

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

4|90



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Грищенко (главный редактор), А. М. Белоус (зам. гл. редактора), С. И. Аксенов, Г. А. Бабийчук, М. Е. Бекер, Ю. П. Благой, Л. Вонг (Канада), А. Н. Гольцев, К. Дж. Грин (Великобритания), Г. Ф. Жегунов, В. И. Луговой, В. Я. Малеев, Г. Маттес (ГДР), П. Мнержичка (ЧСФР), Е. Я. Панков, Ф. А. Приходько (отв. секретарь), Н. С. Пушкарь, Б. П. Сандомирский, А. С. Снурников, А. А. Цуцаева, С. А. Шалимов, Т. Н. Юрченко, Э. З. Эмирбеков

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

EDITORIAL BOARD

V. I. Grishchenko (Editor-in-Chief), A. M. Belous (Associated Editor), S. I. Aksenov, G. A. Babiychuk, M. E. Beker, Yu. P. Blagoj, L. Wang (Canada), A. N. Goltsev, C. J. Green (Great Britain), G. F. Zhegunov, V. I. Lugovoj, V. Ya. Maleyev, G. Matthes, (GDR), P. Meřicka (ČSFR), E. Ya. Pankov, F. A. Prikhodko, N. S. Pushkar, B. P. Sandomirsky, A. S. Snurnikov, A. A. Tsutsayeva, S. A. Shalimov, T. N. Yurchenko, E. Z. Emirbekov

EDITORIAL COUNCIL

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

Адрес редакции:
310015, Харьков, 15,
ул. Переяславская, 23,
тел. 72-10-39.

Научный редактор *В. И. Луговой*
Редактор *Л. А. Рябина*
Технический редактор *В. Н. Волкова*

Сдано в набор 17.07.90. Подп. в печ. 26.09.90. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Уч.-изд. л. 5,39. Усл. кр.-отт. 5,6. Тираж 1000 экз. Зак. 279. Цена 65 к.

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 1189.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

4 1990

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1985 ГОДА
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1990

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Белоус А. М., Гулевский А. К., Бабийчук Л. А., Рязанцев В. В., Землянских Н. Г. Роль белков цитоскелета в изменении стабильности клеток при температурно-осмотическом воздействии 3
- Морозова Т. Ф., Липина О. В., Шраго М. И., Бредихина Л. П. Динамика кислотного и осмотического гемолиза эритроцитов при различных воздействиях . . . 14
- Мяделец О. Д., Суханов А. Ф. Взаимодействие тканевых базофилов и макрофагов в коже и лимфоузле белых крыс после воздействия на их организм общей глубокой гипотермии 19

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Тихонова В. Л., Ильина Л. В., Макеева И. Ю., Яшина С. Г. Влияние низких и сверхнизких температур хранения на лабораторную всхожесть семян дикорастущих травянистых растений. 1. Семена без периода покоя 23
- Жукова Л. В., Неклеса Н. П., Лобжанидзе Н. А. Влияние криоконсервации на жизнеспособность и генетическую стабильность ржавчатых грибов хлебных злаков 28
- Мельникова В. Н., Платонова Г. Г., Замалетдинова Т. В. Продление сроков хранения при 4 °С размороженных эритроцитов, криоконсервированных различными методами 31

КРИОМЕДИЦИНА

- Сосин И. К., Бабийчук Г. А., Гуревич Я. Л., Филатов М. К., Згонникова Т. Б. Клинические результаты использования краниocereбральной гипотермии для лечения больных алкоголизмом 36
- Козин Ю. И., Юрченко Т. Н., Козлова В. Ф., Дмитриева Л. Ю. Динамика абациллирования и морфологических изменений почечной ткани при санации кавернозных форм нефротуберкулеза методами криотермовоздействия 42

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Зинченко А. В., Воротилин А. М., Моисеев В. А. Повреждение эритроцитов при низких температурах 48
- Верховская Л. З., Карташов В. Ф., Пичугин Ю. И. Морфофункциональные свойства клеток перевиваемой культуры почки телят, криоконсервированной под защитой некоторых диолов 49
- Погосян Г. К., Алагемян Д. С., Корчилава Т. К. Коррекция сперматогенеза методом локальной гипотермии 52
- ХРОНИКА 53
- ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ 55



CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Belous A. M., Gulevsky A. K., Babiychuk L. A., Rysantsev V. V., Zemlyanskikh N. T.</i> The role of cytoskeleton proteins in changing the cell stability by temperature-osmotic effects	3
<i>Morozova T. F., Lipina O. V., Shrago M. I., Bredikhina L. P.</i> The dynamics of acidic and osmotic hemolysis of erythrocytes caused by different effects	14
<i>Myadelets O. D., Sukhanov A. F.</i> Interactions between tissue basophils and macrophages in skin and lymph nodes of white rats subject to total deep hypothermia	19

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Tikhonova V. L., Ilyina L. V., Makeyeva I. Yu., Yashina S. G.</i> The effect of low and superlow storage temperatures on the laboratory germinating ability of wild herb seeds. 1. Seeds without resting period	23
<i>Zhukova L. V., Neklesa N. P., Lobzhanidze N. A.</i> The influence of cryopreservation on the viability and genetic stability of cereal rusts	28
<i>Melnikova V. N., Platonova G. G., Zamal'tdinova T. V.</i> The prolongation of storage of thawed erythrocytes at 4 °C after freezing by various methods	31

CRYOMEDICINE

<i>Sosin U. K., Babiychuk G. A., Gurevich Ya. L., Filatov M. K., Zgonnikova T. B.</i> Clinical efficiency of craniocerebral hypothermia used for treatment of alcoholism	36
<i>Kozin Yu. I., Yurchenko T. N., Kozlova V. F., Dmitriyeva L. Yu.</i> The dynamics of abacillation and morphological changes in renal tissue during sanation of cavern nephrotuberculosis forms by cryoapplication	42

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Zinchenko A. V., Vorotilin A. M., Moiseyev V. A.</i> Damage of erythrocytes at low temperatures	48
<i>Verkhovskaya L. Z., Kartashov V. F., Pichugin Yu. I.</i> Morphological and functional properties of calf kidney cells in culture cryopreserved under protection of diols	49
<i>Pogosyan G. K., Alagezyan D. S., Korchilava T. K.</i> Correction of the sperm genesis by the method of local hypothermia	52
<i>CHRONICLE</i>	53
<i>DEFENSE OF THESES</i>	55

*А. М. Белоус, А. К. Гулевский, Л. А. Бабийчук,
В. В. Рязанцев, Н. Г. Землянских*

РОЛЬ БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА В ИЗМЕНЕНИИ СТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОК ПРИ ТЕМПЕРАТУРНО- ОСМОТИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

В работе с помощью методов поляризационной микроскопии, радиоизотопного и ферментативного анализа исследовали связь структурно-функциональных изменений белков цитоскелета эритроцитов с их гемолизом при замораживании-оттаивании в зависимости от условий обработки криопротектором ПЭО-1500. Показано, что предварительная холодовая адаптация клеток при 4 °С в присутствии полимерного криопротектора позволяет лучше сохранить свойства белков спектрин-актиновой сети. Обсуждаются механизмы структурно-функциональных перестроек спектрин-актиновой сети в условиях холодной обработки эритроцитов ПЭО-1500.

Теоретический и экспериментальный анализ механизмов повреждений клеток при температурном шоке [1,14] и при замораживании-оттаивании [4] показывает, что одной из важных цитоплазматических структур, обеспечивающих стабильность (или нестабильность) клетки, является система мембранных цитоскелетных белков [11, 15]. Ранее нами [2] в опытах на эритроцитах человека было обнаружено, что феноменологически реакция цитоскелета на температурно-осмотическое воздействие проявляется в локальной деформации мембраны, интенсивность проявления которой зависит от тоничности среды и температуры, а также возникновения процессов ко- и противотранспорта ионов [9]. При повышении концентрации NaCl в среде инкубации с 0,15 М до 0,6 М и выше (1,2—1,5 М) направленность морфологических изменений эритроцитов очень сильно зависела от температуры, при которой инкубировали клетки (рис. 1). Как видно, при повышении концентрации в среде NaCl и инкубации в течение 40—60 мин при 0 °С формируются сжатые формы клеток, которые по данным гемолиза и выхода катионов характеризуются достаточно высокой устойчивостью. При тех же условиях среды инкубации, но при 37 °С в течение 40—60 мин образуется большое число сфероцитов — клеток, отличающихся высокой лабильностью к действию факторов температурного шока [2].

Исследование характера цитоархитектоники эритроцитов показало, что аналогичные изменения формы этих клеток возникают и при использовании таких осмотически активных соединений, как полиэтиленгликоли, ПВП, сахара [10].

Очень медленное добавление непроникающих криопротекторов в суспензию эритроцитов на протяжении ~60 мин при низкой положительной температуре (0—4 °С), хотя и не предотвращает полностью дегидратации

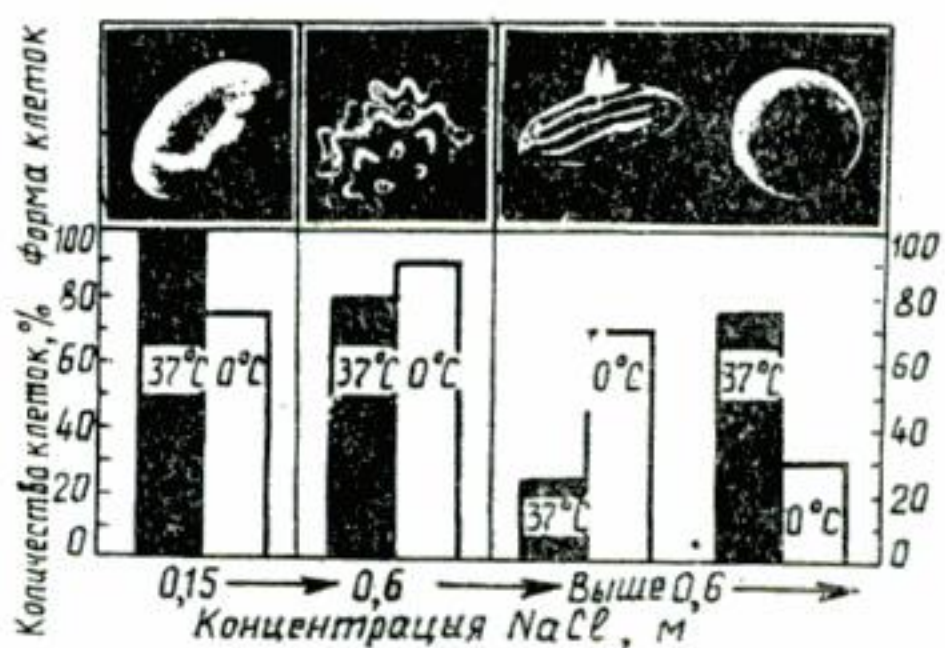


Рис. 1. Трансформация формы эритроцитов в зависимости от тоничности среды и температуры

клеток, однако поверхностная архитектура эритроцитов мало изменяется (рис. 2, б). После замораживания-отогрева эритроцитов, инкубированных предварительно в растворе 15 %-ного ПЭО при этих температурах, их форма приближается к нативной (рис. 2, в), т. е. большая часть клеток в этом случае представлена клетками, близкими по своей структуре к нормоцитам (51 %), а число патологически измененных форм клеток незначительно.

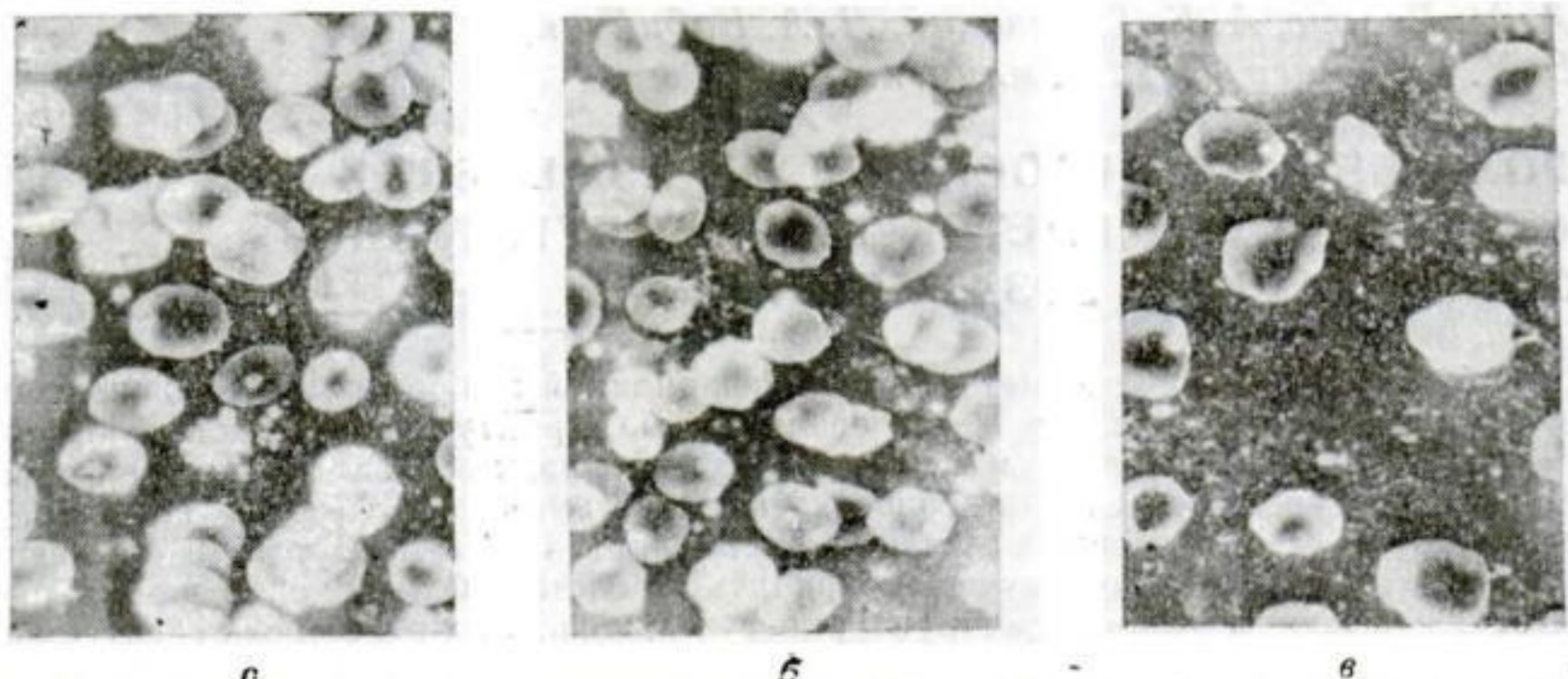


Рис. 2. Изменение формы эритроцитов при холодной обработке крипротектором ПЭО-1500 (б) и последующем замораживании-отогреве (в), а — нативные эритроциты

После обработки крипротектором ПЭО в 15 %-ной концентрации при 22 °С возникает более выраженная дегидратация клеток, сопровождающаяся деформацией плазматической мембраны, и в суспензии гораздо чаще встречаются гемолитические формы эритроцитов, среди которых преобладают дегенеративно измененные и куполообразные клетки (рис. 3, а). После быстрого (37 °С) размораживания клеток, инкубированных

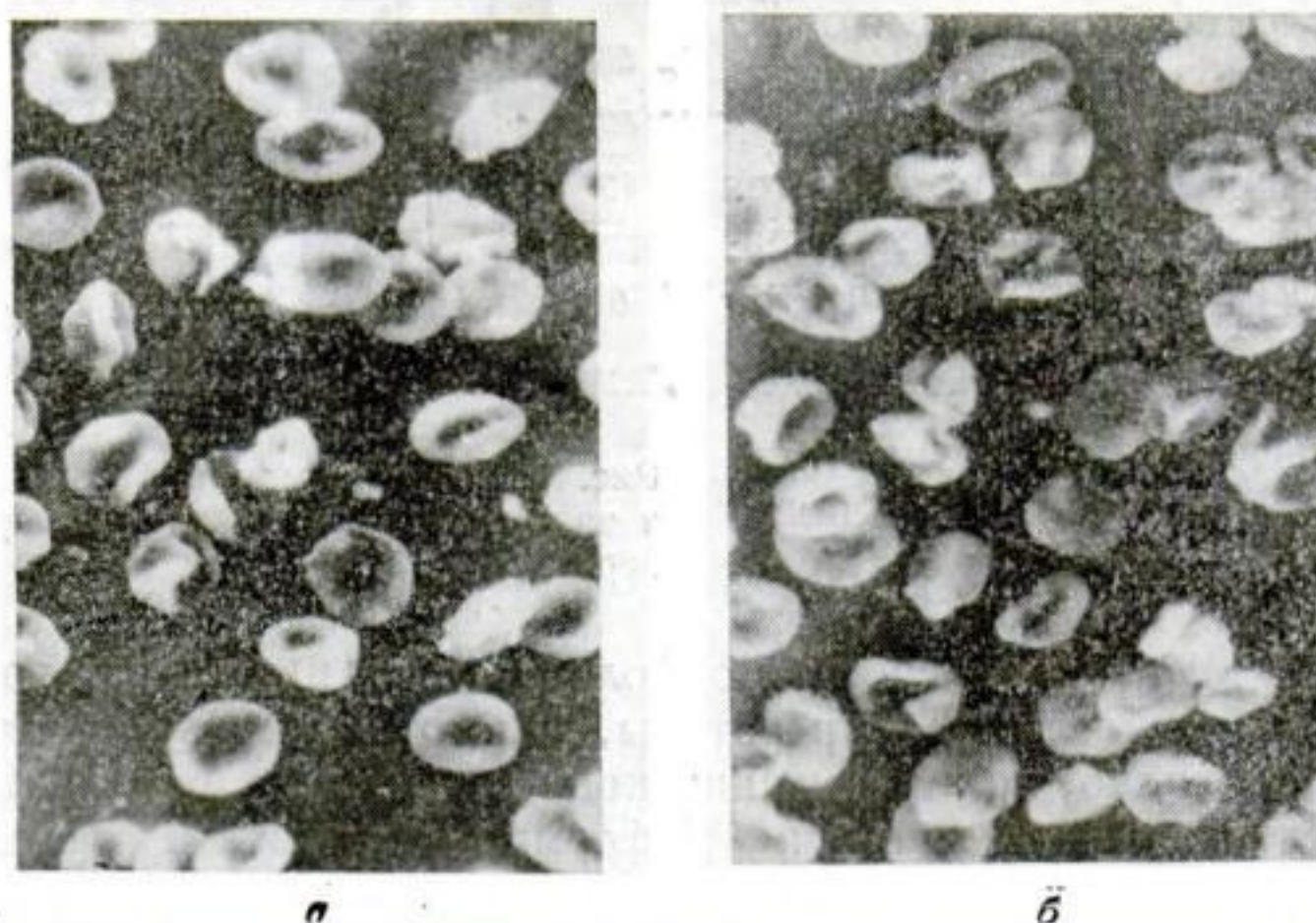


Рис. 3. Изменение формы эритроцитов после обработки крипротектором ПЭО-1500 при комнатной температуре (а) и последующем замораживании-отогреве (б)

в таких условиях (рис. 3, б), они остаются сильно деформированными, наблюдается появление большого числа гемолитических и дегенеративных форм эритроцитов, видны фрагменты эритроцитов. Таким образом, имеется существенная разница в реакции эритроцитов на температурно-осмотическое воздействие: на холоду степень деформации клеток менее выражена, чем при комнатной температуре.

Известно, что процессы спиккулообразования и везикуляции мембраны связаны с реакцией и перестройкой цитоскелетных белков [4, 14] и они

являются основой для формирования трансмембранных дефектов, через которые происходит утечка ионов, метаболитов и белков. Если при этом нарушается структура и функция этих белков, то может происходить нарушение степени их ассоциативных связей с внутренней поверхностью мембраны и, таким образом, изменяться стабильность мембраны в целом.

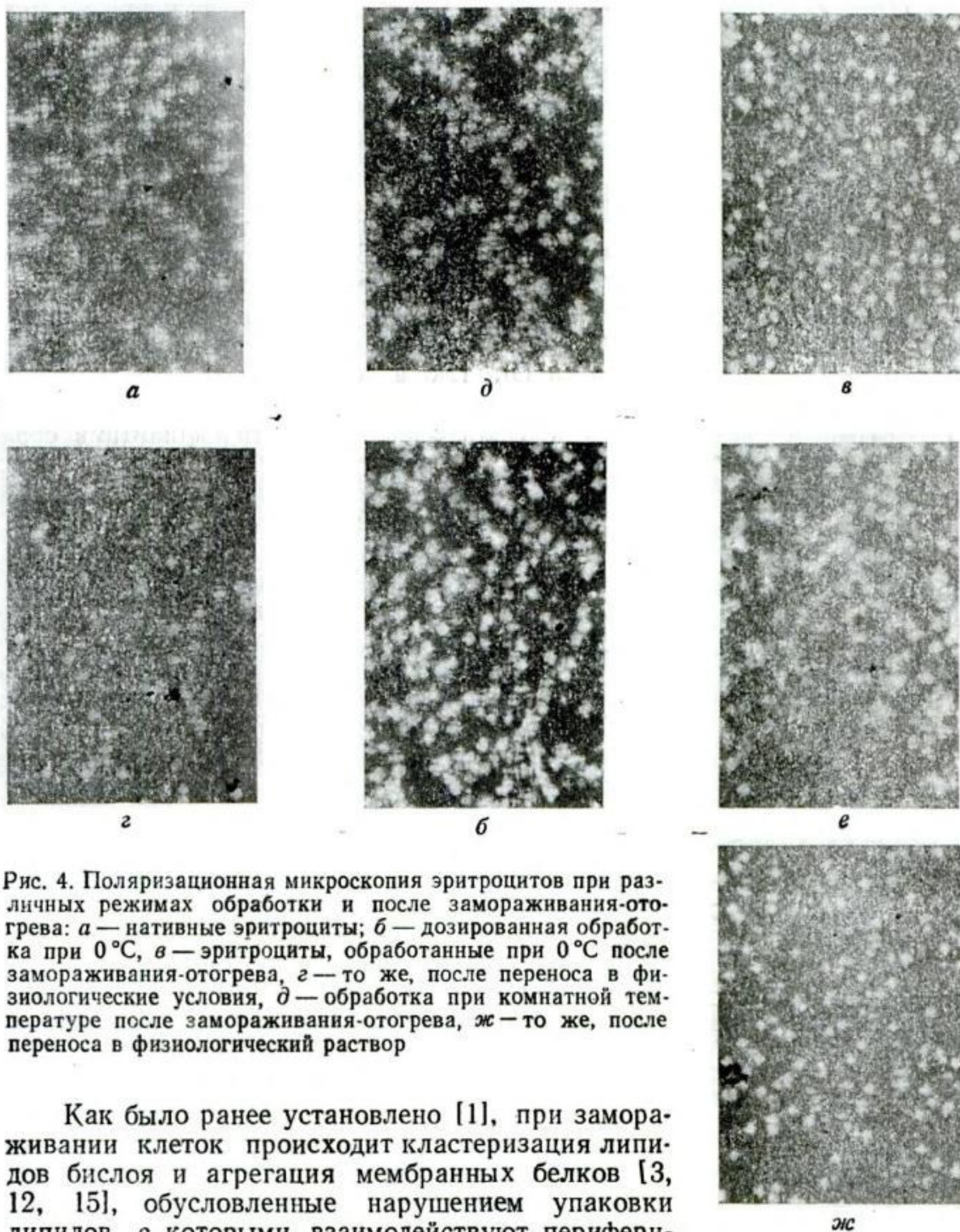


Рис. 4. Поляризационная микроскопия эритроцитов при различных режимах обработки и после замораживания-отогрева: а — нативные эритроциты; б — дозированная обработка при 0 °С, в — эритроциты, обработанные при 0 °С после замораживания-отогрева, г — то же, после переноса в физиологические условия, д — обработка при комнатной температуре после замораживания-отогрева, ж — то же, после переноса в физиологический раствор

Как было ранее установлено [1], при замораживании клеток происходит кластеризация липидов бислоя и агрегация мембранных белков [3, 12, 15], обусловленные нарушением упаковки липидов, с которыми взаимодействуют периферические белки цитоскелета. Достаточно адекватными методами выявления такого рода структурных перестроек цитоскелетной сети в клетках являются метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле с применением сшивающего белки агента — диамида, который способен непосредственно в клетке перекрестно сшивать SH-группы соседних белков, а также метод двулучепреломления, позволяющий наблюдать *in situ* изменение пространственной упаковки спектрин-актиновой сети эритроцитов в зависимости от характера воздействий на клетку.

Выяснение с помощью поляризационной микроскопии пространственной структуры цитоскелета в клетках, обработанных 15 %-ным раствором

ПЭГ с м. м. 1500 при 0 °С, а также после их замораживания свидетельствует о сохранении пространственной структуры цитоскелета в нативном состоянии (рис. 4). Обработка клеток этим же криопротектором при 22 °С и замораживание-отогрев приводят к нарушению пространственной структуры цитоскелета, что указывает на структурные изменения этих белков.

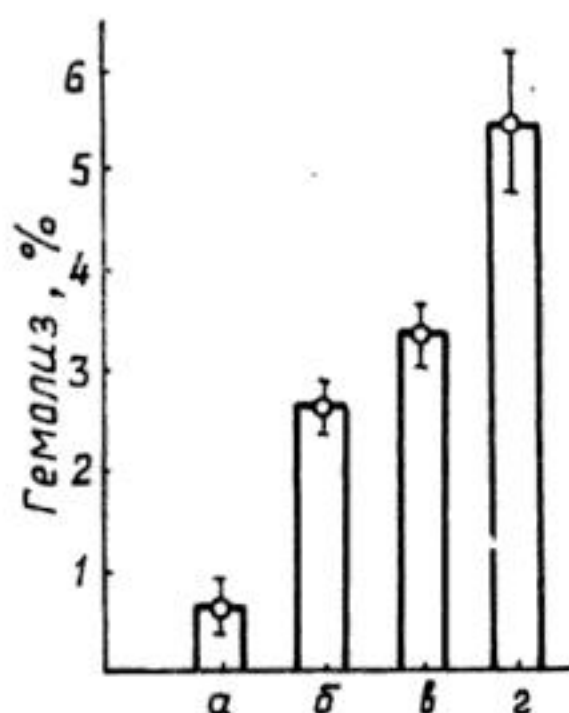


Рис. 5. Влияние тепловой денатурации спектрина на уровень гемолиза эритроцитов после замораживания до -196 °С. Обработка нативных клеток на холоду (а) и при комнатной температуре (б); обработка клеток ПЭО-1500 на холоду (в) и при комнатной температуре (г) после денатурации спектрина при 50 °С

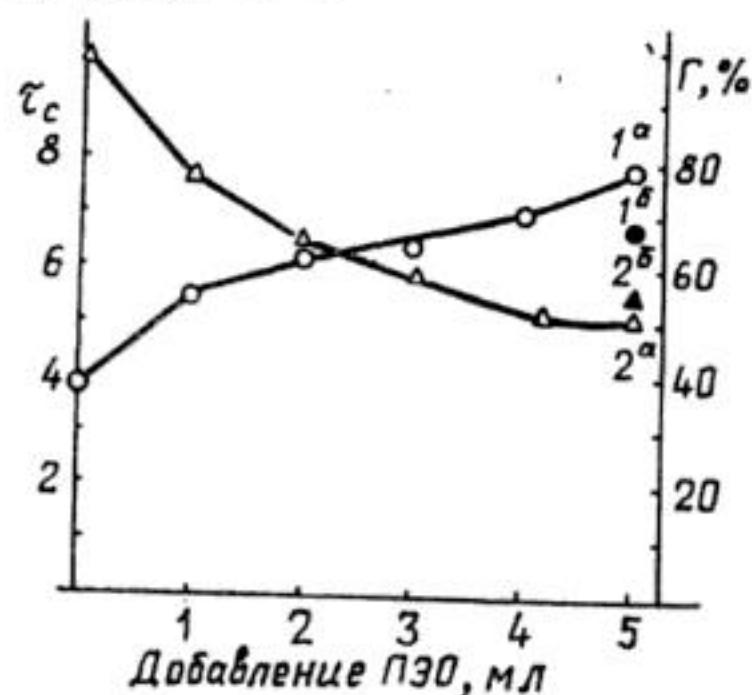


Рис. 6. Изменение внутриклеточной вязкости (1) и степени дегидратуемости (2) эритроцитов при дезирированном (а) и одномоментном добавлении криопротектора ПЭО-1500 (б)

тов по тепловой денатурации свидетельствуют о том, что стабилизация эритроцитов в процессе холодной обработки в присутствии экзогенного полимера связана не только с сохранением нативной структуры спектрина, но и включением в процесс стабилизации, возможно, актиновых ферментов и других вспомогательных белков (б. п. 4.1, 4.2, 4.9, тропомиозин и др.).

При добавлении в суспензию клеток раствора колхицина в дозе 0,04 мг/мл прослеживается подобная закономерность, полученная в опытах с тепловой денатурацией спектрина. Обработка клеток на холоду криопротектором в определенной степени устраняет эффект колхицина, ко-

Вклад спектрин-актиновой системы в стабильность клеток при их взаимодействии с непроницающим криопротектором и охлаждении хорошо проявляется в опытах с тепловой необратимой денатурацией спектрина [21] и после взаимодействия с колхицином, который препятствует процессам полимеризации G-актина [20, 24].

