$ при некоторой определенной концентрации $n_{\min}$ и монотонно возрастаая при отклонении от нее как в сторону меньших, так и в сторону больших концентраций [3]. Указанное свойство проще всего приближенно представить в виде квадратичной зависимости:

$$s = s_{\min} + [s(0) - s_{\min}](n/n_{\min} - 1)^2, \quad (1)$$

где $s(0)$ — площадь на молекулу недеформированного монослоя, состоящего только из частиц второго сорта, n — молярная концентрация частиц первого сорта в мембранном монослое. При заданном равномерном распределении обоих компонентов вдоль мембраны ее растяжение неизбежно повлечет за собой увеличение свободной энергии бислоя. Однако, если на фоне растяжения распределение мембранных компонентов вдоль мембраны станет неравномерным, это (при определенных условиях) в силу свойства (1) может привести к уменьшению свободной энергии деформации бислоя, если площадь поверхности мембраны с неравномерно распределенными вдоль нее компонентами в отсутствие деформации будет больше, чем соответствующая равномерному распределению. Правда, с другой стороны, отклонение распределения мембранных компонентов от равномерного приведет к уменьшению энтропии смешения двухкомпонентного бислоя и вследствие этого к увеличению свободной энергии мембраны. В зависимости от того, какой из указанных эффектов превалирует, свободная энергия, соответствующая неравномерному распределению компонентов вдоль растягиваемой мембраны, может оказаться меньшей или большей, чем свободная энергия мембраны с равномерно распределенными вдоль нее компонентами при том же растяжении. В первом из указанных случаев перераспределение мембранных компонентов вдоль растянутых монослоев везикулы будет термодинамически выгодным, во втором — нет.

Перейдем к более детальному анализу этого явления. Рассмотрим двухкомпонентную бислойную замкнутую мембрану сферической формы с равномерно распределенными вдоль нее компонентами, которая подвергается растяжению (например, за счет осмоса воды снаружи внутрь везикулы). Пусть $\tilde{S}$ — площадь поверхности мембраны, при которой растяжение отсутствует, а S ($S > \tilde{S}$) — текущее значение площади поверхности мембраны в процессе ее растяжения. Пусть далее K_1 и K_2 — модули растяжения монослоя, состоящего соответственно только из молекул первого или только из молекул второго сорта. Эффективный модуль растяжения монослоя, состоящего из молекул обоих сортов, представим в виде

$$K = nK_1 + (1 - n)K_2. \quad (2)$$

Если из области мембраны S_I флуктуационно исчезли все частицы первого сорта, а в области $S_{II} = S - S_I$ частицы первого и второго сорта распределены равномерно, то в первой из указанных областей $n = 0$, а во второй

$$n = n_0/[1 - (1 - n_0)\alpha], \quad (3)$$

где n_0 — начальное значение концентрации молекул первого сорта в мембране, соответствующее исходному равномерному распределению, $\alpha = S_I/\tilde{S}$ — доля площади мембраны, занятая исключительно частицами второго сорта. В дальнейшем для краткости будем называть α параметром сепарации. В отсутствие растяжения площадь мембраны, занятая частицами только второго сорта, имела бы значение

$$\tilde{S}_I = \tilde{S}(1 - n_0)s(0)\alpha/s(n_0). \quad (4)$$

Площадь остальной части мембраны в отсутствие растяжения была бы равна

$$\tilde{S}_{II} = \tilde{S} [1 - (1 - n_0) \alpha] s(n)/s(n_0). \quad (5)$$

Поскольку изотропное натяжение одинаково во всех точках мембраны, то выполняются условия

$$K_I (S_I - \tilde{S}_I)/\tilde{S}_I = K_{II} (S_{II} - \tilde{S}_{II})/\tilde{S}_{II}$$

или

$$S_I = \frac{K_{II} \tilde{S}_I S - (K_{II} - K_I) \tilde{S}_{II} \tilde{S}_I}{K_{II} \tilde{S}_I + K_I \tilde{S}_{II}}, \quad (6)$$

где

$$K_I = 2K_2, \quad K_{II} = 2[nK_1 + (1 - n)K_2] - \quad (7)$$

эффективные коэффициенты растяжения бислоя в первой и во второй частях мембраны (коэффициент растяжения бислоя равен удвоенному

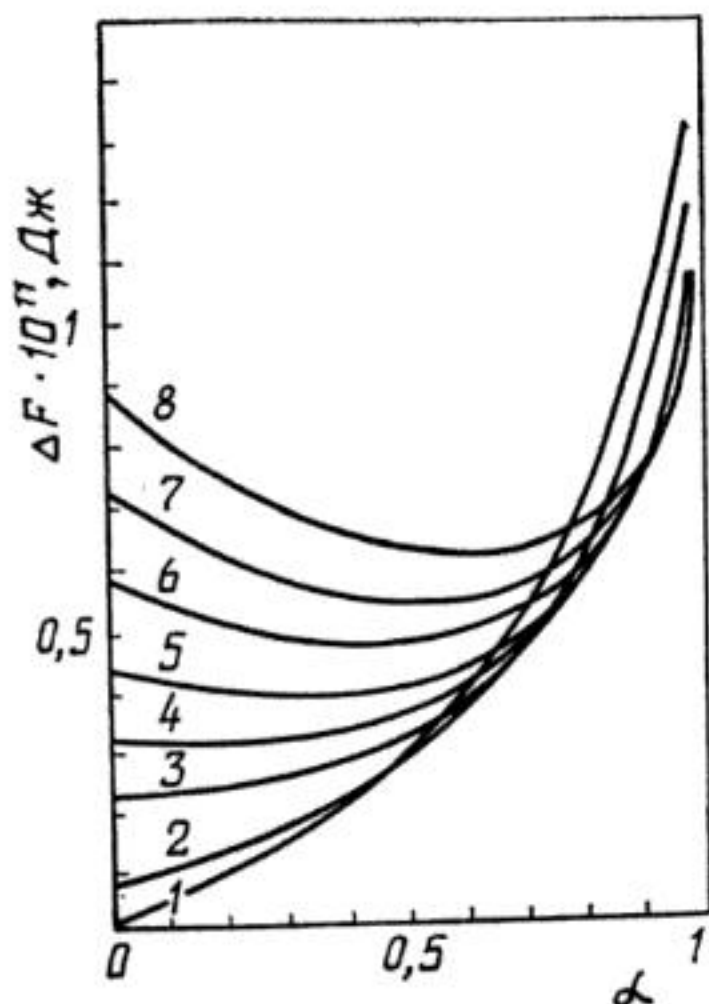


Рис. 1

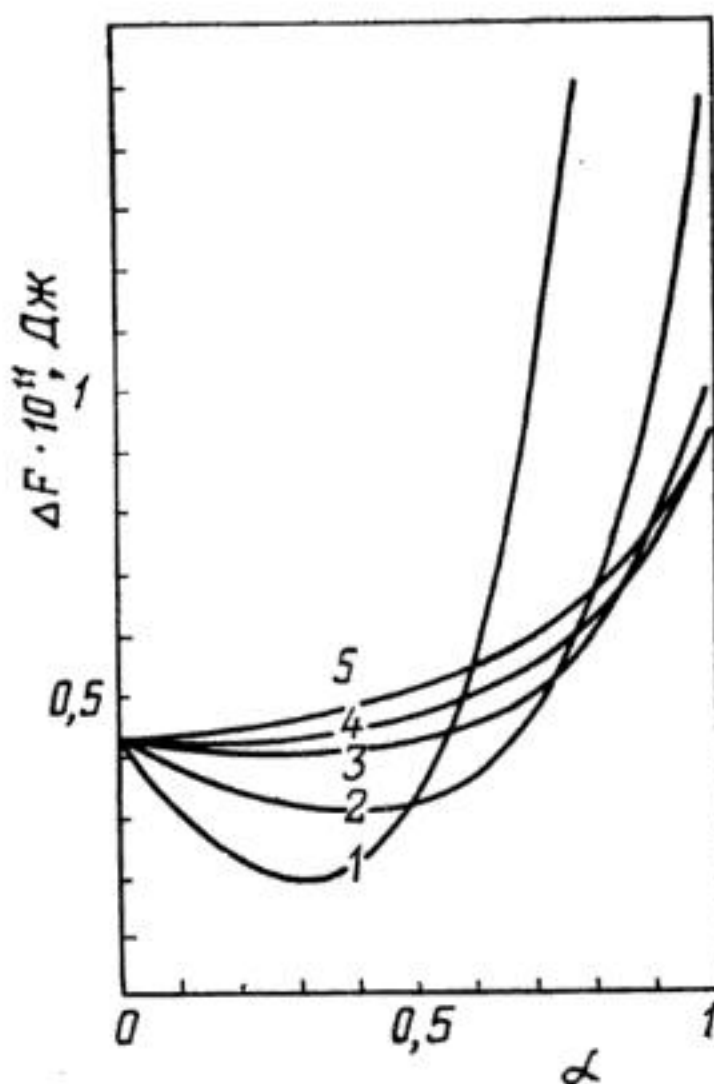


Рис. 2

Рис. 1. Свободная энергия бислойной везикулы как функция параметра сепарации α при разных растяжениях мембраны: 1 — $\beta = 1,02$; 2 — $\beta = 1,06$; 3 — $\beta = 1,1$; 4 — $\beta = 1,12$; 5 — $\beta = 1,14$; 6 — $\beta = 1,16$; 7 — $\beta = 1,18$; 8 — $\beta = 1,2$; $K_1 = 0,4$ Дж/м²; $K_2 = 0,08$ Дж/м²; $n_0 = 0,3$; $n_{\min} = 0,4$; $s(0) = 7 \cdot 10^{-19}$ м²; $s(n_{\min}) = 6 \cdot 10^{-19}$ м²; $\tilde{S} = 12,56 \cdot 10^{-10}$ м²

Рис. 2. Свободная энергия бислойной везикулы как функция параметра сепарации α при разных значениях $n_{\min}$: 1 — $n_{\min} = 0,2$; 2 — $n_{\min} = 0,3$; 3 — $n_{\min} = 0,4$; 4 — $n_{\min} = 0,5$; 5 — $n_{\min} = 0,6$. $K_1 = 0,4$ Дж/м²; $K_2 = 0,08$ Дж/м²; $n_0 = 0,3$; $s(0) = 7 \cdot 10^{-19}$ м²; $s(n_{\min}) = 6 \cdot 10^{-19}$ м²; $\beta = 1,14$; $\tilde{S} = 12,56 \cdot 10^{-10}$ м²

эффективному коэффициенту растяжения монослоя, концентрации во внешнем и внутреннем монослоях считаются равными).

Свободная энергия растянутого бислоя равна [2]

$$F_{\text{деф}} = K_I (S_I - \tilde{S}_I)^2 / 2\tilde{S}_I + K_{II} (S_{II} - \tilde{S}_{II})^2 / 2\tilde{S}_{II}. \quad (8)$$

Учитывая изменение свободной энергии не только за счет деформации, но и за счет перераспределения мембранных компонентов (то есть за счет

изменения энтропии смешения), получим для свободной энергии везикулы следующее выражение:

$$F = F_0 + F_{\text{деф}} + 2SkT(1 - n_0)(1 - \alpha) \ln(1 - n) + n_0 \ln n - \\ - (1 - n_0) \ln(1 - n_0) - n_0 \ln n_0] / s(n_0), \quad (9)$$

где $F_0 = (1 - n_0) \ln(1 - n_0) + n_0 \ln n_0 = \text{const.}$

Исходя из выражений (1)–(9), с помощью ЭВМ мы рассчитали свободную энергию везикул $\Delta F = F - F_0$ как функцию параметра сепарации, характеризующего перераспределение мембранных компонентов вдоль монослоев, при различных значениях параметра растяжения $\beta = S/\tilde{S}$ и пара-

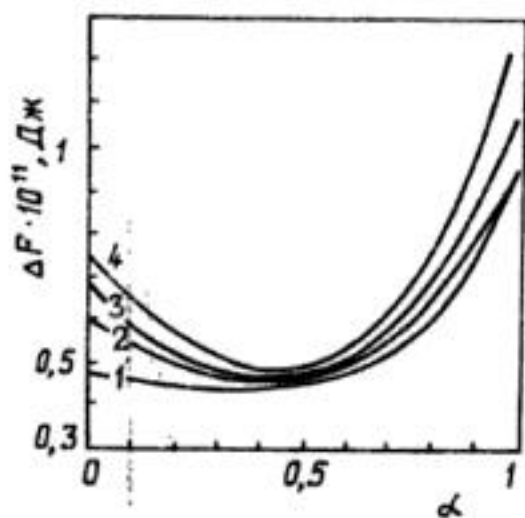


Рис. 3

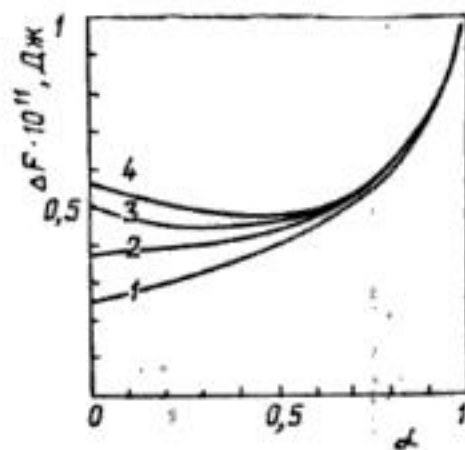


Рис. 4

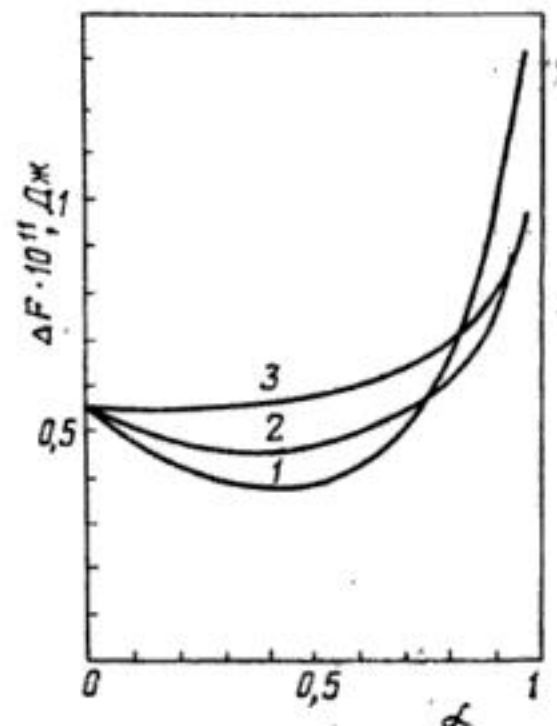


Рис. 5

Рис. 3. Свободная энергия бислойной везикулы как функция параметра сепарации α при разных значениях начальной концентрации частиц первого сорта в мембране: 1 — $n_0 = 0,3$; 2 — $n_0 = 0,5$; 3 — $n_0 = 0,6$; 4 — $n_0 = 0,7$. $K_1 = 0,4$ Дж/м²; $K_2 = 0,08$ Дж/м²; $n_{\min} = 0,4$. $s(0) = 7 \cdot 10^{-19}$ м²; $s(n_{\min}) = 6 \cdot 10^{-19}$ м²; $\beta = 1,16$; $\tilde{S} = 12,56 \cdot 10^{-10}$ м²

Рис. 4. Свободная энергия бислойной везикулы как функция параметра сепарации α при разных значениях модуля растяжения первого компонента: 1 — $K_1 = 0,05$ Дж/м²; 2 — $K_1 = 0,2$ Дж/м²; 3 — $K_1 = 0,3$ Дж/м²; 4 — $K_1 = 0,4$ Дж/м². $K_2 = 0,08$ Дж/м²; $n_0 = 0,3$; $n_{\min} = 0,4$; $s(0) = 7 \cdot 10^{-19}$ м²; $s(n_{\min}) = 6 \cdot 10^{-19}$ м²; $\tilde{S} = 12,56 \cdot 10^{-10}$ м²; $\beta = 1,16$

Рис. 5. Свободная энергия бислойной везикулы как функция параметра сепарации α при разных значениях $s_{\min}$: 1 — $s_{\min} = 5,5 \cdot 10^{-19}$ м²; 2 — $s_{\min} = 6 \cdot 10^{-19}$ м²; 3 — $s_{\min} = 6,5 \cdot 10^{-19}$ м². $K_1 = 0,4$ Дж/м²; $K_2 = 0,03$ Дж/м²; $n_0 = 0,3$; $n_{\min} = 0,4$; $s(0) = 7 \cdot 10^{-19}$ м²; $\beta = 1,16$; $\tilde{S} = 12,56 \cdot 10^{-10}$ м²

метров K_1 , n_0 , $n_{\min}$, $s_{\min}$. Результаты расчетов приведены на рис. 1–5. Они показывают, что при достаточно больших растяжениях мембраны латеральное разделение мембранных компонентов становится энергетически выгодным, поскольку соответствует более низким значениям свободной энергии везикулы по сравнению со случаем равномерного распределения компонентов вдоль мембраны ($\alpha = 0$). Следует отметить, что при расчете не учитывалась энергия границы между областью, которая состоит исключительно из частиц второго сорта, и остальной частью мембраны. Однако это не нарушает справедливости вывода о возможности латерального разделения мембранных компонентов при оводнении бислойной везикулы или клетки, хотя для осуществления этого явления может потребоваться значительный промежуток времени, необходимый для преодоления системой посредством флуктуации активационного барьера, связанного с указанной граничной энергией. Даже если эта энергия активации невелика, для осуществления явления латерального разделения мембранных компонентов оводнение везикулы (клетки) должно быть очень медленным и протекать за время, превышающее характерное время, необходимое для диффузионного перераспре-

деления мембранных компонентов в монослоях. В противном случае мембрана порвется раньше чем в ней образуются обогащенные одним из компонентов кластеры.

1. Гордиенко Е. А., Воинова М. В. Физико-математическая модель латерального перераспределения липидов при изотермической деформации замкнутой бислойной мембраны // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 43—48.
2. Ивенс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран.— М. : Мир, 1982.— 304 с.
3. Lee A. G. Lipid phase transitions and phase diagrams. II. Mixtures involving lipids // Biochim. et biophys. acta.— 1977.— 472, N 2.— P. 285—344.

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

Поступила 10.02.86

УДК 612.014.9 : 534.121.2

А. К. Гулевский, О. А. Нардид

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ — ОТТАИВАНИИ В СРЕДЕ НЕПРОНИКАЮЩЕГО И ПРОНИКАЮЩЕГО КРИОПРОТЕКТОРА

Ранее было показано, что в экстремальных условиях (гипертония [5, 8], высушивание [6], действие сильных электрических полей [9]) можно регистрировать проницаемость плазматических мембран для непроникающих в норме молекул. Данные литературы позволили предположить, что такие условия создаются в процессе замораживания клеток под защитой криопротекторов, особенно непроникающего типа [4]. В настоящей работе показано, что при замораживании—оттаивании эритроцитов в растворах полиэтиленоксида и сахарозы происходит обратимое нарушение барьерных свойств плазматических мембран для K^+ , Na^+ , ^{45}Ca , Mn^{2+} и ^{14}C -сахарозы.

Опыты проводились на свежей донорской крови 1—3 суток хранения при $2 \div 4^\circ C$. Клетки крови отмывали центрифугированием при 3000 об/мин раствором А, содержащим 150 мМ NaCl (х. ч.), 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4, фирмы «Серва». Затем к осадку эритроцитов на холоде по каплям добавляли в соотношении 1 : 1 раствор Б: 150 мМ NaCl, 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4, 20 % ПЭО молекулярной массы 1500 (ПЭО-1500), отечественного производства, или 0,5 М сахарозы (х. ч.) и инкубировали в этой криозащитной среде 30 мин при $3 \div 4^\circ C$. В части экспериментов растворы А и Б содержали 2 мМ $MnCl_2$ (о. с. ч.) или 0,66 мкКи/мл ^{14}C -сахарозы производства ЧССР, уд. акт. 340 мкКи/мл или 1 мкКи/мл ^{45}Ca . Быстрое замораживание ($200 \div 400^\circ C/мин$) осуществляли погружением полиэтиленовых ампул, содержащих 1,5—2,0 мл суспензии эритроцитов, в жидкий азот. Отогревали образцы при $37^\circ C$ на водяной бане. После отогрева пробы отмывали многократным центрифугированием на холоде для удаления находящихся в межклеточном пространстве Mn^{2+} и ^{14}C -сахарозу или ^{45}Ca . Для измерения радиоактивности ^{14}C -сахарозы и ^{45}Ca эритроциты лизировали в холодной дистиллированной воде и после осаждения белков 5 % ТХУ 0,5 мл надосадочной жидкости вносили в сцинтилляционную жидкость ЖС-7 (5 г РРО, 100 г нафталина, 1 л диоксана) и определяли активность на сцинтилляционном счетчике «SL-8000». Внутриклеточное содержание K^+ и Na^+ определяли методом пламенной фотометрии. Быстрое замораживание эритроцитов в среде, содержащей глицерин, и отмывание клеток от криопротекторов производили согласно методическому письму ЦОЛИПК. Содержание радиоактивных веществ в эритроцитах, замороженных под защитой глицерина, определяли как описано выше. Регистрацию ЭПР спектров осуще-

ствляли при следующих условиях: ВЧ модуляция 100 мГц, амплитуда 8 Гс, диапазон развертки магнитного поля 700 Гс, скорость записи 100 с, температура измерения 20 °С.

Полученные результаты показали, что сама по себе инкубация эритроцитов с такими криопротекторами, как глицерин, ПЭО, существенно не влияет на внутриклеточное содержание ионов K^+ или Na^+ (рис. 1). Замораживание—оттаивание в присутствии непроницающего криопротектора ПЭО приводит к отчетливому нарушению содержания катионов в эритроцитах. Уровень K^+ в клетках, сохранившихся после криоконсервирования, уменьшается в 3,2 раза по сравнению с контролем (рис. 1, а), а внутриклеточное содержание Na^+ увеличивается при этом в 3,8 раза. При использовании

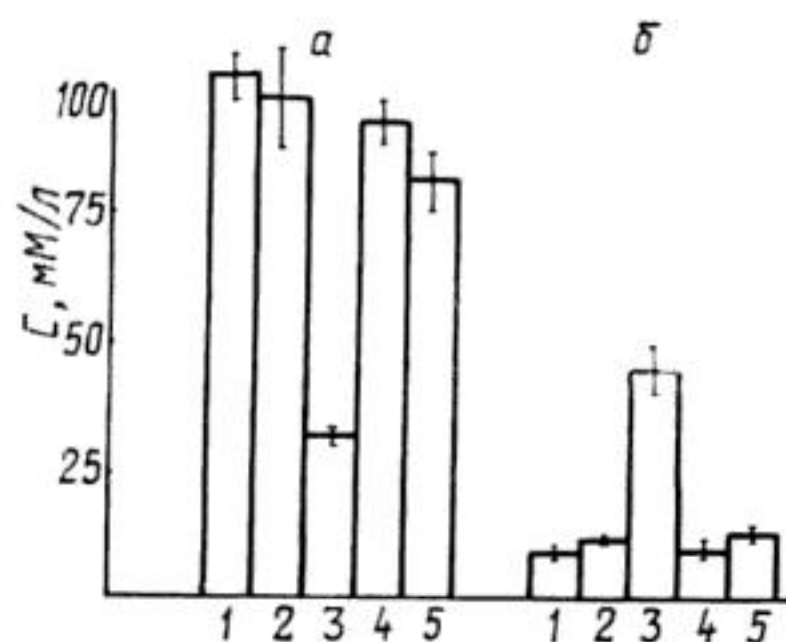


Рис. 1. Содержание K^+ и Na^+ в эритроцитах (мМ/л клеток) после быстрого (200—400 °С/мин) замораживания и оттаивания под защитой 15% глицерина или 20 % ПЭО: а — содержание K^+ ; б — содержание Na^+ ; 1 — контроль: инкубация в среде А — 150 мМ NaCl, 10 мМ трис-НСl, рН 7,4; 2 — инкубация в среде А, содержащей 20 % ПЭО; 3 — инкубация и быстрое замораживание в среде А, содержащей 20 % ПЭО; 4 — инкубация в среде А, содержащей 15 % глицерина; 5 — инкубация и замораживание — оттаивание в среде А, содержащей 15 % глицерина

результаты других исследований [7, 1], можно полагать, что повышенная проницаемость клеточных мембран в условиях замораживания—оттаивания обусловлена формированием трансмембранных дефектов. С целью проверки высказанного предположения нами было изучено состояние барьерной функции эритроцитов во время замораживания—оттаивания в глицерине или ПЭО для плохо проникающего в клетки ^{45}Ca и непроницающих ^{14}C -сахарозы и Mn^{2+} .

Как видно из табл. 2, инкубация эритроцитов в растворе криопротектора не приводит к достоверному накоплению внутри клеток в осмотически активном состоянии (т. е. способном высвободиться из клеток в гипотонических условиях) ^{45}Ca или ^{14}C -сахарозы. После замораживания—оттаивания в среде, содержащей 15 % глицерина, в клетках достоверно обнаруживается «осмотически активный» ^{45}Ca . Еще более заметные изменения происходят в отношении накопления ^{45}Ca и ^{14}C -сахарозы при замораживании—оттаивании эритроцитов в среде, содержащей 20 % ПЭО. Заполнение клеток этими веществами в условиях замораживания—оттаивания, с учетом соотношения содержания радиоактивного вещества во вне- и внутриклеточном пространстве, составляет примерно 6 % для ^{45}Ca и 2 % для ^{14}C -сахарозы. Такое относительно большое заполнение клеток может объясняться как небольшим числом образующихся дефектов, так и коротким временем их существования, ограниченным высокой скоростью замораживания—оттаивания и структурными особенностями биомембран [2, 8].

проницающего криопротектора глицерина изменений гораздо меньше, хотя и в этом случае содержание катионов в эритроцитах достоверно нарушается.

