

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

1 | 88



Степанов А. П.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

1 1988

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в январе 1985 года
выходит 4 раза в год
Киев Наукова думка 1988

СОДЕРЖАНИЕ

Сандомирский Б. П. Критерии летальных и обратимых изменений в тканях после криовоздействий	3
Цымбал Л. В., Гаврилова И. И., Моисеев В. А. Влияние температуры и криопротекторов на структурно-функциональное состояние эритроцитов зрелого организма и плода человека	7
Цуцаева А. А., Лобасенко Н. П. Изучение морфофункциональных свойств моноцитарно-макрофагальных элементов перитонеального экссудата облученных мышей после трансплантации нативного и криоконсервированного костного мозга	12
Семенова Е. Г. Внеплановый синтез ДНК в культивируемых клетках после криоконсервации	17
Дегтярев А. В., Бондаренко В. А., Белоус А. М. Холодовый шок фосфолипидных везикул. Влияние охлаждения на барьерные свойства мембран	20
Дахно Ф. В., Вишневский В. И., Каталевская Л. Г., Долгина Р. Е., Душейко А. Г. Сверхмедленное замораживание ооцитов свиньи	27
Козлова В. Ф., Сигал Н. С. Влияние криопротекторов на ДНК-синтезирующую способность клеток печени и почек животных	29
Войтенко Н. Н. Влияние низких температур на моноаминоксидазу мозга зимоспящих сусликов	34
Львова С. П. Содержание гликогена, фосфорилазная и глюкозо-6-фосфатазная активность в тканях суслика и лягушки при зимней спячке	39

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Шугалей В. С., Шортанова Т. Х., Самойлик Н. И., Головина Т. Н. Некоторые показатели азотистого обмена и интенсивность спонтанного перекисного окисления в тканях зимоспящих сусликов	43
Жегунов Г. Ф. Активация синтеза белка в тканях сусликов на начальном этапе пробуждения от зимней спячки	45
Сидякина Т. М., Ледаков В. С., Чумакова М. Ю. Система автоматического поддержания уровня жидкого азота в хранилищах ХБ-0,5	46
Стусь Л. К., Куракса В. М. Гемолиз эритроцитов при гипотермическом хранении в зависимости от исходных показателей их кислотной резистентности	47
Дрокин С. И., Бибенко А. Г., Копейка Е. Ф. Фосфолипазная активность в сперматозоидах карпа <i>Cyprinus carpio</i> и влияние на нее факторов криоконсервирования	49
ХРОНИКА	51
ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ	53

© Издательство «Наукова думка», «Криобиология», 1988

This One



0045-J8G-Y484

Матеріал, захищений авторським правом

CONTENTS

<i>Sandomirsky B. P.</i> Criteria of lethal and reversible changes in tissues after cryoapplication	3
<i>Tsymbal L. V., Gavrilova I. I., Moiseyev V. A.</i> The effect of temperature and cryoprotectants on the structure-functional state of donor erythrocytes and human fetal red blood cells	7
<i>Tsutsayeva A. A., Lobasenko N. P.</i> The investigation of morphofunctional properties of monocyte and macrophage elements of the peritoneal exudate of irradiated mice after transplantation of native and cryopreserved bone marrow	12
<i>Semenova E. G.</i> Unscheduled DNA synthesis in cultured cells after cryopreservation	1
<i>Degtyarev A. V., Bondarenko V. A., Belous A. M.</i> Cold shock in phospholipid vesicles. The effect of cooling on the membrane barrier properties	20
<i>Dakhno F. V., Vishnevsky V. I., Katalovskaya L. G., Dolgina R. E., Dusheyko A. G.</i> Superslow freezing of swine oocytes	27
<i>Kozlova V. F., Sigal N. S.</i> The effect of cryoprotectants on the DNA synthesising capacity of animal hepatocytes and kidney cells	29
<i>Voytenko N. N.</i> The effect of low temperatures on brain monoaminoxidase of hibernating ground squirrels	34
<i>Luova S. P.</i> The content of glycogen, phosphorylase and glucose-6-phosphatase activities in tissues of ground squirrel and frog during hibernation	39

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Shugaley V. S., Shortanova T. Kh., Samoylik N. I., Golovina T. N.</i> Indices of nitrogenous metabolism and intensity of spontaneous peroxidation in tissues of hibernating ground squirrels	43
<i>Zhegunov G. F.</i> The activation of protein synthesis in ground squirrel tissues at the initial step of arousing from hibernation	45
<i>Sidyakina T. M., Ledakov V. S., Chumakova M. Yu.</i> An automatic system for support of the level of liquid nitrogen in KHB-0.5 refrigerators	46
<i>Stus L. K., Kuraksa V. M.</i> Haemolysis of erythrocytes during storage at low temperatures depending on the initial values of their acidic resistance	47
<i>Drokin S. I., Bibenko A. G., Kopeyka E. F.</i> The phospholipase activity in sperm of carp <i>Cyprinus carpio</i> and the effect of cryopreservation factors	49
CHRONICLE	51
DEFENSE OF THESES	53

Адрес редакции:

310015, Харьков, 15,
ул. Переяславская, 23.

Научный редактор *А. М. Белоус*

Ответственный секретарь редакции

Ф. А. Приходько

Редактор *З. В. Линевиц*

Технический редактор *В. Н. Волкова*

Корректор *Н. П. Спичак*

Сдано в набор 13.10.87, Подп. в печ. 21.12.87. БЦ 22961. Формат 70×108/16. Бум тип. № 1. Вых. печ. Усл. печ. л. 4,9. Уч. изд. л. 5,38. Усл. кр.-отт. 5,6. Тираж 1000 экз. Заказ № 7-435. Цена 65 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, Университетская, 16. Зак. 1970.

Б. П. Сандомирский**КРИТЕРИИ ЛЕТАЛЬНЫХ И ОБРАТИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
В ТКАНЯХ ПОСЛЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЙ**

Прогнозирование результатов использования холода в качестве лечебного фактора связано с выяснением тех изменений, которые наступают в тканях в ходе охлаждения и отогревания. Ответ биологического объекта на криовоздействие зависит от максимальной и минимальной величины приложенной при охлаждении — отогревании скорости изменения температурного показателя, экспозиции. При этом изменения могут происходить на организменном, органном, тканевом, клеточном и субклеточном уровнях, т. е. на определенных уровнях организации биологического объекта. Можно считать, что наиболее чувствительным звеном при холодовых воздействиях являются такие интегрирующие системы, как нейрогуморальная, микрогемодиализаторная, а также мембранные комплексы — на уровне клеток.

Криовоздействие, которое вызывает некротизацию либо стимуляцию клеточных и соединительнотканых систем в зоне хронического воспалительного или дегенеративно-дистрофического процесса, зависит от температурных параметров, вида ткани и ее исходного состояния. При этом возможен третий вариант — уменьшение показателей клеточной альтерации в зоне острого воспаления под влиянием охлаждения. Проявление таких изменений может быть выявлено в тканеспецифических клетках и в микрососудистом русле (рис. 1). Клинические эффекты, связанные с действием холода, дают основание применять низкие температуры для деструкции опухолей, ускорения процессов заживления хронических язвенных поражений (язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки, трофические язвы, язвенный кератит), уменьшения деструктивных и улучшения восстановительных процессов (ожоговые и гнойные раны, хронический гепатит и цирроз печени, хронический тонзиллит и др.).

Методические подходы к оценке функционально-структурного состояния биологического объекта после криовоздействия определяются уровнем организации, возможностями управления появляющимися изменениями (табл. 1).

При этом возникает необходимость единообразия трактовки состояния жизнеспособности, диагностики степени ее повреждения, т. е. прогноза на перспективу. Жизнеспособность — основное качество биологического объекта, заключающееся в проявлении видовых и индивидуальных свойств, основанных на координации отдельных функционально-структурных систем в детерминированной среде обитания. Поэтому для сравнения жизнеспособности двух биологических объектов они должны быть подвергнуты одинаковым по мощности экстремальным воздействиям, а по уровню ответной реакции можно будет судить о степени жизнеспособности.

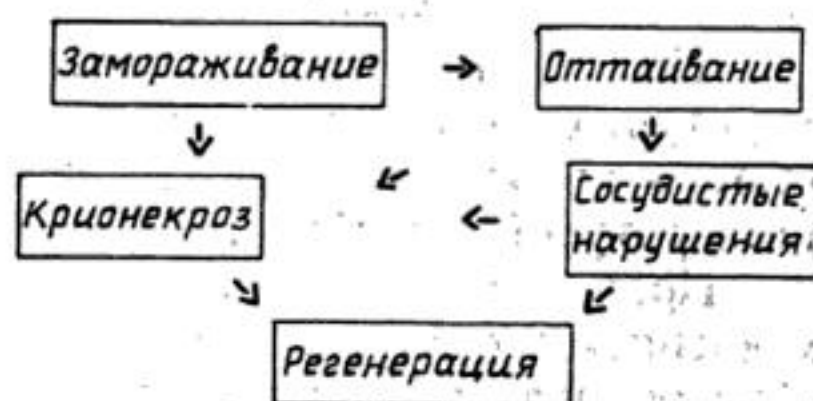


Рис. 1. Изменения в тканях, подвергавшихся криовоздействию

Методы оценки жизнеспособности тканей

Методическая направленность	Уровень организации биообъекта			
	Органный	Тканевой	Клеточный	Субклеточный
Клинико-экспериментальная	Макроскопическая оценка, клиническая симптоматика	Органное культивирование, имплантация	Диссоциированные клеточные культуры	—
Биохимическая	—	Исследование состава соединительной ткани	Определение ферментов, утилизации субстратов, продукции метаболитов, состава культуральной среды	
Морфологическая	Показатели микрогемолимфоциркуляции	Гистологические, цитогистохимические методики, окрасивание	Электронная микроскопия	
Биофизическая	Термография, полярография, определение биопотенциалов, электропроводности, прочности, компьютерная томография, ультразвуковая эхолокация		Хемилюминесценция: ЯМР, ЭПР	
Радиоизотопная	Резорбция индикатора	—	Авторадиография	

Процесс некротизации тканей, подвергавшихся действию низких температур, обусловлен теплопотерями и может быть охарактеризован количеством калорий на единицу массы или скоростью охлаждения и конечной температурой биообъекта.

Процессы льдообразования в суспензионных клеточных системах при медленном и быстром замораживании хорошо изучены [1]. Те же факторы, обуславливая механические повреждения клеток, находящихся в составе тканей, играют большую роль в некротизации последних. Физико-химические изменения, приводящие к деструкции клеток охлажденных тканей, должны лежать в довольно узком температурном диапазоне от 37 до -10°C . Так, температурный шок клеток, обусловленный сложными изменениями в мембранах и цитоскелете клеток, может происходить в донулевой зоне, кристаллизация и рекристаллизация в результате фазового перехода вода — лед (-2°C и ниже) обуславливает формирование механических напряжений, вызывает дегидратацию и пикноз клеток на фоне повышения концентрации электролитов интрацеллюлярной жидкости вплоть до зоны эвтектики. В то же время экспериментально-клинические данные, а также клинический опыт применения холода для деструкции тканей свидетельствуют о возможности сохранения жизнеспособности клеток непосредственно после охлаждения до $-10 \div -15^{\circ}\text{C}$. Обширные клинические наблюдения показывают, что формирование некроза (гангрены) нижних конечностей у людей может развиваться после длительного пребывания при положительных температурах во влажной обуви (так называемая «траншейная» или «болотная» стопа), т. е. одинаковые по степени тяжести низкотемпературные повреждения могут быть получены на разном температурном уровне охлаждения. Это предположение подтверждается результатами исследования в области термических ожогов, которые показывают, что степень тепловой деструкции тканей зависит от величины (мощности) теплоподвода, а не только от их конечной температуры [2]. Под действием криовоздействия формируется некроз, который характеризуется определенной стадийностью.

Патологические изменения в клетках, обусловленные замораживанием и оттаиванием, завершающиеся гибелью уже во время температурных изменений биологического объекта, целесообразно обозначить как первичный некроз. Независимо от того, каким образом выполняется криовоздействие, распылением хладагента или контактным способом, в охлаждаемых тканях возникают температурные перепады (табл. 2). Существенные различия

Таблица 2

Подкожная температура (t , °C) и скорость ее изменения (v , °C/мин) при криоаппликации зондом диаметром 12 мм и температурой при контакте -110 ± 5 °C

Зона	Расстояние от края аппликатора, мм	Время криовоздействия, с													
		0		20		40		60		80		100		120	
		t	v	t	v	t	v	t	v	t	v	t	v	t	v
I	0	28	—	2	180	—22	132	—42	90	—51,6	45	—57	28,2	—61	20,4
II	0 + 4	27	—	23	24	18	35	12	43	3,8	44	—2,8	87	—8,4	27,5
III	4 + 8	27	—	26,2	6,9	27,4	8,7	23,1	12	21,1	13	19	14,4	18,4	15
IV	8 + 12	26	—	25,9	1,6	25,4	4,2	24,6	5,4	23,4	6,3	22	7	20,1	7,6
V	12 + 14	28	—	27,4	3,9	26,7	4,9	26	5,3	25,1	5,4	24	5,1	23,3	4,5
VI	14 + 18	27,8	—	27,6	1,8	27,2	2,8	26,7	3,3	26	3,6	25,4	3,7	24,8	3,4

имеют и величины скоростей охлаждения клеток ткани, расположенных на различном расстоянии от криоаппликатора, т. е. одни клетки подвергаются быстрому замораживанию, другие — медленному. Температурные изменения в клетках тканей, подвергавшихся криовоздействию, неоднородны, в них происходят процессы, обусловленные как медленными, так и быстрыми скоростями замораживания

Существенный вклад в поддержание неоднородности температурных процессов вносит структурная и функциональная гетерогенность клеточных элементов в объеме ткани, подвергавшейся криовоздействию. Совокупность этих клеток различается по своей функциональной активности, генезу и криочувствительности, что не дает возможности одновременно выявить необратимые функционально-структурные изменения, которые до определенного периода времени выглядят как латентные повреждения.

Результаты исследований по изучению механизмов криоповреждения изолированных клеток эукариот, подвергавшихся циклам быстрого и медленного охлаждения-замораживания (рис. 2), позволяют в определенной степени выяснить процесс формирования первичного крионекроза ткани. Не исключено, что в генезе первичного крионекроза главенствующая роль принадлежит клеточным повреждениям, развивающимся во время изменения температуры тканей под влиянием криовоздействия. Формирование вторичного некроза ткани первоначально связано с микрогемодинамическими нарушениями, сопровождающими ее охлаждение — отогревание. Биомикроскопическое исследование гемодинамики русла брыжейки белых крыс и защежных мешков золотистых хомячков показало зональность нарушений кровообращения, зависящую от температуры охлаждения.

Первичной реакцией микрососудов на охлаждение является спазм артериол, что приводит к уменьшению кровенаполнения в капиллярах и вену-

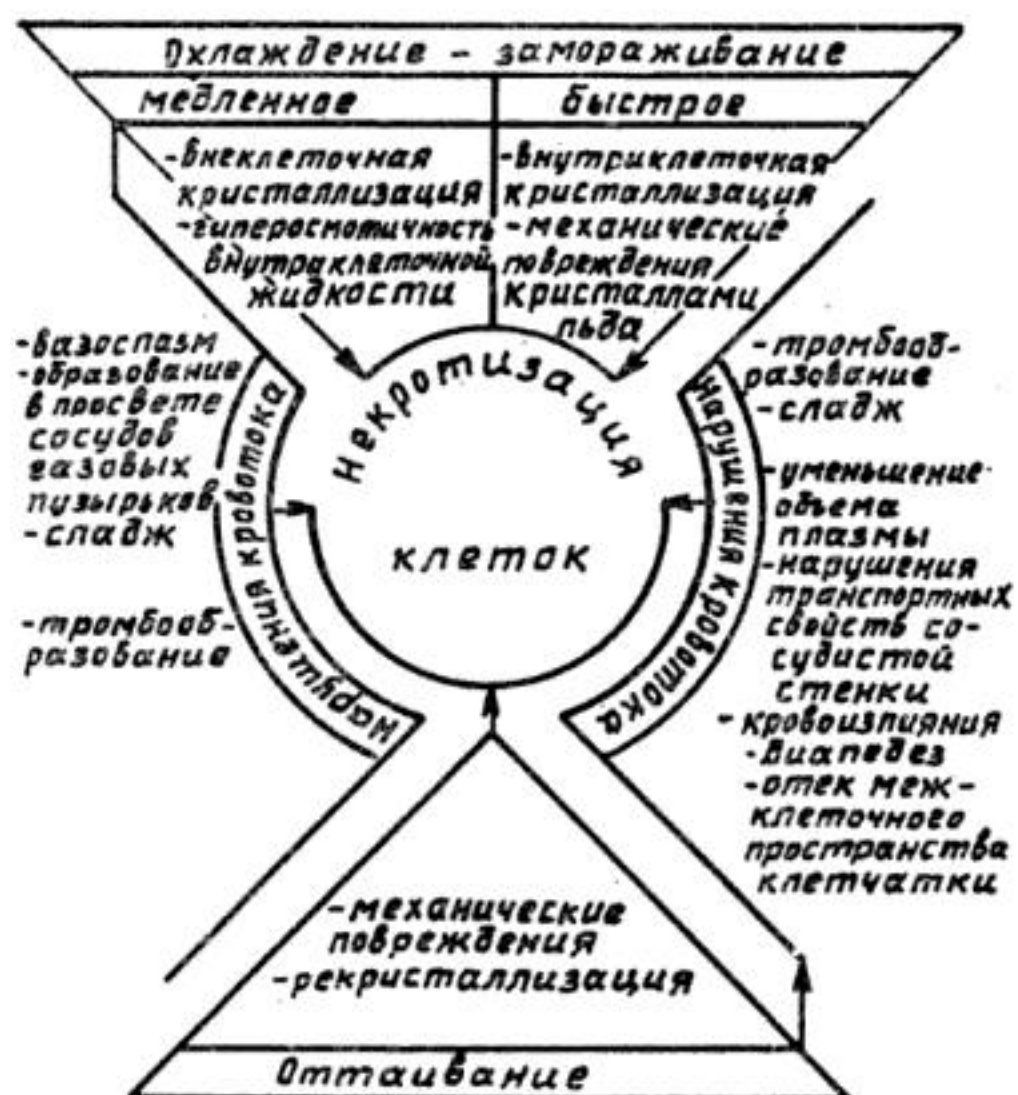


Рис. 2. Патофизиологические механизмы некротизации клеток при замораживании—оттаивании

лах. Дальнейшее понижение температуры сопровождается появлением в просвете кровеносных сосудов газовых пузырьков вследствие снижения растворимости газов, имеющих в жидкой части крови. При захватывании сосудов фронтом льда, кровообращение в них полностью прекращается. Однако в гипотермической зоне ткани оно сохраняется, хотя и в измененном виде. Прежде всего при этом наблюдается ускорение кровотока по шунтам, прекращают функционирование капилляры с извитым строением, а также отходящие под острым углом от приносящего микрососуда, затем на фоне ускоренного кровотока в капиллярах, артериолах и венах происходит их дилатация, образование тромбов, которые могут срываться потоком крови, превращаясь в эмболы. В плазме крови появляются гемолизированные эритроциты.

В тканях, охлажденных без формирования кристаллов льда, после артериолоспазма с последующим уменьшением диаметра капилляров и ве-

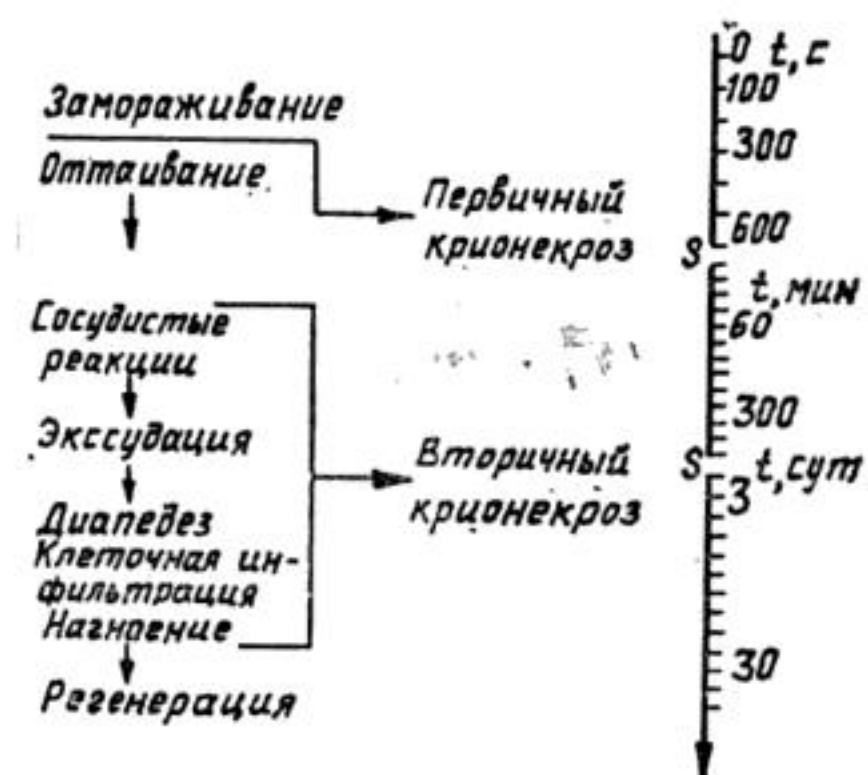


Рис. 3. Причины и сроки развития первичного и вторичного крионекроза тканей

нул возникает дилатация микрососудов, формирование в них белых тромбов, которые могут продвигаться током крови в более мелкие сосуды. Отогревание замерзших тканей сопровождается кратковременным восстановлением кровотока в сосудах артериолярного типа, тогда как в капиллярах и венах оно отсутствует. В гипотермической зоне выявляются нарушения микрогемоциркуляции (сгущение крови, сладж эритроцитов, появление белых тромбов), они носят более выраженный характер и дополняются диapedезом, частичным внутрисосудистым гемолизом. В сроки до 30 мин после оттаивания нарушения микрогемоциркуляции наиболее резко выражены в веноулярном звене.