Как видно из рис. 5, тепловая обработка эритроцитов при 50 °С приводит к снижению устойчивости клеток к процессу замораживания-отогрева, что проявляется в повышении уровня гемолиза как в случаях холодной обработки (в), так и в случае обработки клеток криопротектором при комнатной температуре (г) в сравнении с аналогичными вариантами обработки нативных клеток (а, б). При этом гемолиз после холодной обработки криопротектором эритроцитов, преинкубированных при 50 °С, практически не отличается от результатов, полученных при добавлении криопротектора к нативным клеткам при комнатной температуре (б, в). Это свидетельствует о том, что в механизме устойчивости клеток к низкотемпературному воздействию играет роль не только спектрин, но и другие компоненты клеток, которые под влиянием предварительного охлаждения также могут влиять на стабильность клетки даже в том случае, если спектрин денатурирован. В то же время гемолиз эритроцитов с инактивированным спектрином после обработки их криопротектором при 22 °С значительно выше, чем после холодной обработки. По-видимому, это связано с особенностями взаимодействия ПЭО-1500 с эритроцитами на холоду, когда локальные деформации плазматической мембраны менее выражены, чем при других вариантах температурной преинкубации (рис. 6). Многие также зависят от степени и скорости дегидратации клеток в процессе обработки криопротектором. Результаты проведенных экспериментов

по тепловой денатурации свидетельствуют о том, что стабилизация эритроцитов в процессе холодной обработки в присутствии экзогенного полимера связана не только с сохранением нативной структуры спектрина, но и включением в процесс стабилизации, возможно, актиновых ферментов и других вспомогательных белков (б. п. 4.1, 4.2, 4.9, тропомиозин и др.).

торый хорошо проявился в клетках, преинкубированных до замораживания с полиэтилендиоксидом при 22 °С.

По-видимому, медленная обработка эритроцитов непроникающим полимером при 0 °С приводит к формированию более прочной фиксации в мембране таких белков цитоскелета, как белок полосы 3, белок полосы 4.1, актин, анкирин, что позволяет сохранить при замораживании структуру спектриновой сети клеток, близкой к нативной.

В настоящее время мембранный скелет эритроцитов и других клеток рассматривается как материальная основа для поддержания «физиологической» формы и объема, а также их осмотической стойкости [14, 16]. При этом важное значение имеет процесс фосфорилирования спектрина, белка полосы 4.1 и актина.

Исходя из вышеизложенного, одной из важных функциональных характеристик спектрина является его способность к фосфорилированию.

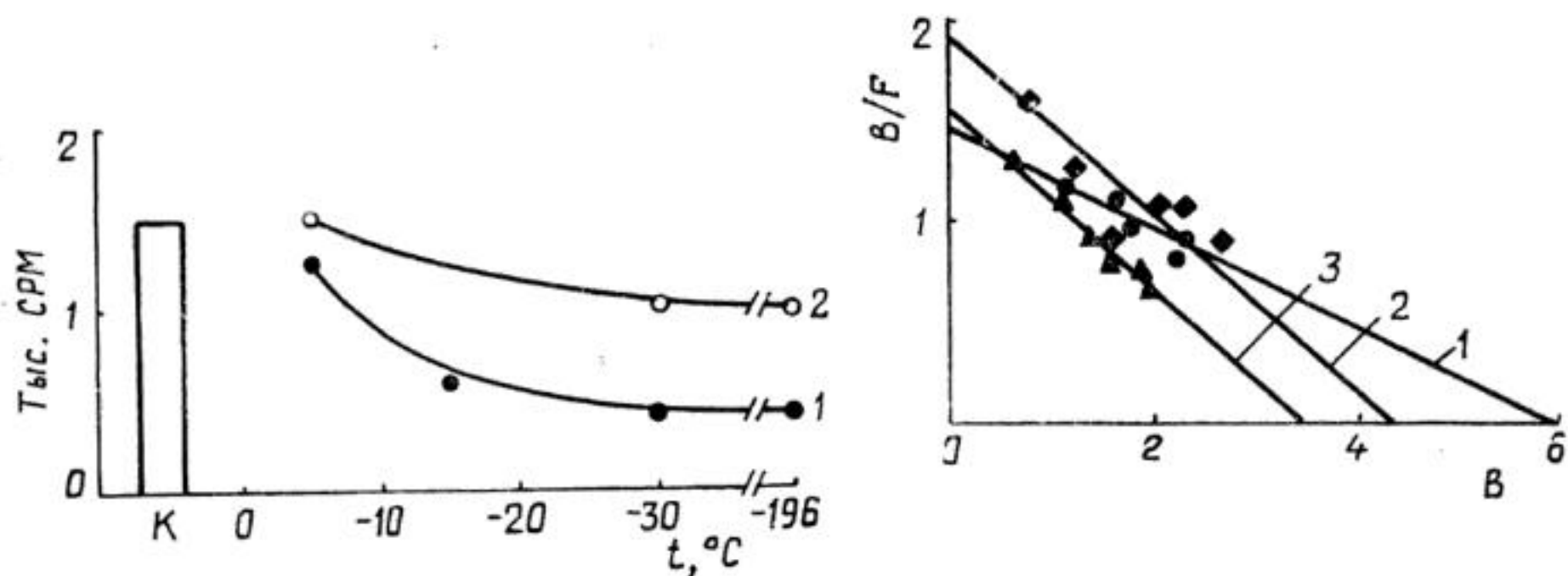


Рис. 7. Фосфорилирование спектрина после медленного замораживания эритроцитов в изотоническом растворе (1) или 2 % глицерина (2). К — контрольный уровень до замораживания

Рис. 8. Связывание спектрина с вывернутыми обедненными по спектрину мембранами эритроцитов: 1 — контроль (нативный спектрин, связанный с нативными мембранами эритроцитов), 2 — быстрое замораживание спектрина до —196 °С и связывание с нативными мембранами, 3 — быстрое замораживание мембран эритроцитов до —196 °С и связывание с нативным спектрином. В — связанный с мембранами ^{32}P -спектрин в тыс. СРМ; F — свободный ^{32}P -спектрин в СРМ

Такие специфические функции эритроцитов, как высокая деформируемость, лабильность формы, способность увеличивать или уменьшать критический объем зависят от механоупругих свойств мембранного скелета и степени фосфорилирования спектрин-актинового комплекса [11, 19].

Этот процесс происходит при участии АТФ, от которой остаток фосфорной кислоты, находящийся в γ -положении, переходит на сериновые или треониновые остатки спектрина с помощью цАМФ независимой мембранной спектринкиназы. Обнаружено (рис. 7), что при температуре —5 °С и ниже включение $^{32}\text{P}_\text{н}$ в спектрин эритроцитов снижается на 65—70 %. Присутствие в среде охлаждения 2 % глицерина в основном предотвращает нарушение процесса фосфорилирования спектрина, т. е. обеспечивает определенную криозащиту спектриновой сети. Известно, что уровень фосфорилирования спектрина определяет степень и характер ассоциации его α - и β -полипептидных цепей димера [18], а также характер связи с другими белками мембранного скелета — белком полосы 3, 4.1 и анкирином. Поэтому выявленное нами нарушение фосфорилирования спектрина может вызвать диссоциацию и уменьшение числа связей, принимающих участие в прикреплении спектриновой сети в мембране, т. е. белком полосы 4.1, анкирина и белком полосы 3.

Действительно, как видно из результатов модельных экспериментов (рис. 8), представленных в координатах Скетчарда, предварительное замо-

раживание спектрина приводит к уменьшению числа мест связывания с мембраной эритроцитов, которое снижается на 30%, т. е. наблюдается частичная потеря спектрином способности ассоциироваться с якорными мембранными белками. Для оценки возникающих в процессе замораживания-отогрева модификаций интегральных белков и липидного бислоя мембран эритроцитов, которые могут оказывать влияние на характер связи спектрин-актинового комплекса с интегральным белком полосы 3 и гликофоорином А, были подвергнуты замораживанию мембранные везикулы эритроцитов. После воздействия низких температур на мембраны эритроцитов происходит уменьшение мест фиксации спектрина на мембране эритроцитов на 40%, которое можно связать с процессами латерального сближения в олигомеризации интегральных белков. Это проявляется в снижении числа молекул белка полосы 4.1 и анкирина, активно участвующих в процессе связывания спектрин-актиновой сети с мембраной. Следовательно, при

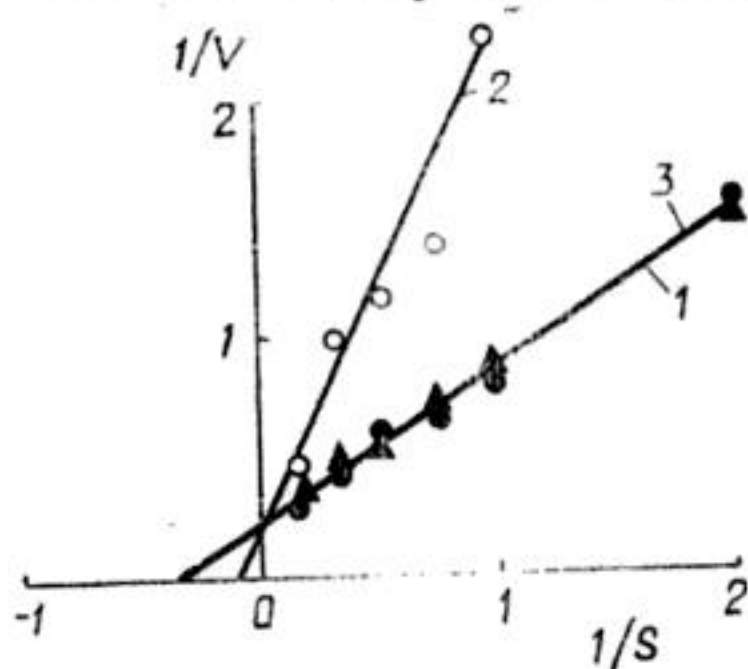


Рис. 9. Зависимость фосфорилирования спектрина от концентрации ^{32}P -АТФ после быстрого замораживания эритроцитов: 1 — контроль, 2 — замораживание без криопротектора, 3 — среда замораживания содержала 15% глицерина

Однако имеется альтернативное объяснение нарушению фосфорилирования, связанное с нарушением работы спектринкиназы. При этом важно отметить, что максимальная скорость реакции фосфорилирования спектрина замороженных эритроцитов не изменяется, что, очевидно, связывается с сохранением функции спектринкиназной системы. Присутствие в среде замораживания клеток 2—6%-ных растворов глицерина полностью предотвращает описанные выше нарушения кинетических параметров фосфорилирования спектрина.

Таким образом, в мембранном скелете, в частности спектриновой сети эритроцитов, подвергнутых замораживанию, возникают структурно-функциональные нарушения, которые, однако, могут существенно предотвращаться вводом в среду замораживания низких концентраций криопротекторов (2—6%). Повреждения актин-спектриновой сети эритроцитов при охлаждении, замораживании и отгреве можно предотвратить также введением в среду инкубации непроникающих криопротекторов (ПЭГ, ПЭО, ПВП, гиооксикрахмал и др.).

Если клетки инкубировать предварительно с непроникающим криопротектором при различных температурах (0 или 22 °C), а затем их замораживать до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, то после отогрева выявляется существенное различие в ответе белков цитоскелета на эти воздействия. Как видно (таблица), при замораживании-отогреве клеток без предварительной защиты, но с последующей обработкой 1 мМ диамидом наблюдается явное уменьшение содержания в мембранах теней эритроцитов многих исследуемых цитоскелетных белков, за исключением анкирина, и появление при этом на старте олигомерных белков с массой 500—1 000 кДа (рис. 10). Появление олигомерных белков, очевидно, связано с нарушением структурного состояния

охлаждении клеток происходят процессы диссоциации комплекса цитоскелет — мембрана и дестабилизация липидного бислоя [12, 15, 23].

Для выяснения механизма нарушения фосфорилирования спектрина после замораживания была получена зависимость этого процесса от концентрации ^{32}P -АТФ (рис. 9). Видно, что после замораживания-оттаивания эритроцитов значительно снижается включение ^{32}P в молекулу спектрина, вызванное трехкратным снижением сродства к субстрату реакции АТФ. Указанное изменение сродства может вызываться структурными нарушениями β -субъединицы димера спектрина, в которой находится белковый домен, присоединяющий

Содержание некоторых фракций белков в эритроцитарных мембранах при различных режимах обработки и после замораживания в ПЭО-1500 (в % от общего содержания мембранных белков)

Условия эксперимента	Белки					
	Спектрин	Анкирин	Белок п. 3	Белок п. 4.1	Актин	Олигомеры
Нативные эритроциты	17,7	12,5	25,1	9,6	11,3	—
Замораживание без криопротектора	14,0	13,9	17,1	7,7	7,8	14,5
Обработка ПЭО-1500 при 22 °С	16,6	10,9	25,5	6,9	9,7	2,4
Замораживание после обработки при 22 °С	12,4	9,5	20,8	4,2	4,3	14,0
Обработка ПЭО-1500 на холоду	17,6	10,8	28,3	5,3	10,0	0,5
Замораживание после холодной обработки	17,8	12,9	26,3	7,8	7,5	3,8

белков примембранной спектрин-актиновой сети в процессе замораживания, когда на клетку воздействуют «эффекты раствора» [3, 14], что облегчает их сшивку в более крупные молекулярные агрегаты. При этом, очевидно, происходит перераспределение белков в цитозоле и формирование аномальных олигомерных комплексов, выявляемых на старте электрофореза. Уменьшение содержания белков цитоскелета в клетке после замораживания-отогрева может быть обусловлено, во-первых, лабильзацией их связей с мембраной и, во-вторых, элиминацией части белков во внешнюю среду. Если клетки предварительно инкубировать с непроникающим криопротектором при 22 °С, а затем замораживать, то количество олигомеров на старте достигает 14 % от всех мембранных белков, что сопоставимо с олигомеризацией белков при замораживании эритроцитов без криопротектора. При этом происходит образование олигомеров большей м. м. (~500—10000 кДа), чем в случае замораживания клеток без криопротекторов, что хорошо выявляется на электрофореграммах (рис. 10).

По-видимому, в процесс окисления диамидами в этом случае вовлечены не только спектрин, но и другие белки (белковая полоса 3, актин и др.), поскольку отмечается определенное снижение их содержания в мембранах (табл.) особенно белка полосы 4.1 и актина по сравнению с контролем. Таким образом, обработка клеток эффективными концентрациями полиэтиленоксида при 22 °С вызывает конформационные и, возможно, денатурационные изменения белков цитоскелета, которые после цикла замораживания-отогрева приобретают необратимый характер.

Неспособность мембранных белков цитоскелета формировать в присутствии диамида S-S мостики между полипептидными цепями белков кле-

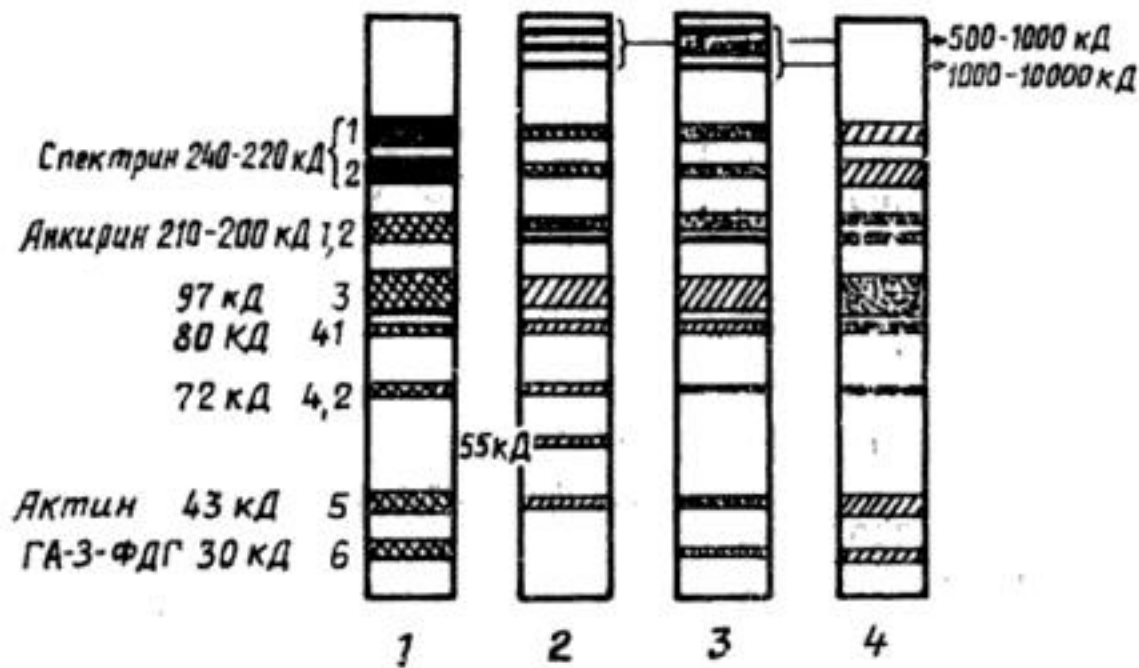


Рис. 10. Схема электрофореза мембранных белков эритроцитов после обработки криопротектором ПЭО-1500 с последующим замораживанием-отогревом. После низкотемпературного воздействия клетки обработаны диамидами (1 мМ): 1 — нативные эритроциты, 2 — замораживание без криопротектора, 3 — замораживание эритроцитов после обработки при комнатной температуре, 4 — замораживание после холодной обработки

ток, подвергнутых на этапе эквilibрации охлаждению с непроникающим криопротектором до 0—4 °С (рис. 10), свидетельствует о том, что предварительная холодовая адаптация клеток в присутствии экзогенного полимера позволяет лучше сохранить свойства белков спектрин-актиновой сети в близком к нативному состоянию. Как видно из таблицы, при этих условиях замораживания-отогрева в клетках хорошо сохраняется качественный и количественный состав цитоскелетных белков, хотя и происходит некоторая потеря актиновых мономеров.

Результаты проведенных исследований показывают, что в процессе замораживания и действия непроникающих криопротекторов под влиянием различных физико-химических факторов [3, 15] происходят глубокие нарушения структуры спектриновой сети и сближение отдельных участков белков цитоскелета. Вместе с тем степень и характер указанных выше перестроек белков цитоскелета очень сильно зависит от температуры, при которой клетки взаимодействуют с криопротектором. Нами выяв-

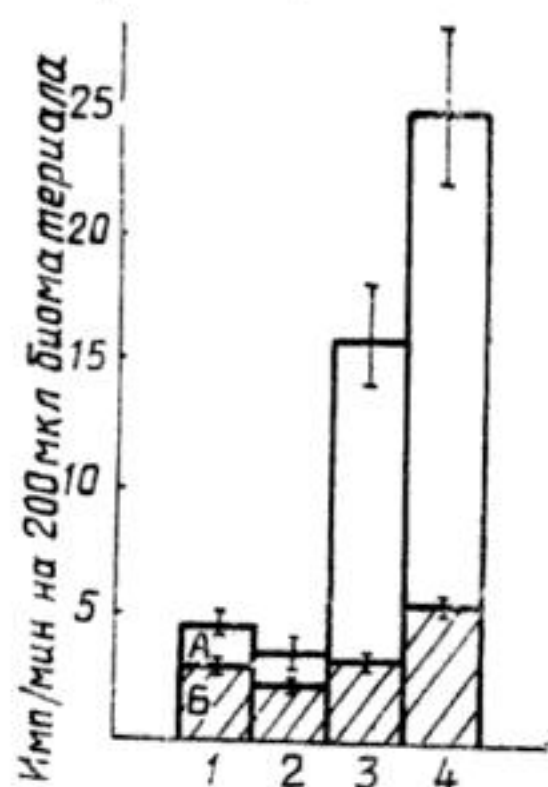


Рис. 11. Взаимодействие ^{14}C -ПЭО-1500 с нативными эритроцитами (А) и белыми теньями (Б) при одномоментном (1) и дозированном добавлении (2) ПЭО-1500 на холоду; 3, 4 — соответственно одномоментное и дозированное добавление ПЭО-1500 при комнатной температуре

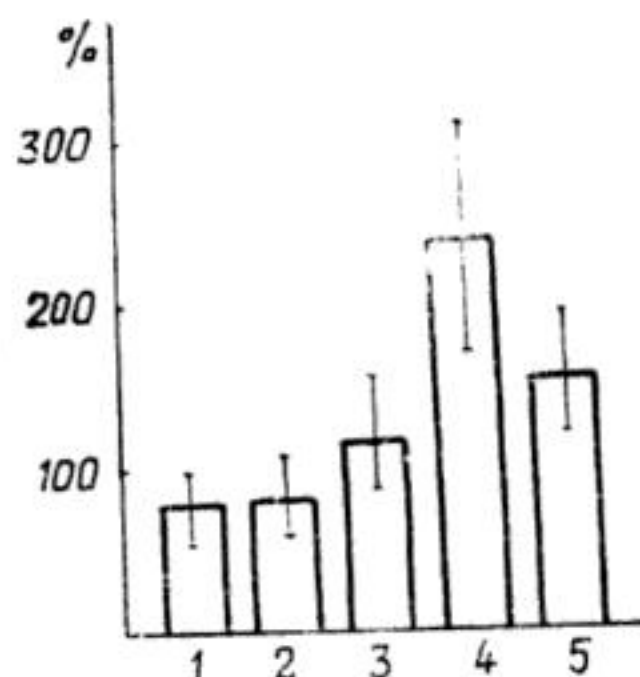


Рис. 12. Изменение фосфорилирования спектрина при различных режимах обработки ПЭО-1500 и последующем замораживании-отогреве: 1 — замораживание без криопротектора, 2 — обработка эритроцитов ПЭО-1500 при комнатной температуре, 3 — замораживание после обработки при комнатной температуре, 4 — холодовая обработка, 5 — замораживание после холодной обработки

лено (рис. 11), что при инкубации клеток с ^{14}C -ПЭО при 0 и 22 °С интенсивность связывания полимера с плазматической мембраной различна: на холоду она гораздо ниже, чем после инкубации при 22 °С. При этом видно, что при взаимодействии этого экзоцеллюлярного криопротектора на холоду степень локальных деформаций плазматической мембраны и утечка K^+ значительно ниже, чем после инкубации клеток при 22 °С, т. е. реакция белков цитоскелетной сети в первом случае менее выражена, чем во втором. Поскольку на состояние цитоскелетных белков большое влияние оказывают температура и осмотический фактор, степень гидратации цитоплазмы, ионная сила и концентрация Ca^{2+} в клетке, можно предполагать, что при медленной адаптации на холоду, в отличие от 22 °С, экзогенный полимер не вызывает существенных сдвигов в биохимической динамике цитоскелетных белков. Это прежде всего касается регуляции структурного состояния цитоскелетной белковой сети посредством процессов их фосфорилирования и дефосфорилирования.

Проведенные нами исследования по изучению фосфорилирования белков в тенях эритроцитов после обработки клеток непроникающим криопротектором при различных температурах с последующим замораживанием-отогревом при инкубации с $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -АТФ свидетельствуют о том, что в процесс холодной «адаптации» эритроцитов вовлечены структурные из-

менения цитоскелета, зависящие от степени фосфорилирования спектрина. Так, после обработки эритроцитов криопротектором на холоду включение ^{32}P в спектрин возрастает в 2,5 раза (рис. 12), причем этот процесс сохраняется и после замораживания-отогрева клеток. Подобный эффект интенсификации включения ^{32}P в спектрин не наблюдается в клетках, инкубированных перед замораживанием при комнатной температуре с ПЭО-1500.

Как показано в работах [18, 19], фосфорилирование белковой β -субъединицы спектрина повышает ее сродство к изолированной α -субъединице, т. е. усиливается ассоциация субъединиц в гетеродимере. При этом средний уровень фосфорилирования гексамеров спектрина и n -мерных форм олигомеров более чем в 2 раза выше, чем у димеров и тетрамеров [18]. Следовательно, темпы фосфорилирования спектрина могут влиять на степень взаимодействия субъединиц при образовании функциональных гетеродимеров и на субъединичное соотношение спектрина в гексамерах и олигомерных формах, т. е. можно предполагать, что в процессе холодовой обработки эритроцитов непроникающим криопротектором происходит стабилизация прежде всего гетеродимеров спектрина за счет усиления взаимодействия его субъединиц. Это, очевидно, позволяет сохранить конформацию спектриновой сети близкой к нативному состоянию после замораживания-отогрева. Вместе с тем можно полагать, что деформационная волна, возникающая при взаимодействии мембран эритроцитов с экзогенным полимером в условиях дозированной холодовой обработки, может приводить к структурным изменениям белков цитоскелета через механизмы активации фосфоинозитного цикла в мембранах [19].

Таким образом, в процессах устойчивости клеток к воздействию осмотических и низкотемпературных факторов весьма существенную роль играют белки цитоскелета, которые формируют трехмерные сети, простирающиеся по всему объему клеток [11, 16]. Замораживание эритроцитов до -196°C сопровождается структурными конформационными перестройками основных цитоскелетных белков (спектрина, б. п. 4.1, 4.2 и др.), которые формируют аномальные олигомерные комплексы в присутствии низких концентраций проникающего (глицерин) или непроникающего полимерного криопротектора, в эффективных концентрациях (полиэтиленоксид) указанная выше структурная модификация белков цитоскелета практически полностью устраняется. При этом применение низких концентраций глицерина не обеспечивает защиту целостных клеток от разрушительного действия низких температур. В случае использования непроникающего полимерного криопротектора полиэтиленоксида с м. м. 1500 при температурах $37-22^\circ\text{C}$ в эритроцитах возникают два очень быстрых процесса: дегидратация клеток с одновременным перераспределением ионов и довольно сильные локальные деформации плазматической мембраны, связанные с реакцией белков цитоскелета на это воздействие. Если такие клетки заморозить до -196°C , то в присутствии диамида формируются грубые олигомерные комплексы большой молекулярной массы, которые не способны поддерживать нативную структуру, пространственную организацию цитоскелетной сети и барьерные свойства плазматической мембраны [4, 10]. После предварительной адаптации при 0°C и аналогичных условий замораживания клеток ответная реакция белков цитоскелета изменяется. Результирующая направленность этих изменений такова, что клетка после холодовой адаптации в присутствии непроникающего криопротектора приобретает высокую стабильность после замораживания-отогрева. Механизм этого явления не вполне ясен. Может быть несколько альтернативных объяснений наблюдаемому феномену повышенной устойчивости клеток после холодовой «адаптации». Одно из них может быть связано с осмотическим эффектом, оказываемым на клетку молекулами полимера. Если принять во внимание литературные и собственные данные, степень дегидратации эритроцитов в среде с 15 %-ной концентрацией ПЭГ-1500 составляет 18—20 %. При этом в результате перераспределения

воды и ионов по обе стороны мембраны [9] происходит увеличение вязкости цитозоля и нарушение внутриклеточного гомеостаза. Эти обстоятельства могут оказывать существенное влияние на состояние белков цитоскелета, функция и структура которых находятся под контролем процессов гидратированности биополимеров и ионного баланса, регулирующих переходы цитоскелетных белков типа гель — золь [22]. Возможно, что на холоду (0 °C) под влиянием полимера создаются оптимальные условия для более плавной перестройки как структуры мембраны, так и белков цитоскелета, которые в этих условиях приобретают новое свойство, способствующее поддержанию стабильной структуры клетки в целом. При этом, очевидно, происходит усиление ассоциативных точечных связей спектрин — актинового комплекса с якорными белками мембраны, в результате чего преобретается ее определенная жесткость, утверждающая форму клеток после замораживания-отогрева. Это хорошо проявляется на практике: эритроциты, замороженные до —196 °C с применением метода холодной адаптации, после отогрева сохраняют на 95—97 % свои морфофункциональные свойства.

Вторым механизмом, лежащим в основе наблюдаемого феномена стабилизации клетки при холодной адаптации, зависящим от состояния цитоскелетных белков, может явиться осмотически индуцируемое активирование фосфатидилинозитидного цикла, который фактически представляет собой Ca^{2+} мобилизующую систему [6]. В результате осмотического сжатия клеток и активации указанного цикла формируются внутримембранные (липофильный 1,2-диацилглицерин) и цитоплазматические растворимые (инозитол 1,4—5 трифосфатон) сигнальные соединения, представляющие по своей природе вторичные мессенджеры [5]. Липофильный мессенджер активирует мембранную фосфолипазу, в результате чего образуются биоактивные липоидные метаболиты [22], оказывающие влияние на белки, а под влиянием специфической киназы он трансформируется в фосфатидную кислоту, которая обладает Ca^{2+} -ионофорными свойствами, т. е. способна индуцировать транспорт экзогенного Ca^{2+} в клетку. Мессенджеры типа инозитол-1,4-5-трифосфатон, поступая в цитоплазму, связываются с определенными локусами эндоплазматического ретикулума, способствуют освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Таким образом, мобилизуется вне- и внутриклеточные ресурсы Ca^{2+} , концентрация которых в цитоплазме может превышать физиологические.

Известно, что повышение содержания Ca^{2+} очень сильно изменяет полимерное состояние актина, который в присутствии повышенных концентраций Ca^{2+} (10^{-5} — 10^{-4} М) сохраняет свое мономерное состояние, т. е. поддерживается состояние золя в цитоплазме, что очевидно обеспечивает сохранение упруго-эластических параметров мембраны и клетки в целом при температурно-осмотическом воздействии и замораживании. В таком состоянии клетка способна противостоять действию осмотических сил и сопутствующих замораживанию факторов. Однако конкретные механизмы, инициирующие реакцию и структурное состояние белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии и замораживании во многом остаются неясными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — 255 с.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бабийчук Л. А. и др. Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология. — 1985. — № 2. — С. 25—28.
3. Белоус А. М., Бабийчук Л. А., Лоевский М. М., Рязанцев В. В. Структурные изменения мембран эритроцитов при охлаждении и замораживании // Криоконсервирование клеток и тканей. — Харьков: Б.и., 1989. — С. 29—42.
4. Гулевский А. К., Бондраенко В. А., Белоус А. М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах. — Киев: Наук. думка. — 1988. — 206 с.