Важно отметить, что потеря внутриклеточного K^+ может быть обнаружена после отогрева как непосредственно в криозащитной среде, так и в супернатанте отмывающего раствора (табл. 1). В то же время существенный выход гемоглобина из разрушенных клеток из-за маскирующего действия криопротекторов («скрытый гемолиз») регистрируется только в отмывающем растворе. Это позволяет рекомендовать измерение выхода K^+ в среду замораживания как экспресс-метод определения степени деструкции эритроцитов. Полученные данные показывают, что за относительно небольшое время, в течение которого происходит замораживание—оттаивание, внутриклеточное содержимое исследуемых веществ (ионов, метаболитов) изменяется столь значительно, что это трудно объяснить только увеличением пассивной проницаемости плазматических мембран, которая немного уменьшается с понижением температуры [5]. Учитывая

Таблица 1

Выход K^+ и гемоглобина в супернатант из эритроцитов после замораживания — оттаивания под защитой 15 % глицерина или ПЭО-1500

Выход K^+ и гемоглобина из эритроцитов	Выход K^+ , мкМ	% от общего содержания	Выход гемоглобина, мг	% от общего содержания
В криозащитную среду с ПЭО-1500 (150 мМ NaCl, 10 мМ <i>трис</i> -HCl, pH 7,4, 20 % ПЭО), контроль 1	$0,75 \pm 0,27$	1	$1,4 \pm 0,02$	1
В криозащитную среду с ПЭО после замораживания, опыт 1	$2,4 \pm 2,0$ $P < 0,001$	39	$5,5 \pm 1,0$ $P < 0,001$	4
В ресуспендирующий раствор А (150 мМ NaCl, 10 мМ <i>трис</i> -HCl, pH 7,4) после удаления криозащитной среды с ПЭО, контроль 2	$0,13 \pm 0,09$	0,2	$0,2 \pm 0,9$	0,2
В ресуспендирующий раствор А после замораживания и удаления криозащитной среды с ПЭО, опыт 2	$21,4 \pm 2,3$ $P < 0,001$	35	$30,0 \pm 5,8$ $P < 0,001$	22
В криозащитную среду с глицерином (ЦОЛИПК — 11 e), контроль 3	$5,3 \pm 1,4$	9	$1,0 \pm 0,4$	0,7
В криозащитную среду с глицерином после замораживания, опыт 3	$8,2 \pm 1,2$ $P < 0,001$	13	$7,1 \pm 1,4$ $P < 0,001$	5
В суммарный супернатант растворов, отмывающих глицерин, и ресуспендирующего раствора А после удаления криозащитной среды с глицерином, контроль 4	$2,3 \pm 1,3$	4	$2,6 \pm 0,8$	2
В суммарный супернатант растворов, отмывающих глицерин, и ресуспендирующего раствора А после замораживания и удаления криозащитной среды с глицерином	$6,8 \pm 1,4$ $P < 0,001$	11	$4,4 \pm 0,9$ $P < 0,02$	3

Примечание. Общее содержание K^+ в образце составляло $62 \pm 24,5$ мг. Сравнение данных опыта проводили с соответствующим контролем.

Таблица 2

Выход в гипотоническую среду маркерных веществ, инкорпорированных эритроцитами при замораживании — оттаивании, имп/мин

Условия опыта	Выход в гипотоническую среду инкорпорированных веществ из 1 мл эритроцитов	
	^{45}Ca	^{14}C -сахароза
Инкубация в среде А (150 мМ NaCl, 10 мМ <i>трис</i> -HCl, pH 7,4), контроль	3046 ± 1050	2143 ± 757
Инкубация в среде Б (150 мМ NaCl, 10 мМ <i>трис</i> -HCl, pH 7,4, 30 % глицерина)	2009 ± 636	2091 ± 812
Инкубация в среде В (150 мМ NaCl, 10 мМ <i>трис</i> -HCl, pH 7,4, 20 % ПЭО)	3603 ± 1616	2587 ± 917
Инкубация, замораживание (200—400 °C/мин), оттаивание (37 °C) в среде Б	7160 ± 2266	4267 ± 1776
Инкубация, замораживание (200—400 °C/мин), оттаивание (37 °C) в среде В	118581 ± 14230	27340 ± 4872

Примечание. ^{45}Ca и ^{14}C -сахароза добавлялись в среды из расчета соответственно 2 мкКи/мл и 0,66 мкКи/мл.

При добавлении в среду замораживания, содержащую 20 % ПЭО, парамагнитного иона Mn^{2+} , судя по данным, представленным на рис. 2, не происходит заметной сорбции или проникновения катиона внутрь клеток. На это указывает отсутствие характерного ЭПР спектра после процедуры отмывки клеток от внеклеточного Mn^{2+} раствором А. Сорбции Mn^{2+} или его поглощения эритроцитами не происходит в процессе эквilibрации клеток в растворе криопротектора (рис. 2, В), а также при добавлении ка-

тиона в суспензию отогретых клеток (рис. 2, Г). В то же время, когда Mn^{2+} содержался в криозащитной среде в процессе замораживания—оттаивания, после удаления внеклеточного Mn^{2+} в суспензии клеток регистрировался разрешенный спектр (рис. 2). Форма спектра и его ширина указывают на то, что катионы Mn^{2+} находятся в более вязкой среде, чем межклеточное пространство (рис. 2, Д). Ширина четвертой компоненты возрастает от 24 до 35 Гс, что соответствует увеличению вязкости от 0,9 до 4,5 сПз [3]. Это коррелирует с данными, полученными с помощью нитроксильных радикалов, о том, что вязкость цитозоля эритроцитов примерно в 4 раза выше вязкости воды и является доказательством внутриклеточной локализации парамагнитного иона. Еще одним подтверждением внутриклеточной локализации

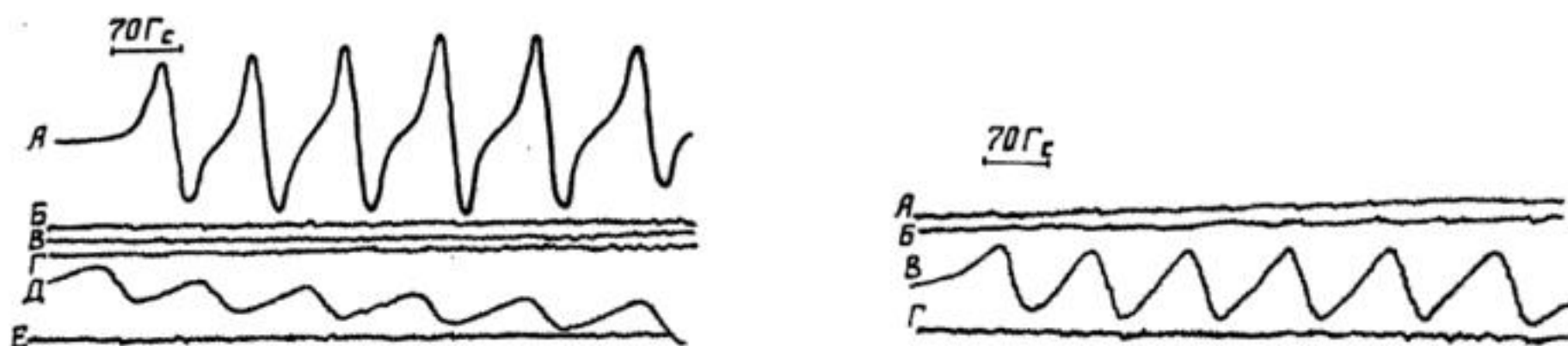


Рис. 2. Инкорпорирование Mn^{2+} в суспензии эритроцитов, подвергнутых быстрому замораживанию в растворе, содержащем 20 % ПЭО: А — в растворе А; Б — в суспензии эритроцитов в растворе А; В — в суспензии эритроцитов в растворе Б; Г — в суспензии эритроцитов, подвергнутых замораживанию в растворе Б, не содержащем Mn^{2+} , с последующим добавлением Mn^{2+} после отогрева; Д — в суспензии эритроцитов, подвергнутых инкубации и замораживанию — оттаиванию в растворе Б; Е — в суспензии белых теней, полученных из эритроцитов, подвергнутых инкубации и замораживанию — оттаиванию в растворе Б. Время инкубации эритроцитов в растворах А и Б, содержащих 2 мМ Mn^{2+} , составляло 30 мин. Раствор Б содержал 20 % ПЭО. Удаление Mn^{2+} из внеклеточного пространства перед измерением производили многократным центрифугированием в растворе А, не содержащем Mn^{2+} . Усиление прибора в случае А — 10^4 , в остальных — 10^5 .

Рис. 3. Инкорпорирование Mn^{2+} в суспензии эритроцитов, подвергнутых быстрому замораживанию в растворе, содержащем 0,5 М сахарозы. Спектры ЭПР регистрировали: А — в суспензии эритроцитов в среде Б, содержащей вместо ПЭО 0,5 М сахарозы; Б — в суспензии эритроцитов, подвергнутых замораживанию — оттаиванию в среде Б без Mn^{2+} и внесения Mn^{2+} до 2 мМ после отогрева; В — в суспензии эритроцитов, подвергнутых замораживанию — оттаиванию в среде Б; Г — в суспензии белых теней, полученных из эритроцитов, подвергнутых замораживанию — оттаиванию в среде Б.

Mn^{2+} является отсутствие спектра в препарате белых теней, полученных после гипотонического гемолиза эритроцитов, подвергнутых замораживанию—оттаиванию в растворе ПЭО, содержащем Mn^{2+} (рис. 2, Е). Очевидно, катион полностью удаляется с внутриклеточным содержимым в процессе гемолиза. Учитывая результаты более ранних исследований [9], можно заключить, что в процессе охлаждения в мембранах образуются трансмембранные дефекты, способные к «заживлению», как это имеет место при гипотоническом гемолизе и образовании замкнутых теней. Однако в данном случае размеры пор намного меньше, что исключает выход гемоглобина. Дальнейшие результаты, полученные после замораживания эритроцитов под защитой сахарозы, показали, что образование обратимых дефектов в мембранах, по-видимому, является закономерностью, характерной для криоконсервации биообъектов в непроникающих криопротекторах. Об этом свидетельствуют данные, представленные на рис. 3, из которых видно, что при замораживании—оттаивании эритроцитов в присутствии 0,5 М сахарозы во внутриклеточном пространстве эритроцитов происходит накопление Mn^{2+} . Сравнение амплитуд спектров (рис. 2, Д и 3, В) показывает, что внутриклеточная концентрация маркера в этом случае в 2—3 раза выше, чем при использовании ПЭО.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что замораживание клеток под защитой непроникающих криопротекторов ини-

цирует образование трансмембранных дефектов, проницаемых для непроницающих в норме веществ и способных к «самозалечиванию» на этапе отогрева. Это позволяет объяснить нарушение асимметрии клеточных мембран для ионов и метаболитов в процессе криоконсервации и открывает определенные перспективы разработки нового метода заполнения клеток непроницающими криопротекторами.

1. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков.— Киев : Наук. думка, 1981.— 208 с.
2. Конев С. В., Мажуль В. М. Межклеточные контакты.— Минск : Наука и техника, 1977.— 312 с.
3. Нардид О. А. Радиоспектроскопические исследования в водноглицеролевых растворах солей некоторых пара- и диамагнитных катионов : Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук.— Харьков, 1979.— 128 с.
4. Осипенко А. П., Белоус А. М., Лишко В. К. Измерение проницаемости мембран эритроцитов после замораживания в присутствии полиэтиленоксида и глицерина // Укр. биохим. журн.— 1978.— 50, № 3.— С. 364—367.
5. Bodeman H., Passow H. Factors controlling resealing of the membrane of human erythrocyte ghosts after hypotonic hemolysis // J. Membrane Biol.— 1972.— 8, N 1.— P. 1—26.
6. Blumbergs J. E., Skards I. V., Ramniece V. E. et al. Damage and reparation of yeast cytoplasmic membrane at dehydration and subsequent reactivation // Fifth Intern. Biophys. Congr. of the Intern. Union for Pure and Appl. Biophysics : Abstr.— Copenhagen.— 1975.— P. 90.
7. Morris G. J. Effect of Low Temperatures on Biological Membranes.— London : Acad. Press, 1981.— 236 p.
8. Steck T. L. Preparation of impermeable inside-out (io) and right side-out (ro) vesicles from erythrocytes // Methods in Membrane Biology.— New York, London : Plenum Press, 1974.— P. 245.
9. Kinoshita K., Tsong T. Y. Formation and resealing of controlled sizes in human erythrocyte membrane // Nature.— 1977.— 268, N 5619.— P. 438—441.

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

Поступила 11.10.86

УДК 612.35.085.2 : 547.422

Л. В. Карева, В. И. Луговой, Л. П. Кравченко

СТРУКТУРНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ГЕПАТОЦИТОВ НА ЭТАПАХ КРИОКОНСЕРВАЦИИ С 1,2-ПРОПАНДИОЛОМ

При разработке способов криоконсервации изолированных клеток печени [4, 5] предпочтение отдается медленным режимам охлаждения ($1 \div 2^\circ\text{C}/\text{мин}$) с использованием в качестве криопротектора диметилсульфоксида. Однако при соблюдении указанных условий консервации до сих пор не удалось получить клетки с удовлетворительной жизнеспособностью. В настоящей работе поставлена задача исследовать на различных этапах криоконсервации с 1,2-пропандиолом структурную устойчивость гепатоцитов.

Гепатоциты выделяли из печени белых крыс [1]. В полученную взвесь клеток добавляли криоконсервирующий раствор, содержащий 15 % 1,2-пропандиола и 0,15 М NaCl, и после 30-минутной экспозиции при 4°C охлаждали со скоростью $2 \div 5^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -196°C в полиэтиленовых ампулах (объемом 5,0 мл), а затем оттаивали в водяном термостате ($37 \div 40^\circ\text{C}$). Размороженные пробы центрифугировали (2 мин при 1,5 тыс. об/мин), осадки клеток ресуспендировали в сбалансированных 0,15 М Na-фосфатным буфером ($\text{pH } 7,4$) растворах ЦНИИГПК-8В, хлористого натрия (0,15 М) и сахарозы (0,25 М). После хранения клеточных суспензий в указанных растворах при 4°C в течение 30 мин, 3 и 24 ч гепатоциты повторно осаждали и в суспендате определяли активность кислой фосфатазы [3], кислой рибонуклеазы [2] и уровень ионов K^+ методом пламенной фотометрии. Актив-

ность ферментов и содержание ионов K^+ во внеклеточной среде выражали в процентах по отношению к общему уровню этих показателей в клеточной взвеси, который определяли после предварительного разрушения гепатоцитов гомогенизацией в присутствии 0,1 %-ного раствора тритона X-100. На всех этапах эксперимента определяли количество клеток в камере Горяева и их жизнеспособность по включению в гепатоциты трипанового синего.

В отдельной серии опытов с целью снижения внутриклеточной концентрации криопротектора в размороженную суспензию клеток вводили (1 : 2 по объему) раствор, содержащий 0,14 М NaCl, 0,5 М глюкозы [4, 5], после чего клеточную взвесь центрифугировали, к осадку гепатоцитов добавляли ресуспендирующие растворы и дальнейшие исследования проводили как описано выше. Контролем служили клетки, которые не подвергались замораживанию и хранились в криоконсервирующем растворе при 4 °C.

Таблица 1

Влияние замораживания на структурную устойчивость гепатоцитов

Условия опыта	Срок хранения при 4 °C	Активность ферментов во внеклеточной среде, % от общей активности		Уровень ионов калия во внеклеточной среде, % от общего содержания	Количество клеток в 1 мл ($\times 10^6$)	Включение трипанового синего, %
		Кислая фосфатаза	Кислая рибонуклеаза			
До замораживания	30 мин	12 $\pm$ 3	12 $\pm$ 3	29 $\pm$ 4	16 $\pm$ 1	2
	3 ч	14 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2	34 $\pm$ 5	15 $\pm$ 1	2
	24 ч	20 $\pm$ 5	14 $\pm$ 5	35 $\pm$ 6	15 $\pm$ 1	3
После замораживания	30 мин	39 $\pm$ 7	45 $\pm$ 5	54 $\pm$ 4	13 $\pm$ 1	10
	3 ч	37 $\pm$ 6	47 $\pm$ 5	59 $\pm$ 8	13 $\pm$ 1	9
	24 ч	37 $\pm$ 5	47 $\pm$ 7	51 $\pm$ 6	12 $\pm$ 1	10

Из табл. 1 видно, что до замораживания на этапе эквilibрации гепатоцитов в криоконсервирующем растворе нарушается их целостность, о чем свидетельствует появление в популяции гепатоцитов небольшого количества клеток с повышенной проницаемостью для красителя, а также выход в экзоцеллюлярную среду лизосомальных гидролаз и ионов K^+ . Общее количество клеток в данных условиях почти не изменялось, микроскопически гепатоциты характеризовались четким контуром плазматической мембраны, плотным темно-зеленым матриксом, незначительным прокрашиванием ядра по истечении 2-х минут контакта с красителем. При этом не отмечено прогрессирования указанных нарушений в зависимости от времени экспозиции клеток в криоконсервирующем растворе. Этот факт позволяет считать, что механизм нарушения структуры гепатоцитов на этапе эквilibрации их с криопротектором, вероятнее всего, обусловлен дегидратацией клеток в начальный период установления осмотического равновесия между клетками и окружающим раствором. Подобное явление наблюдается и для других клеток при введении их в растворы с повышенной осмолярностью [6].

После замораживания—оттаивания обнаружены более выраженные изменения структурной устойчивости гепатоцитов, которые проявлялись заметным повышением в среде замораживания уровня активности ферментов и ионов калия без снижения общего количества клеточных элементов при относительно небольшом увеличении содержания гепатоцитов с повышенной проницаемостью для трипанового синего. Размер большинства клеток увеличивался, ядра прокрашивались в бледно-голубой цвет уже через 30 с контакта с трипановым синим.

Перевод деконсервированных гепатоцитов в различные ресуспендирующие среды (табл. 2) вызывал дальнейшую потерю клетками ферментных белков и ионов калия. В растворе сахарозы выход кислой фосфатазы из гепатоцитов, а также содержание клеток с измененной проницаемостью для кра-

Таблица 2

Структурная устойчивость гепатоцитов, подвергавшихся криоконсервации, в ресуспендирующих растворах

Ресуспендирующие растворы	Срок хранения при 4 °С, ч	Активность ферментов во внеклеточной среде, % от общей активности		Уровень ионов калия во внеклеточной среде, % от общего содержания	Количество клеток в 1 мл ($\times 10^6$)	Включение трипанового синего, %
		Кислая фосфатаза	Кислая рибонуклеаза			
ЦНИИГПК-8В	0,5	32 $\pm$ 4	24 $\pm$ 4	29 $\pm$ 4	14 $\pm$ 1	6
	3	43 $\pm$ 5	30 $\pm$ 5	31 $\pm$ 5	13 $\pm$ 1	6
	24	52 $\pm$ 8	39 $\pm$ 5	25 $\pm$ 5	агрегация	—
0,15 М NaCl	0,5	21 $\pm$ 2	24 $\pm$ 5	26 $\pm$ 3	12 $\pm$ 1	5
	3	16 $\pm$ 3	26 $\pm$ 8	32 $\pm$ 3	13 $\pm$ 1	4
	24	24 $\pm$ 3	41 $\pm$ 11	23 $\pm$ 4	12 $\pm$ 2	4
0,25 М сахараза	0,5	10 $\pm$ 2	25 $\pm$ 3	28 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	4
	3	6 $\pm$ 1	24 $\pm$ 3	28 $\pm$ 3	12 $\pm$ 1	3
	24	5 $\pm$ 1	30 $\pm$ 4	20 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1	3

сителя были ниже, чем в растворах ЦНИИГПК и хлорида натрия. После хранения гепатоцитов в течение 24 ч в среде ЦНИИГПК-8В отмечалась агрегация клеток с образованием нерастворимых клеточных конгломератов. Дополнительные нарушения структурной устойчивости гепатоцитов, которые наблюдались на этапе перевода их в изотонические ресуспендирующие растворы, вероятнее всего, связаны с повреждающим действием на плазматические мембраны осмотических градиентов, обусловленных высоким внутриклеточным содержанием 1,2-пропандиола. Такая точка зрения подтверждается результатами опытов, в которых внутриклеточный уровень криопротектора частично снижался путем предварительного разведения суспензии гепатоцитов раствором, содержащим 0,14 М NaCl и 0,5 М глюкозы. Оказалось (табл. 3), что при переводе таких клеток в ресуспендирующие растворы

Таблица 3

Структурная устойчивость гепатоцитов, подвергавшихся криоконсервации, после снижения внутриклеточной концентрации криопротектора в ресуспендирующих растворах

Ресуспендирующие растворы	Срок хранения при 4 °С, ч	Активность ферментов во внеклеточной среде, % от общей активности		Уровень ионов калия во внеклеточной среде, % от общего содержания	Количество клеток в 1 мл ($\times 10^6$)	Включение трипанового синего, %
		Кислая фосфатаза	Кислая рибонуклеаза			
ЦНИИГПК-8В	0,5	11 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1	4
	3	9 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1	3
	24	10 $\pm$ 2	12 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1	агрегация	—
0,15 М NaCl	0,5	5 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	3
	3	8 $\pm$ 2	20 $\pm$ 4	7 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	3
	24	7 $\pm$ 1	25 $\pm$ 5	5 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	3
0,25 М сахараза	0,5	3 $\pm$ 0,5	10 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	2
	3	3 $\pm$ 0,5	9 $\pm$ 3	7 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1	2
	24	3 $\pm$ 0,5	8 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	2

происходит значительно меньшая потеря ферментных белков и ионов калия, хотя и в этом случае в растворе ЦНИИГПК-8В отмечались изменения структуры клеток, вакуолизация их цитоплазмы. Хранение гепатоцитов в этом растворе в течение суток вызывало их агрегацию с образованием нересуспендируемых сгустков. При помещении клеток в изотонические растворы хлорида натрия и сахарозы такое явление не наблюдалось. Результаты исследования свидетельствуют, что изолированные гепатоциты харак-

теризуются значительной структурной неустойчивостью на различных этапах криоконсервации, в связи с чем необходим дальнейший поиск наиболее оптимальных температурных режимов и криоконсервирующих растворов для этих клеток.

1. Луговой В. И., Кравченко Л. П., Карева Л. В. и др. Метод получения изолированных клеток печени // Криобиология и криомедицина.— Киев : Наук. думка, 1983.— Вып. 13— С. 36—39.
2. Шапоп В. С., Чудинова И. А., Кречетов Г. Д. Методы определения нуклеаз // Современные методы в биохимии.— М. : Медицина, 1964.— С. 267—281.
3. Bodansky O. Acid phosphatase // Adv. Clin. Chem.— 1975.— 15, N 1.— P. 43 —147.
4. Fuller B. J., Grout B. W., Woods R. J. Biochemical and ultrastructural examination of cryopreserved hepatocytes in rat // Cryobiology.— 1982.— 19, N 5.— P. 493—501.
5. Fuller B. J., Morris G. J., Nutt L. H., Attenburrow V. D. Functional recovery of isolated rat hepatocytes upon thawing from -196°C // Cryo-Lett.—1980.— 1, N 5.— P. 139—146.
6. Takanashi T. Effect of cryoprotectants on the viability and function of unfrozen human polymorphonuclear cell // Cryobiology.— 1985.— 22, N 4.— P. 336—350.

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

Поступила 04.07.86

УДК 57.043 : 616.69 — 008.8

Ю. С. Парашук, Н. П. Скидан

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА СПЕРМИИ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

В настоящее время криоконсервированные спермии широко используются при лечении некоторых форм бесплодия. Разработаны методы криоконсервирования и длительного хранения спермиев *in vitro*, которые дают возможность после оттаивания получать репродуктивные клетки с сохраненными оплодотворяющими свойствами, что позволяет использовать их для практических целей при разных вариантах искусственного оплодотворения. В то же время, как показывают клинические наблюдения, для оценки биологических свойств спермиев после оттаивания недостаточно использовать только спермограмму. На процесс оплодотворения влияют факторы, среди которых можно выделить содержание акросомальных ферментов, метаболизм и дыхание спермиев, иммунологические показатели, подвижность половых клеток. Эти показатели особенно важны в тех случаях, когда для криоконсервирования используется патологическая семенная жидкость, в частности при олигоспермии. Наличие резерва консервированного эякулята позволяет осуществлять «обогащение» спермиев с последующим объединением всех порций центрифугированием или отбором лучших фракций после прохождения через специальные фильтры и введением женщине в дни предполагаемой овуляции. Несмотря на перспективность описанного метода, его эффективность остается низкой [5]. По-видимому, это обусловлено тем, что спермии при олигоспермии еще до охлаждения способны к агглютинации, иммобилизации, отличаются низкой концентрацией клеток в эякуляте, наличием изменений в структуре, которые в процессе криоконсервации еще больше усугубляются. Нами изучалось влияние криоконсервирования на ряд показателей, определяющих оплодотворяющие свойства спермиев и позволяющих прогнозировать наступление беременности.

Исследовалась подвижность спермиев (подсчитывали количество спермиев, совершающих прямолинейные, активно-поступательные движения), и число патологически измененных спермиев, совершающих колебательные, «маневренные» движения. Это позволяло судить об аутоиммунных процессах и могло объяснить причину бесплодия в семье, а также отсутствие беременности при использовании криоконсервированных репродуктивных клеток

в клинической практике. Определяли содержание фруктозы и показатель фруктолиза [2], по которому можно судить об интенсивности метаболизма в спермиях. Измеряли в динамике количество фруктозы (в нативной семенной жидкости после полного разжижения эякулята, через 1 и 2 ч перед криоконсервированием, после оттаивания и через 1 ч после оттаивания), наличие антиспермиоантител (АСАТ); использовали спермиоиммобилизационный тест Изоджима и микроагглютинационный тест Фриберга. Криоконсервирование осуществляли по ранее разработанной методике [4].

