

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

2|85



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

EDITORIAL BOARD

Grischenko V.I. (Editor-in-Chief), Belous A.M. (Associated Editor),
Blagoj Yu.P., Brazhnikov A.M., Butenko R.G., Veprin'sev B.N.,
Goldansky V.I., Lugovoj V.I., Ostashko F.I., Pankov E.Ya.,
Piruzyan L.A., Pushkar N.S., Sandomirsky B. P., Snurnikov A.S.,
Sytnik K.M., Utevsky A.M., Fedotenkov A.G., Tsutsayeva A.A.,
Shumakov V.I., Yurchenko T.N.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

EDITORIAL COUNCIL

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

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

2 1985

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1985

СОДЕРЖАНИЕ

- Прокопов В. Е. Ради мира, жизни на земле 3
- Сытник К. М., Мануильский В. Д. Криорезистентность мембран и вопросы консервации растений 5
- Иваницкий Г. Р. Биофизический подход к анализу криопроцессов 12
- Цуцаева А. А. Проблемы криоиммунологии 18
- Туракулов Я. Х., Атаханова Б. А., Кадырова Д. А., Исмаилов С. И. Биосинтез тиреоглобулина и содержание тиреоглобулиновых полирибосом в клетках криоконсервированной щитовидной железы . . . 23
- Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бабийчук Л. А., Бондаренко Т. П., Бойко Н. М. Единый механизм повреждения клетки при гермальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе 25
- Гусева Н. Р., Луговой В. И. Влияние состава ресуспенсирующих сред на сохранность размороженных эритроцитов при $+4^{\circ}\text{C}$ 32

CONTENTS

- Prokopov V. E. For the sake of peace and life on the Earth 3
- Sytnik K. M., Manuilsky V. D. Membrane cryoresistance and problems of plant preservation 5
- Ivanitsky G. R. Biophysical approaches to analysis of cryoprocesses 12
- Tsutsayeva A. A. Problems in cryoimmunology 18
- Turakulov Ya. Kh., Atakhanova B. A., Kadyrova D. A., Ismailov S. I. Biosynthesis of thyroglobulin and content of thyroglobulin polyribosomes in cryopreserved thyroid cells 23
- Belous A. M., Bondarenko V. A., Bab'y-chuk L. A., Bondarenko T. P., Boyko N. M. The common mechanism of damage of cells subjected to thermal shock, freezing and posthypertonic lysis 25
- Guseva N. P., Lugovoy V. I. Effect of resuspension medium composition on the stability of thawed red blood cells at $+4^{\circ}\text{C}$ 32

This One



5GHD-2KW-AQ46 авторским правом

<i>Чуйко В. А.</i> Модуляция низкими температурами и ДМСО биохимических процессов в щитовидной железе	38	<i>Chuyko V. A.</i> The modulation of biochemical processes in the thyroid gland by low temperatures and DMSO	38
<i>Бабийчук Г. А., Марченко В. С., Шифман М. И.</i> Роль норадренергической системы в сверхмедленных процессах головного мозга при краниocereбральной гипотермии	43	<i>Babiychuk G. A., Marchenko V. S., Shifman M. I.</i> The role of noradrenergic system in the superslow processes in brain during craniocerebral hypothermia	43
<i>Наука В. А.</i> Структурные и биохимические криповреждения биомембран гамет самцов сельскохозяйственных животных	47	<i>Nauk V. A.</i> , Structural and biochemical cryodamage of gamete biomembranes in farm animal males	47
<i>Панченко Н. И., Сулло К. М., Чжон Люси Чек</i> Влияние температуры и времени хранения плазмы крови человека на некоторые показатели системы фибринолиза	50	<i>Panchenko N. I., Sullo K. M. John Lucy Chek.</i> The effect of temperature and time of storage on some indices of the fibrinolytic system of human blood plasma	50
<i>Сандомирский Б. П.</i> Рецензия. Handbook of Cryosurgery, ed. by R. J. Ablin, 1982, 428 p	53	<i>Sandomirsky B. P.</i> Review. Handbook of Cryosurgery, ed. by R. J. Ablin, 1982, 428 p.	53
<u>Рефераты</u>	<u>53</u>	<u>Abstracts</u>	<u>53</u>

КРИОБИОЛОГИЯ № 2 1985

Адрес редакции:
310015, г. Харьков, 15
ул. Переяславская, 23
Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Ответственный секретарь редакции
Ф. А. Приходько

Технический редактор В. Я. Козинченко

Сдано в набор 25.02.85. Подписано в печать 08.04.85.
БЦ 16729. Формат 70×108/16. Выс. печ. Усл.-печ. л. 7.
Усл. кр.-отт. 5,4. Уч.-изд. л. 5,6. Тираж 1000 экз.
Заказ № 5-1100. Цена 65 коп.

Издательство «Наукова думка», 252601
Киев, ГСП, Репина, 3.

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики
им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типогра-
фии № 16. Университетская, 16, Зак. 693.

В. Е. Прокопов**РАДИ МИРА, ЖИЗНИ НА ЗЕМЛЕ**

На огромных пространствах 1418 дней и ночей сражался наш народ за свою советскую Родину. Великая Отечественная война стала одним из суровейших испытаний жизненности социалистического строя. Всесторонней проверке было подвергнуто все то, что с таким великим трудом, ценой огромного напряжения было создано советским народом под руководством коммунистической партии. Поистине боевое крещение прошли все социальные институты, все сферы материальной и духовной жизни нашего общества. На советско-германском фронте происходила жесточайшая бескомпромиссная классовая борьба между молодыми силами социализма и системой капитализма.

Коммунистическая партия возглавила борьбу советского народа для защиты социалистической Родины. В центре было указание Ленина: «Раз война оказалась неизбежной,— все для войны». Партия обратилась к народу с призывом: «Все для фронта! Все для победы!» Главной заботой стали вооруженные силы и военная экономика.

За годы войны в партию вступило более 5 млн человек. Почти 60 % всего ее состава находилось на переднем крае вооруженной борьбы с фашизмом. Коммунисты и комсомольцы в годы войны проявили подлинный героизм, они составили около половины награжденных орденами и медалями страны, 86 % Героев Советского Союза. В боях с врагом смертью храбрых пало более 3 млн. коммунистов. Своим личным примером они поднимали на борьбу весь советский народ.

Тыл и фронт стали едиными. Бойцы беззаветно сражались, более 7 млн из них награждены, 11603 воина свыше 100 национальностей и народностей страны удостоены звания Героя Советского Союза; массовый героизм проявили целые воинские части, боевыми орденами отмечено 10900 дивизий и полков, звания гвардейских присвоено 17 армиям, 80 корпусам, 211 дивизиям. Миллионы женщин, стариков, подростков ковали оружие, готовили снаряжение, посылали на фронты питание и одежду.

Строгий экзамен держала и молодая советская наука. Вопрос стоял очень остро. Сумеет ли она принять вызов, брошенный нашей стране фашистами, которые опирались на новейшие научные и технические достижения чуть ли не всей Европы? Ответ известен: не только сумела, но и вышла победительницей.

В соответствии с указаниями ЦК партии в августе—сентябре 1941 г. Академия наук СССР определила ведущие направления научной работы в условиях военного времени. В их основу были положены совершенствование военной техники и создание новых средств борьбы с врагом, научная помощь промышленности в освоении и совершенствовании военного производства, мобилизации сырьевых ресурсов страны, замена дефицитных материалов местным сырьем. Для оперативного решения вопросов военного производства и оказания ему научно-технической помощи в Академии наук СССР создавались специальные комиссии, комитеты и другие организации. Проведение

в жизнь заданий, связанных с обороной, осуществлял отдел специальных работ во главе с крупным ученым академиком М. А. Садовским. Президент Академии наук СССР академик В. Л. Комаров возглавил комиссию по мобилизации ресурсов Урала, деятельность которой в дальнейшем распространилась на Западную Сибирь и Казахстан. Вице-президент АН СССР академик Е. А. Чудаков стал во главе комиссии по мобилизации ресурсов Поволжья и Прикамья на нужды обороны. Вице-президент АН СССР академик А. Ф. Иоффе возглавил организованные Президиумом АН СССР комиссию по научно-техническим военно-морским вопросам и военно-инженерную комиссию, академик Н. Г. Бруевич — комиссию по авиации, вице-президент АН СССР академик Л. А. Орбели — военно-санитарную комиссию и комиссию по пищевым ресурсам.

В огне сражений находились врачи и санитары, они выносили из поля боя раненых, лечили их. Многие тысячи патриотов ухаживали за больными и ранеными в тыловых госпиталях. Пять с половиной миллионов доноров дали фронту 1,7 миллиона литров крови и помогли спасти жизнь тысячам и тысячам раненых бойцов. М. И. Калинин, вручая Н. Н. Бурденко золотую медаль «Серп и молот» и орден Ленина, сказал, что медицинское обслуживание нашей армии стоит в одном ряду с авиационным и артиллерийским обеспечением. На переднем крае борьбы против ненавистного врага находилась вся советская наука, почетное место в этой битве принадлежит советской хирургической школе. Самоотверженная, неутомимая работа медицинского состава Советской Армии, основанная на передовых достижениях науки, позволила добиться высоких результатов в лечении советских воинов. За годы войны в строй было возвращено 72,3 % раненых и 90,6 % больных солдат и офицеров.

С невиданной жестокостью мстил нам враг за то, что мы советские. Убивал, истязал, жег, разрушал. Но выстояли. Враг был изгнан, разгромлен. 20 миллионов советских граждан за победу отдали самое дорогое — жизнь. Народ отстоял свой советский социалистический строй, возможность свободно строить, растить детей. Наши Вооруженные Силы от фашистской чумы освободили полностью или частично 12 стран с населением 183 млн человек.

А после завершения Великой Отечественной войны, в результате которой был нанесен огромный ущерб, пришлось из пепла и руин восстанавливать сотни городов, тысячи предприятий, десятки тысяч сел. Раненые лежали в госпиталях, поэтому для многочисленной армии медиков еще долго продолжалась война. Боль утрат и поныне жива в каждой семье.

И какой же исполинский дух нашего многонационального народа! Выстоял. Победил. Недужных лечил. Восстановил разрушенное. Построил новое. Во много крат усилил свою экономическую и военную мощь. Да, усилил свою мощь. Чтобы никому впредь не повадно было поднять свой меч против нас. Да, идем по пути прогресса на радость всем миролюбивым народам.

Ради мира воевали, умирали ради жизни на земле.

Мрачные силы реакции нашу мощь истолковывают как угрозу. Беззастенчиво лгут. Чтобы отвлечь внимание, усыпить бдительность живущих на планете. Предельно накалили международную обстановку, поставили мир на грань термоядерной катастрофы.

Наша цель — разоружение, созидание. За это боремся мы. Вместе с нами люди доброй воли всех стран и континентов. Все более мощным становится голос миролюбивых сил: дружить народам, учиться этому у советских людей, устранить опасность войны.

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

Поступила 19.02 1985

К. М. Сытник, В. Д. Мануильский

КРИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ МЕМБРАН И ВОПРОСЫ КОНСЕРВАЦИИ РАСТЕНИЙ

Растения, в отличие от других эукариот, находятся в особом положении, поскольку при действии тех или иных внешних факторов обладают значительно большими интервалами внутренней реорганизации. Это предполагает широкий спектр приспособительных реакций клеток, позволяющий им при определенных перестройках приобретать криорезистентность, т. е. устойчивость к замораживанию до ультранизких температур.

При формировании криорезистентности наряду со сложной системой неспецифических адаптивных реакций растительных клеток и процессами перехода организма в стадию «минимального роста» [1] особое значение приобретают перестройки водного обмена и уменьшение толерантности к стрессовым воздействиям, которые в данном случае резко снижают вероятность повреждения клеток в цикле замораживания — отогрева [2].

Исходя из общепринятого допущения о том, что повреждения клеток при замораживании — оттаивании являются результатом дестабилизации клеточных мембран, можно ожидать, что адаптация к низким температурам в первую очередь приведет к изменениям мембран. В таком случае необходимо рассматривать количественные и качественные их изменения у мембран адаптированных и неадаптированных тканей. Однако в настоящее время существуют причины, по которым этот подход не может оказаться достаточно корректным. В частности, исходя из данных о количественном и качественном составе мембран, довольно сложно судить о функциональной характеристике неповрежденной биологической мембраны. По всей вероятности, целесообразно установить, какие функциональные характеристики мембран нарушаются во время цикла замораживания — оттаивания, определить,

как этот цикл изменяет стабильность перечисленных параметров, а затем уже судить, изменяет ли адаптация к низким температурам состояние мембраны. При таком подходе интерпретация различий адаптированных и неадаптированных типов мембран становится более правильной.

В настоящее время существует несколько подходов для изучения влияния цикла замораживания — оттаивания на клеточные мембраны. Наиболее широко используется система изолированных мембран. Однако крупным недостатком этой системы является то, что не всегда (как, например, при выделении плазмалеммы) удается получить достаточно чистую фракцию мембран высших растений [3]. Более перспективной системой, позволяющей устранить проблему структурной организации ткани, являются изолированные протопласты. Но, работая с системой изолированных протопластов, невозможно исследовать влияние дегидратации на клеточные мембраны, поскольку обезвоживание протопластов осуществимо только в строго ограниченных интервалах влажности. Поэтому для конкретных исследований используются различные системы, а это в свою очередь затрудняет сопоставление результатов и анализ модификаций мембран при действии ультранизких температур.

В нашей работе на основании анализа данных, полученных несколькими методическими подходами, предпринята попытка выявления принципов формирования криорезистентности мембран у отличающихся по степени гидратации растительных клеток.

Наиболее четко выраженной криорезистентностью обладают семена, содержащие до 18—20 % воды, а также объекты (пыльца, меристемы проростков), которые при постепенной дегидратации не теряют жизнеспособность [4].

Имеющиеся в литературе сведения об ультраструктурной организации мембран растительных клеток, находящихся в состоянии органического или вынужденного покоя, когда метаболическая активность определяется обезвоживанием, немногочисленны и во многом противоречивы [5]. Основным методическим подходом, используемым в настоящее время при исследовании ультраструктурной организации дегидратированных тканей с помощью электронной микроскопии, является применение безводных методов фиксации. В этом случае исследования проводятся на объектах, содержащих не более 10 % воды, которые фиксируются насыщением в парах осмиевой кислоты либо замораживаются—скалываются, а затем сколы напыляют тяжелыми металлами. Обстоятельные результаты по этому вопросу приведены в работах Пернера [6] и Колсон [7], выполнявших исследования на эмбриональном корне гороха и меристеме зародышевого корня лука. Исходя из полученных данных, авторы выделили особенности организации мембран, характерные для дегидратированных тканей, обладающих повышенной устойчивостью к экстремальным и стрессовым воздействиям. Наиболее четко прослеживалась способность мембран к деформации, в результате чего между клеточной стенкой и протопластом, имеющими разную степень сжатия, образовывались электронно-прозрачные полости. Однако, несмотря на это, плазматесмы практически во всех случаях сохраняли свою целостность. Вероятно, и другие мембранные образования сохраняли свою структуру, поскольку при рассмотрении ядерной оболочки дегидратированных клеток удалось четко выявить поры и контакты с элементами эндоплазматического ретикулула.

В наших работах [8], а также в ряде публикаций [9, 10] показано, что на внутренней поверхности плазмалеммы расположены осмиофильные глобулы липидной природы, скопление которых типично для тканей в состоянии органического или вынужденного покоя. Участки «прикрепления» липидных глобул к внутренней поверхности плазмалеммы можно рассматривать как плотные контакты, характерные слиянием двух мембран, причем эти контакты при гидратации мембраны очень быстро нарушаются, и липидные глобулы смещаются внутрь цитоплазмы.

Поперечное сечение плазмалеммы в воздушно-сухих семенах составляло 150—160 Å. Сопоставление различий в размерах отдельных клеточных мембран, имеющих по литературным данным в активном физиологическом состоянии 250—300 Å, с данными, полученными на воздушно-сухих семенах, по всей вероятности, объясняются уменьшением внутримембранного пространства, что может свидетельствовать о наличии гидратированных компартментов в этих областях.

Важным свойством дегидратированных тканей, определяющим не только устойчивость к обезвоживанию, но и криорезистентность, является отсутствие электронно-прозрачных вакуолей, вместо которых в корневых меристемах семян встречаются белковые вакуоли [11].

Исследования дегидратированных в различной степени изолированных мембран, проведенные с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеивания [12], показывают, что при оводнении не ниже 20—25 % взаимодействия между отдельными компонентами мембран не отличаются от обычных для липид-белковых макромолекул. При снижении содержания воды происходят существенные перестройки структурной организации. Мембрана приобретает выраженные гидрофильные свойства, а вода находится в канальцах, которые пронизывают мембрану насквозь. Чем меньше воды в мембране, тем уже канальцы, причем авторы считают, что обезвоживание мало влияет на структуру мембранных белков.

Важным моментом дегидратации и регидратации мембраны является то, что фосфолипиды и белки мембраны спонтанно переходят из бислойной в глобулярную структуру [13], однако, как было показано при изучении выхода электролитов из тканей, проницаемость и ее селективность восстанавливается не сразу, в результате чего мембрана на первых этапах регидратации не полностью функциональна [14]. Такое явление, по-видимому, связано с выходом из мембраны отдельных, водорастворимых компонентов. Например, при обезвоживании из митохондриальных мембран могут исчезнуть ферментные комплексы, которые восстанавливаются только через несколько часов после оводнения. Изучение этого явления показало, что сохранение целостности мембраны при дегидратации требует специальных режимов обезвоживания, исключающих возможность

миграции отдельных компонентов мембран [5].

Другим объектом, не теряющим структурно-функциональную организацию в состоянии покоя при постепенной дегидратации, является пыльца растений. По своей природе эти клетки напоминают споры, а по строению цитоплазмы довольно близки к меристемам семян. Как правило, цитоплазма пыльцы обладает высокой электронно-оптической плотностью и при стандартной двойной фиксации глутаральдегидом и окисью осмия имеет интенсивно окрашенные мембраны. Такая картина наблюдается при высокой ненасыщенности липидов мембран [10]. Как и в меристематических клетках, в пыльце присутствуют мелкие вакуоли, а на плазмалемме расположен довольно плотный слой липидных глобул [15].

Рассмотрев ультраструктурную организацию мембран двух типов растительных объектов, дегидратация которых приводит к возникновению криорезистентности, можно отметить, что одной из основных особенностей этих структур является обратимость модификаций, вызванных обезвоживанием тканей. Такого рода эффекты невозможно объяснить только за счет изменения гидрофильности (или насыщенности) мембранных липидов или белков. По всей вероятности, в данном случае необходимо рассматривать систему, осуществляющую взаимодействия между плазмалеммой и цитоматриксом, влияние которого на структурно-функциональную организацию мембраны очень велика [16].

В настоящее время интенсивно обсуждается пространственная организация цитоплазматического матрикса в связи с исследованиями транспортных [17], сократительных [18] и ряда векторных [19] процессов. По представлениям этих авторов определяющую роль в поддержании формы клетки и организации клеточных движений играют так называемые немышечные сократительные системы — фибриллярные структурные белки цитоплазмы. Отсутствие на картинах ультраструктурной организации, полученных с помощью традиционных для электронной микроскопии методов фиксации материала таких белков, вызвано свойством эпоксидных смол рассеивать электроны, в результате чего эти образования практически неразличимы [20]. Однако использование в последних экспериментах высоковольтной элек-

тронной микроскопии дало возможность наблюдать фибриллярные структуры в кортикальном слое цитоплазмы, аналогичные выявленным с помощью растровой микроскопии [21]. Исходя из данных растровой электронной микроскопии, когда при постепенной дегидратации образца удается выявить белки цитоскелета, можно предположить, что аналогичные структуры определяют организацию кортикального слоя обезвоженных клеток и, вероятно, играют определенную роль в структурной организации плазмалеммы при дегидратации растительных клеток.

Наряду с описанными выше модификациями плазматических мембран в условиях жесткой дегидратации мы хотим остановиться на эффектах, связанных с возникновением криорезистентности при более высоких уровнях гидратации мембран. В наших экспериментах на примере тканей первичной коры яблони, находящихся в состоянии вынужденного покоя, а также переходящих к активному росту, т. е. в состоянии выраженной криорезистентности и при ее отсутствии, исследовались особенности ультраструктурной организации плазмалеммы [22].

В состоянии вынужденного покоя клетки камбиальной зоны, как правило, имели плазмалемму с немногочисленными инвагинациями, окружающими в некоторых случаях частицы вне протопласта. В кортикальном слое цитоплазмы встречались пузырьки различных размеров и конфигураций. Природа этих образований остается невыясненной, но вполне вероятно, что они могут представлять как эндо- или экзоцитозные образования, так и поперечные профили каналов плазмалеммальной природы. Не исключено также, что они могут являться малыми структурами вакуолярного компартмента. Каналы эндоплазматического ретикулума и плотные структуры аппарата Гольджи представлены образованиями, имеющими примерно равное поперечное сечение мембран и отличающимися только интенсивностью окрашивания. Вакуолярный компартмент состоял из небольших, гетерогенных по размерам образований.

Клетки паренхимы коры в состоянии вынужденного покоя в ряде крупных элементов вакуолярного компартмента имеют скопления осmioфильного вещества, которые по всей вероятности являются полифенолами [23]. Эндоплазматический ретикулум составлен из структур раз-

личных размеров, которые наблюдаются как в непосредственной близости от осмиофильных включений, так и в участках с меньшей электронной плотностью.

При выходе из состояния вынужденного покоя ультраструктурная организация клеток первичной коры яблони существенно менялась. Во-первых, в клетках камбиальной зоны происходила гиперплазия вакуолярного компартмента, что, вероятно, связано с селективной перестройкой основного вещества цитоплазмы. В этом случае поставщиком мембранного материала могут служить отдельные участки каналов эндоплазматического ретикулума или провакуоли. Одним из дополнительных источников вакуолей может служить постоянно рециклизирующаяся плазмалемма, косвенным доказательством чего является наличие большого числа везикулярных образований с ассиметрическим строением в кортикальном слое цитоплазмы.

Описанная ультраструктурная организация клеток первичной коры древесных в состоянии вынужденного покоя и при переходе к активному росту [22] в общем напоминает данные Степонкуса с соавторами [24], полученные при использовании структурно-функциональных изменений изолированных протопластов паренхимы листа *Secale cereale* L., адаптированных и неадаптированных к низким температурам. Широко используемый метод криовидеомикроскопии изолированных протопластов позволил авторам непосредственно наблюдать влияние адаптации к низким температурам на образование внутриклеточного льда. Кроме того прямые измерения формы протопластов позволили упростить расчеты диффузионной проницаемости плазмалеммы для воды и четко установить возникновение переохлаждения. Исходя из своих экспериментов и основываясь на трех основных типах повреждения изолированных протопластов (образовании внутри и внеклеточного льда, потере осмотической чувствительности, а также деструкции в результате растяжения и выхода части мембранного вещества), Степонкус считает, что образование внутриклеточного льда у адаптированных протопластов *Secale cereale* L. не обусловлена повышением проницаемости плазмалеммы к воде, а связана со снижением в этом случае температуры нуклеации. Однако извест-

но, что нуклеация внутриклеточного раствора в значительной степени обуславливается внеклеточным льдом, а не образованием внутриклеточных нуклеаторов [25]. Тогда можно предположить, что плазмалемма адаптированных протопластов является более эффективным препятствием для наружных кристаллов льда по сравнению с неадаптированными клетками. В то же время остается неясным, в результате чего меняются свойства плазмалеммы противостоять действию внеклеточного льда. В литературе по этому вопросу имеется несколько мнений. Мазур [26] предположил, что температура внутриклеточной нуклеации может определяться свойствами наружного льда, который, имея кристаллы с малым радиусом кривизны, лучше проникает в клетку через каналы плазмалеммы при температурах ниже -10°C . Асахина [27] считает, что нуклеация внутриклеточного льда происходит в результате перестроек, непосредственно связанных с наружной мембранной клеткой. Степонкус с соавторами [24] пишут, что именно плазмалемма адаптированных клеток более эффективно препятствует кристаллизации внутриклеточного раствора при наличии внеклеточного льда, т. к. протопласты *Secale cereale* L. выдерживали при адаптации -42°C , а неадаптированные только -15°C . Кроме того, авторы наблюдали ранее неизвестные эффекты, происходящие при модификациях плазмалеммы в результате цикла замораживания—отогрева. Благодаря высокой разрешающей способности видеозаписи на криовидеомикроскопе было зарегистрировано, что непосредственно перед образованием внутриклеточного льда наблюдаются вытекание внутриклеточного раствора из клетки, сократительные колебания плазматической мембраны и вихревые потоки в цитоплазме. После нуклеации льда и сопутствующего ему образования пузырьков газа наибольшее их скопление наблюдалось именно в тех местах плазмалеммы, в которых отмечены приведенные выше явления. Важно также то, что пузырьки газа после оттаивания опять появлялись в участках цитоплазмы, где они были ранее. Такие данные позволяют предположить, что отдельные участки плазмалеммы, а следовательно и цитоплазмы повреждаются еще до образования внутриклеточного льда за счет внеклеточного льдообразования. Объяснить подобные эффекты можно, основ-

ваясь на представлениях о сегрегационных модификациях структурных липидов мембран [28], а также конформационных переходов термолабильных белков [2]. Кроме того, важную роль в этих явлениях может играть криодеструкция сократительных белков кортикального слоя цитоплазмы, приводящая в конечном итоге к нарушению контактов плазмалеммы с матриксом цитоплазмы и деструкции мембраны [29].

Такого рода предположения подтверждаются данными об изменениях осмотической толерантности плазмалеммы при замораживании—отогреве изолированных протопластов. Осмотическая толерантность — это повреждения, вызываемые действием низких температур до образования льда. Они могут являться следствием дегидратации и в большей степени проявляются на высокогидратированных неадаптированных клетках.

Для протопластов потеря осмотической толерантности выражается в уменьшении объема при охлаждении и отсутствии изменений объема при отогреве. Такие изменения свидетельствуют не только о повреждении мембранных структур, ответственных за проницаемость, но и структур, обеспечивающих сократительные функции клетки. Вполне вероятно, что наряду с осмотическими воздействиями следует учитывать физиологическое действие отдельных ионов на структурные белки плазмалеммы и цитоплазмы, которые при изменениях двувалентных ионов и особенно Ca^{2+} претерпевают существенные изменения. Исходя из этого, становятся более понятными изменения, происходящие при структурных модификациях плазмалеммы в результате действия ионных и неионных осмотиков. Кроме того, предложенный Степонкусом с соавт. [24] механизм комбинированного повреждения плазмалеммы, который у адаптированных протопластов зависит от температуры, но не зависит от скорости охлаждения, по-видимому, определяется большей устойчивостью последних к действию осмотиков в результате меньшей степени повреждения сократительных структур клетки.

В последнее время интенсивно обсуждается такая форма криповреждения плазмалеммы растительных клеток, как лизис. Теория этого процесса практически заимствована из представлений о повреждении эритроцитов при замораживании [30]. При исследованиях

лизиса протопластов растений имеются определенные особенности, в первую очередь то, что обратимость процесса расширения протопластов при слишком больших сжатиях не происходит в соответствии с осмотическим давлением. Объяснения этого факта довольно противоречивы. Так, Уильямс с соавт. [31] и Макграт [32] считают, что разрушение мембран при сжатии связано наряду с изменениями площади поверхности также и с возникновением латерального давления в мембране. Степонкус с соавт. [34], основываясь на предыдущих работах Меримана [33], считает, что площадь мембраны не сохраняется ни при сжатии, ни при расширении, а происходит обмен мембранного материала между плоскостями мембраны и внешним объемом.

Такого рода предположения подтверждаются результатами прямых наблюдений адаптированных и неадаптированных протопластов. Гордон—Камм с соавт. [35] при использовании сканирующего микроскопа показали, что осмотическое сокращение поверхности неадаптированных протопластов достигается путем образования из плазматической мембраны внутриклеточных везикул, а у адаптированных протопластов при сокращении плазмалеммы появляются выпячивания наружу. Связаны ли эти изменения плазмалеммы со специфическими действиями температуры, в настоящее время неизвестно, однако описанная выше ультраструктурная организация клеток первичной коры в состоянии вынужденного покоя и при переходе к активной вегетации во многом напоминает изменения адаптированных и неадаптированных протопластов, описанные Гордон—Камм с соавт. [35].

С нашей точки зрения, рассматривать эту аналогию необходимо, исходя из особенностей организации вышеописанных типов тканей, так как модификации плазмалеммы возможны не только при адаптации. Как было показано на интенсивно гидратируемых тканях семян, потеря части мембранного вещества может являться неспецифической реакцией на повреждающие воздействия и быть, по всей вероятности, одной из защитных функций, связанной с уменьшением объема мембраны и в конечном итоге — с образованием более плотной ее структуры. В целом, анализируя особенности организации плазмалеммы тканей с выраженной (семена,

пыльца) криорезистентностью, которая формируется в процессе адаптации, и криолабильных тканей (на примере мезофильных протопластов листа озимой ржи), следует выделить типы адаптации, одни из которых приводят к формированию криорезистентности, а другие — в результате которых криорезистентность не возникает. К первым следует отнести типы адаптации, приводящие к изменениям оводненности тканей, а ко вторым — случаи, когда оводненность ткани мало меняется. Здесь необходимо остановиться на биохимическом составе мембран криорезистентных и криолабильных типов тканей. Дегидратированные мембраны (или мембраны, которые можно дегидратировать без нарушения их функциональной активности), как правило, обладают повышенной насыщенностью полярных липидов [36]. Исключение составляет пыльца, однако в мембранах пыльцы высокое, по сравнению с другими растительными клетками, содержание стерина [10], которое оказывает стабилизирующее влияние на подвижность отдельных компонентов мембран [2]. В связи с этим напрашивается вывод: чем плотнее молекулярная упаковка мембраны и ниже гидратация ее компонентов, тем выше криорезистентность этой структуры и толерантность к стрессовым и осмотическим воздействиям.

В то же время мембраны высокогидратированных тканей, обладающие высокой подвижностью отдельных компонентов и лабильно перестраивающие метаболизм, не имеют криорезистентности. Процессы адаптации таких мембран к низким температурам, как правило, связаны с повышением ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов, которые не приводят к существенным изменениям гидратации клетки [36].

В этой связи представляют интерес данные, полученные нами при исследовании методом ЯМР гидратации мембран хлоропластов, обладающих криорезистентностью и мембран криолабильного типа [37, 39]. Так, в процессе вымораживания воды было установлено, что мембраны в состоянии пониженной функциональной активности при субнулевых температурах имели несколько меньшую интенсивность сигнала, чем мембраны, изолированные из активно вегетирующих тканей. Меньшая интенсивность сигнала ПМР и более плавное его снижение при вымораживании воды при прочих равных условиях может свидетельствовать, ис-

ходя из данных Драго (38), о большей прочности связи воды с гидрофильными компартментами мембран в период вынужденного покоя растений. Для мембран хлоропластов, изолированных из активно растущих листьев, характерно резкое снижение интенсивности сигнала при вымораживании воды. Это больше похоже на фазовый переход обычной или несвязанной с мембранами воды, что может указывать на слабую связь ее с биомакромолекулами. Важно отметить, что спектры ПМР при цикле замораживания—отогрева для мембран, изолированных из листьев в состоянии вынужденного покоя растений, были практически идентичными, в то время как при отогреве мембран, изолированных из тканей, которые вышли из состояния покоя, в области субнулевых температур интенсивность сигнала несколько снижалась по сравнению с начальной, т. е. наблюдался эффект гистерезиса.

Такого рода данные, которые по всей видимости обусловлены диффузией воды под влиянием термоосмотических сил, в этом случае представляют особый интерес в связи с оценкой подвижности водных компартментов в зависимости от степени деструкции мембран при замораживании.

Отсутствие эффекта термоосмоса у тканей в состоянии вынужденного покоя и наличие его при выходе из него, по всей вероятности, указывает на существенную модификацию структуры мембраны. Исходя из имеющихся представлений об адаптированных и неадаптированных протопластах, пока довольно сложно интерпретировать приведенные нами данные. Однако, основываясь на изменениях биохимического состава мембран и их различной толерантности к криострессам [37], можно предположить, что в состоянии вынужденного покоя и у адаптированных к низким температурам протопластов существует более плотная упаковка мембраны, а также более высокая прочность связи воды с биомакромолекулами.

В связи с этим процедуры подготовки растительных объектов для криоконсервации, во избежание значительных повреждений плазмалеммы, должны предусматривать в первую очередь снижение функциональной активности мембраны, уменьшение гидрофильности и увеличение плотности упаковки ее компонентов в пределах, не нарушающих нативность клеточной организации.