В периферической зоне, не имевшей температурных изменений в процессе криовоздействия, изменения кровообращения носят волнообразный характер и заключаются в уменьшении показателей тканевой перфузии, что обусловлено первоначальным вазоспастическим эффектом охлаждения. Однако в последующем развивается компенсация, которая протекает на фоне влияний из пограничной зоны: в просвете сосудов имеется окрашивание плазмы в розовый цвет, встречаются мелкие тромбы, сладж эритроцитов.

Сосудистые нарушения более выражены после оттаивания — отогревания, хотя начало их обусловлено охлаждением — замораживанием ткани. Под влиянием сосудистых изменений идет формирование вторичного крионекроза, его последующее развитие обусловлено нарушениями транспортных свойств сосудистой стенки с развитием экссудации и диapedеза элементов крови, инфильтрации и нагноения. Однако окончательное суждение о формировании ишемического некроза тканей, подвергавшихся криовоздействию, может быть представлено в сроки до 6 ч, в течение которых проявляются микрососудистые нарушения. Следовательно, динамическое наблюдение за микрогемоциркуляторным руслом в тканях, подвергавшихся замораживанию — оттаиванию, позволяет с высокой степенью достоверности прогнозировать их жизнеспособность. Для прогнозирования результата холодового воздействия, следовательно, и жизнеспособности охлаждаемых тканей необходимо учитывать временной фактор (рис. 3). Непосредственно после замораживания — оттаивания, продолжающегося, как правило, несколько минут, могут быть оценены объем и выраженность первичного крионекроза. В сроки до 6 ч завершается формирование сосудистых нарушений, вносящих существенный вклад в процесс вторичной не-

критизации, которая продолжается до двух недель. Продолжительность фаз формирования крионекроза обусловлена не только параметрами охлаждения—отогревания, но также видом ткани и ее исходным состоянием. Следовательно, диагностика летальных и обратимых изменений тканей, подвергавшихся криовоздействию, должна базироваться на комплексном изучении состояния структурных элементов и микроциркуляции с учетом теплофизической характеристики процесса и временного фактора.

1. Bald W. B., Fraser J. Cryogenic surgery // Repts. Progr. Phys.— 1982.— 45, N 12.— P. 1381—1434.
2. Stoll A., Chianta M. Method and rating system for evaluation of thermal protection // Aerospace Med.— 1969.— 40, N 11.— P. 1232—1238.

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

Поступила 21.10.86

УДК 612.111.043 : 547.422

Л. В. Цымбал, И. И. Гаврилова, В. А. Моисеев

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ЗРЕЛОГО ОРГАНИЗМА И ПЛОДА ЧЕЛОВЕКА

Выяснение закономерностей реакции клеток и субклеточных структур на экстремальные воздействия способствует расширению применения холода в медицине, совершенствованию способов криоконсервирования биоматериала. Важным моментом в изучении процессов криоповреждения и криозащиты клеток на разных этапах их развития является исследование плазматических мембран как наиболее криолабильных компонентов клетки. Характеристикой нативного динамического состояния мембран являются перестройки их структуры и связанные с ними изменения функции, которые могут быть вызваны как изменением температуры, так и действием других факторов.

Целью настоящей работы является сравнительное изучение чувствительности к низким температурам динамической структуры мембран эритроцитов плода и зрелого организма человека.

Использовали эритроциты донорской крови, отмытые от следов плазмы и консервирующего раствора трехкратным центрифугированием при десятикратном разбавлении изотоническим раствором NaCl. Эритроциты крови семимесячного плода человека отмывали от стабилизирующего раствора и плазмы аналогичным способом. Для исследования физического состояния мембран и цитозоля эритроцитов был применен метод спиновых зондов [1]. Использовали гидрофобные спиновые зонды: 1-оксил-2, 2, 6, 6-тетраметилпиперидинил-4-амид-стеариновой кислоты (I), прегн-4-ен-3, 20-дион- [17 α , 16 α , d] -2', 2'-диметилоксазолидиннитроксид (II) и водорастворимый зонд 1-оксил-2, 2, 6, 6-тетраметил-4-оксопиперидин (III). Готовили меченые образцы и оценивали барьерную функцию мембран в отношении ионов [Fe (CN) $_6$] $^{3-}$ [5]. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре «Брукер» ER 100D (ФРГ) с термоприставкой, точность термостатирования $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Для описания динамической структуры мембран и цитозоля эритроцитов использовали параметры подвижности спиновых зондов h_0/h_- , h_0/h_+ , h_0 , ΔH_0 , где h_0 , h_+ — интенсивности центральной и боковых компонент спектров ЭПР, ΔH_0 — ширина центральной линии спектра. Изменение структуры мембран и цитозоля в области медленных движений качественно оценивали с помощью параметра максимального расщепления спектров

($2A_{\text{макс}}$). Эти параметры характеризуют микровязкость и структурную упорядоченность матрицы, в которую включен спиновый зонд. Известно, что мембрана донорских эритроцитов взрослых людей неоднородна уже при физиологической температуре [2]. Как было ранее показано [4], при понижении температуры мембрана эритроцитов претерпевает структурные перестройки, связанные с увеличением упорядоченности липидов (33°C), изменением белок-липидных взаимодействий около 22°C , структурным переходом, по-видимому, в мембранных белках в области 10°C и резкой иммобилизацией липидов вследствие замораживания объемной воды (-16°).

Мембрана эритроцитов плода человека отличается по динамическим характеристикам от клеток взрослого организма. При физиологической тем-

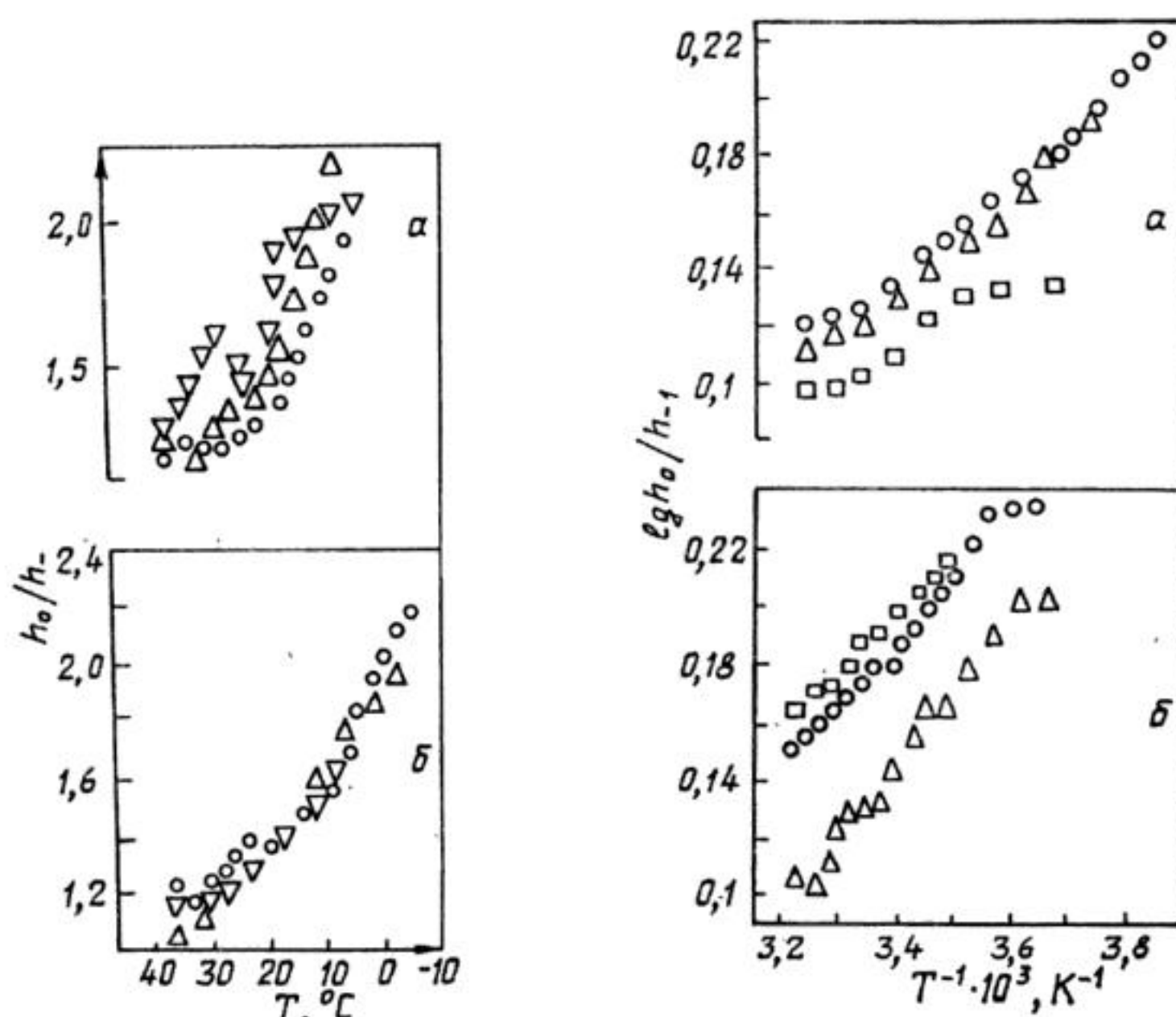


Рис. 1. Температурная зависимость подвижности зонда I в мембранах эритроцитов плода человека (а) и донора (б) без криопротектора (○) и в присутствии 15%-ных растворов α -пропиленгликоля (Δ) и глицерина (∇)

Рис. 2. Кривая Аррениуса для подвижности зонда III в цитозоле эритроцитов плода человека (а) и донора (б) без криопротектора (○) и в присутствии 15%-ных растворов α -пропиленгликоля (Δ) и полиэтиленгликоля с молекулярной массой 2000 ($\square$)

пературе параметры жидкостности обоих типов мембран имеют близкие значения, однако температурозависимые перестройки в мембране эритроцитов плода происходят в более узком интервале температур (рис. 1). Незначительные изменения энергии активации вращения зондов в мембране вплоть до 17°C указывают на отсутствие резких перестроек структуры. Сужение температурного интервала перехода может свидетельствовать о большей кооперативности процесса вследствие меньшей гетерогенности подвижности мембранных компонентов.

При изучении состояния внутриклеточной жидкости эритроцитов взрослого организма показано, что при 20°C происходит структурный переход, сопровождаемый слабым изменением энергии активации подвижности зонда и связанный, по-видимому, с изменением конформации цитоплазматических белков (рис. 2). Структурная перестройка около 7°C сопровождается заметным уменьшением энергии активации, что свидетель-

ствуется о понижении микровязкости, вероятно, вследствие компактизации цитоскелетных белков. Это предположение подтверждается обнаруженными нами структурным переходом в районе 7°C в белках внутренней поверхности мембраны ковалентно меченных эритроцитов. Структурные перестройки цитозоля, наблюдаемые в интервале температур $0 \div -130^{\circ}\text{C}$, связаны с процессом обезвоживания клеток при внеклеточной кристаллизации ($-8 \div -18^{\circ}\text{C}$), затвердеванием внутриклеточной жидкости (-35°C) и с фазовым переходом различных типов связанной воды (рис. 3). При нагревании эритроцитов с той же скоростью ($1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) гистерезис параметров спектров ЭПР отсутствует вплоть до температуры -50°C . Сглаживание перехода при -50°C сопровождается более высокими, по сравнению с этапом охлаждения, значениями микровязкости. Фазовый переход в цитозоле при -25°C приводит к появлению в клетках свободной воды. Барьерная функция мембран нарушается при плавлении внеклеточного льда около 0°C . При этом часть клеток (менее 10%) сохраняется.

При физиологической температуре цитозоль эритроцитов плода человека характеризуется меньшей, по сравнению с донорскими клетками, микровязкостью, вероятно, вследствие большего содержания внутриклеточной воды. Охлаждение клеток приводит к структурным перестройкам в цитозоле при 27 и 0°C (рис. 2), причем эти перестройки сопровождаются значительным увеличением энергии активации вращательной подвижности зонда. При охлаждении эритроцитов ниже температуры внеклеточной кристаллизации структурные переходы в цитозоле наблюдаются до -110°C , свидетельствуя о сохранении фракции подвижной воды вплоть до этой температуры (рис. 3).

Совокупность полученных данных о термотропном поведении эритроцитов донора и плода человека указывает на заметные отличия в состоянии компонентов мембран и цитозоля их клеток. Различия в динамической структуре еще более заметно проявляются при введении в среду суспендирования клеток криопротекторов, которые эффективно взаимодействуют с мембранами [3]. Увеличение липид-липидных взаимодействий в бислое в присутствии криопротекторов тем не менее не приводит к заметному изменению белок-липидных взаимодействий при положительных температурах, о чем свидетельствует наблюдаемый структурный переход при 20°C (рис. 1). Особенности влияния криопротекторов на мембрану и цитозоль эритроцитов плода заключаются в усилении нестабильности структурного состояния мембраны в интервале температур $32 \div 17^{\circ}\text{C}$ и в более выраженном действии на структурные перестройки в цитозоле (рис. 2). Как проникающие, так и не проникающие в клетку криопротекторы сглаживают переход в цитозоле при 27°C , наблюдаемый и в мембране эритроцитов плода. Эти данные позволяют предположить, что кооперативная структурная перестройка в мембране и цитоплазме клеток около 27°C связана с цитоскелетными белками.

Известно, что водный диффузионный обмен в эритроцитах изменяется при 10°C [6], когда, как было выше показано, происходит структурный переход в мембране. Зависимость проницаемости мембраны для молекул зонда III от температуры (рис. 4) свидетельствует о водных путях транспор-

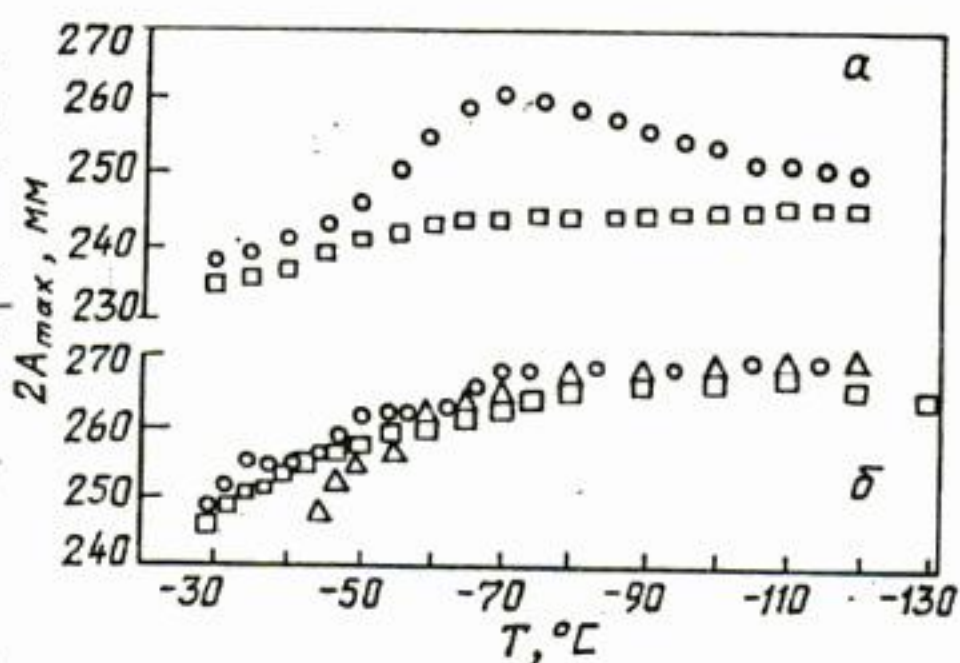


Рис. 3. Температурная зависимость параметра спектра ЭПР $2A_{\text{макс.}}$, мм зонда III в цитозоле эритроцитов плода человека (а) и донора (б) без криопротектора (○) и в присутствии 15%-ных растворов α -пропиленгликоля (Δ) и полиэтиленгликоля с молекулярной массой 2000 ($\square$)

та молекул зонда через мембрану. На общность путей диффузии молекул воды и зонда указывает также сопряженный с обезвоживанием клеток при внеклеточной кристаллизации выход нитроксидов. Уменьшение диффузионного барьера проницаемости воды в условиях гиперконцентрации соли тем не менее не сопровождается изменением путей транспорта воды. Напротив, криопротекторы «сглаживают» изменение проницаемости клеток при белок-зависимом переходе, что отвечает мембранотропному действию этих веществ.

В мембранах эритроцитов плода изменение проницаемости также коррелирует с белок-липидным переходом, причем практически не зависит от температуры вплоть до этой перестройки структуры (рис. 4). Исследованные криопротекторы не влияют на переход при 17°C, однако по-разному изменяют направленность процесса. Увеличение входа молекул зонда в присутствии α -пропиленгликоля в интервале температур $37 \div 0^\circ\text{C}$, в отличие от полиэтиленгликоля с молекулярной массой 2000, подтверждает связь проникающей способности криопротектора с его модифицирующим мембрану действием [3].

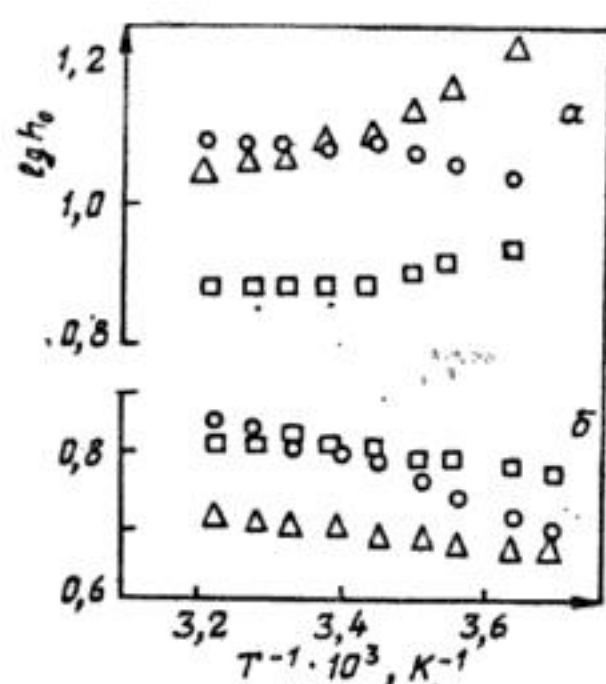


Рис. 4. Температурная зависимость параметра проницаемости мембран для зонда III: эритроцитов плода человека (а) и донора (б) без криопротектора (○) и в присутствии 15%-ных растворов α -пропиленгликоля (△) и полиэтиленгликоля с молекулярной массой 2000 (□)

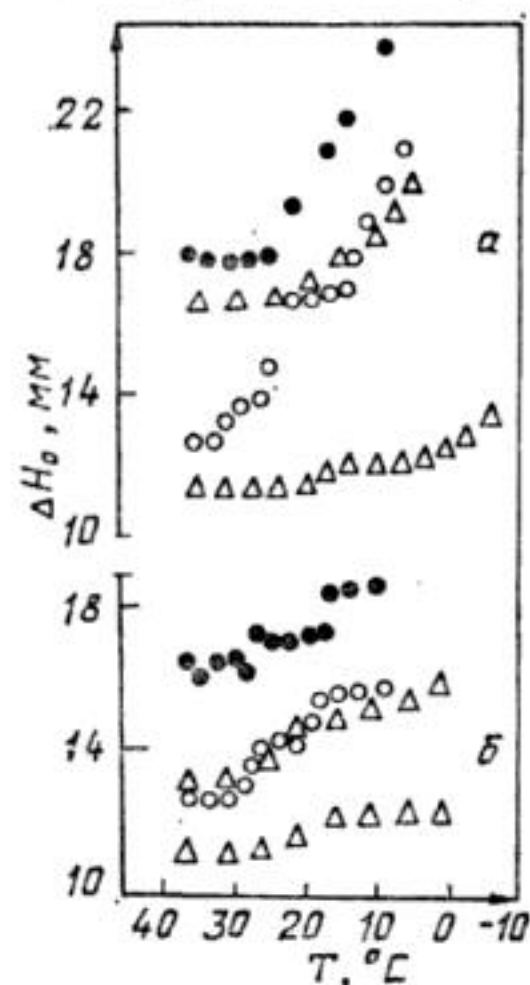


Рис. 5. Температурная зависимость параметра спектра ЭПР ΔH_0 , мм зонда II в мембране эритроцитов плода человека (△, ▲) и донора (○, ●) без криопротектора (а) и в присутствии 15%-ного раствора α -пропиленгликоля (б). Значки, относящиеся к размораживанию, зачернены

При исследовании влияния замораживания на структурное состояние мембран донорских эритроцитов ранее было показано [4], что микровязкость свободных липидов изменяется слабо, наиболее резкие нарушения наблюдаются на уровне белок-липидных взаимодействий. Уширение линий спектров ЭПР стероидного зонда (рис. 5) может быть связано с концентрированием нитроксидов вследствие увеличения жесткости бислоя. Такие же закономерности изменения структуры наблюдаются и в эритроцитах плода, но в отличие от донорских клеток проникающие криопротекторы эффективнее поддерживают нативную жидкость мембраны после размораживания (рис. 5).

Изменение динамической структуры мембраны после замораживания сопровождается нарушением ее барьерных свойств в отношении парамагнитных ионов, причем эритроциты плода повреждаются еще до плавления основной массы внеклеточного льда (в интервале температур от -10 до -5°C). Проникающие в клетки криопротекторы, модифицируя структуру мембраны, сглаживают резкие изменения ее жидкости [3], значительно уменьшают эффекты обезвоживания и способствуют поддержанию клеточ-

ного объема на этапе замораживания. Сохранение динамической структуры мембраны коррелирует с ее целостностью в отношении ионов феррицианида.

Сравнение криозащитного действия полиэтиленгликоля с молекулярной массой 2000 и α -пропиленгликоля при медленном замораживании эритроцитов донора и плода человека показало, что непроникающий криопротектор слабо защищает эритроциты взрослого организма и практически не предохраняет от криповреждения эритроциты плода. Напротив, α -пропиленгликоль достаточно эффективно препятствует нарушению барьерной функции мембран в обоих случаях. Одним из возможных объяснений криозащитной эффективности изученных веществ может быть влияние их на водный диффузионный обмен, характеристики которого обуславливают оптимальные режимы охлаждения и замораживания клеток. Действительно, модификация криопротекторами мембран клеток зрелого организма способствует сохранению проницаемости для воды при температурах ниже белок-липидного перехода. Однако более сложный характер криозащитного действия веществ проявляется не только на эритроцитах взрослых людей, но и еще более отчетливо на эритроцитах плода. В последнем случае криопротекторы в зависимости от проникающей способности по-разному влияют на проницаемость мембран и резко отличаются по криозащитной эффективности.