Проведенные исследования показали, что в эякулятах здоровых мужчин количество подвижных спермиев составляло 70 % (таблица). В динамике

Динамика изменения подвижности спермиев и содержания фруктозы в эякулятах человека ($n = 35$)

Объект исследования	До криоконсервирования						После криоконсервирования					
	Подвижность, %			Содержание фруктозы, мг %			Подвижность, %			Содержание фруктозы, мг %		
	Начальная	Через 60 мин	Через 120 мин	Начальное	Через 60 мин	Через 120 мин	Сразу после оттаивания	Через 60 мин	Через 120 мин	Сразу после оттаивания	Через 60 мин	Через 120 мин
Нормоспермия	$70 \pm 2,9$	$66 \pm 3,9$	$60 \pm 2,0$	358 ± 21	$298 \pm 16,3$	$250 \pm 14,7$	$43,2 \pm 2,5$	$40,1 \pm 4,5$	$33 \pm 2,3$	$277 \pm 16,4$	$168 \pm 10,6$	$158 \pm 11,5$
Олигоспермия	$40 \pm 3,2$	$30 \pm 2,9$	$25 \pm 2,6$	$132 \pm 8,5$	$117 \pm 3,7$	$111 \pm 7,4$	$32 \pm 2,8$	$18 \pm 2,9$	$14 \pm 3,6$	$120 \pm 3,0$	$108 \pm 4,2$	$106 \pm 4,5$

отмечалось снижение подвижных форм. У мужчин с патологией спермы подвижность была существенно ниже (таблица), степень снижения подвижности при патоспермии была выражена больше, чем в норме. Эта тенденция зависела от степени олигоспермии: чем в большей мере была выражена олигоспермия, тем быстрее спермии теряли подвижность, вплоть до полного обездвиживания. Изучение содержания фруктозы в эякулятах здоровых фертильных мужчин показало, что оно равняется 358 мг %, а величина фруктолиза соответствует в первый час 60 мг %, во второй — 40 мг %. Олигоспермия сопровождалась снижением количества фруктозы в эякуляте (таблица), а также уменьшением ее потребления спермиями. Это явление закономерно, поскольку при олигоспермии уменьшено общее число спермиев в семенной жидкости, поэтому расход фруктозы уменьшается. Поскольку увеличено число измененных форм с нарушенной структурой, возрастают нарушения обменных процессов. Что касается общего снижения количества фруктозы в эякуляте, то, как известно, образование фруктозы происходит в семенных пузырьках и находится в тесной зависимости от продуцируемого в клетках Лейдита тестостерона [2]. При заболеваниях, сопровождающихся нарушением сперматогенеза, продукция фруктозы также изменяется и может являться причиной бесплодия.

Влияние факторов криоконсервирования на гликолитическую функцию спермиев проявлялось следующим образом. Добавление криопротектора лишь незначительно изменяло содержание фруктозы (таблица), что обусловлено, по-видимому, увеличением общего объема клеточной суспензии вследствие добавления криопротектора. После криоконсервирования количество фруктозы изменялось незначительно. Это можно объяснить минимальным уровнем обмена веществ в замороженных спермиях. При культивировании их *in vitro* потребление фруктозы возобновлялось, хотя в меньшей мере, чем в незамороженных клетках (таблица). Как показали электронно-микроскопические исследования [1], в спермиях в процессе заморажи-

вания может нарушаться целостность плазматической мембраны и происходить выход митохондрий в межклеточное пространство. Этим можно объяснить и снижение их подвижности после криоконсервации, поскольку разрушение митохондрий сопровождается понижением энергетических обменных процессов и уменьшением двигательной активности. При криоконсервировании патологически измененных спермиев описанные явления были более выраженными (таблица).

Таким образом, уменьшение содержания фруктозы при олигоспермии неблагоприятно отражается на двигательной активности клеток. В дальнейшем в процессе замораживания—оттаивания подвижность еще больше уменьшалась как вследствие недостаточного исходного содержания фруктозы, необходимого для поддержания обменных процессов на этапах обработки перед криоконсервированием, после оттаивания и содержания *in vitro*, так и в результате изменения процессов анаэробного гликолиза при нарушении структуры части спермиев под действием низких температур. Наряду с изменениями подвижности спермиев, их энергетического обмена, существенно изменяется их иммунореактивность. Если при нормоспермии изредка встречались только единичные ложные агглютинаты (не влияющие на оплодотворяющие свойства спермиев), то при патоспермии, уже в нативном препарате, имелись истинные агглютинаты, которые блокировали двигательную активность.

Для определения степени выраженности аутоиммунного процесса проведено изучение титра АСАТ, который при нормоспермии не превышал 1 : 2. Согласно современным взглядам на иммунологию репродукции, такой показатель не вызывает бесплодия и его можно не учитывать. При патоспермии картина была иная. Агглютинаты (истинные) определялись в нативном препарате уже после разжижения эякулята. Со временем количество агглютинатов существенно возрастало. Охлаждение неоднозначно влияло на аутоиммунный процесс. При нормальных исходных показателях спермиев образования агглютинатов не наблюдалось, они совершали поступательные движения. При патоспермии количество агглютинатов возрастало, особенно в тех случаях, когда олигоспермия сопровождалась астенией. Движения спермиев носили колебательный характер. По-видимому, нарушение морфофункциональных свойств спермиев, их «поломка», в нативном биологическом субстрате способствует сенсibilизации, развитию в последующем аутоиммунных реакций, которые особенно усиливаются под влиянием процесса замораживания—оттаивания.

В научной литературе имеются сведения о нарушении гематотестикулярного барьера, который изолирует аутоантигенные половые клетки от иммунологического аппарата организма [3], стимуляции процесса образования спермагглютинатов при травме мужских половых органов [9], обструкции их сосудистой системы [7], воспалительных процессах мочеполовой системы, хронических очагах воспаления в организме [6, 8]. Активирующее действие на указанный процесс, по-видимому, оказывает замораживание—оттаивание. Уменьшение подвижности вызывает и аутоиммунный процесс, приводящий также к изменению характера движения спермиев. В процессе криоконсервирования патологически измененной спермы уменьшается подвижность репродуктивных клеток в результате нарушения энергетических процессов и процессов агглютинации. Нормальные спермии менее чувствительны к повреждающему действию криоконсервирования. Их движения носят поступательный характер, активность фруктолиза более высокая, аутоиммунные процессы в них незначительны. Эти данные позволяют предполагать высокую оплодотворяющую способность нормальных спермиев, что подтвердилось клиническими наблюдениями.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости повышения эффективности методов криоконсервирования спермиев. Одним из возможных направлений может быть криоконсервирование с использованием многокомпонентных сред с включением в их состав углеводов, необходимых для поддержания изотоничности среды и гликолитической функции перед замо-

раживанием и после криоконсервации. Другая сторона изучаемой проблемы, уменьшение иммунологических реакций, более сложная, поскольку существующие методы пока малоэффективны и успех исследований во многом зависит от развития иммунологии репродукции в целом.

1. Грищенко В. И., Паращук Ю. С., Капрельянец А. С. Ультраструктура сперматозоидов человека после криоконсервации // Криобиология и криомедицина.— 1984.— Вып. 14.— С. 50—54.
2. Кунин М. А. Бесплодие в браке.— М. : Медицина, 1973.— 232 с.
3. Райцина С. С. Гематотестикулярный барьер и его роль в регуляции сперматогенеза и фертильности // Акушерство и гинекология.— 1980.— № 4.— С. 5—7.
4. А. с. 1103837 СССР, МКИ⁴ A01 N 1/00. Способ криоконсервирования спермы человека / В. И. Грищенко, Н. С. Пушкарь, Ю. С. Паращук и др. Опубл. 23.07.84, Бюл. № 27.
5. Friedeman S., Broder S. Homologous artificial insemination after long-term semen cryopreservation // Fertil. a. Steril.— 1981.— 35, N 3—4.— P. 321—324.
6. Kern A. M. Le rôle des facteurs immunologiques dans la stérilité du couple // Rev. franc. Gynéc.— 1980.— 75, N 8—9.— P. 437—449.
7. Linnet L., Hjort T., Fogh-Andersen P. Association between failure to impregnate after vasectomy and sperm agglutinins in semen // Lancet.— 1981.— 1, N 8112.— P. 117—119.
8. Rumke Ph., Hekman A. Sterility: An immunologic disorder? // Clin. Obstet. Gynec.— 1977.— 20, N 3.— P. 691—703.
9. Sullivan H., Quinlivan W. L. G. Immunoglobulins in the semen of men with zoospermia, oligospermia, or self-agglutination of spermatozoa // Fertil. a. Steril.— 1980.— 34, N 5—6.— P. 465—468.

Харьковский мед.ин-т

Поступила 16.04.86

УДК 612.46 : 615.361.014.41

В. И. Курпатовский

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА КРИОКОНСЕРВИРОВАННУЮ ПОЧКУ С ПОМОЩЬЮ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Неудачные попытки криоконсервации изолированных органов связаны во многом с отсутствием надежных методов адекватной их защиты от криоповреждения. Основным средством защиты в настоящее время является насыщение органов перед замораживанием различными криопротекторами. Однако это не предотвращает развития значительного повреждения структуры и функции органов после их замораживания и отогрева. Важным фактором эффективности криозащиты могут являться температурные условия, в которых проводится эквilibрация ткани органа с криопротектором, поскольку известно, что гипотермия может сама по себе оказывать неблагоприятное действие [3].

Целью настоящего исследования было изучение возможности повысить эффективность криозащиты оптимизацией условий насыщения органа криопротектором с помощью предварительно введенного животному-донору диметилсульфоксида (ДМСО) или α -токоферола. Такая подготовка, как было показано нами ранее, увеличивает устойчивость почек к действию тепловой ишемии и повышает эффективность гипотермической консервации этого органа [2, 4]. Введение этих фармакологических средств должно повысить степень сохранности почек и в процессе подготовки их к замораживанию. Имеются данные о том, что предварительно введенный животным ДМСО уменьшает также степень низкотемпературного повреждения при замораживании органов [1].

Было проведено 38 экспериментов на срезах почек и 17 опытов на целых почках белых беспородных крыс массой 200—240 г. В опытах со срезами почек исследовали влияние температурных условий и предварительной

фармакологической подготовки на динамику проникновения криопротектора в срез и изменение показателей метаболизма ткани почек в процессе эквilibрации с криопротектором и отмывания от него. В опытах с целыми органами оценивали влияние исследованных факторов на эффективность защиты ткани почки от низкотемпературного повреждения при криоконсервации. В условиях гексеналового наркоза почки выделяли из жировой капсулы и удаляли из организма животного. Из них готовили срезы толщиной 1—1,5 мм, промывали их в физиологическом растворе для удаления крови и погружали в 20 % ДМСО, приготовленный на основе раствора НИИТиО-2 для консервации почек следующего состава (в г/л): KH_2PO_4 — 1,02, K_2HPO_4 — 3,8, NaHCO_3 — 0,84, Na цитрат — 0,3, Na сукцинат — 0,5, маннит — 38,0. Инкубацию проводили при 18 °С в течение 60 мин и при 4 °С в течение 90 мин. После этого срезы извлекали, просушивали на фильтровальной бумаге для удаления криопротектора и переносили последовательно в раствор НИИТиО-2 с повышенной концентрацией маннита до осмолярности 900, 600 и 300 мосм/л с интервалом 20 мин при 18 °С и 30 мин при 4 °С. Для уменьшения степени ишемического повреждения в течение всего периода насыщения и отмывания при 18 °С производили оксигенацию раствора смесью 96 % O_2 + 4 % CO_2 . Через определенные промежутки времени регистрировали изменение веса срезов, брали пробы насыщающего раствора для определения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) набором реактивов фирмы «Борингер», а также пробы ткани для определения в них содержания ДМСО, электролитов и молочной кислоты. При определении содержания ДМСО ткань почки гомогенизировали в дистиллированной воде в соотношении 1 : 9 и измеряли осмолярность гомогената на осмометре «Эдвансед дигиматик осмометр 3DII» (США) с последующим пересчетом миллимолярной концентрации ДМСО в весовую по формуле:

$$C = \frac{(R - 420) \cdot W \cdot 0,078}{P},$$

где C — содержание ДМСО в ткани, мг/г сухого веса; R — осмолярность срезов почки в момент насыщения, мосм/кг; 420 — осмолярность срезов интактных почек, мосм/кг; W — содержание воды в ткани в момент насыщения, г; P — сухой вес срезов почки, г; 0,078 — коэффициент. Содержание молочной кислоты в тканях определяли с помощью наборов реактивов фирмы «Борингер», а содержание K^+ и Na^+ — на пламенном фотометре фирмы «Цейс».

Эффективность криозащиты органа в условиях фармакологической подготовки оценивали в опытах по криоконсервации почек крыс. В этих экспериментах после вскрытия брюшной полости и инфильтрации 0,5 %-ным новокаином почечной ножки и парааортальной клетчатки выделяли обе почки блоком с аортой и нижней полую вену. После введения гепарина канюлировали дистальную часть аорты. Аорту выше отхождения почечных сосудов, а также 2—3 поясничные артерии, отходящие от задней стенки аорты, перевязывали и пересекали. Нижнюю полую вену выше и ниже почек пересекали, комплекс удаляли и подключали к установке для перфузии. Перфузию осуществляли раствором НИИТиО-2 при 18 °С с постепенным добавлением ДМСО в течение 30 мин до конечной концентрации 20 %. При этой концентрации ДМСО почки перфузировали еще 25—30 мин и затем переносили в камеру программного замораживателя ЗПБ 01.00.00. Охлаждение проводили парами жидкого азота со скоростью 1—3 °С/мин до —60 °С. После выдерживания при этой температуре от 30 мин до 18 ч почки отогревали в водяной бане при 40 °С и удаляли криопротектор путем перфузии раствором НИИТиО-2 с повышенной концентрацией маннитола. Начальная осмолярность раствора составляла 900 мосм/л и в течение 45—60 мин ее постепенно уменьшали до 300 мосм/л, после чего перфузию продолжали еще 30 мин. В процессе отмывания регистрировали изменение потока перфузии, выход ЛДГ в перфузат, в конце опыта определяли степень отека почек методом высушивания до постоянного веса. Предварительное введение

ДМСО осуществляли внутривенно в дозе 0,5 г/кг за 3—4 ч до опыта, а α -токоферола — в дозе 0,2 г/кг за 5—6 ч до опыта. Статистическую обработку цифрового материала осуществляли по методу Стьюдента. Достоверность разницы результатов в группах оценивали по критерию t .

При оценке влияния предварительной фармакологической подготовки на динамику процесса насыщения было установлено, что в контрольных опытах (без введения препаратов) насыщение срезов ДМСО протекало неравномерно с периодами ускорения и замедления поступления ДМСО в ткань срезов и выхода воды из них (рис. 1 и 2). Неравномерность изменения веса срезов, отражающего динамику содержания воды в них, была более выражена

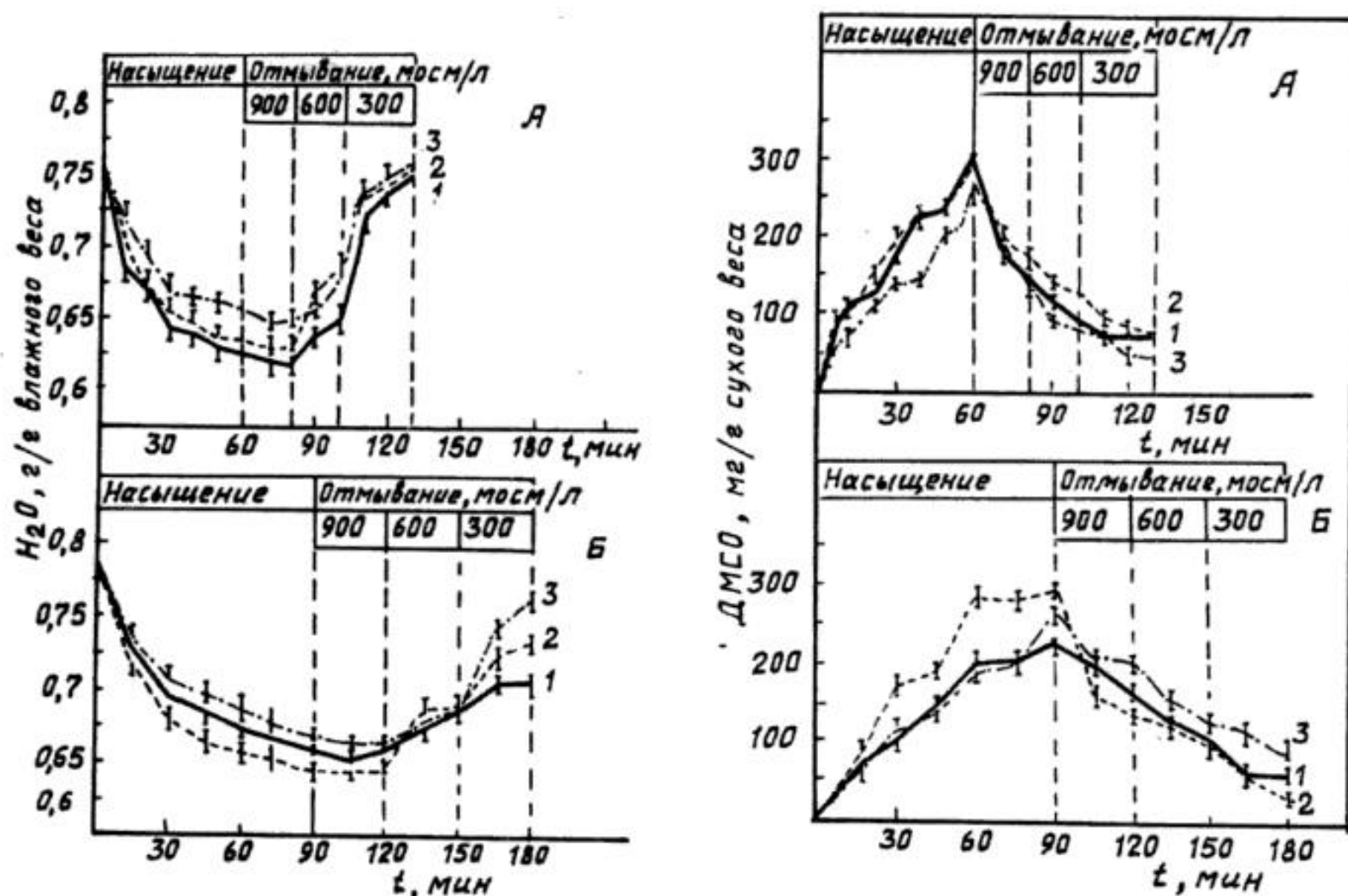


Рис. 1. Влияние фармакологической подготовки и температурных условий на изменение тканевого содержания воды при насыщении срезов почки в 20 % ДМСО и удалении криопротектора: А — при 18 °С; Б — при 4 °С; ——— контроль (без введения препаратов); ---- предварительное введение ДМСО; -.-.-.- предварительное введение α -токоферола

Рис. 2. Влияние фармакологической подготовки и температурных условий на динамику насыщения срезов почки 20 % ДМСО и выхода криопротектора из срезов. Условные обозначения как на рис. 1

при 18 °С, а изменения содержания ДМСО — при 4 °С. Предварительное введение ДМСО ускоряло процесс насыщения ткани почки криопротектором, а α -токоферола — замедляло его. При 4 °С α -токоферол не оказывал существенного влияния на исследуемый процесс. Во время удаления из срезов криопротектора при 18 °С заметной разницы в изменении веса срезов и содержания в них криопротектора отмечено не было. Лишь в опытах с предварительным введением ДМСО вымывание криопротектора несколько замедлялось. Во всех случаях вес срезов (следовательно, и содержание в них воды) восстанавливался практически до нормальных значений. Остаточное содержание ДМСО в ткани в конце отмывки в опытах с предварительной фармакологической подготовкой было таким же, как и без нее. При 4 °С в контрольных опытах вес срезов не восстанавливался до начальных значений, а остаточное содержание ДМСО было достоверно выше, чем при удалении криопротектора в условиях 18 °С ($p < 0,05$).

Интересно, что, несмотря на довольно высокое остаточное содержание ДМСО в ткани, его выход в окружающий раствор к концу отмывки практи-

чески прекращался. Вероятно, это является следствием связывания ДМСО с клеточными компонентами (белки, липиды и др.). При более низкой температуре прочность связывания ДМСО, видимо, повышается. Предварительное введение ДМСО и α -токоферола животному способствовало более полному восстановлению веса срезов в конце периода удаления криопротектора (рис. 1). Выход криопротектора из ткани почки при этом в случае предварительного введения ДМСО ускорялся, а α -токоферола — замедлялся. Неравномерность проникновения ДМСО в срезы в условиях фармакологической подготовки сохранялась, причем периоды ускорения и замедления насыщения совпадали по времени. По нашему мнению, неодинаковая скорость проникновения ДМСО связана с различной скоростью насыщения вне- и внутриклеточного пространства из-за относительно низкой проницаемости цитоплазматической мембраны для этого криопротектора. Взаимодействие ДМСО, насытившего внеклеточное пространство, с компонентами клеточной мембраны (белки, липиды) приводит к повышению ее проницаемости. Это мнение подтверждается ускорением процесса насыщения после предварительного введения ДМСО животному, когда процесс модификации клеточной мембраны прошел заблаговременно. Ингибирующее влияние α -токоферола на скорость насыщения срезов почки криопротектором можно объяснить модифицирующим мембрану действием препарата. Показано, что α -токоферол, встраиваясь в клеточную мембрану, повышает ее стабильность и устойчивость к действию различных экстремальных факторов. При этом он может препятствовать изменению ее свойств под влиянием ДМСО и блокировать увеличение проницаемости для этого криопротектора.

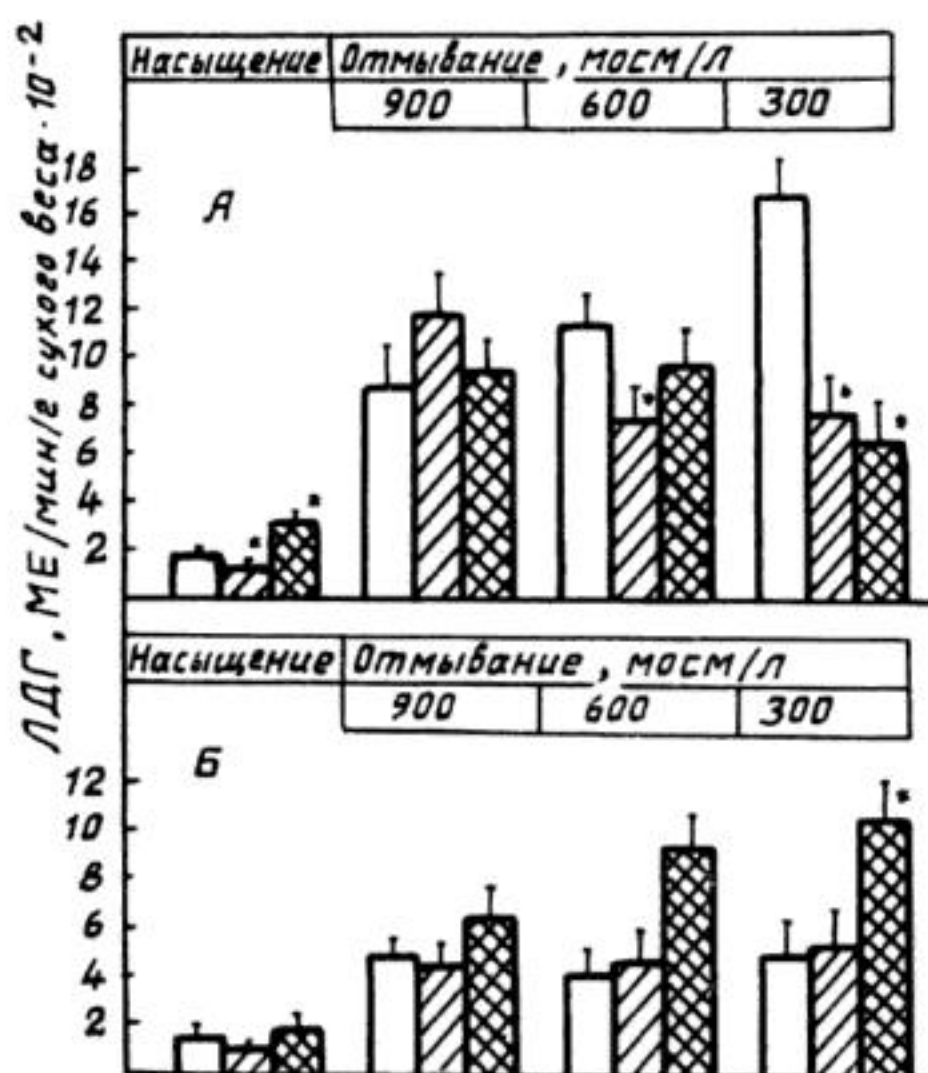


Рис. 3. Влияние фармакологической подготовки и температурных условий на скорость выхода ЛДГ из срезов почки крысы при их насыщении в 20 % ДМСО и при удалении криопротектора. А — при 18 °С; Б — при 4 °С; □ — контроль (без введения препаратов); ▨ (заштрихованный) — предварительное введение ДМСО; ▤ (с двойной штриховкой) — предварительное введение α -токоферола

Оценивая степень изменения показателей метаболизма срезов почки в процессе насыщения криопротектором и отмывания от него, было установлено, что во время насыщения почки ДМСО при 18 °С скорость выхода ЛДГ из клеток в окружающий раствор была небольшой и достоверно не отличалась от значений, полученных при 4 °С (рис. 3). Лишь в случае предварительного введения α -токоферола при насыщении в условиях 18 °С выход ЛДГ был повышен. В процессе отмывания срезов скорость выхода ЛДГ значительно увеличивалась. В контрольных опытах, проводимых при 18 °С, увеличение было особенно выражено на последних этапах удаления криопротектора. Предварительное введение фармакологических препаратов в этих опытах достоверно уменьшало этот показатель на последних этапах отмывания срезов от криопротектора. В опытах, проведенных при 4 °С, скорость выхода ЛДГ в процессе удаления криопротектора не менялась, за исключением опытов с предварительным введением α -токоферола, где скорость выхода ЛДГ возрастала. Вероятно, возрастание выхода ЛДГ в процессе отмывания срезов от криопротектора при 18 °С связано с осмотическими воздействиями на клеточную мембрану. Показано, что клетки почки наиболее чувствительны к осмотическим перепадам именно на конечных этапах удаления криопротектора [1]. Скорость выхода ЛДГ в наших опытах возрастала

параллельно с увеличением потока воды через клеточную мембрану (рис. 1, 3). На последних этапах отмывания скорость выхода ЛДГ и скорость восстановления содержания воды в ткани были максимальными. При 4° С процесс выхода криопротектора из клетки и поступление воды в нее происходил более плавно и осмотические нагрузки на мембрану были выражены в значительно меньшей степени. Следствием этого являлся меньший выход ЛДГ в окружающую среду. Подтверждением взаимосвязи скорости выхода ЛДГ и интенсивности обмена воды между вне- и внутриклеточными тканевыми отсеками являются опыты с предварительным введением α -токоферола и насыщением-отмывкой срезов при 4 °С. При этом отмечено более полное восстановление содержания воды в конце периода отмывки по сравнению с контролем и наибольшая скорость выхода ЛДГ.