1. Wuthers L. A. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR Secretariat, 1980, p. 91.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. Киев: Наукова думка, 1982, с. 255.
3. Биохимическое исследование мембран. Под ред. Э. Мэдди, Москва: Мир, 1979, с. 460.
4. Сытник К. М., Мануильский В. Д. Криоконсервация и длительное хранение эмбрионов и пыльцы растений. Информационный материал, Пушино, ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1983, с. 31.
5. Bewley J. D. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30, 1979, p. 195—238.
6. Perner E. Elektronenmikroskopische untersuchungen an reifen von embryonen im zustand völliger samenruhe. *Planta*, 65, 4, 1965, p. 334—357.
7. Colson M. Localisation ultrastructural de l'activité prosthatische acide et des phosphates dans les racines d'*Allium cepa* en vie ralentie et au début de l'hydratation germinative. effet de traitement bref à basse température (—196 °C). *Ann. Sci. Naturell.*, 1, 1979, p. 21—38.
8. Мануильский В. Д. Криорезистентность мембран при различном уровне гидратации растительной клетки. Допов. АН УРСР, 1982, сер. Б, 4, с. 62—65.
9. Нечаев А. П., Сандлер Ж. Я. Липиды зерна. М. Колос, 1975, с. 157.
10. Stanley R. G., Linskens H. F. *Pollen Biology, Biochemistry, Management*, Springer—Verlag, Berlin, Heidelberg, N. Y., 1974, p. 307.
11. Мартын Г. И. Формирование центральной вакуоли в паренхимных клетках во время роста корня гороха. Укр. бот. журнал, 1971, 28, 2, 204—208.
12. Luzzati V., Husson F. The structure of the liquid—crystalline phase of lipid-water systems. *J. Cell. Biol.*, 1962, 12, p. 207—219.
13. Vieira Da Silva J. Water stress, ultrastructure and enzymatic activity. In: *Water and Plant Life. Problem and modern approaches*. Ed. O. L. Lang, L. Kappen, E.—D. Schulze, 1976, Berlin, pp. 207—224.
14. Krochko J. E., Bewley J. D., Pacev J. The effects of drying and very slow speeds of drying on the ultrastructure and metabolism of the desiccation-sensitive moss *Ceratophyllum demersum*. *J. Exp. Bot.*, 29, 1978, p. 905—917.
15. Мануильский В. Д., Мартын Г. И. Криорезистентность и ультраструктурная организация покоящихся и прорастающих пыльцевых зерен. В кн. *Применение электронной микроскопии в материаловед. биол. и медицине*. Киев, 1979, с. 69—70.
16. Ченцов Ю. С. Общая цитология, М., Из-во МГУ, 1984, с. 344.
17. Курсанов А. Л. Транспорт ассимилятов в растении. М.: Наука, 1976, с. 646.
18. Schliwa M. Proteins associated with cytoplasmic actin. *Cell*, 25, p. 587—590, 1981.
19. Wardrop A. B. Evidence for the possible presence of a microtrabecular lattice in plant cells. *Protoplasma*, 115, 1, p. 81—87, 1983.
20. Woloszewicz J. J., Porter K. R. Stereo high voltage electron microscopy of whole cells of human diploide line, WI—38, *Am. J. Anat.*, 147, p. 303—324, 1976.
21. Pryzwansky K. B., Schliwa M., Porter K. R. Comparison of the three-dimensional organisation of unextracted and triton-extracted human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Europ. J. Cell. Biol.*, 30, 1, p. 112—125, 1983.
22. Сытник К. М., Мануильский В. Д. Криорезистентность мембран при различном уровне гидратации клетки. Материалы совещания «Адаптация древесных растений к экстремальным условиям среды», Петрозаводск, 1981, с. 123—124.
23. Лукнер М. Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных, М.: Мир, 1979, с.
24. Steponkus P. L., Dowgert M. F., Roberts S. R. Cryobiology of isolated plant protoplasts. VI. Influence of cold acclimation. *Cryobiology* 16, p. 594, 1979.
25. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14, 251—272, 1977.
26. Mazur P. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 125, 658—676, 1965.
27. Asahina E. Freezing processes and injury in plant cells. In: *Plant cold hardiness and freezing stress*. Ed. P. H. Li, A. Sakai, Academic Press, N. Y., p. 17—36, 1978.
28. Araki T., Roelofs B., J. A. F. Op Den Kamp, L. L. M. Van Deenen Temperature-dependent vesiculation of human erythrocytes caused by hypertonic salt. A phenomenon involving lipid segregation. *Cryobiology*, 19, p. 353—361, 1982.
29. Cox G., Juniper B. E. High-voltage electron microscopy of whole, critical point dried plant cells—fine cytoskeletal elements in the moss *Bryum tenuisetum*. *Protoplasma*, 115, 1, p. 70—80, 1983.
30. Lovelock J. E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, 10, p. 414—426, 1953.
31. Williams R. J., Willemot C., Hope H. J. The relationship between cell injury and osmotic volume reduction. IV. The behavior of hardy wheat membrane lipids in monolayer. *Cryobiology*, 18, p. 146—154, 1981.
32. McGrath J. J. Thermodynamic modeling of membrane damage. In: *Effects of low temperatures on biological membranes*. Ed. G. J. Morris, A. Clarke. Academic Press, London, pp. 335—377, 1981.
33. Meryman H. T. The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. In: *The Frozen cell*. Ed. G. E. W. Wolstenholme, M. O'Connor. Churchill, London, pp. 51—64, 1970.
34. Steponkus P. L., Dowgert M. F., Gordon-Kamm W. J. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle. The influence of cold acclimation. *Cryobiology*, 20, p. 448—465, 1983.
35. Gordon-Kamm W. J., Steponkus P. L. Morphology of the plasma membrane of isolated protoplasts following osmotic contraction: influence of cold acclimation. *Plant Physiol.*, 69, S. 119, 1982.

36. Хохлова Л. П. О роли липидов при адаптации растений к низким температурам. В сб. «Состояние воды и энергетический обмен растений». Казань, 1975. с. 3—19.
37. Сытник К. М., Мануильский В. Д., Сидоренко Т. В. Действие ультранизких температур на мембраны хлоропластов

Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР,
г. Киев

- озимой пшеницы. Укр. бот. журн. 39, 4, с. 12—16, 1983.
38. Драго Р. Физические методы в неорганической химии. М: Мир., 1967, с. 464.
39. Мануильский В. Д., Манк В. В. Эффект термоосмоса при действии низких температур на мембраны хлоропластов. Материалы I Всесоюзного биофизического съезда, Москва, т. I, с. 245—246, 1982.

Поступила 18.11.84

УДК 57.043.3

Г. Р. Иваницкий

БИОФИЗИЧЕСКИЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ КРИОПРОЦЕССОВ*

Среди физических факторов, воздействующих на биологические системы, существенное место занимают низкие температуры. Интерес к криогенным температурам связан с возможностью обнаружения явлений, скрытых тепловым движением молекул при более высоких температурах. Для криобиологии представляют интерес разные диапазоны низких температур, при которых происходит изменение физико-химических про-



Рис. 1. Белые мыши линии BALB, родившиеся из замороженных бластоцист, хранившихся при температуре -196°C и после размораживания трансплантированных беременной самке (черная мышь) другой линии CBA Ias (Б. Н. Вепринцев, Л. М. Межевикина, И. В. Красте, 1983).

цессов, что находит использование в медицине, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, охране окружающей среды [1.] Область криогенных температур обширна и в три раза больше зоны физиологических температур. Приведем пример, связанный с консервацией генома [2].

Селекционная практика ведет к сужению генетического разнообразия. Генотип абортинных пород вытесняется продуктивными породами, отвечающими

определенным условиям содержания и кормовой базе. Однако с хозяйственным освоением северных регионов требуется создание новых пород. Чтобы остановить потерю генетического материала, необходимо поддержание местных пород и создание генетических банков, где половые и зародышевые клетки животных и растений хранятся при криогенных температурах [3, 4]. Возможность использования криобанков доказана экспериментально (рис. 1).

Создание криобанков генетического материала актуально и для решения других проблем, например, для сохранения генетического материала особо ценных промысловых, а также редких и исчезающих видов животных, птиц и рыб, штаммов микроорганизмов, необходимых для производства пищевых продуктов, витаминов, медико-биологических препаратов и т. д. Решение задач криобиологии требует выяснения механизмов действия низких температур.

Доменная организация биологических систем. Биологические системы отличаются гетерогенностью и анизотропией пространственных свойств. В Институте биологической физики АН СССР было показано, что они имеют доменную организацию на всех иерархических уровнях. Домен — это собирательное понятие, определяющее структурное образование, где внутренние связи в несколько раз больше по сравнению с внешними связями одного домена с другим. Домен в пределах выбранного разрежения рассматривается как однородный, и ему ставится в соответствие среднестатистический обобщенный параметр, напри-

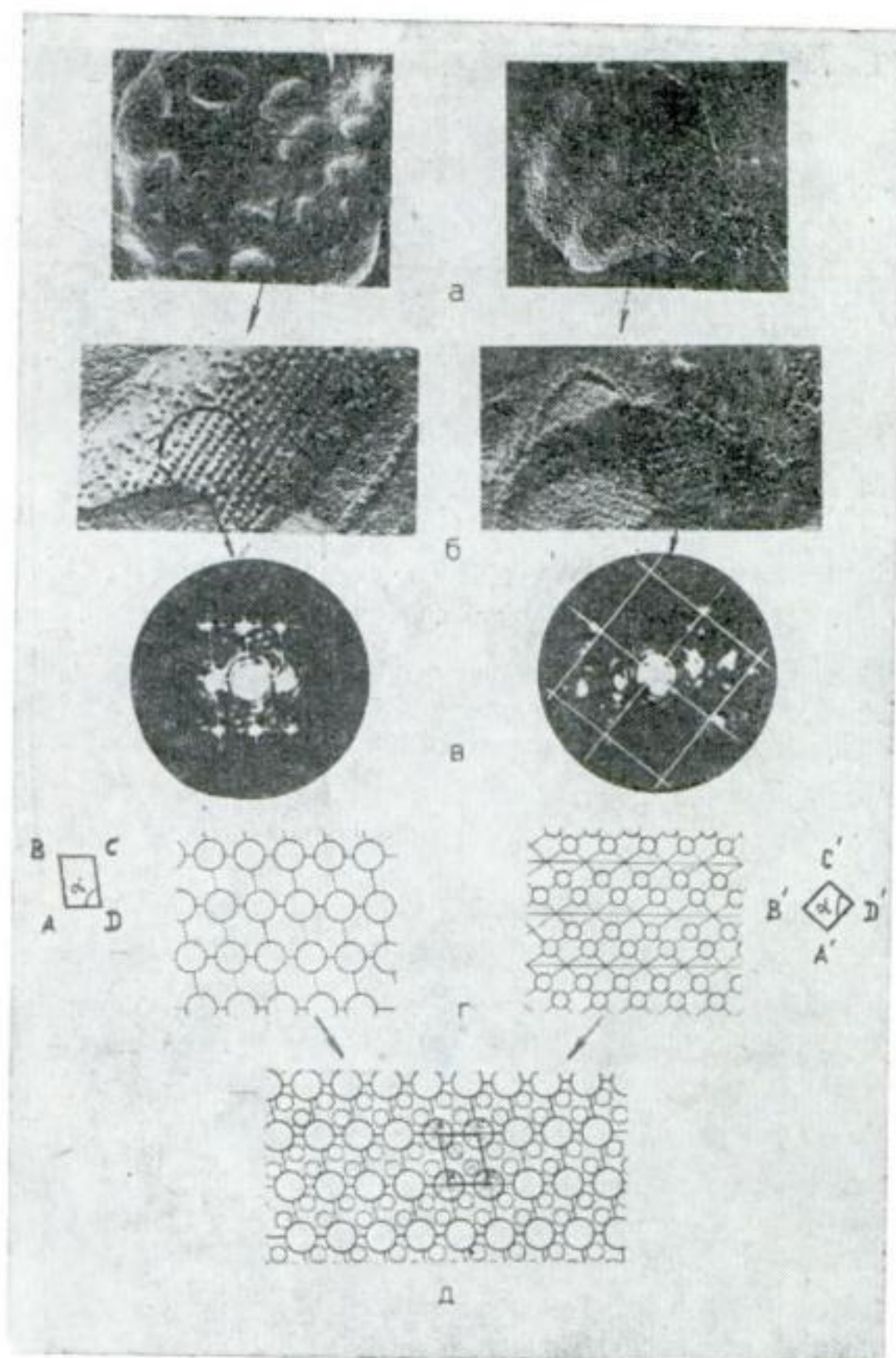
* Материал доложен на пленарном заседании II Всесоюзной конференции „Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов“, Харьков, 9 октября 1984г.

Рис. 2. Последовательность анализа структурной организации доменов, образованных белково-липидными комплексами в мембранах хлоропластов гороха (Б. Л. Аллахвердов, В. И. Попов и др., 1980).

мер, динамическая вязкость, модуль Юнга и т. п. Домены как структурные образования могут двигаться один относительно другого при прикладывании к ним малых усилий по сравнению с усилиями, которые необходимы, чтобы вызвать деформацию самого домена.

Например, для многих глобулярных белков модуль всестороннего сжатия составляет около $7 \text{ Гн} \cdot \text{см}^{-2}$, а при одноосной деформации он меняется в зависимости от направления усилия от 2 до $10 \text{ Гн} \cdot \text{м}^{-2}$. При этом образуется конструкция, которая наряду с «жесткими» участками (модуль Юнга которых близок к аналогичному модулю оргстекла или эбонита) имеет «мягкие» участки, т. е. своеобразные «шарнирные» соединения [5, 6]. Не оставляет сомнения тот факт, что механизмы стабилизации биополимеров определяются вандер-ваальсовыми взаимодействиями, водородными и ионными связями. Участки, соприкасающиеся с водной средой, естественно, характеризуются большим количеством заряженных групп на поверхности. Таким образом, потенциал взаимодействия отдельных доменов (например, α -спиралей) определяется типом и симметрией расположения заряженных групп по поверхности домена. В структуре фибриллярных белков, например, в саркомере поперечно-полосатой мышцы, с помощью меток удастся непосредственно зарегистрировать макроструктуру распределения зарядов по длине биополимера [7].

Аналогичная ситуация с мембрано-белковыми системами. Целостность мембранного домена поддерживается за счет молекулярных взаимодействий внутри белкового каркаса, заполненного фосфолипидом, и гидрофобным взаимодействием с электролитом окружения. Сами же мембрано-белковые домены, создавая целостное образование, соединяются между собой за счет слабых сил молекулярного сцепления. Поэтому такая пленка легко искривляется в пределах взаимного перемещения и сближения доменов, а затем для ее дальнейшего



искривления требуются большие усилия, т. е. начинается деформация самих доменов [8].

Доменная структура хорошо проявляется на электронно-микроскопических снимках с использованием методов кристаллизации или замораживания-скалывания и последующего оптического дифракционного анализа негативов [9—11]. Замороженная система раскалывается по относительно слабым связям.

Например, на рис. 2 показана последовательность анализа структурной организации доменов, образованных белково-липидными комплексами в мембранах хлоропластов гороха [10]. Их структура выявляется благодаря сколу по поверхности мембраны (рис. 2а). Слева показана экзоплазматическая, справа — протоплазматическая поверхности скола мембраны. Охлаждение производилось в 30 % глицерине до -10°C . В виде выпуклостей видны макродоменные образования. На рис. 2б показана структура тех же сколов при большем увеличении. На рис. 2в показаны дифрактограммы с обведенных окружностью участков. Белыми линиями отмечены об-

Т а б л и ц а. Параметры, характеризующие взаимодействие доменов

Выделяемые исследователем факторы среды $\bar{L}_i$	Внутренняя характеристика домена, отвечающая выделенному фактору $\bar{I}_i$	Реакция домена $\bar{X}_i$ на воздействующий фактор
Угловые импульсы Электрический потенциал	Момент инерции Электрический заряд	Угловое ускорение движений Смещение зарядов и заряженных групп (электротрикция) Изменение скорости смещения
Напряженность гравитационного поля Напряженность поля давлений	Масса домена Упругость домена	Пространственное смещение, изменение объема Изменение количества отводимого тепла и скорости колебаний
Напряженность поля температур	Энтропия	Появление наведенного магнитного момента
Напряженность магнитного поля	Намагничиваемость домена	Появление наведенного дипольного электрического момента
Напряженность электрического поля	Поляризуемость домена	

ратные решетки, построенные в соответствии с основными рефlekсами на дифрактограммах. На рис. 2г показана упаковка доменов, прикрепленных к экзоплазматической и протоплазматической мембране. Параметры элементарной ячейки доменов экзоплазматической мембраны ABCD следующие: $AB \approx 254 \text{ \AA}$, $BC \approx 195 \text{ \AA}$, $\angle \alpha \approx 78^\circ$. Соответственно для элементарной ячейки протоплазматической мембраны A'B'C'D': $A'B' \approx 116 \text{ \AA}$, $B'C' \approx 140 \text{ \AA}$, $\angle \alpha \approx 81^\circ$. На рис. 2д дано совмещение двух решеток и образована целостная структура макродомена, которая была нарушена при сколе за счет отрыва по слабым связям одних микродоменов от других.

Внутри клетки аналогичная ситуация, например, динамическая вязкость клетки за счет компартментализации отличается в различных направлениях от $2 \cdot 10^{-3}$ до $50 \cdot 10^{-3} \text{ н} \cdot \text{с} \cdot \text{м}^{-2}$. Одним из путей функционирования биологических систем при физиологических значениях параметров внешней среды является подстройка за счет взаимного движения доменов. Для многих животных клеток в пределах от $+12$ до $+50^\circ \text{C}$ динамическая вязкость почти не изменяется, вне этих значений вязкость растет, одновременно замедляется клеточный метаболизм. У термофильных микроорганизмов плато гомеостаза сдвинуто в сторону высоких, а у рыб или планктона северных морей — в сторону низких температур.

Для описания взаимодействия доменов можно выделить группы сопряженных переменных. Некоторые из них приведены в таблице: $(\bar{L}_i = (\bar{I}_i \cdot \bar{X}_i) \text{ (1)},$

где $\bar{L}_i$ — векторный параметр, характеризующий физический фактор воздействия на домен со стороны соседних доменов или метасистемы (среды), $\bar{I}_i$ — внутренняя характеристика домена, $\bar{X}_i$ — изменение поведения домена (его реакция на воздействие данного фактора). Выражение (1) является нелинейным, т. к. $\bar{I}_i$ в свою очередь зависит от $\bar{X}_i$. Между воздействующими факторами существует дополнтельность и обменные операции, например, изменение электромагнитного поля вызывает нагрев и изменяет напряженность поля температур, такой же эффект может вызвать изменение напряженности поля давлений, производимого с помощью ультразвукового облучения и т. д.

Попытка создать полную теорию взаимодействия доменов с позиций переноса классической механики Ньютона вызывает затруднения, т. е. обобщенные силы и обобщенные перемещения (изменение параметров среды и реакция доменов) охвачены обратной связью. Поэтому данную задачу можно решать только в виде дифференциальных уравнений в частных производных или в виде имитационных моделей. Оба эти варианта при числе доменов более 10^4 (матрица 100×100) практически невозможно реализовать на ЭВМ. Однако некоторые частные решения возможны.

Изменение взаимодействия доменов в при низких температурах

Каждый домен осуществляет некоторые угловые перемещения. Их частота ω прямо пропорциональна $(W_k/m)^{1/2}$ (где W_k — кинетическая энергия доме-

на, m — его масса) и обратно пропорциональна силе связей с соседними доменами и параметрами среды. Параметры среды можно выразить через динамический коэффициент трения или вязкости. На молекулярном уровне организации для микродоменов $W_k = \frac{1}{2} kT$ на одну степень свободы (где k — постоянная Больцмана, T — температура), для макроуровней W_k определяется не только тепловым воздействием, но и расщеплением высокоэнергетических молекулярных комплексов и их окислением. На основе имитационного метода был проведен анализ простой модели — взаимодействие двух доменов, имеющих связь между собой (рис. 3).

При низких температурах или больших коэффициентах вязкости домены практически неподвижны. По мере роста энергии, поступающей в систему, растет частота их колебаний. Соответствующим образом меняется и напряженность поля давлений вокруг них. При этом колеблются домены синфазно. При энергиях W_{12} скачком синфазное колебание переходит в противофазное. При W_2 колебания становятся независимыми (хаотическими). При обратном движении от W_2 к W_0 возврат от противофазных колебаний к синфазным происходит при энергиях W_{11} (где $W_{11} < W_{12}$), т. е. появляется гистерезис.

Если каким-либо образом повысить для всех значений энергии жесткость связей между доменами, то будет происходить расширение петли гистерезиса. При сильных связях наступает такой момент, когда система становится единой, и при всех значениях в интервале $W_0 W_2$ колеблется синфазно, т. е. точки W_{12} и W_{11} выходят за пределы интервала $W_0 W_2$.

Если рассматривать поведение не двух, а цепочки из многих доменов, то мы обнаружим, что система будет распадаться на синфазно колеблющиеся группы и соответственно появятся фазовые сдвиги между группами. При этом средний фазовый сдвиг $\varphi = \frac{2\pi}{n}$, где n — число групп. Такие группы можно рассматривать как домены более высоких иерархических порядков. Если взять не цепочку, а плоскость или трехмерную систему из доменов, то при фазовых сдвигах между колебаниями групп будет прокатываться синхронизирующая волна изменения фазового фронта, которая

сопутствует объединению доменов в синфазно колеблющиеся группы.

Связь между доменами на молекулярном уровне зависит прежде всего от внешней гидратной оболочки молекул, а модуль упругости молекул от внутренней связанной воды. Если рассматривать реальные биомакромолекулы, то значения модуля упругости и плотности для доменов и связей между ними изменяются одновременно, но с разными скоростями.

На ЭВМ имитировалось поведение молекул воды вокруг фрагмента ДНК, состоящего из пары азотистых оснований нуклеиновых кислот (аденин-урацил).

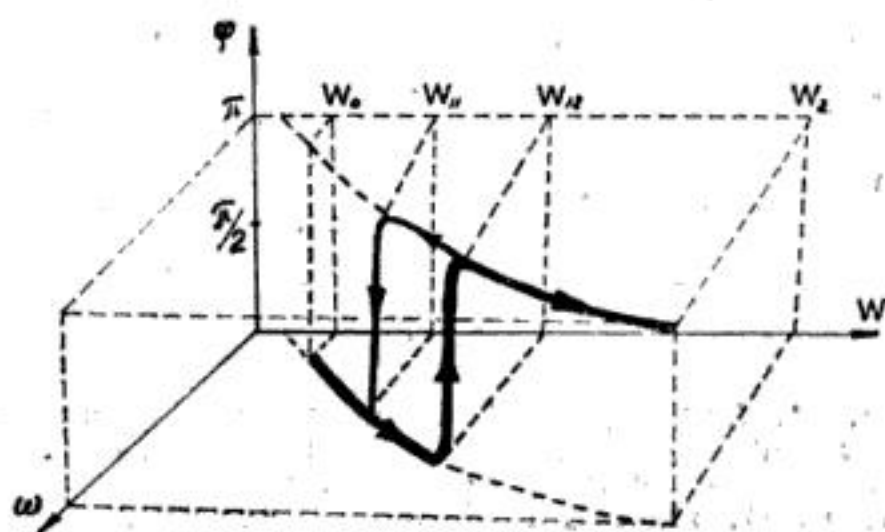


Рис. 3. Характер изменения частоты ω и фазы колебаний φ при взаимодействии двух доменов в зависимости от энергии, поступающей в систему (Г. Р. Иванский, М. А. Морозов, 1984).

При комнатных температурах (300°K) мгновенная картина гидратации постоянно меняется из-за перемещения молекул воды. Для выявления характерных черт расположения ближайших молекул воды расчеты проводятся при низких температурах (5 ÷ 10 °K). Такое «замораживание» проводится из нескольких точек, отвечающих разным мгновенным состояниям системы при комнатных температурах. Это позволяет видеть организацию связей вокруг ДНК, «размазанную» при обычных температурах и выявлять характерные детали структуры водородных связей. На рис. 4 показаны мгновенные конфигурации системы, однако при высоких температурах четкого рисунка водородных связей не обнаруживается. При 5 °K видна ориентация молекул воды вокруг пары оснований и рисунок связей вода-вода и вода-основание. Очевидно, что локальная структура связей на молекулярном уровне задается структурой ближайшего к биомакромолекуле гидратного окружения, т. е. расположением водородных групп на поверхности макромолекулы.

Изменение свойств самих доменов и связей между ними происходит при разных температурах. Было проведено исследование собственной люминесценции белка в растворе путем замораживания

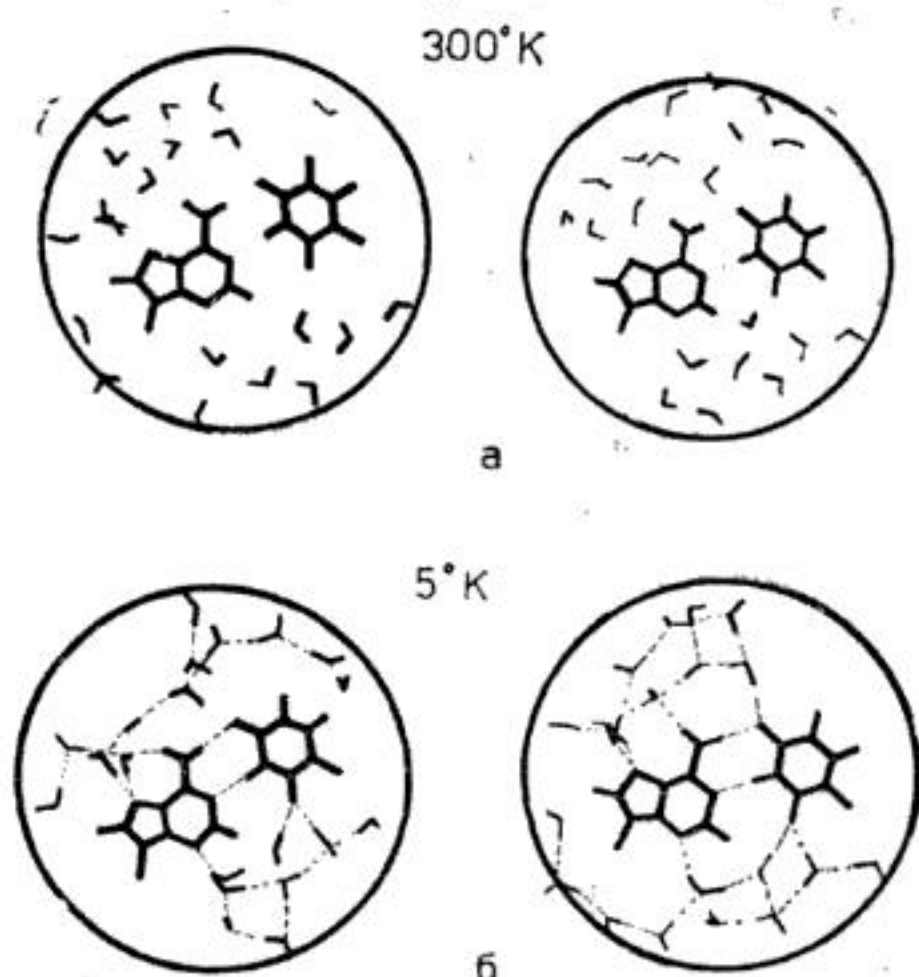


Рис. 4. Моделирование взаимодействия 20 молекул воды с парой азотистых оснований нуклеиновых кислот (аденин-урацил) при температурах: а — 300°K; б — 5°K (В. И. Полтев, Г. Г. Маленков, 1984).

ния наносекундной подвижности [12—14]. Метод основан на том, что положение спектра флуоресценции остатков триптофана в белке, являющихся естественными репортерными метками, опреде-

ние уровня энергии, с которого произойдет излучение, зависит от соотношения времен релаксации диполей окружения τ_p и времени жизни возбужденного состояния хромофора τ_b . Если $\tau_p < \tau_b$, то полярное окружение успеет отрелаксировать, и излучение произойдет с пониженного уровня — спектр флуоресценции будет длинноволновый. В противоположном крайнем случае, когда $\tau_p > \tau_b$, диполи окружения не будут успевать отслеживать за изменением дипольного момента хромофора и излучение будет идти с повышенного уровня — спектр будет коротковолновый.

При замораживании водных растворов белков, триптофановые остатки которых расположены внутри глобулы и недоступны растворителю, спектр их флуоресценции сдвигается в коротковолновую сторону при температурах от -20 до -90 °C (рис. 5а). У белков, обладающих внешними, доступными растворителю остатками триптофана, сдвиги спектров будут в более высокотемпературной области — от 0 до 20 °C (рис. 5б). Если белок, имеющий лишь внутренние триптофаны, денатурирует так, что часть его триптофанилов станет доступными воде, то у него также появятся сдвиги спектров в зоне от 0 до -20 °C (рис. 6). Замена H_2O на D_2O влияет

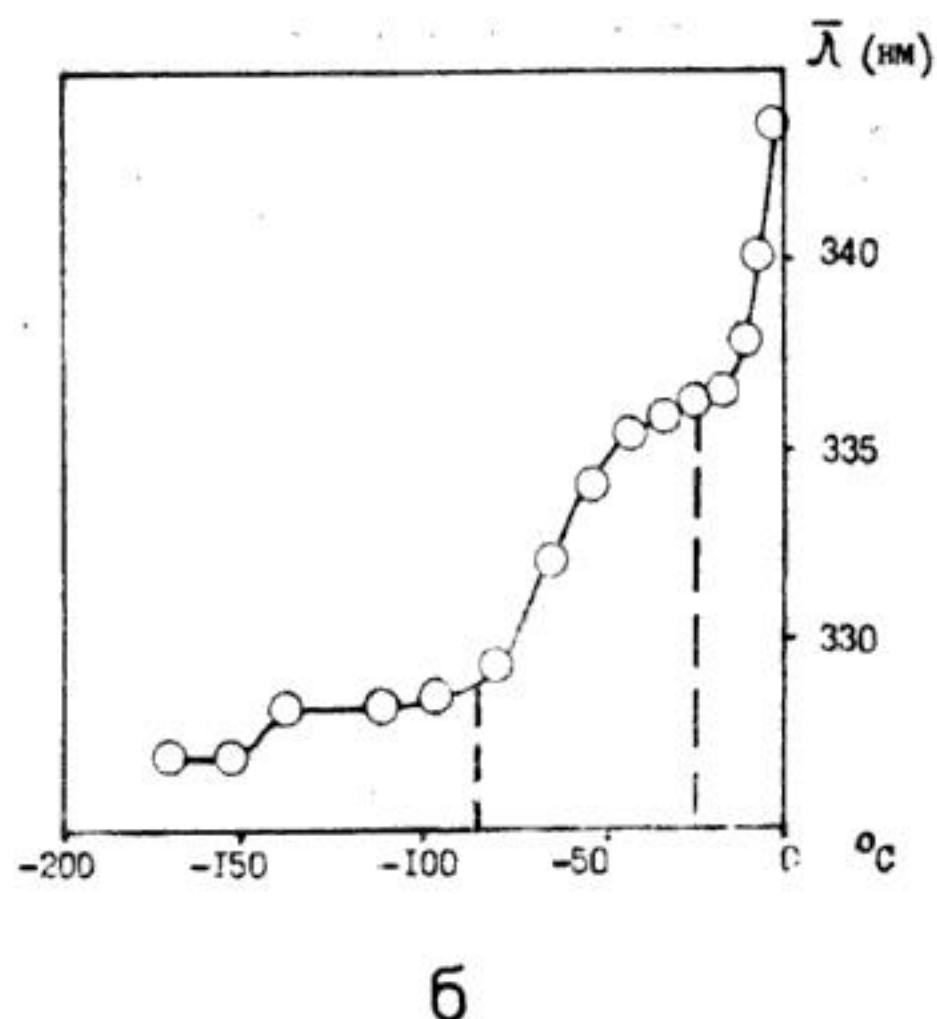
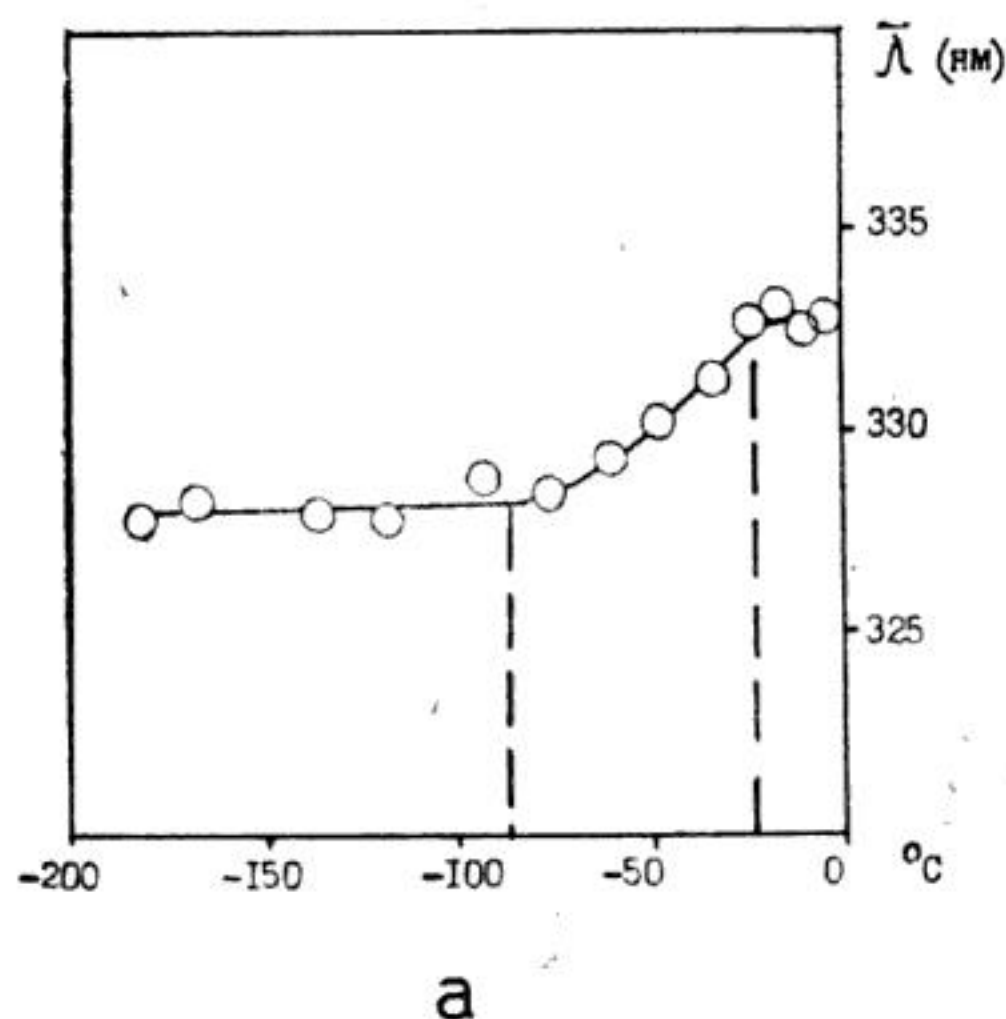


Рис. 5. Температурная зависимость спектра флуоресценции: а — β -лактоглобулина, имеющего внутренние триптофаны; б — бычьего сывороточного альбумина, имеющего поверхностные остатки триптофана (Е. А. Пермяков, Э. А. Бурштейн, 1976).