5. Евстигнеева Р. П. Структурно-функциональные исследования липидов биологических мембран. // Труды 5-го Всесоюзного биохимического съезда.— М.: Наука, 1981, 1, с. 168.
6. Миронов С. Л., Тепикин Л. В., Белан П. В. Механизмы регуляции внутриклеточной концентрации Ca^{++} в изолированных нейронах моллюсков, выявляемые по флуоресценции зонда ФУРА-2 // Внутриклеточная сигнализация.— М.: Наука, 1988.— С. 21—32.
7. Моисеев В. А., Межидов С. Х., Хардид О. А. Исследование дегидратации эритроцитов методом спинного зонда // Биофизика.— 1989.— 34.— С. 993—996.
8. Саакян Ш. С. Исследование структуры цитоскелета эритроцитов: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук — М., 1988.— 22с.
9. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Котелевцев Ю. В. и др. О механизме индукции ионного транспорта при сжатии эритроцитов // Внутриклеточная сигнализация. — М.: Наука, 1988.— С. 118—127.
10. Babiytchuk L. A., Zemlyanskikh N. A. The mechanism of structural and osmotic adaptation of erythrocytes to cryopreservation // Cryobiology and Freeze-drying.— Bulgaria, Sofia, 1989.— P. 31—33.
11. Bennett V. The membrane skeleton of human erythrocytes and its amplification for more complex cells // Ann. Rev. Biochem.— 1985.— 54.— P. 273—304.
12. Bennett F. T., Harmon I. I., Troy M. et al. ESR studies of the erythrocyte membrane skeletal protein network: influence of the state of aggregation of spectrin on the physical state of membrane proteins, bilayer lipids and cell surface carbohydrates // BBA: Biomembranes.— 1985.— 821.— № 3.— P. 420—430.
13. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry.— 1971.— 10.— P. 2606—2617.
14. Green F. A., Jung C. Y., Cupoletti J., Owens N. Hypertonic cryohemolysis and the cytoskeletal system // BBA.— 1981.— 648, N 2.— P. 225—230.
15. Haest C. W. M., Heller K., Schwister K. et al. Concomitant changes of leak permeability and phospholipid dynamics in erythrocytes subjected to chemical and physical membrane perturbation // BBA.— 1983.— 42, N 11—12.— P. 127—129.
16. Lange Y., Hadesman R. A., Steck T. Z. 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.
17. Lin D. C., Tobin K. D., Grumet M. et al. Cytocholasin inhibit nuclei induced actin polymerization by blocking filament elongation // J. Cell. Biol.— 1980.— 84.— P. 455—460.
18. Mische S. M., Haigh W. B., Morrow J. S. Spectrin phosphorylation regulates spectrin self-association // Fed. Proc.— 1985.— 44.— P. 1934.
19. Mische S. M., Morrow J. S. Post-translational regulation of the erythrocyte cortical cytoskeleton // Protoplasma.— 1988.— 145, N 2.— P. 167—175.
20. Pallard T. D., Craid S. W. Mechanism of actin polymerization // Trends Biochem. Sci.— 1982.— 7.— P. 50—55.
21. Rank B. H., Moger N. L., Hebbel R. P. Vesiculation of sickle erythrocytes during thermal stress // Blood.— 1988.— 72, N 3.— P. 1060—1063.
22. Gin H. L., Stossel T. P. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin — a calcium-dependent regulatory protein // Nature.— 1979.— 281.— P. 583—586.
23. Utsumi K., Okimasu E., Morimoto Y. M. et al. Selective interaction of cytoskeletal proteins with liposomes // FEBS Lett.— 141, N 2.— P. 176—180.
24. Zimmerle C. Z., Frieden C. Effect of temperature on the mechanism of actin polymerization // Biochemistry.— 1986.— 25, N 1.— P. 6432—6439.

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

Поступила 18.06.90

A. M. BELOUS, A. K. GULEVSKY, L. A. BABIYCHUK, V. V. RYASANTSEV,
N. T. ZEMLYANSKIKH

THE ROLE OF CYTOSKELETON PROTEINS IN CHANGING THE CELL STABILITY BY TEMPERATURE-OSMOTIC EFFECTS

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

The interrelationships between structure-functional changes in erythrocyte cytoskeleton proteins and hemolysis due to freeze-thawing have been studied as functions of conditions of treatment with the cryoprotectant PEO-1500 using methods of polarization microscopy and radioisotope and enzyme analysis. It has been shown that the preliminary cold adaptation of cells at 4 °C in the presence of the polymer cryoprotectant allows to preserve better properties of proteins of the spectrin-actin network. Mechanisms of structure-functional changes in the spectrin-actin network under conditions of cold treatment of erythrocytes with PEO-1500 are discussed.

Сергиенко Н. Г., Грищенко В. И., Логинова Г. А. Биогенные моноамины и возбудимость головного мозга.— Киев: Наук. думка, 1991 (I).— 12 л.: ил. 2 р. 60 к.

В монографии дан анализ роли моноаминергических нейромедиаторных механизмов центральной нервной системы в формировании судорожной готовности головного мозга, в возникновении, поддержании, иррадиации и подавлении судорожных процессов лимбического происхождения. Приводятся данные о метаболизме биогенных моноаминов в центральной нервной системе животных с высокой и низкой аудиогенной судорожной готовностью, а также у больных эпилепсией. Рассматривается нейродинамика эпилептиформных процессов в условиях фармакологического воздействия на моноаминергические медиаторные процессы, локального введения медиаторов в мозг, а также стимуляции основных моноаминсодержащих ядер мозга. Оценивается возможность модуляции возбудимости головного мозга путем воздействия на систему биогенных моноаминов.

Для биохимиков, нейрофизиологов, врачей, студентов вузов.

Белоус А. М., Конник К. Т. Физиологическая роль железа.— Киев: Наук. думка, 1991 (IV).— 8 л.: 1 р. 70 к.

В монографии систематизированы данные о распространении железа в природе, содержании его в тканях растений и животных. Анализируется значение железа в регуляции биохимических и физиологических процессов в организме человека. Излагается роль железа в кроветворении, пищеварении и обмене веществ, а также воздействие препаратов железа на физиологические функции организма. Уделено существенное внимание структуре, функции и метаболизму железопорфириновых гемопротейнов, показано значение сывороточного и депонированного железа в регуляции физиологических и биохимических процессов в организме животных и человека. Приводятся данные о влиянии биологически активных соединений (витаминов, микроэлементов) на утилизацию железа в организме и его роль в развитии железодефицитных состояний.

Для сельскохозяйственных работников, медиков, биохимиков и физиологов, а также студентов вузов.

УДК 612.118.221.3 : 57.043

Т. Ф. Морозова, О. В. Липина, М. И. Шраго, Л. П. Бредихина

ДИНАМИКА КИСЛОТНОГО И ОСМОТИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

С помощью спектрофотометра исследована кинетика осмотического и кислотного гемолиза эритроцитов на разных длинах волн. Приведены данные по продолжительности скрытого периода повреждения белков эритроцитов и ширине кислотных эритрограмм образцов крови после гипотермического хранения в течение 30 сут, после контакта с ПЭО-1500 и последующего замораживания-оттаивания. Обсуждаются причины различий в кислотной и осмотической хрупкости эритроцитов после указанных воздействий.

Одним из широко распространенных способов исследования структурной устойчивости эритроцитов является изучение показателей кислотного и осмотического гемолиза этих клеток. Обычно используются такие расчетные данные, как усредненное время гемолиза и эритрограммы. При этом в проведенных исследованиях уделяется мало внимания латентному

периоду повреждения эритроцитов, то есть изменениям, которые претерпевают клетки до состояния выраженного повреждения. В настоящей работе исследовали кинетику кислотного и осмотического гемолиза эритроцитов консервированной крови человека в процессе хранения при положительной температуре, а также после экспозиции с полиэтиленоксидом молекулярной массы 1500 (ПЭО-1500) с последующим замораживанием клеток до -196°C .

Опыты были выполнены на эритроцитах крови доноров Харьковской областной станции переливания крови, заготовленной на глюкозо-цитратном консерванте, полученных путем спонтанного оседания в течение суток. Исследования проводили с помощью спектрофотометра «Пай Уникам СП-8000» (Англия). Изучение динамики кислотного и осмотического гемолиза эритроцитов проводили на длинах волн 650 нм (длина волны, при которой оптическая плотность образцов зависит от светорассеяния эритро-ромассы), в области длин волн около 420 и 550—570 нм (то есть в районе специфических полос поглощения гемоглобина) и в диапазоне волн 270—300 нм (в полосе поглощения суммарных ароматических остатков белков эритроцитов). Оптическая плотность образцов на выбранной для измерения длине волны подбиралась в диапазоне 0,5—1,2 ед. опт. плотн. Добавляли соляную кислоту до конечной концентрации в кювете $n/100$ и записывали кривую зависимости оптической плотности от времени. Осмотическую резистентность эритроцитов исследовали в гипотонических растворах хлористого натрия по методике, предложенной в [7].

По спектрам поглощения рассчитывали первые производные спектров (ІПСР). Исследовали положение максимумов ІПСР и интенсивность в максимумах. Этот метод с успехом используется для изучения тонких структурных изменений в белках [1], особенно в сильно рассеивающих средах.

Для изучения динамики кислотной и осмотической резистентности эритроцитов после взаимодействия с ПЭО-1500 поступали следующим образом. Эритроциты, смешанные с 20 %-ным раствором ПЭО-1500 на физиологическом растворе в соотношении 1:1, оставляли для экспозиции на 30 мин. Затем центрифугировали в течение 20 мин со скоростью 1500 об/мин и надосадок удаляли. Оставшиеся эритроциты исследовали на осмотическую и кислотную резистентность. Для выяснения влияния замораживания-оттаивания эритроциты после экспозиции с ПЭО-1500 замораживали в полиэтиленовых ампулах объемом 2 мл погружением в жидкий азот. Оттаивание проводили в водяной бане при температуре $40-41^{\circ}\text{C}$.

Для временной зависимости светорассеяния суспензии эритроцитов донорской крови при добавлении кислоты характерна трехэтапная кривая (рис. 1, А). В табл. 1 приведены данные по длительности каждого из 3 периодов.

Т а б л и ц а 1

Длительность различных периодов кислотного гемолиза эритроцитов ($M \pm m$)

Образцы	Число исследованных образцов	Длительность периодов, с			Общая длительность гемолиза, с
		1	2	3	
Контроль	8	25 ± 2	157 ± 18	76 ± 13	258 ± 23
Эритроциты на 30-е сут гипотермического хранения	7	32 ± 5	$108 \pm 10^*$	55 ± 17	195 ± 31
Эритроциты после контакта с ПЭО-1500	5	32 ± 8	150 ± 28	$35 \pm 11^*$	217 ± 24
Замороженные-оттаянные эритроциты после контакта с ПЭО-1500	8	25 ± 4	$96 \pm 13^{*, **}$	$59 \pm 10^{**}$	$190 \pm 23^*$

Примечание. *— Достоверность различия с показателем для контрольных образцов, $P \leq 0,05$; **— достоверность различия с показателем для эритроцитов после контакта с ПЭО-1500, $P \leq 0,05$.

Исследование кислотного гемолиза эритроцитов методом ИПСП показало, что в первые же секунды контакта эритроциты с кислой внеклеточной средой белки эритроцитов конформационно изменяются. По-видимому, первоначальным объектом действия кислой среды становятся интегральные белки мембраны и примембранных структур эритроцитов, так как резкое изменение спектров поглощения гемоглобина — основного цитоплазматического белка — происходит в конце второго — начале третьего периода. При этом появление полосы с максимумом поглощения около 378 нм, характерной для кислотно денатурированного гемоглобина, происходит в начале — середине третьего периода (рис. 2).

Из полученных экспериментальных данных следует, что первый — второй периоды кислотного гемолиза сопровождаются изменением состояния белков эритроцитов (рис. 3). Именно на этом этапе происходит предлитическое изменение формы эритроцитов [4]. В конце второго — начале третьего периодов происходит выход из клеток и денатурация гемоглобина, дальнейшее повреждение других белков. Исходная морфологическая и функциональная гетерогенность эритроцитов приводит

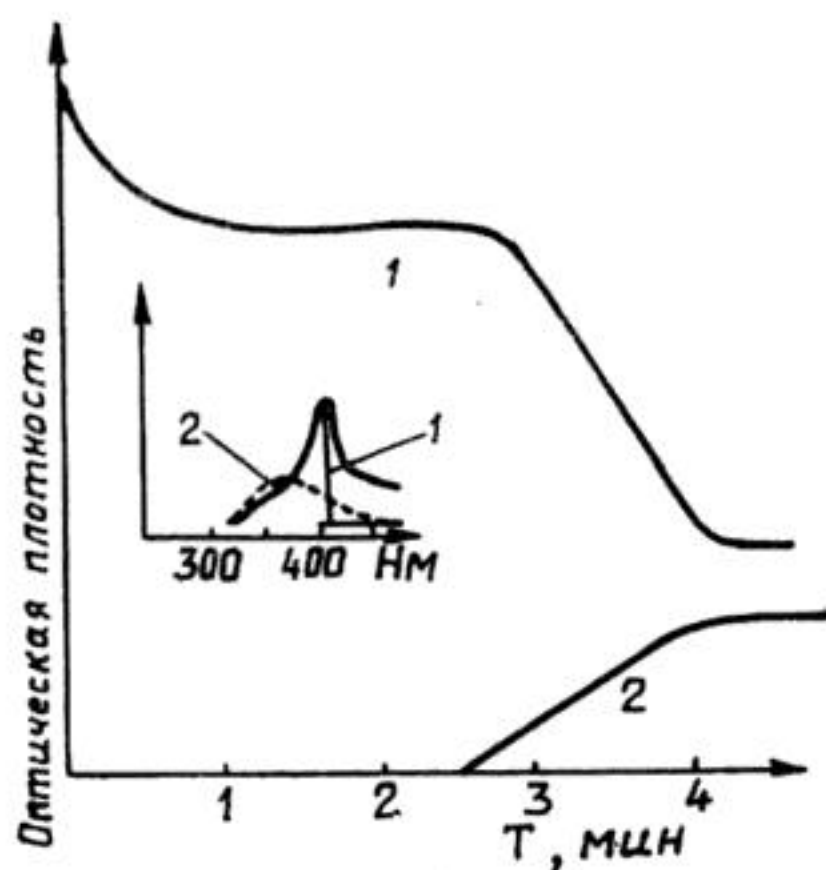


Рис. 2. Динамика изменения спектров гемоглобина: — спектр поглощения для интактной эритроцитовой массы, ---- спектр поглощения для эритроцитовой массы после кислотного гемолиза; 1, 2 — разностные значения поглощения на длинах волн 418 и 378 нм

Рис. 3. Изменение первых производных спектров поглощения (ИПСР) белков эритроцитов при воздействии HCl: 1 (—) — ИПСР для интактной эритроцитовой массы, 2 (---) — ИПСР для эритроцитовой массы через 15 с после добавления кислоты

к тому, что эритрограммы, рассчитываемые на этом этапе гемолиза клеток, имеют зачастую сложный характер (рис. 1, Б) [3]. Таким образом, если длитель-

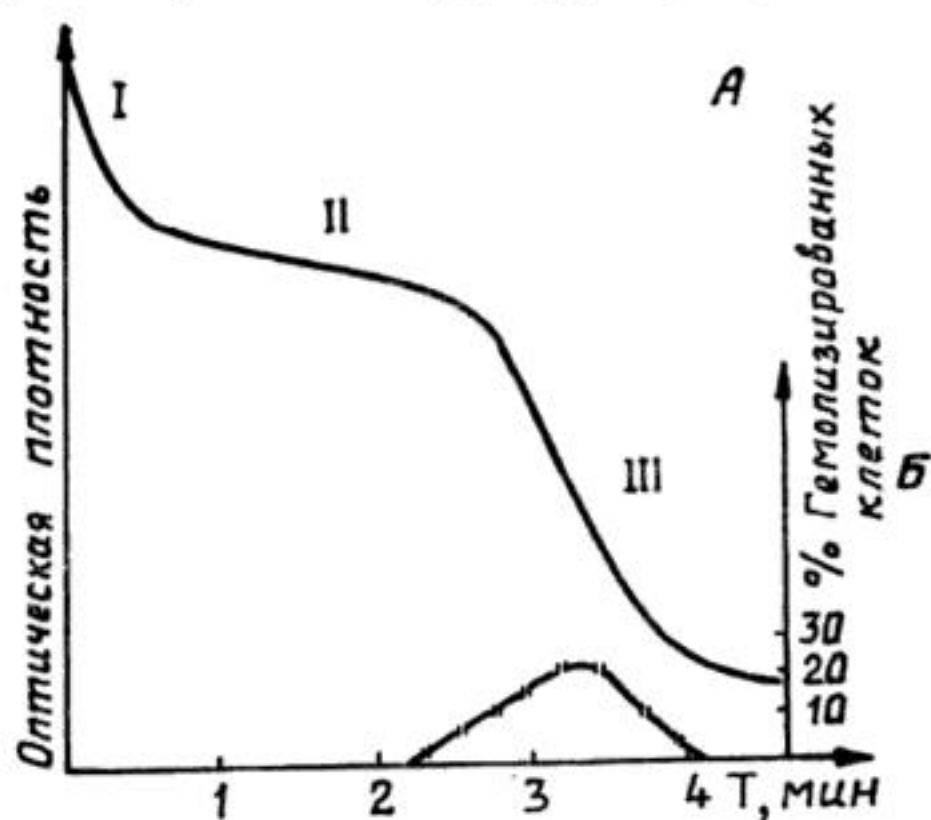
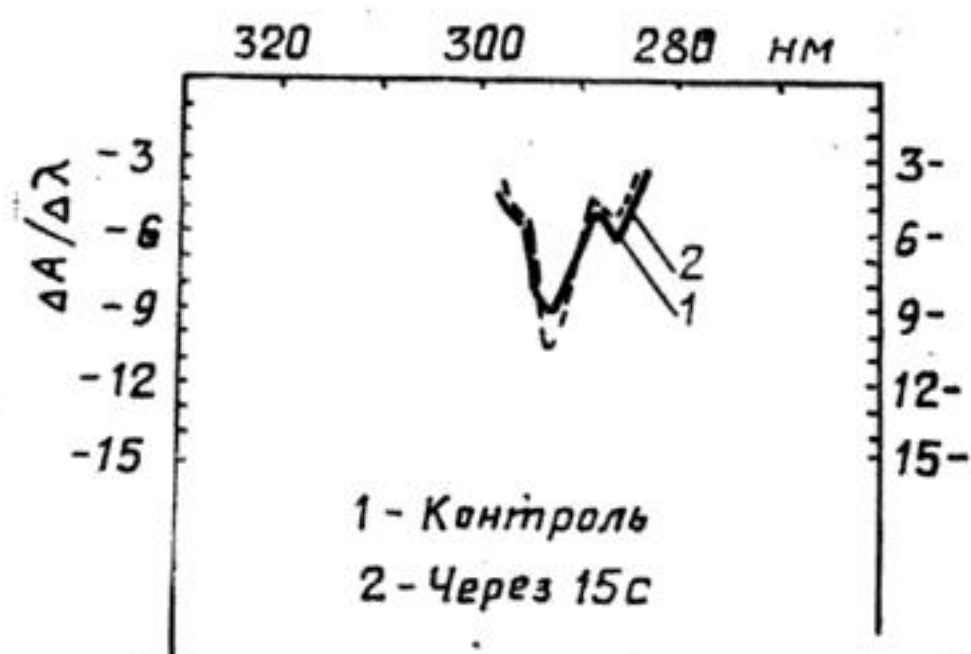


Рис. 1. Динамика кислотного гемолиза эритроцитов для эритроцитовой массы донора Ж.: А — светорассеяние суспензии эритроцитов (длина волны 650 нм) с указанием периодов гемолиза, Б — эритрограмма

ность первого — второго периодов связана с латентным повреждением белков эритроцитов и нарушением, вероятно, межбелковых контактов и белок-липидных взаимодействий, то третий период — это период глубокого разрушения мембранной целостности кровяных клеток с дальнейшим нарушением белок-липидных, липид-липидных взаимодействий на больших участках мембраны.



Исследование динамики гипотонического разрушения эритроцитов, при котором отсутствует этап денатурации белков кислотой, показало, что осмотический гемолиз представляет собой одноэтапный процесс при концентрациях NaCl менее 0,5—0,3 %. При более высоких концентрациях соли (около 0,6—0,7 %) возможны варианты более сложной кинетики, связанной, по-видимому, со сменяющимися фазами набухания-сжатия эритроцитов (рис. 4) Изменение интенсивности в максимумах полос 1ПСП белков коррелирует при осмотическом гемолизе с изменением светорассеяния растворов.

Полученные данные по механизму кислотного гемолиза эритроцитов были в дальнейшем использованы для выяснения причин различной устойчивости эритроцитов при некоторых воздействиях.

Установлено, что в результате 30-суточного хранения достоверно уменьшается длительность второго перио-

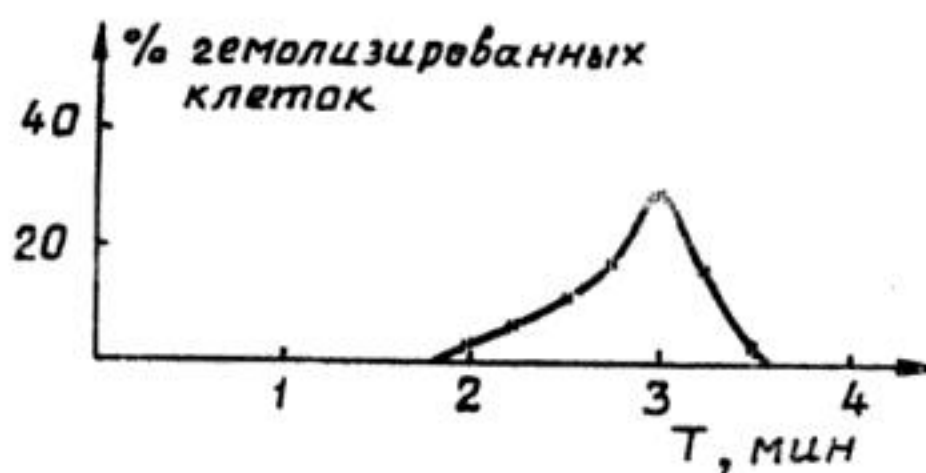
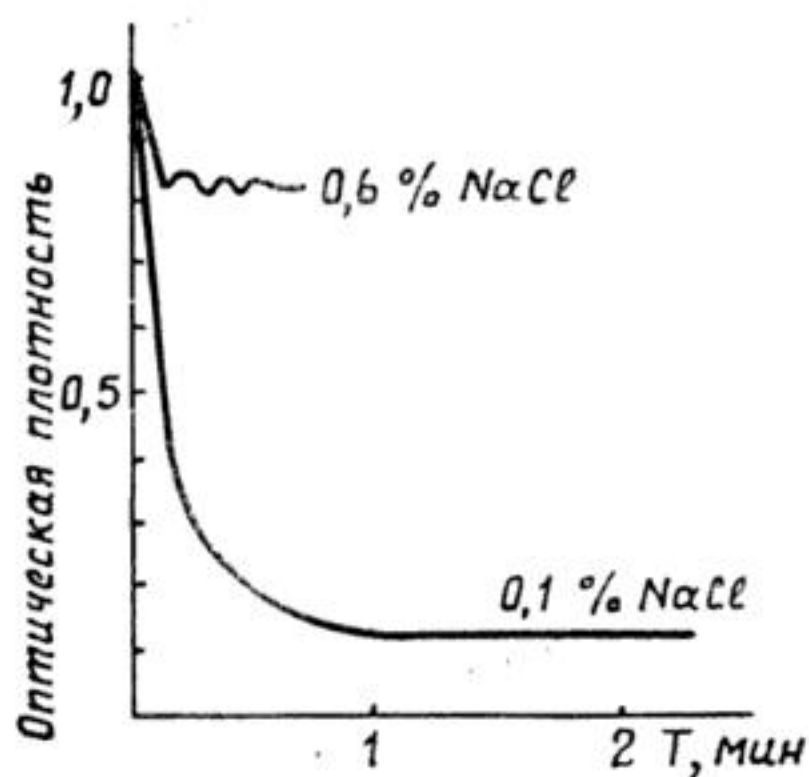


Рис. 4. Динамика осмотического гемолиза эритроцитов для разных концентраций NaCl (донор. В.)

Рис. 5. Эритрограмма крови донора Ж. после контакта эритроцитомассы с ПЭО-1500 (контроль на рис. 1)

да, а общая длительность гемолиза, по сравнению с таковой для интактной эритроцитомассы, также имеет тенденцию к уменьшению.

После контакта с ПЭО-1500 изменяется длительность третьего этапа. Для отдельных образцов донорской крови после контакта с ПЭО-1500 отмечена тенденция к сдвигу эритрограмм вправо с соответствующим уменьшением длительности второго периода (рис. 5). Полученные данные свидетельствуют в пользу взаимодействия ПЭО-1500 с мембраной и о влиянии его на липид-липидные и липид-белковые взаимодействия, что согласуется с рядом работ [2, 5].

После замораживания-оттаивания эритроцитов, контактировавших с ПЭО-1500, происходит достоверное изменение длительности второго этапа по сравнению с контрольными образцами и достоверное уменьшение общей длительности гемолиза. При сравнении с результатами, полученными для эритроцитов после контакта с ПЭО-1500 до замораживания, различия по 2—3-му этапам также достоверны. Таким образом, замораживание-оттаивание вносит дополнительное возмущение в состояние эритроцитов и по сравнению с контролем, и по сравнению с образцами, контактировавшими с ПЭО-1500 без замораживания.

Как следует из результатов этой работы, достоверные различия в длительности третьего этапа кислотного гемолиза (то есть, в ширине основания эритрограмм) наблюдаются для образцов эритроцитомассы, контактировавшей с ПЭО-1500.

В ряде случаев, прежде всего при длительном хранении эритроцитомассы и ее замораживании-оттаивании, различия наблюдаются во времени, прошедшем до начала выраженного гемолиза (то есть в длительности первого — второго периодов кислотного гемолиза), что связано с различной

скоростью скрытого повреждения белков эритроцитов кислотой при изучаемых воздействиях. Для интактных эритроцитов одной из причин такого явления может быть физиологическая гетерогенность различных популяций красных клеток у доноров. При воздействии различных факторов на эритроциты возможны изменения первого — второго этапов вследствие разной экспонированности белков внешней среде, отличий в скорости поступления HCl в клетки крови, в устойчивости самих белков к действию кислой среды и т. д. Поэтому изучение длительности первого, второго, третьего периодов могло бы оказаться достаточно важным при выяснении причин повреждения эритроцитов в результате тех или иных воздействий.

При осмотическом гемолизе, в отсутствие кислотной денатурации белков, процент гемолизированных клеток зависит от прочности липид-липидных и липид-белковых взаимодействий [6]. При денатурации белков осмотическая хрупкость эритроцитов должна увеличиваться вследствие нарушений белок-липидных взаимодействий, что и наблюдается в случае замораживания-оттаивания эритроцитов после контакта с ПЭО-1500 (табл. 2)

Т а б л и ц а 2

Осмотическая хрупкость эритроцитов в растворах NaCl ($M \pm m$)

Концентрация NaCl, %	Количество гемолизированных эритроцитов, %		
	Контроль	После контакта с ПЭО-1500	После замораживания-оттаивания
0,6	8,0±3,0	6,5±2,0	40±6,0*
0,9	6,0±2,5	5,0±2,0	30±5,0*

Примечание. * — Достоверность отличий с показателем для контрольных образцов, $P \leq 0,05$ ($n = 5$).

кислотного гемолиза эритроцитов, как исследование длительности процессов, протекающих в латентном периоде повреждения эритроцитов (1—2 этапы) и изучение параметра кислотного гемолиза, эквивалентного ширине основания эритрограмм (то есть длительность третьего периода) дает возможность более глубокого осмысления причин различной устойчивости эритроцитов и открывает новые перспективы для выбора целенаправленной модификации их с целью обеспечения максимальной стабильности при неблагоприятных воздействиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. — Киев: Наук. думка, 1981. — 208 с.
2. Моисеев В. А. Молекулярные механизмы криповреждения и криозащиты белков и биологических мембран: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Харьков, 1984. 32 с.
3. Стусь Л. К. Влияние исходных характеристик эритроцитов на их сохранность в процессе гипотермического хранения крови: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1987. 16 с.
4. Торсков И. А., Гительзон И. И. Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. — 1957. — 2. Вып. 2. — С. 259—266.
5. Цымбал Л. В. Влияние криопротекторов на структурное состояние мембран и внутриклеточной воды эритроцитов при низких температурах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1988. 16 с.
6. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран. — Минск: Наука и техника, 1981. — 216 с.
7. А. с. 1097949, МКИ³ G01 № 33/48. Способ исследования осмотической резистентности эритроцитов / Липина О. В., Шраго М. И., Морозова Т. Ф. — Опубл. 15.06.84, Бюл. № 22.

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

Поступила 07.06.89

T. F. MOROZOVA, O. V. LIPINA, M. I. ZHRAGO, L. P. BREDIKHINA
THE DYNAMICS OF ACIDIC AND OSMOTIC HEMOLYSIS
OF ERYTHROCYTES CAUSED BY DIFFERENT EFFECTS

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

The kinetics of acidic and osmotic hemolysis of erythrocytes has been studied at different wave lengths using a spectrophotometer. The data have been presented on the duration of latent period of injury to erythrocyte proteins and widths of acidic erythrograms of blood samples subject to hypothermal storage during 30 days after a contact with PEO-1500 followed with freeze-thawing. Causes of differences in acidic and osmotic fragility of erythrocytes after these effects are discussed.