Содержание в ткани электролитов (K^+ , Na^+) в конце периодов насыщения и удаления криопротектора было изменено по сравнению с их содержанием в интактных почках, причем особенно выражено в опытах, проводимых при 4 °С (табл. 1). В контрольных опытах после насыщения срезов при 18°С

Т а б л и ц а 1

Влияние предварительной фармакологической подготовки на содержание электролитов в ткани в конце периодов насыщения срезов почки 20 % ДМСО и удаления его в различных температурных условиях, мэкв/кг сухого веса

Серия опытов	Температура, °С	Конец периода насыщения			Конец периода отмывания		
		K^+	Na^+	K^+/Na^+	K^+	Na^+	K^+/Na^+
Без фармакологической подготовки (контроль)	18	293 ± 9	120 ± 2	$2,44 \pm 0,08$	504 ± 33	204 ± 16	$2,47 \pm 0,16$
	4	267 ± 6	184 ± 13	$1,45 \pm 0,08$	278 ± 4	153 ± 6	$1,81 \pm 0,06$
Предварительное введение ДМСО	18	275 ± 3	$156 \pm 6^{**}$	$1,76 \pm 0,07^{**}$	$400 \pm 9^*$	186 ± 4	$2,15 \pm 0,08$
	4	271 ± 6	176 ± 12	$1,54 \pm 0,06$	$341 \pm 12^{**}$	$200 \pm 3^{**}$	$1,71 \pm 0,07$
Предварительное введение α -токоферола	18	$329 \pm 3^*$	$132 \pm 2^*$	$2,49 \pm 0,05$	500 ± 38	$163 \pm 10^*$	$3,06 \pm 0,18^*$
	4	278 ± 4	161 ± 3	$1,73 \pm 0,06^*$	$312 \pm 8^*$	$181 \pm 8^*$	$1,72 \pm 0,08$
Интактные почки	—	371	187	1,98	—	—	—

Достоверность разницы результатов по отношению к контролю: * — $p < 0,005$; ** — $p < 0,01$.

отмечали снижение содержания K^+ и Na^+ ($p < 0,01$), но их отношение оставалось высоким. Отмывание срезов от криопротектора приводило к почти двукратному возрастанию содержания K^+ и Na^+ без изменения их соотношения. В опытах, проводимых при 4 °С, после насыщения срезов ДМСО и после отмывания от него содержание K^+ и отношение K^+/Na^+ достоверно уменьшалось ($p < 0,01$).

Предварительное введение ДМСО при насыщении в условиях 18 °С и 4 °С способствовало меньшим изменениям содержания Na^+ , при этом отношение K^+/Na^+ снижалось. После удаления криопротектора содержание электролитов достоверно не отличалось от значений, характерных для интактных почек. Предварительное введение α -токоферола способствовало сохранению высокого отношения K^+/Na^+ как в конце периода насыщения, так и в конце периода отмывки. Абсолютное содержание K^+ и Na^+ также было ближе к норме по сравнению с опытами без фармакологической подготовки.

Известно, что снижение температуры органа до околонулевых значений почти полностью ингибирует процессы активного транспорта, в том числе транспорт K^+ и Na^+ через клеточную мембрану [5, 6]. Результатом является прогрессирующее снижение градиента концентрации этих электролитов

через клеточную мембрану. Использованный нами консервирующий раствор содержит около 50 мМ K^+ и 30 мМ Na^+ . Движение электролитов по градиенту концентрации из ткани в раствор приводило к снижению их содержания. Это особенно ярко выявлялось в конце эксперимента после удаления криопротектора из срезов. При более низкой температуре ($4^\circ C$) содержание K^+ и Na^+ оставалось стойко сниженным, тогда как при $18^\circ C$ оно нормализовалось или даже превышало нормальные значения. Отношение K^+/Na^+ , отражающее селективную проницаемость клеточной мембраны для электролитов, также было выше при $18^\circ C$.

Предварительная фармакологическая подготовка как ДМСО, так и α -токоферолом ослабляла неблагоприятное действие гипотермии, способствуя лучшей сохранности показателей электролитного баланса. Таким образом, нами установлено, что процесс насыщения срезов почки ДМСО и удаления его протекает более благоприятно при $18^\circ C$, особенно в условиях предварительной фармакологической подготовки. При этом происходит более быстрое насыщение ткани почки криопротектором, более полное отмывание от него, а содержание электролитов и выход ЛДГ изменяются незначительно. При $4^\circ C$ наступает замедление процессов насыщения и выхода криопротектора, вследствие отрицательного действия гипотермии на клеточную мембрану развиваются более выраженные нарушения электролитного баланса. Причиной этих изменений могут служить фазовые переходы мембранных липидов, происходящие в органе при температуре ниже $14 \div 16^\circ C$ и меняющие физико-химические параметры клеточных мембран и функционирование связанных с мембраной ферментов [1, 3]. Предварительное введение крысам ДМСО и α -токоферола в значительной мере ослабляет эти неблагоприятные эффекты и позволяет проводить насыщение криопротектором и его удаление при этой температуре без значительных нарушений клеточного метаболизма.

Для доказательства благоприятного эффекта предварительной фармакологической подготовки были проведены опыты по криоконсервации почки крысы как целого органа. Результаты опытов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние предварительной фармакологической подготовки на показатели степени повреждения почек после криоконсервации

Серия опытов	Поток перфузии, мл/мин/г сухого веса			Выход ЛДГ в перфу- зат, МЕ/мин/г сухо- го веса		Отек, %
	До замо- ражива- ния	После отогрева, мин		После отогрева, мин		
		5	30	5	30	
Без фармакологической под- готовки (контроль)	2,8±0,9	9,6±1,7	8,5±1,0	7,1±0,8	1,4±0,2	42,5±6,2
Предварительное введение ДМСО	2,7±0,7	5,4±0,6*	5,2±0,8*	5,1±0,4	0,9±0,1*	40,8±5,7
Предварительное введение α-токоферола	2,5±0,6	4,3±0,5*	5,3±0,8*	4,2±0,6*	0,8±0,2*	39,6±9,1

Достоверность разницы результатов по отношению к контролю: * — $p < 0,05$.

Видно, что введение обоих препаратов уменьшает степень изменений перфузионных параметров и выход ЛДГ из клеток в перфузат во время удаления криопротектора из органа после отогрева. Степень отека почек по окончании перфузии под влиянием фармакологической подготовки менялась незначительно. Из этого можно сделать вывод, что комплексный метод защиты органа от криоповреждения, заключающийся в предварительной фармакологической подготовке донора и последующем насыщении изолированного органа криопротектором, позволяет в значительной степени уменьшить развитие низкотемпературного повреждения.

1. *Дворцовой В. К.* Исследование влияния криопротекторов и отрицательных температур на функцию почки : Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 1985.— 22 с.
2. *Кирпатовский В. И., Артамонов С. Д., Лубяко А. А., Онищенко Н. А.* Уменьшение степени ишемического повреждения органов с помощью диметилсульфоксида // Криобиология.— 1985.— № 1.— С. 36—40.
3. *Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Кирпатовский В. И.* Фармакологическая защита трансплантата.— М. : Медицина, 1983.— 232 с.
4. *Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Кирпатовский В. И., Лубяко А. А.* Значение фармакологической адаптации к низким температурам при консервации органов в условиях гипотермии и глубокого замораживания // Криобиология.— 1985.— № 3.— С. 3—8.
5. *Belzer F. O.* Endothelial damage in perfused dog kidney and cold sensitivity of vascular $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ // Cryobiology.— 1972.— 9, N 4.— P. 457—460.
6. *Burg M. B., Orloff J.* Active cation transport by kidney tubules at 0°C // Am. J. Physiol.— 1964.— 207, N 5.— P. 983—988.

НИИ трансплантологии
и искусственных органов МЗ СССР,
г. Москва

Поступила 14.07.86

УДК 615.015 : 547.422

А. М. Воротилин, А. М. Мирошников, В. М. Гучок, В. Д. Зинченко

КРИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ЭФИРОВ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЕЙ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Открытие криозащитных свойств глицерина послужило началом широких исследований по изысканию и синтезу новых соединений, способных ограждать различные клетки и ткани от повреждений при замораживании. К настоящему времени установлено, что в отношении криозащиты эритроцитов человека наиболее эффективны глицерин, пропиленгликоль (ПГ), этиленгликоль (ЭГ) и ряд высокомолекулярных непроникающих в клетки соединений [1]. Молекулярные механизмы защиты клеток криопротекторами еще полностью не раскрыты, в связи с чем выдвигаются различные предположения относительно оптимальной химической структуры защитного соединения [6, 7]. Подробно исследованы такие криопротекторы, как полиэтиленоксиды. Оказалось, что влияние их различных производных на криопротекторные свойства более значимо проявляется у олигомеров с невысокой молекулярной массой [6]. Нами изучены криозащитные свойства четырех алкоксильных производных трех низших гомологов: простых моноэтиловых эфиров моно-, ди- и триэтиленгликолей, а также простого метилового эфира диэтиленгликоля.

Исследуемые соединения синтезированы из окиси этилена и соответствующего спирта (этанола и метанола) в присутствии гидроокиси натрия как катализатора. Выделение и очистка отдельных соединений проводились методом вакуумной ректификации. Все изучаемые эфиры (табл. 1), по данным хроматографического анализа, содержали не менее 99,5 % основного вещества. Температура кипения, плотность и рефракция соответствовали справочным [5]. Токсичность изучаемых этиловых и метилового эфиров гликолей оценивалась по LD_{50} для белых мышей при внутрибрюшинном введении 20 %-ных растворов.

Прохождение исследуемых соединений через мембраны эритроцитов определяли ^1H -ЯМР высокого разрешения на приборе «Тесла BS567A». Для этого эритроцитарную массу одномоментно смешивали с 30 %-ными растворами этих веществ в соотношении 1 : 1, центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин и снимали спектры ЯМР осевших клеток и надосадочной жидкости (контролем служили 15 %-ные растворы соединений). Для замораживания использовали кровь донора, хранившуюся не более

Таблица 1

Физико-химические свойства этиленгликоля и алкиловых эфиров низших диолов

Вещество	Формула	Молекулярная масса	Плотность при 20 °С, г/см ³	Вязкость, мм ² /с	T _{кип} , °С	T _{пл} , °С	T _{эвт} , °С
ЭГ	HOCH ₂ CH ₂ OH	62	1,113	20,9	197,6	—13	—63
Метиловый эфир диЭГ	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OH	120	1,021	128,5	193,0	—90	ниже —90
Этиловый эфир ЭГ	C ₂ H ₅ (OCH ₂ CH ₂)OH	90	0,930	2,1	135,1	—70	—
Этиловый эфир диЭГ	C ₂ H ₅ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OH	134	0,987	4,5	201,9	—45	—66
Этиловый эфир триЭГ	C ₂ H ₅ (OCH ₂ CH ₂) ₃ OH	178	1,020	8,0	254,4	—20	—52

5 суток. После центрифугирования в течение 10 мин при 2000 об/мин плазму удаляли и эритроцитарную массу смешивали в соотношении 1 : 1 с 20, 30 и 40 % изучаемых соединений с добавлением 0,6 % хлорида натрия и 3 % сахарозы. Образцы объемом 1,6 мл замораживали со скоростями 4, 14, 24 и 100 °С/мин до температуры —150 °С с последующим погружением в жидкий азот. Размораживание осуществляли по двухэтапной программе: со скоростью 20 °С/мин до температуры —100 °С и 100 °С/мин на втором этапе, погружая образцы в водяную баню с температурой 45 °С. Степень повреждения эритроцитов в результате замораживания определяли фотоколориметрированием. Для получения 100 %-ного гемолиза к одному из размороженных образцов добавляли 0,04 %-ный раствор аммиака. После соответствующих разведений этим раствором строили калибровочную кривую. Определяя по калибровочной кривой значение гемолиза, которому соответствует концентрация свободного гемоглобина в надосадке размороженного образца и умножая на коэффициент (1—гематокрит), находили процент разрушенных клеток. Для исследований готовили весовые концентрации растворов.

Таблица 2

Острая токсичность 20 %-ных растворов гликолей и их эфиров для белых мышей при внутрибрюшинном введении

Вещество	ЛД ₅₀ , г/кг
ЭГ	7,51(6,7—8,3)
Метиловый спирт диЭГ	19,4(17,0—22,0)
Этиловый эфир ЭГ	7,08(6,3—7,8)
Этиловый эфир диЭГ	10,3(9,1—11,7)
Этиловый эфир триЭГ	14,8(14,0—16,0)

Примечание. В скобках даны минимальные и максимальные значения ЛД₅₀.

исходит растворение последнего с понижением температуры образующегося водного раствора. Вязкость водных растворов исследуемых соединений имеет максимум в интервале концентраций 60—80 %. Для примера приводим данные для моноэтилового эфира диэтиленгликоля (диЭГ): эвтектическая концентрация названного моноэтилового эфира диЭГ, обеспечивающая эвтектическую температуру —66 °С, составляет 80 % и находится в области наиболее вязких растворов.

Содержание эфира, %	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Вязкость, мм ² /с	2,3	3,1	4,3	5,4	6,8	7,2	6,2	5,5	4,5

Чистые эфиры гликолей переохлаждаются на 10 ÷ 25 °С ниже температуры плавления, переохлаждение тем больше, чем ниже температура плавления (замерзания). В целом физико-химические свойства всех четырех изучаемых соединений удовлетворяют требованиям, которые обычно предъявляются к криопротекторам, и близки к показателям ЭГ и ПГ [5]. Полагают также, что криопротектор должен обладать низкой токсичностью и хорошо

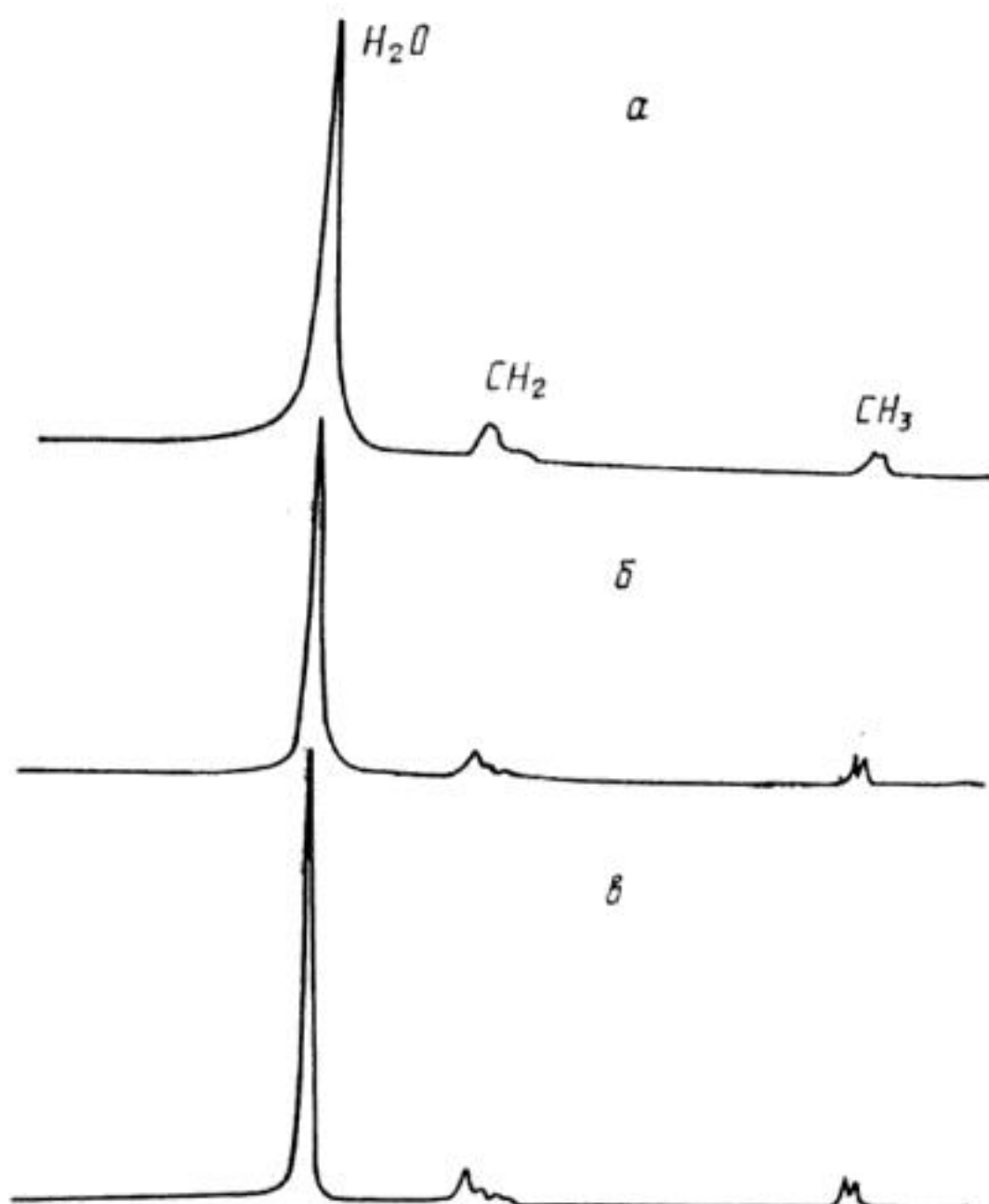
Исследуемые простые эфиры гликолей (табл. 1) растворяются в воде и физиологических растворах хлорида натрия с выделением тепла. При взаимодействии со льдом происходит

проникать в клетку. Изучение острой токсичности на белых мышах позволило установить (табл. 2), что LD_{50} для исследуемых эфиров выше, чем для ЭГ, а для метилового эфира диЭГ этот показатель соизмерим с ПГ [4]. На рисунке представлены спектры осадка (а) и надосадка (б) после смешивания эритроцитов с раствором метилового эфира диЭГ. Для сравнения представлен спектр 15 %-ного водного раствора этого соединения (в). В спектрах видны отдельно сигналы воды и углеводородных групп, по интенсивности которых определяли концентрацию соединения в эритроmasсе и надосадочной жидкости, по нашим оценкам, составляющую соответственно 15 и 18%.

Если учесть, что объем внеклеточной жидкости в эритроmasсе составляет только 10 % от общего объема (гематокрит 0,9), то из сравнения спектров становится ясно, что основной вклад в спектры эритроmasсы вносят молекулы соединения, проникшего внутрь клеток. В пользу этого говорит и тот факт, что сигналы углеводородных групп в спектрах узки и сравнимы по ширине с линией воды. Сигнал от молекул, адсорбированных на мембране, должен быть уширенным за счет мобилизации. Таким образом, приведенные данные являются экспериментальным подтверждением того, что метиловый эфир диЭГ следует относить к классу соединений, проникающих через мембраны эритроцитов. Аналогичные результаты получены для других исследуемых соединений. Показано, что равновесная концентрация между вне-и внутриклеточной средой устанавливается по истечении 10 мин.

В зависимости от соединения концентрация криопротектора в надосадке составляет 15—20 % при гематокрите 0,40—0,45. Отсюда следует, что 30—50 % вещества из раствора попадает внутрь эритроцитов и, возможно, частично адсорбируется на мембранах.

Из представленных в табл. 3 результатов замораживания видно, что во всех случаях наименьший гемолиз эритроцитов наблюдался при средних скоростях замораживания (14 и 24 °C/мин) и 30—40 %-ной концентрации защитного соединения в исходном растворе. Резкое увеличение гемолиза при увеличении скорости замораживания до 100 °C/мин, вероятно, связано с образованием внутриклеточных кристаллов льда. Возрастание гемолиза в результате медленного замораживания (4 °C/мин) и при относительно невысокой концентрации защитного соединения (20%) в исходном растворе обусловлено, по-видимому, интенсивной кристаллизацией льда из внеклеточного раствора и обезвоживанием клеток в процессе замораживания. С увеличением концентрации защитного соединения до 30—40 % и возрастанием скорости замораживания до 14—24 °C /мин действие указанных повреждающих факторов проявляется в меньшей степени. Из сопоставления полученных результатов следует, что при оптимальных режимах замораживания и концентрациях метиловый и этиловый эфиры диЭГ по криозащитному действию на эритроциты сравнимы с ЭГ и ПГ [3]. Наименее токсичен



Спектры ЯМР через 10 мин после смешения эритроmasсы 1:1 с 30 %-ным раствором метилового эфира диэтиленгликоля: а — надосадочная жидкость; б — осадок эритроцитов; в — контроль (15 %-ный раствор метилового эфира диэтиленгликоля)

метилловый эфир диЭГ, токсичность которого почти в три раза меньше, чем ЭГ (табл. 2) и равна токсичности ПГ [4].

Таким образом, обладая выраженным криозащитным действием, метилловый эфир диЭГ в большей степени отвечает требованиям, предъявляемым к криопротекторам, чем ЭГ, и сравним с ПГ [3, 4]. Криозащитное действие других изученных эфиров в отношении эритроцитов человека проявляется в меньшей степени. Слабую защиту оказывал эфир моноэтиленгликоля при замораживании спермы быка [2].

Т а б л и ц а 3

Зависимость гемолиза (%) от концентрации защитной среды и скорости замораживания ($n = 5$)

Защитная среда	Концентрация, %	Скорость замораживания, °С/мин			
		100	24	14	4
ЭГ	20	43,4 ± 6,6	16,3 ± 2,7	27,4 ± 4,2	49,0 ± 6,3
	30	32,1 ± 3,5	4,4 ± 1,2	6,3 ± 1,3	5 ± 0,5
	40	17,1 ± 3,4	3,4 ± 1,1	4,8 ± 0,9	5,8 ± 0,9
Метилловый эфир диЭГ	20	30,6 ± 7,6	13,9 ± 1,9	16,8 ± 2,8	35,3 ± 5,7
	30	38,4 ± 5,8	4,6 ± 0,9	5,7 ± 0,8	13,2 ± 3,5
	40	16,3 ± 2,7	5,3 ± 1,2	3,3 ± 0,8	11,1 ± 1,6
Этиловый эфир ЭГ	20	49,2 ± 10,8	11,7 ± 3,8	14,1 ± 4,5	32,5 ± 7,0
	30	43,8 ± 8,4	14,0 ± 4,2	8,3 ± 2,5	13,2 ± 3,7
	40	27,3 ± 5,2	12,5 ± 4,7	19,5 ± 3,2	47,3 ± 5,6
Этиловый эфир диЭГ	20	49,3 ± 6,6	13,2 ± 1,8	29,3 ± 6,2	33,33 ± 8,3
	30	32,4 ± 4,3	3,6 ± 0,7	6,2 ± 1,2	20,0 ± 5,2
	40	17,1 ± 2,9	4,2 ± 0,6	5,8 ± 1,0	7,8 ± 0,9
Этиловый эфир триЭГ	20	30,2 ± 2,8	17,3 ± 2,6	22,5 ± 5,1	27,0 ± 4,5
	30	14,3 ± 3,6	14,6 ± 2,5	10,2 ± 1,7	13,4 ± 2,1
	40	10,6 ± 2,1	6,8 ± 1,2	8,3 ± 1,2	15,4 ± 1,8

1. Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С. Криоконсерванты. — Киев : Наук. думка, 1979. — 197 с.
2. Бугров А. Д., Шинкаренко Н. И. Изучение криозащитных свойств метилцеллозольва и этилцеллозольва // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. — Киев : Наук. думка, 1974. — С. 41—43.
3. Воротилин А. М. Замораживание клеток крови до —196 °С под защитой низкомолекулярных гликолей и глицерина. Повышение эффективности криоконсервации // Криобиология. — 1985. — № 3. — С. 15—20.
4. Гучок В. М., Зборовская Э. А. О токсичности α-пропиленгликоля // Криобиология и криомедицина. — 1981. — Вып. 8. — С. 46—49.
5. Дымент О. Н., Казанский К. С., Мирошников А. М. Гликоли и другие производные окисей этилена и пропилена. — М. : Химия, 1976. — 415 с.
6. Шраго М. И., Новиков А. Н., Ханина Л. А. и др. Криопротекторы и криоконсерванты (основные направления исследований) // Криобиология. — 1985. — № 3. — С. 8—13.
7. Nach T. The chemical constitution of compounds which protect erythrocytes against freezing damage // J. Gen. Physiol. — 1962. — 46, N 1. — P. 167—175.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков,
Производственное объединение
«Химпром», г. Кемерово

Поступила 10.11.85

С. В. Руденко, В. А. Бондаренко, А. М. Белоус

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛИЦЕРИНА С ЛИПИДНЫМИ БИСЛОЯМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ХОЛЕСТЕРИН

При использовании химических криопротекторов для защиты биологических объектов в условиях низкотемпературной консервации возникает ряд нерешенных проблем, связанных с механизмом непосредственного влияния криопротекторов на структуру мембран клетки. Это связано с тем, что для обеспечения защитного эффекта используются высокие концентрации криопротекторов (1—20 %), что само по себе приводит к изменениям структуры клетки и ее функции. Известно, что большинство криопротекторов — эффективные индукторы слияния клеток (фузогены), ключевые этапы которого включают модификацию структуры мембраны, в связи с чем можно полагать, что основной мишенью действия криопротекторов являются мембранные структуры клетки [7]. В условиях замораживания эффекты криопротекторов *per se* не являются достаточными для трансформации мембраны, поскольку важную роль при этом играют процессы, связанные с изменением состояния водной фазы. Однако в процессе репарации мембран криопротекторы являются активно действующим фактором, особенно в начальной фазе после отогрева. Целью данной работы было исследование особенностей взаимодействия криопротектора глицерина с плоскими липидными бислоями, моделирующими липидную часть биологических мембран.

Плоские липидные бислои (ПЛБ) формировали из раствора липидов и смеси липидов с холестерином в *n*-декане, в концентрации 25 мг/мл на отверстиях в лавсановой пленке диаметром 0,6 мм. В качестве электролита использовали 10 мМ раствор NaCl с *pH* 5,8 ÷ 6,0. Опыты проводили при комнатной температуре 26 ÷ 28 °С. Для формирования мембран использовали следующие липиды: яичный лецитин (ЯЛ) и кардиолипин (производства Харьковского завода бакпрепаратов), бычий лецитин, синтетические дилауроилфосфатидилхолин (ДЛФХ), димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДППХ) производства «Калбио-хем», общие липиды мозга быка и общие липиды яичного желтка, предоставленные Н. Н. Ивановой, амфотерицин В и холестерин (Х). Чистоту липидов контролировали тонкослойной хроматографией.

Сигнал переменного тока с генератора ГЗ-118 усиливался электрометрическим усилителем с сопротивлением обратной связи 1 МОм и через режекторный фильтр подавался на анализатор спектра СК4-56, на котором анализировались высшие гармоники трансмембранного тока. Трансмембранный потенциал измерялся при помощи двух хлорсеребряных электродов с агаровыми мостиками и усилителем У5-9 при создании на мембране десятикратного перепада концентрации NaCl (10 и 100 мМ). Емкость ПЛБ оценивалась по первой гармонике переменного тока или измерялась при помощи моста переменного тока Р471.