ляется подвижностью их ближайшего полярного окружения. При возбуждении триптофанового хромофора его дипольный момент изменяется как по величине, так и по направлению. Положе-

на оба типа переходов, сдвигая их к более высоким температурам на 5—10°.

На основе выжеизложенного было сделано предположение, что сдвиги спектров в зоне температур от 0 до -20 °C

обусловлены замораживанием быстрой наносекундной подвижности слабо связанной белком воды, а сдвиги в зоне от -20 до -90 °C определяются замораживанием наносекундной подвижности кооперативной системы белковая структура-прочно связанная вода. Это подтверждается экспериментами на белковых порошках регулируемой влажности. У сухого белкового порошка никаких спектральных сдвигов во всей зоне температур от 0 до -196 °C нет. При постепенном увлажнении порошка вначале появляются спектральные сдвиги в зоне от -20 до -90 °C, которые завершаются при влажности около $0,3$ г H_2O /г белка (первый гидратный слой — прочно связанная вода), а затем и сдвиги в зоне от 0 до -20 °C (слабо связанная вода) (14).

Таким образом, в глобулярной макромолекуле белка можно выделить две большие области, подвижность которых «замораживается» в различных температурных зонах: одну область составляет внутреннее ядро белковой глобулы, влияющее прежде всего на модуль упругости молекулы и включающее в себя внутренние полипептиды цепи, внутренние боковые группы и наиболее прочно связанные белком молекулы воды (зона температур от -20 до -90 °C); вторую область, обладающую, по-видимому, значительно большей подвижностью, составляют внешние боковые группы, петли полипептидной цепи, выходящие за пределы белкового остова, и связанные ими молекулы воды (зона температур от 0 до -20 °C), т. е. структуры, влияющие на жесткость связей между доменами.

Выводы. 1. На основе работ, выполненных в Институте биологической физики АН СССР, показана доменная организация биологических систем разных структурных уровней. Отмечено, что между воздействующими факторами разной природы существуют обменные операции. 2. В терминах подвижности доменов можно рассматривать механизмы реакции биосистем на физические факторы, в том числе и на низкие температуры. 3. Удалось разделить субнулевые температуры на три зоны по природе ре-

лаксации доменов (полярных молекул и групп) что совпадает с разделением по физиологическому влиянию температуры на живые организмы: — низкие температуры от 0 до -20 °C, при которых еще возможна клеточная активность; — весьма низкие температуры — от -20 до -70 °C, при которых живые системы (за исключением некоторых теплокровных животных) находятся в анабиотическом, резко заторможенном состоянии. В этом диапазоне почти прекра-

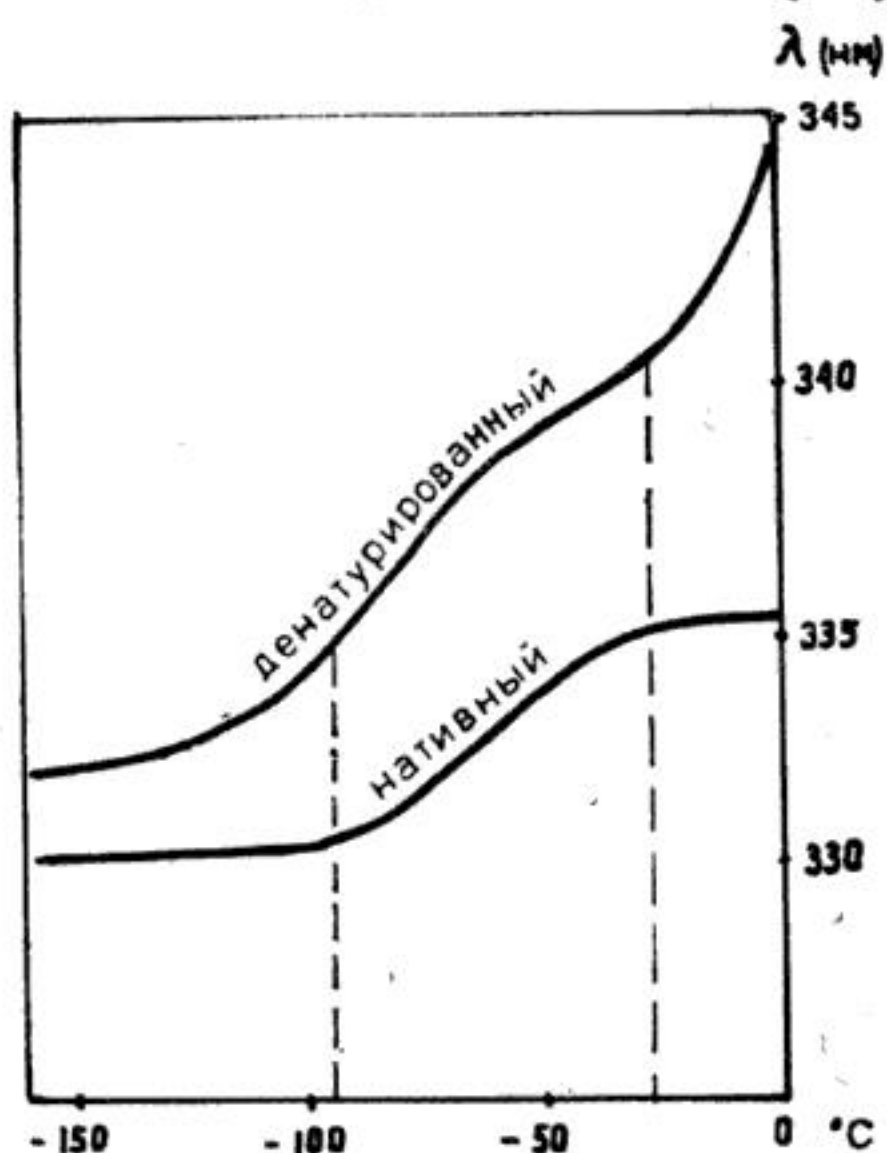


Рис. 6. Температурная зависимость спектра флуоресценции нативного химотрипсина, имеющего внутренние триптофаны и после тепловой денатурации, вследствие которой появляются поверхностные триптофановые остатки, контактирующие с водой (Е. А. Пермяков, Э. А. Бурштейн, 1976).

щается движение доменов и подстройка с их помощью системы под параметры внешней среды; — ультранизкие температуры — ниже -80 °C, при которых начинается криоконсервация объектов — биосистема переходит в твердокристаллическую фазу. 4. Изложены некоторые частные феноменологические модели криопроцессов, которые могут иметь практическое значение. Следует учитывать, что в силу нелинейности и гистерезисного характера процессов два близких пути в пространстве параметров на границе фаз при размораживании могут приводить к различающимся конечным состояниям системы.

1. Механизмы криповреждения и криозащиты биологических объектов. Тезисы докладов, Харьков, 1984.
2. Veprintsev B. N. Rott N. N. Conserving genetic resources of animal species. Nature, 1979, vol. 280, pp. 633—634.

3. Межевикова Л. М., Крафтс И. В., Вепринцев Б. Н. Создание низкотемпературного банка генов лабораторных животных. Механизмы криповреждения и криозащиты биологических объектов. Тезисы, с. 238.

4. Крафтс И. В., Межевикина Л. М. Криоконсервация зародышей морских ежей. Там же, с. 234.
5. Морозов В. Н., Морозова Т. Я. Механические свойства глобулярных белков. Молек. биол., 1983, т. 17, вып. 3, с. 577—586.
6. Morozova T. Ya., Morozov V. N. Viscoelasticity of protein crystal as a probe of the mechanical properties of a protein macromolecule. Hen egg-white e Lysozyme. J. Mol. Biol., 1982, v. 157, No 1, p. 173—179.
7. Филатова Л. Г., Мещерикова В. Н., Есипова Н. Г., Иваницкий Г. Р. Распределение отрицательных зарядов в структуре саркомера поперечно-полосатой мышцы. ДАН, 1984, т. 276, № 6, с. 1504—1505.
8. Иваницкий Г. Р., Кринский В. И., Сельков Е. Е. Математическая биофизика клетки. М: «Наука», 1978, с. 226—228.
9. Вангерман Г., Единцов И. М., Иваницкий Г. Р., Куниский А. С., Райхельт Р., Цыганов М. А. Интерпретация электронно-микроскопических изображений кристаллических агрегатов лейцинаминопептидазы. Биофизика, 1977, т. 22, № 5, с. 599—604.
10. Popov V. I., Kaurov B. S., Finakov G. Z., Gulyaev B. A., Kukarkikh G. P., Allakhverdov B. L., Tageeva S. V. Chloroplast membrane structure. Ultrastructural and functional organization of digitonin-fractionated pea subchloroplast fragments. Photosynthetica, 1980, v. 14, No 3, p. 343—354.
11. Popov V. I., Matorin D. N., Gostimsky S. V., Tageeva S. V., Allakhverdov B. L. Ultrastructural organization of chloroplast membranes in mutants of *Pisum sativum* L. with impaired activity in the photosystems. Planta, v. 151, 512—524, 1981.
12. Пермяков Е. А., Бусел Е. П., Бурштейн Э. А. Люминесценция и состояние производных индола в замороженных водно-солевых растворах. Ж. структурной химии, 1971, т. 12, № 1, 79—86.
13. Пермяков Е. А. Кооперативное замораживание внутримолекулярной подвижности белков. В сб. «Равновесная динамика нативной структуры белка», Пущино, 1977, с. 83—99.
14. Пермяков Е. А. Люминесцентные исследования динамики структуры белка при низких температурах. Дисс. к. ф. —м. н., Пущино, 1976.

Ин-т биологической физики АН СССР
г. Пущино Московской обл.

Поступила 10.11. 1984 г.

УДК 57.043+612.017

А. А. Цуцаева

ПРОБЛЕМЫ КРИОИММУНОЛОГИИ

Криоиммунология начала развиваться как одно из направлений криобиологии в результате применения криометодов для лечения злокачественных новообразований.

Впервые Аблин совместно с Соанес и Гондер в 1969 г. сообщили о фактах обратного развития метастазов у больных под влиянием криоэктомии простаты [4]. Одновременно появляется сообщение Майерс, Хаммонд и Кэтчем (1969 г.) об индукции противоопухолевого иммунитета под влиянием криодеструкции химиоиндуцированных опухолей у животных. Учитывая специфику применяемого для индукции иммунных реакций фактора — замораживание с целью деструкции опухолевых тканей, а также для ограничения круга вопросов, которые при этом предполагалось решать в области иммунологии, был предложен термин «криоиммунология». По мере развития криобиологии в целом и применения криометодов для решения ряда задач в области медицины и ветеринарии, постепенно расширялся круг вопросов, непосредственно касающихся различных аспектов иммунологии.

Накопленный в настоящее время экспериментальный и фактический материал позволяет конкретизировать понятие «криоиммунология» как одно из направлений криобиологии, которое касается исследования иммунобиологических реакций биологических систем на воздействие низких температур *per se* и в комбинации с воздействием химических веществ и других физических факторов, а также механизмов, лежащих в основе возникающих при этом изменений.

Предметом фундаментальных исследований в области криоиммунологии является изучение факторов и механизмов, благодаря которым возникают изменения иммунобиологических свойств биологических объектов как в процессе перевода их с помощью низких температур в состояние холодового анабиоза с целью длительного хранения (криоконсервирование), так и в случае воздействия низких температур с целью деструкции патологически измененных тканей, а также при низкотемпературной стабилизации макромолекул иммуноглобулинов, токсинов, анатоксинов и др.

К прикладным задачам криоиммунологии следует отнести:

1. Разработку технологических процессов криоконсервирования:

а) вакцино-сывороточных препаратов, которые могут найти применение на этапах их промышленного производства и использования в качестве диагностикумов и тест-систем; б) кроветворных клеток (KOE_c и KOE_k); в) различных популяций и субпопуляций лимфоцитов; г) гибридом—продуцентов моноклональных антител.

2. Изучение характера изменения и полноты восстановления иммунобиологических свойств биологических объектов после криоконсервирования. Исследование характера взаимодействия криоконсервированных трансплантатов с организмом реципиента на этапах посттрансплантационного периода.

3. Изучение характера и динамики развития иммунных реакций организма под влиянием локального однократного и многократного криовоздействия на злокачественные и доброкачественные опухоли в зависимости от стадии развития патологического процесса и исходного клинического и иммунологического состояния больного.

Криоконсервирование как надежный метод долгосрочного хранения биологических объектов в состоянии холодового анабиоза в настоящее время широко используется в практике.

В частности, криоконсервированные кроветворные и лимфоидные клетки нашли широкое применение для решения практических и теоретических задач в области гематологии и иммунологии. Криоконсервированные кроветворные клетки используются для лечения гемо- и иммунодепрессивных состояний, вызванных радиотерапией и химиотерапией, а также при врожденных нарушениях кроветворения и иммунодефицитных состояниях.

Криоконсервированные лимфоциты могут применяться для коррекции врожденных нарушений иммунного статуса больных, а также возникающих после воздействия болезнетворных и токсических агентов; с целью унификации, повышения объективности диагностических и прогностических иммунологических тестов, используемых иммунологами-клиницистами; при подборе пар донор—реципиент и для скрининга сывороток, используемых для типирования тканей и др.

Несмотря на то, что в настоящее время разработаны достаточно эффективные способы криоконсервирования иммунокомпетентных и кроветворных клеток [1, 3], с их помощью не удается достичь сохранности всех клеток, часть из них погибает (от 20 % до 40 %), у оставшихся наблюдается обратимое изменение отдельных иммунобиологических свойств [1]. Эти изменения у кроветворных клеток заключались в обратимой ингибции процессов размножения, дифференцировки и образования зрелых функционально полноценных потомков этими клетками после криоконсервирования.

Под влиянием криоконсервирования не изменялась топография расселения кроветворных клеток и способность к длительному приживлению в организме летально облученных реципиентов с последующей дифференцировкой во все ростки кроветворения.

Для криоиммунологов представляет интерес изучение динамики и топографии расселения лимфоцитов в лимфоидных органах летально облученных реципиентов и скорость восстановления функциональной активности иммунокомпетентных клеток после трансплантации им криоконсервированных кроветворных клеток.

Фактический материал, которым располагают исследователи, свидетельствует о том, что под влиянием криоконсервирования тормозится процесс образования из кроветворных клеток зрелых, функционально полноценных Т и В популяций лимфоцитов, способных реализовать весь комплекс иммунных реакций и обеспечивать необходимый защитный потенциал организма. По этой причине у облученных реципиентов после трансплантации криоконсервированных кроветворных клеток на определенных этапах отмечается снижение количества клеток, способных продуцировать антитела; в полуаллогенной системе менее активно и в более поздние сроки развивается реакция «трансплантат против хозяина», которая индуцируется Т-лимфоцитами и является причиной гибели реципиентов.

Описанные особенности функционирования криоконсервированных клеток по сравнению с нативными в организме после трансплантации определяют необходимость разработки оптимальных схем их применения с учетом отмеченных изменений характера, степени и динамики обратимости свойств этих клеток.

В отличие от кроветворных клеток при разработке способов криоконсервирования лимфоцитов периферической крови первоначально была обнаружена их высокая сохранность. В дальнейшем при использовании методов, позволяющих оценивать функциональную активность клеток, в частности, ответ на поликлональные митогены и антигены, было установлено, что снижается не только количество жизнеспособных, функционально полноценных клеток, но также запаздывают сроки развития ими ответных реакций на воздействие митогенов. Оказалось, что Т- и В-лимфоциты обладают разной криостабильностью; неодинаковая криоустойчивость была обнаружена даже у различных субпопуляций Т-лимфоцитов. При этом свойства рецепторов поверхностных мембран лимфоцитов, участвующих в реализации процессов розеткообразования и связывания поликлональных митогенов под влиянием криоконсервирования, не изменялись [5, 8].

Менее устойчивыми оказались лимфоциты лимфоидных органов и в большей степени лимфоциты, отвечающие на воздействие таких митогенов как ФГА и РWM; наиболее устойчивы были лимфоциты, отвечающие на LPS и ConA. В ряде случаев отмечалось, что лимфоидные клетки, находящиеся в функционально активном состоянии, например, продуцирующие антитела-гемолизины, обладают меньшей устойчивостью к воздействию физико-химических факторов низкотемпературного консервирования [5, 8].

В настоящее время для различных популяций и субпопуляций, а также лимфоцитов, трансформированных лейкозогенными факторами, антителопродуцирующих, клеток в функционально активном состоянии отработаны оптимальные способы криоконсервирования, которые отличаются режимами замораживания.

Учитывая, что суспензии лимфоцитов весьма гетерогенны и состоят не только из различных популяций, субпопуляций, но также из клеток, отличающихся исходной функциональной активностью, используя заведомо необходимые для определенной популяции клеток оптимальные режимы замораживания, можно добиться ее селективной сохранности при гибели всех остальных популяций клеток [5].

Изменение функциональной активности кроветворных и лимфоидных клеток

после криоконсервирования сопровождалось ингибцией процессов биосинтеза белка и нуклеиновых кислот. Учитывая, что для нормального течения процессов синтеза необходима определенная энергия, можно допустить, что одной из причин их ингибции является торможение процессов биоэнергетики. При изучении биоэнергетики тимоцитов до и после криоконсервирования были получены результаты, подтверждающие высказанное предположение.

В частности, под влиянием криоконсервирования резко снижался уровень потребления кислорода клетками, который составляет 25—30 % от исходного, в то время как интенсивность аэробного и анаэробного гликолиза изменяется незначительно. Резко снижается содержание выявляемых АТФ, АДФ, АМФ — в криоконсервированных клетках не определяется. Можно допустить, что восстановление структур и обменных процессов в этих клетках после криоконсервирования обеспечиваются энергетически за счет процессов гликолиза в первое время после размораживания [9]. Исследования по изучению характера изменения биоэнергетики клеток после воздействия криоконсервирования необходимо продолжить и развить в плане изучения механизмов, которые лежат в их основе. Остается актуальным выяснение причин, обуславливающих различную криоустойчивость Т- и В-лимфоцитов и субпопуляций этих клеток, а также лимфоцитов, трансформированных лейкозогенными агентами, и отличающихся функциональной активностью, что будет способствовать созданию методологии низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.

Наряду с этим остается актуальным поиск более эффективных способов криоконсервирования суспензий миелокариоцитов и лимфоцитов с целью доведения количества сохраненных, функционально полноценных клеток до 100 %.

Перед тем, как рассмотреть вопрос об особенностях взаимодействия нативных и криоконсервированных трансплантатов с организмом реципиента, следует конкретизировать понятие «иммуногенность трансплантата» и сразу же оговориться, что только клетки и ткани удастся успешно криоконсервировать с целью последующей трансплантации. Проблема криоконсервирования органов остается до настоящего времени нерешенной, посему вопросы взаимодей-

вия криоконсервированного трансплантата с организмом реципиента и характер иммунных реакций, развивающихся при этом, рассматриваются применительно к суспензиям клеток и тканей.

Что же такое иммуногенность трансплантата? Это свойство, благодаря которому после взаимодействия с организмом реципиента в аллогенной и полуаллогенной системах индуцируются иммунные реакции разной степени интенсивности. Иммуногенность определяется рядом факторов: антигенными свойствами различных структур трансплантата, активностью секреции продуктов жизнедеятельности клеток, степенью васкуляризации трансплантата, количеством форменных элементов и, в частности, лимфоцитов и нейтрофилов, находящихся в ткани трансплантата.

Было установлено, что криоконсервированные трансплантаты в аллогенной системе приживляются более длительный промежуток времени по сравнению с нативными. Причины этого могут быть разные.

На этапах замораживания—отогрева и отмывания тканей от криопротектора из трансплантатов удаляются в какой-то степени вещества, выделяющиеся из клеток, поврежденных при иссечении трансплантата, а также продукты жизнедеятельности и продукты распада клеток, которые более активно выходят в отмывающий раствор благодаря повышению проницаемости мембран клеток криоконсервированной ткани.

В первые дни после трансплантации, вследствие обратимой ингибиции обменных процессов в клетках трансплантата под влиянием криоконсервирования, крайне мало выделяется продуктов жизнедеятельности, одновременно отмечается гибель форменных элементов крови, находящихся в ткани трансплантата. В результате снижается вклад этих факторов в процесс становления и развития трансплантационного иммунитета, а у реципиентов, которым пересаживались криоконсервированные ткани, в более поздние сроки и менее активно протекают реакции клеточного иммунитета, что является, в конечном итоге, основной причиной более длительного приживания криоконсервированных трансплантатов по сравнению с нативными.

Под влиянием криоконсервирования возможна обратимая, незначительная временная модификация антигенного спектра мембран клеток вследствие та-

ких процессов как кластеризация белков, липидов, липид-белковых компонентов.

В результате этого сенсibilизация реципиента осуществляется одним набором антигенов, а в эфферентной стадии примированные лимфоциты взаимодействуют с несколько измененным вследствие восстановления антигенным спектром мембран клеток трансплантата, что также может быть причиной снижения иммунных реакций на криоконсервированный трансплантат.

Более детальное изучение иммунобиологических свойств криоконсервированных трансплантатов, особенностей их взаимодействия с реципиентом, характера и активности иммунных реакций реципиента на трансплантацию различных криоконсервированных тканей будет способствовать созданию эффективных схем иммунодепрессивной терапии и определения использования наиболее оптимальных иммунодепрессантов.

Один из разделов криоиммунологии посвящен изучению характера воздействия низких температур на молекулы иммунных глобулинов G.

Несмотря на то, что в настоящее время существует много способов хранения вакцино-сывороточных препаратов, с помощью большинства из них не удается добиться полного сохранения их специфической активности. Наиболее часто для консервирования применяется охлаждение препаратов до различных отрицательных температур либо высушивание из замороженного состояния. На модели противостолбнячного иммуноглобулина G как в составе сыворотки, так и в чистом виде было показано, что степень сохранности свойств препарата зависит от скорости охлаждения. Оптимальная скорость для противостолбнячного иммуноглобулина равнялась 19—21 °C/мин до начала кристаллизации с последующим погружением в азот. Однако и при этих режимах не во всех образцах удалось добиться полного сохранения специфической активности. При добавлении криопротектора ПЭО-400 к сыворотке либо препарату иммуноглобулина G повышалась скорость связывания его с токсином, а после замораживания во всех образцах титр антитоксина не изменялся.

При исследовании с помощью метода спиновых меток ЭПР было показано изменение четвертичной структуры молекул иммуноглобулина после заморажи-

вания. Структура макромолекул не изменялась, если они замораживались под защитой криопротектора ПЭО-400 [9].

Теоретическое значение полученных результатов состоит в том, что установлен один из возможных молекулярных механизмов криоповреждения, заключающийся в изменениях свойств и конформации белковых макромолекул; установлен также возможный механизм защитного действия криопротектора на биологические системы путем стабилизации макромолекул белка и повышения их криоустойчивости.

Прикладное значение результатов не вызывает сомнений, так как разработанный способ позволяет неограниченно долго сохранять иммунные глобулины и сыворотки без изменения исходных свойств.

Исследование механизмов, лежащих в основе повреждения и защиты макромолекул иммунных глобулинов в процессе криоконсервирования, следует развивать и углублять, используя для этой цели различные классы иммуноглобулинов.

Завершая краткий обзор результатов исследований в области криоиммунологии, следует остановиться на тех работах, которые положили начало криоиммунологии и были посвящены изучению характера, активности, динамики развития иммунных реакций в ответ на криодеструкцию опухоли в эксперименте и клинике.

Онкологами, клиницистами и экспериментаторами была показана возможность индуцирования иммунных реакций организма в ответ на криодеструкцию опухоли. В ряде случаев отмечалось обратное развитие отдаленных метастазов. Однако наблюдаемое также нередко отсутствие какого-либо положительного эффекта, либо даже стимуляция опухолевого роста являются и до настоящего

времени факторами, ограничивающими широкое применение криометодов для лечения злокачественных новообразований [2, 4].

В этой области несмотря на 20-летнюю давность исследований остается еще много малоизученных аспектов.

Успех либо неудачи использования криометода для лечения злокачественных новообразований зависят от многих причин:

1) исходного иммунного статуса больного;

2) характера и стадии опухолевого процесса;

3) размеров опухоли, подвергнутой криовоздействию;

4) иммуногенности опухолевой ткани;

5) характера (клеточные или гуморальные) и интенсивности иммунных реакций, которые развиваются после криовоздействия на опухоль.

Это далеко не полный перечень причин, характер влияния которых на эффективность криотерапии опухолей остается еще недостаточно изученным. Организация плановых, активных исследований по всем перечисленным направлениям будет способствовать разработке научных основ использования криометодов для лечения злокачественных новообразований, а также обоснованному их применению в комбинации с другими методами — лучевыми, хирургическими, медикаментозными.

Таким образом, «криоиммунология», первоначально возникнув как частная задача криобиологии, в настоящее время представляет собой отдельное направление. От успешных исследований в этой области зависит решение актуальных задач в области гематологии, иммунологии, вирусологии, производстве вакцино-сывороточных препаратов, биотехнологии, ветеринарии и т. д.

1. *Криоконсервирование* клеточных суспензий/Под ред. А. А. Цуцаевой.— Киев: Наук. думка, 1983.— 240 с.

2. *Cryochirurgie et applications medicales du froid. Etat actuel et perspectives.* Commission C., 1981.—209 p. (Science et Technique du Froid.) Institut international du Froid.

3. *Farrant J., Knight S., McGann L., Ostrien J.* Optimal recover of lymphocytes and tissue culture cells following rapid cooling.— *Nature*, 1974, 249, p. 452—453.

4. *Handbook of Cryosurgery*/Ed. by R. J. Ab-lin. New York; Basel: Dekker, 1980.—428 p.

5. *Holden H. T., Kirchner H. and Herberman R. B.* Different murine thymus-derived

lymphocyte subpopulations identified by their differential susceptibility to cryopreservation.— *Cryobiology*, 1975, 12, N 6, p. 575. Abstracts 12th Ann. Meet. Soc. Cryobiol.

6. *Lewis J.* Long-term preservation of hemopoietic tissue for marrow transplantation. *Blut German*, 1974, p. 389—395.

7. *Pushkar N., Markova V., Tsutsaeyeva A.* et al. The mechanism of action of low temperature and cryoprotective agents on immunoproteins.— *Cryobiology*, 1978, 15, p. 403—407.

8. *Strong D. M., Ahmed A., Sellk W., Greiff D.* Differential cryobiological effects on murine T and B lymphocytes.— *Cryobiology*, 1973, 10, N 6, p. 523—524.

9. Tsutsayeva A., Gordienko A., Fedets O. Energy exchange in rat thymocytes after deep freezing. — Cryo-Letters, 1981, N 2, p. 273—278.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

10. Tsutsayeva A., Goltsev A. Immunologic reactions at various stages after transplantation of cryopreserved bone marrow. — Folia Haematol. Leipzig, 1983, N 2, p. 231—241.

Поступила 03.10.84

УДК 57.043 ÷ 577.112.825 + 577.36 + 577.17.2

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

БИОСИНТЕЗ ТИРЕОГЛОБУЛИНА И СОДЕРЖАНИЕ ТИРЕОГЛОБУЛИНОВЫХ ПОЛИРИБОСОМ В КЛЕТКАХ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Вопросы консервации щитовидной железы получили достаточное развитие у нас в стране [1, 6, 8] и за рубежом [12, 13]. Предложенные методы консервации позволяют сохранять щитовидную железу при гипотермических режимах и в условиях глубокого замораживания. Отмечена устойчивость к замораживанию таких функциональных процессов в щитовидной железе, как йодаккумуляция, связывание J^{125} — трийодтиронина, что свидетельствует о криостабильности целого ряда метаболических и регуляторных процессов в щитовидной железе [7].

Учитывая, что более 60 % всех белков щитовидной железы приходится на долю тиреоглобулина, представляло интерес выяснить, в какой мере используемый нами способ криоконсервации отражается на имеющем первостепенное значение для тиреоидного гормоногенеза процессе биосинтеза белка.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании активности белоксинтезирующей системы из клеток криоконсервированной щитовидной железы; определении размера популяции тиреоглобулиновых полирибосом в тотальной популяции полирибосом из клеток криоконсервированной щитовидной железы.

Материал и методы. Операционный материал получали в лаборатории тиреоидной патологии Института краевой медицины МЗ УзССР. Исследовано 8 случаев. Контроль — ткань щитовидной железы, удаленная у больных во время операции по поводу диффузного токсического зоба (6 случаев). Криоконсервирование проводилось по методу, разработанному Инститutom проблем криобиологии и криомедицины АН УССР (г. Харьков), который обеспечивает 2-х этапное замораживание тканей железы.

После удаления щитовидные железы разрезались на пластинки длиной 3—4 см, шириной 1 см, высотой 2—3 мм. Кусочки железы погружали в раствор криопротектора: 10 %-ный димексид в растворе Хенкса.

Компоненты белоксинтезирующего аппарата (рибосомы, белковые факторы трансляции, тРНК и аминокил—тРНК-синтетазы) вносили в систему в виде фракции, получаемой центрифугированием гомогената клеток при 30000 g 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 (грубый). Концентрация фракции S_{30} в системе составляла 20 ед D_{260} на 1 мл. Стандартная реакционная смесь содержала (в мкмоль/мл): АТФ — 0,5, ГТФ — 0,05, фосфоенолпируват — 10, β — меркаптоэтанол — 5,0, $MgCl_2$ — 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 немеченных аминокислот. Бесклеточную систему инкубировали при 37 °C в течение 1 ч.

Об эффективности белкового синтеза в системе судили по пробирочному включению. Контролем служили пробы с нулевым временем инкубации. Обработку проб после инкубации проводили по методу [10].