По-видимому, различная криорезистентность эритроцитов взрослых и плодов связана с обнаруженными отличиями в динамической структуре мембраны. Защитная эффективность криопротекторов, очевидно, зависит от термотропного поведения мембранных компонентов, которое обуславливает направленность возможной модификации мембраны в целях криозащиты.

1. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии.— М.: Наука, 1974.— 256 с.
2. Селезнев С. А. Физическое состояние липидов мембран эритроцитов // Биофизика.— 1977.— 22, № 5.— С. 934.
3. Цымбал Л. В., Гаврилова И. И., Моисеев В. А. Изучение влияния полиспиртов на динамическую структуру биологических мембран методом спиновых зондов // Криобиология.— 1985.— № 3.— С. 20—24.
4. Цымбал Л. В., Моисеев В. А. Исследование термоиндуцированных структурных изменений мембран эритроцитов методом спиновых зондов // Биол. мембраны.— 1985.— 2, № 2.— С. 190—194.
5. А. с. 1049808 СССР, МКИ³ G 01 N 33/48. Способ определения степени деструкции клеток / Л. В. Иванов, И. И. Гаврилова, В. А. Моисеев и др.— Оpubл. 23.10.83., Бюл. № 39.
6. Conlon T., Outhred R. The membrane dependence of erythrocyte water permeability // Biochim. et biophys. acta.— 1978.— 511, N 3.— P. 408—418.

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

Поступила 16.08.85

А. А. Цуцаева, Н. П. Лобасенко

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МОНОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЭКССУДАТА ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ НАТИВНОГО И КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА

Макрофаги перитонеального экссудата являются удобной моделью для изучения динамики восстановительных процессов в организме после облучения и трансплантации нативного и криоконсервированного костного мозга. Целью данной работы явилось изучение динамики накопления и свойств клеток моноцитарно-макрофагального ряда перитонеального экссудата летально облученных реципиентов на разных этапах после трансплантации нативных и криоконсервированных клеток.

Эксперименты проводили на мышах линии (CBA × C57Bl) F₁. Животных перед трансплантацией костного мозга подготавливали по методу, описанному ранее [3]. Криоконсервирование костного мозга до —196 °С под защитой криопротектора ПЭО-400 проводили по методу, разработанному А. А. Цуцаевой и соавт. [1]. Клетки сингенного костного мозга вводили мышам внутривенно по 1×10^7 клеток. Изучение морфофункциональных свойств моноцитарно-макрофагальных элементов перитонеальной полости проводили в динамике, в первые три недели после трансплантации. В эксперименте были 4 группы животных: I, контрольная — интактные мыши; II, контрольная — летально облученные мыши; III, опытная — летально облученные мыши, защищенные нативным костным мозгом (НКМ); IV, опытная — летально облученные животные, защищенные криоконсервированным костным мозгом (ККМ).

О клеточном составе перитонеальной полости мышей судили по процентному содержанию различных типов клеток в мазках, приготовленных из клеточных суспензий, окрашенных азур-II-эозином. Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов определяли через 1 и 4 ч после инкубации клеток со стафилококком-209, убитым нагреванием. О наличии рецепторов судили по процентному содержанию моноцитарно-макрофагальных клеток, образующих розетки с бараньими эритроцитами, сенсibilизированными кроличьей антиэритроцитарной сывороткой [5]. Кислую фосфатазу и неспецифическую эстеразу в клетках определяли гистохимическим методом. Об активности выявляющихся ферментов судили по среднему гистохимическому коэффициенту (СГК) [4]. Полученные экспериментальные данные подвергнуты статистической обработке по методу Фишера — Стьюдента.

Характер и динамика изменения морфофункциональных свойств и количества моноцитарно-макрофагальных элементов опытных животных оценивались в сравнении с аналогичными показателями интактных (контрольных животных) и животных облученных, но не защищенных костным мозгом, только на 1—3 и 6—7 сут пострадиационного периода, так как в более поздний период облучения мыши погибали. Как видно из табл. 1, в клеточном составе перитонеальной полости контрольных мышей преобладали моноцитарно-макрофагальные элементы и лимфоциты, и на 1—3 сут исследования он практически не отличался от такового интактных животных. Однако размер моноцитов и макрофагов уменьшался, цитоплазма этих клеток окрашивалась базофильно, а ядра — гиперхромно. Появлялись разрушенные клетки, клетки с разорванной цитоплазматической мембраной. К 6—7 сут резко снизилось количество моноцитов и макрофагов в перитонеальной полости облученных мышей, более 30 % составляли разрушенные клетки, клетки-тени. При трансплантации животным как нативных, так и криоконсервированных миелокариоцитов в эти сроки в пери-

Таблица 1

Клеточный состав перитонеального экссудата облученных мышей в различные сроки после трансплантации миелокариоцитов, %

Группа животных	Срок исследования, сут	Макрофаги	Моноциты	Лимфоциты	Лаброциты	Двухядерные	Фибробласты	Бласты
		$\bar{x} \pm \bar{x}$	$\bar{x} \pm \bar{x}$	$\bar{x} \pm \bar{x}$	$\bar{x} \pm \bar{x}$	$\bar{x} \pm \bar{x}$	$\bar{x} \pm \bar{x}$	$\bar{x} \pm \bar{x}$
I	—	$23,2 \pm 0,5$	$22,9 \pm 3,4$	$37,9 \pm 3,3$	$6,9 \pm 1,2$	$4,8 \pm 1,4$	$5,0 \pm 0,2$	—
II	1—2	$31,5 \pm 4,2$	$33,2 \pm 3,4$	$35,3 \pm 1,8^b$	$5,5 \pm 1,8$	—	$4,5 \pm 1,1$	—
	6—7	$8,7 \pm 2,1^b$	$8,8 \pm 1,8^b$	$34,0 \pm 1,2$	$8,7 \pm 1,2$	—	$8,3 \pm 2,1^b$	—
III	1—2	$24,4 \pm 3,4$	$30,0 \pm 1,7$	$25,1 \pm 4,2$	$6,6 \pm 1,3^a$	$5,1 \pm 1,3^a$	$7,4 \pm 1,8^e$	$1,2 \pm 0,8$
	6—7	$34,5 \pm 6,1^{b,e}$	$20,6 \pm 6,1^e$	$17,4 \pm 3,1^{b,e}$	$7,5 \pm 1,7$	$6,7 \pm 1,3$	$8,3 \pm 2,4^b$	$5,0 \pm 0,8$
	13—15	$32,3 \pm 3,5^b$	$27,3 \pm 3,2$	$21,6 \pm 2,6^e$	$7,4 \pm 1,5$	$3,3 \pm 1,2$	$4,0 \pm 1,1$	$4,0 \pm 0,9$
	21	$27,5 \pm 2,5^a$	$32,2 \pm 5,1^a$	$27,1 \pm 2,6^{b,e}$	$3,3 \pm 0,8$	$2,5 \pm 0,9^a$	$4,1 \pm 1,6$	$3,3 \pm 1,1$
IV	1—2	$23,8 \pm 2,4$	$30,7 \pm 4,3$	$18,8 \pm 1,5^b$	$9,4 \pm 0,7^e$	$7,5 \pm 1,1^{b,e}$	$7,6 \pm 2,2^e$	$2,2 \pm 1,1$
	6—7	$34,2 \pm 2,8^{b,e}$	$24,4 \pm 7,4^e$	$21,1 \pm 4,1^{b,e}$	$3,7 \pm 0,3^e$	$5,7 \pm 1,8$	$8,4 \pm 1,2$	$2,7 \pm 0,9$
	13—15	$24,5 \pm 3,3$	$30,9 \pm 5,1$	$26,5 \pm 3,1^b$	$7,4 \pm 2,3$	$4,1 \pm 1,1$	$3,0 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,8$
	21	$17,8 \pm 1,7^b$	$17,7 \pm 0,9^b$	$37,8 \pm 1,3$	$7,6 \pm 2,1$	$7,8 \pm 1,4^b$	$6,6 \pm 1,5$	$4,6 \pm 1,3$

Различия достоверны по сравнению с показателями IV группы (a), I группы (b) и II группы (e).

тонеальной полости повышалось содержание макрофагов по сравнению с интактными животными. На этом уровне содержание макрофагов у III группы оставалось и на 13—15 сут, а у животных IV группы в этот период их количество уменьшалось и в последующие сроки продолжало снижаться. Тенденция к увеличению количества моноцитов у животных обеих опытных групп отмечалась на 1—3 и 13—15 сут по сравнению

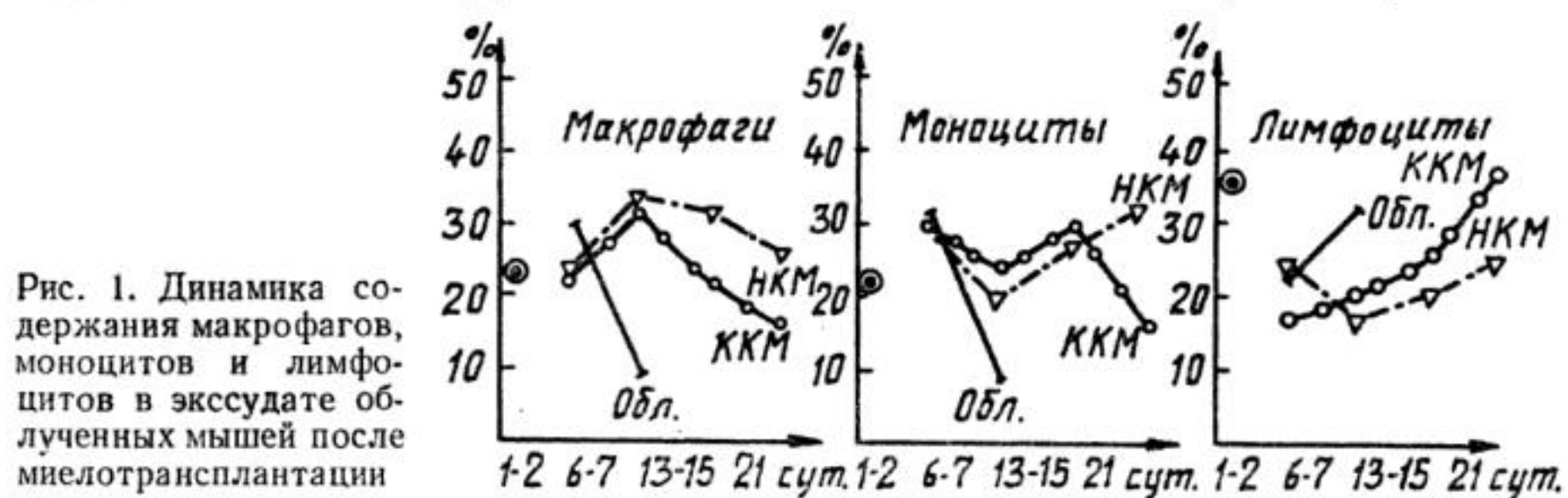


Рис. 1. Динамика содержания макрофагов, моноцитов и лимфоцитов в экссудате облученных мышей после миелотрансплантации

с содержанием этих клеток в перитонеальной полости интактных животных. Повышенное содержание моноцитов оставалось у животных с нативным костным мозгом и на 21 сут. Таким образом, содержание макрофагов возрастало спустя несколько дней после увеличения количества моноцитов.

Описанная динамика изменения моноцитарно-макрофагальных элементов является, видимо, результатом того, что на ранних этапах после миелотрансплантации количество моноцитов повышается в результате их образования из радиорезистентных предшественников. При этом не исключено попадание в перитонеальную полость моноцитарно-макрофагальных клеток из трансплантируемой суспензии миелокариоцитов. До 6—7 сут динамика накопления моноцитарно-макрофагальных клеток в перитонеальной полости реципиентов не зависела от вида миелотрансплантата (рис. 1). С 13—15 сут этот процесс у реципиентов с нативным миелотрансплантатом отличался от такового у животных с криоконсервированным трансплантатом. У животных IV группы выявлялась тенденция к увеличению количества моноцитов и снижению содержания макрофагов по сравнению с ана-

логичными показателями III группы животных. В этот период у животных IV группы несколько изменяется соотношение моноцитарно-макрофагальных клеток по сравнению с III группой. По всей видимости, одной из причин указанных изменений в этот период является торможение процесса образования макрофагов из моноцитов в результате ингибции функциональной активности кроветворных клеток под влиянием криоконсервирования. Причиной изменения соотношения моноцитарно-макрофагальных клеток у животных обеих опытных групп на 6—7 сут, вероятно, является отрицательное влияние гуморальной среды реципиента, свойства которой изменяются под влиянием летального облучения. Несмотря на то, что соотношение моноцитарно-макрофагальных клеток у животных обеих опытных групп приближается к значению этого показателя у интактных животных, начиная с 21 сут количество моноцитарно-макрофагальных клеток у реципиентов IV группы достоверно снижается по сравнению с содержанием таковых у животных III группы. Этот процесс может быть следствием более низкого содержания кроветворных, в том числе коммитированных, предшественников в криоконсервированном миелотрансплантате.

Относительное содержание лимфоцитов у животных обеих опытных групп резко уменьшилось в первые сутки трансплантации миелокариоцитов (рис. 1), а с 13—15 сут их содержание начинало нарастать, видимо, за счет накопления лимфоцитов из трансплантированных кроветворных донорских клеток [2]. Увеличение лимфоцитов в перитонеальной полости животных IV группы скорее всего отражает лишь относительное их увеличение в суспензии на фоне резкого снижения моноцитарно-макрофагальных клеток в этот период. Характеризуя клеточный спектр перитонеальной полости животных в зависимости от стадии посттрансплантационного периода, отмечали такие клетки как лаброциты, фибробласты, двуядерные формы, бластные клетки. В ранние сроки наблюдения количество двуядерных клеток у животных обеих опытных групп было несколько большим, чем у интактных животных. К 13—15 и 21 сут появлялись трех- и четырехядерные клетки, клетки с атипичными фигурами митоза. Появление таких клеток может быть следствием воздействий измененной гуморальной среды реципиента в результате облучения, которое влияет на процессы образования моноцитарно-макрофагальных клеток из предшественников. Относительное количество лаброцитов в перитонеальной полости животных IV группы заметно изменялось в первые 7 дней наблюдения по сравнению с их содержанием у животных остальных групп, однако причины указанных изменений остаются неясными. Динамика изменения содержания фибробластов и бластных форм в перитонеальной полости животных опытных групп колебалось в одних и тех же пределах.

Поглотительная активность клеток перитонеальной полости животных, защищенных костным мозгом, в первые дни после облучения изменялась недостоверно, а в последующие сроки наблюдения отмечалась тенденция к ее нарастанию по сравнению с активностью у интактных животных (табл. 2). Можно предположить, что на поглотительную активность также оказывает влияние микроокружение, которое изменяется под действием облучения, так как у облученных и незащищенных костным мозгом животных поглотительная активность на 6—7 сут резко возрастала по сравнению с активностью клеток у интактных животных.

Поскольку фагоцитарная активность макрофагов тесно связана с активностью лизосомальных ферментов, следующим этапом было изучение содержания кислой фосфатазы, а также неспецифической эстеразы, которые являются маркерами для этих клеток, их наличие и количество позволяют косвенно судить о степени зрелости и функциональной активности макрофагов. Было отмечено, что количество неспецифической эстеразы в моноцитарно-макрофагальных клетках облученных животных было низким, фермент выявлялся в виде слабой диффузной окраски в цитоплазме. В ранние сроки исследования в обеих группах количество эстеразы в клетках

Таким образом, в восстановлении моноцитарно-макрофагальных элементов в перитонеальной полости летально облученных реципиентов преимущественно принимают участие кроветворные клетки донора, что подтверждается исследованиями с использованием кроветворных клеток донора, несущих маркерные хромосомы (мыши линии *CBA/T₆T₆*) [7]. Активный процесс образования моноцитарно-макрофагальных клеток и появление их в перитонеальной полости начинается через 7 сут. Можно предположить, что в раннем постлучевом периоде (1—3 сут) в перитонеальной полости накопление моноцитарно-макрофагальных клеток *in situ* происходит, возможно, из радиорезистентных клеток-предшественников реципиента, сохранившихся после облучения. В литературе имеется сообщение о возможности восстановления пула макрофагов за счет пролиферации местных макрофагов *in situ* в перитонеальной полости [6].

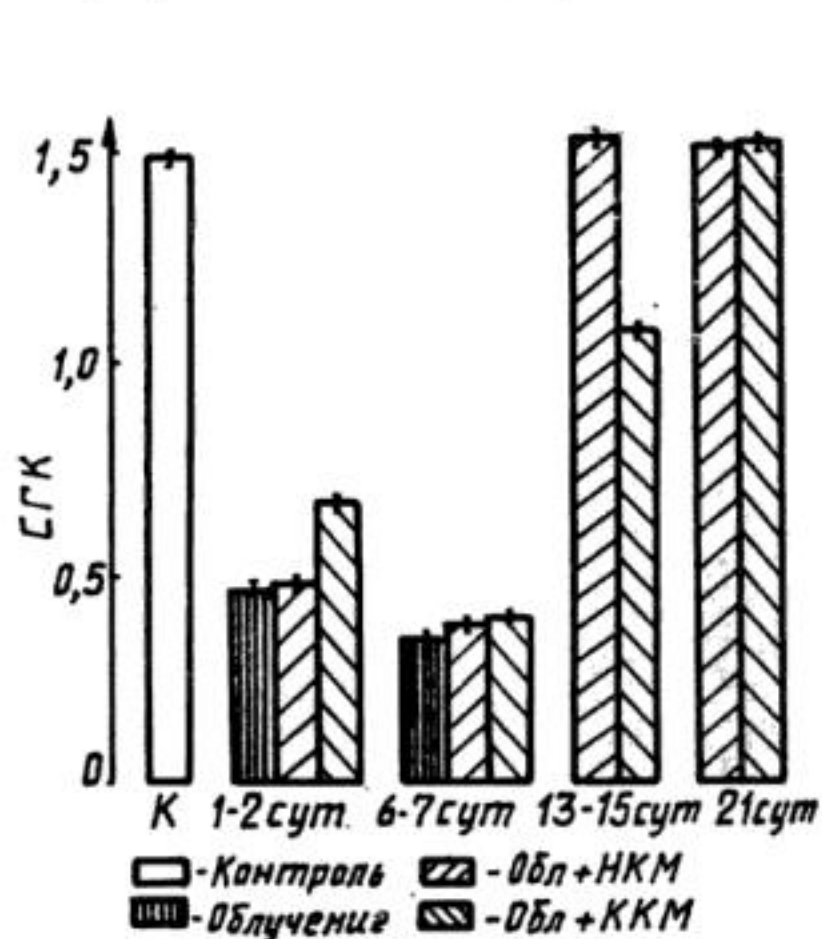


Рис. 2. Динамика содержания неспецифической эстеразы в макрофагах (СГК — средний гистохимический коэффициент)

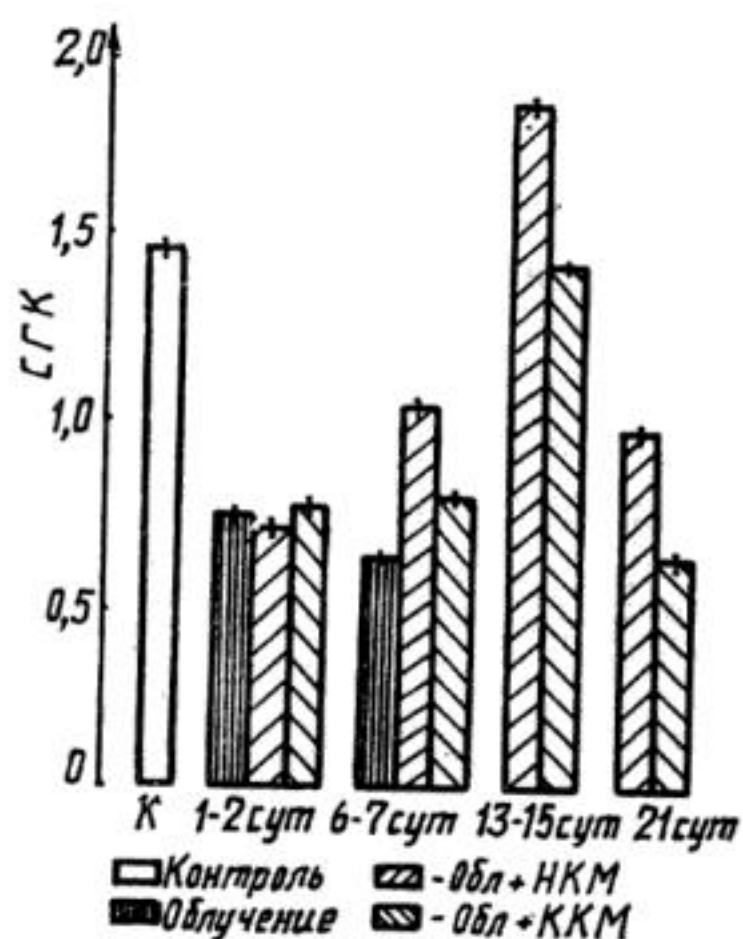


Рис. 3. Динамика содержания кислой фосфатазы в макрофагах (СГК — средний гистохимический коэффициент)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что после криоконсервирования кроветворные клетки сохраняют способность формировать пул моноцитарно-макрофагальных клеток. Динамика изменений, происходящих в клеточном составе моноцитарно-макрофагальных элементов на разных этапах посттрансплантационного периода, не зависела от свойств трансплантируемых кроветворных клеток, изменения касались сроков появления тех или иных категорий клеток, а также сроков обнаружения их в максимальном количестве. Отличие в динамике накопления клеток у реципиентов с криоконсервированными трансплантатами обусловлено торможением процессов пролиферации и дифференцировки кроветворных клеток под влиянием криоконсервирования. Из криоконсервированных клеток функционально полноценные макрофаги образовывались в более поздний период, чем из нативных. Независимо от источника образования отмечена обратно пропорциональная зависимость между содержанием моноцитарных и макрофагальных элементов на всех этапах после трансплантации кроветворных клеток.