Взаимодействие глицерина с плоским липидным бислоем (ПЛБ) проявляется в значительном снижении удельной электрической емкости бислоя и появлении на его поверхности пузырьковых структур (ПС) [3], которые в зависимости от состава бислоя могут полностью или частично занимать его поверхность. Динамика роста ПС зависит от градиента глицерина, ионной силы среды и состава бислоя. При определенных условиях можно вызвать разборку ПС добавлением с противоположной стороны ряда веществ (пропиленгликоль, динитрофенол и т. д.). При этом в структуре ПЛБ образуются бислойные (черные) участки и его емкость возрастает. На рис. 1, а показаны характерные кривые подобного вторичного изменения емкости ПЛБ при добавлении концентрированных растворов глицерина, полиэтиленгликоля-400 и сахарозы. Аналогичные кривые наблюдаются при увели-

чении ионной силы после добавления одно- и двухвалентных катионов с одной стороны мембраны.

Изменение градиента глицерина как с одной, так и с другой стороны бислоя в процессе образования ПС приводит к некоторому восстановлению емкости и небольшой разборке ПС. Последнее указывает, что ПС чувствительны к изменению осмолярности среды, то есть проявляют осмотическую активность. Кроме осмотически индуцированной разборки, реверсию ПС

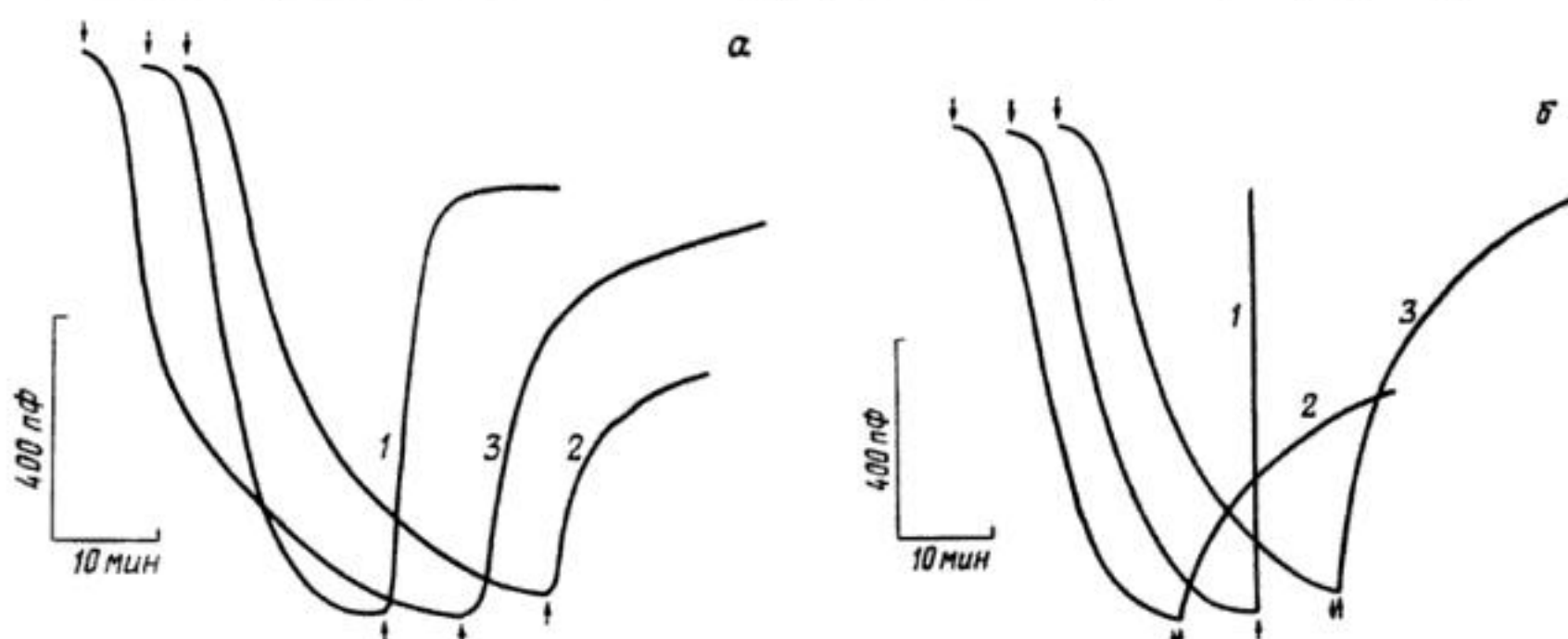


Рис. 1. Зависимость емкости ПЛБ из ЯЛ/Х (1:1) при добавлении 1,6 М глицерина с *цис*-стороны ($\downarrow$), различных веществ с *транс*-стороны ($\uparrow$) и одновременно с двух сторон ($\downarrow\uparrow$) мембраны. а: 1 — глицерин 1,6 М; 2 — ПЭГ-400, 14 %; 3 — сахароза, 10 %. б: 1 — дигитонин, 5 мкМ; 2 — ДНФ, 30 мкМ; 3 — FCCP, 50 мкМ

можно вызвать и добавлением небольших концентраций мембраноактивных веществ (дигитонин, динитрофенол (ДНФ), 3-фторметоксикарбонилцианид-фенилгидразон — FCCP). На рис. 1, б показано, что добавление этих веществ увеличивает емкость бислоев, причем наиболее эффективным является дигитонин, обладающий способностью после разборки ПС вызывать быстрое разрушение мембраны. Фактором, определяющим образование ПС, является наличие в мембране холестерина. В случае мембран, сформированных

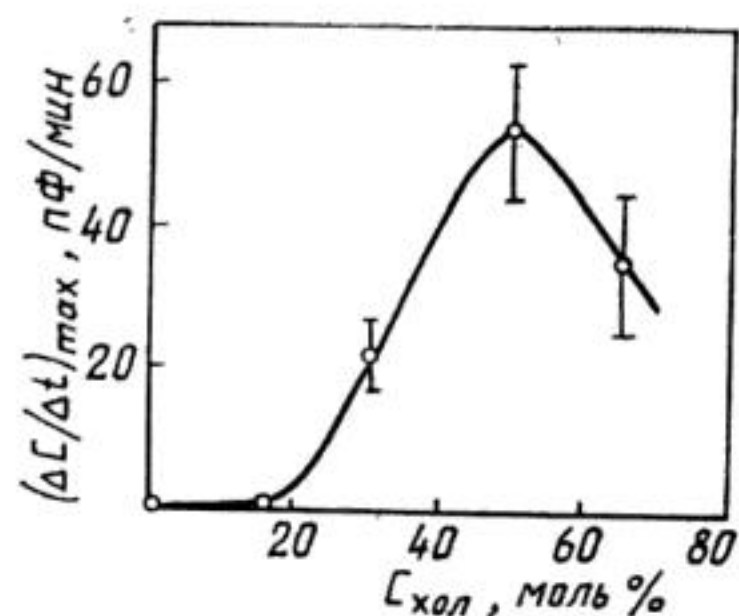


Рис. 2. Зависимость максимальной скорости уменьшения емкости ПЛБ от концентрации холестерина в мембранообразующем растворе. Среда — 10 мМ NaCl. Концентрация глицерина с *цис*-стороны 1,6 М

из чистых липидов (яичного лецитина, бычьего лецитина, кардиолипина, ДЛФХ, ДМФХ, ДПФХ и общих липидов яичного желтка), добавление глицерина с одной стороны в концентрации 1,7 М не приводит к образованию пузырьковых структур. Введение холестерина в эквимольном соотношении с липидами вызывало перестройки различной глубины во всех липидных смесях, кроме синтетических липидов ДЛФХ, ДМФХ, ДПФХ. Слабовыраженные изменения наблюдались и в смеси кардиолипин-холестерин. Это указывает, что помимо холестерина важную роль играют физико-химические характеристики липидной фазы. Роль холестерина на примере мембран из яичного лецитина хорошо видна из данных, представленных на рис. 2. Видно, что интенсивность образования ПС растет с увеличением содержания холестерина в мембране. Структурные перестройки в ПЛБ, индуцированные глицерином, сопровождаются изменениями проводимости мембран, которые носят стохастический характер. Стохастичность изменения проводимости, по-видимому, является прямым следствием вероятностного характера образования ПС, который зависит от многих внешних факторов (предыстории ПЛБ, состава мембраны и т. д.). Можно выделить четыре основных типа изменения проводимости, причем в процессе роста ПС нередко наблюдается последовательная трансформация одного вида прово-

димости в другой. Это постоянная и устойчивая проводимость в процессе роста ПС (рис. 3, а), стрессовые флуктуации трансмембранного тока (рис. 3, а), проводимость канального типа (рис. 3, б) и резкие, иногда обратимые изменения проводимости на несколько порядков величины (рис. 3, в). Крупные дефекты, образующиеся при таких скачках проводимости, по-видимому, представляют собой большие водные поры, поскольку они обладают линейной вольт-амперной характеристикой и в процессе их образования теряется катионная селективность ПЛБ, обусловленная односторонним введением амфотерицина Б. Интересно, что такие дефекты обладают способностью к «самозалечиванию», в результате чего скачки проводимости могут происходить неоднократно (рис. 3, в). Эти данные показывают, что в процессе структурных перестроек ПЛБ при образовании ПС происходят значительные нарушения барьерной функции мембраны, которые могут

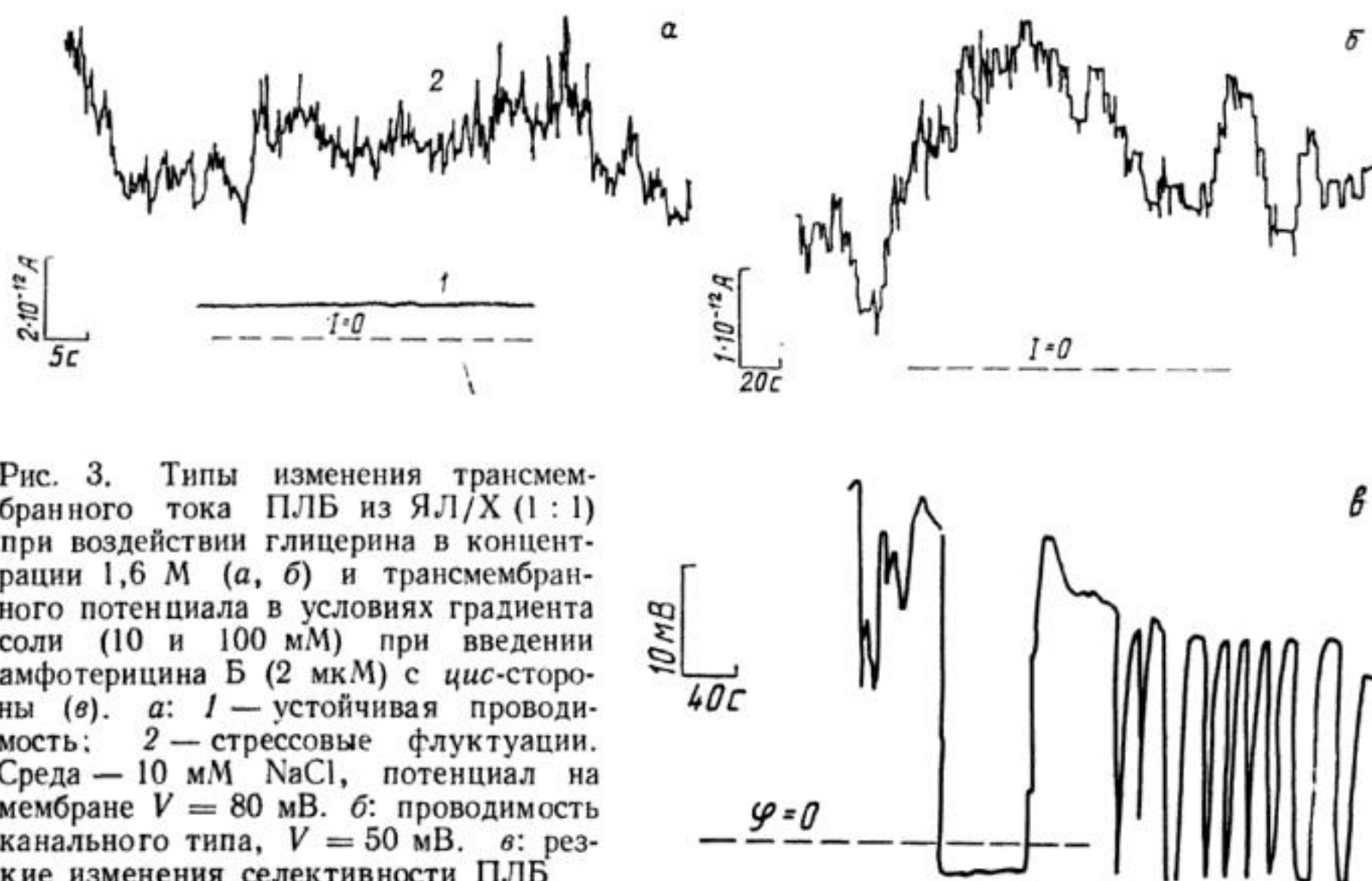


Рис. 3. Типы изменения трансмембранного тока ПЛБ из ЯЛ/Х (1:1) при воздействии глицерина в концентрации 1,6 М (а, б) и трансмембранного потенциала в условиях градиента соли (10 и 100 мМ) при введении амфотерицина Б (2 мкМ) с *цис*-стороны (в). а: 1 — устойчивая проводимость; 2 — стрессовые флуктуации. Среда — 10 мМ NaCl, потенциал на мембране $V = 80 \text{ мВ}$. б: проводимость канального типа, $V = 50 \text{ мВ}$. в: резкие изменения селективности ПЛБ

свидетельствовать о локальных нарушениях бислойной структуры и образовании каналов или пор в зонах этих нарушений.

При взаимодействии глицерина с липосомами из яичного лецитина и холестерина была обнаружена потеря липосомами ламеллярной, бислойной структуры и преобразование ее в квазимицеллярную. При этом наблюдалась фрагментация крупных мультислойных комплексов на мелкие образования, часто имеющие небислойную структуру, которые, однако, через определенное время ($\sim 30 \text{ мин}$) снова реорганизуются в сравнительно крупные бислойные агрегаты [4]. Это позволяет предположить, что в случае плоского бислоя имеет место сходный механизм, включающий образование в бислое промежуточной квазимицеллярной формы упаковки липидов, которая, в свою очередь, является основой формирования ПС. На наличие промежуточной липидной фазы в бислое, вероятно, указывает и появление при росте ПС некомпенсированной второй гармоники трансмембранного тока. Известно, что в обычных условиях вторая гармоника может полностью быть скомпенсирована приложенным к ПЛБ постоянным напряжением. В нашем случае вторую гармонику можно скомпенсировать только частично, причем зависимость некомпенсированной составляющей от входного напряжения имеет квадратичный вид, то есть такой же, как в случае немодифицированных мембран (рис. 4) [2]. Можно полагать, что появление некомпенсированной второй гармоники становится возможным, если ее генерация в зоне ПС и зоне чистого бислоя происходит со сдвигом

по фазе и если эти зоны имеют неодинаковую разность граничных потенциалов. Таким образом, появление некомпенсированной второй гармоники свидетельствует, что в процессе роста ПС появляются липидные образования, имеющие отличные от бислоя вязкоупругие свойства и локальные накопления избыточного заряда, возникающего, вероятно, на границе раздела раствор криопротектора — фосфолипид. Структуру этих участков мембраны можно рассматривать как промежуточную между бислоем и образующимися затем из них крупными мультислойными липосомами, встроенными или прикрепленными к ПЛБ.

Из полученных данных можно сделать вывод, что эффект глицерина, проявляющийся в образовании макроскопических структур на поверхности мембран, реализуется только на структурах ПЛБ, предварительно модифицированных холестерином.

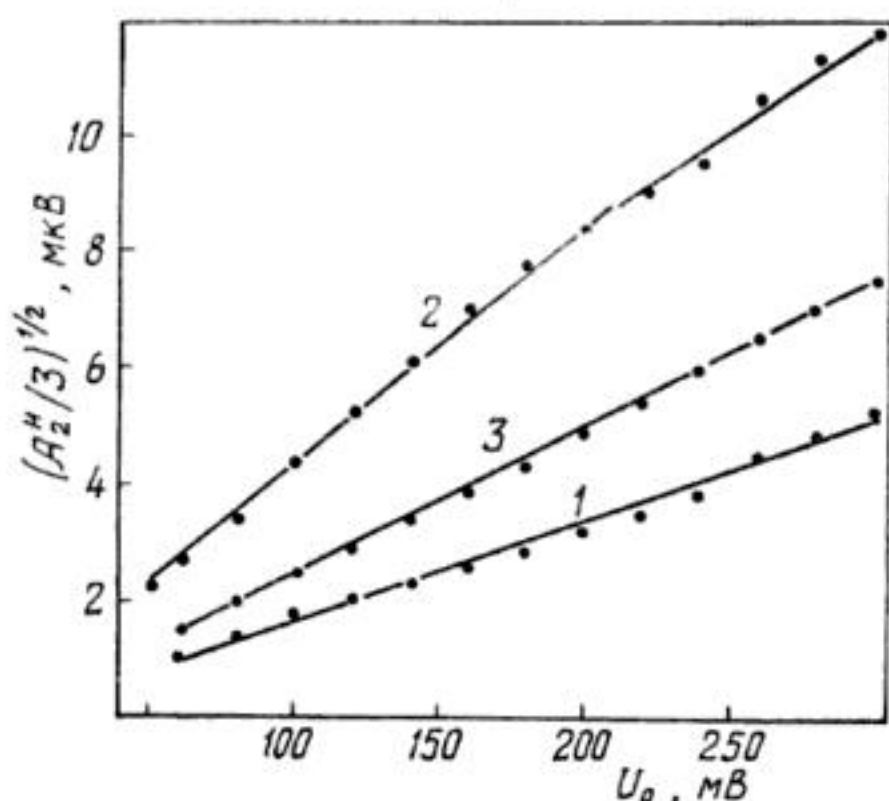


Рис. 4. Зависимость квадратного корня из амплитуды некомпенсированной второй гармоники тока различных частот от амплитуды действующего напряжения, подаваемого на ПЛБ из ЯЛ/Х (1:4) при взаимодействии с глицерином (12 %) и 1,2-пропандиолом (12 %), добавленных с *цис*-стороны: 1 — 200 Гц; 2 — 1000 Гц; 3 — 2000 Гц

уменьшении полярности среды, содержащей глицерин. Изменение состава водной фазы приводит к модификации сил взаимодействия как между липидами, так и между липидами и самой водной фазой [5]. Уменьшение диэлектрической постоянной в смеси глицерина с водой приводит к ослаблению ван-дер-ваальсовых сил притяжения между ламеллами липидов и увеличению расстояния между ними [5], то есть в данном случае можно говорить об однонаправленном (аддитивном) влиянии глицерина и холестерина на состояние бислоя.

Аналогичное увеличение межламеллярного расстояния в липосомах индуцируется и другими неэлектролитами, уменьшающими диэлектрическую постоянную среды (сахароза, глюкоза) [5], что во всех случаях приводит к уменьшению стабилизирующего влияния ван-дер-ваальсовых сил на структуру липидного бислоя. При асимметричном распределении глицерина происходит изменение упаковки и поверхностного потенциала липидов в обращенном к нему монослое, что приводит к увеличению гидратации полярных групп и, фактически, к эффективному увеличению площади полярных групп липидов, то есть появляется структурная асимметрия бислоя. Подобные изменения, оказывающие влияние только на один из монослоев, могут привести к дестабилизации первоначально бислойной упаковки мембраны с образованием промежуточной небислойной липидной фазы, локализованной на поверхности или в пределах бислоя. Исходя из электронно-микроскопических данных, можно предположить, что промежуточная фаза представляет собой скопление мицелл, по характеристикам близким к ли-

посомам. Известно, что холестерин в концентрации 25—35 % вызывает изменение в упаковке компонентов бислоя. Важно отметить, что одновременно с этим изменяется характер взаимодействия мембраны с компонентами окружающей водной фазы [1]. Сложно протекающие взаимодействия полярных групп, включающие как изменение их конформации, так и гидратацию, могут стать начальной фазой в механизме сочетанного действия холестерина и глицерина на структуру бислоя. С учетом этого можно предложить схему последовательности структурных перестроек, происходящих в ПЛБ, включающих холестерин при взаимодействии с глицерином. При добавлении глицерина с одной стороны мембраны возникает асимметрия свойств водной фазы, находящейся по обе стороны бислоя, проявляющаяся в

пидным частицам, возникающим в липидных бислоях при некоторых структурных перестройках [7].

Стабилизация промежуточной фазы в плоских липидных бислоях может осуществляться холестерином. Замещение водной фазы на глицерин в равновесных условиях не нарушает ламеллярную упаковку липидов, хотя фазовое состояние липидов несколько изменяется [6]. Учитывая это, можно сказать, что при насыщении зоны перестройки плоского бислоя глицерином будет протекать обратный процесс формирования мультислойных комплексов с параметрами, характерными для мультислоев липидов в избыточной водно-глицериновой фазе [6] (рис. 5). В предложенной схеме холестерин может оказывать влияние как на начальную фазу трансформации бислоя, так и на терминальную фазу стабилизации формирующихся макроскопических структур.

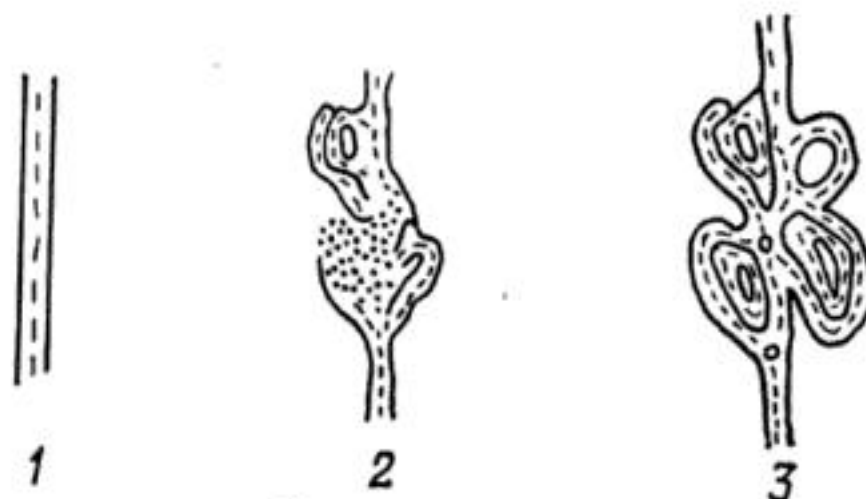


Рис. 5. Возможная последовательность структурных перестроек ПЛБ при взаимодействии с глицерином: 1 — исходный бислой; 2 — сосуществование бислойной и небислойной фаз в липосомальных агрегатах; 3 — конечные липосомальные агрегаты

Таким образом, в ходе структурной перестройки бислоя возможны три типа организации липидов: в виде плоского бислоя, переходной квазимицеллярной упаковки и конечных мультислойных комплексов (рис. 5). В динамике трансформации бислоя доля каждой из этих структурных форм может быть различной и зависеть от глубины происходящих изменений.

1. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. — М. : Наука, 1981. — 293 с.
2. Пасечник В. И. Электрострикционные измерения вязкоупругих свойств бислойных липидных мембран. — М. : ВИНТИ. — 1982. — Т. 2. — С. 267.
3. Руденко С. В. Нарушение планарной упаковки плоского липидного бислоя при взаимодействии с глицерином // Криобиология. — 1985. — № 3. — С. 28—30.
4. Руденко С. В., Белицер Н. В., Чернышов В. И. и др. Изменение структуры липосом и ламеллярной упаковки липосомальных липидов при воздействии с глицерином // Цитология и генетика. — 1985. — 19, № 6. — С. 412—415.
5. LeNeveu D. M., Rand R. P., Parsegian V. A., Gindell D. Measurement and modification of forces between lecithin bilayers // Biophys. J. — 1977. — 18, N 2. — P. 209—230.
6. McDaniel R. V., McIntosh T. J., Simon S. A. Nonelectrolyte substitution for water in phosphatidylcholine bilayers // Biochim. et. biophys. acta. — 1983. — 731, N 1. — P. 97—108.
7. Verkleij A. J. Lipidic intramembranous particles // Ibid. — 1984. — 779, N 1. — P. 43—63.

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

Поступила 05.05.85

УДК 612.014.9 : 534.121.2

В. В. Рязанцев

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАРЬЕРНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ В ГИПО- и ГИПЕРТОНИЧЕСКИХ РАСТВОРАХ СОЛЕЙ

Существующие гипотезы рассматривают гипертонический гемолиз либо как результат прямого воздействия концентрированных растворов солей и осмотических сил на плазматические мембраны [1, 3], либо предполагают первоначальное изменение физико-химических свойств клетки или ее компонентов [2]. С целью дальнейшего выяснения природы гипертонического

гемолиза представляло интерес сравнить характер изменения барьерных свойств эритроцитов в условиях гипо- и гипертонии. При этом можно исходить из того, что физико-химическое нарушение барьерных свойств клеток предполагает одновременное образование дефектов в мембране типа сквозной поры для малых и больших молекул и их обратимость на определенном этапе, в то время как при механическом генезе разрыва мембраны эритроцитов указанные изменения необратимы.