Суммарные полирибосомы клетки выделяли путем обработки гомогената 2%-ным тритоном X-100 в присутствии ингибитора РНК-азы 0,1 %-ного гепарина с последующим осаждением рибосомного материала при повышении концентрации ионов Mg^{2+} до 0,1 М [3]. Для выделения индивидуальных полирибосом использовали сорбент, который представляет собой диазотированную ПАБЦ,

ковалентно связанную с тиреоглобулином, насыщенную кроличьими антителами к тиреоглобулину. Иммуносорбент получали по методике [2, 4]. Связывание полирибосом с иммуносорбентом проводили в инкубационной смеси (60 мин, 0—4 °С, буфер В). Инкубационные смеси объемом 0,16 мл содержали постоянное количество полирибосом (0,16 мг) и разное количество сорбента (от 0,125 до 1 мг). Для определения количества полисом, сорбированных на

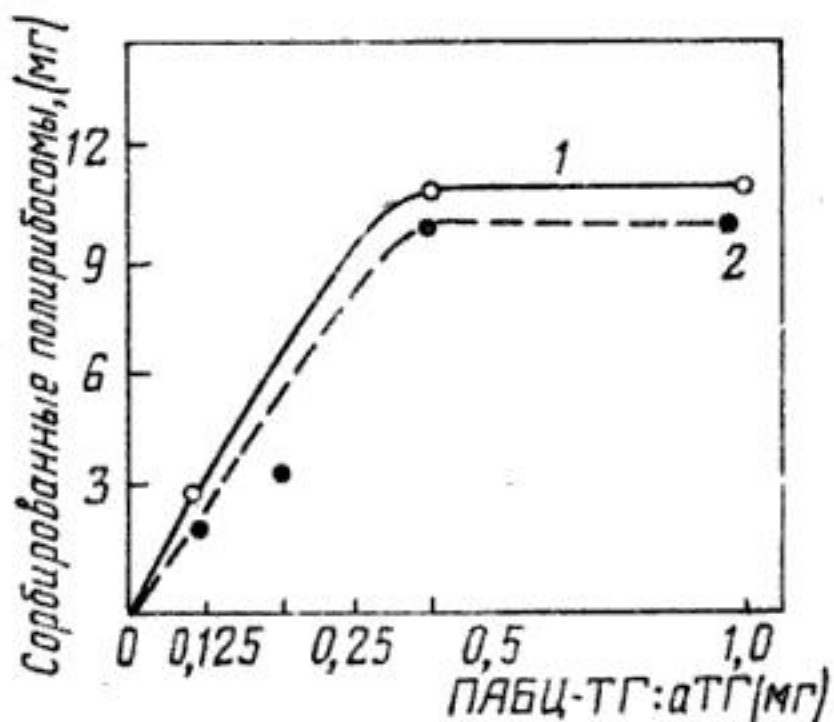


Рис. Определение размера популяции тиреоглобулиновых полирибосом:

1 — в клетках диффузного токсического зоба, 2 — в клетках криоконсервированной щитовидной железы.

сорбенте (ПАБЦ—ТГ : аТГ), применяли метод кислотного гидролиза полирибосом на самой основе с последующим измерением количества РНК по А. С. Спирину [9].

Статистическую обработку результатов исследований проводили по И. Л. Ойвину [5].

Результаты и их обсуждение. Включение ^{14}C -аминокислот в бесклеточную белоксинтезирующую систему из клеток криоконсервированной щитовидной железы составило 1198 ± 87 имп/мин на 20 ед S_{30} , в контроле — диффузный токсический зоб — 1416 ± 94 имп/мин; (в 0¹ опыте — 40 ± 16 имп/мин). Следовательно, после криоконсервации белоксинтезирующая активность щитовидной железы сохраняется на 84,5 %.

На рис. показана сорбция суммарных полирибосом из клеток криоконсервированной щитовидной железы и диффузного токсического зоба. В клетках криоконсервированной щитовидной железы содержание тиреоглобулиновых полирибосом составило $11,2 \pm 0,12$ % (кривая 2), тогда как в контроле (диффузный токсический зоб) содержание тиреоглобулиновых полирибосом составило $13,7 \pm 0,2$ % (кривая 1).

Таким образом, в клетках криоконсервированной щитовидной железы содержание тиреоглобулиновых полирибосом уменьшено на 10 %.

На основании данных исследования белоксинтезирующей активности криоконсервированной щитовидной железы, проведенных как путем изучения включения в S_{30} бесклеточной белоксинтезирующей системы, так и при определении размера популяции тиреоглобулиновых полирибосом установлено, что в криоконсервированной щитовидной железе белоксинтезирующая активность сохраняется на 85—90 %. Отсюда вытекает, что используемый метод криоконсервации [7] вполне пригоден для хранения трансплантационного материала.

Сопоставление полученных результатов с данными других авторов позволяет выявить некоторые общие закономерности. Так, низкотемпературная консервация и хранение щитовидной железы около 30 сут при температуре -196 °С позволяет сохранить способность к биосинтезу суммарных белков на 75 %. При этом обнаружено, что интенсивность гормонообразования в ткани криоконсервированной железы несколько ниже, чем в контроле [9]. При микроскопическом исследовании структуры деконсервированной щитовидной железы выраженных нарушений не наблюдалось [5].

На основании проведенных исследований можно сделать заключение о том, что в процессе криоконсервации и реконсервации щитовидной железы белоксинтезирующая активность железы существенно не меняется.

1. Брук Г. З. Низкотемпературное консервирование и трансплантация щитовидной железы в эксперименте: Автореф. дис. ... канд. мед. наук — Харьков, 1975. — 22 с.
2. Кадырова Д. А., Любимова Е. В., Атаханова Б. А., Лейтин В. Л. Полирибосомы, синтезирующие тиреоглобулин в клетках щитовидной железы. Выделение и определение размера популяции. — ДАН СССР, 1978, 239, № 5, с. 1251—1254.

3. Лейтин В. Л., Лерман М. И. Изучение полирибосом из клеток печени крысы. Препаративный метод получения полирибосом. — Биохимия, 1969, 34, с. 839—848.
4. Лейтин В. Л., Любимова Е. В., Кадырова Д. А., Лерман М. И. Альбуминовая мРНК из клеток печени крысы. Анализ процесса иммуносорбции индивидуальных полирибосом. — Биохимия, 1978, 43, № 8, с. 1504—1514.

5. Ойвин И. Л. Статистическая обработка результатов экспериментального исследования. — Пат. физиология и эксперим. терапия, 1960, № 6, с. 76—79.
6. Пушкарь Н. С. Аутоимплантация криоконсервированной щитовидной железы для лечения послеоперационного гипотиреоза у больных тиреотоксикозом. — В кн.: Актуальные проблемы криобиологии. Киев: Наук. думка, 1981, с. 404—408.
7. Пушкарь Н. С., Утевский А. М., Чуйко В. А., Цариковская Н. Г. Консервирование и трансплантация щитовидной железы человека. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 11, с. 64—74.
8. Пушкарь Н. С., Утевский А. М., Чуйко В. А., Петренко А. Ю., Цариковская Н. Г. Способ консервирования щитовидной железы. А.с. 935050 (СССР), опубл. в Б.И., 1982, № 22, с. 26.
9. Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. — Биохимия, 1958, 23, с. 656—658.
10. Туракулов Я. Х., Атаханова Б. А., Кадырова Д. А. Стимуляция белоксинтезирующей способности полирибосом щитовидной железы *in vitro* под действием циклического аденозин-3', 5'-монофосфата. — Пробл. эндокр., 1975, 21, с. 82—85.
11. Туракулов Я. Х., Ташходжаева Т. П., Мухамедзянова И. Р. Биохимическое обоснование трансплантации криоконсервированной тиреоидной паренхимы. — II Всесоюз. конф. по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии. (Харьков, 9—11 окт. 1984 г.): Тез. докл., Харьков, 1984, с. 223.
12. Brooks S. R. Endocrine tissue transplantation—Springfield, 1962, 3, p. 165.
13. Knox A. S. S., Van Westapp C., Row A. W., Volpe R. The use of cryopreserved human thyroid tissue for the *in vitro* assay of thyroid stimulators—Cryobiology, 1977, 14, N 5, p. 543—548.

Ин-т биохимии АН УзССР,
г. Ташкент

Поступила 10.10.84

УДК 5 .043

**А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, Л. А. Бабийчук,
Т. П. Бондаренко, Н. М. Бойко**

ЕДИНЫЙ МЕХАНИЗМ ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ ПРИ ТЕРМАЛЬНОМ ШОКЕ, ЗАМОРАЖИВАНИИ И ПОСТГИПЕРТОНИЧЕСКОМ ЛИЗИСЕ

Существующие представления о механизмах холодового повреждения клеток не позволяют в настоящее время полностью объяснить целый ряд явлений, наблюдающихся в условиях охлаждения и замораживания — отогрева. В частности, остаются во многом неясными механизмы холодового шока клеток, принципы защитного действия химических криопротекторов, а также факторы, обуславливающие индивидуальную чувствительность клеток к низкой температуре. В основе этого, очевидно, лежит тот факт, что различные клетки (ядерные, микроорганизмы, субклеточные органеллы и т. д.) по-разному реагируют на воздействие низких температур [1; 3].

В то же время становится ясным, что ведущую роль в холодовом повреждении клеток играет наружная (плазматическая) мембрана, отделяющая внутреннюю среду клетки от внешней. Постоянство условий внутренней среды обеспечивается не только механической прочностью плазматической мембраны, но и устойчивостью ее функции как селективного барьера для ионов и неэлектролитов [2]. Поэтому нарушение структуры

плазматической мембраны можно рассматривать не только как повреждение *per se*, но и как фактор, резко снижающий репаративный потенциал клетки вследствие потери метаболитов и нарушения на ней ионного баланса.

Другим важным аспектом является двойственный характер реакции плазматической мембраны на изменение осмотических и температурных условий среды. Микроскопические (молекулярные) реакции мембраны связаны с ее способностью формировать двумерный матрикс, включающий компоненты различной химической природы. При снижении температуры в мембране происходят изменения конформационного состояния белков [15] и развиваются фазово-структурные переходы липидов [10]. Макроскопические реакции связаны со свойством плазматической мембраны образовывать замкнутый трехмерный контур клетки, способный при изменении осмотических условий трансформировать объем и форму [9]. Обе группы факторов в конечном итоге приводят к изменению молекулярной структуры мембраны, т. е. при одновременном изменении осмотических и температурных

условий среды можно говорить о взаимном «наложении» осмотически индуцированных и температурозависимых изменений структуры.

Поскольку изменение осмотических условий среды часто предшествует изменению температуры (например, при обработке криопротектором) возникает вопрос, какую роль процессы, сопровождающие макроскопическую трансформацию клетки, могут играть в ее последующей реакции на снижение температуры. В реальных условиях замораживания изменение температуры сопровождается изменением осмотических условий среды, и при обращении направленности сдвига (например, при переходе от охлаждения к отогреву) глубина модификации структуры в конечной точке замораживания будет показывать влияние на последующее восстановление клетки при отогреве. Из этого следует, что проблема криоповреждения связана с оценкой исходного состояния клетки как на предварительном этапе перед охлаждением, так и на этапе перед отогревом.

Роль плазматической мембраны как первичного звена холодовых повреждений особенно хорошо прослеживается в криобиологических экспериментах, объектом которых являются эритроциты [18]. Эритроциты характеризуются чрезвычайно высокой чувствительностью к замораживанию [3]. Кроме того, в гипертонических условиях эритроциты подвергаются лизису даже при быстром охлаждении в области положительных температур (криогемолиз) [5]. Таким образом эритроцит как криобиологическая модель позволяет проводить эксперименты при охлаждении без кристаллизации жидкой фазы, когда можно оценить роль таких факторов, как осмолярность среды, глубина и скорость изменения температуры. Представленные в данной работе результаты исследований, проведенных на эритроцитах человека, свидетельствуют об определяющей роли исходного состояния плазматической мембраны в механизме их холодового и осмотического повреждения.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования служили эритроциты, полученные из свежей донорской крови человека, заготовленной на Харьковской областной станции переливания крови на консерванте ЦОЛИПК-76.

Для изучения характера изменений формы, объема, структуры и проницае-

мости эритроцитов, вызванных действием повышенной тоничности среды, из эритромаксы готовили 50 %-ную суспензию эритроцитов на фосфатном или трис-малеатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl. Аликвоты концентрированной суспензии микропипеткой вносили в растворы, находящиеся при заданной температуре (конечная концентрация суспензии 2 %). Исследования проводились либо при фиксированных температурах (+37 и 0 °C), либо при сдвиге температуры +37 → 0 °C и 0 → +37 → 0 °C, скорость изменения температуры 1 град/сек. При изменении температурных и осмотических условий среды к 1 мл суспензии эритроцитов добавляли 10 мл забуференного солевого раствора с соответствующей температурой и тоничностью (рассчитанной на конечную тоничность). Скорость охлаждения составляла при этом ~ 20 град/сек.

Изменение формы эритроцитов регистрировали в фазово-контрастном микроскопе после фиксации 0,1 %-ным глутаральдегидом, подсчитывая в камере Горяева количество дискоцитов, гладких, уплощенных, эхиноцитарных и складчатых форм эритроцитов и выражали их в процентах от общего количества клеток.

Гематокритное число определяли с помощью микроцентрифуги МГЦ-8.

Уровень свободного гемоглобина регистрировали спектрофотометрически при 543 нм и выражали в процентах по отношению к 100 %-ному гемолизу. Выход ионов K⁺ определяли в супернатанте на пламенном фотометре ПАЖ-1. При исследовании влияния гиперосмолярности среды на эритроциты в области отрицательных температур (0 ÷ -25 °C) использовали модифицированную среду замораживания, содержащую 6 М глицерин, позволяющий предотвращать кристаллизацию жидкой фазы.

Результаты. Охлаждение эритроцитов в изотонических условиях в интервале температур 37—0 °C не вызывает гемолиза клеток [1]. Эритроциты приобретают чувствительность к охлаждению только после предварительной инкубации в гипертонических растворах солей [4] и неэлектролитов [5]. Это означает, что сопутствующие гипертоническим условиям изменения структуры клеток являются причиной резкого повышения их восприимчивости к последующему охлаждению. В то же время остается неясным вопрос о том, какие внутрен-

ние изменения структуры лежат в основе сенсibilизации клеток к охлаждению. Двойственный характер реакции эритроцитов на гипертонию делает необходимым производить первичную оценку прежде всего макроскопических изменений (объема и формы клеток), которые могут отражать специфику реакции трехмерного белкового скелета эритроцитов.

Анализ изменений формы эритроцитов, развивающихся в процессе их 10-мин инкубации в присутствии 0,15—1,0 М NaCl, указывает на характерную зависимость этого процесса от тоничности среды (рис. 1). При 37 °C в интервале концентраций NaCl 0,15—0,6 М наблюдается постепенное снижение числа дискоцитов и формирование кренированных клеток-эхиноцитов. В присутствии 0,7 М NaCl и выше клетки начинают трансформироваться в уплощенные диски с гладкой поверхностью. Переходным типом между эхиноцитами и уплощенными гладкими клетками являются кренированные дискоидные клетки. Помимо этого в интервале концентраций 0,6—1,0 М NaCl отмечается формирование деформированных клеток со складками на поверхности (рис. 1).

Оценка изменений объема клеток в эксперименте производилась по гематокриту — показателю, который частично отражает особенности приобретенной клетками формы. Полученные данные представлены на рис. 2. В целом изменения гематокрита при 37 °C и 0 °C совпадают с фазой кренирования клеток, и этот показатель остается относительно стабильным при формировании «гипертонического» типа уплощенных гладких клеток.

В связи с выявленными особенностями изменений макроскопических параметров эритроцитов в гипертонических условиях возникает вопрос, как эти изменения, развивающиеся на начальных этапах инкубации, могут быть связаны с поведением клеток при последующем охлаждении.

Как видно из данных, представленных на рис. 3, охлаждение эритроцитов от 37 до 0 °C в растворах NaCl с тоничностью 0,15—1,0 М NaCl приводит к гемолизу клеток только при повышении тоничности выше 0,6 М. Это совпадает с концентрационным интервалом, в котором формируется характерный тип клеток, представляющий собой уплощенные диски с гладкой поверхностью («гипертонические» клетки, рис. 1). Подоб-

ная корреляция позволяет сделать вывод о том, что именно этот тип клеток является сенсibilизированным к охлаждению. Однако остается неясным, какие структурные изменения сопровождают формирование гладких плоских клеток и с чем связана их повышенная чувствительность к охлаждению.

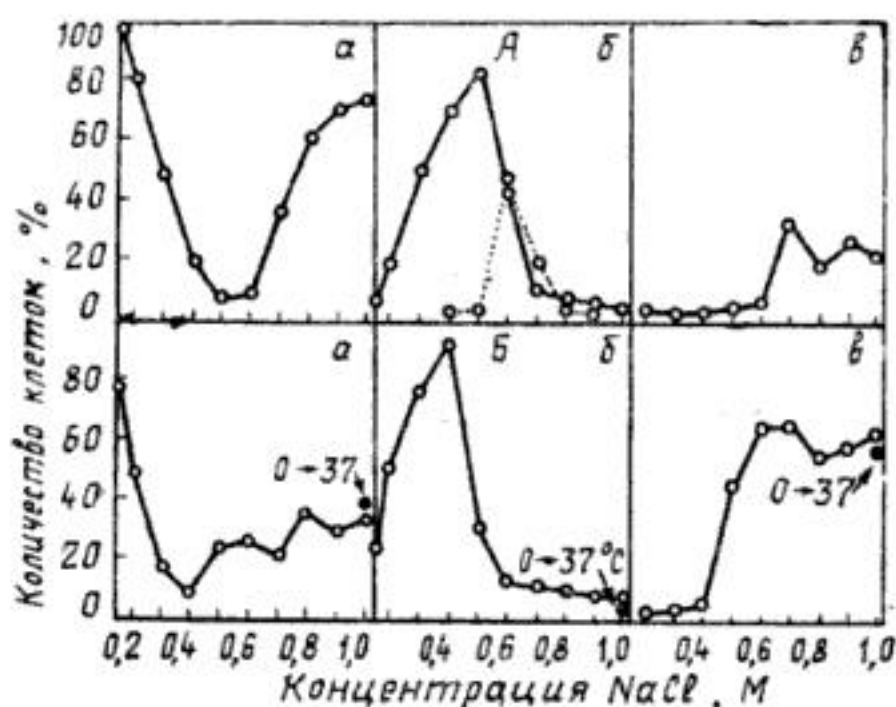


Рис. 1. Изменение формы эритроцитов при 37 °C (А) и 0 °C (Б) в процессе 10 мин инкубации с 0,15—1,0 М NaCl:

а — клетки с гладкой поверхностью (заштрихованы дискоциты); б — эхиноциты (пунктиром обозначены округлые кренированные клетки); в — клетки со складками на поверхности. Заштрихованный квадрат обозначает изменение формы при изменении температуры инкубации 0—37 °C в присутствии 1,0 М NaCl (через 10 мин. после достижения конечной температуры).

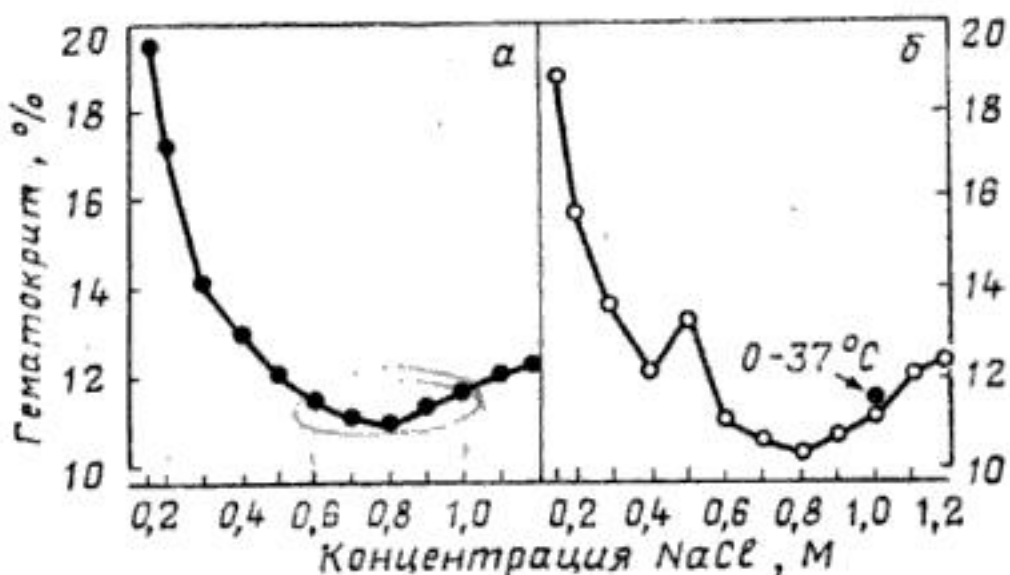


Рис. 2. Изменение гематокрита клеточной суспензии в процессе 10 мин инкубации эритроцитов с 0,15—1,2 М NaCl;

а — инкубация при 37 °C. (Заштрихованы изменения гематокрита дискоидных клеток перед фазой кренирования). Заштрихованный кружок обозначает изменение гематокрита при изменении температуры инкубации 0—37 °C в присутствии 1,0 М NaCl в тех же условиях, что на рис. 1.

Инкубация эритроцитов при 37 °C в растворах NaCl с различной тоничностью приводит к освобождению в среду ионов K⁺ при повышении тоничности выше 0,7—0,8 М NaCl (рис. 3). Это совпадает с концентрационным интервалом трансформации формы клеток из эхиноцитов в сенсibilизированный тип плоских клеток с гладкой поверхностью. В этой области концентраций наблюдается также стабилизация клеточного объема (рис. 2).

Нами проведены эксперименты, в которых одновременно с охлаждением эритроцитов от 37 до 0 °C изменялась тоничность среды от 1,2 М NaCl до различных

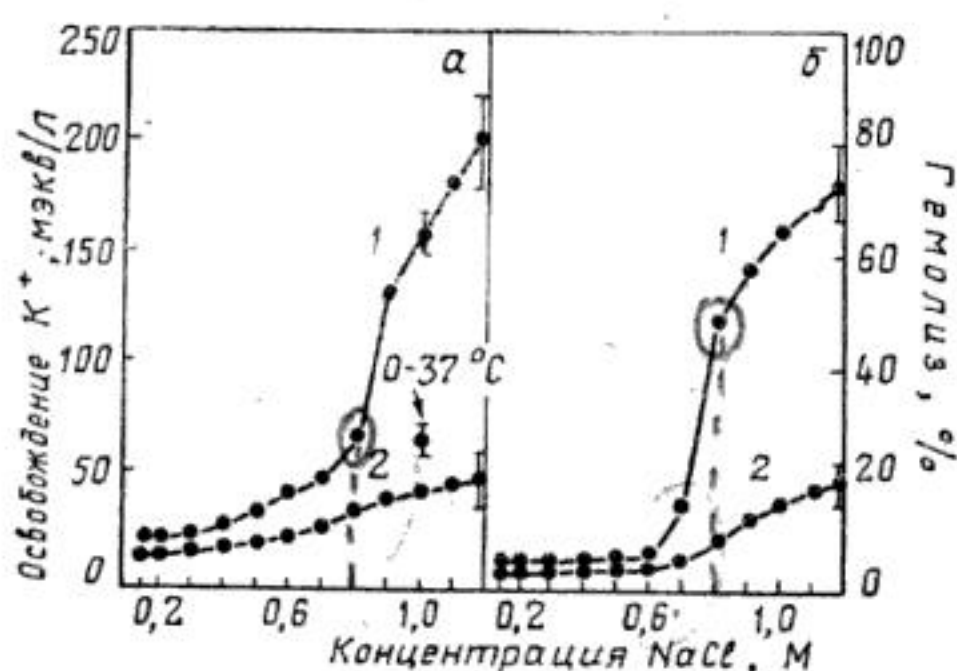


Рис. 3. Освобождение ионов K^+ (а) на предварительном этапе инкубации при 37 (1) и 0 °C (2) и уровень гемслиза эритроцитов (б) при их последующем охлаждении от 37 до 0 °C (1) и в цикле изменения температуры 0—37—0 °C (2). Заштрихованный кружок обозначает уровень освобождения K^+ при изменении температуры инкубации 0—37 °C в присутствии 1,0 М NaCl. Время инкубации на всех этапах — 10 мин.

значений в интервале 0,15—1,0 М NaCl, т. е. в данном случае постоянной была величина тоничности на начальном этапе при 37 °C (1,2 М NaCl) и она изменялась при 0 °C.

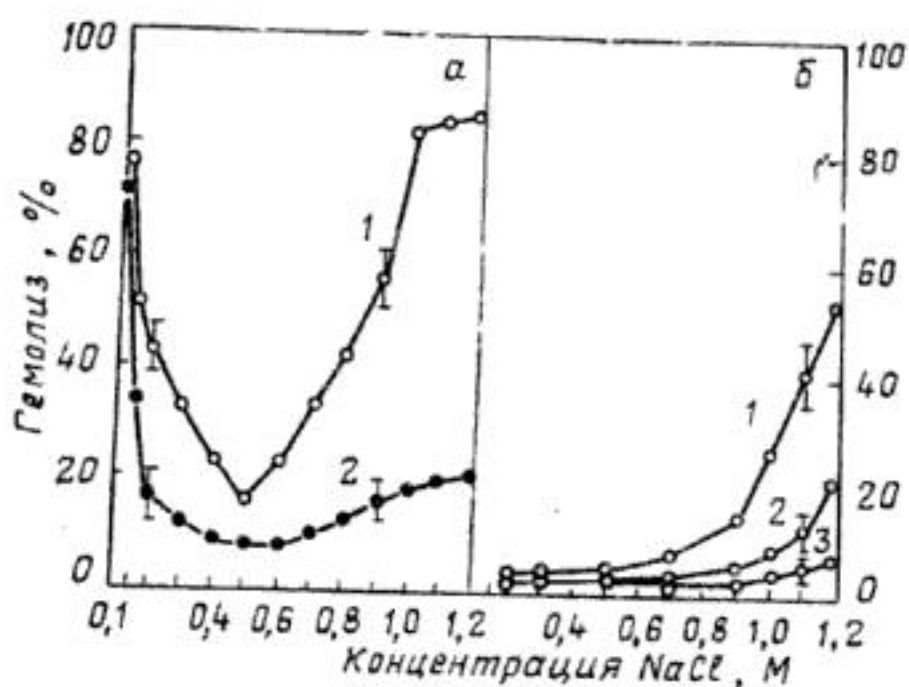


Рис. 4. Уровень постгипертонического лизиса эритроцитов в зависимости от концентрации NaCl в ресуспенсирующей среде при переносе из 1,2 М NaCl (а) и концентрации NaCl в исходной среде при переносе в 0,15 М NaCl (б);

а) 1 — гемоллиз при комбинированном изменении тоничности и охлаждении 37—0 °C; 2 — то же в случае клеток, преинкубированных при 0 °C; б) 1 — то же, что в а, 1; 2 — гемоллиз при изменении тоничности при 0 °C; 3 — гемоллиз при изменении тоничности при 37 °C. Комбинированное охлаждение и изменение тоничности достигалось добавлением 10-кратного избытка солевой среды с соответствующей температурой. Продолжительность инкубации на всех этапах 10 мин.

Из представленных данных (рис. 4а) видно, что результирующий гемоллиз клеток при одновременном охлаждении и разведении зависит от конечного значе-

ния тоничности. После одновременного охлаждения до 0 °C с разведением среды до 0,5—1,0 М NaCl наблюдается снижение гемолиза. При более низких значениях тоничности гемоллиз возрастает. Левое плечо кривой (0,15—0,5 М NaCl) фактически отражает постгипертонический лизис эритроцитов, повышение концентрации NaCl выше 0,5 М приводит к развитию гипертонического холодового шока.

Следует отметить ряд особенностей наблюдаемой реакции эритроцитов на охлаждение и изменение осмотических условий среды. При сопоставлении результатов на рис. 4а с данными, представленными на рис. 2, видно, что постгипертонический лизис клеток развивается в интервале тоничности, в котором клетки должны восстанавливать свой объем (0,15—0,5 М NaCl), а также выходить из фазы кренирования и восстанавливать дискоидную форму (рис. 1). Снижение тоничности среды в фазе охлаждения и при низкотемпературной инкубации (0 °C) до 0,5—1,0 М NaCl, т. е. до значений, при которых объем клеток не изменяется, сопровождается уменьшением величины гемолиза. Т. о. видим, что значение повышенной осмолярности среды не исчерпывается влиянием этого фактора на состояние клеток на предварительном этапе.

Иная картина наблюдается в случае, когда клетки, преинкубированные при 37 °C в растворах NaCl различной тоничности (0,15—1,2 М) охлаждали до 0 °C, одновременно выравнивая тоничность среды во всех случаях до 1,2 М (рис. 4). Видно, что гемоллиз развивается в интервале концентраций 0,6—1,2 М NaCl, в котором формируется «сенсibilизированный тип клеток с дефектами структуры, через которые освобождаются ионы K^+ ».

Из данных, представленных на рис. 4б, видно, что интервал концентрации соли, в которой клетки сенсibilизируются к переносу в 0,15 М NaCl при изменении начальной тоничности среды (при фиксированной конечной концентрации) совпадает с интервалом, в котором отмечено появление «гипертонических» плоских клеток с гладкой поверхностью 0,6—1,0 М (рис. 1) и дефектами структуры (рис. 3). Следует отметить, что постгипертонический лизис эритроцитов практически не развивается в изотермических условиях при 37 °C и относительно слабо выражен при 0 °C. Мак-

симальный эффект наблюдается при охлаждении ($37 \rightarrow 0^\circ\text{C}$) и восстановлении физиологической тоничности среды, когда эти изменения происходят одновременно.

В этой связи представляют интерес данные о влиянии тоничности среды на уровень освобождения ионов K^+ при 0°C , при переносе клеток из 0 в 37°C (рис. 3), а также данные о гемолизе клеток при циклическом сдвиге температуры $0 \rightarrow 37 \rightarrow 0^\circ\text{C}$, когда можно оценить

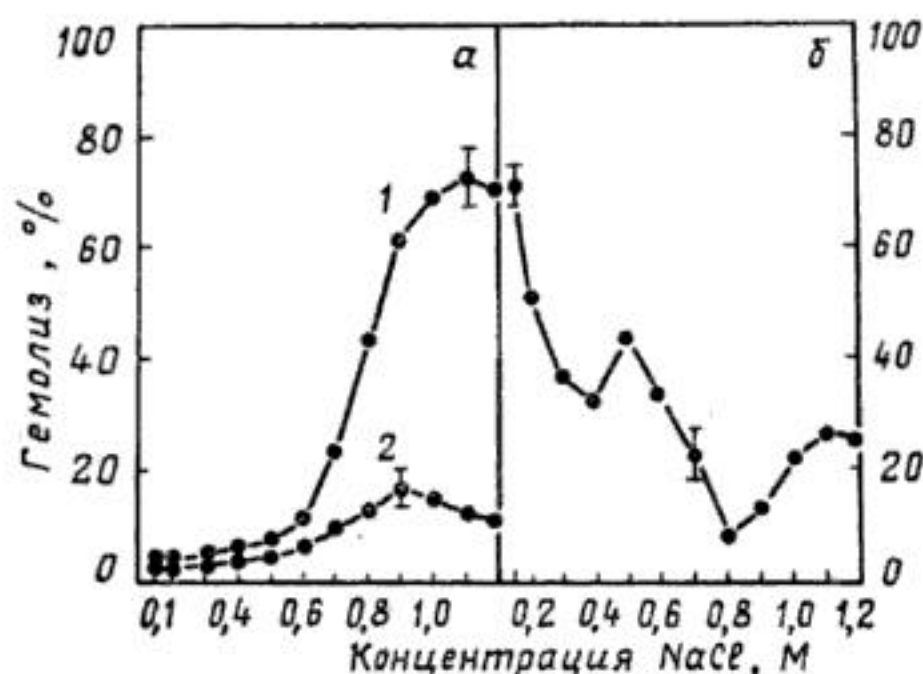


Рис. 5. Уровень гемолиза эритроцитов после охлаждения от 37 до 0°C в средах с различной тоничностью и выравнивания тоничности при 0°C во всех образцах до $1,2\text{ M NaCl}$ (а), а также гемолиз клеток, подвергнутых инкубации при 0°C с $0,15 - 1,2\text{ M NaCl}$, с последующим выравниванием тоничности при 37°C до $1,2\text{ M NaCl}$, и охлаждением до 0°C (б);

а) 1 — охлаждение от 37 до 0°C ; 2 — то же после преинкубации при 0°C . Время инкубации на всех этапах 10 мин. Изменение температуры и тоничности достигалось добавлением 10-кратного избытка солевой среды.