1. Цуцаева А. А. Криоконсервирование клеточных суспензий. — Киев: Наук. думка, 1983. — 240 с.
2. Цуцаева А. А., Гольцев А. Н., Дроздова О. А., Останкова Л. В. Влияние низкотемпературной консервации на пролиферативную активность и топографию расселения донорских и трупных колониеобразующих единиц (КОЕ) в облученном организме // Цитология и генетика. — 1980. — 14, № 6. — С. 25—30.

3. Цуцаева А. А., Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г. Сохранность костно-мозговых КОЕ_с, находящихся в разных фазах клеточного цикла при криоконсервировании // Цитология.— 1985.— 27, № 1.— С. 103—106.
4. Astaldi D., Verge T. The glycogen content of the cells of lymphatic leukemia // Acta haematol.— 1957.— 17, N 3.— P. 129—135.
5. Gond I. L. M., Scotte C. V., Furth R. Identification and characterization of the monoblasts in mononuclear phagocyte colonies grown *in vitro* // J. Exp. Med.— 1975.— 142, N 3.— P. 1180—1199.
6. Deacus W., Bakker J. Do resident macrophages proliferate? // Immunology.— 1982.— 161, N 3/4.— P. 204—211.
7. Virolainen M. Hematopoietic origin of macrophages as studied by chromosome markers in mice // J. Exp. Med.— 1968.— 127, N 5.— P. 943—952.

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

Поступила 09.04.86

УДК 57.043.576.5

Е. Г. Семенова

ВНЕПЛАНОВЫЙ СИНТЕЗ ДНК В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Для использования культивированных клеток человека и животных в биологии и медицине необходимо иметь доступный, стандартный и полностью охарактеризованный клеточный материал. Это возможно при создании банков или коллекций клеточных культур, в которых клетки хранятся в жидком азоте при температуре —196 °С. Степень выживаемости клеток после их размораживания и переноса в питательную среду находится в пределах от 20 до 90 %. При исследовании внепланового (репаративного) синтеза ДНК в культивируемых клетках после лучевого повреждения наблюдался высокий уровень его в контроле. Дальнейшие эксперименты показали, что независимо от облучения УФ лучами внеплановый синтез ДНК обнаруживается в клетках сразу после перевода их из замороженного состояния в культуру. Настоящая работа посвящена изучению повреждения и репарации ДНК в культивируемых клетках в разные сроки после криоконсервации.

Работа проводилась на культурах клеток крысы ХС-Д (диплоидная) и ХС-Т (тетраплоидная), полученных И. И. Фридлянской путем клонирования линии ХС-опухоли, трансформированной вирусом саркомы Рауса, клетках китайского хомячка *CHO-K1* («Флоу лабораторис», Англия) и фибропластах мыши *LSM* [4]. Культуры ХС-Д, ХС-Т и *LSM* росли на среде Игла (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Москва) с добавлением 10—15 % сыворотки крупного рогатого скота (Мясокомбинат, Киев), а клетки *CHO-K1* — на среде *F₁₂* («Флоу лабораторис», Англия) и 10 %-ной эмбриональной бычьей сыворотке (БелНИИЭМ, Минск). Все культуры были свободны от микоплазм.

Культуры, использованные в опытах, замораживали в присутствии 10 % ДМСО и хранили в жидком азоте в течение 2—5 лет в банке Института цитологии АН СССР. Все культуры клеток взяты из банковских закладок. Криоконсервацию проводили на программном замораживателе типа ЗПБ-1 по программе I (с включением второго этапа после кристаллизации при —16 °С). Деконсервацию осуществляли путем отогрева в аппарате РТ-3 при 40 °С в течение 80 с. После размораживания ампулу с клетками центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин и удаляли среду. Затем клетки ресуспендировали в 1 мл свежей среды без криопротектора и вводили во флакон с 5 мл среды. Через 24 ч вновь меняли среду, чтобы удалить по-

гибшие клетки и обломки. Внеплановый синтез ДНК исследовали в клетках на 0—3 пассажах после размораживания, т. е. через 3—5 ч и 2, 5, 7, 12, 14 и 17 сут после криоконсервации. Облучение клеток УФ лучами проводилось с помощью лампы БУВ-30 с преобладающим излучением 254 нм на расстоянии 150 см от источника при интенсивности 0,43 Дж/м² · с.

Любая асинхронная культура клеток, которая не подвергалась никакому экспериментальному воздействию, состоит на 45—50 % из клеток,

Таблица 1

Включение ³H-тимидина в ДНК клеток ХС-Д и ХС-Т после криоконсервации и при УФ облучении

Опыт	Время после размораживания, сут	Культура	Доза облучения, Дж	Распределение клеток в популяции по интенсивности метки, %		
				Сильномеченные	Слабомеченные	Немеченные
1	5	ХС-Д	—	40,9 ± 1,5	59,1 ± 1,5	0
		ХС-Д	10	37,1 ± 0,8	62,9 ± 0,8	0
		ХС-Т	—	56,5 ± 1,5	43,5 ± 1,5	0
		ХС-Т	10	48,0 ± 1,0	52,0 ± 1,0	0
	7	ХС-Д	—	45,2 ± 1,5	54,8 ± 1,5	0
		ХС-Д	10	48,3 ± 1,5	44,4 ± 1,5	7,3 ± 8,0
		ХС-Т	—	55,0 ± 1,5	42,0 ± 1,5	3,0 ± 0,5
		ХС-Т	10	41,4 ± 1,2	54,5 ± 1,6	4,1 ± 0,7
	12	ХС-Д	—	48,4 ± 1,5	4,0 ± 0,6	47,6 ± 1,5
		ХС-Д	10	44,0 ± 1,5	56,0 ± 1,5	0
		ХС-Т	—	45,1 ± 1,5	2,4 ± 0,4	52,5 ± 1,5
		ХС-Т	10	47,0 ± 1,5	53,0 ± 1,5	0
2	5	ХС-Д	—	40,5 ± 1,1	55,7 ± 1,1	4,0 ± 0,9
		ХС-Т	—	55,2 ± 1,1	41,6 ± 1,1	3,2 ± 0,7
	7	ХС-Д	—	44,4 ± 1,0	55,6 ± 1,0	0
		ХС-Т	—	50,0 ± 1,0	50,0 ± 1,0	0
	12	ХС-Д	—	47,4 ± 1,2	3,2 ± 0,7	49,4 ± 1,2
		ХС-Д	10	39,3 ± 1,2	58,4 ± 1,2	2,3 ± 0,3
		ХС-Т	—	53,5 ± 1,8	44,8 ± 1,6	2,1 ± 0,4
		ХС-Т	10	43,5 ± 1,5	56,5 ± 1,5	0
	17	ХС-Д	—	38,4 ± 1,2	3,1 ± 0,7	58,5 ± 1,2
		ХС-Д	10	47,4 ± 1,2	41,5 ± 1,2	11,1 ± 0,3
		ХС-Т	—	52,3 ± 1,2	6,1 ± 0,6	41,6 ± 1,2
		ХС-Т	10	50,5 ± 1,2	49,5 ± 1,2	0

щали во флаконы с питательной средой. В среду вводили ³H-тимидин в концентрации 18,5 × 10⁴ МБк/мл и инкубировали в течение двух часов. Культуру отмывали от изотопа в растворе Хенкса с немеченым тимидином и фиксировали смесью Карнуа. Препараты покрывали эмульсией («Илфорд», Англия) и выдерживали в холодильнике в течение трех недель.

При микроскопировании клетки разделяли на три группы: сильномеченные (свыше 70 зерен над ядром), слабомеченные (11—70 зерен) и немеченные (5—10 зерен над ядром, фон). Показателем внепланового синтеза ДНК служило увеличение числа слабомеченных клеток за счет уменьшения числа немеченых без сколько-нибудь значительного изменения числа сильномеченных клеток. В каждом варианте подсчитывали 1000—2000 клеток. На гистограммах, которые подчиняются закону нормального распределения, зерна подсчитывали над ядрами 100 клеток (объектив × 90). Средняя ошибка

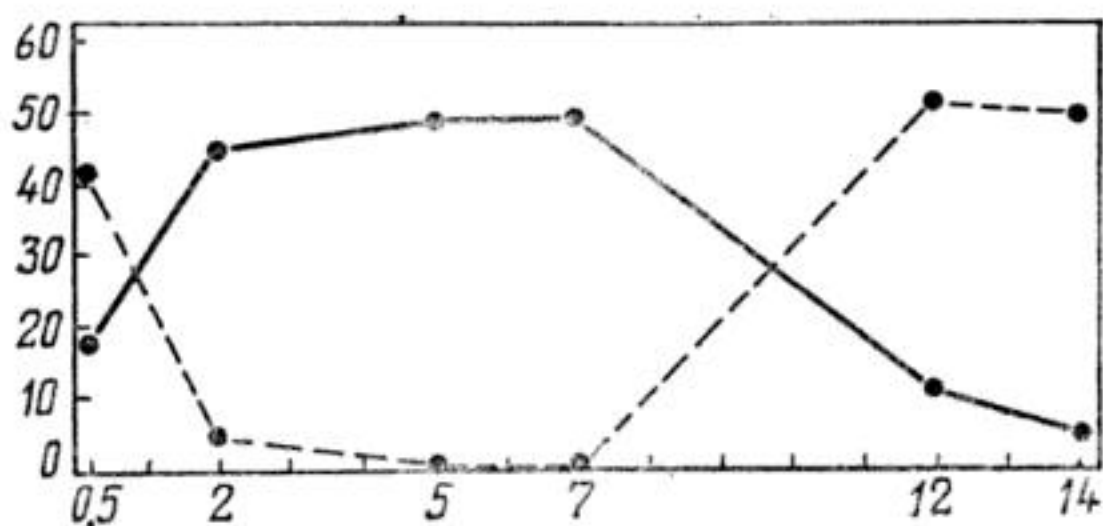
вычислялась по формуле $m = \frac{\sqrt{a(n-a)}}{n}$, $m \% = \frac{m \cdot 100\%}{n}$ [5].

находящихся в фазе S, и на 55—50 % из клеток, находящихся в фазах G₁, G₂ и M. Около 2—6 % последних имеют обычно слабую метку выше фона, в этих клетках наблюдается спонтанный внеплановый синтез ДНК. После лучевых и нелучевых воздействий в клетках, находящихся в несинтетических фазах, появляется слабая метка, т. е. в клетках идет внеплановый синтез ДНК, обнаруживаемый с помощью метода автордиографии. Впервые это явление на клетках в культуре было описано в работах Расмуссена и Пайнтера [6]. Нами исследовано распределение клеток в асинхронной и синхронизированной культурах *HeLa* Ж-63 по интенсивности метки [2].

Внеплановый синтез изучали методом автордиографии с помощью ³H-тимидина (удельная активность 0,79 ТБк/ммоль). Клетки высевали в пенициллиновые флаконы на покровные стекла и инкубировали перед облучением 48 ч. При облучении УФ лучами стекла с клетками извлекали из флаконов, а затем после облучения вновь помещали

В табл. 1 приведены результаты исследования ДНК в клетках ХС-Д и ХС-Т после криоконсервации и УФ облучения. Как видно из таблицы, число клеток со слабой меткой в этих культурах на 5—7 сут значительно и лишь на 12 сут (1-й опыт) и на 17 сут (2-й опыт) оно нормализуется, т. е. составляет 2—6 %. Облучение УФ лучами в дозе 10 Дж на 5—7 сут ничего не меняет в распределении клеток по группам, а на 12—17 сут приводит

Рис. 1. Распределение клеток СНО-К1 по интенсивности метки в разные сроки после криоконсервации (без учета клеток, находящихся в стадии репликации); — слабомеченные клетки; --- немеченные клетки. По оси абсцисс—срок после криоконсервации, сут; по оси ординат—число клеток, %



к перераспределению клеток и переходу их из группы немеченых в группу со слабой меткой. В этих клетках после УФ облучения, как и в *HeLa* [3], идет внеплановый синтез ДНК.

Как видно из табл. 2 и рис. 1, в течение первых нескольких часов после размораживания число клеток линий СНО—К1 и LSM со слабой меткой лишь слегка превышало их количество в культурах через 14 сут после криовоздействия. Наибольшее число клеток со слабой меткой наблюдали на 2—7 сут, т. е. в это время интенсивно шла репарация ДНК, и к 14 сут обе культуры приходили в нормальное состояние. Необходимо отметить также, что не только репарационная система начинает работать не сразу после размораживания, но и репликативный синтез ДНК постепенно набирает силу, так как на автографах через 3—5 ч после размораживания репликативный синтез ДНК наблюдается в отдельных частях ядер, и он не столь интенсивен, как через 2 сут и позже (табл. 2).

Из таблиц видно, что внеплановый синтез ДНК в четырех культурах после криоконсервации и УФ облучения идет сходным образом. Подтверждением этого служит анализ гистограмм (рис. 2): интенсивность внепланового синтеза ДНК (по числу зерен над ядрами клеток) после криоконсервации (5—7 сут) и УФ облучения (17 сут) у диплоидных (а, б, е) и тетраплоидных (ж, з, м) клеток проходит одинаково. После криоконсервации и УФ облучения наибольшее число клеток с внеплановым синтезом ДНК у диплоидной культуры имеет 15 зерен (а, в, г, е), а у тетраплоидной — 30 зерен над ядром (ж, з, к, м). Известно, что после облучения клеток дозой 10 Дж реплицирует только 15—18 % репарированной ДНК [7], причем

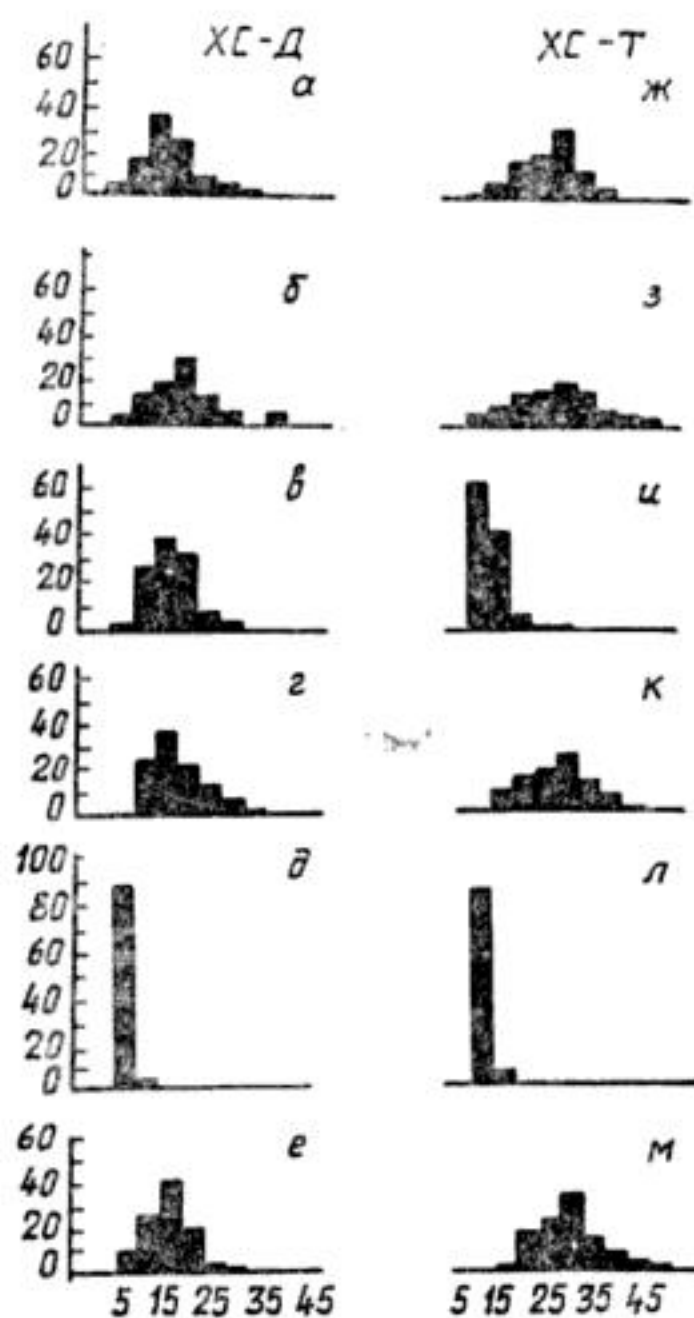


Рис. 2. Гистограмма распределения клеток ХС-Д и ХС-Т по числу зерен над ядром после криоконсервации и УФ облучения (без учета клеток, находящихся в стадии репликации): а—5 сут; б—7 сут; в—12 сут, облучение; г—17 сут; е—17 сут, облучение. По оси абсцисс—число зерен над ядром клетки; по оси ординат — число клеток, %

Таблица 2

Включение ^3H -тимидина в ДНК клеток *CHO-K1* и *LSM* после криоконсервации

Время после размораживания, сут	Культура	Распределение клеток в популяции по интенсивности метки, %		
		Сильно-меченые	Слабamente-меченые	Немеченые
3—5 ч	<i>CHO-K1</i> <i>LS M</i>	$39,7 \pm 1,5$ $33,8 \pm 1,5$	$17,9 \pm 1,2$ $8,9 \pm 0,8$	$42,4 \pm 1,5$ $57,3 \pm 1,5$
2	<i>CHO-K1</i> <i>LS M</i>	$49,8 \pm 1,5$ $54,8 \pm 1,6$	$45,6 \pm 1,5$ $45,2 \pm 1,6$	$4,6 \pm 0,6$ 0
5	<i>CHO-K1</i> <i>LS M</i>	$52,1 \pm 1,6$ $52,1 \pm 1,6$	$47,9 \pm 1,6$ $47,9 \pm 1,6$	0 0
7	<i>CHO-K1</i> <i>LS M</i>	$50,6 \pm 1,6$ $47,5 \pm 1,5$	$49,4 \pm 1,6$ $49,6 \pm 1,5$	0 $2,9 \pm 0,3$
12	<i>CHO-K1</i> <i>LS M</i>	$37,6 \pm 1,5$ $46,7 \pm 1,5$	$11,1 \pm 0,9$ $4,8 \pm 0,6$	$51,3 \pm 1,5$ $48,5 \pm 1,5$
14	<i>CHO-K1</i> <i>LS M</i>	$47,9 \pm 1,5$ $50,2 \pm 1,6$	$4,7 \pm 0,6$ $5,0 \pm 0,7$	$47,4 \pm 1,5$ $44,8 \pm 1,6$

внеплановый синтез продолжается три часа [3], а после криоконсервации с одинаковой интенсивностью идет в течение многих дней, но неизвестна степень восстановления исходного состояния ДНК.

В данной работе при криоконсервации клеток наблюдалось повреждение и репарация ДНК. Поэтому любое воздействие (экспериментальное) на клетку можно начинать не раньше, чем через 15—17 дней после размораживания, т. е. тогда, когда клетки придут в нормальное состояние. Таким образом, полученные данные позволяют считать, что при криоконсервации наряду с повреждением мембран [1] происходит повреждение ядра клетки.

1. Грищенко В. И. Современные тенденции развития криобиологии и криомедицины // Криобиология.— 1985.— № 1.— С. 3—5.

2. Парибок В. П., Семенова Е. Г. Стимуляция синтеза ДНК при действии рентгеновых лучей на культуру *HeLa* // Цитология.— 1969.— 11, № 4.— С. 469—475.
3. Парибок В. П., Семенова Е. Г. Внеплановый синтез ДНК и репарация сублетально поврежденных излучениями клеток *HeLa* Ж-63 // Цитология.— 1970.— 12, № 11.— С. 1423—1432.
4. Семенова Е. Г., Хоменко А. В., Мамаева С. Е. Изменение продолжительности клеточного цикла и кариотипа клеток *L* мыши при смене способа культивирования // Цитология.— 1984.— 24, № 10.— С. 1156—1160.
5. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков.— М: Медицина, 1963.— 157 с.
6. Rasmussen R. E., Painter R. B. Radiation-stimulated DNA synthesis in cultured mammalian cells // J. Cell. Biol.— 1966.— 29, N 1.— P. 11—19.
7. Rasmussen R. E., Reisner B. L., Painter R. B. Normal replication of repaired human DNA // Intern. J. Radiat. Biol.— 1970.— 17, N 3.— P. 285—290.

Ин-т цитологии АН СССР,
г. Ленинград

Поступила 13.10.86

УДК 57.043

А. В. Дегтярев, В. А. Бондаренко, А. М. Белоус

ХОЛОДОВЫЙ ШОК ФОСФОЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ. ВЛИЯНИЕ ОХЛАЖДЕНИЯ НА БАРЬЕРНЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН

Известно, что в температурной зоне основного фазового перехода липидов барьерная функция мембран фосфолипидных везикул может нарушаться [8]. Особенно сильно этот эффект проявляется на бислоях из гомогенных синтетических липидов [5]. Предполагается, что каналами утечки ионов и неэлектролитов могут являться дефекты упаковки липидных молекул, формируемые на границах раздела «твердых» и «жидких» доменов в бислое [5]. В везикулах из липидных смесей и природных мембранах механизм нарушения барьерной функции более сложный [8]. Помимо этого, фазовые переходы в локальных регионах мембраны и связанные с ними фа-

зовое разделение липидов и агрегация белков могут оказывать существенное влияние на различные функции мембраны [1]. Охлаждение в интервале температур, включающем зону фазового перехода липидов, может привести к выходу маркера из везикул. При температурах выше фазового перехода фосфолипидный бислой является хорошим барьером для ионов, глюкозы и сахарозы [8], а пассивная проницаемость в данном случае обусловлена наличием стохастических пор [5]. Тем не менее имеются данные о том, что охлаждение везикул из яичного лецитина в изотонических условиях от 25 до 5 °С, т. е. в зоне температур выше фазового перехода данного липида, приводит к выходу включенного маркера (^{14}C — глюкозы) [11]. Указанное явление имеет определенное сходство с повреждением некоторых типов клеток при охлаждении в зоне положительных температур, обычно называемым холодовым шоком [1].