Опыты проводились на донорской крови человека со сроком хранения при 4 °С не более 3 суток. Перед помещением в условия гипо- или гипертонии эритроциты 3 раза промывали центрифугированием при 1500g в физиологическом растворе на холоде. К 0,2 мл осадка эритроцитов добавляли 1,8 мл раствора NaCl или холинхлорида соответствующей концентрации,

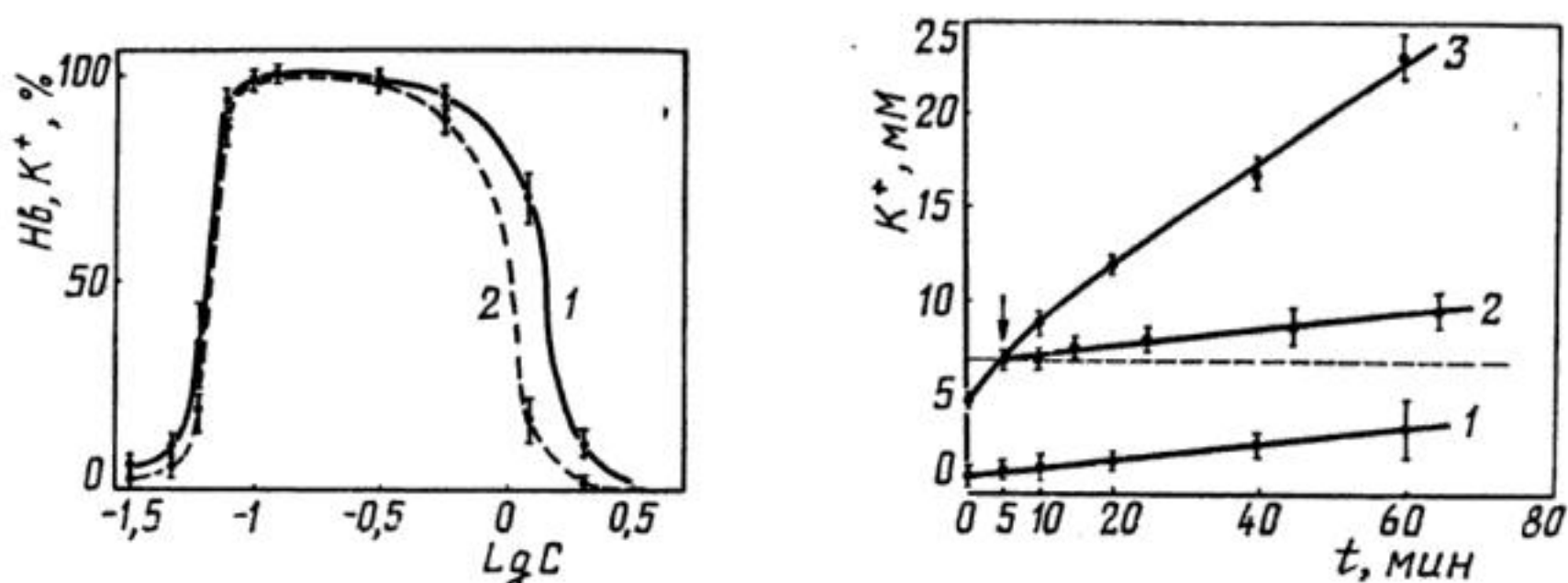


Рис. 1. Содержание гемоглобина (1) и K^+ (2) в образце эритроцитов, подвергнутых инкубации в гипо- или гипертонических растворах холинхлорида. За 100 % принято содержание гемоглобина и K^+ в контрольном осадке эритроцитов. На оси абсцисс — логарифм концентрации холинхлорида, М; на оси ординат — внутриклеточное содержание гемоглобина и K^+ , %. Время инкубации в соли 15 мин

Рис. 2. Кинетика выхода K^+ из эритроцитов в 1 М растворе соли и после возвращения в условия изотонии: 1 — контроль, эритроциты суспендированы в изотоническом растворе NaCl; 2 — эритроциты суспендированы в 1 М NaCl и через 5 мин инкубации перенесены в условия изотонии (стрелкой указан момент возвращения в 0,15 М NaCl); 3 — эритроциты суспендированы в 1 М NaCl

приготовленном на 10 mM трис-HCl, pH 7,4, и содержащем 0,1 mM оуабина фирмы «Серва». Затем образцы инкубировали необходимое время при 20 °С. После инкубации эритроциты суспендировали в 50-кратном объеме изотонического раствора соли и осаждали центрифугированием. Выход K^+ и гемоглобина во внеклеточную среду определяли соответственно методом пламенной фотометрии и спектрофотометрии при 410 нм. Гематокрит измеряли с помощью микрогематокритной центрифуги «Адамс Ридакрит» (США). Статистическую обработку данных проводили по методу Фишера—Стьюдента.

Ранее было показано, что гипотонический гемолиз обусловлен увеличением объема клеток выше критического и является классическим примером механического нарушения целостности мембран [1]. Как видно из рис. 1 (левая ветвь), при помещении эритроцитов в гипотонические растворы (150—15 mM) имеется достаточно четкая корреляция в высвобождении небольших молекул K^+ и крупных молекул гемоглобина, то есть нарушение барьерной функции мембран осуществляется, по-видимому, по принципу «все или ничего» с образованием пор макроскопического масштаба, одновременно проницаемых для малых и больших молекул. Иная картина имеет место при помещении эритроцитов в условия гипертонии (0,15—1,8 М), рис. 1 (правая ветвь). Видно, что после инкубации в 0,6—1,2 М холинхлорида в основном происходит утечка ионов K^+ , в то время как содержание гемоглобина изменяется незначительно. В частности, при инкубации эритроцитов в 1,2 М растворе соли выход K^+ составляет 82 %, а гемоглобина — 27 %. Дальнейшее повышение концентрации холинхлорида в среде до 1,8 М

и выше вызывает при перенесении в условия изотонии практически полное высвобождение K^+ и гемоглобина.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили определить существенные различия в протекании гипо- и гипертонического гемолиза. В последнем случае стадии образования крупных дефектов в мембране, проницаемых для молекул гемоглобина, предшествует увеличение проницаемости для катионов, что хорошо согласуется с результатами других исследований.

Дальнейшие эксперименты позволили установить, что стадия повышенной проницаемости мембран для катионов в значительной мере обратима. Это демонстрируется данными, представленными на рис. 2, из которого видно, что высокий уровень выхода K^+ из клеток, помещенных в 1 М NaCl, уменьшается почти до контрольного уровня при перенесении в изотоническую среду. Однако на стадии образования крупных дефектов в мембране клетки при повышении концентрации соли в среде инкубации до 3 М их репарации, даже при помещении в условия изотонии, не происходит, в то время как потеря барьерных свойств в условиях гипотонии вполне обратима. На рис. 3 показано, что после обработки эритроцитов 3 М NaCl и последующего перенесения в условия изотонии мембраны не способны удерживать во внутриклеточном пространстве не только небольшие молекулы K^+ , но и гемоглобин (рис. 3. Б). При гипертоническом гемолизе и последующем восстановлении изотонии среды, полупроницаемые свойства мембраны восстанавливаются, что соответствует классическим представлениям.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гипертонический гемолиз эритроцитов не вкладывается в рамки чисто механического нарушения целостности мембран, а, по-видимому, связан с физико-химическим повреждением клеток. В области умеренных гипертонических концентраций солей (до 1 М) дефекты мембран эритроцитов, типа сквозной поры, носят обратимый характер.

1. Гительзон И. И., Терсков И. А. О механизме гемолиза // Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов.— М.: Наука, 1961.— С. 3—10.
2. Фаррант Д. Пересмотр некоторых криобиологических концепций // Криобиология и криомедицина.— 1977.— Вып. 3.— С. 12—21.
3. Meryman H. T. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes// Nature.— 1968.— 218, N 5187.— P. 333—335.

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

Поступила 16.04.84

УДК 612.826.4 : 615.832.9

Е. М. Стабровский

РОЛЬ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР ГИПОТАЛАМУСА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИИ ЭНДОКРИННЫХ ОРГАНОВ ПРИ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ

Результаты физиологических и фармакологических исследований свидетельствуют о том, что моноамины мозга, и в частности серотонин, включаются в регуляцию секреции гормонов аденогипофиза с помощью гипота-

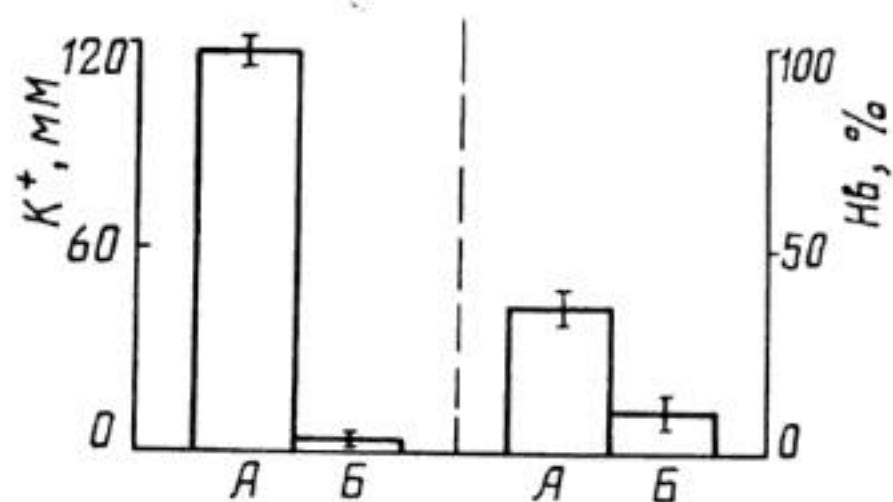


Рис. 3. Способность эритроцитарных мембран к сохранению барьерной функции после инкубации в условиях гипо- или гипертонии. Эритроциты обработаны гипотоническим раствором соли 20 мМ (А) или гипертоническим раствором соли 3 М (Б) и возвращены в условия изотонии. На осях ординат — содержание K^+ , мМ на литр эритроцитов (слева), и гемоглобина, % относительно контрольного образца эритроцитов (справа)

ламических гормонов, которые достигают железы через портальную систему капилляров гипофиза [1, 2]. Большинство данных литературы касается серотонинергических структур мозга в регуляции функции гипофизадреналовой и гипофиз-тиреоидной эндокринных систем. Одни исследователи [3, 7] считают, что секреция кортикостерона стимулируется серотином, другие [6] придерживаются иной точки зрения. Противоречивы данные и о серотонинергической регуляции функции гипофиз-тиреоидной системы.

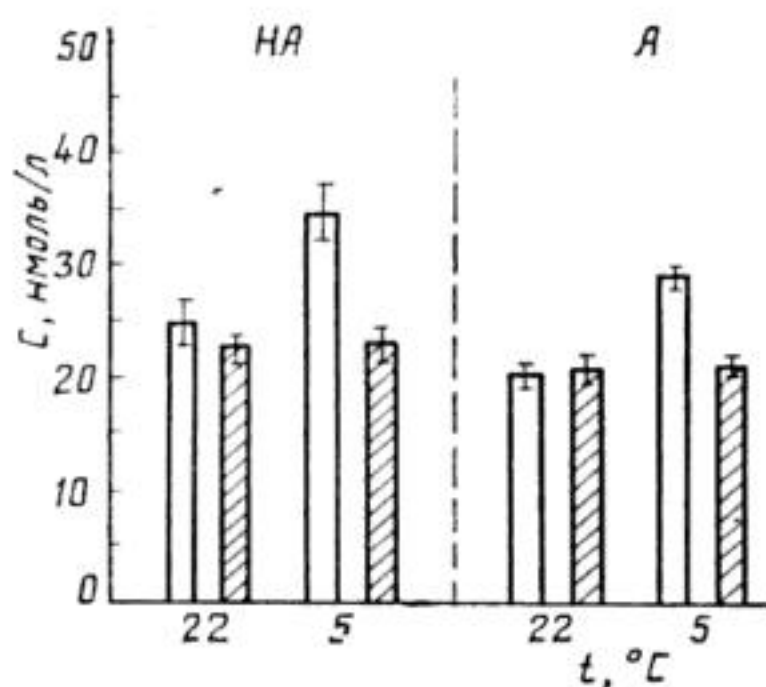


Рис. 1

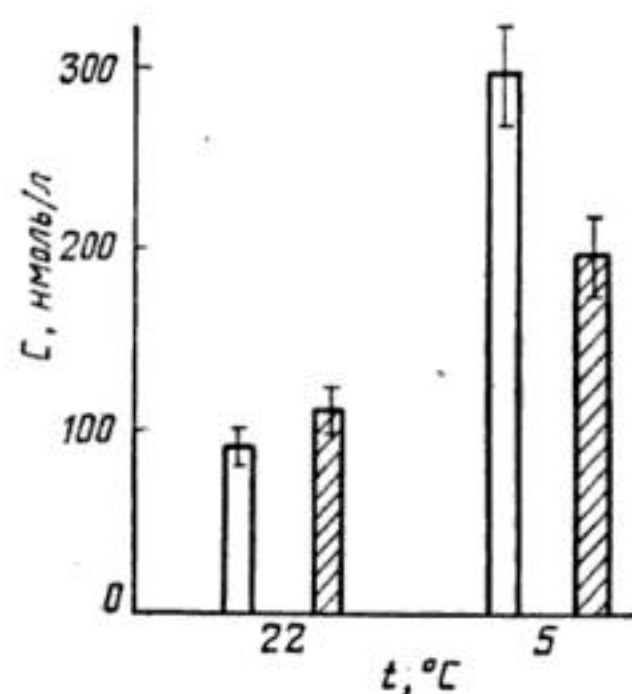


Рис. 2

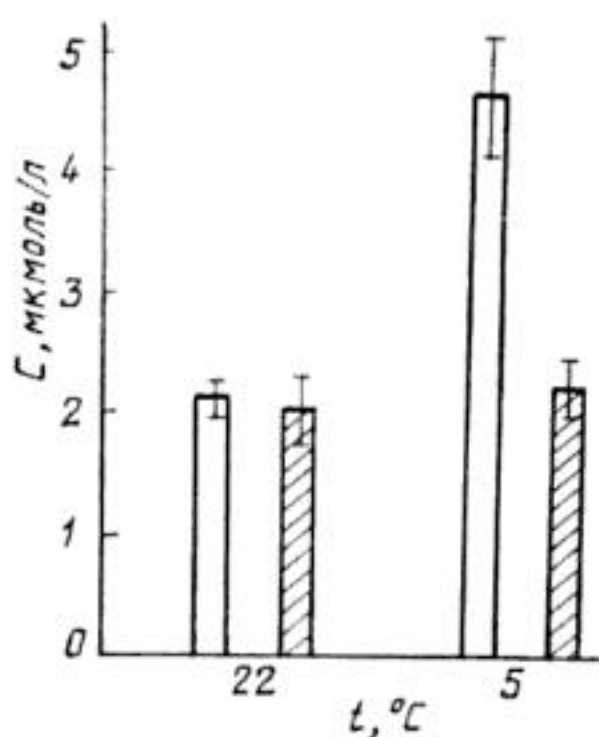


Рис. 3

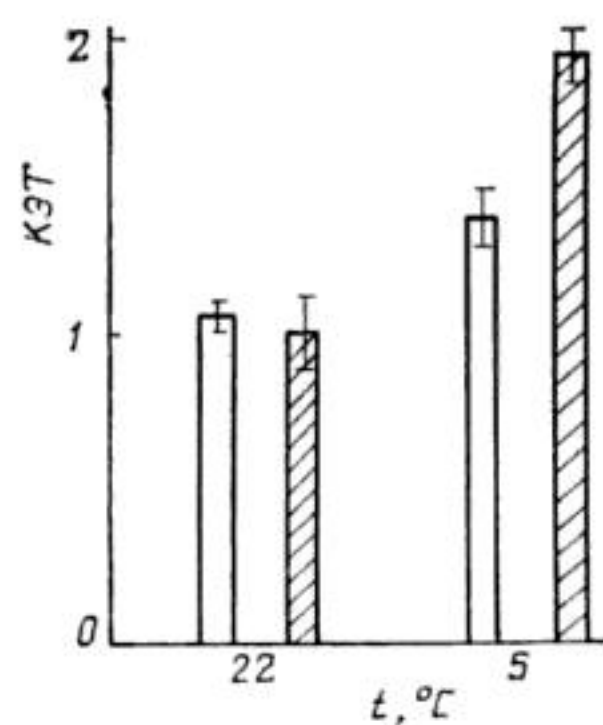


Рис. 4

Рис. 1. Влияние инъекции 5,6-ОТА на содержание норадреналина (НА) и адреналина (А) в плазме крови крыс (ось ординат) при $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$ (ось абсцисс). Светлые столбики — контроль, заштрихованные — группа крыс после инъекции 5,6-ОТА

Рис. 2. Содержание кортикостерона в плазме крови крыс (ось ординат) после инъекции 5,6-ОТА при $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$ (ось абсцисс). Обозначения те же, что на рис. 1

Рис. 3. Содержание серотонина в плазме крови крыс (ось ординат) после инъекции 5,6-ОТА при $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$ (ось абсцисс). Обозначения те же, что на рис. 1

Рис. 4. КЭТ крови крыс (ось ординат) после инъекции 5,6-ОТА при $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ (ось абсцисс). Обозначения те же, что на рис. 1

Не доказано участие серотонина мозга в регуляции симпатико-адреналовой и энтерохромаффинной систем.

Опыты проведены на беспородных крысах-самцах массой 180—200 г в осенне-зимний период. Крыс делили на 2 группы: 1 — контрольная (вводили 20 мкл растворителя: 0,5 % аскорбиновой кислоты в физиологическом растворе); 2 — животным вводили 5,6-окситриптамиин (5,6-ОТА) в боковые желудочки мозга в дозе 75 мкг в 20 мкл растворителя на одну крысу в стереотаксическом аппарате под гексеналовым наркозом (10 мг/100 г массы тела). Через 7 дней после инъекции препаратов крыс обеих групп помещали на 1 ч в специальную камеру с температурой воздуха $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$. Перед началом опытов животных 3—4 дня адаптировали в камере, затем их декапитировали, извлекали гипоталамус и собирали кровь. Флуориметриче-

ским методом [4] в гипоталамусе и в крови анализировали серотонин, триоксиндольным методом [5] в крови определяли адреналин (А) и норадреналин (НА), радиоиммунологическим методом — кортикостерон и коэффициент эффективности тироксина (КЭТ). Сравнивали данные, полученные при исследовании крыс, содержащихся в камере 1 ч при 22 °С и находившихся 1 ч при 5 °С.

Исследовано значение серотонинергической системы гипоталамуса в регуляции нейроэндокринного ответа при действии острого холода на крыс. В результате инъекции 5,6—ОТА содержание серотонина в гипоталамусе снижалось от 13,6 мкмоль/кг до 6,2 мкмоль/кг, что свидетельствовало о разрушении примерно 50 % серотонинергических волокон гипоталамуса. Охлаждение не изменяло этого эффекта.

Из представленных результатов видно, что деструкция серотонинергических волокон гипоталамуса отражалась на функциональной активности симпатико-адреналовой, гипофиз-адреналовой, гипофиз-тиреоидной и энтерохромаффинной систем в условиях термонеutralной зоны (22 ± 1) °С и при остром охлаждении (5 ± 1) °С. Оказалось, что такая деструкция не изменяет базальную (условия термонеutralной зоны) секрецию гормонов симпатико-адреналовой системы НА и А (рис. 1), но блокирует вызванное холодом увеличение их содержания в крови. В тех же условиях содержание кортикостерона (гипофиз-адреналовая система) в крови при 22 °С (термонеutralная зона) несколько увеличивалось. После острого охлаждения у крыс, серотонинергические волокна которых были разрушены, реакция гипофиз-адреналовой системы оказалась аналогичной реакции контрольных животных (рис. 2). Функциональная активность энтерохромаффинной системы (по содержанию серотонина в крови) после деструкции серотонинсодержащих терминалей в условиях термонеutralной зоны не отличалась от контроля (рис. 3). После воздействия холодом у крыс с деструкцией серотонинергических волокон блокировалось увеличение секреции серотонина.

Серотонинергические волокна гипоталамуса участвуют также в регуляции функции щитовидной железы (по величине коэффициента тироксина в крови). Это доказывается тем, что, хотя их деструкция не изменяла базальную функцию щитовидной железы, после действия острого холода ответ со стороны железы оказался гораздо большим, чем в контроле (рис. 4).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что серотонинергические структуры гипоталамуса стимулируют функциональную активность симпатико-адреналовой, гипофиз-адреналовой и энтерохромаффинной систем, но ингибируют функцию гипофиз-тиреоидной системы.

Результаты проведенных исследований позволяют представить, каким образом серотонинергические терминалии гипоталамуса осуществляют регуляцию функции исследованных нейроэндокринных систем и желез. Серотонинергические терминалии гипоталамуса играют существенную роль в регуляции функции симпатико-адреналовой системы в условиях острого охлаждения. Известно, что от рецепторов холода по афферентным путям импульсы попадают в ствол мозга, где сконцентрированы тела серотонинергических нейронов, волокна которых достигают гипоталамуса, группируясь в переднем и заднем его отделах. Анатомически такая концентрация серотонинергических терминалей обеспечивает регуляцию центра симпатико-адреналовой системы, расположенного в заднем гипоталамусе. В условиях стресса, вызванного холодом, возбуждаются серотонинергические нейроны, терминалии которых оканчиваются в заднем гипоталамусе, что обеспечивает стимуляцию активности центра симпатико-адреналовой системы. В результате происходит максимальное возбуждение симпатико-адреналовой системы, что сопровождается высвобождением больших количеств норадреналина и адреналина в систему кровообращения.

Данные настоящих опытов позволили также впервые показать значение центральных механизмов в регуляции функциональной активности эн-

терохромаффинной системы. Рассмотрим особенности центральной регуляции функции на примере действия на организм острого холода. Афферентные импульсы от рецепторов холода достигают клеточных тел серотонинергических нейронов ствола мозга и возбуждают их. Серотонинергические терминали, оканчивающиеся вокруг супраоптического и паравентрикулярного ядер, стимулируют нейросекреторную активность этих крупноклеточных ядер, в результате чего активно высвобождается и транспортируется нейросекреторный материал (вазопрессин, окситоцин и, возможно, еще какой-то неизвестный пептид). Дальнейший путь нейросекрета пока неясен. Однако, попадая в систему кровообращения, он достигает энтерохромаффинных клеток желудочно-кишечного тракта, где стимулирует секрецию серотонина в кровь.

Полученные результаты позволили уточнить роль серотонинергических терминалей гипоталамуса в регуляции функции гипофиз-адреналовой и гипофиз-тиреоидной систем. Оказалось, что серотонинергические терминали гипоталамуса стимулируют функцию гипофиз-адреналовой системы, но ингибируют функцию гипофиз-тиреоидной системы.

1. *Алешин Б. В.* Двойственность нейросекреторных механизмов гипоталамуса и ее значение в регуляции эндокринных функций // *Успехи физ. наук.*— 1979.— 10, № 1.— С. 7—27.
2. *Баранов В. Г., Пропп М. В.* Гипоталамическая регуляция функций гипофиза и периферических эндокринных желез // *Физиология эндокринной системы.*— Л. : Наука, 1979.— С. 507—554.
3. *Науменко Е. В., Попова Н. К.* Серотонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы.— Новосибирск : Наука, 1975.— 210 с.
4. *Стабровский Е. М.* 5-окситриптамин (серотонин) // *Методы исследований нейро-эндокринных систем.*— Л. : Изд. ГИДУВ, 1971.— С. 78—89.
5. *Стабровский Е. М., Коровин К. Ф.* Методы определения катехоламинов и их предшественников в клинике и в эксперименте // *Методы исследования нейроэндокринных систем.*— Л. : Изд. ГИДУВ, 1971.— С. 5—38.
6. *Шляпина В. Г.* Участие катехоламинов мозга в регуляции гипофиз-адреналовой системы // *Гипофизарно-адреналовая система и мозг.*— Л. : Наука, 1976.— С. 49—66.
7. *Шрейберг Г. Д.* Нейрогуморальные механизмы регуляции функции системы гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников / *Физиология и патофизиология гипоталамуса.*— М. : Наука, 1966.— С. 30—38.

Научно-исследовательский
психоневрологический ин-т
им. В. М. Бехтерева,
г. Ленинград

Поступила 02.02.87

УДК 616.36—091.8:57.043:537.533.35

А. С. Капрельянц, Л. Н. Марченко, И. П. Матяш

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ГЕПАТОЦИТОВ КРОЛИКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ CCl_4

В связи с широким использованием низких температур в различных областях биологии и медицины вопросы исследования тонких структурных перестроек ткани при действии охлаждения приобретают все большее значение [2]. В литературе имеются сообщения, посвященные изучению влияния охлаждения на ультраструктуру гепатоцитов экспериментальных животных в условиях функциональной нормы и онтогенеза [1, 6, 9]. Информация о состоянии ультраструктуры печени при действии охлаждения в условиях длительного введения животным CCl_4 нами не обнаружена. В то же время исследование динамики ультраструктурных перестроек патологически измененной ткани печени при ее локальном охлаждении представляет не только теоретический интерес для криобиологии, но и является необходимым этапом в разработке научно обоснованных криометодов лечения деструктивно-дистрофических состояний этого органа. Целью данной работы является исследование ультраструктуры гепатоцитов кроликов, длительно

получавших инъекции CCl_4 , при локальном действии низких температур на печень.

Для электронно-микроскопических исследований использована ткань печени [3] самцов кроликов породы «шиншилла» с исходной массой 2,5—3,0 кг, которым подкожно вводили 0,2 мл 40%-ного раствора CCl_4 на оливковом масле на 1 кг массы животного 2 раза в неделю в течение пяти недель. После 40-дневного перерыва курс инъекций был повторен. Экспериментальные животные, разделенные на 3 группы, во время операций, производившихся на второй неделе после окончания инъекций, наркотизировались внутривенным введением 5 %-ного раствора тиопентала натрия. Животным 1-й группы производили срединную лапаротомию и брали биопсийный материал с целью определения степени выраженности повреждения ткани печени. Животным 2-й группы после проведения лапаротомии производили криоаппликацию в двух соседних точках одной доли печени автономным зондом, охлажденным жидким азотом, с температурой наконечника $-180 \div -190^\circ\text{C}$ и диаметром 10 мм в течение 120 с в каждой точке. Животным 3-й группы производили криоаппликацию двух различных долей печени тем же инструментом. Время воздействия — 60 с в одной точке. Объем замороженной ткани печени животных 2-й и 3-й групп составлял соответственно 10—12 и 5—8 % массы органа. Спустя 60 сут после криовоздействия ткань охлаждавшейся доли печени брали для исследований. Контролем служили интактные кролики, содержащиеся в тех же условиях. В каждой группе было не менее 3-х животных.