влияние температуры на начальную дефектность структуры клеток (рис. 5б). Видно, что при 0°C начальный уровень освобождения ионов K^+ существенно ниже, чем при 37°C . Подобное состояние клетки сохраняют и при последующем переносе из 0 в 37°C , когда инкубация при этой температуре (на всех этапах период инкубации составлял 10 мин) не приводит к значительному дополнительному освобождению ионов K^+ (рис. 3). Более низкая дефектность структуры эритроцитов, преинкубированных при 0°C коррелирует с низким уровнем гемолиза при их охлаждении от 37 до 0°C (рис. 3). Хотя не совсем ясно, с чем связана устойчивость состояния приобретенного клетками при 0°C , при их последующем переносе в 37°C , можно сделать вывод, что при низкой температуре начальная нуклеация дефектов структуры под влиянием гипертонии затруднена. Оценка изменений формы клеток в процессе их гипертонической инкуба-

ции при 0°C (рис. 1) позволяет отметить несколько особенностей. Как видно из данных на рис. 1, при 0°C резко снижается пропорция «гипертонических» клеток с гладкой поверхностью и возрастает число формирующихся из эхиноцитов деформированных складчатых клеток. Помимо этого при 0°C отсутствует переходной тип кренированных плоских дисков и несколько сдвигается концентрационный интервал формирования эхиноцитов. В целом на основании этих данных можно сделать вывод, что величина холодового гемолиза эритроцитов соответствует количеству сенсibilизированных клеток, сформировавшихся на предварительном этапе инкубации. При этом обратимость изменений формы и объема клеток при реверсии температуры $0-37^\circ\text{C}$ является низкой.

Обсуждение полученных результатов. Известно, что холодовый шок (или криогемолиз [5]) эритроцитов наблюдается не только в гипертонических условиях, но и под влиянием самых различных факторов: бактериальных токсинов [13], продуктов окисления [12], короткоцепочных фосфолипидов [8, 14] и лизофосфатидов [16]. Помимо этого эритроциты характеризуются высокой чувствительностью к переносу из гипертонических условий в изотонические [18].

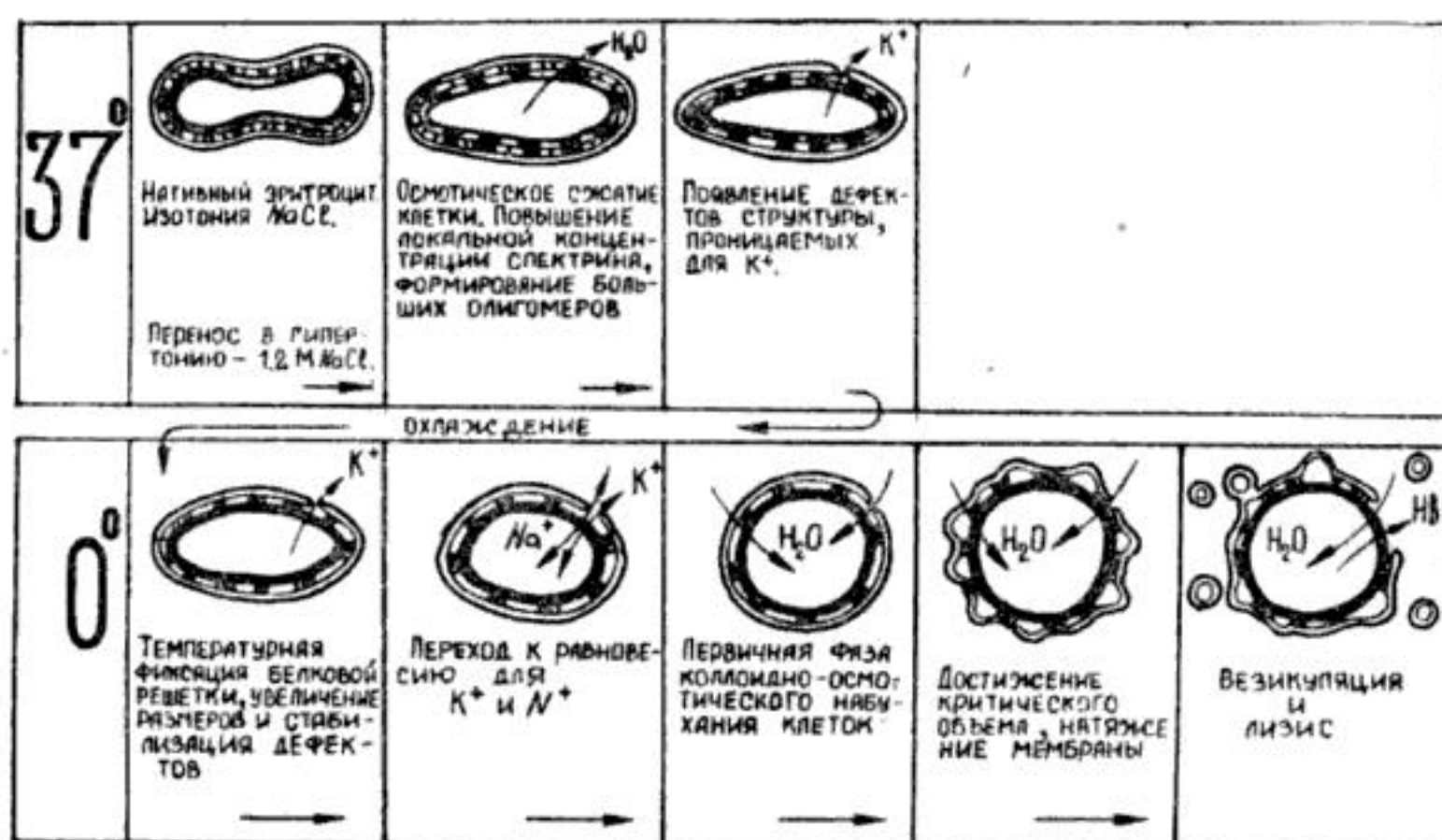
Отсутствие специфичности в действии факторов, вызывающих появление у эритроцитов чувствительности к холодовому шоку (сенсibilизацию) свидетельствует, что в основе повышенной чувствительности клеток лежит единый механизм, связанный с изменением структуры мембраны. Полученные нами данные показывают, что в гипертонических условиях появление чувствительности к охлаждению наблюдается в интервале концентраций электролита, в котором формируются дефекты структуры, проницаемые для ионов K^+ . В этой области концентраций клетки также становятся чувствительными к переносу в начальные изоосмотические условия. Из полученных нами данных следует, что уровень повреждения эритроцитов при изменении температурных и осмотических условий среды зависит от следующих начальных параметров клеток: 1. Уровня исходной дефектности структуры, определяемой по проницаемости для ионов K^+ ; 2. Начального объема.

Начальное состояние повышенной ионной проницаемости является существенным фактором, т. к. является предпо-

сылкой к развитию коллоидно-осмотического набухания клеток при переходе к равновесному распределению ионов и низкомолекулярных неэлектролитов.

Роль этого фактора в механизме холодого и осмотического повреждения эритроцитов становится понятной, если предположить, что механизм повреждения связан с начальным формированием (нуклеацией) дефектов, а последующий их рост и стабилизация при изменении условий среды приводят к лизису клеток.

раженных фаз трансформации формы (процесса, в котором определяющую роль играют белки цитоскелета) [6, 9], при помещении клеток в гипертонические условия показывает, что при реверсии условий должны восстанавливаться объем и форма как внутренней трехмерной белковой решетки, так и наружной липидной мембраны. Однако изменения объема и формы клеток, развивающиеся при переносе «изотонических» клеток в гипертонические условия при 0 °С, явля-



Если в начальных условиях дефекты являются временными, низкая температура может влиять на процесс их замыкания, замедляя или предотвращая его. В этом случае при низкой температуре следует ожидать лизиса клеток по коллоидно-осмотическому механизму, обусловленному переходом к равновесному распределению K⁺ и Na⁺ и появлению избыточного осмотического давления, связанного с наличием внутриклеточного гемоглобина [17]. Не менее важную роль должен играть начальный объем клеток. Это связано с тем, что эритроцит представляет собой трехмерную липидную везикулу с «вложенной» в нее трехмерной белковой решеткой [6, 9, 11]. В интервале —20 ÷ +37 °С температура оказывает относительно слабое влияние на состояние липидов мембраны эритроцитов [4], однако в этих условиях резко изменяется состояние белков, включенных в решетку [15].

При сопоставлении данных, представленных на рис. 1, 2 и 4, видно, что постгипертонический гемолиз эритроцитов развивается в интервале концентраций NaCl, в котором клетки должны обратимо увеличивать свой объем и выходить из фазы кренирования. Наличие четко вы-

ются слабообратимыми даже при 37 °С. Так как уровень нуклеации дефектов при 0 °С ниже, чем при 37 °С, это проявляется в падении уровня гемолиза при циклическом сдвиге температуры 0 → 37 → 0 °С.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что при низкой температуре «фиксируется» объем и форма белковой решетки, т. е. резко снижается способность клетки восстанавливать объем в фазе набухания. Быстрое охлаждение эритроцитов от 37 до 0 °С в гипертонических средах соответствует переносу в описанные выше условия, когда низкая температура «фиксирует» начальный редуцированный объем трехмерной белковой решетки обезвоженных клеток. Если в этих условиях замедляется скорость замыкания предсуществующих дефектов (а это показано на тенях эритроцитов [7]), состояние повышенной проницаемости мембраны приведет к уравниванию электролитов и в последующей фазе клетки должны набухать по коллоидно-осмотическому механизму. Однако в отличие от обычных условий, когда набухание липидной мембраны и белковой решетки происходит одновременно, в данном случае набухание ли-

липидной мембраны в областях контакта с обездвиженной белковой сетью будет ограничено. «Критическая» фаза повреждения будет соответствовать условиям, когда мембрана не сможет набухать дальше и через нее установится градиент осмотического давления, переход которого через небольшой интервал приведет к лизису.

Белковая решетка ассоциирована с мембраной точечными контактами [9], поэтому наиболее вероятно, что повреждение, развивающееся при натяжении мембраны, будет носить локальный характер и проявляться в формировании везикул, представляющих собой участки мембраны, края которых закреплены на неподвижных белковых «якорях». Так как в осмотически сжатых клетках возникает избыток поверхностной площади наружной липидной мембраны, процесс везикуляции может быть циклическим и проявляться в чередовании фаз отщепления везикул и замыкания мембраны.

Таким образом, чем меньше исходный объем клеток перед охлаждением, тем более выраженным будет их лизис при низкой температуре, что связано с уменьшением критического гемолитического объема в фазе коллоидного-осмотического набухания. Возможный механизм повреждения эритроцитов представлен на схеме. Сокращение белковой решетки в присутствии повышенных концентраций солей не полностью связано с осмотическими факторами, и в значительной степени обусловлено электростатическим механизмом экранировки заряженных групп белков при повышении ионной силы [9]. В этом состоит отличие данного процесса от осмотического сжатия липидных везикул. Помимо того обезвоживание эритроцитов в условиях осмотического сжатия может привести к резкому возрастанию локальной концентрации ос-

новного компонента белковой решетки — спектрина. В таком случае следует ожидать сдвига в соотношении между димерами, тетрамерами и олигомерными формами белка в сторону формирования больших олигомеров [11]. При низкой температуре высокая пропорция олигомеров сохраняется часами [6, 11], в то время как при высокой температуре наблюдается их диссоциация. Именно этот фактор может лежать в основе обнаруженного нами явления низкотемпературной фиксации объема и формы белковой решетки, когда может происходить укрупнение «узлов», формирующих белковую решетку. При снижении температуры устойчивая структура олигомерных белков приводит к фиксации решетки в некотором минимальном объеме. Как видно из данных, представленных на рис. 5б, величина гемолиза эритроцитов, преинкубированных при 0 °C в растворах NaCl различной концентрации (10 мин), и затем охлажденных от 37 до 0 °C с 1,2 М NaCl отражает особенности изменений объема и формы клеток при 0 °C.

Оценивая результаты, можно предположить, что в процессе замораживания конечное значение температуры (по крайней мере в интервале 0 ÷ -30 °C) можно рассматривать как параметр, задающий соответствующее значение осмолярности среды и соответственно уровень дефектности структуры и объем белковой решетки, относящиеся к последующей фазе отогрева, когда повреждение будет развиваться по постгипертоническому механизму.

В целом можно утверждать, что молекулярная структура мембраны определяется ее механическим состоянием, т.е. имеет место взаимосвязь между молекулярными и макроскопическими свойствами мембраны.

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — 255 с.
2. Лев А.А. Ионная избирательность клеточных мембран. — Л.: Наука, 1975. — 323 с.
3. Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 343 с.
4. Gottlieb W.H., Eanes E.D. On phase transitions in erythrocyte membranes and extracted membrane lipids. — Biochim. biophys. acta, 1974, 373, N 3, p. 519—522.
5. Green F.A., Yung C.Y. Cold-induced haemolysis in a hypertonic milieu. — J. Membr. Biol., 1977, 33, p. 249—262.

6. Haest C.W.M. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic membrane domains. — Biochim. biophys. acta, 1982, N 4, p. 331—352.
7. Johnson R.M. The kinetics of resealing of washed erythrocyte ghosts. — J. Membrane Biol., 1975, 22, N 3—4, p. 231—253.
8. Kitagawa T., Tanaka Y., Inoue K., Nojima S. Effect of temperature and bovine serum albumin on lysis of erythrocytes induced by dilauroyl glycerophosphocholine and didecanoglycerophosphocholine. — Biochim. biophys. acta, 1977, 467, N 2, p. 137—145.
9. Lange Y., Hadesman R.A., Steck T.L. Role of the reticulum in the stability and shape of the isolated human erythrocyte

- membrane.— J. Cell. Biol., 1982, 92, N 3, p. 714—722.
10. Lee A.G. Lipid phase transitions and phase diagrams. I. Lipid phase transitions. — Biochim. Biophys. acta, 1977, 472, N 2, p. 237—281.
 11. Marchesi V.T. The red cell membrane skeleton: recent progress. — Blood, 1983, 61, N 1, p. 1—12.
 12. Meduski K.W., Hochstein P. Hot-cold haemolysis: the role of positively charged membrane phospholipids. — Experientia, 1972, 28, N 5, p. 565—566.
 13. Smyth C.J., Mollby R., Wadstrom T. Phenomenon of hot-cold haemolysis: chelator induced lysis of sphingomyelinase-treated erythrocytes. — Infect. Immun., 1975, 12, N 5, p. 1104—1111.
 14. Tanaka Y., Inoue K., Nojima S. Interaction of dilaurilglycerophosphocholine with erythrocytes. Pre-hemolytic events and haemolysis. — Biochim. biophys. acta, 1980, 600, N 1, p. 126—139.
 15. Verma S.P., Wallach D.F. Erythrocyte membranes undergo cooperative, pH-sensitive state transitions in the physiological temperature range: Evidence from Raman spectroscopy. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73, N 10, p. 3558—3561.
 16. Weltzieu H.U. Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. — Biochim. Biophys. acta, 1979, 559, N 2—3, p. 259—287.
 17. Willbrandt W. Osmotischen natur sogennante nicht-osmotischen hemolyse. — Pflugers. Arch. Gesamte Physiol., 1941, 245, N 1, p. 22—52.
 18. Woolgar E.A., Morris G. J. Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on posthypertonic hemolysis of human red blood cells. — Cryobiology, 1973, N 10, p. 82—86.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, г. Харьков

Поступила 27.09.84

УДК 57.043:577.15:612.111

Н. Р. Гусева, В. И. Луговой

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА РЕСУСПЕНДИРУЮЩИХ СРЕД НА СОХРАННОСТЬ РАЗМОРОЖЕННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ +4°C

Количественные и качественные вариации основных компонентов раствора

Наличие и прогрессирование структурных криповреждений эритроцитарных мембран является основной причиной ускоренной деградации эритроцитов после криоконсервирования [11]. Это ограничивает срок годности клеток для трансфузий [3, 6] и препятствует их широкому практическому использованию. В связи с этим для более длительного сохранения структурно-функциональной полноценности размороженных эритроцитов необходимо, в первую очередь, обеспечить стабилизацию мембранных структур с латентными повреждениями, создать условия для замедления гемолиза и поддержания метаболизма клеток. В решении этой задачи важное значение имеет состав раствора для ресуспендирования и последующего хранения размороженных — отмытых эритроцитов при +4°C.

Количество веществ, применяющихся в настоящее время в различных сочетаниях в качестве основных компонентов стандартных ресуспендирующих сред, весьма ограничено: электролиты (NaCl), обеспечивающие изотонию среды и осмотические свойства клеток, неоргани-

ческий фосфат и глюкоза, обладающие положительным метаболическим эффектом непроникающие сахара, повышающие резистентность мембраны и отдаляющие развитие гемолиза. Основным направлением усовершенствования растворов является включение в их состав непроникающих высокомолекулярных компонентов, обладающих неспецифическим стабилизирующим действием на частично поврежденную мембрану: сахаров, белков, полимеров [1,8].

Задача данной работы состояла в том, чтобы изучить и оценить динамику основных биохимических показателей структурно-функциональной полноценности размороженных эритроцитов в процессе хранения при +4°C в зависимости от изменений качественного состава и количественных соотношений основных компонентов стандартных ресуспендирующих растворов.

Эритроциты донорской крови, заготовленной на ЦОЛИПК 76, криоконсервировали по методу ЦНИИГПК [3] под защитой 15 % глицерина при —196°C. Размороженные-деглицеринизированные клетки ресуспендировали в равных объемах соответствующих растворов (конечный показатель гематокрита 30—36 об. %) и хранили в течение 5 суток при +4°C. Концентрацию

гемоглобина в клетках определяли гемоглобинцианидным методом, содержание ионов K^+ во внеклеточной среде — методом пламенной фотометрии, а количество свободного гемоглобина — на основании колориметрического определения процента относительного гемолиза клеток. Содержание АТФ в эритроцитах измеряли в гексокиназной реакции [9], 2,3-ДФГ — колориметрически [4]. Все измерения проводили до криоконсервирования и через 1 и 5 суток хранения размороженных — отмытых — ресуспендированных клеток при $+4^\circ C$.

В настоящее время общепринятым за рубежом является ресуспендирующий раствор NaГФ — 0,15 М NaCl, обогащенный глюкозой (0,2 %) и Na_2HPO_4 (0,065 %) [6]. Наиболее эффективный отечественный раствор-сахарозно-фосфатно-солевая среда № 8^в [3]. На первом этапе работы было проведено сравнительное изучение этих двух стандартных растворов, а также эффекты обогащения их «недостающими» основными компонентами, в частности, добавления глюкозы (0,2 %) или маннитола (1 % и 2 %) в раствор 8^в и введения маннитола (1 %, 2 % и 3,5 %) в среду NaГФ.

Эксперименты показали (табл. 1), что в течение 5 суток хранения размороженных эритроцитов при $+4^\circ C$ содержание свободного гемоглобина в надосадке клеток, ресуспендированных в растворе 8^в, было в несколько раз ниже, чем в NaГФ. Очевидно, что значительное замедление гемолиза эритроцитов в среде 8^в (по сравнению с раствором NaГФ), обусловлено положительным эффектом входящей в его состав сахарозы, ослабляющей коллоидно-осмотическое набухание клеток с аномально-проницаемыми мембранами [12], благодаря чему снижается гемолиз эритроцитов после оттаивания. В то же время утечка ионов K^+ из клеток, суспендированных в растворе NaГФ, достоверно слабее, чем в среде 8^в. Потери гемоглобина и K^+ размороженными эритроцитами являются проявлением скрытых криоповреждений клеточной мембраны, свидетельствуют о нарушении ее целостности и функциональных свойств.

Причиной отсутствия корреляции между утечкой гемоглобина и K^+ из размороженных эритроцитов может быть различие механизмов поддержания барьерных свойств мембраны для макромо-

лекул и ионов. В норме эритроциты абсолютно непроницаемы для белков и, в частности, для гемоглобина. Выход его из размороженных клеток происходит вследствие нарушения целостности мембраны и является необратимым процессом. В то же время физиологическая непроницаемость эритроцитов для катионов, в частности, для K^+ , относительна и поддерживается за счет динамического равновесия пассивной диффузии K^+ из клетки вдоль градиента концентрации и активного транспорта K^+ в клетку против концентрационного градиента, сопряженного с потреблением энергии АТФ в реакции $Na^+ - K^+ - АТФ$ -азы, а значит, непосредственно связанного с метаболизмом эритроцита.

Нарушение катионного баланса размороженных эритроцитов (потеря ионов K^+) связано, очевидно, с усилением пассивного выхода ионов через поврежденную мембрану. Однако степень утечки в данном случае зависит не только от выраженности мембранных дефектов, но и от состояния энергозависимой мембранной системы активного транспорта, функциональной активностью которой определяется уровень возможной компенсации катионных сдвигов. Не исключено, что уменьшение потерь ионов K^+ из эритроцитов, хранившихся в растворе NaГФ, (по сравнению со средой 8^в), обусловлено как присутствием глюкозы — основного субстрата метаболизма эритроцитов, так и более физиологичным ионным составом среды.

Введение маннитола в состав обеих сред ведет к дополнительному ослаблению гемолиза клеток после криоконсервирования. Этот эффект более ярко выражен при включении маннитола в среду NaГФ (не содержащую стабилизирующие мембрану непроницающие компоненты): чем выше содержание маннитола в растворе, тем меньше гемолиз клеток. Однако при добавлении в NaГФ маннитола обнаружена тенденция к усилению утечки ионов K^+ из эритроцитов, что свидетельствует о весьма сложной взаимосвязи нарушений структурных параметров и функциональных свойств мембраны в размороженных клетках и требует дополнительного изучения.

Хранение эритроцитов после криоконсервирования 5 суток при $+4^\circ C$ как в растворе NaГФ, так и в 8^в, ведет к снижению уровней АТФ и 2,3-ДФГ в клетках (табл. 1). Во всех средах в большей степени истощается 2,3-ДФГ

Таблица 1. Влияние дополнения ресуспендирующих сред сахарами на утечку гемоглобина, ионов K^+ и содержание КТФ, 2,3-ДФГ в размороженных эритроцитах в процессе хранения при $+4^\circ C$

	Гемоглобин (мг%)		Ионы K^+ (мэкв/л)		АТФ (мМ/г Нв)		2,3-ДФГ		(мМ/г Нв)	
	Срок хранения при $+4^\circ C$ после криоконсервации									
	1 сутки	5 суток	1 сутки	5 суток	1 сутки	5 суток	1 сутки	5 суток	1 сутки	5 суток
$N_2\ 8^B$	$122,0 \pm 4,9$	$209,4 \pm 7,9$	$0,96 \pm 0,06$	$8,60 \pm 0,50$	$5,18 \pm 0,33$ $p_K > 0,1$ 96,3 %	$3,50 \pm 0,26$ $p_K < 0,05$ 65,0 %	$8,41 \pm 0,59$ $p_K < 0,01$ 70,0 %	$4,77 \pm 0,56$ $p_K < 0,001$ 39,7 %		
$N_2\ 8^B + 0,2\ %$ глюкоза	$104,2 \pm 7,0$ $p_1 < 0,1$	$198,7 \pm 8,8$ $p_1 > 0,1$	$0,94 \pm 0,06$ $p_1 > 0,1$	$8,35 \pm 0,42$ $p_1 > 0,1$	$4,82 \pm 0,46$ $p_K > 0,1$ 89,6 %	$4,18 \pm 0,36$ $p_K < 0,05$ 77,7 %	$11,74 \pm 0,88$ $p_K > 0,1$ 97,8 %	$7,45 \pm 0,47$ $p_K < 0,001$ 62,0 %		
$N_2\ 8^B + 1\ %$ маннитол	$98,6 \pm 6,9$ $p_1 < 0,02$	$174,7 \pm 8,6$ $p_1 < 0,02$	$1,05 \pm 0,10$ $p_1 > 0,1$	$8,72 \pm 0,60$ $p_1 > 0,1$						
$N_2\ 8^B + 2\ %$ маннитол	$96,9 \pm 9,8$ $p_1 < 0,05$	$182,9 \pm 8,4$ $p_1 < 0,02$	$0,98 \pm 0,06$ $p_1 > 0,1$	$8,80 \pm 0,81$ $p_1 > 0,1$	$5,09 \pm 0,29$ $p_K > 0,1$ 94,6 %	$3,72 \pm 0,29$ $p_K < 0,02$ 69,1 %	$8,52 \pm 0,68$ $p_K < 0,01$ 70,9 %	$5,45 \pm 0,48$ $p_K < 0,001$ $p_1 > 0,1$ 45,4 %		
$Na\ ГФ$	$803,9 \pm 22,4$ $p_1 < 0,001$	$1041,0 \pm 11,4$ $p < 0,001$	$0,85 \pm 0,08$ $p_1 > 0,1$	$5,43 \pm 0,47$ $p_1 < 0,001$	$5,89 \pm 0,46$ $p_K > 0,1$ 109,4 %	$4,12 \pm 0,38$ $p_K < 0,05$ 76,5 %	$12,27 \pm 0,90$ $p_K > 0,1$ 102,2 %	$8,21 \pm 0,57$ $p_K < 0,01$ $p_1 < 0,02$ 68,4 %		
$Na\ ГФ + 1\ %$ маннитол	$349,6 \pm 22,3$ $p_1 < 0,001$ $p_5 < 0,001$	$610,4 \pm 27,4$ $p_1 < 0,001$ $p_5 < 0,001$	$0,94 \pm 0,07$ $p_1 > 0,1$ $p_5 > 0,1$	$6,32 \pm 0,40$ $p_1 < 0,05$ $p_5 < 0,05$						
$Na\ ГФ + 2\ %$ маннитол	$127,6 \pm 8,1$ $p_1 > 0,1$ $p_5 < 0,001$	$354,1 \pm 20,2$ $p_1 < 0,001$ $p_5 < 0,001$	$0,93 \pm 0,05$ $p_1 > 0,1$ $p_5 > 0,1$	$6,70 \pm 0,51$ $p_1 < 0,05$ $p_5 < 0,05$	$5,92 \pm 0,49$ $p_K > 0,1$ 110,0 %	$3,70 \pm 0,32$ $p_K < 0,02$ 68,8 %	$12,07 \pm 0,93$ $p_K > 0,1$ 100,5 %	$6,78 \pm 0,46$ $p_K < 0,001$ $p < 0,05$ 56,2 %		
$Na\ ГФ + 3,5\ %$ маннитол	$112,5 \pm 8,3$ $p_1 > 0,1$ $p_5 < 0,001$	$314,9 \pm 18,9$ $p_1 < 0,001$ $p_5 < 0,001$	$0,95 \pm 0,06$ $p_1 > 0,1$	$7,50 \pm 0,56$ $p_1 > 0,1$	$5,94 \pm 0,42$ $p_K > 0,1$ 110,4 %	$3,47 \pm 0,32$ $p_K < 0,02$ 64,5 %	$11,35 \pm 0,84$ $p_K > 0,1$ 94,5 %	$6,45 \pm 0,51$ $p_K < 0,001$ $p_1 < 0,05$ 53,7 %		

Примечание: в эритроцитах до криоконсервирования содержание АТФ— $5,38 \pm 0,36 \mu M/g$ Нв. 2,3-ДФГ— $12,0 \pm 0,5 \mu M/g$ Нв (контроль = 100%).

(более, чем на 50 %), а содержание АТФ превышает 50 % от исходного. Однако в растворе NaГФ уровни обоих органических фосфатов эритроцитов выше, чем в среде 8^в.

Сохранение важнейших метаболитов эритроцитов при использовании раствора NaГФ (по сравнению с 8^в) сочетается с замедлением утечки ионов K⁺. Возможно, что более физиологичный ионный состав, а также присутствие фосфата и глюкозы обеспечивает высокую эффективность среды NaГФ с точки зрения поддержания основных продуктов метаболизма эритроцитов в условиях значительного ослабления обменных процессов при +4 °С. Это может замедлять прогрессирование катионных нарушений как путем повышения уровня энергозависимой компенсации пассивной утечки, при расщеплении АТФ в реакции Na⁺—K⁺—АТФ-азы, так и при участии 2,3-ДГФ — важнейшего поливалентного аниона, контролирующего внутриклеточную осмолярность [7].

Введение в ресуспендирующие среды маннитола не оказывает влияния на содержание АТФ и 2,3-ДГФ эритроцитов. Обогащение раствора 8^в глюкозой достоверно замедляет истощение фосфатов: в течение 5 суток хранения при +4 °С в этой среде, в клетках поддерживается более высокий уровень АТФ, чем в 8^в, а содержание 2,3-ДГФ соответствует таковому в растворе NaГФ. Этот результат подтверждает наши выводы об эффективности раствора NaГФ с точки зрения метаболизма клеток.

Положительный метаболический эффект глюкозы и антигемолитическое действие сахарозы и маннитола свидетельствуют о необходимости сочетанного применения этих сахаров в составе ресуспендирующих сред.

Экспериментальные данные показали, что для уменьшения потерь гемоглобина и ионов K⁺ размороженными клетками необходимо присутствие в ресуспендирующем растворе непроникающих сахаров и электролитов соответственно. Однако осмолярность существующих сред определяется в основном NaCl и сахарозой, содержащимися в наиболее значительных количествах, что ограничивает пределы параллельного повышения концентрации обоих веществ в растворе. Поэтому важное значение приобретает вопрос об оптимальном количественном соотношении этих основных компонентов.

На втором этапе работы для ресус-

пендирования размороженных-отмытых эритроцитов использовали 5 вариантов растворов с различным количественным соотношением NaCl и сахарозы. Их взаимное отношение изменялось в сторону преобладания электролита за счет снижения концентрации сахара: содержание NaCl повышалось от 0,3 % до 0,77 %, а сахарозы пропорционально сокращалось от 7 % до 1,46 %. В работу не были включены «крайние» варианты растворов, основу которых составляет только один из этих компонентов, ввиду их явной неэффективности. Отсутствие стабилизирующих мембрану компонентов в электролитной среде NaГФ ускоряет гемолиз размороженных клеток (табл. 1). Аналогичные явления происходят, как известно, и при хранении клеток в ресуспендирующем растворе 8^в — изотонической среде, содержащей 8 % сахарозы (4/5 общей точности среды), но лишенной электролитов [2]. Отсутствие стабилизирующего эффекта сахарозы в этих условиях не случайно, поскольку даже изотоническая сахароза не способна предотвращать нарушения барьерных свойств клеток [5]. Для проявления защитного действия сахаров необходимо присутствие электролитов [12]. Решающую роль в снижении гемолиза и сохранении осмотических свойств клеток в гипотонических растворах сахарозы играет наличие в среде NaCl [10], причем стабилизирующий эффект пропорционален количественному содержанию электролита [5].