УДК 612.112.93 + 612.112.95 : 616 — 89.583.29

О. Д. Мяделец, А. Ф. Суханов

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТКАНЕВЫХ БАЗОФИЛОВ И МАКРОФАГОВ
В КОЖЕ И ЛИМФОУЗЛЕ БЕЛЫХ КРЫС
ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ИХ ОРГАНИЗМ
ОБЩЕЙ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ**

Животных охлаждали до 18 °С в прямой кишке, выдерживали при этой температуре 2 ч и согревали до 37 °С. Макрофаги выявляли по поглощению трипанового синего, который вводили подкожно в межлопаточную область. Тучные клетки (тканевые базофилы) выявляли окраской трипановым синим. Установлено, что во всех слоях кожи гипотермическое воздействие приводило к уменьшению числа тканевых базофилов и увеличению числа активно функционирующих макрофагов. Численность взаимодействующих тканевых базофилов и макрофагов в ранние сроки постгипотермического периода была снижена и увеличивалась в более поздние сроки. В лимфоузле инъекция трипанового синего вызывала резкое уменьшение числа тканевых базофилов. После воздействия гипотермии наблюдалось перераспределение тканевых базофилов, что приводило к уменьшению их числа в корковом и увеличению в мозговом веществе. В мозговом веществе увеличивалось число активно функционирующих макрофагов и число взаимодействующих тканевых базофилов и макрофагов. Сделан вывод о различном характере взаимодействия указанных клеток в коже и лимфоузле.

Глубокая гипотермия приводит к значительным нарушениям гомеостаза, требующим в постгипотермическом периоде существенной коррекции [2]. Это в полной мере относится к соединительной ткани [4]. Среди ее клеток особого внимания заслуживают тканевые базофилы, способные вызвать серьезные нарушения функций органов и систем из-за выраженного влияния на микроциркуляцию [5]. Эти клетки тесно кооперируют с другими клетками соединительной ткани, и в первую очередь с макрофагами, с которыми находятся в антагонистических взаимоотношениях [5].

В настоящей работе изучено взаимодействие тканевых базофилов (ТБ) и макрофагов (М) в коже и регионарном лимфоузле после воздействия на организм общей глубокой гипотермии.

Эксперименты выполнены на 20 белых крысах-самцах массой 150—170 г. Их охлаждали под эфирным наркозом до 18 °С в прямой кишке, выдерживали при этой температуре 2 ч и затем согревали до 37 °С. Скорость охлаждения и согревания составляла 1 °С за 5 мин. Животных декапитировали через



Взаимодействие тканевого базофила и макрофага в гиподерме крыс через 30 сут после гипотермического воздействия: М — макрофаг, ТБ — тканевой базофил. Прижизненная окраска трипановым синим с последующей окраской толуидиновым синим. X 400

24 ч, 3, 7 и 30 сут после эксперимента. В каждой опытной группе использовано по 5, а в контрольной — 8 животных. И контрольным, и всем подопытным крысам за 24 ч до умерщвления подкожно в межлопаточную область вводили 0,5 мл 0,5 %-ного трипанового синего (ТС) для выявления макрофагов. Кроме того, у 6 интактных крыс взяты лимфоузлы без введения ТС. Кожу межлопаточной области и регионарный (надлопаточный) узел фиксировали в жидкости Буэна, заливали в парафин. Срезы толщиной 7 мкм окрашивали 0,1 %-ным раствором толуидинового синего для выявления ТБ. Эта методика позволяла отчетливо выявлять на срезах и ТБ, и М (рис.). Определяли число ТБ и М на 1 мм² среза, долю дегранулированных ТБ, процент, долю ТБ, контактирующих с М, процент, число разрушенных ТБ на 1 мм² среза, интенсивность захвата макрофагами ТС в баллах. Эти показатели в коже определяли отдельно в сосочковом, сетчатом слоях дермы и в гиподерме. В лимфоузле ТБ подсчитывали в корковом и мозговом веществе, М — только в мозговом. Все цифровые данные обработаны статистически с использованием критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Взаимодействие тканевых базофилов и макрофагов в коже и лимфоузле белых крыс после воздействия общей глубокой гипотермии

Показатели	Сроки наблюдения	Кожа			Лимфоузел	
		сосочковый слой	сетчатый слой	гиподерма	корковое вещество	мозговое вещество
Количество ТБ на 1 мм ² среза	Контроль	71,0 →	119,0 →	153,0	3,4	3,1 (130,0)
	24 ч	25,0*→	34,0*→	65,0*	8,8	9,6*
	3 сут	63,0 →	126,0 →	169,0	1,5*	11,0*
	7 сут	43,0	49,0*→	67,0*	0,5*	6,0*
	30 сут	17,0*→	55,0*→	60,0*	0*	9,5*
Доля дегранулированных клеток, %	Контроль	7,0 →	40,0	30,0	9,0	6,0
	24 ч	20,0*→	69,0*→	53,0*	0*	3,4
	3 сут	13,0*→	56,0	39,0	0*	0*
	7 сут	5,6 →	30,0 →	19,0*	0*	0*
	30 сут	9,0*→	42,0	35,0	0*	0*
Количество разрушенных ТБ на 1 мм ² среза	Контроль	0,25→	12,0 →	31,0	1,4	0,6
	24 ч	0,25→	8,5 →	10,5	0*	0,4
	3 сут	0,5 →	11,0 →	16,0	0*	0*
	7 сут	0,4	0,4*→	1,2*	0*	0*
	30 сут	0* →	1,6*→	3,6*	0*	1,0
Доля ТБ, контактирующих с макрофагами, %	Контроль	6,5 →	27,0 →	35,0	0	1,0
	24 ч	0,7*→	29,0	31,0	0	22,0*
	3 сут	12,0*→	23,0	24,0	0	43,0*
	7 сут	0* →	47,0*	41,0*	0	47,0*
	30 сут	12,0*→	37,0*	55,0*	0	62,0*
Численность макрофагов на 1 мм ² среза	Контроль	49,1 →	82,2 →	812,4 →	—	4057,8
	24 ч	309,4*→	404,8*→	953,2*	—	7077,2*
	3 сут	410,3*→	508,7*→	1245,1*→	—	7097,1*
	7 сут	340,9*→	499,7*→	1037,4*→	—	6395,7*
	30 сут	335,3*→	430,0*→	1093,7*→	—	5577,8*
Интенсивность поглощения макрофагами ТС, баллы	Контроль	0,9 →	1,1 →	1,6 →	—	2,7
	24 ч	2,5*	2,5*	2,4*→	—	3,5*
	3 сут	2,5*	2,6*	2,6*→	—	3,4*
	7 сут	1,5* →	2,2*	2,2*→	—	3,3*
	30 сут	2,5*	2,0*	2,2*→	—	3,3*

Примечание. * — достоверно к контролю. Стрелками обозначены достоверные различия между соседними показателями. В скобках приведено число тканевых базофилов на 1 мм² среза в лимфоузлах крыс, которым трипановый синий не вводился (интактные крысы).

Результаты исследования представлены в таблице. После гипотермического воздействия в коже наблюдались волнообразные изменения численности ТБ во всех слоях. Первая волна снижения их числа наблюдалась через 24 ч после охлаждения. В это время во всех слоях кожи возрастала доля дегранулированных ТБ, однако число разрушенных клеток от контроля не отличалось. В сосочковом слое уменьшалась доля клеток, контактирующих с М, в других слоях кожи показатель не изменялся. Число М, поглотивших ТС, в это время было увеличено по сравнению с контролем во всех слоях кожи.

Через 3 сут после гипотермии число ТБ во всех слоях кожи соответствовало контролю, что могло быть связано с появлением вновь образованных клеток. Доля дегранулированных клеток была увеличена только в сосочковом слое, в остальных отделах от контроля не отличалась. Численность разрушенных ТБ не изменялась. В сосочковом слое дермы возрастала доля клеток, контактирующих с М. Число М и интенсивность захвата ими ТС были повышены во всех слоях кожи, что сохранялось до конца наблюдения.

Вторая волна снижения численности ТБ в коже наблюдалась через 7 сут после эксперимента. В это время число клеток снижалось в сетчатом слое дермы и в гиподерме. Показатель дегрануляции ТБ достоверно снижался в гиподерме. В сетчатом слое дермы и в гиподерме падало число разрушенных клеток и возрастала доля клеток, контактирующих с М. В сосочковом слое изменения содержания всех форм ТБ были недостоверными, а контакты ТБ и М отсутствовали.

Через 30 сут уменьшение числа ТБ захватывало все слои кожи. Дегранулированные клетки в сосочковом слое отсутствовали, в других отделах кожи отличий от контроля не выявлено. Было уменьшено число разрушенных клеток в сетчатом слое дермы и в гиподерме, а в сосочковом слое они отсутствовали. Во всех слоях кожи было достоверно увеличено число взаимодействующих ТБ и М (рис.).

Поскольку в лимфоузле и контрольных, и опытных крыс при введении ТС выявлено очень низкое содержание ТБ при высоком содержании их в окружающей орган соединительной ткани, были исследованы лимфоузлы интактных крыс. У этих животных обнаружено высокое содержание ТБ в мозговом веществе и отсутствие их в корковом веществе (табл., цифра в скобках). Введение ТС приводило к резкому накоплению в мозговых синусах М, заполненных красителем. После холодового воздействия число таких М еще более возрастало и оставалось резко увеличенным до конца наблюдения.

Введение трипанового синего приводило к появлению ТБ в корковом веществе. После гипотермии наблюдалось перераспределение ТБ в органе: постепенное уменьшение их числа вплоть до исчезновения в корковом и нарастание — в мозговом веществе. На протяжении всего наблюдения были уменьшены доля дегранулированных и число разрушенных ТБ. В мозговом веществе происходило прогрессивное увеличение доли ТБ, контактирующих с М.

Таким образом, выявлено увеличение функциональной активности макрофагов кожи и лимфоузла после холодового воздействия, что свидетельствует о формировании в организме адаптивных реакций. Подобное влияние холодового стресса на макрофагическую систему отмечено и в других работах [3]. Авторы цитированной работы считают, что значение феномена активации макрофагов в условиях холодового воздействия, когда резко активируются процессы перекисного окисления липидов, состоит в обезвреживании токсических веществ липоперекисной природы, так как эти клетки обладают эффективными антиоксидантными системами.

Динамика тканевых базофилов была иной. В коже отмечалось две волны снижения содержания этих клеток (через 24 ч и 7—30 сут). Если первое снижение можно объяснить непосредственным повреждающим дей-

ствием холода, то второе мы расцениваем как результат усиления взаимодействия тканевых базофилов и макрофагов. Известно, что активация фагоцитоза макрофагов приводит к уменьшению числа ТБ вследствие выделения макрофагами фактора, вызывающего разрушение этих клеток. Так, при эритрофагии макрофагов лимфоузлов, стимулированной введением БЦЖ, наблюдалось резкое обеднение синусов макрофагами [1]. В наших экспериментах резкая активация макрофагов в лимфоузле после введения трипанового синего приводила к почти полному исчезновению ТБ из органа. Однако холодное воздействие, которое еще более активировало макрофаги, вызывало некоторое увеличение числа тканевых базофилов в мозговом и постепенное исчезновение их в корковом веществе лимфоузла, т. е. происходило перераспределение клеток в органе с увеличением их числа в зоне повышенной активности макрофагов. В связи с этим следует привести данные [1] о том, что наряду с антагонистическими взаимоотношениями этих двух клеточных популяций ТБ являются сателлитами макрофагов и необходимы для выполнения ими функции фагоцитоза. Отсутствие тканевых базофилов в корковом веществе у интактных крыс и появление их там после введения красителя и холодного воздействия могло быть связано с образованием этих клеток в корковом веществе для последующей миграции в мозговое, в зону активного фагоцитоза.

Таким образом, холодное воздействие приводит к изменению характера взаимодействий тканевых базофилов и макрофагов, что имеет защитно-приспособительное значение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковалевский Г. В. Очерки иммуноморфологии. — Новосибирск: Наука, 1976. — 266 с.
2. Коростовцева Н. В. Повышение устойчивости к гипоксии. — Л.: Медицина, 1976. — 168 с.
3. Куликов В. Ю., Семенюк А. В., Колесникова Л. И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор. — Новосибирск: Наука, 1988. — 190 с.
4. Лабори А. Предварительные данные о возможной роли соединительной ткани при проведении глубокой гипотермии // Вестн. АМН СССР. — 1966. — № 5. — С. 52—59.
5. Проценко В. А., Шпак С. И., Доценко С. М. Тканевые базофилы и базофильные гранулоциты крови. — М.: Медицина, 1987. — 128 с.

Витебский мед. ин-т

Поступила 30.05.88

O. D. MYADELETS, A. F. SUKHANOV

INTERACTIONS BETWEEN TISSUE BASOPHILS AND MACROPHAGES IN SKIN AND LYMPH NODES OF WHITE RATS SUBJECT TO TOTAL DEEP HYPOTHERMIA

Medical Institute of Vitebsk

Animals were cooled to the rectal temperature of 18 °C, hold at the temperature for 2 hr and then rewarmed to 37 °C. Macrophages were identified by exclusion of trypane blue administered subcutaneously between the shoulder-blades. Tissue basophils were identified using trypane blue. It has been found that the hypothermal effect decreased the number of tissue basophils and increased the number of active macrophages in all skin layers. The number of interacting tissue basophils and macrophages in the early posthypothermal period decreased and later increased. The injection of trypane blue per se to a lymph node induced a sharp decrease in number of tissue basophils. Hypothermia induced redistribution of tissue basophils, thus decreasing their number in the cortical and increasing in the medullar substance. The number of active macrophages as well as the number of interacting tissue basophils and macrophages increased in the medullar substance. A different nature of interaction between the cells in skin and lymph node has been found.

В. Л. Тихонова, Л. В. Ильина, И. Ю. Макеева, С. Г. Яшина

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ И СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР ХРАНЕНИЯ НА ЛАБОРАТОРНУЮ ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН ДИКОРАСТУЩИХ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ.

1. СЕМЕНА БЕЗ ПЕРИОДА ПОКОЯ

Изучено влияние замораживания при температурах -10 и -196 °C семян восьми дикорастущих травянистых видов растений (*Dianthus superbus*, *D. fischeri*, *D. borbasii*, *D. deltoides*, *Anemone sylvestris*, *Pulsatilla patens*, *Leucanthemum vulgare*, *Filipendula vulgaris*) на их лабораторную всхожесть и динамику появления всходов.

Необходимость долговременного хранения семян охраняемых видов растений становится в настоящее время весьма актуальной. Банки долговременного хранения генетических ресурсов не только основа восстановления численности видов, но и национальное богатство страны: за рубежом начинаются работы по патентованию генов, и законодательная политика некоторых высокоразвитых капиталистических стран уже направлена на запрещение продажи непатентованных семян [3]. В Ботанических садах Советского Союза обменные фонды семян дикорастущих видов растений хранятся пока в комнатных условиях. Влияние лабораторных условий хранения на жизнеспособность и генетическую цельность семян изучено для многих видов: семена быстро стареют, сильно повышается процент мутаций вследствие нарушения процессов метаболизма и накопления в семенах аутомутагенов [2]. Во Всесоюзном институте охраны природы и заповедного дела с 1982 г. создан банк долговременного хранения семян видов союзной и региональной охраны, насчитывающий в настоящее время свыше 600 образцов; семена хранятся в стеклянной таре с герметизацией при низких положительных температурах (от 3 до 5 °C), что значительно замедляет процесс их старения. Для долговременного хранения ведутся эксперименты по возможности хранения семян в замороженном состоянии при температурах -10 и -196 °C.

В данной статье обобщены экспериментальные материалы по реакции на замораживание семян, не имеющих периода покоя и легко прорастающих в комнатных условиях.

Семена для опытов собирались в природных популяциях Московской области и с растений, выращенных в питомнике размножения. Изучены семена следующих видов:

1. Гвоздика пышная (*Dianthus superbus* L. сем. *Caryophyllaceae*) — декоративный многолетник, охраняющийся в Московской, Горьковской, Мурманской и др. областях Нечерноземья, в Удмуртии, на Урале, включена в «Красные книги» Литвы и Латвии.

2. Гвоздика Фишера (*Dianthus fischeri* Spreng.) — декоративный многолетник, охраняющийся в Горьковской, Курской, Ярославской, Псковской и др. областях.

3. Гвоздика Борбаша (*Dianthus borbasii* Vandas) — декоративный многолетник, охраняющийся в Брянской, Горьковской, Ивановской, Владимирской и др. областях, в Удмуртии.

4. Гвоздика травяная (*Dianthus deltoides* L.) — декоративный многолетник, охраняется в Костромской и др. областях.

5. Ветреница лесная (*Anemone sylvestris* L., сем. *Ranunculaceae*.) — очень декоративный многолетник, охраняющийся по всему ареалу.

6. Прострел раскрытый, сон-трава (*Pulsatilla patens* (L.) Mill. сем. *Ranunculaceae*) — очень декоративный многолетник, взятый под охрану по всему ареалу.

7. Нивяник обыкновенный (*Leucanthemum vulgare* Lam сем. *Asteraceae*) — декоративный многолетник, входит в «Красные книги» Карелии и Мурманской области, охраняется в Московской, Саратовской и др. областях.

8. Таволга обыкновенная (*Filipendula vulgaris* Moench сем. *Rosaceae*) — травянистый многолетник, охраняется в Ярославской, Псковской и др. областях, в Удмуртии.

Размеры семян определяли измерением 30 шт. в каждом образце, массу — взвешиванием 100 шт. в 4—5-кратной повторности. Влажность определялась путем высушивания 100 шт. семян в 3—5 повторностях до постоянной массы. Семена для опытов брали с равновесной влажностью, т. е. с той, которую они приобрели сами при хранении в комнатных условиях в течение 1—2 мес. после сбора, искусственного подсушивания семян не проводили. Определение лабораторной всхожести проводили в чашках Петри на фильтровальной бумаге с тонкой подстилкой ваты, в комнатных условиях (18—22 °C), по 50 шт. в одной чашке, в 5-кратной повторности по каждому варианту; проращивание проводили до полного прорастания или гибели семян.

Результаты определения размеров, массы и всхожести статистически обработаны и представлены [1] в виде среднего арифметического с ошибкой ($M \pm m$), вариационных коэффициентов $V\%$ (для оценки вариабельности признаков) и при сравнении контроля и результатов экспериментов — коэффициентов достоверности разницы (t — коэффициента Стьюдента). Контролем служили семена, хранящиеся в банке при положительных низких температурах (от 0 до 5 °C). Замораживание семян проводили в герметично закупоренных пластмассовых ампулах; до температуры —196 °C семена доводили двумя способами: опусканием непосредственно в жидкий азот (быстрое замораживание — БЗ, скорость охлаждения 700 °C в мин) и медленным охлаждением со скоростью 1 °C в мин до —70 °C, а затем перенесением в жидкий азот (медленное замораживание — МЗ). Отогревали семена всегда одинаково; вынутые из азота ампулы размораживались при комнатной температуре.

Таблица 1

Морфобиологические показатели семян

Вид растений	Размеры семян $M \pm m$, мм		Масса 100 шт., мг	Влажность, %
	длина	ширина		
Гвоздика пышная	$2,55 \pm 0,03$ 6,4 %	$1,87 \pm 0,04$ 11,4 %	$60,0 \pm 0,8$ 3,1 %	$6,47 \pm 0,03$ 0,9 %
Гвоздика Фишера	$2,38 \pm 0,06$ 15,6 %	$1,71 \pm 0,02$ 9,0 %	$43,2 \pm 0,7$ 3,8 %	$7,3 \pm 0,3$ 7,1 %
Гвоздика Борбаша	$1,57 \pm 0,02$ 7,1 %	$1,16 \pm 0,27$ 12,4 %	$20,7 \pm 0,5$ 4,6 %	$7,2 \pm 0,1$ 2,9 %
Гвоздика травяная	$1,33 \pm 0,02$ 9,8 %	$0,80 \pm 0,02$ 11,5 %	$12,7 \pm 0,2$ 1,7 %	$7,4 \pm 0,5$ 13,4 %
Ветреница лесная	$2,76 \pm 0,06$ 11,0 %	$0,76 \pm 0,02$ 15,8 %	$33,0 \pm 1,0$ 6,1 %	$5,3 \pm 0,2$ 5,4 %
Прострел раскрытый	$5,50 \pm 0,16$ 14,1 %	$0,88 \pm 0,02$ 8,9 %	$131,5 \pm 1,0$ 1,4 %	$5,3 \pm 0,2$ 5,6 %
Нивяник обыкновенный	$2,25 \pm 0,04$ 9,3 %	$0,77 \pm 0,02$ 13,3 %	$34,5 \pm 0,5$ 2,9 %	$4,2 \pm 0,2$ 6,4 %
Таволга обыкновенная	$3,41 \pm 0,09$ 14,9 %	$1,51 \pm 0,03$ 9,9 %	$81,5 \pm 1,1$ 2,7 %	$6,1 \pm 0,1$ 1,4 %

Примечание: Показатели представлены в виде дроби, в числителе которой среднее арифметическое с ошибкой ($M \pm m$), в знаменателе — вариационный коэффициент ($V\%$).

Результаты измерений, взвешивания семян и определения их влажности сведены в табл. 1. Семена 6 изученных видов весьма мелкие (1—2 мм в длину) и легкие (масса 100 шт. семян 12—60 мг), у 2 видов — таволги и прострела — семена крупнее и более тяжелые. Равновесная влажность изученных семян составляла 4,2—7,3 %.

В пределах одной популяции размеры семян изученных видов весьма константны (вариационный коэффициент по длине и ширине колеблется в пределах 6,4—15,8 %); масса семян в каждом образце и их влажность еще более стабильны (V % по массе 100 шт. 1,4—6,1 %, по влажности 0,9—7,1 %).

Эксперименты по определению лабораторной всхожести семян после замораживания проводили дважды: в мае и в октябре 1986 г. на семенах разных лет сбора и разного происхождения. Оба раза экспозиция семян при отрицательных температурах была одинакова — 1 мес. Семена всех видов гвоздики, нивяника, таволги перенесли замораживание при -10°C и при -196°C без изменения всхожести (табл. 2; t между контролем и вариантами у этих видов меньше 2,3; разница не достоверна). Несмотря на небольшое число повторностей ($n = 5$) всхожесть в пределах одного образца обычно варьирует слабо (вариационный коэффициент редко превы-

Таблица 2

Влияние замораживания на лабораторную всхожесть семян

Вид семян	Год сбора семян	Сроки проращивания, 1986	Режимы хранения, $^{\circ}\text{C}$				t^*		
			контроль 0—5	-196 (БЗ)	-196 (МЗ)	-10	$\frac{K}{БЗ}$	$\frac{K}{МЗ}$	$\frac{K}{-10^{\circ}\text{C}}$
Гвоздика пышная	1985	13/V—26/V	97 ± 1 2,4 %	—	96 ± 1 2,1 %	98 ± 1 2,0 %	—	0,7	0,7
	1986	23/X—10/XI	99 ± 1 1,8 %	100 ± 0 0 %	100 ± 0 0 %	100 ± 0 0 %	1,0	1,0	1,0
Гвоздика Фишера	1985	13/V—22/V	97 ± 1 1,2 %	96 ± 2 4,2 %	98 ± 0 0 %	—	0,4	1,0	—
	1986	23/X—27/X	100 ± 0 0 %	99 ± 1 1,1 %	100 ± 0 0 %	100 ± 0 0 %	1,0	0	0
Гвоздика Борбаша	1985	8/V—19/V	70 ± 6 12,1 %	68 ± 6 15,3 %	75 ± 8 18,8 %	91 ± 3 6,7 %	0,2	0,5	3,1
	1986	23/X—10/XI	95 ± 2 4,4 %	92 ± 1 2,4 %	97 ± 1 4,2 %	98 ± 1 1,7 %	1,3	0,9	1,3
Гвоздика травяная	1986	27/X—13/XI	98 ± 1 1,5 %	99 ± 1 1,5 %	96 ± 2 4,2 %	98 ± 1 1,7 %	0,7	0,9	1,0
Ветреница лесная	1985	13/V—15/VII	56 ± 5 16,1 %	3 ± 2 92,4 %	2 ± 1 100 %	3 ± 2 126,1 %	9,8	10,6	9,3
	1986	22/X—29/XI	25 ± 7 60,8 %	14 ± 2 26,3 %	19 ± 4 47,5 %	18 ± 4 52,4 %	1,5	0,7	0,9
Прострел раскрытый	1986	22/X—28/XI	87 ± 3 8,8 %	70 ± 3 11,1 %	75 ± 3 8,0 %	70 ± 4 13,6 %	4,0	2,8	3,4
Нивяник обыкновенный	1985	13/V—1/VII	91 ± 2 3,4 %	95 ± 2 4,4 %	88 ± 3 6,8 %	87 ± 3 7,0 %	1,4	0,8	1,1
	1986	22/X—11/XI	93 ± 1 2,5 %	89 ± 3 7,4 %	94 ± 2 4,1 %	97 ± 1 1,8 %	1,3	0,4	2,8
Таволга обыкновенная	1985	7/V—22/VII	76 ± 1 2,6 %	75 ± 3 5,6 %	—	70 ± 3 6,6 %	0,3	—	1,9
	1986	23/X—20/XI	70 ± 3 11,5 %	62 ± 5 17,4 %	65 ± 6 19,9 %	65 ± 9 31,0 %	1,4	0,7	0,5

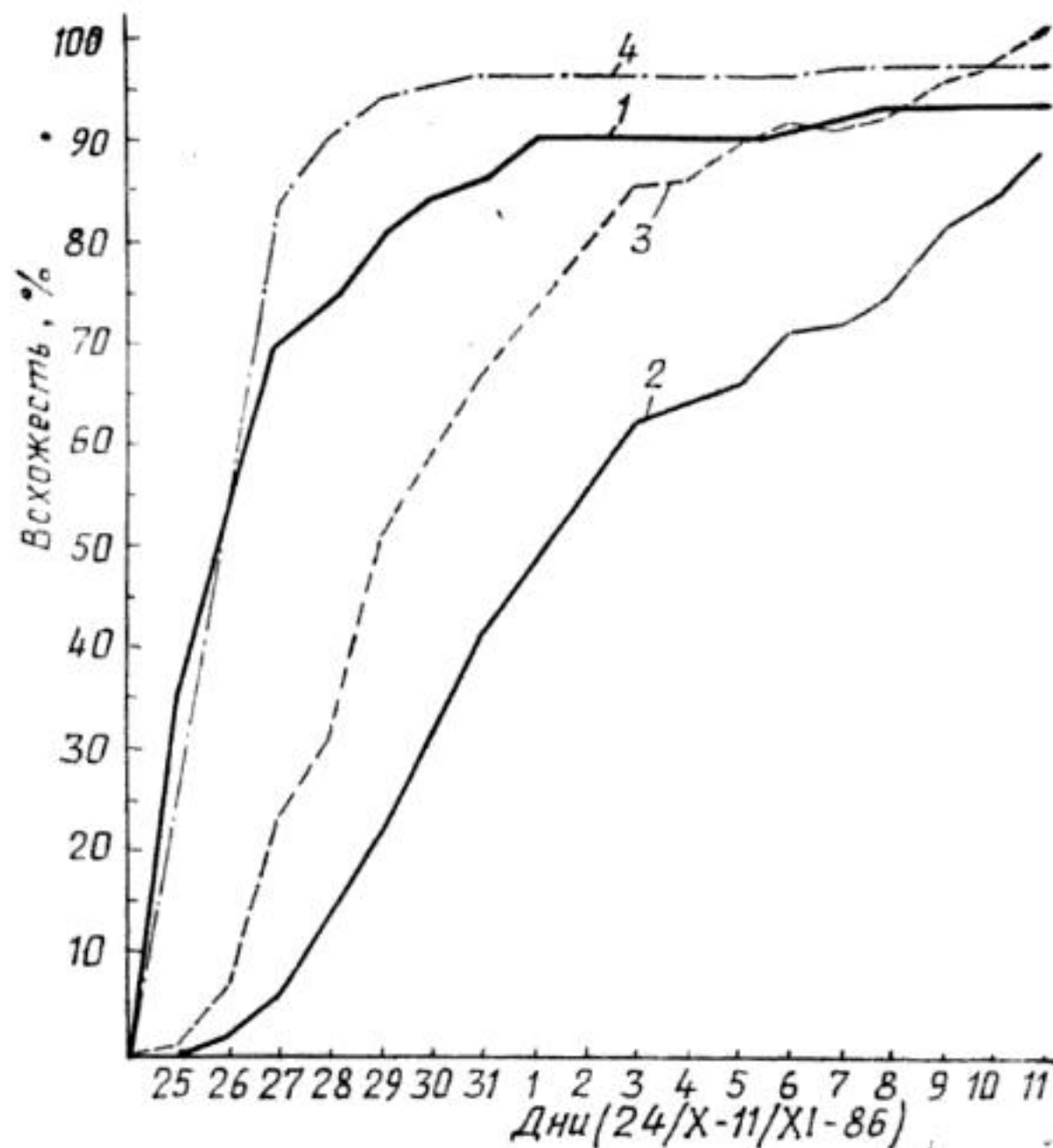
Примечание. t^* — коэффициент достоверности разницы (коэффициент Стьюдента); при $n = 5$ разница достоверна при $t \geq 2,3$ (на 95 % доверительном уровне).

шает 10 %); внутривидовая изменчивость по реакции на замораживание в вариантах опыта чаще всего близка к контролю. Что касается межвидовой изменчивости, то 2 вида гвоздики Борбаша оказались неоднозначными; из 2 видов ветреницы лесной семена одной слабо реагировали на замораживание ($t=0,7-1,5$), а в другой — замораживание семян привело к их массовой гибели, несмотря на то, что в контроле всхожесть была достаточно высока (56 %). Семена изученной популяции прострела раскрытого достоверно снизили всхожесть после замораживания ($t = 2,8 - 4$). Из 4 образцов семян гвоздики Фишера, собранных в 1986 г. в разных местообитаниях (табл. 3), всхожесть снизилась в 2 по сравнению с контролем (но разница эта не достоверна, меньше 2,3).