Для электронно-микроскопических исследований брали ткань из печени на

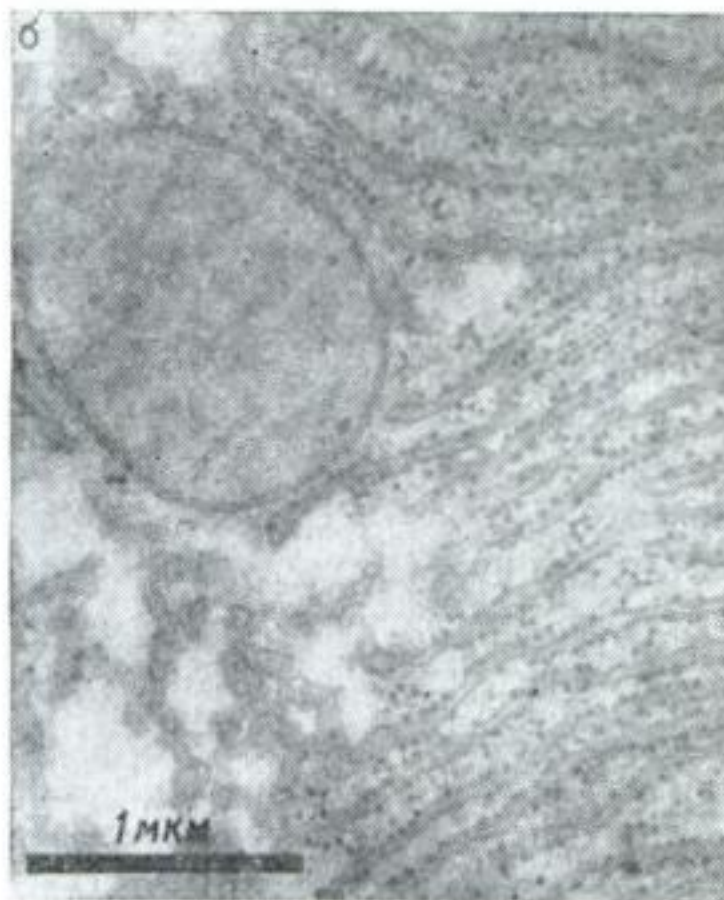
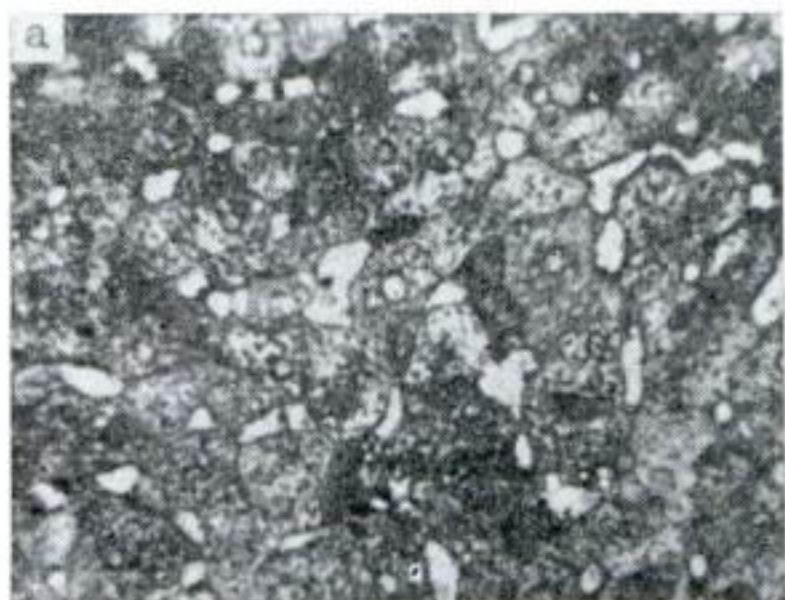


Рис. 1. Ультраструктура гепатоцитов кроликов, длительно получавших CCl_4 (а), и гепатоцитов животных через 60 сут после проведения криоаппликации одной доли печени (б): а — полутонкий срез фиксированного в глутаральдегидном и осмиевом фиксаторах и залитого в эпоксидную смолу образца; отмечается очаговое просветление и зернистость цитоплазмы, 7×40 ; б — митохондрии нормального вида с митохондриальными гранулами, незначительно расширены цистерны ЭПР с уплотненным содержимым

расстоянии 0,5—0,8 см от зоны замораживания, фиксировали в 2 %-ном растворе глутаральдегида на какодилатном буфере ($\text{pH } 7,4$) и дофиксировали в 1 %-ном растворе OsO_4 , обезвоживали в ацетонах возрастающей концентрации, заливали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Ультратонкие срезы готовились на ультрамикротоме УМТП-4. Просмотр и фотографирование осуществляли в электронном микроскопе ЭВМ-100БР при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Для прицельного анализа структуры и светооптического контроля материала дополнительно из тех же блоков изготавливали полутонкие срезы и окрашивали по методу Филпотта [7] (рис. 1, а). Для гистологического просмотра печень тех же животных фиксировали в нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах и заливали в парафин; срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Электронно-микроскопическое исследование образцов 1-й группы показало гетерогенность ультраструктурной характеристики клеток: наряду с гепатоцитами, имеющими незначительные изменения, присутствуют клетки, в которых органоиды цитоплазмы теряют обычную структуру. При этом преобладают гепатоциты второго типа. В ряде случаев органоиды цитоплазмы труднодифференцируемы и имеют вид электронно-оптически плотных скоплений, очевидно, связанных с дистрофическими и аутолитическими процессами, локализующимися в цитоплазме. Встречаются просветленные участки цитоплазмы в различных частях клетки, свободные от органоидов и вещества цитоплазмы (рис. 1, б). Обнаруживаются митохондрии обычной формы с измененной структурой: локальным просветлением внутреннего содержимого, нарушением целостности внутренней и наружной митохондриальных мембран. Значительные изменения претерпевают цистерны эндоплазматического ретикулума (ЭПР), количество которых в цитоплазме уменьшено, имеет место их фрагментация. Иногда ЭПР представлен в виде разветвляющихся укороченных канальцев. Рибосомы на мембранах ЭПР расположены нерегулярно, в цитоплазме отмечаются отдельные скопления свободных рибосом, много вакуолей разных размеров, иногда с плотным гомогенным содержимым, очевидно, лизосомальной природы. Отмеченная вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов при введении CCl_4 может рассматриваться как проявление вакуольной дистрофии [5]. Ядра гепатоцитов имеют преимущественно обычную форму, однако встречаются пикнотизированные ядра и редко — двуядерные клетки. В некоторых ядрах отмечено увеличение ядерных пор. Описанные изменения ультраструктуры гепатоцитов кроликов, получавших в течение длительного периода времени CCl_4 , характеризуются преимущественно повреждением органоидов цитоплазмы. При этом характер изменений, связанных, в первую очередь, с ЭПР и митохондриями, позволяет предположить нарушение метаболизма клетки в результате деструктивно-дистрофических процессов, обусловленных токсическим влиянием CCl_4 [5, 8].

Анализ образцов 2-й группы показал, что ультраструктура гепатоцитов характеризуется большим количеством митохондрий различной формы и размеров. Встречаются увеличенные митохондрии вытянутой формы. Внутренняя структура митохондрий без изменений. В некоторых из них нарушена целостность наружной и внутренней митохондриальных мембран. В цитоплазме отмечается наличие шероховатого ЭПР с незначительно расширенными цистернами и электронно-оптически плотным содержимым (рис. 1, б). В цитоплазме гепатоцитов этой группы животных также обнаруживаются электронно-оптически светлые участки. Обращает внимание наличие отдельных скоплений округлой формы, состоящих из мелких вакуолей, имеющих электронно-оптически плотное содержимое, окруженное однослойной мембраной. Вакуоли имеют округлую или вытянутую форму, при этом размеры вакуолей соизмеримы с размерами цистерн ЭПР, что, очевидно, свидетельствует об их происхождении. Ядерный аппарат гепатоцитов близок к норме. В то же время обращает внимание увеличение количества двуядерных клеток. Отчетливо определяются поровые комплексы с несколько расширенными порами и скоплением отдельных рибосом со стороны цитоплазмы. Таким образом, ультраструктура гепатоцитов кроликов, получавших CCl_4 , которым была сделана криоаппликация в двух соседних точках одной доли печени, спустя 60 сут имеет изменения, свидетельствующие при сопоставительном анализе с предыдущей группой о некоторой нормализации структурных элементов клетки.

В цитоплазме гепатоцитов животных 3-й группы обнаружено большое количество митохондрий округлой и вытянутой формы различных размеров (рис. 2, а). Внутренняя структура большинства митохондрий имеет характерное строение. Наружная и внутренняя митохондриальные мембраны местами теряют свою целостность (рис. 2, б). Иногда повреждения митохондрий связаны с отслоением наружной и внутренней мембраны и образованием «пузыря», содержимое которого имеет незначительное количество

электронно-оптически плотного материала с остатком мембран, расположенных на светлом фоне (рис. 2, б). ЭПР имеет вид плоско-параллельных мембран с расположенными на них рибосомами, локализуемыми вблизи митохондрий и других органоидов клетки (рис. 2, а). Некоторые цистерны ЭПР утолщены, с большим количеством рибосом. Рядом с цистернами ЭПР в некоторых местах располагается большое количество свободных рибосом

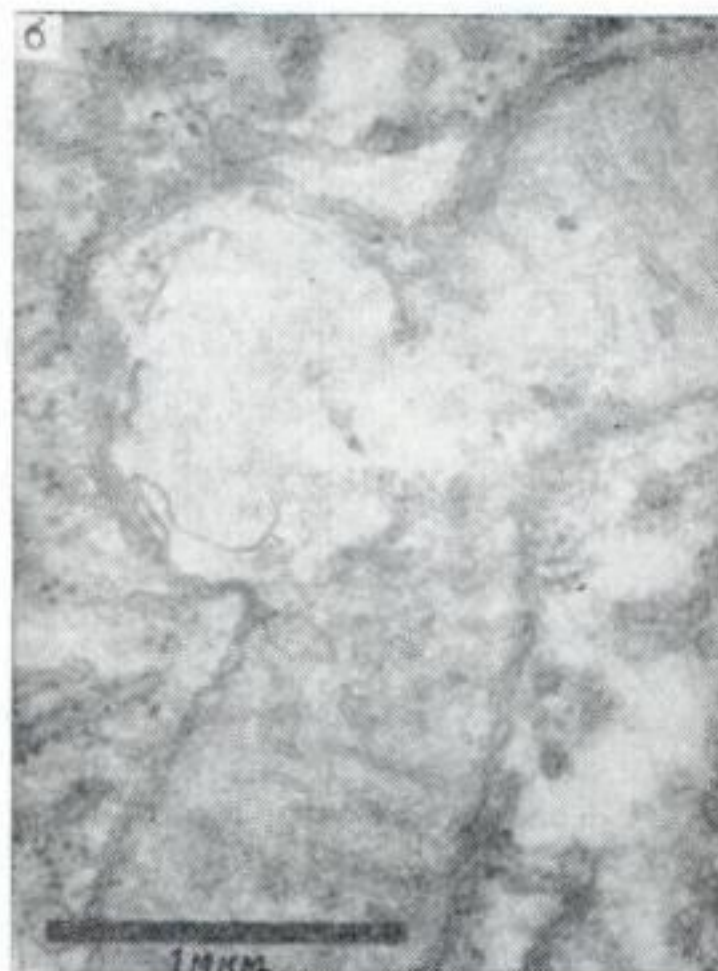
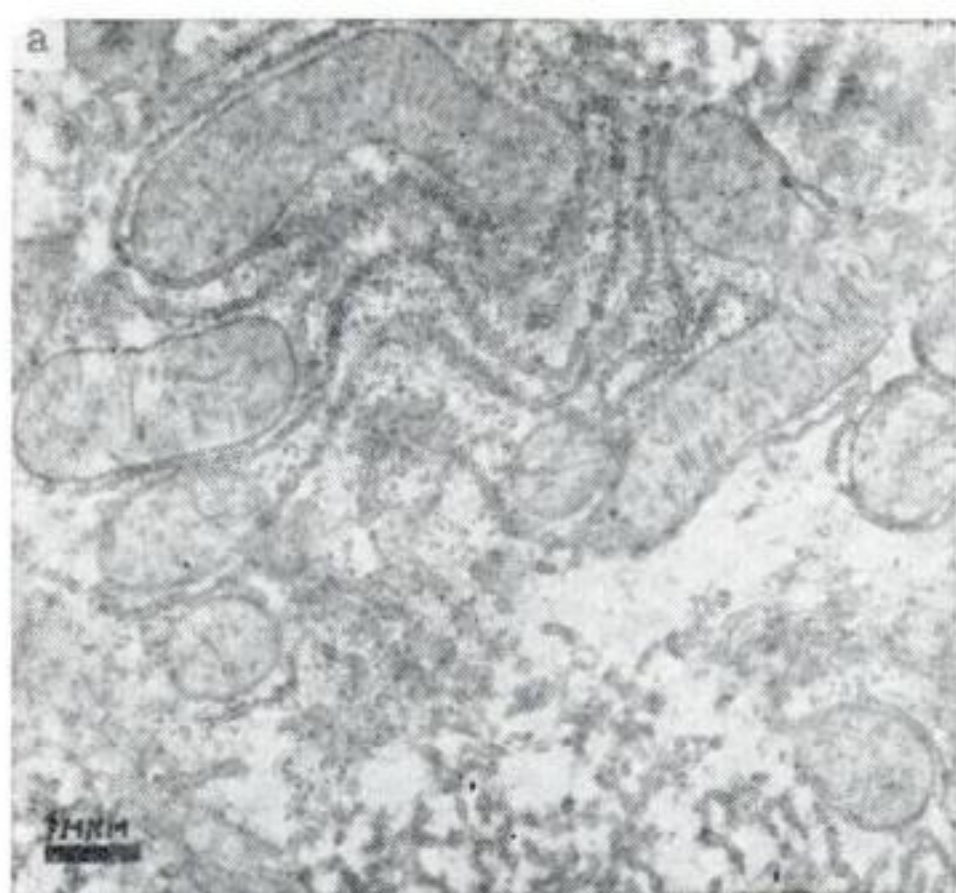
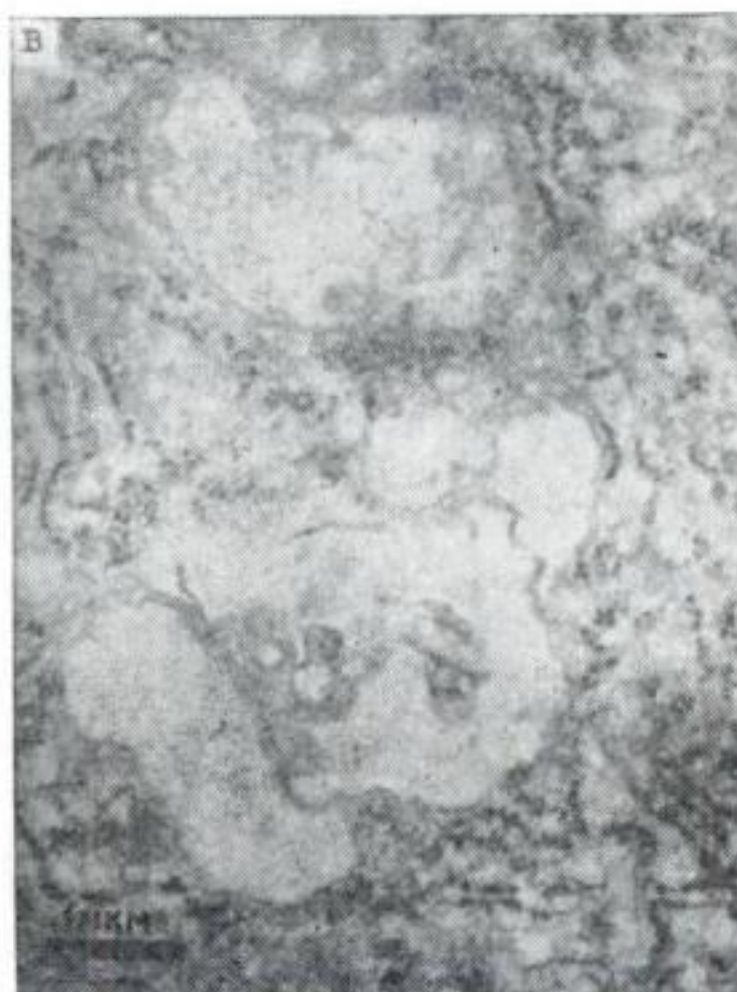


Рис. 2. Ультраструктура гепатоцитов спустя 60 сут после криоаппликации двух долей печени (а и б) и гепатоцитов кролика, погибшего после прекращения курса инъекций CCl_4 (в): а—цитоплазма с митохондриями обычного вида и размеров, отмечается нерегулярное расположение рибосом на мембранах ЭПР и скопление мелких вакуолей и трубочек в нижней части снимка; б—повреждение митохондриальной мембраны с образованием «пузыря»; в—набухание митохондрий, лизис крист, нарушение наружной и внутренней мембран



и рибосомальных комплексов. Иногда отмечается нерегулярное расположение рибосом на мембранах ЭПР. В цитоплазме также обнаруживается скопление мелких вакуолей и трубочек описанного выше вида, свидетельствующее о гиперплазии ЭПР, что согласуется с имеющимися данными о репаративной регенерации цитоплазматической сети после ее повреждения, в частности, CCl_4 [4]. Ядра гепатоцитов имеют преимущественно обычное строение, встречаются двоядерные клетки. В некоторых случаях отмечено увеличение ядерных пор. Редко обнаруживаются пикнотизированные ядра.

При общей интерпретации результатов учитывались данные, полученные при электронно-микроскопическом исследовании печени животных, погибших более чем через месяц после прекращения инъекций CCl_4 . В первую очередь обращает внимание наличие в гепатоцитах большого количества измененных митохондрий, внутренняя структура которых почти полностью лизирована, кристы отсутствуют, имеются небольшие вакуоли и мелкие электронно-оптически плотные гранулы внутри. Наружная и внутренняя митохондриальные мембраны на большом протяжении теряют свою целостность (рис. 2, в). Имеются фрагменты мембран ЭПР, расположенные вблизи

митохондрий. Отмечается скопление свободных рибосом и вакуолей. У части гепатоцитов обнаружены пикнотически измененные ядра.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что длительное введение CCl_4 способствует развитию деструктивно-дистрофических изменений ультраструктуры, преимущественно органоидов цитоплазмы. Сопоставляя характер изменений ультраструктуры гепатоцитов кроликов, длительно получавших CCl_4 , на 60 сут после криовоздействия двух видов становится очевидным отсутствие значимых различий в реакции ультраструктурных компонентов клеток в условиях данного эксперимента. В обоих случаях в большей или меньшей мере были выражены морфологические признаки, с одной стороны, репаративной регенерации, с другой — деструктивно-дистрофических процессов. При этом можно отметить положительный сдвиг направленности развития ультраструктурных перестроек гепатоцитов после проведенных криовоздействий на печень по сравнению с исходным состоянием.

1. Джинджолия Ш. Р. Действие низких температур на ультраструктуру цитоплазмы гепатоцитов 11-дневных куриных зародышей // Сообщения АН ГССР. — 1980. — 97, № 2. — С. 461—463.
2. Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С., Панков Е. Я. Ультраструктура клетки при низких температурах. — Киев : Наук. думка, 1978. — 140 с.
3. Сандомирский Б. П., Волкова Н. А., Журавлев А. С. и др. Механизмы криостимуляции регенерации поврежденных тканей // Криобиология. — 1985. — № 1. — С. 29—36.
4. Саркисов Д. С. Очерки по структурным основам гомеостаза. — М. : Медицина, 1977. — 350 с.
5. Саркисов Д. С., Пальцын А. А., Втюрин Б. В. Электронно-микроскопическая радиоавтография клетки. — М. : Медицина, 1980. — 262 с.
6. Meryman H. T., Plott W. T. The distribution and growth of the ice crystals in frozen mammalian tissue // Res. Rep. Naval Med. Res. Inst. Maryland. — 1955. — 13, N 1. — P. 1—30.
7. Philpott D. E. A rapid method for staining plastic-embedded tissue for light microscopy // Sci. Inst. — 1966. — 11, N 1. — P. 11—12.
8. Ryoo J. W., Buschmann R. A morphometric analysis of the hypertrophy of experimental liver cirrhosis // Virchows Arch. — 1983. — A400, N 2. — P. 173—186.
9. Smith J. J., Fraser J., MacIver A. G. Ultrastructure after cryosurgery of rat liver // Cryobiology. — 1978. — 15, N 4. — P. 426—432.

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

Поступила 12.11.85

УДК 612.44 : 615.361.014.41

**Я. Х. Туракулов, Б. А. Атаханова, Д. А. Кадырова,
С. И. Исмаилов**

ВЛИЯНИЕ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА (ТТГ) НА СИНТЕЗ БЕЛКА В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ ИЗ КЛЕТОК КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ранее нами было определено, что в процессе криоконсервации и деконсервации щитовидной железы белоксинтезирующая активность существенно не меняется [1]. Известно, что ТТГ модулирует синтез тиреоглобулина (ТГ) в культивируемых клетках щитовидной железы [4], регулируя уровень тиреоглобулиновой мРНК в цитоплазме и ядре [5]. Представляло интерес выяснить, подвергаются ли влиянию ТТГ клетки криоконсервированной щитовидной железы. В связи с этим задачей настоящего исследования явилось изучение влияния ТТГ на активность белоксинтезирующей системы клеток контрольной и криоконсервированной щитовидной железы.

Криоконсервированию подвергали щитовидные железы людей, удаленные при хирургическом лечении диффузного токсического зоба. Криоконсервирование проводилось по методу, разработанному в Институте проблем

криобиологии и криомедицины АН УССР [3]. После удаления железы разрезались на пластинки длиной 3—4 см, шириной 1 см, высотой 2—3 мм. Кусочки железы погружали в раствор 10 %-ного димексида. Контролем служила незамороженная ткань диффузного токсического зоба людей.

Об интенсивности биосинтеза белков щитовидной железы судили по уровню включения меченых аминокислот в белки щитовидной железы. Компоненты белоксинтезирующего аппарата (рибосомы, белковые факторы трансляции, тРНК и аминоацил-тРНК-синтетазы) вносили в систему в виде фракции, полученной центрифугированием гомогената клеток при 30000g в течение 10 мин (фракция S_{30}). Для удаления аминокислот фракцию S_{30} непосредственно перед добавлением в систему пропускали через колонку с сефадексом Г-25. Концентрация фракции S_{30} в системе составляла 20 ед. D_{260} на 1 мл. Стандартная реакционная смесь содержала (мкмоль/мл): АТФ — 0,5, ГТФ — 0,05, фосфонолпируват — 10, β -меркаптоэтанол — 0,5, $MgCl_2$ — 15; KCl — 70, *трис*-HCl (pH 7,8) — 50, пируваткиназу — 16 мкг. Смесь аминокислот (0,03 мкмоль/мл) состояла из 13 равномерно меченных ^{14}C -аминокислот и 7 немеченых аминокислот. ТТГ (0,1 м ед.) добавляли непосредственно в инкубационную смесь. Бесклеточную систему инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливали быстрым охлаждением и добавлением равного объема 10 % ТХУ, содержащей 0,1 % гидролизата лактальбумина. Контролем служили пробы, которые не подвергались инкубации. Через 18 ч пробы центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин. Осадки суспендировали в 5 % ТХУ, прогревали в течение 15 мин при 90 °С для гидролиза аминоацил-тРНК. После центрифугирования осадки суспендировали в 5 % ТХУ и переносили на нитроцеллюлозные ультрафильтры «Руфс» (Чехословакия) и отмывали 60 мл 5 % ТХУ. Радиоактивность измеряли в жидкостном сцинтилляторе (4 г РРО, 0,2 г РРОР на 1 л толуола) на счетчике «Марк-3». Статистическую обработку результатов исследований проводили по Ойвину [2].

Включение ^{14}C -аминокислот в S_{30} бесклеточной системе из клеток щитовидной железы, имп/мин

Вариант опыта	Диффузный токсический зоб ($n = 4$)	Криоконсервированная тиреотоксически измененная ткань щитовидной железы ($n = 8$)
$S_{30} + ^{14}C$ -аминокислоты (0^1)	40 ± 16	39 ± 12
$S_{30} + ^{14}C$ -аминокислоты (60^1)	$1416 \pm 94, p_{1-2} < 0,001$	$1198 \pm 87, p_{1-2} < 0,001$
$S_{30} + ^{14}C$ -аминокислоты + ТТГ (60^1)	$2258 \pm 118, p_{2-3} < 0,001$	$1670 \pm 102, p_{2-3} < 0,001$

Примечание. Приведены средние данные 4—6 определений для каждого случая.

В таблице представлены данные включения ^{14}C -аминокислот в S_{30} бесклеточной системе из клеток щитовидной железы. Из данных таблицы следует, что в клетках криоконсервированной щитовидной железы больных диффузным токсическим зобом ТТГ стимулирует включение ^{14}C -аминокислот на 37,4 %. По мнению Тоста и соавторов [4], происходит двукратное увеличение концентрации цитоплазматической ТГ мРНК ядерных РНК при введении тиреотропного гормона, влияние тиреотропина сказывается на посттранскрипционном уровне, и, возможно, связано со стабилизацией молекул зрелой тиреоглобулиновой мРНК. По-видимому, и в бесклеточной системе из клеток криоконсервированной железы стимулирующий эффект ТТГ обусловлен его действием на посттрансляционном уровне, вероятно, в клетках криоконсервированной щитовидной железы сохраняются механизм посттрансляционного биосинтеза белков и чувствительность к ТТГ.

1. Туракулов Я. Х., Атаханова Б. А., Кадырова Д. А., Исмаилов С. И. Биосинтез тиреоглобулина и содержание тиреоглобулиновых полирибосом в клетках криоконсервированной щитовидной железы // Криобиология. — 1985. — № 2. — С. 23—25.

2. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментального исследования // Патол. физиология и эксперим. терапия.— 1960.— № 6.— С. 76—78.
3. А. с. 935050 СССР, МКИ³ А 01 N 1/02. Способ консервирования щитовидной железы / Н. С. Пушкар, А. М. Утевский, В. А. Чуйко и др. — Опубл. 15.06.82. Бюл. № 22.
4. Tosta Z., Chabaud O., Chebath J. Identification of thyroglobulin mRNA sequences in the nuclear and the cytoplasm of cultured thyroid cells : a posttranscriptional effect of thyrotropin // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 1983.— 116, N 1.— P. 54—61.
5. Sherwin J. R., Tong W. Stimulatory actions of thyrotropin and dibutyl cyclic AMP on transcription and translation in the regulation of thyroidal protein synthesis // Biochim. et biophys. acta.— 1976.— 425, N 4.— P. 502—510.