Эксперименты показали (табл. 2), что значительное уменьшение содержания сахарозы в ресуспендирующей среде приводит к достоверному усилению выхода гемоглобина из размороженных клеток (среда 4). Обогащение такой среды маннитолом 1 % полностью компенсирует недостаток более, чем 5,5 % сахарозы (по сравнению со средой 8^в), и способствует ослаблению гемолиза (среда 5). В то же время, по мере повышения концентрации NaCl, при одновременном снижении содержания сахарозы, достоверно уменьшаются потери ионов K⁺ клетками в процессе хранения их при +4 °С (в средах 3, 4, 5 по сравнению со средами 1 и 2). Непроникающие сахара, стабилизируя поврежденные при криоконсервировании эритроцитарные мембраны, ослабляют утечку гемоглобина. Повышение концентрации NaCl в растворе способствует поддержанию ионного состава клеток с нарушенной

Таблица 2. Утечка гемоглобина, ионов K^+ и содержание АТФ, 2,3-ДФГ в размороженных эритроцитах в процессе хранения при $+4^\circ C$ в ресуспендирующих средах с различным количественным соотношением основных компонентов

Среда ресуспен- дирования	Гемоглобин (мг%)		Ионы K^+ (мэкв/л)		АТФ ($\mu M/g$ Нв)		2,3-ДФГ ($\mu M/g$ Нв)	
	Срок хранения при $+4^\circ C$ после криоконсервации							
	1 сутки	5 суток	1 сутки	5 суток	1 сутки	5 суток	1 сутки	5 суток
№ 1	$98,7 \pm 6,3$	$225,6 \pm 12,4$	$1,42 \pm 0,01$	$9,47 \pm 0,35$	$5,57 \pm 0,23$ $p_K > 0,1$ 100 %	$3,67 \pm 0,25$ $p_K < 0,01$ 65,9 %	$6,11 \pm 0,49$ $p_K < 0,05$ 75,3 %	$2,86 \pm 0,26$ $p_K < 0,001$ 35,3 %
№ 2	$104,5 \pm 8,3$ $p > 0,1$	$235,4 \pm 11,4$ $p > 0,1$	$1,51 \pm 0,01$ $p > 0,1$	$10,38 \pm 0,4$ $p > 0,1$	$5,45 \pm 0,24$ $p_K > 0,1$ 97,3 %	$4,12 \pm 0,22$ $p_K < 0,01$ 75,6 %	$6,48 \pm 0,44$ $p_K < 0,05$ 80,0 %	$3,30 \pm 0,24$ $p_K < 0,001$ $p_1 > 0,1$ 41,6 %
№ 3	$92,2 \pm 6,2$ $p > 0,1$	$217,0 \pm 10,9$ $p > 0,1$	$1,27 \pm 0,04$ $p > 0,1$	$8,54 \pm 0,31$ $p < 0,1$	$5,42 \pm 0,41$ $p_K > 0,1$ 97,3 %	$3,96 \pm 0,27$ $p_K < 0,01$ 73,0 %	$7,93 \pm 0,53$ $p_K > 0,1$ 97,8 %	$5,05 \pm 0,43$ $p_K < 0,01$ $p_1 < 0,01$ 62,3 %
№ 4	$153,5 \pm 9,1$ $p < 0,001$	$363,2 \pm 12,7$ $p < 0,001$	$1,28 \pm 0,04$ $p > 0,1$	$8,70 \pm 0,34$ $p > 0,1$	$5,57 \pm 0,28$ $p_K > 0,1$ 100 %	$3,76 \pm 0,23$ $p_K < 0,001$ 68,2 %	$9,01 \pm 0,52$ $p_K > 0,1$ 111,2 %	$5,44 \pm 0,42$ $p_K < 0,01$ $p_1 < 0,001$ 67,1 %
№ 5	$89,2 \pm 5,9$ $p > 0,1$	$213,7 \pm 11,9$ $p > 0,1$	$1,25 \pm 0,01$ $p > 0,1$	$8,05 \pm 0,30$ $p < 0,02$	$5,51 \pm 0,36$ $p_K > 0,1$ 98,9 %	$3,98 \pm 0,20$ $p_K < 0,01$ 71,4 %	$8,52 \pm 0,57$ $p_K > 0,1$ 105,1 %	$6,18 \pm 0,56$ $p_K < 0,01$ $p_1 < 0,001$ 76,2 %

Примечание: среда № 1 — $NaCl$ — 0,3 %, сахараза — 7 %, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ — 0,02 %, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,1 % (ЦИИГПК 8^в); среда № 2 — $NaCl$ — 0,46 %, сахараза — 7 %, Na_2HPO_4 — 0,065 %, глюкоза — 0,2 %; среда № 3 — $NaCl$ — 0,77 %, сахараза — 3,34 %, Na_2HPO_4 — 0,065 %, глюкоза — 0,2 %; среда № 4 — $NaCl$ — 0,77 %, сахараза — 1,46 %, Na_2HPO_4 — 0,065 %, глюкоза — 0,2 %; среда № 5 — $NaCl$ — 0,77 %, сахараза — 1,46 %, Na_2HPO_4 — 0,065 %, глюкоза — 0,2, маннитол — 1 %); в эритроцитах до криоконсервирования (контроль = 100 %: содержание АТФ — $5,58 \pm 0,25 \mu M/g$ Нв, содержание 2,3-ДФГ — $8,10 \pm 0,62 \mu M/g$ Нв.

проницаемостью, а кроме того, обеспечивает более полное выявление эффекта сахаров в смягчении гемолиза размороженных эритроцитов. Таким образом, изменяя количественное соотношение NaCl и сахаров в ресуспендирующих растворах, можно как повысить, так и понизить скорость реализации латентных структурных криоповреждений и связанных с ними нарушений барьерных функций мембраны.

В нашей работе лучшие результаты получены при использовании сред 3 и 5. Учитывая высокую эффективность маннитола (равное антигемолитическое действие в меньших концентрациях по сравнению с сахарозой), мы считаем целесообразным включение его в состав ресуспендирующих растворов.

Определение содержания АТФ и 2,3-ДФГ в размороженных эритроцитах, ресуспендированных в этих же 5 растворах, показало (табл. 2), что через 5 суток хранения при $+4^{\circ}\text{C}$ уровень АТФ клеток в средах 2—5 составляет 70—75 % от исходного. В среде 8^в (без глюкозы) содержание АТФ было ниже. Хранение размороженных клеток в этом растворе ведет и к максимальному истощению 2,3-ДФГ (на 65 %). Наиболее высокое содержание 2,3-ДФГ (65—75 %) поддерживается в течение 5 суток в эритроцитах в глюкозосодержащих средах с высокой концентрацией NaCl (среды 3—5). Именно в этих растворах досто-

верно уменьшаются и потери ионов K^{+} клетками, что отражает взаимосвязь между уровнями АТФ и 2,3-ДФГ и регулирующей ионного баланса эритроцитов.

Сравнительный анализ полученных экспериментальных данных позволяет сделать следующие основные выводы:

создание условий, обеспечивающих поддержание высоких уровней АТФ и 2,3-ДФГ наряду с замедлением гемолиза и потерь катионов в течение 5 суток хранения эритроцитов при $+4^{\circ}\text{C}$ после криоконсервирования возможно при ресуспендировании клеток в растворе, содержащем все основные компоненты: электролиты (NaCl), непроницающие сахара (сахарозу, маннитол), глюкозу, неорганический фосфат;

присутствие NaCl и сахарозы (маннитола) в достаточном количестве при адекватном соотношении является обязательным условием одновременного поддержания барьерных свойств мембраны для ионов и макромолекул, соответственно, что обусловлено преимущественным влиянием электролитов на ионный баланс эритроцитов и антигемолитическим действием непроницающих сахаров.

Из числа исследованных вариантов растворов лучшей (по всем изучавшимся показателям) является ресуспендирующая среда № 5 (табл. 2), которую мы считаем целесообразным использовать в качестве основной в дальнейшей работе.

1. Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И., Семенова Н. В. Эффективные растворы для взвешивания размороженных—отмытых эритроцитов.— Пробл. гематол., 1978, т. 23, № 8, с. 16—21.
2. Лоевский М. М., Воротилин А. М., Гулевский А. К., Белоус А. М. Динамика содержания катионов и фосфорорганических соединений в эритроцитах после низкотемпературной консервации при -196°C под защитой 1,2-пропандиола и глицерина.— Бюл. эксп. биол. и мед., 1982, т. 94, № 9, с. 95—97.
3. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузий.— Метод. рекомендации/Под ред. О. К. Гаврилова, В. А. Аграненко.— М., 1980.
4. Мешкова Н. П., Алексахина Н. В. Определение фосфоглицериновой кислоты.— Успехи биол. химии, 1954, № 2, с. 285—288.
5. Смолин Ю. Н., Сарбаш В. И., Команов А. В., Рымарчук В. И. Влияние ионной силы среды на осмотические свойства эритроцитов.— Биофизика, 1980, т. 25, № 2, с. 343—344.
6. Additional Standarts for Human Blood and Blood Products: Federal Register, 1976, May 3, vol. 41, 13292.
7. Albala M. M., Fortier N. L., Glader B. E. Physiologic features of hemolysis associated with altered cation and 2,3-DPG content.— Blood, 1978, vol. 52, N 1, p. 135—141.
8. Amer K. A., Pepper D. S., Prowse Ch. V. Effect of different resuspension media on the post-thaw characteristics of frozen blood.— Brit. J. Haematol., 1980, vol. 44, N 4, p. 635—644.
9. Beutler E. Red Cell Metabolism.— New York: Grune and Stratton, 1975.— 160 p.
10. Minn S. K., Harnchonth K., Mandell E. E. Combined effect of dextrose and NaCl on red cell osmotic fragility.— Amer. J. Hematol., 1978, vol. 5, N 1, p. 33—42.
11. Pribor D. B. PVP contrasted with dextran and a multifactor theory of cryoprotection.— Cryobiology, 1974, vol. 11, N 1, p. 60—72.
12. Zade-Oppen A. M. M., Östling S. G., Marsden N. V. B. On how macromolecules reduce hamoglobin loss in hypotonic hamolysis.— Uppsala J. Med. Sci., 1979, vol. 84, N 2, p. 155—161.

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

Поступила 29.10. 1984 г.

В. А. Чуйко

МОДУЛЯЦИЯ НИЗКИМИ ТЕМПЕРАТУРАМИ И ДМСО БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ

Основные представления о механизме действия низких температур на биологические системы основываются на изучении сравнительно просто организованных клеток растительных и животных организмов. Сформированные на основании указанных исследований, ставшие уже классическими гипотезы о ведущей роли в механизмах криоповреждений «эффектов раствора», обусловленных концентрированием при вымораживании воды ионов и органических веществ, возникновения механических повреждений клеток кристаллами льда, их дегидратации, осмотического сжатия, изменения объема клетки не являются универсальными, так как существует большое количество разнообразных клеток, которые сохраняют способность к функционированию даже с развитым в них при замораживании многих из перечисленных выше процессов.

В еще меньшей степени применимы указанные представления для понимания механизма действия низких температур на объекты тканевого уровня организации, где некоторые из упомянутых выше факторов или не проявляются вообще или носят ограниченный характер и заметно не изменяют функциональную активность тканей. Одним из таких объектов является щитовидная железа, характеризующаяся определенной устойчивостью к действию низких температур.

Ниже будут представлены данные, отражающие влияние замораживания до -196°C на щитовидную железу. Они свидетельствуют о сохранении способности к образованию и секреции тиреоидных гормонов, механизмов нейро-гуморальной регуляции. Влияние замораживания при этом укладывается в представление о физиологической перестройке биохимических процессов в ответ на действие повреждающего фактора (снижение транспорта иодида и аминокислот, активация резервных механизмов иодирования — за счет использования эндогенного иодида, компенсаторное увеличение гормон-рецепторного взаимодействия и образования обладающего свойствами универсального клеточного регулятора — цАМФ.

Предварительная обработка тиреоидной паренхимы диметилсульфоксидом (димексидом), приводящая к умеренному снижению активности одних процессов и к увеличению других, в зависимости от концентрации используемого вещества, может оказывать стабилизирующее влияние на изменения, вызываемые замораживанием, усиливать или ослаблять действие последнего.

Медленное ($1-3^{\circ}/\text{мин}$) замораживание щитовидной железы без криопротектора вызывает снижение на 50 % ее способности захватывать и аккумулировать иодид [1]. Медленное и быстрое ($85-100^{\circ}/\text{мин}$) замораживание также сопровождается снижением на 50 % включения ^{14}C -аминокислот в суммарные белки [1].

В отличие от указанных выше процессов, способность клеток щитовидной железы органифицировать иодид — как при медленной, так и быстрой скорости замораживания увеличивается. При этом сохраняется чувствительность исследуемого процесса к ингибирующему влиянию избытка KI и мерказолила (табл. 1). Медленное замораживание не изменяет характер общего, неспецифического и специфического связывания ^3H -норадреналина соответствующими рецепторами плазматических мембран (рис. 1). При этом, однако, увеличивается количество связывающих мест с 2900 до 4100 фМ/мг белка, что приводит к незначительному увеличению константы ассоциации с $7,9$ до $8,8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Кривая насыщения рецепторов радиолигандом носит линейный нисходящий характер и не отличается от аналогичной кривой, полученной при исследовании образцов мембран, выделенных из интактной тиреоидной паренхимы. Вытеснение радиолиганда немеченым гормоном из гормон-рецепторного комплекса происходит при добавлении в среду инкубации немеченого норадреналина в концентрациях $1 \cdot 10^{-6}$, 10^{-4} M .

Действие медленного замораживания отличается от быстрого — вызывающего увеличение общего связывания на 60 % за счет повышения специфического и не-

Таблица. Влияние замораживания и ДМСО на органификацию иодида в щитовидной железе, % включения ^{131}I

Условия эксперимента	Контроль	KI $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$	Мерказолил $1 \cdot 10^{-3}\text{M}$
Интakтная ткань	$0,0707 \pm 0,009$	$0,0306^* \pm 0,007$	$0,0324^* \pm 0,007$
Замораживание $85-100^\circ/\text{мин}$	$0,1425^* \pm 0,012$	$0,0311^* \pm 0,005$	$0,0223^* \pm 0,002$
Интakтная ткань	$0,213 \pm 0,06$	$0,046^* \pm 0,004$	$0,044^* \pm 0,007$
Замораживание $1-3^\circ/\text{мин}$	$0,648 \pm 0,138$	$0,087^* \pm 0,010$	$0,055^* \pm 0,004$
Замораживание $1-3^\circ/\text{мин}$ с 0,5 % ДМСО	$1,288^* \pm 0,212$	$0,131^* \pm 0,026$	$0,070^* \pm 0,005$
Замораживание $1-3^\circ/\text{мин}$ с 1 % ДМСО	$0,788 \pm 0,098$	$0,108^* \pm 0,014$	$0,050^* \pm 0,004$
Замораживание $1-3^\circ/\text{мин}$ с 5 % ДМСО	$0,486 \pm 0,148$	$0,099^* \pm 0,02$	$0,055^* \pm 0,006$
Замораживание $1-3^\circ/\text{мин}$ с 10 % ДМСО	$1,447^* \pm 0,683$	$0,067^* \pm 0,002$	$0,048^* \pm 0,01$
Замораживание $1-3^\circ/\text{мин}$ с 20 % ДМСО	$0,356 \pm 0,061$	$0,081^* \pm 0,006$	$0,052^* \pm 0,004$

* Достоверно по отношению к контролю.

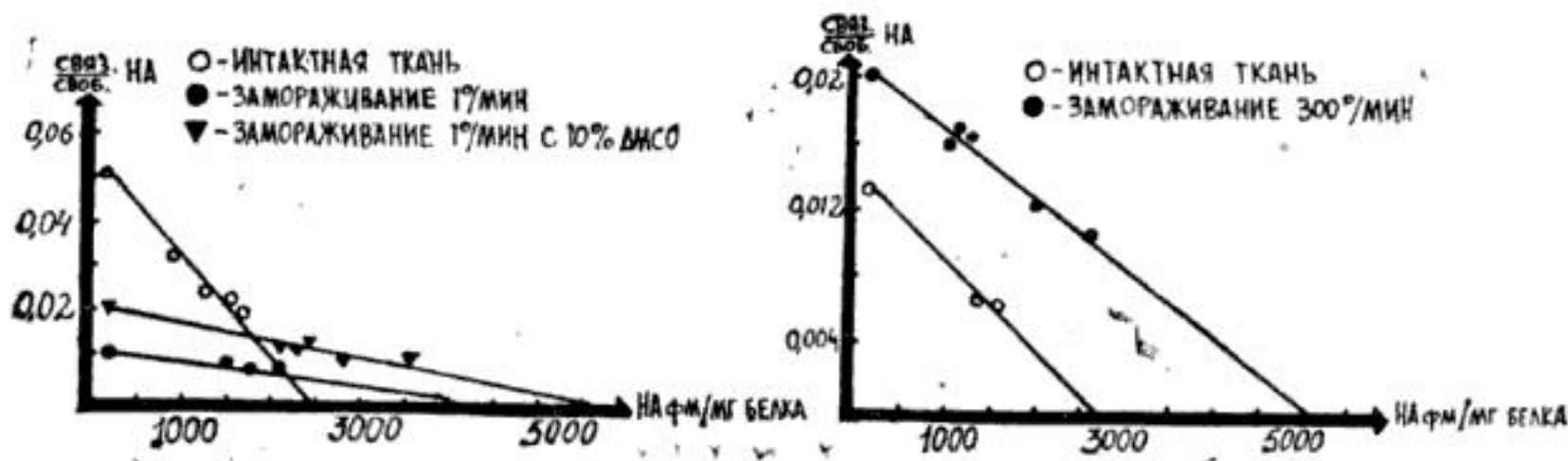


Рис. 1. Влияние замораживания на связывание норадреналина мембранами тироцитов.

специфического связывания радиолиганда. При этом на 50 % увеличивается количество связывающих мест и снижается константа ассоциации с $9,0$ до $5,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Кривая насыщения адренорецепторов радиолигандом носит линейный нисходящий характер, мало отличаясь от аналогичной кривой для незамороженной ткани.

Замораживание существенно увеличивает базальную активность аденилатциклазы, а также ее чувствительность к фториду и негидролизуемой форме ГФТ — гуанилилимидотрифосфату (ГИТФ), в то время как чувствительность к тиреостимулирующему гормону и адреналину сохраняется после указанного воздействия в неизменном виде (рис. 2).

Замораживание оказывает неодинаковое влияние на митохондриальную моноаминоксидазу (субстраты: тирамин, серотонин): медленное — не изменяет ее активность, быстрое — способствует некоторой активации. Ни медленное, ни быстрое замораживание не влияют на чувствительность исследуемого процесса к ингибиторам, что свидетельствует

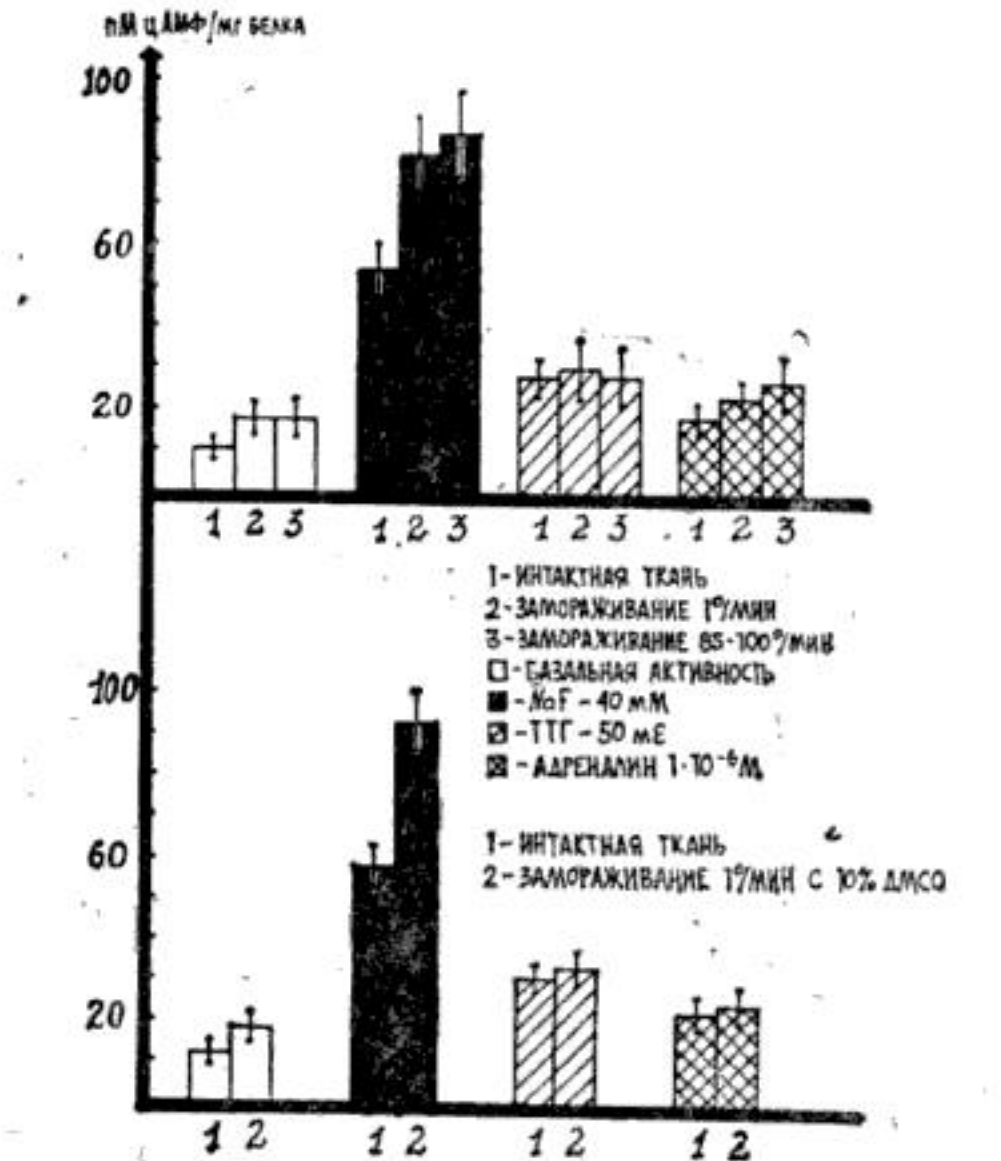


Рис. 2. Влияние замораживания с 10% ДМСО на активность аденилатциклазы в мембранах тироцитов.

о кристоустойчивости не только каталитического центра молекулы фермента, но и того его участка, который обеспечивает взаимодействие с регуляторами.

30 мин. инкубация щитовидной железы с 7,5 и 15 димексидом обеспечивает сохранение на 70 % способности к накоплению иодидов [1], а с 7,5 и 12,5 % димексидом высокого уровня включения ^{14}C -аминокислот в белки. Максимальный криозащитный эффект достигается при замораживании щитовидной железы со скоростью 1,5 °/мин с 12,5 % димексидом.

Замораживание со скоростью 1 °/мин с ДМСО оказывает стимулирующее влияние на включение иодида в белки щитовидной железы. В наибольшей степени увеличение исследуемой активности обнаруживается в щитовидной железе, обработанной 0,5 и 10 % ДМСО: она

адреналина мембранами тироцитов. Таким образом действие его отличается от эффекта вызываемого замораживанием без использования криопротектора. Оно напоминает действие быстрого замораживания, повышающего общее связывание на 50 %, хотя и отличается от него тем, что при медленном замораживании с 10 % ДМСО возрастает только максимальное специфическое связывание, в то время как неспецифическое практически не изменяется, а при быстром — увеличение связывания вызвано одновременным повышением обоих компонентов процесса (рис. 1).

Замораживание щитовидной железы со скоростью 1—3 °/мин до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$

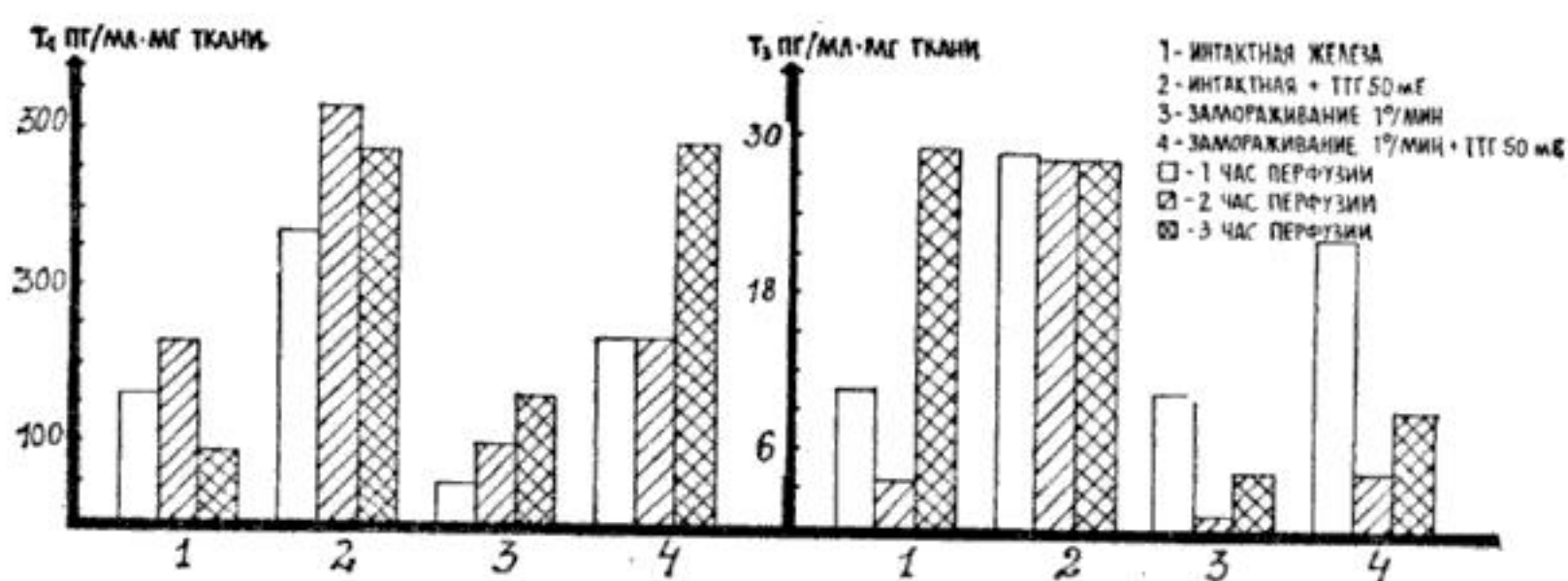


Рис. 3. Влияние замораживания с ДМСО на секрецию тиреоидных гормонов щитовидной железой.

увеличивается соответственно в 2 и 3 раза (табл. 1).

При исследовании секреции тиреоидных гормонов *in vitro* установлено уменьшение под влиянием медленного замораживания с 10 % ДМСО выделения в перфузат — тироксина и трийодтиронина (рис. 3). Указанные изменения неодинаковы для T_3 и T_4 . В большей мере снижалась базальная секреция трийодтиронина — на 60 %; секреция тироксина уменьшалась на 25 %. Возможной причиной указанных различий является снижение под влиянием замораживания с ДМСО процесса деиодирования тироксина до трийодтиронина. Добавление ТСГ к срезам криоконсервированной щитовидной железы приводит к 2—3-кратному увеличению секреции трийодтиронина и тироксина. Поскольку и в незамороженной железе отношение стимулируемой ТТГ секреции к базальной составляет 2,8 и 3 соответственно, следует заключить, что замораживание незначительно влияет на чувствительность исследуемого процесса к ТСГ.

Медленное замораживание с 10 % ДМСО активирует связывание ^3H -нор-

с 0,25—5 % ДМСО не приводит, как это имеет место при замораживании без криопротектора, к увеличению базальной активности аденилатциклазы. В то же время замораживание с 10 % ДМСО оказывает на нее стимулирующее влияние, аналогичное тому, которое обнаруживается при раздельном действии каждого из указанных факторов. Приблизительно таким же образом влияет замораживание с ДМСО на активность аденилатциклазы, стимулируемой фторидом. Однако стабилизирующий эффект диметилсульфоксида проявляется при замораживании с 1—5 % ДМСО, в то время как использование 0,25 и 0,5 % этого соединения сопровождается снижением исследуемой активности. Замораживание с 10 % ДМСО способствует повышению чувствительности аденилатциклазы к фториду (рис. 2).

Существенно отличается от базальной и стимулируемой фторидом аденилатциклазы реакция фермента, стимулируемого тиреотропным гормоном — при замораживании с 0,25—2,5 % ДМСО чувствительность его к ТСГ снижается на 50 %; увеличивается на 50 % при замораживании с 5 % и характеризуется

отсутствием изменений при замораживании с 10 % диметилсульфоксидом.

Таким образом в зависимости от типа аденилатциклазной системы и концентрации ДМСО, используемой при замораживании, отчетливо проявляются два типа его эффектов: стабилизирующий — в концентрации 0,25—5 % для базальной, 1—5 % — для стимулируемой фторидом, 10 % — для аденилатциклазы, стимулируемой ТСГ, и дестабилизирующий, выражающийся в увеличении или снижении активности тех типов циклазной системы, которые при раздельном действии диметилсульфоксида и замораживания оставались практически без изменений. Дестабилизирующий эффект замораживания с ДМСО проявляется при использовании 10 % указанного препарата — в отношении базальной, 0,25, 0,5 и 10 % — чувствительной к фториду и 0,25—5 % — аденилатциклазы, стимулируемой ТСГ.

Вызываемая замораживанием перестройка биохимических процессов в клетках может быть обусловлена как изменениями, наступающими в результате вымораживания воды, создания высоких концентраций ионов, сдвигов рН, осмотического сжатия клеток и непосредственно в структурных характеристиках функциональных белков мембраны — ферментов и рецепторов за счет нарушения постоянно проявляющегося стабилизирующего влияния на их конформационное состояние воды, ионов и липидов.

С другой стороны, перестройки, происходящие под влиянием замораживания, включающие в себя, наряду с фазовыми переходами вода—лед и структурно-фазовые превращения липидов, и в свою очередь приводящие к нестабильности мембраны за счет нарушения характера липид—белковых взаимоотношений, могут сопровождаться изменением вязкости липидного бислоя, перераспределением внутримембранных частиц, гомогенизации липидов как в микроучастках мембраны, так и обеих частях бислоя в целом. Следствием этого процесса, как правило, являются нарушения барьерных функций мембраны, транспорта через нее ионов и субстратов, взаимосвязи мембраны с другими органеллами и компартментами клетки.

Факт определенного многообразия реакции исследуемых биохимических процессов на замораживание вероятней всего связан с различием структурной

и функциональной организации исследуемых процессов. Проявление активирующего влияния замораживания на такие процессы как связывание ^3H -норадреналина адренергическими рецепторами, образование внутриклеточного цАМФ или органификацию иодидов отражает изменения, происходящие непосредственно в конформационном состоянии белков. На это указывает факт увеличения средства адренергического лиганда с рецептором при быстром замораживании, или активации ферментов — аденилатциклазы и тиреоидной пероксидазы. В основе же снижения захвата и концентрирования иодидов и секреции тиреоидных гормонов — процессов, характеризующихся достаточно сложной организацией и требующих соответствующих мембранных перестроек, вовлечения в эти перестройки элементов цитоскелета, вероятно лежат изменения некоторых мембранных функций — прежде всего барьерных, транспорта, вызванных нарушением взаимоотношений белков и липидов.

В свою очередь димексид, добавленный к срезам щитовидной железы перед замораживанием, существенно изменяет характер вызванных действием указанного фактора перестроек биохимических процессов. Указанное соединение, как и замораживание, может оказывать свое действие двояким путем: на уровне макромолекул, изменяя их конформацию за счет образования устойчивых водородных связей или гидрофобных взаимодействий с соответствующими их функциональными группировками, так и путем изменения функциональных свойств мембраны: вязкости ее микроучастков и бислоя в целом, латеральной диффузии, характера распределения внутримембранных частиц, проницаемости, транспорта субстратов и ионов, а также взаимодействия мембраны с другими органеллами и компартментами клетки [8, 7, 6].

Эффект диметилсульфоксида определяется его концентрацией. В малых концентрациях — 0,5—1 %, которые гораздо ниже концентраций, используемых с криозащитной целью, указанное соединение, очевидно, действует, изменяя конформационное состояние макромолекул, а в 5—10 % и более высоких концентрациях его влияние распространяется на функциональные характеристики мембраны. Реализация эффектов ДМСО на молекулярном и мембранно-

клеточном уровне может, в зависимости от направленности его действия, проявляться в виде стимуляции либо ингибирования. При стимулировании биохимической реакции определенной структурной перестройке макромолекул должны соответствовать такие изменения в мембране, которые позволили бы этим перестройкам проявиться. Ингибирование, вызываемое ДМСО, может быть обусловлено снижением функциональной активности фермента, рецептора и характера взаимодействий этих белков с субстратом как за счет изменения конформации указанных молекул, так и молекулярных перестроек мембраны в целом. Сама направленность влияния ДМСО на молекулярном уровне определяется химическим строением макромолекул, количеством и характером в них функциональных групп, участвующих во взаимодействии с указанным соединением, а также микроокружением этих макромолекул, осуществляющих стабилизирующее влияние на белковые молекулы.

Модифицированные при использовании ДМСО исследуемые биохимические процессы при последующем замораживании претерпевают дальнейшие изменения, которые отличаются от эффектов, производимых одним замораживанием.

Использование соответствующих доз препарата позволяет в отдельных случаях стабилизировать стимулирующие или ингибирующие эффекты замораживания, вместе с тем ДМСО может потенцировать активирующее действие низких температур. Обнаруженные факты являются подтверждением высказанного ранее предположения о том, что

эффекты замораживания и ДМСО реализуются на уровне молекулярно-клеточных процессов и действуют, по-видимому, на одни и те же звенья указанных процессов.

Полученные данные показывают, что многообразное влияние ДМСО на биохимические процессы в щитовидной железе значительно шире тех перестроек, которые происходят под влиянием указанного препарата в суспензионных системах и которые, как полагают, способствуют повышению их криоустойчивости за счет частичной дегидратации, витрификации, внутриклеточного льда, замещения молекул связанной воды взамен разрушенных в белках при замораживании молекулами криопротектора, хелатированием поливалентных ионов металлов [7].

Действие ДМСО наряду с указанными физико-химическими эффектами проявляется в щитовидной железе на биохимическом и физиологическом уровне.