При холодовом шоке клеток неясен, однако, сам механизм лизиса, который может быть связан как с коллоидно-осмотическим набуханием при нарушении ионного равновесия на мембране, так и с влиянием на липидный бислой других компонентов мембраны и окружающей среды — белков и ионов [1]. Представляет интерес выяснить особенности холодового шока фосфолипидных везикул в условиях, когда процесс лизиса зависит от гидратационного радиуса, концентрации включенного в везикулы осмотически активного вещества (ОАВ) и изменения концентрации ОАВ в окружающей среде (т. е. оценить роль факторов, существенных при коллоидно-осмотическом лизисе). Важно также оценить зависимость процесса лизиса от исходных осмотических условий и их изменения в процессе охлаждения, а также от размеров везикул.

В настоящей работе исследовались нарушения барьерной функции мембран униламеллярных фосфолипидных везикул при изменении осмотических и температурных условий среды в интервалах $10 \div 1140$ мМ и $22 \div 0$ °С. Сходство механических свойств мембран липидных везикул и липидной части биологических мембран [2, 10], а также относительная простота анализа поведения искусственных липидных систем при охлаждении позволяют более глубоко понять процессы, развивающиеся в аналогичных условиях в клеточных мембранах.

В работе использовали яичный лецитин производства Харьковского завода бакпрепаратов, дицетилфосфат («Серва»), холестерин («Кальбиохем»). Чистоту липидов контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). В качестве маркеров использовали K^+ и дитиодинитробензойную кислоту (DTNB). Яичный лецитин подвергали дополнительной очистке методом ТСХ. Трис-буфер («Кальбиохем») использовали без дальнейшей очистки. Остальные реактивы были марки «х. ч.».

Фосфолипидные везикулы получали методом обращения фаз упариванием [12] из яичного лецитина, дицетилфосфата и холестерина в молярном соотношении 100 : 10 : 3 при температуре 22 °С. Включаемые буферные растворы содержали 10 мМ трис-буфера, 0,1 мМ EDTA, 10 мМ DTNB, 270 мМ сахарозы, pH 7,5, или 10 мМ трис-буфера, 0,1 мМ EDTA, 10 мМ DTNB, 100 мМ KCl, pH 7,5. Смесь липидов растворяли в 4 мл диэтилового эфира и, добавив 1 мл включаемого буфера, озвучивали 1 мин на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т. Концентрация липидов была равна 10 мг на 1 мл включаемого раствора. Полученную эмульсию упаривали на ротационном испарителе [12]. В процессе обращения фаз вместе с эфиром терялась часть воды и включаемый раствор концентрировался. Внешний буфер подбирался путем быстрого смешивания аликвот полученной суспензии везикул с растворами, содержащими различное количество ОАВ (NaCl или сахарозы) в спектрофотометрической кювете. Изотонической считали среду, при ресуспендировании в которой не наблюдалась релаксация объема везикул (светопропускания суспензии). Известно [12], что метод обращения фаз дает гетерогенную по размерам популяцию уни- и олиголамеллярных везикул с некоторой примесью многослойных липосом.

Везикулы трижды отмывались в подобранном изотоническом буфере, содержащем 10 мМ *трис*—HCl, 350 мМ сахарозы, pH 7,5, или 20 мМ *трис*—HCl, 160 мМ NaCl, pH 7,5, центрифугированием при 18 000 *g* 15 мин. Температура поддерживалась на уровне 22 °C. Разделение по размерам осуществляли последовательным центрифугированием суспензии везикул, в которые была включена сахароза, в 180 мМ растворе NaCl, содержащем 10 мМ *трис*—HCl, pH 7,5, при 3 000 *g* (фракция I), 6 000 *g* (фракция II) и 18 000 *g* (фракция III) по 10 мин. Везикулы, осажденные при 3 000 *g*, имели сферическую форму и диаметры от 3 до 30 мкм (определенные методом оптической микроскопии). При этом отмечалось максимальное число везикул, имеющих диаметр 5 ÷ 7 мкм. После центрифугирования при 6 000 *g* основное количество осажденных везикул при наблюдении в микроскоп имело вид точек, диаметром около 1 мкм и менее, хотя отдельные везикулы имели диаметр до 5 мкм. Везикулы, осажденные при 18 000 *g*, визуально не обнаруживались.

Выход включенного *DTNB* определяли после осаждения везикул центрифугированием при 30 000 *g* 15 мин по поглощению света супернатантом в присутствии 2 мМ восстановленного глутатиона (*GSH*) при длине волны 420 нм. Концентрацию K^+ в супернатанте измеряли методом пламенной фотометрии на ПАЖ-1.

Выход *DTNB* как функцию температуры рассчитывали из кривых зависимостей светопропускания суспензии везикул при 420 нм, полученных в реальном масштабе времени и температуры при охлаждении в отсутствие и в присутствии *GSH* по формуле:

$$L_{DTNB} = \frac{\ln \tau^*(T) - \ln \tau(T)}{\ln \tau_\infty} \cdot 100, \quad (1)$$

где L_{DTNB} — процент вышедшего маркера; $\tau = \frac{I}{I_0}$ — светопропускание суспензии везикул; I и I_0 — световые потоки, пропускаемые соответственно суспензией и буферным раствором; $\tau^* = \frac{I^*}{I_0}$ и $\tau_\infty = \frac{I_\infty}{I_0}$ — светопропускание суспензии в присутствии 2 мМ *GSH* соответственно без и с добавлением 0,5 % тритона X-100, полностью растворяющего мембраны везикул. Добавка одновременно тритона X-100 и липида не изменяла светопропускания системы *DTNB*—*GSH*. Температурная зависимость $\tau_\infty(T)$ была линейной с крутизной $15 \cdot 10^{-4}$ единиц на градус и при обработке полученных данных не учитывалась.

Выход сахарозы оценивали по изменению светопропускания суспензии везикул при 420 нм по формуле:

$$L_{сах} = \frac{\ln \tau_B(T) - \ln \tau(T)}{\ln \tau_B(T) - \ln \tau_\infty(T)} \cdot 100, \quad (2)$$

где $L_{сах}$ — количество вышедшей сахарозы в процентах; $\tau(T)$ — светопропускание суспензии; $\tau_B(T)$ — прямая с наклоном, равным наклону $\tau(T)$ в начальной фазе охлаждения; $\tau_\infty(T)$ — светопропускание суспензии при полной потере везикулами включенной сахарозы измеряли при разбавлении суспензии дистиллированной водой в соотношении 1 : 30 до той же концентрации липидов, что и в цикле охлаждения — нагрева.

Теоретическое обоснование правомерности использования формулы (2) заключается в том, что рассеяние света сферической везикулой зависит как от ее размера, так и от разности показателей преломления внутренней и внешней среды [13]. Потеря сахарозы приводит к резкому уменьшению разности показателей преломления внешней и внутренней среды и увеличению светопропускания суспензии везикул. Следует подчеркнуть, что за-

метного увеличения диаметра сферической везикулы при лизисе не происходит, так как бислой способен увеличить свою площадь не более чем на 2 %. Дальнейшее растяжение мембраны приводит к образованию поры [2]. Поэтому просветление суспензий полностью определяется выходом сахарозы и *DTNB* (в отсутствие *GSH*) во внешнюю среду, что подтверждается данными, полученными методом светорассеяния и приведенными на рис. 1. Увеличение $\tau(T)$ в отсутствие *GSH* и уменьшение $\tau(T)$ в присутствии *GSH* симметричны относительно базовой линии $\tau_B(T)$. Обе кинетические зависимости τ от температуры в цикле охлаждения — нагрева дают одну и ту же критическую температуру начала лизиса, определяемую на уровне 1 % выхода сахарозы или *DTNB*.

Измерение светопропускания суспензии производили на установке для исследования малоуглового светорассеяния. Установка создана на базе монохроматора спектрофотометра СФ-4А, укомплектована высокостабильным блоком питания лампы накаливания, системой термостабилизации кюветы в парах азота, магнитной мешалкой и системой измерения температуры суспензии при помощи медь-капельной термодпары. Ток фотодиода усиливается усилителем У5-11 и регистрируется как функция температуры двухкоординатным самописцем ПДП-4-002. Расходимость регистрируемого пучка света при помощи цилиндрической линзы и дополнительных диафрагм уменьшена до 3°. Скорость сканирования температуры составляла $5 \div 6^\circ\text{C}/\text{мин}$. Погрешность измерения температуры не превышала $\pm 0,2^\circ\text{C}$. Долговременная нестабильность и шумы измерительного канала не превышали 0,001.

Осмотический шок проводили быстрым смешиванием суспензии везикул, отмытых в изоосмотическом буфере (160 мМ NaCl), с растворами, содержащими различное количество NaCl ($0 \div 1,2 \text{ М}$) в соотношении 1 : 16 при помощи спаренных шприцов и смесителя. Время смешивания составляло около 20 мс. Малый шприц термостатировался при 22°C , а большой — при 0°C . Конечная температура суспензии после смешивания не превышала 4°C . В контроле смешивание производили при 4 или 22°C . После смешивания при 22°C охлаждение суспензии до 0°C производили помещением пробирки в ледяную баню на 10 мин. Усредненная скорость охлаждения в этом случае составляла $30^\circ\text{C}/\text{мин}$.

На рис. 2 представлены результаты, полученные в серии опытов с быстрым изменением концентрации NaCl и температуры. В везикулы включали буфер, содержащий KCl, концентрация NaCl изменялась от 160 до $10 \div 1140 \text{ мМ}$, а температура — от 22 до 4°C за 20 мс. Контролем служила серия опытов, в которых везикулы подвергались изотермическому осмотическому стрессу при 22 и 4°C . Кроме того, для оценки вклада собственно охлаждения суспензия подвергалась осмотическому стрессу при 22°C , а затем охлаждалась до 0°C со скоростью $30^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Из полученных данных видно, что при переносе везикул в изо- и гипертонические растворы NaCl во всех вариантах опытов как в изотермических условиях, так и при охлаждении существенного выхода *DTNB* не происходит. При переносе в гипотонические растворы NaCl развивается лизис везикул, причем как предварительное охлаждение суспензии везикул

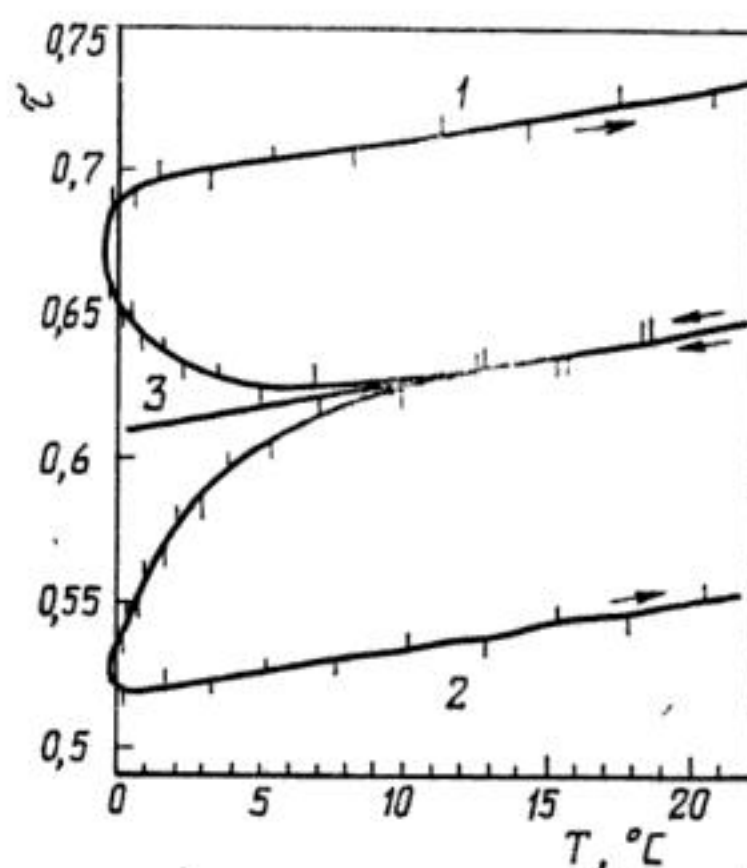


Рис. 1. Зависимость светопропускания (τ) суспензии везикул от температуры. Концентрация NaCl равна 180 мМ. 1 — $\tau(T)$ в отсутствие *GSH*; 2 — $\tau^*(T)$ в присутствии 2 мМ *GSH*; 3 — $\tau_B(T)$ — касательная к $\tau(T)$ в начальной фазе охлаждения. Длина волны 420 нм

и растворов NaCl до 4 °C, так и смешивание исходной (22 °C) суспензии с охлажденными (0 °C) растворами уменьшает количество вышедшего маркера.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными [4], указывающими на уменьшение осмотической хрупкости везикул из общих липидов эритроцитов при снижении температуры и свидетельствуют о незначительном вкладе собственно процесса охлаждения в механизм гипотонического лизиса везикул. Возможное объяснение подобного эффекта может заключаться в том, что температура суспензии изменяется со скоростью смешивания, т. е. за 20 мс, а набухание и лизис везикул в гипоосмотических растворах имеет времена полурелаксации порядка секунд (на что указывает кинетика изменения светопропускания при гипотоническом шоке везикул, включающих сахарозу). Таким образом, везикулы, подвергнутые осмотическому стрессу при пониженной температуре (4 °C), и везикулы,

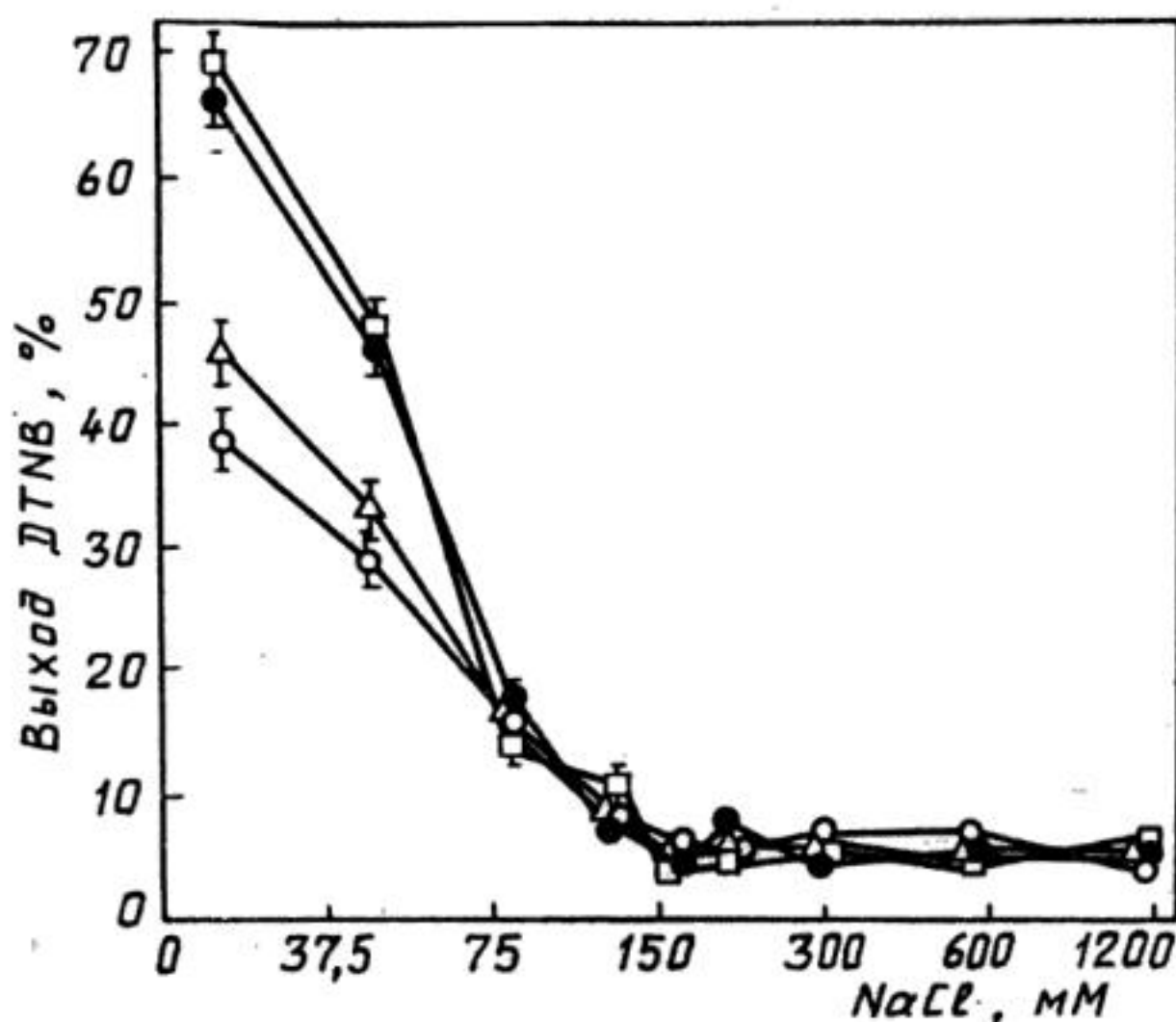


Рис. 2. Выход DTNB из везикул при осмотическом и температурном стрессе. Изотоническая концентрация NaCl равна 160 мМ. (— □ —) — изменение за 20 мс осмолярности внешней среды от 160 мМ до указанных на рисунке при 22 °C и последующее охлаждение до 0 °C со скоростью 30 °C/мин; (— ● —) — осмотический стресс при 22 °C; (— △ —) — одновременное (за 20 мс) изменение осмолярности внешней среды от 160 мМ до указанной на рисунке и охлаждение от 22 до 4 °C; (— ○ —) — изменение осмолярности внешней среды (за 20 мс) от 160 мМ NaCl до указанной на рисунке при 4 °C

имеющие температуру 22 °C и смешиваемые с холодными (0 °C) растворами NaCl, находятся, фактически, в одинаковых условиях. Аналогичные результаты были получены нами и при использовании в качестве маркера K^+ (данные не представлены). Отсюда можно сделать вывод о возрастании механической прочности при пониженных температурах, что проявляется в уменьшении осмотической хрупкости везикул в условиях осмотического набухания, вызывающего растяжение мембраны, а также вывод об отсутствии стимулированного охлаждением выхода маркера при всех исследованных концентрациях NaCl во внешней среде.

При охлаждении от 20 до 5 °C в изоосмотических солевых растворах наблюдалось [11] увеличение выхода ^{14}C -глюкозы из лецитиновых липосом. Причины такого поведения мембран остались невыясненными. Другие авторы [7] наблюдали разрушение униламеллярных везикул из яичного лецитина, мембрана которых была частично втянута в микропипетку, в условиях солевой симметрии вне и внутри везикул при охлаждении на 10 °C ниже исходной температуры. В основу интерпретации указанного эффекта было положено явление термоупругости. Известно, что термоупругие свойства бислоя определяются зависимостью от температуры площади мембраны и механических сил, действующих в ее плоскости [2]. В работе [7] с использованием эмпирических величин модуля упругости и температурного коэффициента изменения площади лецитинового бислоя показано, что при охлаждении на 10 °C ниже исходной температуры (20 °C)

достигается критическая величина изотропного натяжения мембраны и везикула разрушается. Однако в приведенной работе не была выяснена роль внешнего возмущения мембраны микропипеткой, имеющей внутри отрицательное по отношению к окружающему раствору гидростатическое давление.

Кажущееся несоответствие наших результатов с данными цитированных работ [7, 11] устраняется в случае замены KCl во включаемом буфере сахарозой. Нормированные кривые, описывающие процент вышедшей са-

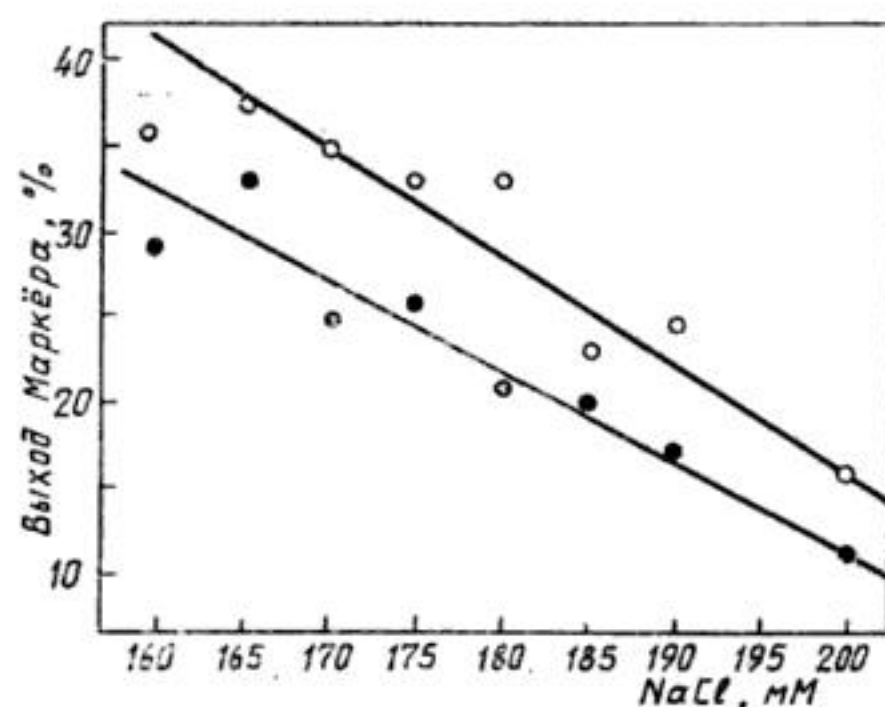
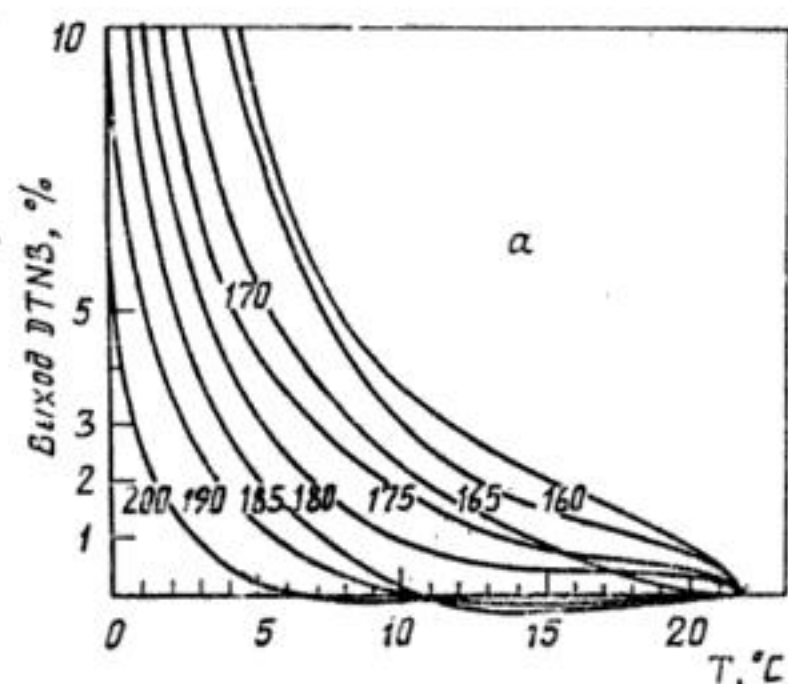


Рис. 4.