Таблица 3

Влияние сверхнизких температур на лабораторную всхожесть семян гвоздики Фишера разного происхождения

№ п/п	Происхождение и год сбора семян	Лабораторная всхожесть, %		
		Контроль	t	БЗ—196 °C
1.	Дер. Хатунь, 1986	100±0	0	100±0
2.	Дер. Соколова Пустынь, 1986	97±1	0,7	96±1
3.	Дер. Чулково, 1986	98±1	1,3	95±2
4.	Питомник, 1986	100±0	0	100±0



Лабораторная всхожесть семян *Leucanthemum vulgare* после замораживания: 1 — контроль (0 — 5 °C), 2 — быстрое замораживание (БЗ), 3 — медленное замораживание (МЗ), 4 — —10 °C

Кроме определения лабораторной всхожести, изучали влияние замораживания на динамику появления всходов. Из изученных 8 видов глубокое замораживание не влияет на скорость появления всходов у всех видов гвоздики, таволги и замедляет появление всходов у нивяника, ветреницы лесной, прострела (рис.). Проращивание семян нивяника из 3 природных популяций и одного образца из питомника (табл. 4) показало, что сверхглубокое замораживание замедляет появление всходов во всех популя-

Таблица 4

Влияние сверхнизких температур на лабораторную всхожесть семян нивяника разного происхождения (посев в чашки Петри 10 марта 1987 г.)

№ п/п	Происхождение и год сбора	Варианты	10 апреля 1987 г.			15 июня 1987 г.
			Всхожесть, %	Непроросшие семена, %	Сумма всхожих и непроросших семян, %	Всхожесть, %
1.	Пл. Садовая, Белорусской ж. д., 1986	К	92±2 (88—98)*	0	92±2	92±2
		t	1,9	—	0,7	0
2.	Дер. Сабурово, Красногорский р-н, 1986	БЗ	76±8 (46—92)	18±6 (8—42)	94±2	92±3
		К	89±1 (84—92)	0	89±1	89±1
3.	Дер. Хатунь, Ступинский р-н, 1986	t	5,7	—	2,2	5,0
		БЗ	71±3 (60—82)	13±4 (4—22)	84±2	82±1
4.	Питомник, 1986	К	96±2 (90—100)	0	96±2	96±2
		t	1,4	—	0	0
		БЗ	92±2 (86—94)	4±2 (2—12)	96±1	96±1
		К	98±1 (92—100)	0	98±1	98±1
		t	1,8	—	1,4	1,4
		БЗ	89±5 (74—98)	7±4 (0—20)	96±1	96±1

Примечание. *— Показатели характеризуются средним арифметическим с ошибкой ($M \pm m$), а также минимальным и максимальным значениями из 5 повторностей (lim.); К — контроль; БЗ — быстрое замораживание; t — коэффициент достоверности разницы (разница достоверна при $t \geq 2,3$).

циях, но в разной степени: за 1 мес. проращивания в контролях проросли все семена, а в опытах с замораживанием сильно задержалось появление всходов в популяциях № 1 и № 2; на семена популяции № 3 криоконсервация повлияла очень слабо (не проросло всего 4 % семян). Таким образом, межпопуляционная изменчивость у семян нивяника по реакции на сверхглубокое замораживание весьма велика. Достоверно снизилась всхожесть только в популяции с пониженной начальной всхожестью семян (№ 2; к окончанию опыта 15 июня $t = 5,0$; разница достоверна). Причины этого замедления изучаются. Надо отметить также, что хранение семян нивяника в комнатных условиях в течение 3 лет замедляет появление всходов по сравнению с хранением при 4 °С, но гораздо меньше, чем в азоте (дней на 6—8).

Хранение при температуре жидкого азота одинаковых образцов некоторых видов семян было прекращено (табл. 5) через 1 мес. (апрель 1986 г.) и через 1 год (март 1987 г.). Сравнение всхожести в этих образцах показало, что годовое пребывание семян гвоздики Борбаша в холодильнике (4 °С) привело к повышению их всхожести (между 70 ± 6 и 93 ± 2 , $t = 3,6$;

Таблица 5

Влияние разной экспозиции семян при сверхнизких температурах на их лабораторную всхожесть, %

Виды	Продолжительность замораживания					
	1 месяц			1 год		
	Контроль	t	МЗ—196°С	Контроль	t	МЗ—196°С
Гвоздика пышная	97±1	0,7	96±1	98±1	2,0	100±0
Гвоздика Фишера	97±1	1,0	98±0	98±1	0,7	99±1
Гвоздика Борбаша	70±6	0,5	75±8	93±2	3,1	86±1
Нивяник обыкновенный	91±2	0,8	88±3	94±2	3,9	80±3
Таволга обыкновенная	76±1	—	—	72±3	0,4	74±4

разница достоверна); всхожесть семян после криоконсервации разной продолжительности практически одинакова (между 75 ± 8 и 85 ± 1 , $t = 1,4$; разница недостоверна); всхожесть семян гвоздики пышной, гвоздики Фишера и таволги обыкновенной почти не изменяется при хранении в холодильнике и в жидком азоте.

Годичное пребывание семян нивяника в холодильнике не повлияло на их всхожесть (между 91 ± 2 и 94 ± 2 , $t = 1,1$; разница недостоверна); пребывание при температуре жидкого азота в течение года слегка понизило всхожесть семян, но при взятых повторностях эта тенденция не доказана (между 88 ± 3 и 80 ± 3 , $t = 1,9$, разница недостоверна). Итак, по 5 изученным видам продолжительность пребывания в жидком азоте (1 мес. или 1 год) не влияет на лабораторную всхожесть семян.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайцев Г. Н. Методика биометрических измерений. — М.: Наука, 1973, 256 с.
2. Орлова Н. Н. Естественный мутационный процесс в семенах при их хранении // Успехи современной генетики. — М., 1972. — С. 206—228.
3. Сытник К. М. Сохранение генетических ресурсов — важнейшая задача биологической и сельскохозяйственной науки в СССР // Генетические ресурсы растений и животных Украинской ССР. — Киев: Наук. думка, 1987. — С. 5—9.

ВНИИ охраны природы и
заповедного дела, г. Москва,
Ин-т почвоведения и фотосинтеза
АН СССР, Пущино, Моск. обл.

Поступила 03.12.87

V. L. TIKHONOVA, L. V. ILYINA, I. Yu. MAKEYEVA, S. G. YASHINA

THE EFFECT OF LOW AND SUPERLOW STORAGE TEMPERATURES ON THE LABORATORY GERMINATING ABILITY OF WILD HERB SEEDS. 1. SEEDS WITHOUT RESTING PERIOD

All-Union Research Institute of Nature Protection and Reservation; Institute for Soil Science and Photosynthesis of the USSR Academy of Sciences, Moscow

The effect of freezing of seeds of eight wild herb species (*Dianthus superbus*, *D. fisheri*, *D. barbasi*, *D. deltoides*, *Anemone sylvestris*, *Pulsatilla patens*, *Leucanthemum vulgare*, *Filipendula vulgaris*) to -10 and -196 °C on their laboratory germinating ability and dynamics has been studied.

УДК 632.4 : 633.1 : 57.043

Л. В. Жукова, Н. П. Неклеса, Н. А. Лобжанидзе

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ РЖАВЧЕННЫХ ГРИБОВ ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ

Приводятся результаты сохраняемости уредоспор возбудителей ржавчинных заболеваний зерновых в жидком азоте. Показано влияние повторных криовоздействий на жизнеспособность ржавчинных грибов. Выявлена идентичность фенотипического проявления различных генотипов патогенов на моногенных линиях пшеницы. Установлена возможность использования неоднократно замороженного инфекционного материала ржавчин для практических работ.

Криоконсервация один из эффективных современных методов сохранения различных живых систем в состоянии анабиоза. В настоящее время этот метод успешно применяется в медицине, животноводстве, а также для хранения культур грибов, включая ржавчинные [1, 3, 4]. Известно, что уредоспоры стеблевой ржавчины пшеницы и ржи хорошо сохраняют жизнеспособность как при быстром, так и при медленном замораживании. Выведению из состояния анабиоза способствует повышение температуры до $36-45$ °C [2, 5].

Из анализа литературы о хранении грибных культур в жидком азоте видно, что наименее исследованными являются вопросы влияния многократных криовоздействий на жизнеспособность и генетическую стабильность патогенов. Выяснение этих вопросов явилось целью наших экспериментов.

Объектом исследований служили уредоспоры возбудителей следующих видов ржавчины зерновых: стеблевая ржавчина пшеницы (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*), стеблевая ржавчина ржи (*P. graminis* f. sp. *secalis*), стеблевая ржавчина овса (*P. graminis* f. sp. *avenae*), бурая ржавчина пшеницы (*P. recondita* f. sp. *tritici*), бурая ржавчина ржи (*Puccinia dispersa*), корончатая ржавчина овса (*P. coronata* f. sp. *avenae*). Споры указанных видов — от округлых до эллипсоидальных, размеры $14-40 \times 13-26$.

В качестве хранилища биоматериала использовали заполненные жидким азотом криобиологические сосуды Х-34Б. Уредоспоры с влажностью 7—12 % помещали в азот в полиэтиленовых пробирках емкостью 1—2 мл, обеспечивающих равномерное охлаждение и отогрев всего биоматериала. Масса спор в емкости колебалась от десятков до сотен миллиграмм. Замораживали материал путем быстрого (за 1,5—2 с) погружения его в хладагент, оттаивали при температуре 43 °С в водяной бане в течение 5 мин. Часть выведенных из анабиоза спор отсыпали для анализа, оставшиеся вновь погружали в азот. Интервалы между повторными циклами замораживания-оттаивания варьировали от нескольких недель до 2 лет.

Биологические свойства спор характеризовались показателем жизнеспособности, выраженным процентом прорастания через 24 ч и энергией прорастания (прорастаемость через 3 ч). Повторность в опытах для каждого вида ржавчины 5-кратная. Полученные результаты обработаны методом дисперсионного анализа на ЭВМ «Лабтам». В целях проверки патогенности хранившимися спорами инокулировали растения соответствующих культур. Генотип патогена устанавливали путем заражения линий и сортов пшеницы, содержащих известные гены устойчивости, отдельными изолятами ржавчинных грибов. Работу проводили в камерах искусственного климата.

Данные по сохраняемости уредоспор ржавчинных грибов представлены в таблице, из которых следует, что после однократного размораживания биологические показатели хранившегося инфекционного материала большинства видов ржавчин остались на исходном уровне. Исключение представляли споры возбудителей стеблевой и корончатой ржавчин овса, жизнеспособность которых снизилась на 9—10 %. Повторное заморажи-

Влияние повторных криовоздействий на жизнеспособность уредоспор возбудителей ржавчин

Вид ржавчины	Перед замораживанием		После очередного размораживания									
	жизнеспособность, %	энергия прорастания, %	жизнеспособность					энергия прорастания				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Бурая ржавчина пшеницы	92	90	92	87	81	77	76	82	80	81	83	66
Бурая ржавчина ржи	92	87	87	87	62	60	58	81	80	58	57	52
Корончатая ржавчина овса	95	90	85	81	70	62	52	81	72	62	53	49
Стеблевая ржавчина пшеницы	90	84	90	91	81	79	62	82	80	77	71	56
Стеблевая ржавчина ржи	96	91	95	93	92	84	83	93	89	85	82	78
Стеблевая ржавчина овса	88	81	79	75	73	76	45	75	70	67	69	45

вание не внесло значительных изменений в жизнеспособность консервированных спор.

С увеличением числа криовоздействий биологические показатели спор снижались, причем неодинаково для различных видов ржавчин. Более устойчивыми к многократным замораживаниям оказались уредоспоры возбудителей стеблевой ржавчины пшеницы и ржи, бурой ржавчины пшеницы, жизнеспособность которых после 5-кратного процесса замораживания-оттаивания сохранилась на уровне 62, 83 и 76 %. Менее стойкими были уредоспоры возбудителей стеблевой и корончатой ржавчин овса, бурой ржавчины ржи. Так, жизнеспособность уредоспор возбудителя бурой ржавчины ржи снизилась на 30% уже после третьего замораживания, хотя в дальнейшем почти не изменилась. Жизнеспособность возбудителя корончатой ржавчины овса заметно снижалась почти после каждого замораживания и к концу испытаний составила половину от исходной; вдвое упала также жизнеспособность стеблевой ржавчины овса. Энергия прорастания различных ржавчинных культур в процессе повторных замораживаний была аналогичной их жизнеспособности. Так как данный показатель более чувствителен к условиям внешней среды, его снижение в некоторых случаях было более резким.

При заражении растений хранившимися в азоте уредоспорами во всех случаях наблюдали развитие болезни, вне зависимости от кратности их замораживания-оттаивания. Это свидетельствует о том, что многократное воздействие на уредоспоры ультранизких температур не лишает их патогенности, хотя в определенной мере и снижает жизнеспособность.

В экспериментах по установлению влияния криовоздействий на генетическую стабильность патогенов неоднократно циклам замораживания-оттаивания подвергали уредоспоры возбудителей 11, 15, 34 рас стеблевой ржавчины пшеницы, содержащих гены вирулентности в таком сочетании: а) 5, 6, 7, 9d, 9e, 9g, 11, 14, 15, 16, 36; б) 5, 6, 7, 9b, 9d, 11, 14, 15, 16, 17, 36, 9g; в) 5, 6, 7, 8, 9g, 9d, 9b, 11, 14, 15, 16, 17, 22, 36, 37; г) 5, 6, 7, 9g, 9d, 14, 15, 16, 17, 22, 36, 37; д) 5, 6, 7, 8, 9d, 13, 14, 16, 17, 36 и патотипов 77 и 58 рас бурой ржавчины пшеницы со следующим набором генов вирулентности: а) 1, 2a, 2b, 2c, 3, 11, 14a, 14b, 16, 17, 20; б) 1, 2a, 2b, 2c, 3, 11, 14a, 14b, 16, 17, 18, 26; в) 2c, 3, 10, 14b, 16, 20, 26.

Свежими и размороженными уредоспорами каждого из указанных патотипов ржавчины инокулировали моногенные линии и сорта пшеницы. Результаты оценки поражения растений как свежими, так и хранившимися уредоспорами ржавчинных грибов показали, что различий в реакциях сортов и линий пшеницы нет. Типы поражения пшеницы, инокулированной свежими уредоспорами патотипов полностью соответствовали типам поражения, вызванным патогенами, уредоспоры которых неоднократно замораживали и размораживали. Фенотипические проявления каждого из указанных генотипов возбудителей были идентичны как в случае использования свежего, так и подвергавшегося действию ультранизких температур материала. Вирулентность патотипов не зависела от продолжительности хранения в жидком азоте и от воздействия на них процессов оттаивания-замораживания.

Выполненные исследования позволяют сделать вывод о генетической стабильности консервируемого в жидком азоте биоматериала ржавчинных культур. Уредоспоры ржавчинных грибов достаточно устойчивы к повторным криовоздействиям, что дает возможность неоднократно использовать замороженный материал для практических работ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грищенко В.И. Современные тенденции развития криобиологии и криомедицины// Криобиология. — 1985. — № 1. — С. 3—8.

2. Bromfield K. R. Cold-Induced Dormancy and its Reversal in Uredospores of *Puccinia graminis* var *tritici* // *Phytopathology*.— 1964.— 54, N 1.— P. 68—73.
3. Bugbee W. M., Kernkamp M. F. Storage of pucciniospores of *Puccinia graminis* *secalis* in liquid nitrogen // *Phytopathology*.— 1965.— 55, N 10.— P. 1052.
4. Davis E. E., Hodges F. A., Goos R. D. Effect of suspending Media on the Survival of *Puccinia graminis* Urediospores during Freezing // *Phytopathology*.—1966.—56, P 12.—P 1432—1433.
5. Loegering W. Q., Harmon D. L. Effect of thawing temperature on urediospores of *Puccinia graminis* f. Sp. *tritici* frozen in liquid nitrogen // *Plant Disease Reporter*.— 1962.— 46, — P. 299—302.

ВНИИ фитопатологии, Моск. обл.,
Большие Вяземы

Поступила 25.04.88

L. V. ZHUKOVA, N. P. NEKLESA, N. A. LOBZHANIDZE

THE INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION ON THE VIABILITY AND GENETIC STABILITY OF CEREAL RUSTS

All-Union Research Institute for Phytopathology, Bolshiye Vyazmy, Moscow Region

The data on preservation of uredospores of cereal rust pathogens in liquid nitrogen presented. The effect of repeated freezing on the viability of rusts has been showed. The identity of phenotypic manifestations of different genotypes of the pathogens on monogenic cereals has been found. The possibility of using of repeatedly frozen infectious are rust material in practice has been demonstrated.

В. Н. Мельникова, Г. Г. Платонова, Т. В. Замалетдинова

УДК 615.386.1.014.413

ПРОДЛЕНИЕ СРОКОВ ХРАНЕНИЯ ПРИ 4 ° С РАЗМОРОЖЕННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

Предложен метод отсроченного отмывания размороженных эритроцитов, обеспечивающий существенное удлинение срока их хранения при 4 °С: до 10 дней при замораживании в жидком азоте и до 21 дня при криоконсервировании в условиях умеренно низкой температуры -38 ± 2 °С.

Наряду с известными преимуществами, метод криоконсервирования эритроцитов имеет некоторые недостатки, в частности — очень короткий срок их годности после размораживания и отмывания от глицерина. Большинство исследователей этот период ограничивается 24 ч вследствие нарастания гемолиза во взвеси деконсервированных эритроцитов и опасности бактериального загрязнения в связи с многоступенчатой процедурой отмывания. Такой короткий срок годности размороженных эритроцитов резко затрудняет их использование при необходимости индивидуального подбора по эритроцитарным антигенам в лечебных учреждениях, даже находящихся в непосредственной близости от банка замороженных эритроцитов, и совершенно исключает возможность их транспортировки в сколько-нибудь отдаленные районы.

В предыдущие годы многими исследователями предпринимались попытки удлинения срока хранения размороженных эритроцитов. Эти разработки обычно были направлены на совершенствование рецептуры взвешивающих растворов [1, 2, 4, 5].

Целью настоящего исследования являлось изыскание принципиально нового метода хранения оттаянных клеток, в частности, изучение возможности отсроченного отмывания размороженных эритроцитов после их хранения при 4 °С в среде глицерина.

Основанием для таких разработок послужили ранее полученные нами данные о том, что в противоположность сложившемуся мнению нативные

взвеси эритроцитов в 30—40 %-ном растворе глицерина не подвергаются гемолизу в течение 14 дней. Кроме того, по литературным данным, глицерин в концентрации около 40 % обладает бактерицидными свойствами [6]. На основании современной гипотезы о водно-заместительном действии глицерина [7] также можно предположить, что замена в клетке водной среды этим соединением приводит к некоторой дегидратации клетки, дополнительному подавлению обменных процессов при 4 °С, стабилизации мембраны клетки. Исследования [3] с использованием 1,2-пропандиола подтверждают это предположение.

Для подтверждения вышеизложенных предположений нами было проведено сравнительное изучение взвесей размороженных эритроцитов, криоконсервированных в жидком азоте в стандартных гофрированных контейнерах с 30 % глицерина (1-я группа опытов) и при умеренно низких температурах со сниженной концентрацией глицерина в криоконсерванте разработанным нами методом (2-я группа опытов). В 1-й группе опытов эритроциты донорской глюкозоцитратной крови после центрифугирования при 1500 оборотах в течение 15 мин и удаления плазмы соединяли 1 : 1 с криозащитным раствором ЦНИИГПК 11₄-М, переводили в стандартный гофрированный контейнер и погружали в жидкий азот для замораживания. После размораживания 1/2 объема взвеси эритроцитов отмывали по методике ЛенНИИГПК с применением солевых растворов и двукратного центрифугирования. Деглицеринизированные эритроциты соединяли в равных объемах со взвешивающим раствором ЦНИИГПК 8в помещали в холодильник для хранения при 4 °С (контроль 1). Оставшуюся часть оттаянных неотмытых эритроцитов, не переводя из контейнера, также хранили в холодильнике при 4 °С, осуществляли их деглицеринизацию и суспендирование в растворе ЦНИИГПК 8в после разных сроков хранения (опытные пробы 1). Таким образом, эритроциты как контрольной серии № 1 (отмытые сразу), так и опытной № 1 (отсроченно отмытые) исследовали в день размораживания и через 1, 3, 5, 15, 20 дней хранения при 4 °С.

Из табл. 1 следует, что размороженные эритроциты, отмытые от глицерина даже после 10 дней хранения при 4 °С, по большинству показателей (содержание свободного гемоглобина во взвеси, количество осмотически неустойчивых клеток, уровень АТФ) незначительно уступают эритроцитам, деглицеринизированным сразу после оттаивания. Хотя к этому времени общие потери клеток достигают $10,8 \pm 2,93$ %, что вдвое больше, чем сразу после размораживания ($5,5 \pm 0,7$ %), оставшиеся клетки обладают нормальной кислородтранспортной функцией, о чем можно судить по кривой диссоциации гемоглобина (P_{50} составляет в среднем 20,5 мм рт. ст. в день размораживания и 19,8 мм рт. ст. через 10 дней). В то же время к 10-му дню происходит снижение уровня 2,3-ДФГ более чем в 2 раза по сравнению с исходными показателями ($3,0 \pm 0,75$ мкмоль/гНв против $10,4 \pm 1,15$ мкмоль/гНв в первые сутки после размораживания). Кажущееся отсутствие корреляции между P_{50} и 2,3-ДФГ-показателями, характеризующими кислородтранспортную функцию эритроцитов, вероятно, можно объяснить тем, что при определении P_{50} рН доводят до нормы, а при определении 2,3-ДФГ — нет. При этом рН эритроцитарной среды к 10-му дню хранения составляет 6,2 вместо 6,5 в первый день, что, как известно, приводит к обратимому снижению 2,3-ДФГ в эритроцитах.

Следует отметить, что хотя в процессе хранения неотмытых размороженных эритроцитов происходит постепенное нарушение их морфофункциональных свойств, красные клетки крови, деглицеринизированные через 15 дней, по всем показателям соответствуют эритроцитам консервированной крови тех же сроков хранения. В то же время во взвеси эритроцитов, отмытых сразу после размораживания, уже к 5-му дню хранения наступает резкое снижение морфофункциональных показателей сохранности клеток. Содержание свободного гемоглобина увеличивается более чем в 3 раза, уровни АТФ и 2,3-ДФГ снижаются в 2 раза, а концентрация вне-

Результаты отсроченного отмывания размороженных эритроцитов, хранившихся при 4 °С в течение 20 дней

Дни исследования после размораживания	Статистические показатели	Потери клеток на всех этапах криоконсервирования, %					Показатели биологической полноценности эритроцитов в растворе ЦНИИГПК 8в						Модель переливания (в сывор.)	
		После размораживания	После 1-го отмывания	После 2-го отмывания	Взвесь отмываемых эритроцитов в Р-ре ЦНИИГПК 8в	Всего	Свободный гемоглобин, г/л	Осмотически неустойчивые клетки, %	АТФ, мкмоль/г Нв	2,3-ДФГ, мкмоль/г Нв	К, ммоль/л	Р ₅₀ , мм. рт. ст.	Свободный гемоглобин, г/л	Разрушенные клетки, %
0	$M \pm m$ n	3,3 0,21 3	3,7 0,31 8	1,3 0,18 8	0,41 0,015 8	5,5 0,7 8	0,54 0,015 8	3,1 0,47 8	4,6 0,41 9	10,4 1,15 9	1,34 0,12 9	20,5 6	0,33 0,031 9	0,6 0,15 9
1-й	$M \pm m$ n	4,0 0,32 8	4,7 0,31 8	1,4 0,45 8	0,39 0,046 8	6,5 0,64 8	0,57 0,07 8	2,6 0,17 6	—	—	—	—	0,40 0,097 8	0,73 0,16 8
3-й	$M \pm m$ n	5,0 0,40 10	5,3 0,35 10	1,5 0,23 10	0,40 0,04 10	7,2 0,06 10	0,51 0,03 10	3,9 0,74 9	—	—	—	—	0,42 0,05 10	0,74 0,1 10
5-й	$M \pm m$ n	3,1 0,42 9	5,8 1,5 9	1,2 0,26 9	0,64 0,98 9	7,6 0,18 9	0,61 0,061 9	5,5 1,76 9	4,8 0,64 9	8,1 1,19 8	9,1 4	19,6 6	0,64 0,047 8	1,5 0,01 9
10-й	$M \pm m$ n	4,1 1,5 8	6,0 1,45 8	4,2 0,45 8	0,58 0,018 8	10,8 2,9 8	0,68 0,17 8	5,4 1,18 9	4,0 0,48 9	4,5 1,97 9	12,4 4	19,8 4	1,0 0,08 9	2,3 0,28 9
15-й	$M \pm m$ n	4,5 0,92 9	5,6 1,4 9	4,7 1,0 9	1,5 0,55 8	11,7 1,97 9	0,91 0,17 9	7,5 1,85 8	2,6 0,34 7	3,0 0,75 7	13,6 4	19,7 3	0,96 0,08 8	2,1 0,25 8
20-й	$M \pm m$ n	4,4 4	7,1 4	10,4 4	2,4 4	19,9 4	2,75 4	—	—	—	15,7 4	19,2 4	1,24 4	2,8 4

клеточного калия возрастает более чем в 6 раз и достигает 12,4 ммоль/л, то есть уровня, характерного для отсроченно отмываемых эритроцитов 10 дней хранения. К 10-му дню содержание свободного гемоглобина превышает допустимый уровень в 3 раза, а количество осмотически неустойчивых клеток возрастает в 10 раз по сравнению с исходным и достигает 37,7 %. К 15-му дню наступает полный гемолиз эритроцитов, отмываемых сразу после оттаивания (табл. 2).

Проведенные исследования позволяют считать, что предложенный метод отсроченного отмывания эритроцитов обеспечивает увеличение срока годности оттаянных клеток с 1 до 10—15 дней.

Еще более интересные данные получены во 2-й группе опытов при применении отсроченного отмывания эритроцитов, замороженных разработанным нами методом при 38 ± 2 °С со сниженной с 79 до 40 % концентрацией глицерина в криоконсерванте. С этой целью выделенные, как описано выше, из консервированной крови эритроциты соединяли 1 : 1 с криозащитным раствором ЦНИИГПК 11₅-М и переводили в алюминиевый цилиндрический контейнер, который помещали на 1—9 мес в электрохоло-

Таблица 2

Результаты хранения взвеси размороженных и отмытых эритроцитов в растворе ЦНИИГПК 8в при 4° С в течение 10 дней

Дни исследования после размораживания и отмывания	Статистические показатели	Исследуемые показатели					Модель переливания	
		Свободный гемоглобин, г/л	Осмотически неустойчивые клетки, %	АТФ, мкмоль/г Нв	2,3-ДФГ, мкмоль/г Нв	К, ммоль/л	Свободный гемоглобин, г/л	Разрушенные клетки, %
0	$\begin{matrix} M \\ \pm m \\ n \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,54 \\ 0,015 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 3,1 \\ 0,57 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 4,6 \\ 0,41 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 10,4 \\ 1,15 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,38 \\ 0,12 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,33 \\ 0,031 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,62 \\ 0,015 \\ 9 \end{matrix}$
1-й	$\begin{matrix} M \\ \pm m \\ n \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,76 \\ 0,073 \\ 8 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,6 \\ 0,17 \\ 8 \end{matrix}$	—	—	—	$\begin{matrix} 0,49 \\ 0,015 \\ 9 \end{matrix}$	—
3-й	$\begin{matrix} M \\ \pm m \\ n \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,82 \\ 0,09 \\ 11 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 3,4 \\ 0,40 \\ 11 \end{matrix}$	—	—	—	$\begin{matrix} 0,66 \\ 0,072 \\ 11 \end{matrix}$	—
5-й	$\begin{matrix} M \\ \pm m \\ n \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,65 \\ 0,25 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 6,2 \\ 0,72 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 2,3 \\ 0,24 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 5,6 \\ 1,43 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 12,4 \\ 1,25 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,4 \\ 0,12 \\ 6 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,6 \\ 0,12 \\ 6 \end{matrix}$
10-й	$\begin{matrix} M \\ \pm m \\ n \end{matrix}$	$\begin{matrix} 6,53 \\ 0,73 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 37,7 \\ 5,11 \\ 8 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,8 \\ 0,15 \\ 8 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 3,5 \\ 0,17 \\ 8 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 25,7 \\ 4,32 \\ 12 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 5,6 \\ 0,12 \\ 6 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 6,4 \\ 1,72 \\ 8 \end{matrix}$

Таблица 3

Результаты отсроченного отмывания размороженных эритроцитов (криоконсервированных при —38 °С), хранившихся при 4 °С в течение 21 дня

Дни исследования после размораживания	Статистические показатели	Потери клеток на всех этапах криоконсервирования, %					Показатели биологической полноценности эритроцитов в растворе ЦНИИГПК 8в						Модель переливания (в сывор.)	
		После размораживания	После 1-го отмывания	После 2-го отмывания	Взвесь отмытых эритроцитов в р-ре ЦНИИГПК 8в	Всего	Свободный гемоглобин, г/л	Осмотически неустойчивые клетки, %	АТФ, мкмоль/г Нв	2,3-ДФГ, мкмоль/г Нв	К, ммоль/л	P ₅₀ , мм. рт. ст.	Свободный гемоглобин, г/л	Разрушенные клетки, %
0	$\begin{matrix} M \\ \pm m \\ n \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,1 \\ 0,13 \\ 13 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 2,4 \\ 0,23 \\ 13 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,0 \\ 0,15 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,40 \\ 0,029 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 3,6 \\ 0,38 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,69 \\ 0,096 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 3,1 \\ 0,62 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 4,7 \\ 0,29 \\ 8 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 13,2 \\ 0,88 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,75 \\ 0,049 \\ 8 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 19,2 \\ 0,58 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,48 \\ 0,02 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,9 \\ 0,09 \\ 9 \end{matrix}$
7-й	$\begin{matrix} M \\ \pm m \\ n \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,7 \\ 0,31 \\ 11 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 3,2 \\ 0,57 \\ 10 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,7 \\ 0,07 \\ 10 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,29 \\ 0,041 \\ 10 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,38 \\ 0,07 \\ 10 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,50 \\ 0,079 \\ 10 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 2,0 \\ 0,31 \\ 10 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 4,4 \\ 0,34 \\ 8 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 7,4 \\ 0,72 \\ 6 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,69 \\ 0,062 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 19,2 \\ 0,64 \\ 4 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,37 \\ 0,04 \\ 10 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,55 \\ 0,03 \\ 10 \end{matrix}$
14-й	$\begin{matrix} M \\ \pm m \\ n \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,6 \\ 0,23 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 4,3 \\ 0,53 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,1 \\ 0,21 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,20 \\ 0,050 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 5,6 \\ 0,51 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,31 \\ 0,064 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 2,2 \\ 0,29 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 3,3 \\ 0,22 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 5,6 \\ 0,67 \\ 8 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,50 \\ 0,029 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 18,6 \\ 0,49 \\ 4 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,26 \\ 0,02 \\ 9 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,47 \\ 0,06 \\ 9 \end{matrix}$
21-й	$\begin{matrix} M \\ \pm m \\ n \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,5 \\ 0,26 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 6,9 \\ 1,07 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 1,4 \\ 0,29 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,22 \\ 0,037 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 7,6 \\ 1,32 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,037 \\ 0,048 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 2,9 \\ 0,55 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 3,4 \\ 0,21 \\ 8 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 4,5 \\ 0,58 \\ 4 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,64 \\ 0,033 \\ 4 \end{matrix}$	—	$\begin{matrix} 0,34 \\ 0,03 \\ 7 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 0,51 \\ 0,06 \\ 7 \end{matrix}$

дильник, обеспечивающий температуру $-38 \pm 2^\circ\text{C}$. После размораживания исследования проводили аналогично вышеописанным для эритроцитов, криоконсервированных в жидком азоте. Полученные во 2-й опытной серии данные свидетельствуют о морфофункциональной полноценности и пригодности для переливания криоконсервированных эритроцитов, отмытых даже через 21 день после размораживания и хранения в холодильнике при 4°C (табл. 3).