Таким образом оба исследуемых фактора — замораживание и диметилсульфоксид, воздействуя на щитовидную железу, вызывают в ней существенные изменения процессов образования и секреции тиреоидных гормонов, совместимые с последующим функционированием как этих процессов, так и щитовидной железы в целом. Модулирующий характер действия указанных факторов подтверждается исследованиями роста и размножения тироцитов в органной культуре и способности криоконсервированного тиреоидного трансплантата к регулируемому гормонообразованию [3—5].

1. Пушкарь Н. С., Чуйко В. А., Цариковская Н. Г. Низкотемпературное консервирование и аутотрансплантация щитовидной железы человека. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии, Киев, Наукова думка, 1981, с. 390—415.
2. Пушкарь Н. С., Македовская В. А., Утевский А. М., Чуйко В. А., Карпенко Л. Г., Цариковская Н. Г. Аутоимплантация криоконсервированной (-196°C) тиреоидной паренхимы как метод лечения послеоперационного гипотиреоза. — Проблемы эндокринологии, 1984, 30, № 5, с. 42—46.
3. Чуйко В. А., Чупринова С. И. Влияние низкотемпературной консервации на рост клеточной культуры щитовидной железы. — Докл. АН УССР 1982, № 10 (сер. Б), с. 77—81.
4. Даценко Б. М., Чуйко В. А., Алюшина А. А. Функция щитовидной железы, консервированной замораживанием (-196°C). —

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков

- Пробл. эндокринологии, 1975, 21, № 2, с. 86—90.
5. Чуйко В. А., Онуфриева Г. А., Митасов В. И. Реакция коры надпочечников на гомотрансплантацию щитовидной железы — свежей и криоконсервированной (-196°C). — Криобиология и криомедицина, 1976, 2, с. 77—79.
6. De Bruijne A. W., Steveninck J. V. Asymmetry of the yeast cell membrane with respect to influx and efflux of dimethyl sulfoxide. — Biochim. Biophys. Acta, 1970, 211, N 4, p. 555—564.
7. Schlafer M. Pharmacological considerations in cryopreservation. In: Organ preservation for transplantation. Ed. Karow A. M., Pegg D. E. New York — Basel, 1981, p. 177—211.
8. Szmant H. H. Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. — Ann. NY Acad. Sci., 1975, 243, N 1, p. 20—23.

Поступила 22.10.1984

Г. А. Бабийчук, В. С. Марченко, М. И. Шифман

РОЛЬ НОРАДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В СВЕРХМЕДЛЕННЫХ ПРОЦЕССАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

В современной нейрофизиологии сформировались различные направления и подходы к изучению функциональных состояний человека и животных при экстремальных воздействиях. В настоящее время увеличивается количество работ, посвященных расшифровке адаптационных механизмов действия краниocereбральной гипотермии на организм [2—4]. Перспективным в этом плане является исследование секреции нейромедиаторов, как одного из пусковых факторов гипоталамической системы, регулирующей температуру тела. Однако экспериментальные данные по этому вопросу малочисленны, во многом противоречивы и указывают на существенные видовые различия в сложном гетерохимическом строении системы центральной регуляции температурного гомеостаза [6]. Традиционные электрофизиологические методы оценки активности ЦНС при температурных воздействиях не всегда являются эффективными [4]. Практически во всех работах отсутствует комплексный подход к проблеме, где бы использовались как нейрохимические, так и нейрофизиологические методы исследования.

Основная цель настоящей работы заключается в выяснении характера действия краниocereбральной гипотермии (КЦГ) на механизмы синаптической передачи в комплексе с исследованиями, определяющими универсальные электрофизиологические корреляты ключевого нейрохимического звена в функциональной системе терморегуляции коры и гипоталамуса при охлаждении.

Решение этих вопросов, помимо общетеоретического, представляет большой практический интерес, поскольку способствует оптимизации методов изменения устойчивости организма к действию экстремальных факторов, открывает широкие возможности для обоснования выбора направленного воздействия и управления защитными системами организма.

Материалы и методы. В I серии экспериментов, проведенных на 25 кроликах породы шиншилла и 60 белых крысах, изучались нейрофизиологические и нейрохимические показатели актив-

ности ЦНС при программном охлаждении. За 5—7 сут до опыта животным производилась стереотаксическая операция по вживлению термопар и электродов в передний и задний гипоталамус, ретикулярную формацию, кору головного мозга, а также направляющих трубок для микроэлектродов и push—pull—канюли. Первой группе кроликов в устройство для охлаждения головы (шлем) подавался хладагент (пары азота) с температурой -10°C . Во второй группе температура в шлеме была -20°C , в третьей -40°C . КЦГ проводилась при помощи аппарата для программного охлаждения организма, разработанного в ИПКиК АН УССР. Температура тела животного измерялась каждые 15 мин в 9 точках (грудная полость, брюшная полость, спинной отдел позвоночника, левая подмышка, левое бедро, прямая кишка, а также в коре, лимбических структурах и гипоталамусе головного мозга). Корреляционный, спектральный анализ сверхмедленных процессов проводился на ЭВМ СМ 1.

На крысах изучали обратный захват ^3H -норадреналина (^3H —НА). Для определения K^{+} -индуцированной секреции НА—НА аликвоты суспензии синапсом наносили на фильтры «Синпор—6» и промывали деполяризующим раствором ($60\mu\text{M}$ KCl). Фильтры сушили и просчитывали радиоактивность.

Для изучения действия охлаждения *in vitro* на секрецию ^3H —НА осадок синапсом ресуспензировали в растворе Кребса—Рингера и инкубировали с ^3H —НА 10 мин при 37°C . От невключенного изотопа освобождались центрифугированием. Пробы объемом 500 мкл инкубировали 15 мин в термостатируемых водяных банях при температурах от 37°C до 0°C . Относительное изменение уровня секреции ^3H —НА при понижении температуры определяли следующим образом:

$$\% \text{ радиоактивности, ос-тавшейся в синапсосомах} = \frac{\text{имп/мин фильтра } T^{\circ}\text{C}}{\text{имп/мин фильтра } 37^{\circ}\text{C}} \times 100,$$

где $T^{\circ}\text{C}$ —изучаемая температура.

Во II серии экспериментов, проведенных на 20 белых крысах, изучали сверх-

медленную биоэлектрическую активность и секрецию ^3H -норадреналина при КЦГ, приводящей к снижению температуры головного мозга до 18°C , т. е. при холодовом выключении функциональной активности коры. С помощью микрошприца в гипоталамус и кору вводили 7 мкл ^3H —НА. Перфузию головного мозга проводили усовершенствованной в ИПКиК АН УССР *push—pull*-канюлей. Уровень секреции (коэффициент высвобождения — Кв) определялся как отношение радиоактивности исследуемой фракции к радиоактивности последней фракции отмывки, имеющей стабильный уровень радиоактивности.

Сверхмедленную биоэлектрическую активность регистрировали также на срезах коры головного мозга (толщиной 400 мкм), помещенных в перфузионную камеру.

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что охлаждение головного мозга вплоть до 22°C сопровождается увеличением частоты разрядов нейронов, а при снижении температуры коры ниже 19°C ее импульсная активность подавляется. Наличие фаз активации и угнетения функциональной активности коры при КЦГ, подтверждаемое рядом авторов [3], обусловило проведение экспериментов, в которых с помощью разных режимов охлаждения добивались доминирования одной из фаз с целью уменьшения их взаимовлияния.

В I серии опытов установлено, что при всех трех программах охлаждения температура коры головного мозга не опускалась ниже 19°C . Уменьшение температуры хладоагента увеличивает скорость падения температуры тела только в первые 0,5 ч, а в дальнейшем скорости уменьшаются и становятся почти одинаковыми во всех опытах. Скорость роста градиента температур так же максимальна в первые 15—30 мин гипотермии. Затем рост градиента температур прекращается и наблюдается тенденция к незначительному его уменьшению. Скорость падения температуры коры головного мозга уменьшалась тем раньше, чем ниже температура хладоагента. Этот факт можно объяснить, приняв во внимание модели терморегуляции Майерса и Блая [6]. При более низкой температуре хладоагента раньше сдвигается установочная точка и происходит запуск терморегуляторных реакций. Однако, анализируя полученные законо-

мерности, можно прийти к выводу, что для активации систем термогенеза при КЦГ недостаточно смещения «установочной точки» гипоталамуса, иначе замедление скорости снижения температуры тела происходило бы уже в первые минуты охлаждения.

Мы предполагаем, что таким дополнительным фактором активации температурного гомеостаза является изменение сверхмедленных процессов головного мозга при охлаждении. Одно из важных условий генерации сверхмедленной активности — это градиент ионных концентраций в межклеточной среде [1, 5], с другой стороны, соотношение ионов Na^+/Ca^+ обуславливает поддержание «установочной точки» гипоталамуса [8]. Реакции на изменение этого соотношения однозначны у всех изученных видов млекопитающих, так же универсальны изменения сверхмедленной активности. В наших опытах характерным было синусоидальное колебание температуры с периодом около часа с общей тенденцией к снижению [2], аналогичные часовые качания частоты и амплитуды секундного ритма наблюдаются при КЦГ в сверхмедленной активности.

Полученные нами результаты показали, что терморегуляторные механизмы, ведущие к снижению скорости охлаждения, включаются только на фоне высокой синхронности сверхмедленной активности коры (коэффициент корреляции (КК) $> 0,7$), возникающей через 15—30 мин после начала охлаждения. Эти данные становятся понятными, если учесть, что высокая пространственная синхронность биопотенциалов отражает то состояние ЦНС, при котором облегчается передача возбуждения [7].

Проведенное изучение спектральных функций сверхмедленной активности коры и гипоталамуса показало, что при низких значениях КК четкие закономерности в характере кривых спектрограмм отсутствуют. Напротив, при максимальных КК в спектре доминирует секундный диапазон (дзета-ритм). При этом отсутствие значимой когерентности в полосе дзета-ритма даже при наличии ее на других частотах не ведет к активации систем терморегуляции.

Таким образом включение терморегуляторных механизмов имеет место в тех случаях, когда когерентная функция в полосе дзета-ритма достигает значений $> 0,7$. Из этой закономерности следует практический вывод: чем раньше

при более высокой температуре усиливается дзета-ритм, тем меньше скорость охлаждения конкретного организма при КЦГ и наоборот.

Подтверждением установленных закономерностей являются наши данные при модуляции сверхмедленной активности ритмическим действием холода, приводящем к усилению выраженности дзета-активности, причем это холодное навязывание секундного ритма приводит к замедлению скорости охлаждения. Стимуляция гипоталамуса ионами K^+ так же вызывала диффузное повышение синхронности сверхмедленной активности коры. Пространственная синхронизация сверхмедленных процессов коры достигала наибольшего уровня в период максимальной корреляции биопотенциалов коры и гипоталамуса.

Анализ полученных результатов второй серии экспериментов показал активацию центральных адренергических структур, сопровождающуюся повышенной секрецией 3H -норадреналина в радио-преоптической области гипоталамуса, коэффициент высвобождения (K_v) в этом случае равняется 9, в то время как в состоянии нормотермии он равен 2—2,5. В заднем гипоталамусе усиления секреции норадреналина не происходит. Одновременно нами отмечена двухфазная реакция изменения дзета-активности, кратковременное ослабление которой сменяется усилением мощности дзета-ритма на 100—150 %. Пролонгирование гипотермии до 1 ч приводит к выраженному ингибированию секреции 3H -норадреналина, индуцированной высокой концентрацией ионов K^+ ($K_v = 1,2—1,3$) и подавлением сверхмедленной активности.

Для более полного анализа изменений работы синаптического аппарата при КЦГ изучалось ее действие на секрецию и обратный захват 3H -норадреналина из синапсом гипоталамуса и коры.

Гипотермия практически не изменяет уровень обратного захвата 3H -норадреналина в гипоталамусе. В то же время уровень обратного захвата норадреналина в коре значительно уменьшается — на 64 % при пролонгировании гипотермии до 1 ч. Изменение уровня секреции 3H -норадреналина из синапсом гипоталамуса сходно с аналогичными изменениями обратного захвата, как и секреции 3H -норадреналина из синапсом коры, которая уменьшается на 60 %.

В переднем гипоталамусе исследо-

валось действие охлаждения *in vitro* на препарат изолированных синапсом. Если охлаждение непосредственно влияет на спонтанную секрецию 3H -норадреналина синапсами, то это влияние будет выявлено при изучении секреции 3H -норадреналина синапсами.

Исследования выхода 3H -норадреналина из синапсом, инкубируемых в растворе Кребса—Рингера с разной температурой в течение 15 мин, позволило выяснить, что в интервале температур $+14,5 \div +20^\circ C$ существует температурная аномалия, выражающаяся в уменьшении спонтанного выхода норадреналина из синапсом. При этом максимум ингибирования (25 %) спонтанного выхода медиатора находится в интервале $+14,5 \div +15^\circ C$.

Следовательно температурозависимостью процессов спонтанной секции нейромедиаторов можно, в какой-то мере, объяснить полученное нами навязывание дзета-активности ритмическим действием холода, когда температура коры периодически менялась от $25—20^\circ C$ до $15—10^\circ C$. А объяснения изменений в уровне спонтанной секреции 3H -норадреналина, наблюдаемых в опытах с локальной перфузией гипоталамуса, следует искать, по нашему мнению, в нейрональных взаимосвязях между структурами головного мозга и в первую очередь посредством сверхмедленных процессов. К такому выводу нас приводят и данные, полученные на переживающих срезах коры мозга. Добавление норадреналина в инкубационную среду срезов коры мозга ведет к увеличению мощности дзета-ритма на 150 %, причем спектр сверхмедленной активности аналогичен такому при охлаждении. Кроме того в опытах *in vivo* при перфузии гипоталамуса блокаторами адренорецепторов исчезает сопряженность процессов секреции норадреналина и реакции ослабления—усиления дзета-ритма в условиях охлаждения. Таким образом специфика синаптического действия нейромедиаторов, в частности норадреналина, при КЦГ проявляется в биоэлектрических феноменах сверхмедленной активности, что позволяет идентифицировать их по электрографическим эффектам.

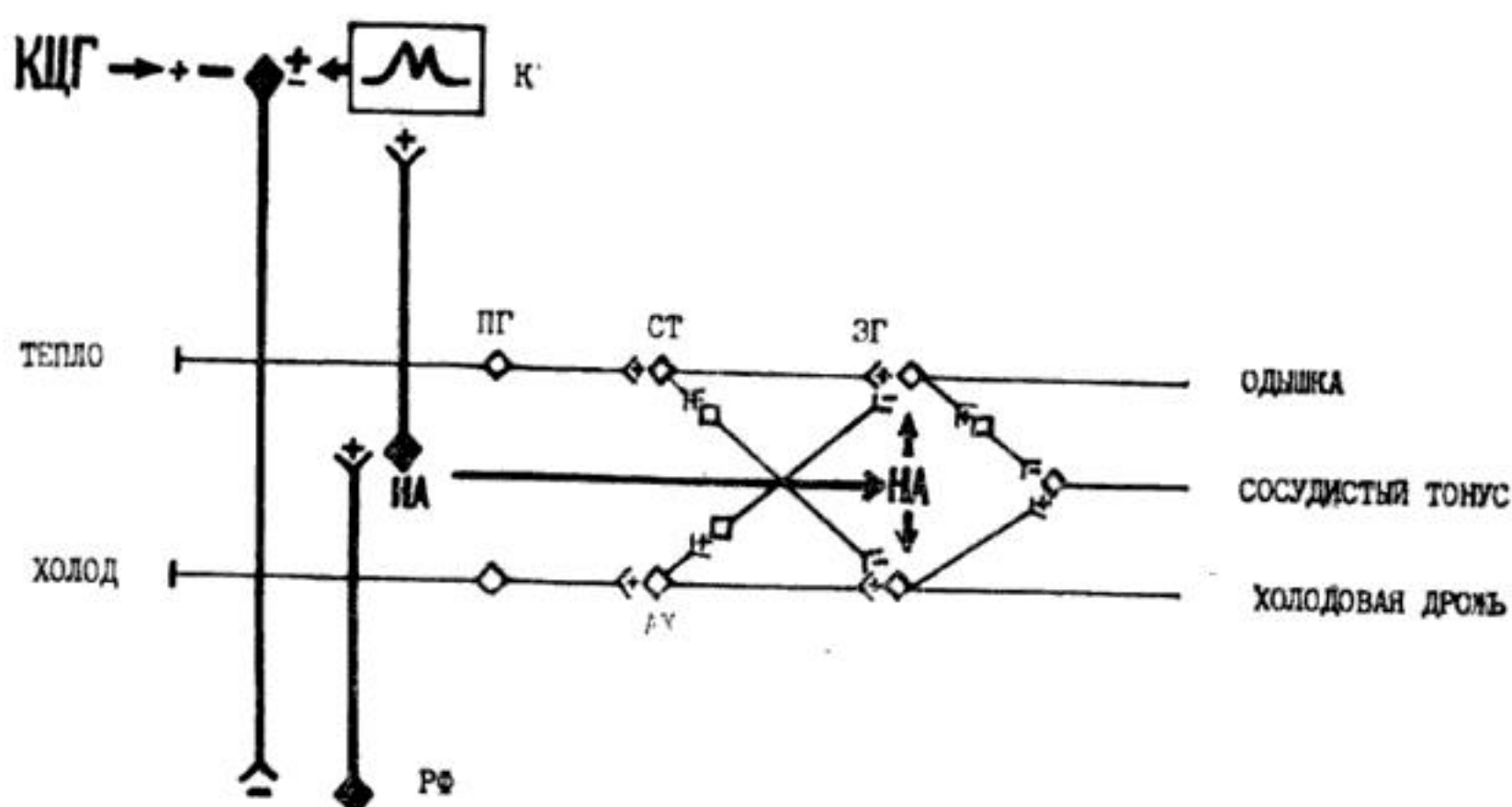
Обобщение результатов экспериментов и литературных данных (1, 5, 8) позволяет нам представить последовательность реакций ЦНС на КЦГ следующим образом (рис. 1):

1. Активация на начальных этапах КЦГ нейрональной активности коры → накопление K^+ в экстраклеточной среде → рост порога нервного элемента → активация АТФазы → деполяризация глии → усиление дзета-ритма.

2. Изменение установочной точки гипоталамических центров терморегуляции → формирование единой гипоталамо-кортикальной системы, ответственной за

дзета-ритма сверхмедленных процессов в коре как отражение последних резервных возможностей организма.

Выводы. Таким образом полученные экспериментальные данные позволяют прийти к ряду заключений о механизмах реагирования ЦНС на охлаждение. Для адекватного реагирования ЦНС на экстремальные температурные воздействия необходима синхронность свехмедленной



Центральные механизмы терморегуляции при краниocereбральной гипотермии. К — кора; ПГ — передний гипоталамус; ЗГ — задний гипоталамус; РФ — ретикулярная формация; СТ — серотонин; АХ — ацетилхолин; НА — норадреналин; μ — сверхмедленные процессы мозга.

регулирование уровня пространственной синхронизации сверхмедленных процессов → запуск терморегуляторных реакций.

3. При дальнейшем снижении температуры коры до 19°C → инактивация нейрональной активности коры → снятие тормозного влияния коры на подкорку → активация норадренергических нейронов ствола головного мозга → выброс норадреналина в переднем гипоталамусе → реципрокное торможение терморегуляторных реакций → усиление

активности коры и гипоталамуса, наличие ритмических компонентов в секундном диапазоне частот и когерентность этих ритмических составляющих. Наши данные свидетельствуют, что генез сверхмедленных колебаний секундного диапазона при КЦГ связан с нейрохимическими процессами норадренергической синаптической передачи и усиление сверхмедленных процессов указывает на повышенную реактивность адренергической функциональной системы в ответ на охлаждение.

1. Адлажслова Н. А. Психофизиологические аспекты сверхмедленной ритмической активности головного мозга. — М.: Наука, 1979, 213 с.
2. Бабийчук Г. А., Гальченко С. Е., Марченко В. С., Тарасов В. Ф. Температурные градиенты организма животного при краниocereбральной гипотермии. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 71—73.
3. Беленков Н. Ю. Принцип целостности в деятельности мозга. — М.: Медицина, 1980, 310 с.
4. Бернштейн В. А. Гипотермия и мозг. — Успехи физиол. наук. 1971, т. 2, № 2, с. 49—67.
5. Илюхина В. А., Дамбинова С. А., Медведева Т. Г. Состояние головного мозга и организма и их физиолого-биохимические основы. — В кн.: Современные проблемы клинической физиологии ЦНС. Л.: Медицина, 1981, с. 18—58.
6. Лупандин Ю. В. Медиаторные механизмы терморегуляции. — В кн.: Физиология терморегуляции. Л.: Наука, 1984, с. 348—377.

7. Труш В. Д., Королькова Т. А., Тишанинова Л. В. и др. Функциональное значение и принципы организации пространственной синхронизации фоновых биопотенциалов коры головного мозга. — В кн.: Пространственная синхронизация биопотенци-

лов головного мозга. — М.: Наука, 1973, с. 28—66.

8. Фельдберг В. Новые перспективы в изучении механизма регуляции температуры тела. — В кн.: Достижения современной фармакологии. Л.: 1976, с. 222—234.

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

Поступила 22.10. 1984 г.

УДК 57.043.636.082.31:591.463.1

В. А. Наук

СТРУКТУРНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ БИОМЕМБРАН ГАМЕТ САМЦОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

В настоящее время достигнуты значительные успехи в криоконсервации спермы сельскохозяйственных животных. Вместе с тем разработка не может считаться завершенной, поскольку сперма даже близких видов животных отличается по своей чувствительности на этапах замораживания—отогрева. Так, например, хотя технология криоконсервации спермы быков уже более 20-ти лет внедрена в производство, все же 50% гамет не восстанавливают свои функции после оттаивания. В то же время использование способа криоконсервации спермы барана и хряка в практике искусственного осеменения овец и свиноматок пока не нашло широкого применения.

Поэтому важной задачей является выяснение видовых особенностей механизмов возникновения повреждений гамет и разработка способов их криозащиты. На основании имеющихся данных [1, 2, 4—10, 13] и результатов собственных исследований мы пришли к выводу [6, 7], что в основе холодовых повреждений спермиев лежит разрушение их плазматической, акросомальной и митохондриальной мембран под влиянием низких температур [15] и эффекта раствора [17]. Степень этих повреждений во многом зависит от молекулярной организации биомембран гамет различных видов, состава защитных сред, режимов охлаждения, замораживания и оттаивания.

В настоящей работе нами исследованы видовые особенности морфологических изменений биомембран, активности мембраносвязанных ферментов, соотношения белок:липид и аминокислотного состава плазматических мембран гамет при криоконсервации спермы быка и барана.

Материал и методы. Сперму быков и баранов после получения разбавляли в соответствии с существующими требованиями к каждой среде (лактозо-глицериновой для быков, лактозо-фруктозо-раффинозо-магниево-глицериновой для баранов), охлаждали и замораживали в форме гранул [6]. Оттаивание проводили в водяной бане при $+37^{\circ}\text{C}$ и сразу же осуществляли морфологические исследования с помощью электронной и фазо-контрастной микроскопии. Плазматические мембраны получали в двухфазной полимерной системе, состоящей из декстрана с молекулярной массой Т-500 и полиэтиленгликоля — Т-6 производства фирмы Флука А.Г. Буш (Швейцария) — по методике [13]. О степени чистоты плазматических мембран судили по активности Mg^{2+} ,

$(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ АТФазы (ε С 3.6.1.3), 5^1 нуклеотидазы (ε С 3.1.3.5) и щелочной фосфатазы (ε С 3.1.3.1). Количество белка определяли по [16]. Экстракцию общих липидов проводили по методу [12], а их содержание исследовали методом Блора в модификации Брагдона, описанным А. А. Покровским [11]. Определение аминокислотного состава плазматических мембран гамет проводили на чешском аминокислотном анализаторе ААА-229.

Результаты и их обсуждение. Электронно-микроскопические исследования гамет на разных этапах замораживания—отогрева показали, что в деконсервированных клетках выявляются повреждения плазматической и митохондриальной мембраны и особенно акросомы гамет. Эти изменения в мембранах начинают проявляться уже в период охлаждения и выдержки разбавленной спермы при $2-4^{\circ}\text{C}$ и по мере понижения температуры до $-25 \div -30^{\circ}\text{C}$ они усугубляются. Так, в акросоме наблюдалось просветление ее содержимого, набухание, разрывы, а также полное ее отслоение, уменьшалась электронная плотность митохондриальных мембран, а также набухание органелл.

С помощью фазо-контрастной микроскопии выявлено, что после замораживания и оттаивания спермы барана акросомный аппарат их подвергается значительно большему повреждению, чем у гамет быков. Так, процент гамет с нормальной акросомой в разбавленной сперме быка составил $62,7 \pm 1,50$, барана $60,8 \pm 1,80$, а после замораживания и оттаивания $42,3 \pm 1,13$ и $32,8 \pm 1,20$ соответственно. Можно считать, что такие видовые особенности устойчивости гамет к низким температурам связаны с различным молекулярным составом плазматических мембран гамет быков и баранов [4, 6, 7]. С этой целью дальнейшие исследования нами проводились на изолированных плазматических мембранах спермиев быков и баранов, в которых определяли содержание белков и липидов. Выявлено, что в изолированных нативных плазматических мембранах гамет быков и баранов соотношение белок:липид гамет быков составляет $0,43 \pm 0,014$, а баранов $0,36 \pm 0,031$ ($p < 0,01$).

После замораживания — отогрева соотношение белок:липид в плазматических мембранах быков уменьшается, а баранов — повышается, что свидетельствует о большей потере липидов в мембранах гамет баранов и белков — у быков.

Таблица 1. Аминокислотный состав плазматических мембран гамет быка и барана

Тип аминокислот	Аминокислоты	Мг на 100 мг белка плазматических мембран гамет			
		Быков		Баранов	
		Свеже-разбавленных	После замораживания и оттаивания	Свеже-разбавленных	После замораживания и оттаивания
Основные	Лизин	5,46 ± 0,98	3,88 ± 0,51	5,72 ± 0,24	6,30 ± 0,23
	Гистидин	3,49 ± 0,54	2,70 ± 0,25	3,54 ± 0,06	3,49 ± 0,11
	Аргинин	2,11 ± 0,32	3,47 ± 0,53	5,97 ± 0,25	5,98 ± 0,08
	Всего	11,06 ± 1,16	10,05 ± 0,77	15,23 ± 0,35	15,77 ± 0,26
Кислые	Аспарагиновая к-та	8,33 ± 1,57	5,86 ± 0,83	8,56 ± 0,78	9,00 ± 0,44
	Глютаминовая к-та	9,95 ± 1,76	6,79 ± 0,87	11,67 ± 0,38	13,57 ± 0,48**
	Всего	18,28 ± 2,35	12,65 ± 1,2	20,23 ± 0,86	22,57 ± 0,65
Гидрофобные	Метионин	0,23 ± 0,09	0,23 ± 0,066	0,20 ± 0,078	0,07 ± 0,006
	Валин	4,21 ± 0,94	2,61 ± 0,39	4,56 ± 0,22	3,94 ± 0,185
	Изолейцин	2,93 ± 0,45	2,19 ± 0,28	3,65 ± 0,21	3,92 ± 0,170
	Лейцин	6,46 ± 1,20	4,28 ± 0,56	9,86 ± 0,33	9,21 ± 0,54
	Тирозин	3,39 ± 0,79	2,73 ± 0,59	2,29 ± 0,09	1,60 ± 0,20
	Фенилаланин	4,43 ± 0,66	3,51 ± 0,39	4,36 ± 0,18	3,95 ± 0,27
	Всего	21,55 ± 1,89	15,55 ± 1,02**	24,86 ± 0,46**	22,65 ± 0,70
Нейтральные	Треонин	4,82 ± 0,88	3,04 ± 0,43	5,52 ± 0,33	5,80 ± 0,18
	Серин	5,61 ± 0,80	3,33 ± 0,44	5,46 ± 0,21	5,73 ± 0,22
	Пролин	4,91 ± 1,60	1,72 ± 0,43	4,48 ± 0,35	4,95 ± 0,155
	Глицин	4,12 ± 0,73	2,55 ± 0,30	4,14 ± 0,11	4,01 ± 0,09
	Аланин	3,64 ± 0,73	2,84 ± 0,39	4,10 ± 0,16	4,27 ± 0,014
	Всего	23,10 ± 2,24	12,48 ± 0,89*	23,60 ± 0,55	24,76 ± 0,33
	Итого	73,99 ± 3,93	50,73 ± 1,96*	83,92 ± 1,17	85,75 ± 1,04

* — $p < 0,01$

** — $p < 0,05$

Таблица 2. Криогенные изменения активности ферментов плазматических мембран гамет быков и баранов

Ферменты	Активность ферментов в (в ммоль/ч/мг белка) мембран гамет:			
	быков		баранов	
	Свеже-разбавленное (I)	После замораживания и оттаивания (II)	Свеже-разбавленное (III)	После замораживания и оттаивания (IV)
Mg ²⁺ (Na ⁺ + K ⁺) — АТФ-аза	27,52 ± 3,99	23,40 ± 2,27	25,02 ± 2,27	22,64 ± 1,87
5 ¹ — АМФ-аза	16,43 ± 2,12	10,90 ± 1,30*	1,77 ± 0,25*	1,56 ± 0,38
Щелочная фосфатаза	0,85 ± 0,11	1,67 ± 0,16**	1,82 ± 0,05*	1,44 ± 0,06***

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ при сравнении I—II и III—IV

* — $p < 0,01$ при сравнении I—III.

Исследования аминокислотного состава изолированных плазматических мембран гамет быков и баранов показали, что после замораживания и оттаивания более выраженным структурным изменениям подвергаются мембраны гамет быков и в меньшей степени — баранов (табл. 1). Видно, что количество аминокислот в расчете на 100 мг белка выше в плазматических мембранах гамет баранов ($83,92 \pm 1,17$), чем у быков ($73,99 \pm 3,93$), т. е. в изолированных мембранах гамет, как свежеполученных, так и после замораживания и оттаивания спермы быков и баранов, больше всего содержится аминокислот, входящих в группы нейтральных, гидрофобных и кислых, тогда как аминокислоты, входящие в группу основных (щелочных), характерных для

ядра, являются минорными компонентами белков.

После замораживания и оттаивания спермы в изолированных плазматических мембранах гамет изменяется содержание аминокислот отдельных групп. Так, в мембранах гамет быков общее количество аминокислот снизилось с $73,99 \pm 3,93$ мг на 100 мг белка до $50,73 \pm 1,96$ ($p < 0,01$), тогда как в мембранах гамет баранов содержание аминокислот практически не изменилось.

Анализ результатов исследований по группам аминокислот показывает, что в изолированных мембранах гамет быков после замораживания и оттаивания спермы происходит значительное снижение содержания гидрофобных и нейтральных аминокислот по

сравнению с их количеством в мембранах свежеполученных гамет ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно). Выявлена также существенная тенденция к снижению кислых аминокислот, тогда как содержание щелочных аминокислот практически не изменялось. В мембранах гамет баранов после замораживания спермы происходит снижение количества гидрофобных аминокислот по сравнению с их содержанием в мембранах свежеразбавленных гамет ($p < 0,05$). В аналогичных условиях наблюдалось увеличение содержания глютаминовой кислоты ($p < 0,01$).

Нарушения молекулярной организации плазматической мембраны спермиев сопровождается также изменением активности мембраносвязанных ферментов (табл. 2). Видно, что активность $Mg^{2+}(Na + K^+)$ АТФазы в мембранах свежеполученных гамет быков и баранов практически одинакова.

В изолированных плазматических мембранах гамет после замораживания и оттаивания спермы быков и баранов активность $Mg^{2+}(Na + K^+)$ АТФазы изменялась незначительно, что свидетельствует об устойчивости данного фермента к действию низких температур.

При изучении активности 5^1 -АМФазы в нативных мембранах гамет быков выявлено, что она почти в 10 раз выше, чем в мембранах гамет баранов. После криоконсервации спермы в мембранах гамет быков активность 5^1 -АМФазы снижается ($p < 0,05$). В аналогичных условиях в мембранах гамет баранов также наблюдается тенденция к снижению активности данного фермента.