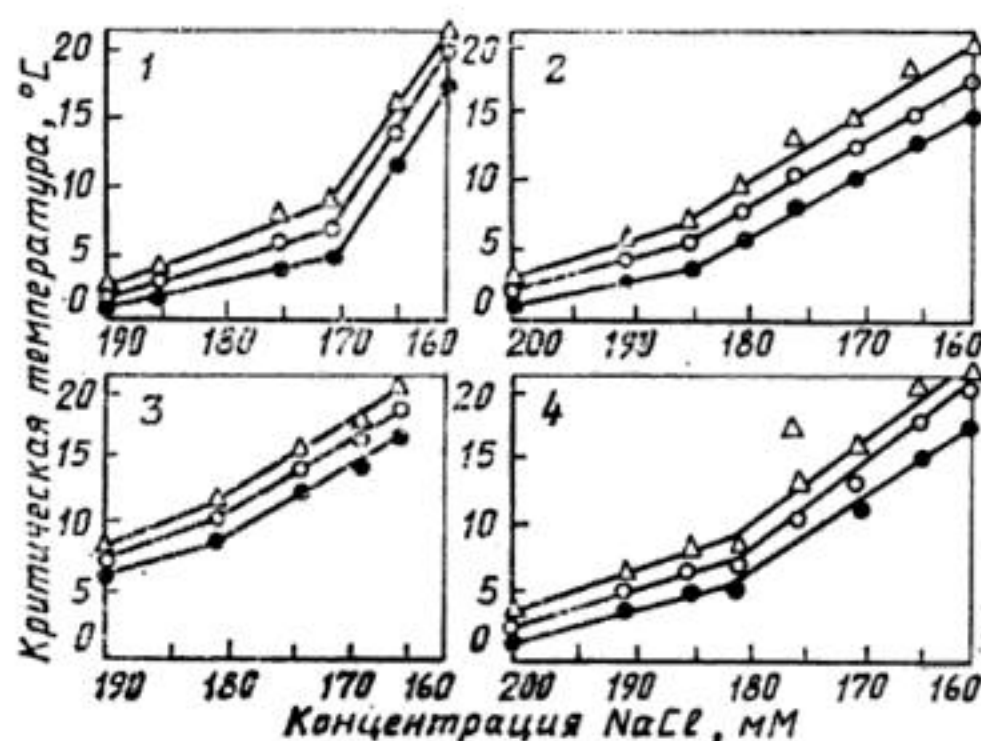
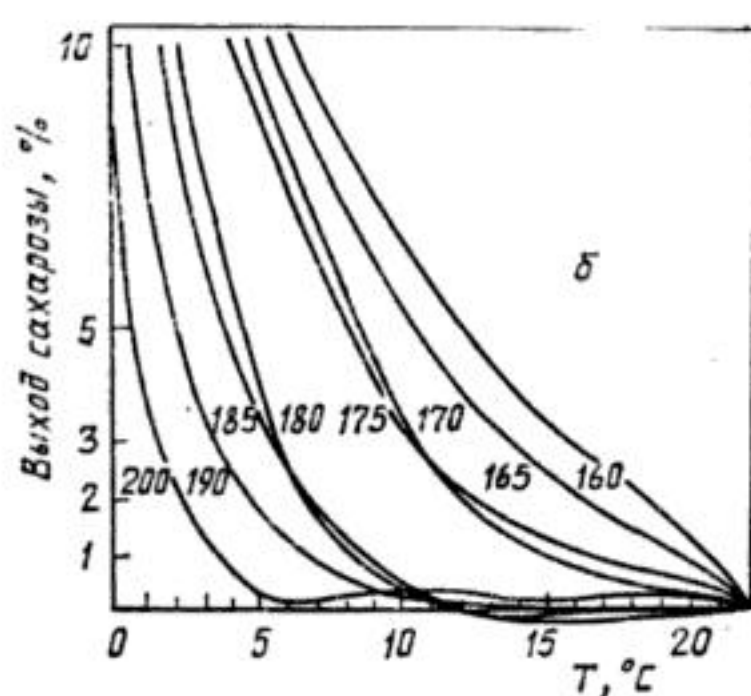


Рис. 3.

Рис. 5.

Рис. 3. Кинетические кривые лизиса везикул при охлаждении со скоростью $5 \div 6$ °C/мин. а — выход DTNB; б — выход сахарозы, %. Цифрами указана концентрация NaCl во внешней среде

Рис. 4. Выход включенной сахарозы (—○—) и DTNB (—●—) в цикле охлаждения-нагрева ($22 \rightarrow 0 \rightarrow 22$ °C) в средах, содержащих различные концентрации NaCl

Рис. 5. Зависимость критической температуры начала лизиса везикул от начальных осмотических условий. Кривые 1, 3, 4 (сахароза) и 2 (DTNB) построены по четырем сериям опытов на уровнях 1% (—△—), 2% (—○—) и 3% (—●—) выхода сахарозы или DTNB

харозы и DTNB как функции температуры при охлаждении везикул в средах, содержащих различное количество NaCl, представлены на рис. 3. За начало лизиса принимали отклонение $\tau(T)$ от базовой прямой $\tau_b(T)$ на величину, равную 1 % выхода DTNB или сахарозы, а температуру, соответствующую этой точке, считали критической температурой начала лизиса $T_{кр}$. Видно, что в изоосмотических условиях (180 mM NaCl) лизис везикул начинается при охлаждении на $12 \div 13^\circ$ ниже начальной температуры (22° C). Изменение концентрации NaCl во внешней среде от 200 до 160 mM сдвигает $T_{кр}$ от $3 \div 4^\circ$ C до $19 \div 20^\circ$ C и модулирует количество вышедшего маркера в цикле охлаждения — нагрева (рис. 4). Видно, что с ростом

осмолярности внешней среды количество вышедшего *DTNB* и сахарозы уменьшается.

Охлаждение везикул, разделенных на фракции по размерам, в изотонических условиях дало для фракции I (со средним диаметром $5 \div 7$ мкм) $T_{кр} = 11^\circ\text{C}$, для фракции II (со средним диаметром около 1 мкм) — $T_{кр} = 7^\circ\text{C}$, а для фракции III (со средним диаметром менее 1 мкм) — $T_{кр} = 2^\circ\text{C}$. Можно предполагать, что уменьшение размеров везикул приводит к снижению $T_{кр}$ при прочих равных условиях.

Графики зависимости $T_{кр}$ от концентрации NaCl во внешней среде для четырех серий опытов представлены на рис. 5. Видно, что качество везикул (по-видимому, распределение по размерам и количество ламелл в мембранах) заметно варьирует от серии к серии в связи с невозможностью абсолютно точного воспроизведения всех экспериментальных параметров процесса обращения фаз упариванием. Отметим, что в области гипотонии приведенные зависимости линейны, а в области гипертонии крутизна кривых уменьшается.

Охлаждение сферических везикул приводит к уменьшению площади липидного бислоя [2]. Если в униламеллярные везикулы диаметром 3 мкм включено 200 мМ недиссоциирующего ОАВ, то при уменьшении объема везикул на 0,05 % изотропное натяжение мембраны достигнет критического значения из-за концентрирования ОАВ внутри везикул и соответствующего роста градиента осмотического давления на мембране [3]. При этом происходит рождение одиночной поры, как при гипотоническом лизисе везикул [3]. Если гидратационный радиус ОАВ, включенного в везикулы, меньше, чем гидратационный радиус ОАВ в окружающей среде (т. е. коэффициент диффузии у включенного ОАВ больше, чем у ОАВ во внешней среде), то суммарный поток ОАВ через пору будет направлен из везикулы во внешнюю среду, что приведет к уменьшению градиента осмотического давления, объема везикул и изотропного натяжения их мембран. После выброса незначительной части включенного ОАВ из везикул барьерная функция их мембран восстановится. Этим, по-видимому, и объясняется отсутствие заметного выхода K^+ (имеющего гидратационный радиус, равный 2,32 Å [6]) и минорного ОАВ — *DTNB* при охлаждении K^+ -содержащих везикул в изо- и гипертонических растворах NaCl (гидратационный радиус Na^+ равен 2,76 Å [6]).

Когда в везикулы включена сахароза, имеющая диаметр молекулы, равный 10,6 Å [9], рождение поры при охлаждении приведет к дальнейшему ее росту и лизису везикул, так как потоки Na^+ и Cl^- внутрь везикул будут в сумме превышать поток сахарозы наружу. «Демпфирующего» выброса незначительной части включенного ОАВ в этом случае не происходит, т. е. выход ОАВ продолжается вплоть до полной потери включенной сахарозы и *DTNB*.

Из вышеизложенного можно сделать вывод о том, что заметный лизис везикул при охлаждении в изо- и гиперосмотических условиях возможен только в том случае, когда гидратационный радиус ОАВ, включенного в везикулы, превышает гидратационный радиус ОАВ во внешней среде.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — 256 с.
2. Ивэнс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран. — М.: Мир, 1982. — 304 с.
3. Козлов М. М., Маркин В. С. Теория осмотического лизиса липидных везикул // Биол. мембраны. — 1984. — 1, № 1. — С. 74—90.
4. Aloni B., Eitan A., Livne A. The erythrocyte membrane site for the effect of temperature on osmotic fragility // *Biochim. et biophys. acta.* — 1977. — 465, N 1. — P. 46—54.
5. Block M. C., Neut-Kok E. C. M., Deenen L. L. M., Gier J. The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes // *Ibid.* — 1975. — 406, N 2. — P. 187—196.
6. Conan K. N., Levine R. P. Molecular transport via the functional complement lesion // *Mol. Immunol.* — 1977. — 17, N 3. — P. 1464—1474.

7. Kwok R., Evans E. Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles // *Biophys. J.*— 1982.— 35, N 3.— P. 637—652.
8. Lee A. G. Lipid phase transitions and phase diagrams. 1. Lipid phase transitions // *Biochim. et biophys. acta.*— 1977.— 472, N 2.— P. 237—281.
9. Massari S., Felice A. G. The equivalent pore radius of intact and damaged mitochondria and the mechanism of active shrinkage // *Ibid.*— 1972.— 283, N 1.— P. 23—28.
10. Morris G. J. Liposomes as model systems for investigating freezing injury // *Effects of Low Temperature on Biological Membranes.*— London: Acad. Press, 1981.— P. 241—262.
11. Oku N., Nojima S., Inoue K. Selective release of non-electrolytes from liposomes upon perturbation of bilayers by temperature change or polyene antibiotics // *Biochim. et biophys. acta.*— 1980.— 595, N 2.— P. 277—291.
12. Szoka F. J., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1978.— 75, N 9.— P. 4194—4198.
13. Yoshikawa W., Akutsu H., Kuogoku Y. Light-scattering properties of osmotically active liposomes // *Biochim. et biophys. acta.*— 1983.— 745, N 3.— P. 397—406.

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

Поступила 15.08.85

УДК 57.043 : 611.013.15.014.41

**Ф. В. Дахно, В. И. Вишневский, Л. Г. Каталевская, Р. Е. Долгина,
А. Г. Душейко**

СВЕРХМЕДЛЕННОЕ ЗАМОРАЖИВАНИЕ ООЦИТОВ СВИНЬИ

В настоящее время значительно возрос интерес исследователей к вопросам криоконсервации гамет и эмбрионов человека и млекопитающих с целью их дальнейшего применения в медицине и народном хозяйстве. Это связано с определенными успехами в медицине и животноводстве, достигнутыми при эмбриотрансплантации после оплодотворения *in vitro*, а также при пересадке эмбрионов крупного рогатого скота [3, 4, 5]. Однако наибольший процент прерывания беременностей связан с десинхронизацией процесса оплодотворения *in vitro* и *in vivo*, что приводит к нарушениям имплантационного периода. В связи с этим перспективным является использование замораживания ооцитов и эмбрионов, что делает возможным проведение эмбриотрансплантации в подходящие для этого сроки. Для замораживания эмбрионов сейчас используются сверхмедленные скорости охлаждения [2]. Однако вопросы, связанные с влиянием скоростей охлаждения до температуры кристаллизации, способами введения криопротектора и влияния инициации кристаллообразования на жизнеспособность ооцитов и эмбрионов, остаются во многом неясными.

Целью настоящей работы является подбор условий эквilibрации и способов замораживания ооцитов свиньи. Исследования выполнены на ооцитах полиовулирующего млекопитающего — свиньи. Яичники доставляли с мясокомбината в физиологическом растворе с антибиотиками при температуре 23 °С, материал дважды промывали средой 199, затем производили аспирацию фолликулярной жидкости [1], которую переносили на часовые стекла, поиск ооцитов производили на МБС-9 при 28-кратном увеличении. Ооциты помещали в пластмассовые контейнеры с 1 мл среды 199. Замораживание ооцитов свиней производили под защитой ДМСО на лабораторной установке со следующими скоростями замораживания: от 25 до 0 °С со скоростью 1 °С/мин, от 0 до —70 °С со скоростью 0,3—0,4 °С/мин, при —70 °С ампулы погружали в жидкий азот. Для получения низких скоростей замораживания ампулы с ооцитами (10 штук) размещали в металлическом блоке с ячейками, который охлаждался регулируемым потоком

паров азота. Температуру охлаждения измеряли в одной из ампул и регистрировали на ленте самописца. Исследовали два способа введения ДМСО в среду с ооцитами — дробный, когда криопротектор вводили двумя (по 0,07 мл) или тремя порциями (по 0,047 мл), и одномоментный, конечная концентрация криопротектора была равной 1,5 М (по 0,14 мл на 1 мл среды). Время эквilibрации клеток с криопротектором составляло 30 мин при одномоментном введении ДМСО и несколько увеличивалось при дробном. Инициирование льдообразования в период фазового перехода

Таблица 1

Влияние инициации льдообразования на сохранность криоконсервируемых ооцитов свиньи

Материал инициатора	Количество опытов	Количество ооцитов			Сохранность, %
		использованных	полученных	сохраненных	
Алюминий	12	65	53	22	41
Серебро	10	63	32	13	41
Нержавеющая сталь	5	31	19	8	42
Без инициатора	15	109	65	34	52

Таблица 2

Влияние дробного введения криопротектора на сохранность ооцитов

Количество опытов	Способ введения криопротектора, мл	Количество ооцитов			Сохранность, %
		использованных	полученных	сохраненных	
5	0,14	44	23	8	35
5	0,070	37	19	7	37
7	0,047	52	27	12	44

тов снижалось до 64 %. Как видно из табл. 1, не выявляются отличия в жизнеспособности ооцитов в зависимости от материала инициатора, хотя их развитие после замораживания — оттаивания чаще наблюдалось при использовании инициаторов из нержавеющей стали. В этих случаях 50 % размороженных ооцитов выделили полярное тельце, что свидетельствует об их дальнейшем созревании до стадии метафаза II, на которой они уже могут быть оплодотворены.

Сопоставление полученных результатов с литературными данными [2], свидетельствующими о положительном влиянии инициации льдообразования, требует новых подходов к осуществлению данного способа инициации. По-видимому, следует изменить расположение иницирующих стержней на контейнере, так как ооциты концентрируются в нижней его части, где размещены инициаторы.

Во второй серии исследований изучали влияние дробного и одноразового введения криопротектора при сверхмедленном замораживании ооцитов. Как видно из табл. 2, дробное введение криопротектора не позволяет выявить преимущества его по сравнению с разовым, так как различия между сохранностью ооцитов при различных способах введения ДМСО недостоверны ($p < 0,95$).

вода — лед проводили с помощью введения в контейнеры с ооцитами металлических стержней, температура которых была ниже точки депрессии. Были испытаны инициаторы, выполненные из следующих материалов: алюминий, нержавеющая сталь, серебро.

Сохранность ооцитов оценивалась с помощью суправитального окрашивания ооцитов трипановым синим (рабочий раствор с ЭДТА был приготовлен на среде Эрла) и культивирования ооцитов в течение 48 ч в среде 199 с антибиотиками. Размораживание ампул с ооцитами проводили в водяной бане с температурой 20 °С, которая обеспечивала скорость отогрева 100 °С/мин. Процесс оттаивания до 0 °С происходил за две минуты. Статистическая обработка проведена по критерию Стьюдента и критерию χ^2 . Проведено 59 опытов замораживания на 401 ооците свиней. Ооциты малых размеров, диаметр которых составлял 80—120 мкм, разрушались при их переносе в контейнеры и извлечении из них. В результате этого в размороженных образцах количество ооци-

Таким образом, полученные данные позволяют сделать предположение, что использованный способ криоконсервирования ооцитов свиней дает возможность получить достаточно однородные результаты по сохранности данного вида клеток в процессе замораживания — оттаивания. Оценка объединенной доли выживших ооцитов по λ^2 показала, что 95 %-ный доверительный интервал для доли выживающих ооцитов составляет $40,2 \% \leq p \leq 51,0 \%$. Применяемый способ иницирования льдообразования и дробное введение ДМСО в используемой концентрации не дает преимущества по сравнению с контролем при оценке сохранности методом суправитального окрашивания. Однако исследования жизнеспособности ооцитов, культивированных *in vitro* после цикла замораживания — отогрева, показывают, что инициация кристаллообразования с помощью стержней из нержавеющей стали способствует лучшей сохранности свойств клеток.

1. Дахно Ф. В., Долгина Р. Е., Каталевская Л. Г., Белоношко А. П. Сохранность ооцитов свиней при кратковременном содержании их в фолликулах // Криобиология. — 1986. — № 3. — С. 45.
2. *Frozen Storage of Laboratory Animals* / Ed. G. H. Zeilmaker. — Stuttgart, New York: Gustav Fisher, 1981. — 193 p.
3. Lopata A. Concepts of human *in vitro* fertilization and embryo transfer // Fertil. Steril. — 1983. — 40, N 3. — P. 289—301.
4. Polge C., Willadsen S. M. Freezing eggs and embryos of farm [animals] // Cryobiology. — 1978. — 15, N 3. — P. 370—373.
5. Zeilmaker G. H., Alberta A. Th., van Gent J. et al. Two pregnancies following transfer of intact frozen—thawed embryos // Fertil. Steril. — 1984. — 42, N 2. — P. 293—296.

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

Поступила 20.03.86

УДК 57.043 : 612.35.46 : 547.422.426.1

В. Ф. Козлова, Н. С. Сигал

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ДНК-СИНТЕЗИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК ЖИВОТНЫХ

Раскрытие тонких механизмов взаимодействия структурных элементов организма с криопротекторами остается актуальной проблемой современной криобиологии. Особенно остро она стоит при исследовании характера действия *in vivo* новых препаратов, предлагаемых в качестве криопротекторов.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР синтезирован ряд оксиэтильных производных многоатомных спиртов этиленгликоля и глицерина — полиэтиленоксид (ПЭО) и оксиэтилированный глицерин (ОЭГ), обладающие выраженными свойствами экзоцеллюлярных криопротекторов [1, 6]. Представляет научный интерес изучение реакции клеток и тканей органов, в том числе их ДНК-синтезирующей способности, на введение в организм криопротекторов в заведомо повреждающих дозах с целью выявления изменений и определения морфогенеза репаративного процесса, обеспечивающего гомеостаз систем.

В настоящем сообщении изложены результаты морфофункционального исследования органов-мишеней (печени и почек) белых беспородных половозрелых крыс-самцов при различных режимах внутрибрюшинного введения в организм 20 %-ных растворов ПЭО-1500 и ОЭГ-1412 в повреждающих дозах: 1/2 ДЛ-50 в острых, 1/5 ДЛ-50 в подострых опытах (трехкратное введение в течение недели и двенадцатикратное — в течение месяца). Особое внимание акцентировалось на состоянии ДНК-синтезирующей способности клеток паренхимы и стромы этих органов. Контрольным животным соответственно в острых и подострых экспериментах вводили физиологический раствор. Забой животных путем декапитации проводили через 4 ч и 14 дней после применения полиолов.

Для изучения ДНК-синтезирующей способности клеток печени и почек всем животным подопытных и контрольных групп за 2 ч до забоя однократно внутрибрюшинно вводили ^3H -тимидин в дозе 1 мКи/г массы (37 МБК) с молекулярной активностью 48 кКи/моль (1790 ТБК/моль). При радиоавтографическом исследовании образцы органов фиксировали в смеси Карнуа, целлоидин-парафиновые срезы толщиной 5—6 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином с предварительной радиоавтографией, для которой использовалась мелкозернистая эмульсия типа «М». Длительность экспозиции составляла три недели. Оценку радиоавтографов проводили по показателям включения ^3H -тимидина ядрами клеток эпителиальной и соединительной ткани печени и почек. Определяли митотическую активность (в промиллях) и индекс меченных ^3H -тимидином клеток печени (при подсчете 5000), в почке учитывали количество радиоавтографов в 100 полях зрения ($\times 420$) корковой, переходной и мозговой зон. Результаты исследования подвергались статистической обработке по Фишеру — Стьюденту. Кроме того, были применены гистологические методы и гистохимическое определение гликопротеинов и гликозаминогликанов реактивом Шиффа и альциановым синим по Моури.

Проведенные патоморфологические исследования показали, что в период острого действия (через 4 ч после однократного введения) ПЭО-1500 и ОЭГ-1412 в дозе 1/2 ДЛ-50 вызывают перераспределение жидкости в организме, скопление ее в естественных полостях и обезвоживание тканей, а также диффузное повреждение паренхиматозных органов. Эти изменения носят в основном характер зернистой и гидропической дистрофии, реже (в 2 и 3 % соответственно при введении ПЭО и ОЭГ) встречаются пикноз ядер, кариорексис и цитоллиз структур паренхимы и деполимеризация межклеточного вещества. Отмечается накопление гликозаминогликанов в мозговом веществе почек, обуславливающее повышенную проницаемость для воды, а также гликопротеинов в мембранах эпителиоцитов, особенно в апикальных частях клеток извитых канальцев, характеризующих усиленную реабсорбционную функцию.