Так, хотя на протяжении указанного срока закономерно наблюдается постепенное нарастание общих потерь клеток, достигающее к 21-му дню 7,6 %, оставшиеся эритроциты в целом не уступают клеткам, отмытым непосредственно после оттаивания. Уровень свободного гемоглобина (0,37 г/л) и количество разрушенных клеток (0,22 %) в подготовленной к переливанию взвеси практически не увеличился по сравнению с исходным. Количество осмотически неустойчивых клеток к 21-му дню возрастает очень незначительно: 2,9 против 2,5 %. Такой важнейший показатель жизнеспособности эритроцитов, как АТФ, находится в пределах нормы — 3,4 мкмоль/гНв (70 % исходного). P_{50} также практически не снижается (19,2 и 19,9 мм рт. ст.), что свидетельствует о хорошей сохранности кислородтранспортной функции эритроцитов, деглицеринизированных на 21-й день после оттаивания.

Таким образом, эритроциты, замороженные при умеренно низкой температуре разработанным в ЛенНИИГПК методом, в результате применения предлагаемой методики отсроченной деглицеринизации пригодны для переливания даже через 3 недели после оттаивания.

Несомненно значительное увеличение сроков хранения оттаянных эритроцитов, криоконсервированных при ультра- и умеренно низких температурах, благодаря использованию метода отсроченной деглицеринизации значительно расширяет возможность применения криоконсервированных красных клеток крови в лечебных учреждениях, не требуя никаких дополнительных технологических приемов.

Особенно эффективным разработанный метод представляется применительно к эритроцитам, замороженным в условиях умеренно низких температур. По всем показателям морфофункциональных свойств они превосходят отсроченно отмытые эритроциты, замороженные в жидком азоте общепринятым методом (30 % глицерина) и отмытые от глицерина в значительно более ранние сроки после оттаивания. Указанное, а также данные различных авторов о меньшем повреждении клеток при замораживании в условиях умеренно низких температур свидетельствуют о перспективности разработанного метода замораживания эритроцитов в этих условиях для создания банков криоконсервированных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусева Н. Р., Луговой В. И. Влияние состава ресуспендирующего раствора на сохранность структурно-функциональных свойств размороженных эритроцитов в деконсервационном периоде // Механизмы криповреждения и криозащиты биологических объектов: 11 Всес. конф. (Харьков, октябрь, 1984 г.). — Харьков: Б. и. — 1984. Вып. 2. — С. 166.
2. Гусева Н. Р., Луговой В. И. Влияние добавок метаболитов и мембранотропных веществ в растворы для ресуспендирования размороженных и отмытых эритроцитов // Пробл. гематологии и переливания крови. — 1982. — № 4. — С. 10—14.
3. Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И., Семенова Н. В. Эффективные растворы для взвешивания размороженных эритроцитов // Пробл. гематологии и переливания крови. — 1978. — 23, № 8. — С. 16—21.
4. Винарчик М. И. Изучение некоторых морфологических показателей размороженных отмытых эритроцитов, взвешенных в лактатно-сахарозо-фосфатном растворе в процессе их хранения при положительной температуре (227 К) // Сб. научн. тр. Харьковск. мед. ин-та. — 1981. — N 5. — С. 146—147.
5. Basile A. E. A comparative study of glyceronised and lyophilized porcine skin indresings for third — degree burns // Plast. Recons. Surg. — 1982. — 69, N 6. — P. 969—74.

6. Clegg J. S., Seitz P., Seitz W., Hazlewood C. F. Cellular responses to extreme water loss. The water loss-replacement hypothesis// Cryobiology.—1982.—19, N3.—P. 306—316.

Ленинградский НИИ гематологии
и переливания крови

Поступила 06.01.88

V. N. MELNIKOVA, G. G. PLATONOVA, T. V. ZAMALETDINOVA

THE PROLONGATION OF STORAGE OF THAWED ERYTHROCYTES AT 4 °C AFTER FREEZING BY VARIOUS METHODS

Research Institute for Haematology and Blood Transfusion of Leningrad

A method has been suggested for delayed washing of erythrocytes which permits to prolong the storage period at 4 °C to 10 days after freezing in liquid nitrogen and to 21 days for cells cooled at a moderately low temperature of -38 ± 2 °C.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 616.89 — 008.441.13 — 085.832.9

**И. К. Сосин, Г. А. Бабийчук, Я. Л. Гуревич, М. К. Филатов,
Т. Б. Згонникова**

КЛИНИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ

Излагаются теоретические предпосылки использования краниocereбральной гипотермии (КЦГ) в наркологической практике. Описываются разработанная методика управляемой поверхностной краниocereбральной гипотермии, клинические проявления купирования алкогольного абстинентного синдрома (ААС) и острой алкогольной интоксикации (ОАИ). Выделяются три этапа — подготовительный, собственно краниocereбральной гипотермии и постгипотермический. Приводятся данные об эффективности купирования ААС у 237 больных алкоголизмом II и III стадий. Показаны влияние КЦГ на интенсивность патологического влечения к алкоголю, важность использования метода для формирования аверсии к алкоголю, динамика насыщения крови кислородом при проведении КЦГ и особенности криокинетики алкоголя при купировании ОАИ у 72 больных алкоголизмом.

Разработка эффективных методов терапии алкоголизма, включающих купирование таких urgentных состояний, как алкогольный абстинентный синдром (ААС) и острое алкогольное опьянение (ОАО), является актуальной задачей наркологии. В их патогенезе имеют значение выраженные метаболические и гемодинамические нарушения [7, 9, 14, 25]. Традиционно применяемые для лечения этих состояний медикаментозные средства [1, 2, 20, 22] не всегда оказываются достаточно эффективными. Кроме того, они могут вызвать практически непрогнозируемые лекарственные осложнения. Это является предпосылкой для поиска новых немедикаментозных способов лечения, которые уже находят применение в наркологической практике [6, 17, 18, 24].

Анализ работ [5, 12] показал, что в патогенезе ААС и ОАО гемодинамические, метаболические и нейромедиаторные нарушения сопряжены с гипоксией. Имеются также данные, что патогенетически обоснованным средством для борьбы с гипоксией является краниocereбральная гипотермия [11, 23], которая нашла применение при лечении белой горячки при нарастающем отеке-набухании мозга [21]. Однако применяемые в медицине режимы умеренной и глубокой гипотермии, требующие проведения нейровегетативной блокады и наркоза, оказались неприменимыми для купирования ААС и ОАО. Это побудило нас разработать более адекватные, щадящие режимы краниocereбральной гипотермии (КЦГ) для лечения алкогольного абстинентного синдрома и острой алкогольной интоксикации. Неглубокая гипотермия, осуществляемая в диапазоне адаптационных возможностей организма, вызывает интенсификацию метаболического тер-

могенеза и приводит к ускорению метаболизма этанола и продуктов его распада [4, 8, 14]. Нами было также учтено, что экстракраниальное гипотермическое воздействие, приводящее к увеличению градиента температур между кортикальными и субкортикальными церебральными структурами, способствует усилению в них метаболических процессов [3, 13, 15]. Разработанная методика [19], обозначенная как управляемая поверхностная краниocereбральная гипотермия, оказалась адекватной поставленным задачам и позволила исключить применение нейровегетативной блокады.

КЦГ осуществлялась в три этапа: подготовительный, собственно краниocereбральной криотерапии и постгипотермический. Подготовительный этап включает тщательное клиническое обследование больного, оценку тяжести его сомато-неврологического и психопатологического статуса. С учетом психического состояния больного проводятся психотерапевтическое опосредование и потенцирование предстоящей процедуры.

На этапе собственно краниocereбральной гипотермии больного укладывают на функциональную кровать, а на волосистую часть головы одевают шлем гипотермогенератора-флюидокраниотерма. Термоадаптацию организма на действие холода осуществляли заданным режимом работы гипотермогенератора, обеспечивающим постепенное и дискретное понижение температуры хладагента. С этой целью исходную температуру хладагента от 35—30 °С каждые 10 мин дискретно понижали на 5 °С. В случае неполной адаптации терморецепторов к действию холода экспозицию заданной температуры хладагента пролонгировали еще на 10 мин. Длительность процедуры составляла 60—90 мин. Критерием ее окончания служило возникновение генерализованных защитных реакций на действие холода, проявляющихся в папилломоторной реакции, ощущениях озноба, давления в висках, охлаждения всего тела, холодовой дрожи, болезненности в области волосистой части головы.

Постгипотермический этап КЦГ наступал после прекращения экстракраниального воздействия хладагента. Этот период не требовал специальных мероприятий по выведению из гипотермического состояния, т. е. общего согревания, так как осуществлялся спонтанно.

Для купирования ОАО применялись несколько иные режимы гипотермического воздействия. Учитывая, что большинство больных алкоголизмом, находящихся в состоянии алкогольного опьянения, на 10—15-й мин процедуры засыпали, дискретное понижение температуры хладагента осуществлялось в более быстром режиме.

Купирование ААС описанным методом проведено у 237 больных алкоголизмом II-й и III-й стадий, поступивших на стационарное лечение в наркологическое отделение при промышленном предприятии. Вне зависимости от возраста и длительности заболевания у всех больных ААС определялся характерный комплекс соматовегетативных, неврологических и психических нарушений [16]. Основными клиническими проявлениями ААС были различной степени выраженности — влечение к алкоголю, тремор, головная боль, общая слабость, одышка, сердцебиение, боли в области сердца, отсутствие аппетита, тошнота, рвота, боли в эпигастральной области и в правом подреберье, бессонница, низкий фон настроения, раздражительность, элементарные галлюцинации. Имели место повышение артериального давления, тахикардия. Мониторинг обратного развития всех проявлений алкогольной абстиненции проводился от их максимальной выраженности до полного купирования по разработанной нами специальной шкале (в баллах). Были проведены также исследования термотопографии с измерением височной, аксиллярной и парамембранальной температур (в наружном слуховом проходе, вблизи барабанной перепонки), а также оксигемометрия. По изменениям парамембранальной и височной температур можно было косвенно судить о глубине гипотермического воздействия и его динамике, а по показаниям оксигемометрии — об интенсивности метаболических процессов в организме больных.

Особенностями редукции ААС при использовании поверхностной управляемой КЦГ явились относительная быстрота и своеобразная последовательность исчезновения всех компонентов абстинентного синдрома.

Положительная динамика в сомато-вегетативном, неврологическом и психическом состоянии у больных основной группы начинала проявляться уже во время сеанса КЦГ (экспозиционный эффект). На 10—20-й мин процедуры у 83 % больных исчезли гиперемия кожных покровов, инъекрованность склер, пастозность лица, гипергидроз. Обнаружена статистически достоверная связь динамики изменения височной и парамембранальной температур со снижением артериального давления, нормализацией пульса, частоты дыхательных движений. Из исследованных неврологических расстройств в процессе проведения гипотермического воздействия более выражено редуцировались нистагм, гиперрефлексия, нарушение координации, в то время как тремор и повышенный мышечный тонус оказались более резистентными. У 78 % больных уже во время процедуры полностью купировались такие проявления ААС как тошнота, позывы на рвоту, неприятные ощущения в области эпигастрия, анорексия. Со стороны психической сферы результатом гипотермии явилось исчезновение беспокойства, раздражительности, эмоциональной неустойчивости и напряженности, подозрительности, дисфорий, обманов восприятия.

Обнаружено также влияние КЦГ на динамику интенсивности влечения к алкоголю, которая объективно оценивалась нами реакцией на кратковременное предъявление паров этанола в качестве раздражителя обонятельного анализатора. До проведения процедуры 78 больных испытывали умеренное, 6 — выраженное и 12 — компульсивное влечение к алкоголю, в то время как лишь у 3 было отмечено появление тошноты при вдыхании этанола. После процедуры влечение к алкоголю сохранилось лишь у 19 больных, при этом у 34 были выражены различные аверсионные реакции: у 22 — тошнота, у 8 — позывы на рвоту и у 4 — рвотная реакция. Влияние КЦГ на динамику интенсивности влечения к этанолу приведено в таблице.

Влияние управляемой поверхностной краниocereбральной гипотермии на динамику влечения к этанолу

До КЦГ, после КЦГ	Влечение				Выраженность аверсии					Всего
	умеренное	выраженное	Компульсивное	отсутствие	реакция отвращения	тошнота	позывы на рвоту	рвота	обонятельные иллюзии	
До КГЦ абс. %	78 32,9± ±0,5	67 28,3± ±0,3	12 5,1± ±0,6	41 17,3± ±0,6	22 9,3± ±0,6	3 1,3± ±0,6	0 0±0,7	0 0±0,7	14 5,9± ±0,6	237 100± ±0,1
После КГЦ абс. %	13 5,5± ±0,6	5 2,1± ±0,6	1 0,4± ±0,7	40 16,4± ±0,6	127 53,6± ±0,4	22 9,3± ±0,6	8 3,4± ±0,6	4 1,7± ±0,7	17 7,2± ±0,6	237 100± ±0,1
<i>P</i>	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	

Обнаружено также, что у некоторых больных в состоянии ААС исчезала обонятельная идентификация этанола (у 41 до КЦГ и у 40 после процедуры). У некоторых же обнаружен феномен извращенного восприятия этанола (у 14 до КЦГ и у 17 после процедуры). Больные в этих случаях воспринимали этанол либо как особенно неприятное для них вещество (гниль, трупный запах, нашатырь и т. д.), либо как приятное (например, запах духов, цветов, свежих фруктов и т. п.). В первом случае можно с большей вероятностью предположить, что вызванные этанолом иллюзии есть проявление аверсионной реакции, во втором — влечение к алкоголю.

Пролонгированный эффект краниocereбрального охлаждения заключался в нормализации аппетита, сна, полной редукции тремора, тревоги, напряженности, исчезновении компульсивного влечения к алкоголю, полном купировании психопатологических компонентов ААС, стабилизации неврологических и соматических показателей. Для купирования всех компонентов ААС достаточно было однократного проведения КЦГ, причем полная редукция абстинентной симптоматики происходила, как правило, уже на первые — вторые сутки после процедуры гипотермии. Рецидивов ААС и трансформации его в алкогольный делирий ни у одного из пролеченных КЦГ больных не наблюдалось.

В контрольной группе больных (50 чел.) с аналогичной клинической картиной заболевания, которым проводились традиционные медикаментозные методы лечения, отмечался более длительный промежуток вегетативной дисфункции и астении. Для полной редукции ААС у них при медикаментозной терапии требовалось назначение больших доз детоксикационных, дегидратационных, общеукрепляющих, снотворных и других психотропных средств. Длительность редукции абстинентных расстройств составила при этом в среднем 144 ч, причем в 2 случаях произошла трансформация абстинентной симптоматики в алкогольный психоз, а астения после купирования проявлений абстиненции носила протрагированный характер. К трудовым процессам реабилитационного назначения пациенты могли приступить лишь начиная с 12—14-го дня после поступления в наркологическую больницу. Разность между длительностью купирования ААС методом КЦГ и традиционными медикаментозными методами таким образом составила в среднем 96 ч в пользу КЦГ.

Исследования гемодинамики при купировании ААС управляемой поверхностной краниocereбральной гипотермией, которые производились путем измерения артериального давления, пульса, изучения показателей реоэнцефалограммы и микроциркуляции в области бульбарной конъюнктивы, т. е. общих и церебральных гемодинамических показателей, подтвердили, что краниocereбральная гипотермия в указанных режимах способствует устранению явлений гипоксии. Исследование динамики насыщения кислородом циркулирующей крови обнаружило определенную закономерность и было сопряжено с динамикой регионарных температурных реакций. Это позволило нам выделить четыре фазы лечебного воздействия КЦГ:

1. Начальная фаза — характеризуется подъемом височной и парамембранальной температуры по типу феномена отдачи и понижением уровня насыщения кислородом циркулирующей крови. Длительность этой фазы от начала процедуры составила в среднем 15 мин.

2. Фаза собственно гипотермии, в которой, во-первых, температура височной и парамембранальной областей понижалась и, во-вторых, скорость снижения насыщения кислородом циркулирующей крови в этой фазе замедлялась, наблюдалась тенденция к стабилизации. Завершение данной фазы наступало в среднем на 50-й мин гипотермии.

3. Фаза первых признаков генерализованной реакции на экстракраниальное охлаждение церебральных структур характеризовалась появлением признаков защитной реакции на действие холодового агента (чувство прохлады во всем теле, неприятные ощущения в охлаждаемой области, давление в висках, начальные явления озноба, папилломоторная реакция, повышение мышечного тонуса с трансформацией в холодовую дрожь) и сопровождалась возникновением колебаний височной и продолжением снижения парамембранальной температур. В этой фазе было отмечено дальнейшее понижение уровня насыщения кислородом циркулирующей крови. Длительность этой фазы около 25 мин.

4. Фаза спонтанного выхода из гипотермии, которая продолжалась 14—20 мин и при которой уровень кислородного насыщения крови повышался.

Можно предположить, что в связи с усилением окислительных процессов и повышением активности нейронов под влиянием начальных режимов гипотермического воздействия, резко возрастает потребление тканями кислорода за счет интенсификации его поглощения из притекающей крови. Этим и объясняется кратковременное снижение уровня насыщения кислородом крови в первой фазе. Возможность такого механизма согласуется с литературными данными [10]. Нами была обнаружена положительная коррелятивная зависимость между понижением в процессе КЦГ насыщения циркулирующей крови кислородом и положительной динамикой психического и соматического состояния больных, причем это имело отношение как к выраженности экспозиционного эффекта, так и к изменению сроков пролонгированного эффекта.

Исследована эффективность КЦГ при лечении 72 больных алкоголизмом, находящихся в состоянии острого алкогольного опьянения, путем клинического исследования и объективизацией путем определения концентрации этанола в крови и моче (до и после процедуры). В процессе гипотермического воздействия у больных наблюдалось ускоренное выведение этанола из организма, особенно у лиц с высокой «фоновой» концентрацией алкоголя в крови, что проявлялось в значительном увеличении (до 0,7—0,9 промилле в час) коэффициента Видмарка. Как известно, скорость естественной элиминации этанола в крови составляет в среднем 0,16 промилле, а при медикаментозном вытрезвлении — 0,27 промилле в час [22]. Во всех случаях экстракраниальной лечебной гипотермии была выявлена прямая корреляция между клиническим улучшением состояния больных и элиминацией алкоголя. Клинический эффект, получаемый от применения КЦГ оценивается как «экспресс-вытрезвление», так как к концу процедуры симптоматика опьянения подвергалась значительной редукции. Улучшались показатели координационных проб, пульса, артериального давления, частоты дыхательных движений. Имела место выраженная тенденция к нормализации некоторых психических функций, в частности, ориентировочно-поисковые реакции и объем внимания (по данным таблиц Шульте) улучшались непосредственно после процедуры на 32 %. Нистагмические подергивания глазных яблок (проба Ташена) уменьшились в среднем на 40 %. Происходила нормализация показателей гемодинамики.

При проведении поверхностной КЦГ больным в состоянии алкогольного опьянения, когда исходная аксиллярная температура понижена до 34—36 °С, ответная реакция организма на охлаждение проявлялась тенденцией к нормализации, т. е. к повышению аксиллярной температуры, и некоторым снижением височной и парамембранальной температур. Наблюдающиеся при этом увеличение височно-парамембранального градиента, по нашему мнению, играет немаловажную роль в механизме усиления выведения этанола и ускорения купирования острой алкогольной интоксикации.

Таким образом, предложенный нами метод управляемой поверхностной краниocereбральной гипотермии можно рассматривать как новый и достаточно эффективный для лечения таких urgentных состояний, как алкогольный абстинентный синдром, острое алкогольное опьянение, острое патологическое влечение к алкоголю. Механизмами лечебного эффекта данного метода являются нормализация общей и церебральной гемодинамики, увеличение температурного градиента между поверхностными и глубокими структурами головного мозга и устранение гипоксии нервной ткани. Несомненную положительную роль играет также модулирующее влияние КЦГ на кругооборот нейромедиаторов, что согласуется с имеющимися экспериментальными данными [3]. Высокая терапевтическая и экономическая эффективность, практическое отсутствие противопоказаний и осложнений дает возможность рекомендовать широкое применение поверхностных режимов экстракраниальной гипотермии в наркологической практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авруцкий Г. Я., Гурович Г. Я., Громова В. В. Фармакотерапия психических заболеваний М.: Медицина, — 1974. — С. 448.
2. Авруцкий Г. Я., Недува А. А. Лечение психически больных. М.: Медицина. — 1988. — 528с.
3. Бабийчук Г. А., Марченко В. С., Шифман М. И. Роль норадренергической системы в сверхмедленных процессах головного мозга при краниocereбральной гипотермии // Криобиология. — 1985. — № 2. — с. 43—47.
4. Бернштейн В. А. Гипоксия и мозг // Успехи физиол. науки. — 1971. — 2. — С. 42—67.
5. Бокий И. В., Лапин И. П. Алкогольный абстинентный синдром. — Л.: Медицина, Ленингр. отд., 1976. — 119 с.
6. Ефун С. Н., Шпектор В. А. Гипоксические состояния и их классификация // Анестезиология и реаниматология. — 1981, № 2. — 6. 2—12.
7. Жислин С. Г. Очерки клинической психиатрии. М.: Медицина, 1965. — 320 с.
8. Иванов К. П. Об основных принципах регуляции температурного гомеостаза // Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова. — 1979. — 56, № 11. — С. 1553—1561.
9. Качаев А. К. О зависимости возникновения рецидивов и трансформаций алкогольных психозов от тяжести хронического алкоголизма // Практика судебно-психиатрической экспертизы. — М.: ВНИИ судебной психиатрии им. В. П. Сербского, 1970. — Вып. 16. — С. 65—70.
10. Кондрашенко В. Т. Нарушение соматических функций при алкогольной интоксикации. — Л.: Медицина, — 1877. — 176 с.
11. Королев Б. А., Охотин И. К., Шварц Т. Ф. и др. Поверхностная гипотермия в кардиохирургии // Вопросы клинической реанимации и гипотермии: Тр. Всесоюз. симпозиума по реанимации и гипотермии. — Горький: Б. и., 1966. — С. 205—212.
12. Лакуста В. Н., Гроссу Г. С. Иглорефлексотерапия алкогольного абстинентного синдрома. — Кишинев: Картя Молдавеныске, 1982. — 107 с.
13. Майстрах Е. В. Патологическая физиология охлаждения человека. — Л.: Медицина, 1975. — 216 с.
14. Морозов Г. В., Рожнов В. Е., Бабаян Э. А. Алкоголизм. Руководство для врачей. М.: Медицина, 1983. — 432с.
15. Мурский Л. И. Краниocereбральная гипотермия (в эксперименте). — М.: Медицина, 1975. — 247 с.
16. Портнов А. А., Пятницкая И. Н. Клиника алкоголизма. — Л.: Медицина, 1973. — 368 с.
17. Сосин И. К., Мысько Г. Н. Акупунктурная коррекция аффективных нарушений при алкоголизме // Немедикаментозные методы лечения в клинической медицине. — Харьков: Б. и. — 1982. — с. 118—119.
18. Сосин И. К., Мысько Г. Н., Гуревич Я. Л. Немедикаментозные методы лечения алкоголизма. — Киев: Здоров'я, — 1986. — 152 с.
19. Сосин И. К., Гуревич Я. Л., Мысько Г. Н. Наркологическая служба на промышленном предприятии. — Киев: Здоров'я, 1989. — 224 с.
20. Стрельчук И. В. Особенности клиники и лечения тяжелых форм алкогольного делирия // Алкоголизм и некоторые другие интоксикационные заболевания нервной системы и психической сферы: Матер. пленума Всесоюз. общества невропатол. и психиатров (3—5 октября 1972 г.) — Ташкент: Медицина, 1972. — С. 15—17.
21. Таранская А. Я., Первомайский Э. Б., Бачериков А. Н. Лечение белой горячки методом краниocereбральной гипотермии. Информационное письмо МЗ УССР, Киев, 1981.
22. Ускоренное вытрезвление лиц, находящихся в состоянии алкогольного опьянения в медицинских вытрезвителях (Инструктивно-методические рекомендации) / Сост. Стрельчук И. В. и др. М.: Б. и. 1975. — 21 с.
23. Чепкий А. П., Трещинский А. И. Лечебная гипотермия. — Киев: Здоров'я, 1969. — 203 с.
24. Чуркин Е. А., Гегенава Н. О. Гемосорбция в наркологической практике // Сов. медицина. — 1984, № 12. — с. 67—71.
25. Энтин Г. М. Лечение алкоголизма и организация наркологической помощи. — Медицина, — 1990. — 411с.

Украинский ин-т усовершенствования
врачей, г. Харьков

Поступила 20.01.89

U. K. SOSIN, G. A. BABIYCHUK, Ya. L. GUREVICH, M. K. FILATOV,
T. B. ZGONNIKOVA

CLINICAL EFFICIENCY OF CRANIOCEREBRAL HYPOTHERMIA USED FOR TREATMENT OF ALCOHOLISM

Ukrainian Institute for Doctor's Advancement, Kharkov

Theoretical approaches to craniocerebral hypothermia (CCH) used in the narcologic practice are presented. A method of directed surface craniocerebral hypothermia is described. Clinical signs of the removal of alcohol abstinence syndrome (AAS) and acute

alcohol intoxication (AAI) are described. Three stages, namely preparative, craniocerebral hypothermia per se and posthypothermic stages have been outlined. The data on the efficiency of removal of AAS in 237 patients with alcoholism of I and III stages are presented. The effect of CCH on the intensity of pathological alcohol addiction is shown as well as the importance of using the method to form aversion to alcohol. The dynamics of blood saturation with alcohol during removal of AAS has been demonstrated in 72 patients.

УДК 615.832.97/98; 616.61/63 — 002.5

Ю. И. Козин, Т. Н. Юрченко, В. Ф. Козлова, Л. Ю. Дмитриева

ДИНАМИКА АБАЦИЛЛИРОВАНИЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ САНАЦИИ КАВЕРНОЗНЫХ ФОРМ НЕФРОТУБЕРКУЛЕЗА МЕТОДАМИ КРИОТЕРМОВОЗДЕЙСТВИЯ

Экспериментально лабораторно-бактериологически на 789 суспензиях микробактерий туберкулеза (МБТ) и субоперационно на 120 беспородных собаках доказана возможность использования методов криоорошения и криотермоаппликации для лечения кавернозных форм нефротуберкулеза. При апробации на 78 животных методов криоорошения и на 42 — криотермоаппликации разработаны новые способы криотермоабацилляции, эффективность которых подтверждается гистологическими и гистохимическими исследованиями, проведенными в динамике четырехмесячного наблюдения за животными. Морфологические и бактериологические исследования почечной ткани на 319 почках собак позволили обосновать необходимость внедрения новых атравматичных способов хирургического лечения кавернозных форм туберкулеза почек в клиническую практику.

Высокая заболеваемость туберкулезом не только в экономически отсталых, но и в высокоразвитых странах (США, Канада, ФРГ и др.), указывает на необходимость дальнейшего поиска путей адекватного санирования этой категории больных [6], так как среди впервые выявленных больных в 47—82,3 % обнаруживаются кавернозные формы поражения почек [1].

Современная химиотерапия и органосохраняющие хирургические вмешательства при распространенных деструктивных формах туберкулеза почек малоэффективны. Операцией выбора у данной категории больных становится кавернотомия как наиболее щадящий вид операции, но нередко не устраняющий причины заболевания — жизнеспособных популяций микобактерий туберкулеза (МБТ) и не предотвращающий рецидива [3,5].

Поиск новых методов атравматичной и эффективной антимикробной санации кавернозных образований проводился при местном применении сверхнизких температур методами криоорошения и криоаппликации в связи с тем, что ранее нами показана возможность гарантированного разрушения МБТ при холодом воздействии [2].

Экспериментальная модель кавернозного нефротуберкулеза создана на одной из почек у 141 беспородной собаки по разработанному оригинальному способу путем внутривнепочечного введения культуры МБТ H37RV в дозе 50 млн. микробных тел в 0,5 мл лошадиной сыворотки в предварительно ишемизированную зону почки [8], в результате чего на второй неделе с момента заражения в почках развивалась картина очагового и очагово-деструктивного туберкулеза, а к концу пятой недели патоморфологические изменения свидетельствовали о развитии кавернозного процесса [8].