Активность щелочной фосфатазы в мембранах свежеполученных гамет быков почти в два раза ниже, чем у баранов. При криоконсервации спермы быков активность данного фермента в мембранах гамет возрастает ($p < 0,01$), тогда как у баранов снижается незначительно. Полученные данные позволяют заключить, что холодовые изменения мембраносвязанных ферментов гамет являются следствием изменения молекулярной организации плазматических мембран, перестройка которых проявляется в процессе разбавления, охлаждения, замораживания и оттаивания. Подтверждением этому служат изменения соотношения белок:липид и содержания аминокислот изолированных плазматических мембран гамет быков и баранов при криоконсер-

вации спермы. Указанные изменения косвенным образом свидетельствуют о нарушении липид-белковых взаимодействий, имеющих большое значение в сохранении конформационной устойчивости и активности мембранных ферментов. Кроме того потери гидрофобных и нейтральных аминокислот плазматических мембран гамет свидетельствуют о нарушении гидрофобных взаимодействий, а также о снижении количества белков, встроенных в мембраны.

Таким образом исследования соотношения белок:липид в плазматических мембранах гамет быков и баранов свидетельствуют о существовании видовых особенностей в их холодовой чувствительности к низким температурам. Так, например, высокое соотношение белок:липид в мембранах гамет быков может свидетельствовать о более высокой устойчивости спермы этого вида животных по сравнению с гаметами баранов. Подтверждением служат данные по исследованию холодовых изменений акросомы и функциональных показателей гамет быков и баранов. Полученные данные позволили выявить также межвидовые особенности в сохранении плазматической мембраны и акросомы гамет при криоконсервации спермы быков и баранов. Например, по данным электронно-микроскопических исследований в спермиях быков криоповреждениям прежде всего подвергаются митохондрии, что свидетельствует о нарушении работы биоэнергетических систем клеток.

Таким образом в сперме при ее разбавлении, охлаждении, замораживании и оттаивании происходят глубокие нарушения структуры биомембран и акросомы гамет. Степень этих нарушений связана с видовой особенностью молекулярной организации плазматических мембран клеток. Поэтому необходимы дальнейшие исследования структуры и функции мембран гамет при криоконсервации спермы сельскохозяйственных животных, что позволит разработать новые высокоэффективные способы длительного хранения генома ценных животных. В этом аспекте также перспективным является развитие исследований по регуляции спермогенеза у животных, предусматривающих регуляцию синтеза структурных компонентов гамет, устойчивых к холодовому воздействию.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — 256 с.
2. Зверева Г. В. Электронно-микроскопические и биохимические исследования сохраняемого семени быка. — В кн.: Доклады советских ученых к V Международному Конгрессу по биологии воспроизведения и искусственному осеменению животных. М.: Колос, 1964, с. 20—21.
3. Милованов В. К., Соколовская И. И., Смирнов И. В. Свойство живчиков млекопитающих сохранять биологическую полноценность после быстрого замораживания. — Открытия СССР, ЦНИИПИ, М., 1972, с. 28—29.
4. Милованов В. К., Варнавский А. Н., Наук В. А. О природе криогенных повреждений живчиков барана. — Вестн. сельскохозяйственной науки. 1970. № 10, с. 86—93.
5. Милованов. Исследование криогенных повреждений живчиков с помощью ЭПР-спектроскопии спиновых зондов в мембранах. — Доклады ВАСХНИЛ, 1981, № 10, с. 27—29.
6. Наук В. А. Изменение проницаемости мембран и устойчивость белково-холестериновых комплексов под влиянием технологической обработки семени быка. — Сельскохозяйственная биология, 1974, 9, № 1, с. 102—108.
7. Наук В. А. Криоконсервация семени животных. — Пушино, 1982, с. 52.
8. Осташко Ф. И. Причины и механизмы холодового удара клеток (половых). — Междунар. сельскохозяйственный журн., 1964, № 3, с. 106—109.
9. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. — Киев: Урожай, 1978. — 255 с.

10. Платов Е. М. Теоретические и практические основы замораживания семени производителей сельскохозяйственных животных: Автореф. дис.... д-ра биол. наук.—Дубровицы, 1973.— 42 с.
11. Покровский А. А. Биохимические методы исследования в клинике. — М.: Медицина, 1969.— 652 с.
12. Bligh B. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification.— Can. J. Biochem. Physiol., 1959, 37, p. 911.
13. Ivanov N., Profirov Y. Isolation of plasma membranes from ram spermatozoa by a two-phase polymer system.— J. of Reprod. and Fertility, 1981, 63, p. 25—29.
14. Jones R., Mann T. Lipid peroxides in spermatozoa: formation, role of plasmogen and physiological significance. — Proc. Roy. Soc., Lond., 1976, 193, p. 1113.
15. Lovelock J. E. The denaturation of lipid/protein complexes as a cause of damage by freezing.— Proc. Roy. Soc., Ser. Biol., 1957, 147, N 4, p. 427—433.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurements with the folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, p. 265—275.
17. Meryman H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. — Cryobiology, 1971, 8, N 5, p. 489—500.

Институт зоологии и физиологии
АН МССР, г. Кишинев

Поступила 11.11.84

УДК 615.387 : 612.115

Н. И. Панченко, К. М. Сулло, Чжон Люси Чек.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ВРЕМЕНИ ХРАНЕНИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ФИБРИНОЛИЗА

Система фибринолиза играет важную роль в поддержании жидкого состояния крови, а ее нарушения могут явиться причиной тромбообразования или тяжелых геморрагий. Изучение некоторых показателей этой системы, хранившейся различное время при различных температурах, представляет значительный интерес в срочных клинических ситуациях.

Собственно компонентами системы фибринолиза являются плазмин, его неактивный предшественник плазминоген, ферменты — активаторы, превращающие плазминоген в плазмин, а также ингибиторы плазмина [3, 4, 6].

Для характеристики системы фибринолиза в целом необходимо также изучение содержания фибриногена в плазме крови, который лизируется плазмином, продуктов деградации фибриногена (ПДФ), по количеству которых можно косвенно получить представление об активности активаторов плазмина и фибринстабилизирующего фактора XIII, уплотняющего сгусток фибрина.

Кроме того широко используемый в клинике показатель фибринолитической активности крови выявляет скорость превращения плазминогена в плазмин под влиянием тканевых и сосудистых активаторов, имеющих в плазме крови.

Точность и воспроизводимость лабораторных тестов, отражающих состоя-

ние системы гемостаза в значительной мере зависит от соблюдения правил получения и хранения плазмы [10, 12].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния температурного фактора и различных сроков хранения плазмы крови человека на содержание в ней фибриногена, продуктов его деградации (ПДФ), активности фибриназы (фактора XIII), фибринолиза, плазминогена и ингибиторов плазмина в эуглобулиновом осадке.

Исследовалась плазма крови доноров в возрасте 20—55 лет. Кровь для определения фибриногена, ПДФ и активности фактора XIII набирали в полиэтиленовые пробирки с ϵ -аминокапроновой кислотой. Содержание фибриногена определяли спектрофотометрическим методом, ПДФ — по методу Nanniga and Cguest (1967), выражая результаты исследования в ммоль/л тирозина [3].

При определении активности фактора XIII унифицированным методом были учтены рекомендации Г. В. Андреевского и С. Н. Алтуховой (1972) относительно учета количества субстрата в пробе, то есть активность фермента выражали временем (в сек), за которое растворился 0,1 мг фибриногена [1].

Компоненты системы фибринолиза — контактно активизируемый плазминоген и ингибиторы плазмина исследовались методами, разработанными в институте биохимии АН УССР и Киевс-

Т а б л и ц а. Влияние температуры и времени хранения плазмы крови человека на показатели системы коагуляции и фибринолиза.

Показатель	температура и время хранения плазмы	n	$M \pm m$	P
Фибриноген (г/л)	До 2-х часов на льду	45	$2,29 \pm 0,1$	
	Через 20 час:			
	а) при $+20^{\circ}\text{C}$	16	$2,28 \pm 0,03$	$>0,05$
	б) при $+4^{\circ}\text{C}$	16	$2,24 \pm 0,09$	$>0,05$
	в) при -4°C	16	$2,23 \pm 0,09$	$>0,05$
Фибринолитическая активность (г/ч. л.)	До 2-х часов на льду	32	$0,61 \pm 0,01$	
	Через 20 час:			
	а) при $+20^{\circ}\text{C}$	16	$0,39 \pm 0,01$	$<0,001$
	б) при $+4^{\circ}\text{C}$	16	$0,41 \pm 0,01$	$<0,001$
	в) при -4°C	16	$0,44 \pm 0,01$	$<0,001$
Активность фактора XIII (сек)	До 2-х часов на льду	33	$21,45 \pm 1,14$	
	Через 20 час:			
	а) при $+20^{\circ}\text{C}$	16	$18,71 \pm 1,7$	$>0,05$
	б) при $+4^{\circ}\text{C}$	14	$20,31 \pm 1,7$	$>0,05$
	в) при -4°C	16	$17,8 \pm 2,7$	$>0,05$
Активность пламиногена (мин)	До 2-х часов на льду	28	$33,79 \pm 3,0$	
	Через 20 час:			
	а) при $+20^{\circ}\text{C}$	16	$130,0 \pm 9,0$	$<0,001$
	б) при $+4^{\circ}\text{C}$	16	$96,0 \pm 3,0$	$<0,001$
	в) при -4°C	16	$76,0 \pm 2,5$	$<0,05$
Активность ингибиторов пламина (усл. ед)	До 2-х часов на льду	18	$145,0 \pm 7,0$	
	Через 20 час:			
	а) при $+20^{\circ}\text{C}$	14	$118,0 \pm 4,0$	$<0,05$
	б) при $+4^{\circ}\text{C}$	14	$125,0 \pm 3,0$	$<0,05$
	в) при -4°C	16	$127,6 \pm 3,0$	$<0,05$
ПДФ (ммоль/л)	До 2-х часов на льду	48	$0,57 \pm 0,06$	
	Через 20 час:			
	а) при $+20^{\circ}\text{C}$	16	$0,19 \pm 0,01$	$<0,001$
	б) при $+4^{\circ}\text{C}$	16	$0,23 \pm 0,01$	$<0,001$
	в) при -4°C	16	$0,43 \pm 0,01$	$<0,05$

ком НИИ отолярингологии (1983) [8]. Время лизиса эуглобулиновой фракции (активность фибринолиза) определяли унифицированным методом Ковальского и соавт., но при этом учитывали содержание фибриногена в плазме и, таким образом, результаты исследования выражали в граммах фибриногена, лизировавшегося за час под влиянием пламина, содержащегося в 1 л плазмы [9].

Часть плазмы, помещенной в лед, исследовали в течение первых двух часов после забора крови. Остальная плазма была разлита в три пробирки и хранилась при различной температуре: $+20^{\circ}\text{C}$, $+4^{\circ}\text{C}$, -4°C . Повторные исследования избранных показателей проводились через 20 часов.

Поскольку согласно большинству методических указаний коагуляцион

ные тесты рекомендуется выполнять в течение первых двух часов после получения крови, значение показателей в этот период нами приняты в качестве контрольных и остальные серии исследований сопоставлялись с ними. Полученные данные об изменении избранных показателей при определенном времени хранения плазмы при разной температуре приведены в таблице.

Из приведенных данных видно, что содержание фибриногена во всех образцах плазмы, хранившихся в течение 20 часов при различных температурных режимах, не меняется. Не изменяется в этих условиях также активность фактора XIII. Активность фибринолиза, пламиногена и ингибиторов пламина при хранении в течение 20 часов, независимо от температуры: $+20^{\circ}\text{C}$,

+4 °С, —4 °С закономерно снижается. Снижение фибринолитической активности при хранении плазмы, возможно, происходит ввиду высокой лабильности активаторов плазминогена и свободного плазмина в крови. Можно также предположить, что в этих условиях ингибиторы плазмина, взаимодействуя со свободным плазмином, образуют необратимые комплексы, которые не обладают фибринолитической активностью [6].

По активности плазминогена в эуглобулиновом осадке обычно судят об уровне его активаторов. Во всех сериях наблюдалось падение активности плазминогена ($P < 0,001$), причем максимальное снижение времени лизиса осадка ($130,0 \pm 0,9$ мин) оказалось в плазме, хранившейся при комнатной температуре (+20 °С).

Снижение активности ингибиторов плазмина происходит параллельно с уменьшением активности плазминогена и, следовательно, плазмина. Механизмы снижения активности ингибито-

ров в данных условиях неясны. Можно лишь предположить образование необратимых комплексов, в частности с α -макроглобулином, который способен связывать избыток плазмина.

Что касается исследования ПДФ в условиях нашего эксперимента, то можно было ожидать соответствия между уровнем фибриногена и продуктов его деградации. Однако количество ПДФ в данных условиях значимо уменьшилось и лишь при —4 °С это снижение было менее выражено.

Таким образом при комнатной температуре и в холодильнике при +4 °С и —4 °С и 20 часах хранения плазмы крови человека стабильными оказались лишь фибриноген и фактор XIII. Эти показатели можно исследовать через 20 часов в плазме, хранившейся при комнатной температуре, +4 °С, —4 °С.

Все остальные показатели, характеризующие систему фибринолиза, следует изучать в плазме крови, хранившейся на льду не позже чем через два часа после взятия крови.

1. Андреев Г. В., Алтухова С. Н. Лаб. дело, 1972, № 11 с. 656—658.
2. Балуда В. П. Основные закономерности изменения свертываемости крови и ее фибринолитической активности при различных состояниях организма. Томск, 1963, с. 24—28.
3. Балуда В. П., Баркаган З. С. и соавт. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. Томск, 1980, 304 с.
4. Беремеев К. Н., Волохонская Л. И. и соавт. Исследование ингибиторов плазмина крови человека. Лаб. дело, 1980, № 4, с. 202—203.
5. Иванов Е. П. Диагностика нарушений гемостаза Минск: «Беларусь», 1983, 223 с.
6. Коваленко А. Н. Механизм фибринолиза. Врачебное дело, 1983, № 1, с. 11—19.
7. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М., 1975, 488 с.
8. Белицер В. А., Варецкая Т. В., Беремеев К. Н. и соавт. Методы определения фибриногена и компонентов фибринолиза плазмы крови человека. «Методические рекомендации», К., 1983, 20 с.
9. Панченко Н. И., Сулло К. М., Масленникова Н. К. Оценка активности фибринолиза и фибриназы. Информационное письмо, К., 1984.
10. Derek O. The physiology of hemostasis, Groom Helm. 1983, London and Canberra, 367 pp.
11. Lowe G. D. O. and Prentice C. R. M. The laboratory investigation of fibrinolysis. Blood coagulation and hemostasis. Ed. J. M. Thomson, 1980, Edinburg. pp. 245—9.
12. Roger H., Robert G. M. Medical lab. Haematology. Butterworth. 1984, 669 pp.

Украинский институт
усовершенствования врачей,
г. Харьков

Поступила 8.12.1984

Рецензия

HANDBOOK OF CRYOSURGERY, ed. by Richard J. Ablin, 1982, p. 428.

Существенным отличием рецензируемой книги от ранее изданных монографий является наличие в ней данных о применении холода в качестве лечебного фактора в различных областях медицины и ветеринарии, а также детализация приемов эксплуатации криомедицинской техники, что делает издание полезным не только для врачей, но и для разработчиков новой криохирургической аппаратуры.

Книга написана коллективом из 24 человек, чьи имена известны советским читателям, некоторые являются авторитетными исследователями в разделах экспериментальной и клинической криохирургии. В работе, рассчитанной на широкий круг читателей, имеется три части.

Первая — посвящена фундаментальным аспектам и общим принципам действия низких температур на ткани. В описании аспектов криоповреждения тканей подчеркнута взаимосвязь некротизации с температурными и временными режимами замораживания — оттаивания, что находится в тесной зависимости от хладопроизводительности инструмента, обеспечивающего кристаллизацию тканевых жидкостей лишь на определенном расстоянии от центра воздействия. Данное обстоятельство, по справедливому мнению автора раздела, де-

лает задачи контроля и стандартизации криоповреждения главными.

Вторая часть, в 8 главах, излагает практические аспекты применения низких температур в лечении доброкачественных и злокачественных кожных повреждений, злокачественных опухолей женских половых органов, в нейрохирургии, при лечении заболеваний глаз, в области стоматологии и оториноларингологии, а также криохирургии заболеваний аноректальной зоны и предстательной железы. Указанные главы (204 стр.) детально освещают показания к использованию криохирургии, методики выполнения операций, возможные осложнения и мероприятия по их предотвращению.

С особой убедительностью написаны страницы главы 13, посвященные эндоскопической криохирургии простаты и мочевого пузыря.

Третья часть книги связана с материалами по применению криохирургии в ветеринарной медицине.

Развернутые библиографические сведения после каждой главы, к сожалению, не содержат работ советских авторов, хотя по многим вопросам криохирургии они дополняют приведенные публикации, а в некоторых разделах (гинекология, онкология, ожоги) носят приоритетный характер.

Б. П. Сандомирский,
доктор медицинских наук

Рефераты

УДК 61:355

Ради мира, жизни на земле/Прокопов В. Е. — Криобиология, 1985, № 2, с. 3.

Статья о подвиге советского народа в Великой Отечественной войне, о вкладе советской науки медиков в дело победы над врагом

УДК 57.043:581.1.036

Криорезистентность мембран и вопросы консервации растений./Сытник К. М., Мануильский В. Д. Криобиология, 1985, № 2, с. 5.

На основании анализа литературных и собственных данных рассматриваются структурно-функциональные аспекты действия ультранизких температур на мембраны клеток растительных тканей, различающихся по степени гидратации. Делается вывод, что основными принципами формирования криорезистентности мембран растений являются снижение их функциональной активности, уменьшение гидрофильности и увеличение плотности упаковки ее компонентов в пределах, не нарушающих нативность клетки. Библиогр. 39 назв.

УДК 577.3

Биофизический подход к анализу крио-процессов/Г. Р. Иваницкий — Криобиология, 1985, № 2, с. 12.

Показана доменная организация биологических систем разных структурных уровней. В терминах подвижности доменов даны биофизические подходы к описанию реакции биосистем на воздействие низкими температурами. Библиогр.: 14 назв. Табл. 1. Рис. 5.

УДК 57.043—612.017

Проблемы криоиммунологии/Цуцаева А. А. — Криобиология, 1985, № 2, с. 18.

Дан анализ состояния исследований в области криоиммунологии; определены основные задачи в области фундаментальных и прикладных исследований и наиболее перспективные направления развития.

Определено понятие криоиммунологии как одного из направлений криобиологии, касающегося исследований иммунобиологических реакций биологических систем на воздействие низких температур per se и в сочетании с воздействием химических веществ и других физических факторов, а также механизмов, лежащих в основе возникающих при этом изменений. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043:577.112.825+577.217.36+577.17.2

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

Исследована активность белоксинтезирующей системы из клеток криоконсервированной щитовидной железы. Показано, что после криоконсервации белоксинтезирующая способность щитовидной железы сохраняется на 84,5%.

Определен размер популяции тиреоглобулиновых полирибосом в тотальной популяции полирибосом из клеток криоконсервированной щитовидной железы. Содержание тиреоглобулиновых полирибосом в клетках криоконсервированной щитовидной железы составило 11,2 %.

Таким образом установлено, что в криоконсервированной щитовидной железе белоксинтезирующая активность сохраняется на 85—90 %. Ил. 1. Библиогр.: 13 назв.

УДК 57.043

Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе/Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бабийчук Л.А., Бондаренко Т.П., Бойко Н.М.— Криобиология, 1985, № 2, с. 25.

Изменение объема, формы и проницаемости эритроцитов в гипертонических средах зависят от температуры. При 0 °С резко снижается пропорция клеток с дефектной структурой мембраны, оцениваемой по проницаемости для ионов K^+ . Характеристики объема, формы и проницаемости, приобретаемые клетками при 0 °С, практически не изменяются при последующем изменении температуры до 37 °С. Клетки, сенсibilизированные к охлаждению, становятся чувствительными к переносу из гипертонических условий в изотонические. При этом максимальный гемолиз наблюдается при комбинированном охлаждении и изменении тоничности среды. Делается вывод, что чувствительность эритроцитов к охлаждению в гипертонических условиях связана с резким ограничением способности белкового скелета клетки изменить свой объем в фазе коллоидно-осмотического набухания при низких температурах. Ил. 5. Библиогр.: 18 назв.

УДК 57.043:577.15:612.111

Влияние состава ресуспендирующих сред на сохранность размороженных эритроцитов при +4 °С. Количественные и качественные вариации основных компонентов раствора/Гусева Н. Р., Луговой В. И. Криобиология, 1985, № 2, с. 32.

Изучалось влияние качественного состава и количественного соотношения основных компонентов ресуспендирующих растворов/NaCl, сахарозы, маннитола, фосфата, глюкозы/ на динамику главных показателей структурно-функциональной полноценности размороженных эритроцитов в течение 5 суток хранения при +4 °С после криоконсервирования. Обсуждаются эффекты отдельных компонентов и различных вариантов их сочетания в составе растворов на сохранность клеток при +4 °С. Полученные результаты свидетельствуют о том, что создание условий, обеспечивающих поддержание высоких уровней АТФ и 2,3-ДФГ наряду с замедлением гемолиза и потерь катионов в этих условиях возможно при ресуспендировании размороженных-отмытых клеток в растворах, содержащих все основные компоненты в адекватных количественных соотношениях. Табл. 2. Библиогр.: 12 назв.

УДК 57.043:612.43:45.014.41.089.843

Модуляция низкими температурами и ДМСО биохимических процессов в щитовидной железе/ В. А. Чуйко — Криобиология, 1985, № 2, с. 38.

Представлены данные, показывающие, что замораживание щитовидной железы до -196 °С сопровождается перестройкой биохимических процессов, выражающейся в снижении захвата и концентрирования иодида, включения ^{14}C -аминокислот в белки, увеличении органификации иодида, образования внутриклеточного цАМФ, изменения параметров связывания 3H -норадреналина с рецепторами. Диметилсульфоксид существенно изменяет характер реакции щитовидной железы на замораживание. В зависимости от концентрации он может оказывать стабилизирующее влияние, ингибировать или усиливать эффекты, вызываемые действием низких температур. Ил. 3. Табл. 1. Библиогр.: 8 назв.

УДК 612.82:612.592

Роль норадренергической системы в сверхмедленных процессах головного мозга при краниocereбральной гипотермии/Бабийчук Г. А., Марченко В. С., Шифман М. И.— Криобиология, 1985, № 2, с. 43.

При помощи локальной перфузии гипоталамуса *in vivo* и выделением синапсом *in vitro* с одновременной регистрацией сверхмедленных процессов изучалось действие краниocereбральной гипотермии на некоторые нейрoхимические и нейрoфизиологические показатели ЦНС.

Гипотермия на начальных этапах воздействия (20 мин) приводит к активации центральных адренергических структур, сопровождающейся повышенной секрецией 3H -норадреналина (коэффициент высвобождения (K_v)=9). Одновременно происходит усиление дзета-активности. Мощность дзета-ритма увеличивается на 150 %. Ил. 1. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043:636.082.31:591.463.1

Структурные и биохимические криоповреждения биомембран самцов сельскохозяйственных животных/Наук В.А.— Кробиология, 1985, № 2, с. 47.

Исследованы изолированные богатые фракции плазматических мембран и морфологические изменения гамет при криоконсервации спермы быков и баранов. Выявлены межвидовые особенности содержания и соотношения основных структурных компонентов плазматических мембран гамет. При криоконсервации спермы происходят изменения активности мембраносвязанных ферментов и структуры плазматических мембран. Табл. 2. Библиогр.: 17 назв.

УДК 615.387:612.115

Влияние температуры и времени хранения плазмы крови человека на некоторые показатели системы фибринолиза/Панченко Н. И., Сулло К. М., Чжон Люси Чек.— Кробиология, 1985, № 2, с. 50

В плазме крови доноров, которую хранили при $+20^{\circ}$, $+4^{\circ}$ и -4°C , исследовали содержание фибриногена, ингибиторов пламина и активность фибринстабилизирующего фактора (фибриназы). Установлено, что содержание фибриногена и активность фибриназы во всех образцах плазмы, хранившейся в течение 20 часов при различных температурных режимах, не меняется. В этих же условиях уровень ПДФ, активность фибринолиза, пламиногена и ингибиторов пламина закономерно снижается независимо от изучавшихся температурных условий.

UDC 61:355

For the sake of peace and life on the Earth/Prokopov V. E.— Kriobiology, 1985, № 2, p. 3.

The leading article devoted to the feat of the Soviet people in the Great Patriotic War, the contribution of the Soviet science and physicians to the victory over enemies.

UDC 57.043:581.1.036

Membrane cryoresistance and problems of plant preservation/Sytnik K. M., Manuilsky V.D.— Kriobiology, 1985, L 2, p. 5.

On the basis of personal and published elsewhere data, structural and functional aspects of the effect of ultralow temperatures on the membranes of plant cells different in the hydration degree are discussed. The conclusion is drawn that the basic principles in formation of plant membrane cryoresistance are the lowering of their functional activity, a decrease in the hydrophilic nature and an increase in the package density of the components in the ranges not disturbing cell nature.

УДК 577.3

Biophysical approaches to analysis of cryoprocesses/Ivanitsky G. R.— Kriobiologiya, 1985, N 2, p. 12.

The domain organization of biological systems of different structural levels is shown. The biophysical approaches to describing biosystem reaction to the effect of low temperatures are given in terms of domain motility. Table, 14 Refs.

UDC 57.043+612.017

Problems in cryoimmunology/Tsutsayeva A.A.— Kriobiologiya, 1985, N 2, p. 18.

Analysis of the state of cryoimmunological investigations is presented, key problems in the fundamental and applied studies and the most perspective directions of research are defined.

The notion «cryoimmunology» is given as one of the directions in cryobiology concerning investigations of immunological response of biological systems to the effect of low temperatures per se, combined with the effect of chemical substances and other physical factors, and also mechanisms of changes resulted from them are discussed. 10 refs.

UDC 57.043+577.112.825+577.217.36 + 577.17.2

Biosynthesis of thyroglobulin and content of thyroglobulin polyribosomes in cryopreserved thyroid cells/Turakulov Ya.Kh., Atakhanova B.A., Kadyrova D.A., Ismailov S.I. — Kriobiologiya, 1985, N 2, p. 23.

The activity of protein-synthesizing system from cryopreserved thyroid cells was studied. Cryopreservation produced no significant effect on the level of labeled amino acid incorporation into proteins. The content of individual thyroglobulin polyribosomes in cryopreserved thyroid cells was studied. The content of thyroglobulin polyribosomes in cryopreserved thyroid cells makes up to 11,2 %. Therefore, the protein-synthesizing activity in cryopreserved thyroid gland kept on 85—90 %. 1 fig. 13 refs.

The common mechanism of damage of cells subjected to thermal shock, freezing and post-hypertonic lysis./Belous A. M., Bondarenko V. A., and Boyko N. M.— *Kriobiologiya*, 1985, N 2, p. 25.

Changes in volume, shape, and permeability of erythrocytes in hypertonic solutions are caused by temperature. At 0 °C the percentage of cells with faulty membrane structures (as judged by the permeability for K⁺) decreases sharply. Volume, shape and permeability parameters which the cells acquire at 0 °C change but insignificantly with the environmental temperature rise to 37 °C. Cells sensitized to cold become sensitive to transfer from a hypertonic solution into isotonic one, the highest haemolysis being observed upon combined cooling and changing the medium tonicity. It is concluded that the erythrocyte sensitivity to cooling under hypertonic conditions is due to a sharp limitation of the capability of the cell skeleton for changing the volume upon colloid—osmotic swelling at low temperatures 5 figs. 18 refs.

YUC 57.043:577.15:612.111

Effect of resuspension medium composition on the stability of thawed red blood cells at +4 °C/Guseva N. R., Lugovoy V. J.— *Kriobiologiya*, 1985, N 2, p. 32.

The influence of quality composition and quantity correlations of resuspension solution basic components (sodium chloride, sucrose, mannitol, glucose, phosphate) on the dynamics of main biochemical parameters of structural and functional ability of erythrocytes stored up to 5 days at 4 °C following freeze preservation has been studied. The effects of some components and their combinations on red blood cell stability at 4 °C are discussed. The data obtained show that the maintenance of ATP, 2,3-DPG alongside with the reduction of haemolysis and cation loss under these conditions may be provided with the post-freeze resuspension of thawed-washed erythrocytes in solutions containing all the main components in adequate correlations. 2 tables. 12 refs.

UDC 57.043:612.43:45.014.41.089.843

The modulation of biochemical processes in the thyroid gland by low temperatures and DMSO/V. A. Chuyko—*Kriobiologiya*, 1985, No 2, p. 38.

Data are presented, which show that the freezing of thyroid gland to —196 °C is escorted by the rebuilding of biochemical processes which is expressed by the decrease of uptake and concentration of iodide, inclusion of ¹⁴C-amino acids into proteins, increase of iodide organification, formation of intracellular cAMP, change of binding parameters of ³H-noradrenalin with receptors. Dimethyl sulfoxide considerably changes the reaction character of the thyroid gland to freezing. Due to the concentration, it may effect stabilizingly, inhibit or increase the effects of low temperatures. Refs: 8 titles, 1 table, 3 figs.

Role of noradrenergic system in the super-slow processes of brain under craniocerebral hypothermia/Babiychuck G. A., Marchenko V. S., Shifman M. I.— *Kriobiologiya*, 1985, No. 2, p. 43.

The effect of craniocerebral hypothermia on various neurochemical and neurophysiological indices of CNS has been studied by means of local perfusion of hypothalamus in vivo and isolation of synaptosomes in vitro with simultaneous registration of superslow processes.

Hypothermia at the initial stages of its effect (20 min) results in the activation of the central adrenergic structures followed by the increased secretion of ³H-noradrenaline (release coefficient (RG) = 9). At the same time an increase in dzeta activity occurs. The intensity of dzeta-rhythm increases by 150 %. 1 fig, 8 refs.

UDC 57.043:636.082.31:591.463.1

Structural and biochemical cryodamage of gamete biomembranes in farm animal males/Nauk V. A.—*Kriobiologiya*, 1985, N 2, p. 47.

Isolated enriched in plasma membrane fractions and morphological changes of gametes during cryopreservation of bull and ram semen were investigated. Interspecies peculiarities of the quantity and relation of the main structural plasma membrane components of gametes were observed. The procedure of semen cryopreservation affects the membrane related enzymes and plasmac membrane structure.

2 tables. 17 refs.

UDC 615 387:115

The effect of temperature and time of storage on some indices of the fibrinolytic system of human blood plasma./N. I. Panchenko, K. M. Sullo, and John Lucy Chek—*Kriobiologiya*, 1985, № 2, p. 50.

The content of fibrinogen and its degradation products (DPF) as well as the activities of fibrinolysis, plasminogen, plasmin inhibitors and fibrin stabilizing factor (fibrinase) were studied in donor blood plasma stored at 20, 4, or —4 °C. The content of fibrinogen and the activity of fibrinase in the samples of plasma stored at different temperatures during 20 hours unchanged. The activities of DPF, fibrinolysis, plasminogen and plasma inhibitors were found to decrease progressively and independently of the temperature regimes studied.

О НОВОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ СТАНДАРТЕ

Постановлением Госстандарта от 27.02.84 утвержден разработанный впервые ГОСТ 7.46-84 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Справочное издание. Представление численных данных о свойствах веществ и материалов. Общие требования». Срок его действия установлен с 01.01.85 до 01.01.88.

Цель разработки стандарта — унификация требований к представлению численных данных о свойствах веществ и материалов в справочных изданиях.

Стандарт соответствует Рекомендациям по представлению в первичной литературе численных экспериментальных данных Международного комитета по сбору и оценке численных данных для науки и техники (КОДАТА), ГОСТ 7.32-81 и ГОСТ 7.33-81. Стандарт устанавливает общие требования к структуре справочного издания с численными данными о свойствах веществ и материалов, представлению в нем численных данных и порядку согласования выпуска справочного издания. Справочное издание должно обеспечивать ученых и специалистов достоверной, полной и современной информацией о численных данных свойств веществ и материалов, иметь четко выраженный читательский адрес и указания на достоверность или категорию представленных численных данных — по ГОСТ 8.310-78, содержать записи численных данных в форме, удобной для обработки и ввода в ЭВМ, включать поисковый аппарат, обеспечивающий удобство пользования изданием.

Всесоюзный научно-исследовательский центр по материалам и веществам Госстандарта (ВНИЦ МВ) организует экспертизу содержания справочника и выдает издательству право титульной записи «Согласовано с Государственной службой стандартных справочных данных».

Лит 3-23

Цена 65 коп.

Индекс 70474

ПРОДОЛЖАЕТСЯ ПОДПИСКА
на 3 и 4 номера журнала «Криобиология»,
которые выйдут в 1985 году

Цена одного номера 65 коп.
Стоимость двух номеров 1 р. 30 коп.

Подписку принимают все отделения связи
и общественные уполномоченные «Союзпечати».

Журнал «Криобиология», № 2, 1985 г.
Издательство «Наукова думка». Киев
Тип. изд-ва «Соц. Харківщина».