В печени, наряду с альтерацией структур, проявляются морфологические признаки, характеризующие функциональную активность эпителиальных и соединительнотканых элементов (купферовых клеток, лаброцитов и др). Многие одно- и двоядерные гепатоциты, особенно центроробулярной зоны, гипертрофированы, содержат полиплоидные ядра, интенсивно синтезирующие ДНК. Гистохимически в цитоплазме этих клеток определяется значительное количество гликогена. Радиоавтографичес-

Т а б л и ц а 1

Индекс меченных ^3H -тимидином клеток печени крыс после однократного введения ПЭО-1500 и ОЭГ-1412 в дозе 1/2 ДЛ-50

Вещество	Срок исследования	Клетки		
		Гепатоциты	Соединительной ткани	Купферовы
Физиологический раствор (контроль)	4 ч	$1,11 \pm 0,08$	$0,12 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$
	14 дней	$1,09 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,004$
ПЭО-1500	4 ч	$2,76 \pm 0,06^*$	$0,27 \pm 0,02^*$	$0,04 \pm 0,01$
	14 дней	$1,14 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,01$	$0,015 \pm 0,009$
ОЭГ-1412	4 ч	$3,28 \pm 0,03^*$	$0,36 \pm 0,04^*$	$0,10 \pm 0,01^*$
	14 дней	$1,73 \pm 0,03^*$	$0,16 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,01$

Примечание. *Достоверность разницы результатов по отношению к соответствующему контролю — $P < 0,05$.

Показатели ДНК-синтезирующей способности клеток почек крыс после однократного введения ПЭО-1500 и ОЭГ-1412 в дозе 1/2 ДЛ-50 (данные радиоавтографии)

Вещество	Срок исследования	Зона почки		
		Корковое вещество	Переходная зона	Мозговое вещество
Физиологический раствор (контроль)	4 ч	$24,83 \pm 0,83$	$14,83 \pm 0,98$	$8,83 \pm 0,98$
	14 дней	$22,52 \pm 1,30$	$13,82 \pm 1,21$	$6,66 \pm 0,49$
ПЭО-1500	4 ч	$158,83 \pm 3,09^*$	$87,33 \pm 4,75^*$	$9,34 \pm 0,37$
	14 дней	$39,83 \pm 0,74^*$	$23,83 \pm 1,11^*$	$8,33 \pm 0,42^*$
ОЭГ-1412	4 ч	$246,17 \pm 13,01^*$	$144,83 \pm 7,61^*$	$16,83 \pm 1,94^*$
	14 дней	$101,33 \pm 3,99^*$	$78,16 \pm 5,28^*$	$12,67 \pm 0,72^*$

Примечание.* Достоверность разницы результатов по отношению к соответствующему контролю — $P < 0,05$.

кое исследование в этот срок показало статистически достоверное увеличение ДНК-синтезирующей способности эпителиальных и соединительнотканых клеток печени и почек (табл. 1,2). В печени большая часть меченых ^3H -тимидином гепатоцитов располагается вокруг центральных вен и в зоне триад (рис. 1,2).

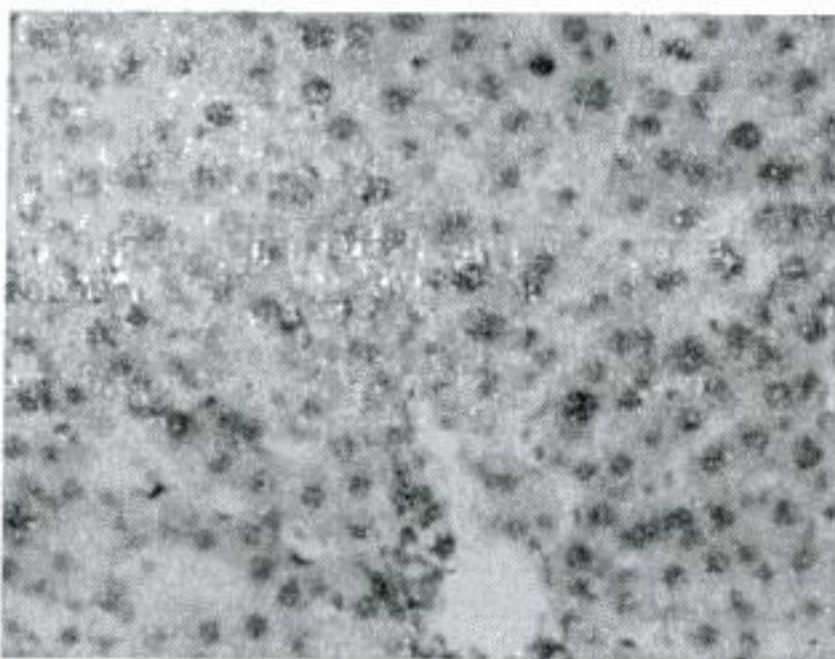


Рис. 1.

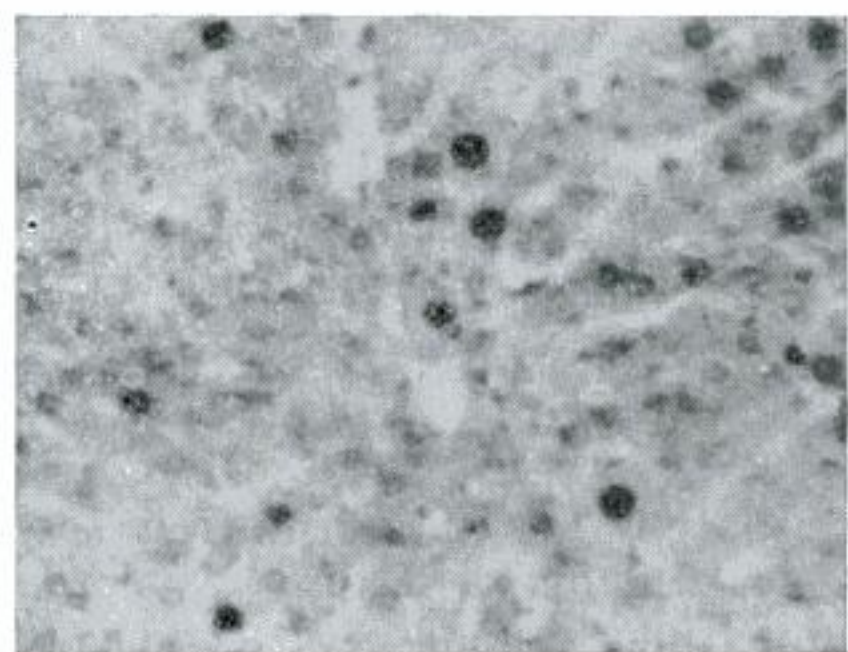


Рис. 2.

Рис. 1. Структура печени крысы через 4 ч после введения ПЭО-1500 в дозе 1/2 ДЛ-50. Автографы ядер клеток эпителиальной и соединительной ткани, меченные ^3H -тимидином. Радиоавтография. Гематоксилин-эозин, $\times 180$

Рис. 2. Структура печени крысы через 4 ч после введения ОЭГ-1412 в дозе 1/2 ДЛ-50. Автографы ядер клеток эпителиальной и соединительной ткани, меченные ^3H -тимидином. Радиоавтография. Гематоксилин-эозин, $\times 180$

В почках биосинтетические процессы наиболее выражены в корковом веществе, менее — в переходной зоне и слабо — в мозговом слое. В корковом веществе ^3H -тимидином метятся в основном ядра эпителиоцитов извитых канальцев и структурные элементы сосудистых клубочков (рис. 3.,4). В переходной зоне радиоавтографы наблюдаются в клетках как эпителиальной, так и соединительной ткани, в мозговом слое — преимущественно в клетках соединительной ткани. Такое различие в синтезе ДНК клетками почек по зонам свидетельствует о разной степени активации в них метаболических процессов в ответ на введение в организм криопротекторов-полимеров, которые обладают осмодиуретическими свойствами [6]. Это тем более вероятно, что почки участвуют не только в осмо-, волюмо- и ионорегуляции, обеспечивают кислотно-основное равновесие и выделительную функцию, но также ответственны за гомеостаз белков, липидов и углеводов в организме [4].

Несмотря на то, что в корковом веществе почек подопытных животных абсолютное число меченных ^3H -тимидином клеток так же высоко, как и в печени (табл. 1,2), митозы здесь встречаются чрезвычайно редко. В печени они достигают 0,5 и 1,00 ‰ соответственно при введении ПЭО и ОЭГ. По-видимому, в обход митозам для клеток почек более характерна экономичная внутриклеточная форма регенерации, чем для печени, хотя эти органы, согласно классификации [5], относятся к «растущим» или «стабильным». ^3H -тимидин в качестве специфической метки ДНК может служить адекватным инструментом не только для радиоавтографического определения новообразующихся нуклеиновых кислот, но и для выявления связанных с ними внутриклеточных форм регенерации.

Отмечено, что при введении в организм ОЭГ-1412 наблюдаются более выраженные по сравнению с ПЭО-1500 дистрофические изменения клеток печени и почек подопытных животных, с одной стороны, синтетические и про-

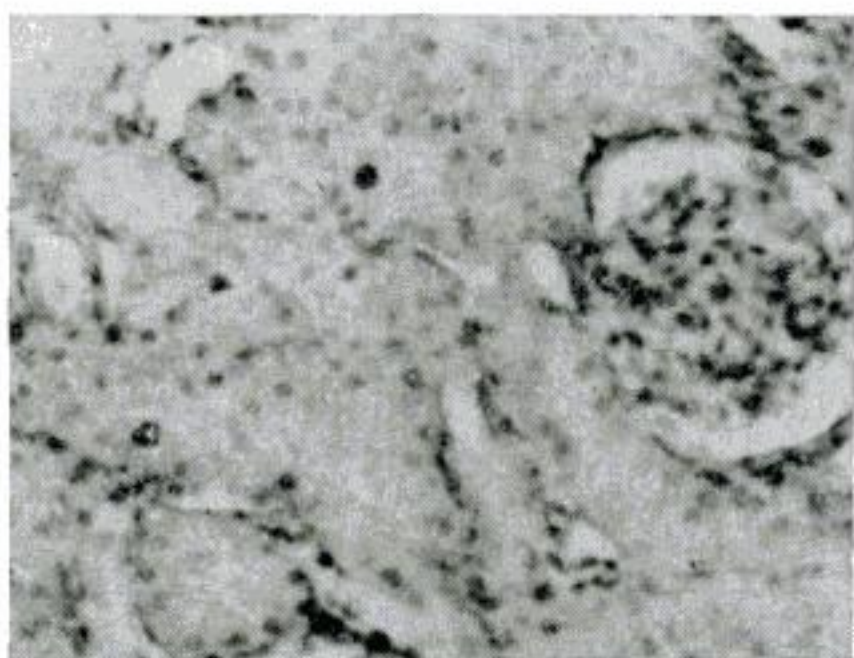


Рис. 3.

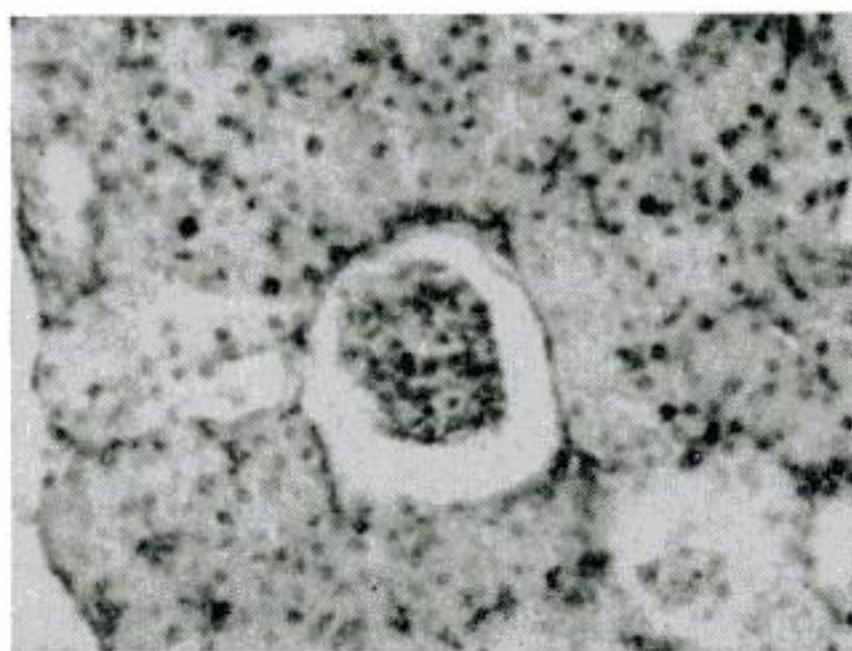


Рис. 4.

Рис. 3. ДНК-синтезирующая способность клеток эпителиальной и соединительной ткани почки животного через 4 ч после введения ПЭО-1500 в дозе 1/2 ДЛ-50. Радиоавтография. $\times 180$

Рис. 4. ДНК-синтезирующая способность клеток эпителиальной и соединительной ткани почки животного через 4 ч после введения ОЭГ-1412 в дозе 1/2 ДЛ-50. Радиоавтография. $\times 180$

лиферативные — с другой (табл. 1,2), что, по-видимому, связано с их токсикофармакологическими свойствами. Деструкция клеток обуславливает репаративные процессы, активизирует синтез ДНК, которые развиваются уже в течение первых 4 ч действия полиолов.

Через 14 дней после однократного парентерального введения ПЭО-1500 и ОЭГ-1412 в дозе 1/2 ДЛ-50 отмечается восстановление структуры печени и почек, снижение в них содержания метки ^3H -тимидина, однако не всегда достигающее уровня контроля (табл. 1,2). Последнее характерно для клеток коркового и мозгового вещества почек в обоих экспериментах, а также для гепатоцитов при введении в организм 1/2 ДЛ-50 ОЭГ-1412 и, вероятно, свидетельствует о незавершенности процессов репарации и гомеостаза изучаемых систем.

В отличие от однократной обработки при дробном (трехкратном) введении в организм ОЭГ-1412 одинаковой суммарной дозы 1/2 ДЛ-50 (4 г/кг массы), как показали наши предыдущие исследования [2], ДНК-синтезирующая функция клеток печени возвращается к исходному состоянию. Следовательно, течение регенеративного процесса зависит не только от дозы, но и от режима введения вещества. Это наблюдается даже при длительном (в течение месяца) 12-кратном парентеральном введении в организм животных 20 %-ных растворов ОЭГ-1412 в дозе 1/5 ДЛ-50 (суммарная доза 2,4 ДЛ-50 составляет 19,2 г/кг массы). И хотя суммарная доза криопротектора в данной постановке опыта в 4,8 раза превышает дозу, вводимую однократно (1/2 ДЛ-50 составляет 3,95 г/кг массы), структурные изменения и ДНК-синтезирующая способность клеток печени и почек при этом в 5

и 7 раз менее выражены при забое через 4 ч и возвращаются к уровню контроля через 14 дней после воздействия (табл. 3,4). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии кумулятивного эффекта ОЭГ и наличии процессов репарации и адаптации клеток органов-мишеней к исследуемому веществу, что подтверждает ранее высказанное мнение [3] о развитии многоуровневой неспецифической реакции адаптации организма животных к оксиэтильным производным многоатомных спиртов.

Таблица 3

Индекс меченных ^3H -тимидином клеток печени крыс после введения ОЭГ-1412 в различных условиях эксперимента

Доза ОЭГ	Условия введения	Срок исследования	Клетки	
			Гепатоциты	Соединительной ткани
1/2 ДЛ-50	Однократное	4 ч	$3,28 \pm 0,03^*$	$0,36 \pm 0,04^*$
		14 дней	$1,73 \pm 0,03^{**}$	$0,16 \pm 0,03^{**}$
1/5 ДЛ-50	12-кратное в течение месяца	4 ч	$0,51 \pm 0,05^*$	$0,11 \pm 0,01^*$
		14 дней	$0,06 \pm 0,02^{**}$	$0,06 \pm 0,01^{**}$

Примечание. Достоверность разницы результатов при введении ОЭГ в различных дозах и забое животных через 4 ч — * $p < 0,05$, через 14 дней — ** $p < 0,05$.

Таблица 4

Показатели ДНК-синтезирующей способности клеток почек крыс после введения ОЭГ-1412 в различных условиях эксперимента (данные радиоавтографии)

Доза ОЭГ	Условия введения	Срок исследования	Зона почки		
			Корковая	Переходная	Мозговая
1/2 ДЛ-50	Однократное	4 ч	$246,17 \pm 13,01^*$	$144,83 \pm 7,61^*$	$16,83 \pm 9,4$
		14 дней	$101,33 \pm 3,99^{**}$	$78,16 \pm 5,28^{**}$	$12,67 \pm 0,72$
1/5 ДЛ-50	12-кратное в течение месяца	4 ч	$50,20 \pm 1,28^*$	$26,60 \pm 2,9^*$	$18,4 \pm 2,1$
		14 дней	$25,60 \pm 1,70^{**}$	$15,60 \pm 1,70^{**}$	$11,2 \pm 1,5$

Примечание. Достоверность разницы результатов при введении ОЭГ в различных дозах и забое животных через 4 ч — * $p < 0,05$, через 14 дней — ** $p < 0,05$.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать следующее заключение. ПЭО и ОЭГ даже в сублетальных дозах при внутрибрюшинном введении в организм вызывают обратимые изменения клеток печени и почек. Выявлены ранние признаки репаративной регенерации эпителиальных и соединительнотканых элементов органов в виде их усиленной ДНК-синтезирующей способности, которая развивается вслед за повреждением структур уже в течение первых 4 ч действия веществ. Установлено, что репликация ДНК клеток паренхимы органов-мишеней, особенно почек, не всегда сопровождается их пролиферацией и характеризует преобладание внутриклеточной формы регенерации в этих высокоспециализированных структурах в ответ на воздействие ПЭО и ОЭГ. Морфогенез регенеративного процесса в клетках печени и почек протекает по типу реституции. Интенсивности и частоте патогенного влияния криопротекторов соответствует характер восстановительных реакций тканей, направленных на поддержание гомеостаза систем. Многократное введение в организм животных криопротекторов в дозе 1/5 ДЛ-50 (суммарная 2,4 ДЛ-50) не вызывает кумулятивного эффекта, а обуславливает развитие процессов адаптации.

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под общ. ред. Н. С. Пушкаря и А. М. Белоуса.— Киев: Наук. думка, 1981.— 608 с.
2. *Козлова В. Ф., Сигал Н. С.* Морфологическая характеристика эпителиальной и соединительной ткани печени животных при введении в организм криопротекторов // *Криобиология и криомедицина*.— 1984.— Вып. 15.— С. 13—19.
3. *Козлова В. Ф., Шенберг М. Г., Гучок В. М. и др.* Неспецифическая реакция адаптации организма на оксигенильные производные некоторых многоатомных спиртов // *Эндокринная система организма и токсические факторы внешней среды*.— Л.: Б. и., 1980.— С. 157—164.
4. *Наточин Ю. В.* Основы физиологии почки.— Л.: Медицина, 1982.— 208 с.
5. *Саркисов Д. С.* Очерки по структурным основам гомеостаза.— М.: Медицина, 1977.— 361 с.
6. *Шраго М. И., Козлова В. Ф.* Токсико-фармакологические исследования в криобиологии // *Криобиология*.— 1987.— № 1.— С. 5—10.

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

Поступила 07.07.86

УДК 612.8.015

Н. Н. Войтенко

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА МОНОАМИНОКСИДАЗУ МОЗГА ЗИМОСПЯЩИХ СУСЛИКОВ

Выработанная в процессе эволюции способность некоторых животных поддерживать метаболизм в определенных пределах независимо от изменения температуры тела представляет несомненный интерес для понимания механизмов адаптации к низким температурам. Установленная ранее компенсация действия низких температур на метаболизм у пойкилотермов [6] недавно подтверждена и у гетеротермных животных — краснощеких сусликов [4]. Для понимания механизма метаболической компенсации действия низких температур в мозге зимоспящих гетеротермов исследовалась активность моноаминоксидазы (МАО), фермента, участвующего в окислительном дезаминировании моноаминов, которые имеют большое значение для адаптации животных к низким температурам.

Отловленные в Новосибирской области самцы краснощеких сусликов на время зимней спячки помещались в подвал с температурой от 2 до 6°C. Изучали сусликов в состоянии погружения в зимнюю спячку, выхода из нее, бодрствования и спячки при температуре тела соответственно 11,22 и 37,7°C. У погружающихся в спячку сусликов в условиях естественного содержания их при температуре 9°C температура тела снижалась от 37 до 11°C в течение 24 ч. У выходящих из спячки сусликов при 22°C температура тела повышалась от 7 до 22°C в течение 2,5 ч.

Выделенную из ствола головного мозга сусликов неразделенную фракцию митохондрий инкубировали в 0,1 М Na, К-фосфатном буфере [3], рН 8,5, при свободном доступе воздуха и встряхивании в аппарате Варбурга в течение 30 мин при следующих температурах инкубации: для бодрствующих 37 и 11°C; для находящихся в спячке 37 и 7°C; для выходящих из спячки 37 и 11°C; для погружающихся в спячку 37 и 11°C.

В каждой серии опытов по начальным скоростям реакции (при пяти концентрациях серотонина от 0,0625 до 1,0 мМ) для изучения зависимости скорости (v) дезаминирования серотонина от его концентрации $[S]$ рассчитывали коэффициент кооперативности Хилла n_H [5], поскольку постулированы олигомерное строение МАО и возможное кооперативное взаимодействие между активными центрами МАО [1]. Изменение коэффициента кооперативности Хилла служило показателем изменения конформации МАО. Активность МАО выражали в наномолях аммиака, образованного за минуту, на миллиграмм белка. Количество аммиака в инкубатах опреде-

ляли методом изотермической отгонки [3] с последующим применением реактива Несслера и измерением оптической плотности при 410 нм на СФ-26. Белок определяли по Лоури. Кроме того, изучали субстратную специфичность МАО с использованием в качестве субстратов глюкозамина и галактозамина в концентрации 1,0 мМ.