В эксперименте проведено внутрикавернозное криоорошение на 78 беспородных собаках и криотермоаппликация — на 42 животных. Оперативное вмешательство выполнялось на взрослых собаках обоего пола массой 10—30 кг после премедикации (внутримышечно фентанил 0,25 мг/кг с дроперидолом 5 мг/кг) под общим внутривнеплевральным или внутривнегоч-

ным гексеналовым (40 мг/кг) или тиопенталовым (30—40 мг/кг) наркозом. Доступ к одной из почек осуществлялся боковым межмышечным разрезом. После пункции объемно-инфекционного образования и частичной эвакуации гнойно-некротических масс в зоне наибольшего истончения почечной паренхимы производилась микрокавернотомия (длиной до 8—10 мм), позволявшая вводить в ее полость активные наконечники криотермозондов для воздействия путем криоорошения или криоаппликации.

В первой серии экспериментальных исследований внутрикавернозное орошение остатков некротических масс и стенок остаточных полостей парожидкостными струями хладагентов (азотом, закисью азота и фреоном-12) с естественным отогревом и сохраненным кровотоком выполнено у 56 животных и криоорошение азотом с последующим принудительным отогревом путем обдува струей горячего воздуха ($44 \pm 1^\circ\text{C}$) еще у 22 животных [9]. Контроль за эффективностью воздействия осуществлялся по данным многоточечной термометрии и термографии, повторного бактериологического исследования мочи и гомогенатов почечной ткани из очагов воздействия с последующим сопоставлением с результатами морфологических исследований. Криоорошение парожидкостными струями азота одно- и двукратно с экспозициями 60 с (16 случаев) и 120 с (8 случаев) с помощью аппарата КАС-01-V.4.2 [4] давало неравномерную по глубине зону криодеструкции и приводило к абациллированию очагов лишь в 41,7 % случаев.

Эффективность воздействия существенно повысилась за счет равномерности холодового воздействия на пиогенную и фиброзную капсулы кавернозных образований, что способствовало их абациллированию и быстрой регенерации почечной ткани без грубых рубцов при сочетании двухмесячного курса туберкулинотерапии (0,3 ТЕ/кг подкожно раз в 3 дня), используемой в качестве иммунокорректирующей и десенсибилизирующей, с предваряющим криовоздействие орошением стенок остаточной полости 10 %-ным раствором натрия хлорида [10]. При орошении по данной методике стенок каверн парожидкостными струями фреона-12 или закиси азота абациллирование достигалось в 54,2 % случаев, а при орошении азотом — в 72,2 %. Это объясняется большей хладопроизводительностью азота и созданием в 5 мм зоне прилегающей почечной ткани температуры до $-46,6^\circ\text{C}$.

Профилактика инфицирования МБТ ран при вскрытии и опорожнении каверн, а также необходимость обеспечения стабильных скоростей, стойких предельных температур и экспозиций замораживания и нагрева патологических тканей в заданном объеме привели к разработке во второй серии исследований аппликационных методов криотермодеструкции. Внутрикавернозное воздействие на инфицированные некротические массы в 13 случаях проводилось до их эвакуации с последующим обеззараживанием стенок с помощью криозонда-насадки к работающему на азоте аппарату КАС-01-V.4.2 и последующей диатермокоагуляцией криоканюлей-электродом, подключенной к аппарату ЭН-57. Необходимые температурные и временные параметры замораживания и нагрева получены при использовании разработанного ФТИНТ АН УССР аппарата для локальной криодеструкции урологического (АЛКУ-01). Термоциклирование в автоматическом режиме с этапным замораживанием гнойно-некротических масс, а после их эвакуации и стенок кавернозного образования до температуры $(-85 \pm 3)^\circ\text{C}$ с экспозицией (3 ± 2) мин и последующим нагревом до температуры $(60 \pm 5)^\circ\text{C}$ с экспозицией (3 ± 2) мин позволило в 93,1 % случаев получить гарантированное абациллирование. Единичные случаи роста МБТ из тканевого гомогената после криотермовоздействия объясняются трудностью достаточного контакта активного наконечника криотермозонда с инфицированной тканью во всех зонах объемного образования. В то же время во всех случаях рост МБТ был скуден (до 50 колоний) и появлялся в более отдаленные сроки (через 6—9 недель) [2].

Гистологические и гистохимические изменения, происходившие в очагах криодеструкции кавернозных образований почек и окружающей почечной ткани, изучены на 319 почках собак в основном после их умерщвления (введением смертельных доз тиопентала натрия и миорелаксантов) в разные фазы морфологических изменений. На этапе оттаивания (до 15—20 мин после криовоздействия) исследована почечная ткань 7 животных, в фазе гиперемии или кровенаполнения (до 45—60 мин) — 4 животных, фазе крионекроза или экссудации (3—24 ч) — 14, фазе пролиферации или резорбционно-репаративной (2—10 сут) — 35 и фазе регенерации и реорганизации (14—120 сут.) — 60 животных. В двух последних наиболее длительных по срокам фазах гистологически почечная ткань исследовалась на 2—4-е сут у 16 животных, на 6—8-е сут у 19, 14—16-е сут у 4, 23—27-е у 12, 35—36-е у 13, 49—52-е у 8, 62—65-е у 12, 96—98-е у 7, на 120-е сут после криотермодеструкции — у 4 животных.

Материал фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина и готовили целлоидин-парафиновые срезы почек, захватывающие не только область криодеструкции (крионекроза) и сублетальных повреждений, но и зоны минимальных повреждений тканей — глубокой и умеренной гипотермии. Параллельно исследовались паренхима контрлатеральной почки в идентичных сегментах. Срезы почечной ткани толщиной 7—9 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином, а также реактивом Шиффа и альциановым синим по Моури для выявления содержания в структурах гликопротеинов и гликозаминогликанов.

Комплексными экспериментальными исследованиями на 120 животных (собаках) методом криотермовоздействия с бактериологическим и многоточечным термометрическим контролем установлены параметры наиболее щадящего для окружающей паренхимы и эффективного в инфекционном очаге криотермоабациллирования почечных тканевых структур, инфицированных микобактериями туберкулеза. Независимо от способа воздействия (криоорошение или криоаппликация) оптимальными пределами воздействия являются: скорость охлаждения (250 ± 50) °C/мин при температуре (-80 ± 10) °C и экспозиции воздействия (3 ± 2) мин с последующим отогревом со скоростью (40 ± 10) °C/мин при температуре нагрева ($+50 \pm 10$) °C и экспозиции воздействия (3 ± 2) мин. При соблюдении установленных предельных параметров воздействия достаточная для гарантированного абациллирования температура (-80 ± 10) °C достигалась лишь в зоне непосредственного контакта хладагента с пиогенной капсулой — зоне абсолютной криодеструкции (I-я зона). Зона частичной криодеструкции и гемодинамических нарушений (II-я зона) с тканевой температурой до ($-20 \div 25$ °C) захватывает прилегающую ткань, располагающуюся на расстоянии 5—10 мм от орошаемой поверхности. На расстоянии 10—20 мм от патологического очага температура почечной ткани была в пределах 5—7 °C. Для этой III-й зоны медленного охлаждения или глубокой гипотермии характерна активная регенерация паренхимы почек. Начиная с 20—30 мм зоны умеренной гипотермии (IV-я зона), где охлаждение ткани не ниже 10—12 °C, и дальше от патологического очага гистологически и гистохимически структура почечной ткани существенно не менялась. Во всех трех разработанных нами оригинальных способах хирургического лечения кавернозных форм нефротуберкулеза [9,10] характер изменений, наблюдаемых в динамике дистрофических процессов в тканях почечной паренхимы и их ликвидации был однотипен и характеризовался следующими показателями.

На этапе оттаивания в I-й зоне выявлено, что границы петель почечных клубочков и эпителия канальцев размыты, а их цитоплазма резко вакуолизирована, в узкой полоске прилежащей II-й зоны артериолы и венулы максимально расширены со свежими полосами кровоизлияний вдоль сосудов, в более отдаленных участках III-й и IV-й зон определялось

расширение и переполнение кровью микроциркуляторного русла с сохранением морфофункционального состояния паренхимы и стромы органа.

В фазе гиперемии или кровенаполнения в первой зоне нарастали дезорганизация, вакуолизация и фрагментация клеток с пикнозом ядер в эпителиальных клетках и обильным белковым экссудатом в просвете канальцев. В прилежащей зоне дистрофические и деструктивные изменения в почечных артериолах сочетались с участками отторжения вакуолизированного и некротизированного эпителия в канальцах. Третья зона в этой фазе морфологических изменений характеризовалась расширением капиллярных кровеносных сосудов, выполненных «агрегированными» эритроцитами, зернистой дистрофией и вакуолизацией цитоплазмы эпителия, а в более отдаленной (IV-й) зоне дистрофических изменений не было, отмечалось лишь расширение капилляров, преимущественно коркового слоя.

Фаза крионекроза и экссудации характеризовалась наиболее выраженным полиморфизмом гистологической картины (рис. 1). В зоне абсолютной криодеструкции в сосудах отмечено отторжение эндотелия с выпадением фибрина и прогрессированием экстравазации. Цитоплазма эпителиальных клеток гомогенизирована со стиранием их границ, а структуры гломерул и почечных канальцев определялись в виде теневых образований. Во II-й зоне сосуды были расширены, наполнены кровью и организовавшимися тромбами, отмечались участки кровоизлияний. Эпителий канальцев с выраженной дистрофией и местами некротизирован. Ткань инфильтрирована полиморфноядерными лейкоцитами и моноцитами.

Отечность и гранулированность эпителия почечных канальцев с наличием в их просвете гиалиновых цилиндров и белковых флоккулянтов в капсулах почечных клубочков характеризовали динамику тканевых изменений в III-й зоне.

Степень внутрисосудистого стаза и гиперемии, отека и расширения проксимальных канальцев была значительно меньше выражена в 20 — 30 мм перифокальной зоне умеренной гипотермии. В полости капсул сосудистых клубочков почек встречались незначительные нитевидные белковые включения. Структурная целостность почечной ткани была сохранена.

Тканевые изменения в резорбционно-репаративной фазе или в фазе пролиферации [7] оценивались нами как в раннем периоде — на 2—4-е сут, так и более позднем — на 6—8 сут после криотермодеструкции кавернозных образований в почках экспериментальных животных. Это, на наш взгляд, позволило более полно отразить динамику морфологических изменений. Степень деструктивно-регенераторных изменений оценивалась в указанных выше зонах термодеструкции. В I-й зоне в раннем периоде на фоне кариолизиса и кариопикноза наблюдалась слабая инфильтрация некротизированных масс полиморфноядерными лейкоцитами, лимфоцитами и др. клетками, отсутствовала демаркационная линия, а по краю некроза

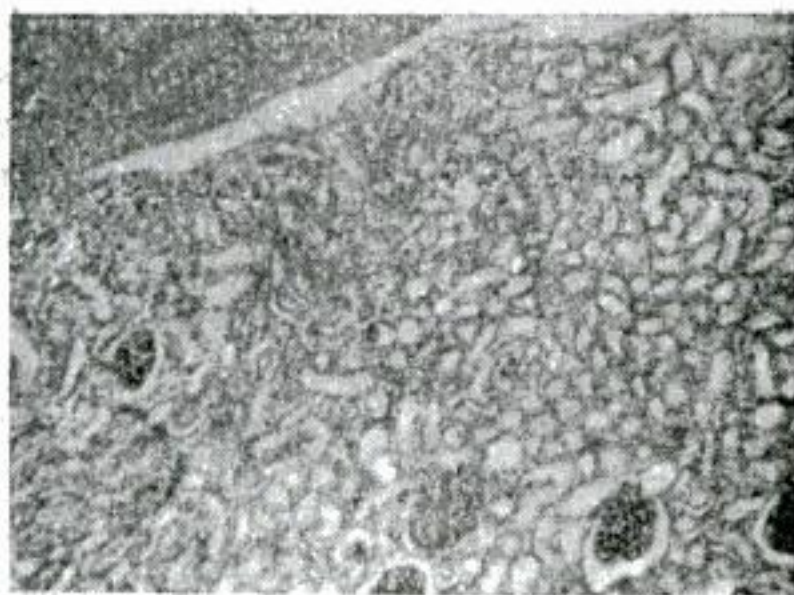


Рис. 1. Зона некроза, сублетальных и минимальных повреждений почечной ткани в 1-е сут после криотермодинамического действия. Окраска гематоксилином и эозином. X 100

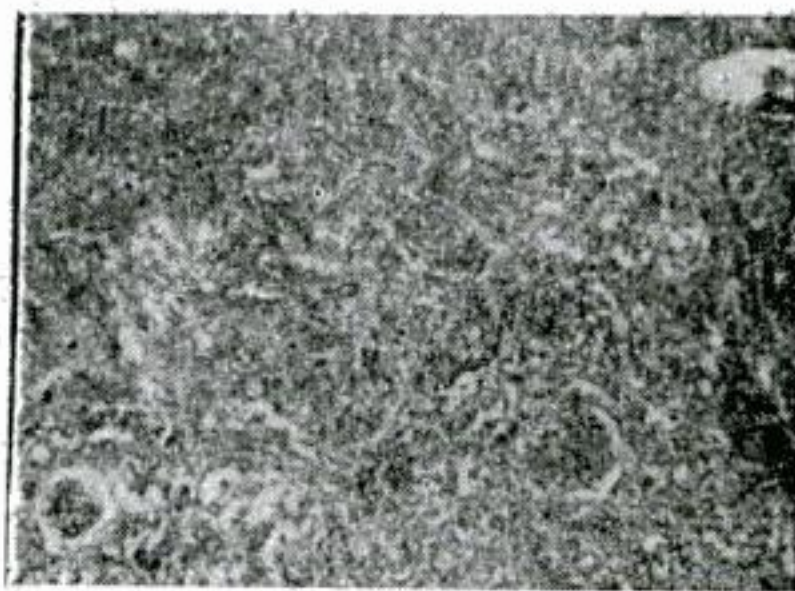


Рис. 2. Развитие и созревание грануляционной ткани в почке после криотермодинамического действия на 8-е сут. Окраска гематоксилином и эозином. X 100

отмечено развитие грануляционной ткани и пролиферация фибробластов (рис. 2). В прилежащей зоне (II) имели место отек ткани, разобщение структур, гемолиз эритроцитов и повреждение интимы в относительно сохранившихся кровеносных сосудах, расширение полостей лимфатических сосудов и почечных клубочков. Последние содержали эозинофильное и Шифф-положительное белковое содержимое, что свидетельствовало о нарушении фильтрационного барьера. В извитых канальцах нефронов отмечено отслоение эпителия от базальных мембран, их разрыхление и утолщение. В III-й зоне эпителий почечных канальцев, сохранивший свои границы, гидронефротически изменен, местами в стенках канальцев видны очаговые некрозы с десквамацией и скоплением клеточного детрита в просветах прямых канальцев и собирательных трубок. В различных отделах канальцевой системы встречались гиалиновые цилиндры. Клубочки гипертрофированы и в полости их капсул определялись белковые включения. Стаз в капиллярах преимущественно коркового слоя почек к периферии от очага воздействия постепенно уменьшался и в IV-й зоне был незначителен. Просветы канальцев в этой зоне, как правило, были сохранены, а их эпителий слегка набухший.

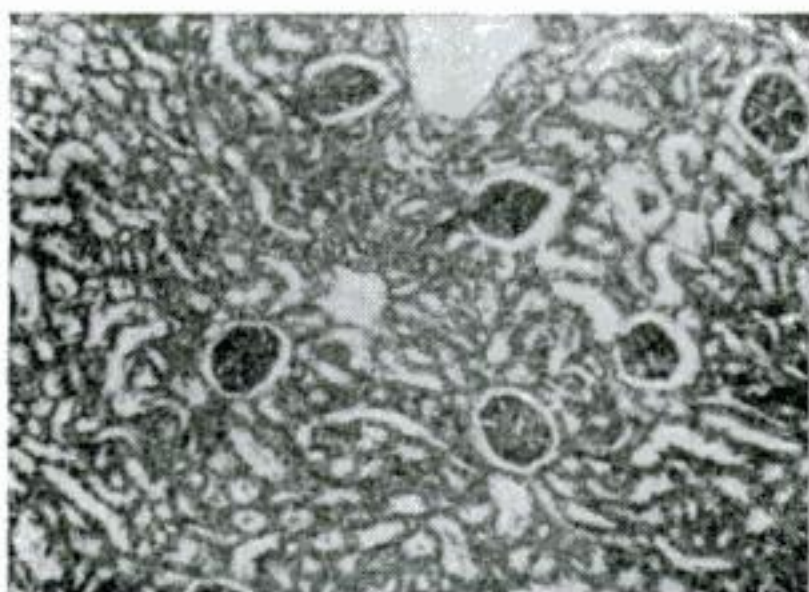


Рис. 3. Восстановление коркового вещества почки во II-й и III-й зонах на 64-е сут после криотермовоздействия. Окраска гематоксилином и эозином. X 100

К 6—8-м сут I-я зона уменьшается в размерах, идет интенсивное развитие грануляционной ткани, богатой фибробластами, сидерофагами и бедной лейкоцитами. В некротической ткани образуются тканевые «мостики» из фибробластов. Во II-й зоне, наряду с гидронефротическими клубочками, часто встречаются запустевшие, с белковым содержимым и признаками мембранознопролиферативного гломерулонефрита. Почечные канальцы кистообразно расширены, щеточная каемка эпителиоцитов

интенсивно окрашивается реактивом Шиффа. Это свидетельствует о развитии дистрофических, а также гипертрофических и гиперпластических процессов, направленных на поддержание гомеостатического состояния тканей. В III-й зоне эпителий почечных канальцев сохранял свои границы, однако был изменен: с участками зернистой дистрофии в извитых канальцах, с гипертрофией и многоядерностью клеток, реже митозами. Отмечается пролиферация также соединительнотканых клеток. В наиболее периферийной (IV) зоне отмечено некоторое увеличение размеров клубочков, эпителиальных клеток и диаметра проксимальных и дистальных канальцев. Структурно-функциональная картина была близка к уровню контроля.

В фазе регенерации и реорганизации, отражающей весь период от момента образования молодой соединительной ткани до ее преобразования в рубцовую, выявлено поступательное уменьшение зоны крионекроза с ее рубцеванием. Гистологически к 15, 25, 35-м сут наблюдения, в 50 % случаев к 52-м сут, полного рубцевания зоны крионекроза не происходило, но отмечено значительное прогрессирующее «огрубение» ткани. В рубце уже к 15-му дню вместо нежной рыхлой волокнистой соединительной ткани появляется значительное количество коллагеновых волокон, интенсивно окрашивающихся реактивом Шиффа. В прилежащей к очагу криодеструкции 5—10 мм зоне отмечается кровенаполнение сосудов с обилием вновь образованных микрососудов. Наряду с регенерацией и гипертрофией структурных компонентов паренхимы имела место выраженная пролиферация соединительной ткани. В отдаленных от зоны криотермовоздействия участках почки, как и в контрлатеральной почке, не подвергавшейся охлаждению, повреждения структур не выявлено.

Через 64—96 сут после внутрикавернозного криотермоабациллирования у собак в зоне абсолютной криодеструкции обнаруживался фиброзный рубец, а окружающая его узкая зона со структурно сохранными, но гипертрофированными клубочками и канальцевым эпителием непосредственно переходила в нормальную почечную ткань (рис. 3). Не наблюдалось развития местной инфекции и рецидива патологического состояния. К 120-м сут после криотермодеструкции на фоне обычной цитоархитектоники и морфофункционального состояния почечной ткани в зоне воздействия определялся звездчатый соединительнотканый рубец.

Таким образом, динамика морфологических изменений в почках, пораженных кавернозным нефротуберкулезом после криотермовоздействия на инфекционно-воспалительные очаги, в сопоставлении с результатами многоточечной термометрии и бактериологическими исследованиями наглядно показала, что основными преимуществами предложенных способов являются:

— гарантированное абациллирование, исключаяющее рецидивы патологического процесса;

— усиление резорбционно-регенеративной способности почечной ткани, предупреждающее образование грубых рубцов,

— атравматичность для окружающей почечной ткани оригинальных методов криотермовоздействия в зоне патологических очагов.

Эффективность микрокавернотомии с внутрикавернозным абациллированием содержимого и стенок остаточной полости путем криоорошения или криотермоаппликации в уточненных параметрах позволяет рекомендовать в клиническую практику предлагаемые хирургические методы лечения кавернозных форм нефротуберкулеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Комышич И. С., Погребинский В. М.* Туберкулез мочевых органов. — Киев: Здоров'я, 1987. — 184 с.
2. *Козин Ю. И.* Криотермовоздействие на инкапсулированные инфекционно-воспалительные образования почек. Бактериологическое исследование. — Харьков, 1989. — 48 с. (Препринт / ФТИНТ АН УССР; 21—89).
3. *Мочалова Т. П., Волович Л. Я.* Хирургическое лечение больных туберкулезом мочевых органов. — Киев: Здоров'я, 1983. — С. 17—71.
4. *Муриниц-Маркевич Б. Н., Никитин В. А., Носов М. Е.* Криоороситель // Медтехника. — 1975. — 3. — С. 37—39.
5. *Оперативная урология (Руководство)* / Под ред. Н. А. Лопаткина, И. П. Шевцова. — Л.: Медицина, 1986. — С. 81—86.
6. *Струков А. И., Соловьев И. П.* Морфология туберкулеза в современных условиях. 2-е изд. — М.: Медицина, 1986. — 232 с.
7. *Фенчик К. М.* Заживление ран. — Киев: Здоров'я, 1979. — 168 с.
8. А. с. 1443019 СССР МКИ⁴ G 09 В 23/28. Способ моделирования деструктивного туберкулеза почек / Ю. И. Козин. — Оpubл. 7.12.88. Бюлл. № 45.
9. А. с. 1447355 СССР МКИ⁴ А 61 В 17/00. Способ лечения инфекционных полостных образований почки / Ю. И. Козин. — Оpubл. 30.12.88. Бюлл. № 48.
10. А. с. 1516099 СССР МКИ⁴ А 61 В 17/36. Способ хирургического лечения объемных инкапсулированных образований / Ю. И. Козин, Т. Н. Юрченко, В. Ф. Козлова, Л. Ю. Дмитриева. — Оpubл. 23.10.89. Бюлл. № 39.

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

Поступила 14.12.89

Yu. I. KOZIN, T. N. YURCHENKO, V. F. KOZLOVA, L. Yu. DMITRIYEVA

THE DYNAMICS OF ABACILLATION AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN RENAL TISSUE DURING SANATION OF CAVERN NEPHROTUBERCULOSIS FORMS BY CRYOAPPLICATION

Medical Institute of Kharkov; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the UkrSSR Academy of Sciences, Kharkov

The possibility of usage of cryospray and cryoapplication methods for treatment of cavernous nephrotuberculosis forms has been proven in bacteriologic trials with 789 suspensions of tuberculosis microorganisms (TMB) and in suboperational experiments on 120 inbred dogs. In experiments with cryospray and cryoapplication on 78 and 42 animals, respectively, new methods of cryothermoabacillation have been developed. Their efficiency was confirmed by histological and histochemical studies performed during the observation period of 4 months. Morphological and bacteriological investigations of renal tissue carried out on 319 dogs allowed to substantiate the necessary usage of new non — traumatic methods of surgical treatment of cavernous nephrotuberculosis forms in medical practice.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК.57.043

А. В. Зинченко, А. М. Воротилин, В. А. Мусеев

ПОВРЕЖДЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Известно, что повреждения клеток и потеря ими биологических свойств на стадиях замораживания и оттаивания происходят в результате внутри- и внеклеточной кристаллизации льда, возрастания вследствие льдообразования концентрации солей и биологически активных веществ, осмотических эффектов и др. Однако повреждения могут происходить не только на стадиях замораживания и нагрева, но возникать и постепенно нарастать также в процессе длительного хранения при низких температурах. Так, в [1] показано, что в эритроцитах, хранившихся в течение 1,5 и 10 лет, после размораживания, отмывки при дальнейшем хранении при 4 °С снижение уровня АФТ, 2,3-ДФГ, потеря клетками K^+ и нарастание свободного гемоглобина происходят тем быстрее, чем дольше хранились они в замороженном состоянии.

Цель настоящей работы — выявить наличие повреждений, происходящих в твердофазном состоянии образца, т. е. в диапазоне температур от температуры стеклования t_g до температуры жидкого азота. Для этого использовалось многократное охлаждение и нагрев образца в указанном диапазоне температур (циклирование). При циклировании температуры в образце моделировались условия колебания температуры во время длительного хранения замороженных объектов. Такие колебания возникают, например, при испарении жидкого азота в хранилище, его заливке, открытии крышки хранилища и т. д. Эти факторы особенно влияют в случае хранения материала в парах жидкого азота.

Исследования проводили на эритроцитах человека. Кровь, стабилизированную гемоконсервантом «Глюгидир», центрифугировали, отделяли плазму. Полученную эритромассу (ЭР) смешивали с криозащитными средами следующих составов: 1 — пропандиосахароль (ПДС), масс. % : 35 — 1,2 — пропандиола, 3 — сахарозы, 0,7 — NaCl, остальное — вода бидистиллированная; 2 — криоконсервант ЦНИИГПК 11₃-М : маннит — 40,0 г, натрия хлорид — 7,0 г, двузамещенный фосфорнокислый натрий — 0,3 г, глицерин — 400 мл, вода бидистиллированная — до 1000 мл.; 3 — криозащитный раствор на основе полиэтиленгликоля молекулярной массы 1500 (ПЭГ-1500), масс. % : 25 — ПЭГ-1500, 0,9 — NaCl, остальное — вода бидистиллированная; 4 — криозащитный раствор с высокой концентрацией глицерина: маннит — 20 г, NaCl — 4 г, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ — 0,8 г, глицерин — 570 мл, воды бидистиллированной — до 1000 мл. С последним криоконсервантом ЭРМ смешивали в соотношении 2 : 1 (2 части ЭРМ и 1 часть криоконсерванта), с остальными — 1 : 1. Темпе-

ратура стеклования для каждого криозащитного состава разная и обусловлена растворенными веществами, главным образом многоатомными спиртами.

Циклирование образцов в диапазоне температур $t_g \div -196^\circ\text{C}$ проводили 1, 3, 5, 7, 10, 15 и 20 раз. После размораживания образцов в водяной бане (45°C) их центрифугировали и определяли свободный гемоглобин в надосадке. На рисунке представлена зависимость степени гемолиза эритроцитов от числа циклов подъема — понижения температуры в диапазоне $t_g \div -196^\circ\text{C}$. Как видно из результатов, приведенных на рисунке, повреждения нарастают тем больше, чем больше циклов температурного сканирования было осуществлено. Однако 5—15 циклов уже достаточно, чтобы заметить отличия в защитном действии различных криопротекторов. Обусловлен этот факт, вероятно, тем, что в процессе замораживания и нагрева эритроцитов

в межклеточной среде возникают различные метастабильные состояния, зависящие от состава исходной среды и проявляющиеся, в частности, в возникновении механических напряжений, нескомпенсированных электрических зарядов и других факторов, влияющих на сохранность биологических объектов при криоконсервации. Данные исследования могут помочь в выборе криоконсерванта, который бы обеспечивал наилучшую сохранность объекта в процессе хранения при низких температурах. Из приведенных данных видно, что среди проверенных криоконсервантов наилучшую сохранность эритроцитов обеспечивает ПДС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федорова Л. И., Азовская С. А., Виноградов В. Л., Баташева Т. В. Функциональная полноценность эритроцитов, консервированных замораживанием в течение разных сроков и сохраняемых после оттаивания — отмывания до 7 дней при 4°C // Гематология и трансфузиология. — 1984. — № 2. — С. 50—53.

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

Поступила 15.01.90

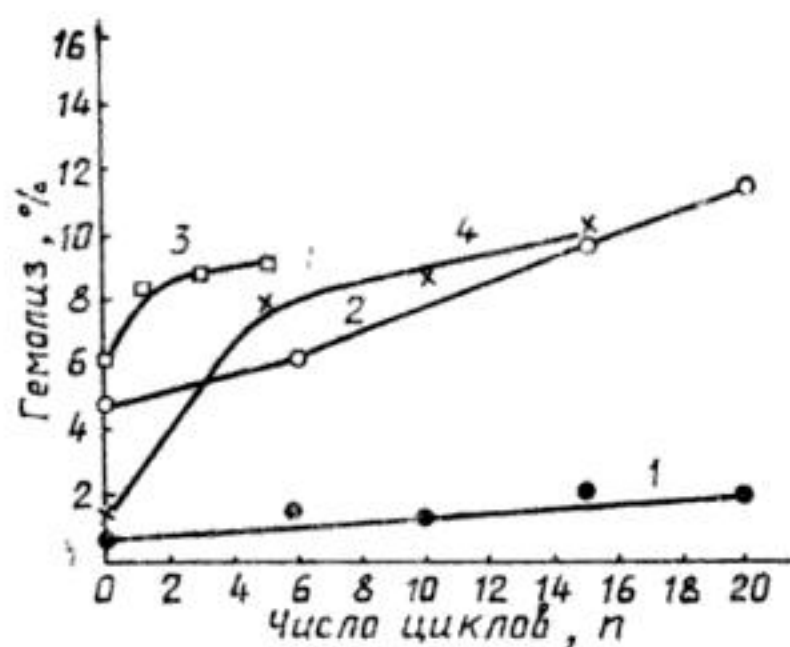
УДК 547.422.22

Л. З. Верховская, В. Ф. Карташов, Ю. И. Пичугин

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЫ ПОЧКИ ТЕЛЕНКА, КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ПОД ЗАЩИТОЙ НЕКОТОРЫХ ДИОЛОВ

Исследование зависимости криозащитных свойств химических соединений от их структуры с целью обоснования рекомендаций для научного поиска эффективных криопротекторов при криоконсервировании клеточных суспензий является актуальной задачей криобиологии. Изучение криозащитной активности химических веществ — необходимый этап такого исследования. Несомненный интерес представляет изучение криопротекторных свойств соединений ряда диолов, отдельные представители которого известны как эффективные криопротекторы [1, 6, 7]. В качестве объекта для изучения криозащитной активности применяется перевиваемая культура клеток [4]. Использование диолов как криопротекторов при замораживании перевиваемых культур не исследовалось.