Ин-т биохимии АН УзССР,
г. Ташкент

Поступила 12.11.85

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043 : 577.217

Ю. Е. Микулинский, А. О. Котляров, А. А. Цуцаева

ИНДУКЦИЯ СИНТЕЗА БЕЛКОВ, ПОДОБНЫХ БЕЛКАМ ТЕПЛОВОГО ШОКА, У *E. coli* ПОД ВЛИЯНИЕМ ХОЛОДОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Под влиянием низкотемпературного консервирования в клетках про- и эукариотов изменяется интенсивность синтеза белков, что связано с индукцией летальных и нелетальных повреждений в клетках. Однако после низкотемпературной консервации белковый спектр не изучался, хотя описана индукция синтеза определенных белков в клетках под влиянием теплового шока и некоторых химических соединений [1]. Целью настоящей работы было определение качественного состава белков, синтезируемых клеткой после криовоздействия.

Исследования проводили на бактериях *E. coli*, штамм MRE-600, в среде М9. Холодовый шок (ХШ) вызывали быстрым охлаждением бактерий до 0 °С и выдерживанием при данной температуре в течение 20 мин. Замораживание бактериальных клеток проводили со скоростями 40 и 400 °С/мин до —196 °С. Тепловой шок (ТШ) вызывали выдерживанием бактерий при температуре 42 °С в течение 20 мин. Сразу же после описанных воздействий в культуру клеток (10⁷ клеток/мл вносили ¹⁴С-лейцин (8880 МБк/ммоль) по 2 мкКи на пробу и исследовали качественный состав синтезированных белков в интервалах 0—15, 15—30, 30—45 мин при 37 °С. По истечении 15 мин экспозиции включение метки останавливалось добавлением 100-кратного избытка немеченого лейцина. Из образцов отбирали аликвоты и проводили их обработку на нитроцеллюлозных фильтрах. Радиоактивность образцов определяли в толуоловом сцинтилляторе на β-счетчике Бекман LS7800. Клетки *E. coli* разрушали путем кипячения в течение 3 мин в 1 %-ном растворе додецилсульфата натрия, и полученные образцы анализировали методом слаб-электрофореза в 12,5 % ПААГ по методу Лэмли [2]. После фиксации, окрашивания кумасси-G-250 и отмывки 7 %-ной уксусной кислотой гель импрегнировали PPO и высушивали на бумаге. Флюорографию проводили на пленке РМ-1 (инкубация 2 недели при —20 °С).

Установлено, что после низкотемпературного воздействия, ХШ и ТШ на окрашенных пластинках геля не отмечалось качественных и количественных различий в белковом спектре клеток. Однако на флюорограммах белков бактерий под влиянием замораживания со скоростями 400 и 40 °С/мин в процессе инкубации в интервале 15—45 мин появлялся интенсивно меченный белок с молекулярной массой около 90—100 кД. При ХШ интенсивно меченная фракция данного белка появлялась уже в ранние сроки инкубации (0—15 мин) и сохранялась в течение всего периода наблюдения, однако по мере пролонгации сроков культивирования (30—45 мин) отмечалась некоторая тенденция к снижению уровня синтеза этого белка. При сопоставлении флюорограмм белков *E. coli*, подвергнутых низкотемпературному воздействию, ХШ, и флюорограмм белков бактерий после ТШ можно отметить, что происходила активация синтеза одной и той же белковой фракции (90—100 кД).

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что после низкотемпературного воздействия и ХШ в клетках *E. coli* начинается синтез белков, сходных с бел-

ками, появляющимися в клетках после ТШ, хотя динамика синтеза данных белков несколько различна. Полученные данные позволяют предположить, что клетка обладает универсальными механизмами ответа на стрессовые воздействия внешних факторов, в том числе холодовых.

1. Лозовская Е. Р., Евгеньев М. Б. Тепловой шок у дрозофилы и регуляция активности генома // Итоги науки и техники: Молекулярная биология.— М.: ВИНТИ, 1984.— 20,— С. 142—179.
2. Остерман Л. А.— Разделение белков по размеру // Методы исследования белков и нуклеиновых кислот.— М.: Наука, 1981.— С. 56—66.

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

Поступила 22.01.87

ХРОНИКА

КООРДИНАЦИОННОЕ СОВЕЩАНИЕ ПО ВОПРОСАМ ЗИМОСТОЙКОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

В Киеве проведено совещание членов секции «Зимостойкость сельскохозяйственных растений» (председатель заслуженный деятель науки, профессор М. А. Соловьева) проблемного совета «Криобиология и криомедицина» АН УССР, посвященное обсуждению итогов исследований, выполненных в различных регионах страны, и утверждению плана коллективных исследований по проблеме зимостойкости растений на XII пятилетку. В числе участников совещания были ведущие специалисты из 16 научно-исследовательских институтов Москвы, Киева, Харькова, Еревана, Барнаула, Кишинева, Мироновки и других учреждений. В заслушанных сообщениях приводились результаты теоретических исследований природы зимостойкости и практических разработок, направленных на повышение устойчивости растений к холоду. Важные вопросы были подняты в сообщениях чл.-кор. АН УССР Ю. Ю. Глебы «Генетическая инженерия растений», Т. И. Труновой «О механизмах структурных и функциональных изменений в клетках растений, подвергшихся действию низких температур», М. А. Соловьевой «Изучение природы зимостойкости и характера регенерационных процессов у плодовых растений после повреждения холодом», Ю. П. Шалина «О методике подбора селекционного материала озимой пшеницы», М. И. Шраго «Криопротекторы в криоконсервировании биологических объектов растительного происхождения», К. С. Погосяна «Влияние высокоштамбовой формировки виноградного куста и условий выращивания на зимостойкость», Д. И. Тупицына «Особенности повреждения плодовых деревьев в европейских странах в зиму 1984/85 г.», Т. А. Побетовой «Сочетание метеорологических факторов и повреждаемость плодовых растений в разных районах страны», П. Я. Голодрыги «Теория и практика создания комплексноустойчивых сортов винограда». Роль фитопатогенных вирусов и бактерий в снижении морозоустойчивости растений была показана в докладах чл.-кор. ВАСХНИЛ В. Ф. Пересыпкина, П. Е. Бондаренко, Р. И. Гвоздяка. В. М. Бурдасов остановился на особенностях формирования зимостойкости в условиях Сибири и предложил схему прогнозируемой технологии селекционного процесса выращивания растений. Участники совещания уделили внимание обсуждению методов определения степени и характера повреждения растений морозами, а также вопросам применения защитных средств, предупреждающих появление солнечных ожогов, и специальных замазок для заживления ран плодовых растений (Г. П. Биличенко, О. И. Китаев, В. В. Грохольский). С докладами о структурно-функциональных изменениях в растениях в связи с морозоустойчивостью выступили А. М. Силаева, В. П. Дмитренко, А. В. Брайон, Е. К. Белецкая, В. Д. Мануильский. В рекомендациях, принятых участниками совещания, отмечена актуальность изучения научной проблемы зимостойкости сельскохозяйственных растений и определены основные направления ее разработки. К ним отнесены: изучение природы устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды и исследования адаптационных и репаративных процессов; разработка и совершенствование экспресс-методов оценки зимостойкости, прогнозирования эффекта перезимовки для картирования территории УССР; совершенствование приемов защиты растений и плодов, основанных на использовании криопротекторов и других биологически активных веществ; комплексное изучение генофонда новых и перспективных сортов сельскохозяйственных культур с целью оценки их зимостойкости для правильного районирования.

О. И. Китаев

Состоялось заседание координационного совета по проблеме «Разработка методов биоинженерии в животноводстве для совершенствования продуктивных и технологических качеств сельскохозяйственных животных». Обсуждались вопросы культивирования, хранения и использования животных клеток, внедрения достижений клеточной и генной инженерии, получения, хранения и использования репродуктивных клеток и эмбрионов, а также микробной биотехнологии. Большое внимание уделялось проблеме разработки цитогенетических и молекулярно-генетических методов оценки и изменения генотипов сельскохозяйственных животных, методов оценки животных по гормональному статусу с целью создания высокопродуктивных животных, способов стимуляции роста и повышения сохранности животных на ранней стадии развития с использованием продуктов генной инженерии. В работах по указанным проблемам принимает участие 39 научно-исследовательских институтов из стран СЭВ. Создан Московский сельскохозяйственный биотехнологический центр, в состав которого включено 11 институтов СССР и 2 института ГДР. В числе проблем, которыми занимается центр,— трансплантация эмбрионов, их криоконсервация, клеточная и генная инженерия. Созданы советско-чехословацкая и советско-болгарская лаборатории для исследования вопросов биотехнологии. Задачи биотехнологии и криобиологии тесно переплетаются. Их выполнение становится реальным в рамках сотрудничества стран СЭВ.

Ф. В. Дахно

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР защищены диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. В работе Т. Ф. Морозовой «Влияние низких температур и криопротекторов на структурные и функциональные характеристики миозина» показано, что при отогреве замороженных водно-солевых растворов миозина от -196 до 0°C наблюдаются многоступенчатые сдвиги положения спектра и изменение наклона кривой температурного тушения интенсивности флуоресценции белка. И. А. Налетов в диссертации «Действие низких температур на физико-химические свойства мышечной ткани рыбы» установил, что увеличение скорости замораживания от $0,1$ до $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ снижает уровень конформационных изменений актомиозина и высокополимерной ДНК. В. К. Мазалов в исследовании «Механизм действия криопротекторов ряда полиэтиленоксидов при холодовом и механическом воздействии на головной мозг» показал, что ПЭО могут быть испытаны в клинике как лечебный препарат при травматическом отеке головного мозга, а также для подготовки больных к операциям в нейрохирургии. В работе О. В. Кудокоцевой «Влияние физико-химических факторов низкотемпературного консервирования на расы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*» исследован широкий диапазон скоростей замораживания на сохранность и морфофункциональные свойства дрожжей в зависимости от их генетических и фенотипических особенностей. Т. П. Линник в диссертации «Зависимость криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств» показала возможность математического прогнозирования новых криопротекторов, справедливость прогноза подтверждена экспериментально при криоконсервировании спермы петуха под защитой метилацетамида.

УДК 57.043

Повышение холодоустойчивости свободноживущих амёб при действии экзогенного липида / Калинина Л. В., Шляхтер Т. А., Круглова Э. Э. // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 4—7.

Изучена холодоустойчивость амёб, инкубировавшихся с униламеллярными липосомами из яичного лецитина и лецитина с холестерином. Показано, что после контакта с липосомами обоих типов выживаемость клеток повышалась до 60—80 % против 9—18 % в контроле и не зависела от времени (5 мин, 3 ч, 24 ч) и температуры эквilibрации (0 °С, 20 °С) амёб с липосомами. В липидном экстракте *Amoeba borokensis*, обработанных липосомами из лецитина, доля фосфатидилхолина возросла вдвое. Этим, по-видимому, и объясняется изменение холодоустойчивости амёб, обработанных липосомами. Табл. 1. Библиогр.: 8 назв.

УДК 612.621.38.014:57.043

Создание банка криоконсервированной овариальной ткани человека для аллогенных трансплантаций в акушерско-гинекологической практике / Грищенко В. И., Демина Л. Г., Чадаев В. Е., Лобынцева Г. С., Чуб Н. Н. // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 7—11.

Разработанный способ консервирования ткани яичника с использованием криопротекторов при сверхнизких температурах позволил создать банк всесторонне обследованной овариальной ткани с длительным сроком хранения. Аллогенные трансплантации криоконсервированной овариальной ткани, произведенные 159 пациенткам, явились эффективным методом немедикаментозного лечения гипоменструального синдрома и аменорей, посткастрационного и патологического климактерического синдромов, бесплодия. Ил. 1. Библиогр.: 8 назв.

УДК 577.37

Термодинамическая модель явления перераспределения мембранных компонентов в изотропно растянутом замкнутом бислое / Гордиенко Е. А. // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 11—15.

Путем вычисления свободной энергии замкнутой бислойной двухкомпонентной мембраны, подвергающейся растяжению, показано, что медленное оводнение везикулы может привести к латеральному разделению мембранных компонентов. Ил. 5. Библиогр.: 3 назв.

УДК 612.014.9:534.121.2

Исследование проницаемости мембран эритроцитов при замораживании — оттаивании в среде непроницающего и проникающего криопротектора / Гулевский А. К., Нардид О. А. // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 15—19.

Установлено, что замораживание—оттаивание эритроцитов донорской крови в растворе непроницающего криопротектора (0,13 М ПЭО молекулярной массы 1500, 0,5 М сахарозы) индуцирует образование трансмембранных дефектов, проницаемых для молекул Mn^{2+} и сахарозы. Ил. 3. Табл. 2. Библиогр.: 9 назв.

УДК 612.35.085.2:547.422

Структурная устойчивость гепатоцитов на этапах криоконсервации с 1,2-пропандиолом / Карева Л. В., Луговой В. И., Кравченко Л. П. // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 19—22.

Установлено, что изолированные гепатоциты чувствительны к действию низких температур и ресуспендирующим средам различного состава на этапах постконсервационного периода, в связи с чем необходим дальнейший поиск оптимальных температурных режимов и криоконсервирующих растворов для этих клеток. Табл. 3. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043:616.69—008.8

Влияние криоконсервирования на спермии человека в норме и при патологии / Парашук Ю. С., Скидан Н. П. // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 22—25.

В процессе криоконсервирования патологической спермы уменьшается подвижность репродуктивных клеток вследствие нарушения энергетических процессов, метаболизма и аутоиммунных реакций. Нормальные спермии менее чувствительны к повреждающему действию холода. Табл. 1. Библиогр.: 9 назв.

УДК 612.46:615.361.014.41

Повышение эффективности защитного действия криопротекторов на криоконсервированную почку с помощью предварительного введения фармакологических средств / Кирпатовский В. И. // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 25—31.

При криоконсервации изолированных почек введение ДМСО и α -токоферола уменьшало степень нарушения гидродинамических показателей и выход ЛДГ в перфузат после отогрева органа и его отмывания от криопротектора. С помощью предварительного введения фармакологических средств можно повысить эффективность защитного действия криопротекторов при криоконсервации органов. Ил. 3. Табл. 2. Библиогр.: 8 назв.

УДК 615.015:547.422

Криопротекторные свойства эфиров этиленгликолей при замораживании эритроцитов человека / Воротилин А. М., Мирошников А. М., Гучок В. М., Зинченко В. Д. // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 31—34.

Исследовано криозащитное действие простого монометилового эфира диэтиленгликоля и простых моноэтиловых эфиров моно-, ди- и триэтиленгликолей. Установлено, что метиловый и этиловый эфиры диэтиленгликоля обладают выраженными криозащитными свойствами. Ил. 1. Табл. 3. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043:577.352.26:547.426.1

Особенности взаимодействия глицерина с липидными бислоями, содержащими холестерин / Руденко С. В., Бондаренко В. А., Белоус А. М. // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 35—39.

Взаимодействие глицерина с плоскими липидными бислоями, состоящими из различных липидов и холестерина, приводит к значительным изменениям удельной электрической емкости и проводимости бислоев, которые зависят от состава бислоев, ионной силы среды и ее физико-химических свойств. Обсуждается механизм структурных перестроек липидного бислоя, согласно которому понижение полярности среды при добавлении глицерина приводит к ослаблению сил взаимодействия между липидами и появлению промежуточной небислоидной фазы, динамика образования которой определяет дальнейшее развитие структурных нарушений. Ил. 5. Библиогр.: 7 назв.

УДК 612.014.9:534.121.2

Сравнительная характеристика барьерных свойств эритроцитов в гипо- и гипертонических растворах солей / Рязанцев В. В. // Криобиология.— 1987.— № 3.— С. 39—41.

Исследовали проницаемость мембран эритроцитов в гипо- и гипертонических растворах NaCl или холинхлорида. Установлено, что в гипертонических растворах солей (до 0,06 М) происходит одновременное высвобождение K^+ и Hb из клеток, при увеличении концентрации соли в пределах 0,8—1,2 М наступает обратимое нарушение катионной проницаемости мембран эритроцитов, которое при дальнейшем повышении концентрации соли (до 3 М) сменяется гемолизом клеток. Ил. 3. Библиогр.: 3 назв.

УДК 612.826.4:615.832.9

Роль серотонинергических структур гипоталамуса в регуляции функции эндокринных органов при холодовом стрессе / Стабровский Е. М. // Кробиология. — 1987. — № 3. — С. 41—44.

В опытах на самцах белых крыс исследовалось влияние фармакологического разрушения серотонинергических терминалей гипоталамуса посредством внутрижелудочковой инъекции 5,6-окситриптамина на базальную и вызванную холодовым стрессом функциональную активность симпатико-адреналовой, гипофиз-тиреоидной и энтерохромаффинной систем. Установлено, что серотонинергические волокна гипоталамуса стимулируют функцию симпатико-адреналовой, гипофиз-адреналовой и энтерохромаффинной систем, но ингибируют функцию гипофиз-тиреоидной системы. Ил. 4. Библиогр.: 7 назв.

УДК 616.36—091.8:57.043:537.533.35

Влияние низких температур на ультраструктуру гепатоцитов кроликов при введении CCl_4 / Капрельянц А. С., Марченко Л. Н., Матяш И. П. // Кробиология. — 1987. — № 3. — С. 44—48.

Изучена ультраструктурная характеристика гепатоцитов кроликов в условиях длительного введения CCl_4 и действия низких температур. Выявлены положительные сдвиги в ультраструктуре гепатоцитов при течении деструктивных и дистрофических процессов, обусловленных токсическим эффектом CCl_4 , спустя 60 сут после локального охлаждения. В условиях данного эксперимента не выявлено значимых различий в реакции ультраструктурных компонентов клеток при замораживании одной и двух долей печени в течение 120 с. Ил. 2. Библиогр.: 9 назв.

УДК 612.44:615.361.014.41

Влияние тиреотропного гормона (ТТГ) на синтез белка в бесклеточной системе из клеток криоконсервированной щитовидной железы / Туракулов Я. Х., Атаханова Б. А., Кадырова Д. А., Исмаилов С. И. // Кробиология. — 1987. — № 3. — С. 45—50.

В бесклеточной системе из клеток криоконсервированной щитовидной железы ТТГ оказывает стимулирующее действие на посттрансляционном уровне. Вероятно, в клетках сохраняются механизм посттрансляционного биосинтеза белков и чувствительность к ТТГ. Табл. 1. Библиогр.: 5 назв.

UDC 57.043

Increasing the cold tolerance of freely living amoebae by exogenous lipid / Kalinina L. V., Shlyakhter T. A., Kruglova E. E. // Kriobiologiya. — 1987. — N 3. — P. 4—7.

The cold resistance of amoebae incubated with unilamellar egg lecithin or lecithin-cholesterol liposomes was studied. Survival of cells contacted with the liposomes has been shown to increase to 60—80 % versus 9—18 % in control cells and to be independent of the equilibration time (5 min, 3 and 24 hrs) and temperature (0 °C, 20 °C). In the lipid extract of *Amoeba borokensis* treated with lecithin liposomes, the fraction of phosphatidilcholine increased by two-fold. This is probably responsible for changing the cold tolerance of amoebae treated with liposomes. 1 table. Refs.: 8 titles

UDC 612.621.38.014:57.043

Creation of bank of human cryopreserved ovarian tissue for allografting in obstetrics and gynecology / Grishchenko V. I., Demina L. G., Chadayev V. E., Lobyntseva G. S., Chub N. N. // Kriobiologiya. — 1987. — N 3. — P. 7—11.

A method has been developed of ovarian tissue cryopreservation using cryoprotectants and ultralow temperatures which allowed to create a bank of comprehensively examined ovarian tissue for long-term storage. Allogenic transplantations of cryopreserved ovarian tissue performed in 159 patients appeared to be an effective method of non-medicamental treatment of patients with hypomenstrual syndrome and amenorrhea as well as postcastration and pathologic climacteric syndromes and infertility. 1 fig. Refs.: 8 titles

UDC 577.37

A thermodynamic model of the phenomenon of redistribution of membrane components in isotropically stretched closed bilayers / Gordiyenko E. A. // Kriobiologiya.— 1987.— N 3.— P. 11—15.

Calculations of free energy of a closed two-component bilayer membrane subjected to stretching demonstrated that slow hydration of the vesicle can result in lateral separation of membrane components. 5 figs. Refs.: 3 titles

UDC 612.014.9:534.121.2

The investigation of permeability of erythrocyte membranes frozen-thawed in media of non-permeable and permeable cryoprotectants / Gulevsky A. K., Nardid O. A. // Kriobiologiya.— 1987.— N 3.— P. 15—19.

Freeze-thawing of donor erythrocytes in a solution of non-permeable cryoprotectant (0.13 M PEO of molecular weight 1500 and 0.5 M sucrose) was found to induce formation of transmembrane defects permeable for molecules of Mn^{+2} and sucrose. 3 figs. 2 tables. Refs.: 9 titles

UDC 612.35.085.2:547.422

Structural stability of hepatocytes during cryopreservation with 1,2-propanediol / Kareva L. V., Lugovoj V. I., Kravchenko L. P. // Kriobiologiya.— 1987.— N 3.— P. 19—22.

Isolated hepatocytes were found to be sensitive to low temperatures and resuspending media of different composition at the stages of postpreservation period. Further research of optimal temperature regimens and cryoprotective solutions for these cells is recommended. 3 tables. Refs.: 6 titles

UDC 57.043:616.69—008.8

The effect of cryopreservation on normal and pathologic human spermatozoa / Parashchuk Yu. S., Skidan N. P. // Kriobiologiya.— 1987.— N 3.— P. 22—25.

During cryopreservation of pathologic sperm a decrease in the mobility of reproductive cells was observed as a result of changing energy processes, metabolism and autoimmune reactions. Normal spermatozoa appeared to be less sensitive to cryoinjury. 1 table. Refs.: 9 titles

UDC 612.46:615.361.014.41

Increasing the cryoprotective effect of cryoprotectants on cryopreserved kidneys by pharmacologic pretreatment / Kirpatovsky V. I. // Kriobiologiya.— 1987.— N 3.— P. 25—31.

Administration of DMSO and α -tocopherol upon kidney cryopreservation decreased changes in hypodynamic parameters and LDH release into the perfusate after thawing and cryoprotectant removal. Pharmacologic pretreatment can increase the protective efficiency of cryoprotectants during organ cryopreservation. 3 figs. 2 tables. Refs.: 8 titles

UDC 615.015:547.422

Cryoprotective properties of ethylene glycol ethers during freezing of human erythrocytes / Vorotilin A. M., Miroshnikov A. M., Guchok V. M., Zinchenko V. D. // Kriobiologiya.— 1987.— N 3.— P. 31—34.

Cryoprotective actions of simple monomethyl ether of diethylene glycol and simple monoethyl ethers of mono-, di- and triethylene glycols were studied. Methyl and ethyl ethers of diethylene glycol were found to possess good cryoprotective properties. 1 fig. 3 tables. Refs.: 7 titles

UDC 57.043:577.352.26:547.426.1

Peculiarities of the interaction between glycerol and lipid bilayers containing cholesterol / Rudenko S. V., Bondarenko V. A., Belous A. M. // Kriobiologiya.— 1987.— N 3.— P. 35—39.

The interaction of glycerol with lipid bilayers consisting of different lipids and cholesterol was found to lead to significant changes in the capacity and conductivity which depended on the bilayer composition, medium ionic strength and physico-chemical properties. A mechanism of structural alterations in the lipid bilayer is discussed, according to which a decrease in the medium polarity by added glycerol results in weakening interaction forces between lipids and in the appearance of interstitial non-bilayer phase whose formation dynamics determined further development of structural changes. 5 figs. Refs.: 7 titles

UDC 612.014.9:534.121.2

The comparative investigation of erythrocyte barrier properties in hypo- and hypertonic salt solutions / Rysantsev V. V. // Kriobiologiya.— 1987.— N 3.— P. 39—41.

The permeability of erythrocyte membranes was studied in hypo- and hypertonic NaCl and choline chloride solutions. Simultaneous release of K^+ and Hb from cells was found in hypotonic (to 0.06 M) salt solutions, salt concentrations in a range of 0.8 to 1.2 M induced reversible changes in the permeability of erythrocyte membranes for cations. Further increasing the salt concentration (to 3 M) caused hemolysis. 3 figs. Refs.: 3 titles

UDC 612.826.4:615.832.9

Role of serotonergic structures of hypothalamus in the regulation of endocrine organ functions under cold stress / Stabrovsky E. M. // Kriobiologiya.— 1987.— N 3.— P. 41—44.

In the experiments on male white rats we studied the effect of pharmacologic destruction of hypothalamus serotonergic terminals by intraventricular administration of 5,6-oxytryptamine on the basal and cold stress induced functional activities of sympathico-adrenal, hypophys-thyroid and enterochromaffin systems. Hypothalamus serotonergic fibers were found to stimulate functions of sympathico-adrenal, hypophys-adrenal and enterochromaffin systems and to inhibit the function of hypophys-thyroid system. 4 figs. Refs.: 7 titles

UDC 616.36—091.8:57.043:537.533.35

The effect of low temperatures on the ultrastructure of rabbit hepatocytes after injection of CCl_4 / Kaprelyants A. S., Marchenko L. N., Matyash I. P. // Kriobiologiya.— 1987.— N 3.— P. 44—48.

The ultrastructure of rabbit hepatocytes was studied under conditions of long-term administration of CCl_4 and low temperatures. Positive changes in ultrastructural transformations during destructive and degenerative processes induced by the toxic effect of CCl_4 , 60 days after local cooling, have been demonstrated. No significant changes in the reaction of ultrastructural cell components were found upon freezing of one and two lobes of liver during 120 s. 2 figs. Refs.: 9 titles

UDC 612.44:615.361.014.41

The effect of thyrotropic hormone (TTH) on the protein synthesis in a cell free system of thyroid cells / Turakulov Ya. Kh., Atakhanova B. A., Kadyrova D. A., Ismailov S. I. // Kriobiologiya.— 1987.— N 3.— P. 45—48.

It has been found that TTH exerts a stimulation effect at the posttranslation level in a cell free system of thyroid cells. Probably, the mechanism of posttranslation protein synthesis and sensitivity to TTH are preserved in the cells. 1 table. Refs.: 5 titles

В г. Харькове на базе Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в феврале 1988 г. в соответствии с решением секретариата ЮНЕСКО будет проведено международное совещание «Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины».

Заявки для участия в совещании направлять по адресу:
310015 Харьков, 15, ул. Переяславская, 23,
Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР,
Оргкомитет международного совещания

Проводится подписка на 1988 год на всесоюзный научно-теоретический журнал «Криобиология». В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

Периодичность — 4 номера в год. Подписная цена: на 3 мес. — 65 к., на 6 мес. — 1 р. 30 к., на 12 мес. — 2 р. 60 к.

Подписка принимается в агентствах и отделениях «Союзпечать», отделениях связи и общественными распространителями печати.