В настоящей работе представлены результаты изучения морфофункционального состояния клеток перевиваемой культуры почки теленка (ПТ), криоконсервирован-



Зависимость степени гемолиза эритроцитов от числа циклов понижения и подъема температуры образца в диапазоне $t_g \div -196^\circ\text{C}$ в присутствии следующих криоконсервантов: 1 — пропандиосахароля, 2 — консерванта ЦНИИГПК 11₅-М, 3 — консерванта на основе ПЭГ-1500, 4 — консерванта на основе глицерина.

Составы консервантов даны в тексте

ной под защитой следующих диолов: этиленгликоля (ЭГ); 1,2-пропандиола (1,2-ПД); 2-метоксиэтанола (МЦ); 1,4-бутандиола (1,4-БД). Исследуемые вещества марки «ч. д. а.» или «хч» дополнительно очищались по методикам [2,3]. Чистоту веществ контролировали с помощью газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на хроматографах «ЛХМ» и «Цвет». Для идентификации исследуемых соединений определяли показатель преломления, удельный вес, температуру кипения. Перед исследованием криозащитной активности вещества стерилизовали на кипящей водяной бане в течение 40 мин и 2 ч под бактерицидными лампами. После стерилизации идентификация изучаемых веществ проводилась путем сравнения значений показателя преломления с данными, полученными до стерилизации, а также методом газожидкостной хроматографии.

Клетки линии ПТ культивировали, получали клеточный концентрат бесцентрифужным методом, жизнеспособность и концентрацию которого оценивали с помощью метода суправитального окрашивания трипановым синим [5]. Клеточный концентрат разбавляли ростовой средой и исследуемыми веществами до конечной концентрации клеток $1-3 \times 10^5$ в мл и вещества 10 %. После 15 мин эквilibрации с изучаемыми соединениями при комнатной температуре клеточную суспензию разливали в полиэтиленовые ампулы объемом 2 мл. Материал криоконсервировали по медленной двухэтапной программе [5]. Ампулы хранили в жидком азоте. Оценку сохранности клеток проводили после эквilibрации и криоконсервирования в разведенной в 10 раз ростовой средой клеточной суспензии с помощью метода суправитального окрашивания трипановым синим и по способности к образованию монослоя в течение 3 пассажей [5]. Жизнеспособность клеток выражали следующими показателями: 1) процент неокрашенных клеток в исходной клеточной суспензии (a_k), после эквilibрации ($a_{эк}$) и отогрева ($a_{от}$); 2) концентрация клеток в исходной клеточной суспензии (c_k), после эквilibрации ($c_{эк}$) и отогрева ($c_{от}$); 3) относительная жизнеспособность клеток после эквilibрации ($A_{эк}$) и отогрева ($A_{от}$); 4) индекс криозащитной активности ($I_{кр}$). Приведенные показатели определяли с помощью следующих выражений:

$$1) A_{эк} = \frac{a_{эк} \cdot c_{эк}}{a_k \cdot c_k} \cdot 100\%,$$

$$2) A_{от} = \frac{a_{от} \cdot c_{от}}{a_k \cdot c_k} \cdot 100\%, \quad 3) I_{кр} = \frac{A_{от}}{A_{эк}}.$$

Полученные данные сравнивали с сохранностью клеточной суспензии, криоконсервированной в присутствии 10 %-ного ДМСО.

Статистическая оценка результатов проводилась с помощью критерия Стьюдента-Фишера для независимых выборок по данным 5—6 опытов на ЭВМ СМ-4. Различия сравниваемых величин считали существенными при $p < 0,05$.

Основные физико-химические константы исследуемых веществ (табл. 1) не отличались от литературных данных [3]. Показатель преломления и данные газожидкостной хроматографии свидетельствовали об отсутствии изменений в веществах после стерилизации.

Таблица 1
Основные физико-химические константы исследуемых диолов

Наименование веществ	Показатель преломления	Относительная плотность	Температура кипения, °С	% примесей по данным ГЖХ
Этиленгликоль	1,4312	1,1155	198	0,3
1,2-пропандиол	1,4323	1,0400	188	0,3
2-метоксиэтанол	1,4020	0,9660	124	0,3
1,4-бутандиол	1,4460	1,0200	203	0,4

Данные, полученные после эквilibрации клеточной суспензии (табл. 2), свидетельствуют о безвредности 10 %-ной концентрации ЭГ; 1,2-ПД; 1,4-БД. Необходимо отметить снижение показателя относительной жизнеспособности клеток после

эквilibрации ($A_{\text{ЭК}}$) с 1,2-ПД по сравнению с воздействием ДМСО, что объясняется некоторыми отличиями в исходном состоянии клеточной суспензии. Процент неокрашенных клеток после эквilibрации ($a_{\text{ЭК}}$) с МЦ ниже, чем в исходной клеточной суспензии, что свидетельствует о некотором цитотоксическом действии. Однако этот эффект незначителен, так как показатели жизнеспособности исследуемых клеток после воздействия МЦ не отличаются от соответствующих показателей при эквilibрации клеток с ДМСО. При культивировании клетки после воздействия исследуемых диолов формировали монослой в те же сроки, что и интактные, в течение трех пассажей не теряли способности пассироваться, сохраняли исходные морфологические признаки.

Таблица 2

Показатели жизнеспособности клеток культуры ПТ после эквilibрации с исследуемыми веществами

Наименование	$c_{\text{К}}$	$a_{\text{К}}$	$c_{\text{ЭК}}$	$a_{\text{ЭК}}$	$A_{\text{ЭК}}$
ДМСО	$22,5 \pm 2,0$	$90,5 \pm 1,5$	$21,9 \pm 2,1$	$90,2 \pm 0,7$	$97,3 \pm 3,0$
ЭГ	$24,6 \pm 1,7$	$91,2 \pm 1,3$	$23,3 \pm 2,0$	$90,7 \pm 0,9$	$95,6 \pm 2,4$
1,2-ПД	$23,5 \pm 3,7$	$90,8 \pm 1,6$	$19,9 \pm 3,4$	$87,2 \pm 2,2$	$82,4 \pm 4,9^{**}$
МЦ	$24,6 \pm 1,7$	$91,2 \pm 1,3$	$23,7 \pm 2,9$	$87,2 \pm 1,3^*$	$87,6 \pm 4,4$
1,4-БД	$24,6 \pm 1,7$	$91,2 \pm 1,3$	$24,3 \pm 2,1$	$87,9 \pm 2,3$	$95,3 \pm 4,2$

Примечание. * — Достоверное отличие ($P < 0,05$) от соответствующего показателя в контроле, ** — достоверное отличие ($P < 0,05$) от соответствующего показателя при эквilibрации с ДМСО.

После криоконсервирования под защитой ЭГ; 1,2-ПД; МЦ клетки культуры ПТ сохраняли свои морфофункциональные свойства на уровне клеток, криоконсервированных под защитой ДМСО (табл. 3). Для ЭГ индекс криозащитной активности ($I_{\text{кр}}$) выше, чем для ДМСО. Показатели жизнеспособности исследуемых клеток после криоконсервирования с 1,4-БД ниже, чем соответствующие показатели криоконсервирования с ДМСО; ЭГ; 1,2-ПД и МЦ (табл. 3). После отогрева клетки не распластывались, монослой не формировался.

Таблица 3

Показатели жизнеспособности клеток культуры ПТ после отогрева

Наименование	$c_{\text{от}}$	$a_{\text{от}}$	$A_{\text{от}}$	$I_{\text{кр}}$
ДМСО	$20,8 \pm 1,8$	$83,2 \pm 1,2$	$85,7 \pm 7,3$	$0,87 \pm 0,06$
1,2-ПД	$23,2 \pm 3,3$	$75,5 \pm 3,2$	$77,3 \pm 4,8$	$0,96 \pm 0,02$
ЭГ	$25,1 \pm 3,0$	$81,0 \pm 2,4$	$105,0 \pm 5,8$	$1,1 \pm 0,07^*$
МЦ	$28,4 \pm 2,2^*$	$66,6 \pm 3,8^*$	$84,5 \pm 5,4$	$0,94 \pm 0,09$
1,4-БД	$26,8 \pm 1,95^*$	$48,3 \pm 2,7^*$	$60,6 \pm 5,3^*$	$0,66 \pm 0,08^*$

Примечание. * — Достоверное отличие ($P < 0,05$) от соответствующего показателя при криоконсервировании с ДМСО.

Клетки после криоконсервирования под защитой ЭГ; 1,2-ПД; МЦ при культивировании формировали монослой в те же сроки, что и после криоконсервирования с ДМСО, не теряли способности к пассированию в течение трех пассажей. После пересевов монослой непрерывен, клетки ПТ сохраняли исходные морфологические признаки: эпителиоподобного типа, полигональной формы с хорошо выраженными границами.

Таким образом, криозащитные свойства ЭГ; 1,2-ПД; МЦ проявлялись при криоконсервировании культуры клеток ПТ, что согласуется с данными, полученными на

сперме быков [1], сперме карпа и эритроцитах человека [6], клетках *E. coli* [7]. Отсутствие криозащитной активности для 1,4-БД объясняется, вероятно, морфофункциональными особенностями клеток перевиваемой культуры, так как наличие криозащитных свойств показано для этого вещества на эритроцитах и сперме карпа [6].

Исследованные диолы ЭГ; 1,2-ПД; МЦ в 10 %-ной концентрации могут быть использованы при криоконсервировании клеток культуры ПТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бугров А. Д., Шинкаренко Н. И. Изучение криозащитных свойств метилцеллозоля и этилцеллозоля // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. — Киев: Наук. думка. — 1974. — С. 41—43.
2. Вайсберг А., Проскауэр Э., Родфок Дж. и др. Органические растворители. — М.: ИЛ, 1958. — 670 С.
3. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. — М.: Мир, 1976. — 541 с.
4. Глушко Т. А. Характер действия криопротекторов на митотический режим клеточных культур // Криобиология и криомедицина. — 1981. — Вып. 9. — С. 22—25.
5. Дьяконов Л. П., Глухов В. Ф., Поздняков А. А. и др. Культура клеток и тканей животных. — Ставрополь: Ставр. с.-х. ин-т, 1980. — 110 с.
6. Пичугин Ю. И. Зависимость цитотоксичности и криопротекторной активности диолов от их структуры и физико-химических свойств. // Автореф. дис. канд. биол. наук. — Харьков, 1988. — 17 с.
7. Takanashi Tsumo, Bros Joanne B., Shaber Ruth E., Williams Robert J. Effect of cryoprotectants on the viability and function of unfrozen human polymorphonuclear cells // Cryobiology. — 1985. — 22. — N 4. — P. 336—350.

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

Поступило 11.11.88

НИИ животноводства Лесостепи
и Полесья УССР,
г. Харьков

УДК 615.454 + 618.1

Г. К. Погосян, Д. С. Алагемян, Т. К. Корчилава

КОРРЕКЦИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА МЕТОДОМ ЛОКАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

В основе успешной терапии мужского бесплодия лежит точная диагностика причин заболевания, однако, по данным [4], приблизительно половину всех бесплодных мужчин составляют больные с идиопатическим бесплодием, при котором применяются эмпирические методы лечения патоспермии, основанные на гормонотерапии [2,3]. Подобное лечение не только неэффективно, но и приводит часто к вторичным осложнениям, в связи с чем все большее внимание исследователей привлекают негормональные методы коррекции сперматогенеза, одним из которых является метод локальной гипотермии (ЛГ). При применении ЛГ в эксперименте на животных было установлено, что происходит активация нейро-секреторной функции гипоталам-гипофизарной системы, о чем свидетельствует увеличение количества зерен РНК и субстанции Ниссля в клетках типа 1а, расширение сети капилляров вокруг них. Подобная реакция в свою очередь приводила к активации яичников и надпочечников [1].

Для изучения возможности ЛГ как метода коррекции сперматогенеза было обследовано 200 мужчин, состоящих в бесплодном браке (табл.). Средний возраст обследованных мужчин — 31,5 лет, длительность брака — от 3 до 16 лет (в среднем — 9,7 лет). У 82 (41 %) мужчин из бесплодных браков была установлена нормоспермия. Сперма была получена путем мастурбации после 5—7 дней воздержания от половой жизни и употребления алкоголя. Окончательное заключение о патоспермии давалось после 2—3-кратного исследования спермы с интервалом в 7—21 день. Эякулят микроскопировался через 40—60 мин после сбора. Больные были распределены по 2 группам: 1-я группа (контрольная) — 50 больных — получали обычное лечение, соответствующее выявленной патологии, в основном гормональные препараты в общепринятых дозировках. Больным 2-й группы — 68 мужчин — назначалась ЛГ в виде мощных ванн, которые проводились обычной водой, охлажденной до 2 °С, один раз в сутки в течение 14 дней.

Возрастной состав и морфологическая характеристика спермы обследованных мужчин, состоящих в бесплодном браке

Морфологическая характеристика спермы	Возрастные группы												Всего	
	21—25		26—30		31—35		36—40		41—45		46—50			
	ч	%	ч	%	ч	%	ч	%	ч	%	ч	%	ч	%
Олигозооспермия I°	3	2,5	7	5,9	2	1,6	2	1,6	1	0,8	1	0,8	16	13
Олигозооспермия II°	4	3,4	9	7,6	7	5,9	2	1,6	2	1,6	1	0,8	25	21
Олигозооспермия III°	7	5,9	8	6,8	4	3,4	5	4,2	3	2,5	—	—	27	23
Гипокинезия	4	3,4	8	6,8	8	6,8	9	7,6	8	6,8	—	—	37	32
Некрозооспермия	1	0,8	1	0,8	3	2,5	—	—	—	—	—	—	5	4,2
Азооспермия	—	—	—	—	4	3,4	1	0,8	—	—	—	—	5	4,2
Тератозооспермия	—	—	—	—	3	2,5	—	—	—	—	—	—	3	2,5

После завершения лечения у больных обеих групп двукратно с интервалом в 7—14 дней исследовалась сперма. Контрольные исследования у больных, при получении положительного результата, проводились через 2,5 мес. У больных 2-й группы осложнений в процессе лечения не отмечалось. У больных 1-й группы в одном случае отмечалась аллергия к применяемым препаратам, у 6 (12 %) — несколько понизилось либидо и ослабла эрекция. Данные нарушения прошли на второй месяц после прекращения лечения. Больные 2-й группы, как правило, сообщали о повышении либидо.

Исследования, проведенные после лечения в 1-й и 2-й группах больных показали, что среди больных 1-й группы у 18 (36 %) лечение оказалось неэффективным, у 14 (28 %) — морфологический состав спермы восстановился полностью (за время наблюдения у 8 (16 %) жен этих больных наступила беременность) и у 18 (36 %) больных значительно улучшились показатели спермограммы. Среди больных 2-й группы у 24 (35,3 %) сперма восстановилась полностью, у 23 (33,8 %) — лечение оказалось неэффективным и у 21 (30,9 %) больного значительно улучшились показатели спермограммы. Следует отметить зависимость результатов лечения от возраста больных: у мужчин старше 30 лет более эффективным было применение локальной гипотермии. Таким образом, локальная гипотермия является методом терапии мужской стерильности, не уступающим традиционным способам лечения в эффективности и превосходящим их в безопасности для здоровья больных, более экономичным и легким в применении. Метод особенно рекомендуем при выявлении патоспермии у мужчин старше 30 лет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аветисян А. Н., Хостикян Н. Г., Азнаурян А. С. Реакция системы гипоталамус — кора надпочечников — яичники у крыс при применении локальной гипотермии // Современные аспекты регуляции репродуктивной функции. — Ереван: Айастан, 1977. — С. 87—92.
2. Акунц К. Б. Актуальные вопросы бесплодия в браке: Дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1971. — 504 с.
3. Каган С. А. Стерильность у мужчин. — Л.: Медицина, 1974. — 222 с.
4. Бесплодный брак / Под ред. Б. Хандсона. — М.: Мир, 1983. — С. 73—77.

Ереванский государственный
мед. ин-т

Поступило 16.05.89

ХРОНИКА

КООРДИНАЦИОННОЕ СОВЕЩАНИЕ СЕКЦИИ «ЗИМОСТОЙКОСТЬ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ»

27—29 марта 1990 г. в г. Ялте в Государственном Никитском ботаническом саду (ГНБС) проходило очередное координационное совещание секции «Зимостойкость сельскохозяйственных растений» при проблемном совете «Криобиология и крио-

медицина АН УССР». В работе совещания приняли участие ведущие специалисты в области физиологии растений, криобиологии, гидрометеорологии, химии, физики и ботаники из 19 научно-исследовательских учреждений Москвы, Киева, Харькова, Ялты, Одессы, Казани, Мичуринска, Симферополя, Обнинска и др. городов СССР. Совещание открыл член-корреспондент АН МССР директор ГНБС А. А. Чеботарь, который обратил внимание ученых на необходимость расширения фундаментальных исследований не только сельскохозяйственных, но и декоративных культурных и исчезающих видов растений с целью выявления наиболее устойчивых форм и типов для использования в различных экологических условиях. Важным также является выявление доноров устойчивости и моделирование подбора родительских форм для создания устойчивых растений. Анализ проведенных в 1988—1989 гг. исследований в различных регионах страны повреждаемости плодовых в годы с отличающимся сочетанием метеорологических факторов во вступительном слове провела председатель секции д. б. н. М. А. Соловьева. Важные вопросы устойчивости растительной клетки были подняты в сообщениях д. б. н. Т. И. Труновой «О роли белков в адаптации к холоду и морозу», д. б. н. Л. П. Хохловой «Адаптационные изменения мембран у озимых злаковых при закаливании и действии антистрессовых регуляторов роста», д. б. н. Н. Н. Мусиенко «Современные проблемы устойчивости растений» и к. б. н. В. Д. Мануильского «Структурно-функциональные модификации разных типов растительных мембран при низкотемпературных стрессах». Доклад д. г. н. В. П. Дмитренко был посвящен учету агрометеорологических условий, обеспечивающих повышение зимостойкости зерновых культур и некоторым особенностям климатических условий выращивания абрикоса на Украине. Речь шла о принципах прогнозирования урожайности растений на примере климатических условий республики, сложившихся в последнее время. Об эколого-физиологических особенностях плодовых культур и их устойчивости к неблагоприятным факторам среды доложил заведующий отделом физиологии растений ГНБС, к. б. н. А. И. Лищук, который на основании большого фактического материала разработал методы оценки и экспресс-диагностики устойчивости ряда плодовых культур. О теоретических аспектах проблемы устойчивости растительной клетки сообщалось в докладах д. х. н. В. В. Манка «Связанная и вымерзающая вода в дисперсных системах, методы определения». Вопросы отбора наиболее устойчивых форм растений рассматривались в докладах д. б. н. В. А. Шерер «Формирование признаков морозоустойчивости растений винограда и методов оценки селекционного материала на устойчивость к низким температурам» и к. б. н. К. М. Москаленко «Выведение сортов абрикоса для селекции на зимостойкость по продолжительности фаз микроспорогенеза и степени морозоустойчивости». Обобщающий доклад по проблемам зимостойкости сельскохозяйственных культур сделала д. б. н. М. А. Соловьева «Морозоопасность территории, структурно-функциональные изменения и зимостойкость плодовых растений в зависимости от оводненности тканей». Особое внимание уделялось вопросам комплексной устойчивости и перспективам развития теории физиологии устойчивости растений, основные проблемы которой связаны с повышением урожайности и улучшением качества сельскохозяйственной продукции. Вопросам регуляции устойчивости сельскохозяйственных растений были посвящены доклады к. б. н. Г. В. Кузиной «Гормональная регуляция покоя культурных растений» и к. б. н. В. К. Мазалова «Защитное действие обработки семян криопротекторами ПЭО-400 и ПЭО-1500 на всходы пшеницы и сахарной свеклы». Методические разработки в области морозоустойчивости были представлены в докладах к. б. н. Г. Я. Карповой «Методы изучения морозоустойчивости эфиромасличных культур», Ю. В. Иващенко «Характеристика некоторых теплоадаптационных свойств листьев плодовых культур методом флуориметрического анализа», а также Т. Ф. Стрибуль «Влияние низкотемпературного воздействия на семена овощных культур». В заключение д. б. н. Т. И. Трунова рассказала о научных исследованиях, проводимых в Мичиганском университете (США) в области морозоустойчивости растений.

Участники совещания наряду с подведением итогов о проведенных в 1988—1989 гг. работах уточнили план исследований на 1990 г. и обсудили предложения и направления исследований на 1991—1995 гг. В принятом на совещании решении отмечена особая роль исследований по вопросам комплексной устойчивости сельскохозяйственных растений для решения проблемы повышения продуктивности и ста-

бильности урожая растений. Актуальными являются также разработки по выявлению морозоопасных территорий и влиянию гипоксии на процессы устойчивости и продуктивность растений. Кроме того признана необходимость включения основных разделов комплексных исследований секции в Международную программу по зимостойкости растений при ФАО. Рассмотрены организационные вопросы о дополнительном включении секции «Зимостойкость сельскохозяйственных растений» в Украинское физиологическое общество, а также возможность опубликования результатов исследований секции «Зимостойкость сельскохозяйственных растений» в специальном сборнике.

В. Д. Мануильский

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИИ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в 1990 г. С. И. Очкуром защищена диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Влияние факторов криоконсервирования на энергетику и подвижность спермиев петухов». Изучено влияние температурного, осмотического шоков, криопротекторов и криоконсервирования на параметры энергетического метаболизма и подвижность спермиев петухов. Установлено, что в порядке усиления повреждающего эффекта экспериментальные воздействия располагаются следующим образом: резкое охлаждение, изменение осмолярности среды, криоконсервирование под защитой этиленгликоля, криоконсервирование без криопротектора. По мере увеличения ингибирующего действия на дыхание и подвижность спермиев петухов изученные криопротекторы располагаются следующим образом: глицерин, диметилсульфоксид, этиленгликоль, диметилацетамид. Влияние криопротекторов отчасти обратимо. Лучшими криозащитными свойствами обладают этиленгликоль и глицерин.

11 апреля 1990 г. скончался Борис Николаевич Вепринцев — ученый-биофизик, орнитолог, один из авторов идеи создания низкотемпературных генетических банков для сохранения геномов редких и исчезающих видов растений и животных.

Б. Н. Вепринцев родился в Москве, в семье профессионального революционера. С детских лет он проявил большую любовь к природе и стремление к знаниям. В 1947 г. Борис Николаевич поступил на биофак МГУ, где занимался изучением ориентации птиц при перелетах; учеба была прервана в 1951 г. арестом и заключением по ложному обвинению. В 1954 г. Борис Николаевич вернулся в университет, где на кафедре биофизики занялся биофизикой мембран нервных клеток. После окончания аспирантуры в 1961 г. защитил кандидатскую диссертацию и поступил на работу во вновь созданный Институт биологической физики (ИБФ) АН СССР. В 1964 г. переехал в Пущино, где был организован Научный центр биологических исследований. С 1966 г. Борис Николаевич — руководитель лаборатории биофизики клетки ИБФ АН СССР, в 1971 г. защитил докторскую диссертацию по механизмам памяти. Для усовершенствования методики исследования клеток Борис Николаевич совместно с группой сотрудников ИБФ и СКБ создает комплекс приборов по микрохирургии клетки, за который в 1982 г. был удостоен Государственной премии. Одновременно он продолжает работу, начатую еще в студенческие годы — записывает голоса птиц в природе, ежегодно совершая длительные экспедиции в самые отдаленные уголки нашей страны. Результатом этой работы явилась организация в 1973 г. первой в нашей стране фонотеки голосов пернатых — выпуск 26 пластинок с записями голосов многих видов птиц. Орнитологи высоко оценили эту работу, Борис Николаевич был избран членом Центрального совета орнитологического общества СССР и ряда международных обществ.

Во время своих экспедиций Борис Николаевич постоянно наблюдал все более заметное оскудение природы даже в наименее доступных уголках нашей страны и пришел к выводу, что для спасения редких и исчезающих видов необходимо дополнить существующие методы — создание зоопарков, ботсадов, заповедников — каким-то нетрадиционным. Так родилась идея создания низкотемпературных генетических банков, позволяющих сохранять генетическую информацию в практически неограниченном объеме и неизменном виде в течение десятков или даже сотен лет. К тому времени, когда была высказана эта идея (1975 г.), прошел основательную проверку временем метод криоконсервации спермы и были опубликованы первые работы по криоконсервации зародышей млекопитающих. Идея Бориса Николаевича быстро получила международное признание. В 1978 г. по его докладу на XIV генеральной ассамблее Международного союза охраны природы была создана рабочая группа по консервации генома, и Борис Николаевич трижды избирался ее председателем.

Многолетние занятия биофизикой клетки, опыт культивирования клеток, созданный комплекс приборов по микрохирургии клетки позволили Б. Н. Вепринцеву и его сотрудникам разработать разнообразные биофизические и цитохимические методы оценки жизнеспособности клеток после криоконсервации различных объектов с применением различных криопротекторов и режимов замораживания. Привлечение к работе эмбриологов, использование методов биологии развития дало возможность предложить ряд путей реализации генетической информации, сохраненной в глубоко-замороженных половых и соматических клетках. Под руководством Бориса Николаевича выполнены работы по криоконсервации зародышей различных линий лабораторных мышей, спермы птиц, спермы и зародышей ряда беспозвоночных, семян и меристем многих видов дикорастущих растений.

В 1989 г. была утверждена составленная под руководством Бориса Николаевича программа «Низкотемпературный генетический банк промысловых и редких видов рыб и водных беспозвоночных», предусматривающая выполнение широкого круга работ по сбору и криоконсервации генетического материала и реализации содержащейся в нем информации. Но приступ смертельной болезни не позволил ему принять участия в ее осуществлении.

Скорбь об утрате никогда не покинет сердца тех, кто имел счастье знать Бориса Николаевича. Хочется надеяться, что его идеи будут развиваться.

Докт. биол. наук Н. Н. Ротт

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ ЖУРНАЛА «КРИОБИОЛОГИЯ»

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

Статья печатается на машинке черной лентой через 2 интервала на белой бумаге форматом А₄ (210×297 мм). На странице не более 30 строк, в строке не более 60—62 знаков. Абзацный отступ равен 5 знакам. Левое поле страницы — не менее 25, правое — 10, верхнее — 20, нижнее — 20 мм.

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

В тексте ссылки на номер статей по списку литературы даются в квадратных скобках.

Иностранные фамилии и названия фирм даются в русской транскрипции.

Таблицы печатают на отдельных страницах, помещают в рукописи вслед за страницей, содержащей первую ссылку на эту таблицу. На полях проставляют номера таблиц и рисунков против тех мест текста, где они должны быть заверстаны.

Формулы и буквенные обозначения должны быть выполнены четко, крупно, черными чернилами. Прописные и строчные буквы в формулах, одинаковые по начертанию и отличающиеся только размером, подчеркиваются: прописные буквы — двумя черточками снизу, строчные — двумя черточками сверху. Следует особенно четко вписывать сходные по написанию буквы: *e* и *l*, *I* и *J*, *h* и *n*.

Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые буквы, а также нуль, *sin*, *cos*, *exp* и т. д. размечаются на прямой набор знаком —. Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках). Разметка формул производится синей или фиолетовой пастой, греческие буквы подчеркиваются или обводятся красным карандашом, готические — синим. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) выписываются на поле (один раз) с указанием их значения.

Рисунки в количестве не более 5 выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге (или в виде фотографий). На них наносятся только необходимые условные обозначения. Расшифровка их дается в тексте или в подписи к рисунку. На обороте рисунка указывается его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и журнала.

Список литературы печатается на отдельной странице через 2 интервала и составляется в алфавитном порядке авторов, русский, затем латинский алфавит. В списке необходимо привести следующие сведения: фамилия и инициалы автора в оригинальной транскрипции, название статьи, журнала или книги и далее: для периодических изданий 1) год издания, 2) том, 3) номер, 4) номера страниц; для монографий — место издания, название издательства, год издания, общее количество страниц.

Названия периодических и продолжающихся изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНТИ.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

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

Реферат к статье подается на русском и английском языках объемом до 0,3 стр.

Материалы направлять по адресу: 310015, Харьков-15, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, редакции журнала «Криобиология».

С 1991 года журнал «Криобиология» переименован и выходит под названием «Проблемы криобиологии». В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

Периодичность — 4 номера в год. Подписная цена: на 3 мес. — 1 р. 20 к., на 6 мес. — 2 р. 40 к., на 12 мес. — 4 р. 80 к.

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

Our journal KRIOBIOLOGIYA (CRYOBIOLOGY) published by Naukova Dumka Publ. Co. is renamed to **Problemy Kriobiologiyi (Problems of Cryobiology)** in 1991. The journal is designated for the communication of papers on aspects of low temperature studies covering the chemical and life sciences and their associated technologies. Coverage includes: physical and chemical changes accompanying freezing and thawing, low temperature biophysics; biochemistry and molecular biology at sub-zero temperatures; preservation of cells, tissues and organs; effects of low temperatures on cell physiology; the use and mode of action of cryoprotectants; cell damage and its avoidance; freeze-drying and substitution; chill and frost injury, cold acclimation and hardiness in plants; cold survival mechanisms in animals and micro-organisms; low temperature techniques and instrumentation, e. g. food and pharmaceuticals.

Problemy Kriobiologiyi will be published 4 times a year.

ISSN 0233-7673. Криобиология, 1990, № 4. 1—56