Полученная зависимость скорости (v) дезаминирования серотонина от его концентрации $[S]_0$ у краснощеких сусликов при разных физиологических состояниях и температурах инкубации представлена в табл. 1. Как видно из полученных данных, дезаминирование серотонина происходит при всех изученных состояниях сусликов. У животных, находящихся в состоянии спячки при температуре инкубации, соответствующей реальной температуре тела (7 °С), график двойных обратных величин Лайниувера — Бэрка линеен (рис. 1, 1), коэффициент кооперативности Хилла близок к 1,0 при всех изучавшихся концентрациях серотонина (табл. 2.). Эти данные свидетельствуют об отсутствии кооперативных взаимодействий между центрами МАО, связывающими серотонин в мозге у сусликов в состоянии спячки.

Таблица 1

Зависимость скорости (v) дезаминирования серотонина от его концентрации $[S]_0$ у сусликов

Состояние животного	Температура инкубации фракции митохондрий, °С	Концентрация серотонина, мМ				
		1,00	0,50	0,250	0,125	0,0625
		Активность МАО, нмоль аммиака/мг белка/мин				
Бодрствование	37	2,91 ± 0,19	2,47 ± 0,32	1,37 ± 0,08	1,09 ± 0,07	0,51 ± 0,04
	11	0,60 ± 0,07	0,41 ± 0,05	0,26 ± 0,06	0,24 ± 0,07	0,13 ± 0,03
Погружение в спячку	37	1,98 ± 0,07	1,68 ± 0,09	1,40 ± 0,06	0,87 ± 0,03	0,49 ± 0,08
	11	0,69 ± 0,07	0,65 ± 0,13	0,38 ± 0,04	0,36 ± 0,09	0,26 ± 0,05
Спячка	37	2,25 ± 0,30	1,87 ± 0,03	1,08 ± 0,02	0,79 ± 0,06	0,28 ± 0,04
	7	0,49 ± 0,04*	0,37 ± 0,08*	0,28 ± 0,05*	0,19 ± 0,01*	0,11 ± 0,02*
Выход из спячки	37	1,68 ± 0,14	1,49 ± 0,13	0,94 ± 0,18	0,78 ± 0,13	0,28 ± 0,09
	11	0,93 ± 0,19	0,82 ± 0,22	0,67 ± 0,21	0,45 ± 0,12	0,30 ± 0,07

Примечание. В каждом опыте использовано 6 животных и проведено две параллельные пробы; * $P < 0,001$.

Иными являются характеристики у сусликов, находящихся в состоянии спячки после инкубации при 37 °С. Зависимость скорости дезаминирования серотонина от его концентрации носит сложный негиперболический характер, график двойных обратных величин нелинеен (рис. 1, 2), кооперативное связывание серотонина МАО положительно. Это приводит к повышению коэффициента кооперативности Хилла (табл. 2). Таким образом, у сусликов, находящихся в спячке, инкубация тканей мозга при 37 °С сопровождается изменением конформации МАО.

У выходящих из спячки сусликов при температуре тела 22 °С и температуре инкубации 37 °С зависимость скорости дезаминирования серотонина от его концентрации, как и у сусликов в состоянии спячки при инкубации митохондрий при 37 °С, носит сложный негиперболический характер, график двойных обратных величин нелинеен (рис. 1, 3). Коэффициент кооперативности Хилла зависит от концентрации серотонина, он далек от 1,0 (табл. 2). У сусликов, находящихся в состоянии спячки и выходящих из нее, после инкубации выделенной фракции при 11 и 7 °С зависимость скорости дезаминирования серотонина от его концентрации носит гиперболический характер, график двойных обратных величин линеен (рис. 1, 4), кооперативного связывания серотонина МАО не происходит.

У бодрствующих животных с более высокими значениями активности МАО, чем у сусликов, находящихся в состоянии спячки (табл. 1), зависимость скорости дезаминирования серотонина от его концентрации при 37 °С была гиперболической, график двойных обратных величин линейным (рис. 1), коэффициент кооперативности Хилла близок к 1,0 (табл. 2). Полученные данные указывают на отсутствие кооперативных взаимодействий между центрами МАО, связывающими серотонин.

Кинетика реакции дезаминирования серотонина МАО у бодрствующих сусликов при 11 °С была иной. Линейность графика двойных обратных

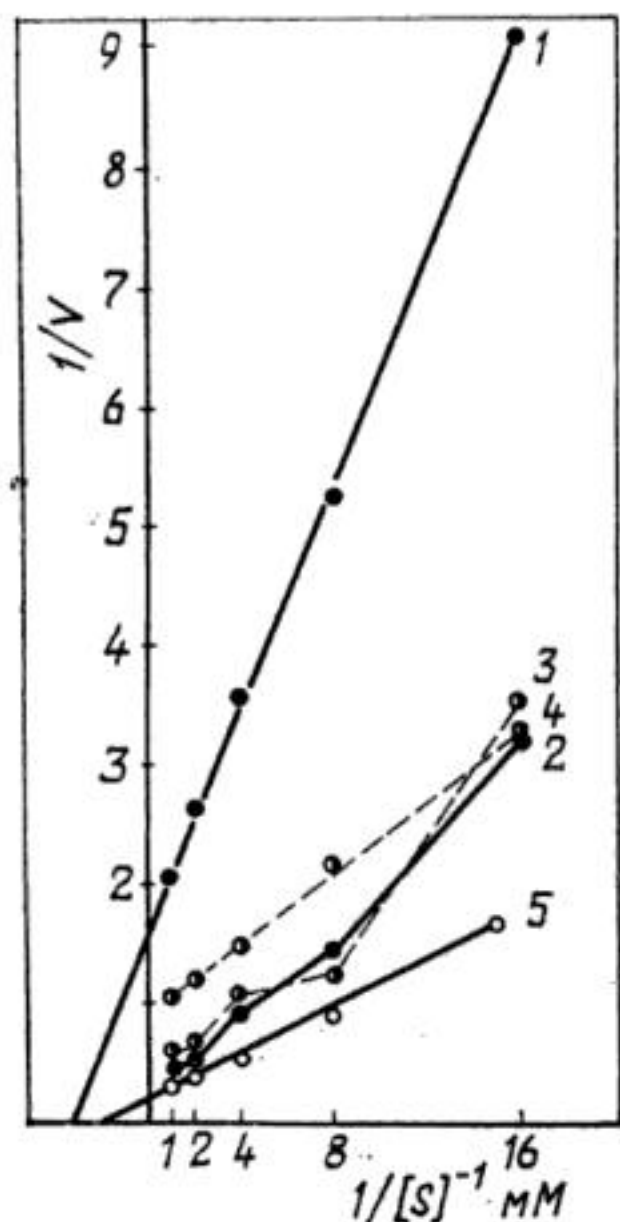


Рис. 1. Зависимость начальной скорости (v) дезаминирования серотонина МАО от его концентрации [S]₀ у сусликов в состояниях: спячки, температура инкубации 7 °С (1); спячки, температура инкубации 37 °С (2); выхода из спячки, температура инкубации 37 °С (3); выхода из спячки, температура инкубации 11 °С (4); бодрствования, температура инкубации 37 °С (5)

мационные изменения только в области низких концентраций серотонина. В области высоких концентраций, судя по коэффициенту кооперативности Хилла, близкому к 1,0, продолжает работать исходная форма МАО.

У погружающихся в спячку сусликов при естественном снижении температуры тела от 37 до 11 °С в течение 24 ч влияние 11 °С на фракцию митохондрий проявилось в нелинейности графика обратных величин (рис. 2), положительном кооперативном связывании серотонина МАО в области как низких, так и высоких его концентраций, поскольку коэффициент кооперативности Хилла приближался к 4,0 (табл. 2). Эти данные свидетельствуют об изменении конформации МАО, которое сопровождается появлением положительных кооперативных взаимодействий между центрами МАО, связывающими серотонин. Положительная кооперативность по субстрату для МАО свидетельствует о росте каталитической эффективности активных

Таблица 2
Коэффициент кооперативности Хилла n_H для кривой зависимости скорости (v) дезаминирования серотонина от его концентрации [S]₀ при различных физиологических состояниях сусликов

Состояние животного	Температура, °С		Концентрация серотонина, мМ		
	тела	инкубации митохондрий	0,0625; 0,125; 0,250;	0,125; 0,250; 0,500	0,250; 0,500; 1,00
Бодрствование	37	37	1,16	1,29	0,90
	37	11	3,49	—	0,90
Погружение в спячку	11	37	1,05	1,44	1,61
	11	11	3,22	—	3,60
Спячка	от 2 до 6	37	2,52	—	2,11
	от 2 до 6	7	1,17	0,95	0,38
Выход из спячки	22	37	3,58	—	2,29
	22	11	0,87	1,09	1,0

величин Лайниувера — Бэрка и коэффициент кооперативности Хилла, близкий к 1,0, сохранились только в области высоких концентраций серотонина (рис. 2,1 и табл. 2). В области низких концентраций серотонина линейная зависимость графика двойных обратных величин исчезала, коэффициент кооперативности Хилла возрастал (табл. 2). Эти данные показывают, что за 30 мин инкубации при 11 °С МАО бодрствующих сусликов претерпевает конфор-

центров фермента по мере заполнения их серотонином и является, по-видимому, одним из механизмов, который, повышая активность МАО, противостоит действию низких температур и компенсирует влияние данного фактора на метаболизм серотонина в мозге погружающихся в спячку сусликов.

После 30-минутной инкубации митохондрий мозга при 37°C у погружающихся в спячку животных нелинейность графика обратных величин (рис. 2,3) и положительное кооперативное связывание серотонина МАО сохранялись только в зонах высоких концентраций серотонина ($n_H = 1,61$), в области же низких концентраций кооперативное связывание его исчезало (табл. 2). Эти факты свидетельствуют о том, что у погружающихся в спячку сусликов образованный при 11°C конформер МАО после нагревания до 37°C в течение 30 мин успевает деконформироваться в исходную форму МАО только при низких концентрациях серотонина и не успевает при высоких.

Глюкозамин и галактозамин дезаминируются МАО бодрствующих сусликов (соответственно $(1,45 \pm 0,25)$ и $(1,51 \pm 0,32)$ нмоль аммиака/мг белка/мин и сусликов в состоянии спячки (соответственно $(0,21 \pm 0,00)$ и $(0,44 \pm 0,08)$ нмоль аммиака/мг белка/мин). Это указывает на существенные различия между МАО гетеротермных сусликов и гомойотермных крыс. У крыс аминоксахара дезаминируются трансформированной под влиянием холода МАО [2], у сусликов дезаминирование аминоксахаров не зависит от температуры тела. Причем хлоргилин (10^{-7} М), специфический ингибитор, дезаминирующий серотонин МАО, не ингибирует дезаминирование ни глюкозамина, ни галактозамина (соответственно $(1,55 \pm 0,11)$ и $(1,37 \pm 0,22)$ нмоль аммиака/мг белка/мин), в то же время ингибирует дезаминирование серотонина ($0,62 \pm 0,18$ нмоль аммиака/мг белка/мин). На основании полученных результатов можно заключить, что МАО, дезаминирующая аминоксахара в мозге находящихся в спячке сусликов, не является температурным трансформером дезаминирующей серотонин МАО. Серотонин же у сусликов в состоянии спячки дезаминируется жесткой формой МАО с коэффициентом кооперативности Хилла, близким к 1,0 (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у сусликов в состоянии спячки и у бодрствующих животных уровень активности МАО различный (табл. 1). В то же время характер зависимости скорости дезаминирования серотонина от его концентрации, линейность и непересекаемость графиков двойных обратных величин (рис. 1, 1 и 5) и отсутствие кооперативных взаимодействий между центрами МАО, связывающими серотонин, оказались сходными (табл. 2). Однако связывать разницу в активности МАО у этих животных только с прямым действием низких температур в соответствии с правилом Аррениуса-Вант-Гоффа, по-видимому, нельзя, так как ранее наблюдалась компенсация действия низких температур на дезаминирование серотонина МАО у погружающихся в спячку сусликов [4]. При 37°C у находящихся в спячке сусликов активность МАО, характер зависимости дезаминирования серотонина от его концентрации, кооперативность по серотонину для МАО резко отличались от аналогичных пока-

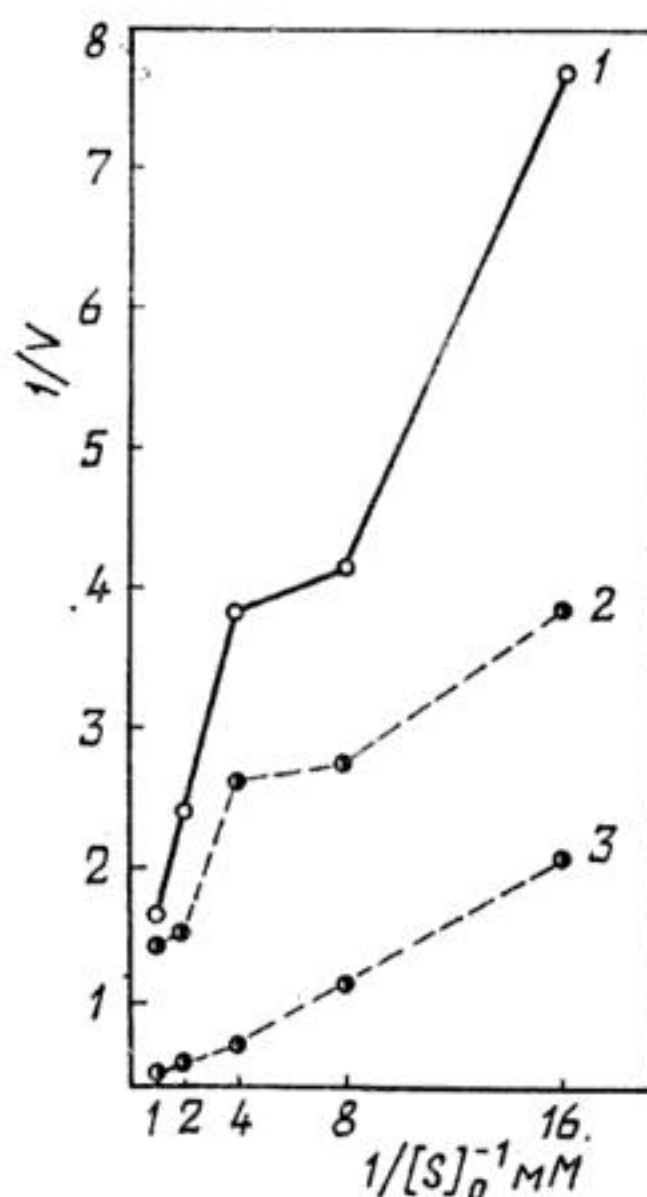


Рис. 2. Зависимость начальной скорости (v) дезаминирования серотонина МАО от его концентрации $[S]_0$ у сусликов в состояниях: бодрствования, температура инкубации 11°C (1); погружения в спячку, температура инкубации 11°C (2) и погружения в спячку, температура инкубации 37°C (3)

зателей у бодрствующих сусликов. Полученные данные позволяют предположить, что у сусликов, как находящихся в спячке, так и у бодрствующих, имеются «холодовый» и «тепловой» варианты МАО. Причем «холодовый» вариант не является температурным конформером «теплого», так как у бодрствующих и находящихся в спячке животных коэффициенты кооперативности Хилла одинаковы и близки к 1,0 (табл. 2).

У сусликов, находящихся в спячке и выходящих из нее, судя по сходной кооперативности по субстрату при 37 °С, а также соответственно при 7 и 11 °С, действует исходный «холодовый» вариант МАО, подверженный конформационным изменениям при повышении температуры (табл. 2). У впадающих в спячку животных, видимо, работает конформер МАО бодрствующих, так как одинаковые коэффициенты кооперативности Хилла в области как 37, так и 11 °С (табл. 2) совпадают. Скорость образования конформера МАО у бодрствующих сусликов при 11 °С регулируется концентрацией серотонина, поскольку в области низких концентраций данного соединения конформер МАО обнаруживался уже через 30 минут. В области же высоких концентраций конформер МАО был найден у впадающих в спячку не ранее, чем через 24 ч.

Из факторов, снижающих активность МАО в мозге животных, находящихся в спячке, следует исключить ингибиторы (рис. 1, 1 и 5), так как графики двойных обратных величин Лайниувера — Бэрка не пересекаются у бодрствующих и находящихся в спячке животных. Конформационные изменения МАО у сусликов, в отличие от крыс, не связаны с трансформацией ее [2] под влиянием низких температур, поскольку глюкозамин и галактозамин дезаминируются.

Полученные данные позволяют предположить, что у сусликов существует механизм, поддерживающий активность МАО длительное время при низких температурах — «холодовый» и «тепловой» варианты МАО. Эти формы МАО мозга сусликов, обладая гибкими структурами высшего порядка, претерпевают конформационные изменения в переходные периоды. Температурные конформеры исходных форм являются факторами, немедленно изменяющими активность МАО. Положительное кооперативное связывание серотонина ферментом у погружающихся в спячку сусликов компенсирует действие низких температур на метаболизм серотонина в мозге. Таким образом, у гетеротермных краснощеких сусликов, как и у пойкилотермов, гибкость структур высшего порядка позволяет реагировать на понижение температуры обратимыми изменениями метаболизма серотонина.

1. Васильевых Л. Г., Горкин В. З., Каган З. С. Особенности кинетики реакций, катализируемых мембраносвязанными моноаминоксидазами // Биохимия. — 1979. — 44, № 9. — С. 1542—1550.
2. Горкин В. З. Трансформация ферментов // Молекуляр. биология. — 1976. — 10, № 4. — С. 717—736.
3. Горкин В. З., Вережкина И. В., Гриднева Л. И., Жердева Л. В. и др. Методы исследования активности и специфического торможения моноаминоксидаз митохондрий // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1968. — С. 155—177.
4. Попова Н. К., Войтенко Н. Н., Слоним А. Д. Температурная компенсация метаболизма серотонина в мозге зимоспящих // Докл. АН СССР. — 1979. — 248, № 2. — С. 492—494.
5. Силонова Г. В., Ливанова Н. Б., Курганов Б. И. Аллостерическое ингибирование фосфорилазы Б из мышц кролика // Молекуляр. биология. — 1969. — 3, № 5. — С. 768—783.
6. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 309 с.

Ин-т цитологии и генетики
СО АН СССР,
г. Новосибирск

Поступила 15.02.86

С. П. Львова

СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОГЕНА, ФОСФОРИЛАЗНАЯ И ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ТКАНЯХ СУСЛИКА И ЛЯГУШКИ ПРИ ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ

В зимнюю спячку, или гибернацию, характеризующуюся значительным и длительным снижением температуры тела и метаболизма, впадают животные разных филогенетических групп. В состоянии спячки температура тела млекопитающих понижается до $3 \div 5^\circ \text{C}$, а у пойкилотермных позвоночных до 0 или -1°C . Сравнительное исследование биохимических процессов при гибернации животных разного филогенетического уровня представляет несомненный интерес для решения ряда вопросов экологии, эволюционной биохимии и физиологии, криобиологии.

С 1967 г. нами проводятся исследования энергетического метаболизма тканей при гибернации в филогенезе. Целью данного исследования явилось изучение содержания гликогена, фосфорилазной (КФ 2.4. 1.1) и глюкозо-6-фосфатазной (КФ 3.1.3.9) активности в тканях эндо- и эктотермных животных при подготовке к спячке и наступившей спячке различной длительности.

Опыты проведены на малых сусликах (*Citellus pygmaeus*) массой 200—250 г и озерных лягушках (*Rana ridibunda*) массой 30—40 г. Содержание гликогена, фосфорилазную, глюкозо-6-фосфатазную активность исследовали в печени, икроножной мышце, миокарде, больших полушариях мозга в июне — июле, осенью перед залеганием в спячку (октябрь — ноябрь) и при 1, 3, 4—6-недельной зимней спячке. Все эксперименты проведены в одно время суток (10—11 ч.).

Осенью лягушек помещали в аквариумы с небольшим количеством воды, которые ставили в темное прохладное ($2 \div 4^\circ \text{C}$) помещение [4]. Сусликов в отдельных клетках в октябре также переносили в темное прохладное помещение. Температура тела сусликов при спячке составляла $8 \div 10^\circ \text{C}$, лягушек — $2 \div 4^\circ \text{C}$.

О фосфорилазной [2] и глюкозо-6-фосфатазной [1] активности судили по приросту фосфора за 20 мин инкубации при 37°C . Содержание гликогена определяли по количеству глюкозы, образующейся при 2,5-часовом гидролизе в $1 \text{ н } \text{H}_2\text{SO}_4$ [7], глюкозы — глюкозоксидазным методом [3]. Ферментативную активность выражали в микромолях фосфора на 1 г влажной ткани за 1 мин, количество гликогена — в микромолях глюкозы на 1 г влажной ткани.

Результаты исследования показывают (табл. 1, 2), что содержание гликогена и активность ферментов, участвующих в его утилизации, претерпевают значительные сезонные изменения. Осенью (октябрь — ноябрь) перед спячкой наблюдается заметное увеличение депонированного в печени гликогена, более выраженное (в 2,8 раз) у эктотермного, чем у эндотермного (в 1,7 раз) животного. При этом содержание печеночного гликогена у лягушек намного превышает его уровень у сусликов. Увеличение гликогена в печени мы наблюдали также перед зимней спячкой у разноцветной ящурки [5]. У сусликов растет содержание этого полисахарида и в икроножной мышце (на 40,9 %). Наши исследования [6] показывают, что изменение уровня гликогена перед спячкой в разных мышцах сусликов происходит по-разному. Так, его уровень понижается зимой в мышцах головы и шеи и увеличивается в мышцах задних конечностей, что, видимо, связано со снижением двигательной активности животных.

Значительное резервирование гликогена в его основном депо, печени, при подготовке к спячке несомненно играет важную биологическую роль, поскольку в условиях непрерывной зимней спячки углеводы с пи-

Таблица 1

Содержание гликогена, фосфорилазная и глюкозо-6-фосфатазная активность в тканях сусликов при зимней спячке ($M \pm m$)

Вариант опыта	Печень	Мышца	Миокард	Мозг
Гликоген, мкм/г влажной ткани				
Контроль, лето	$77,7 \pm 2,3$	$32 \pm 4,7$	$7,0 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$
Контроль, осень	$134 \pm 10,5^*$	$45 \pm 3,2^*$	$7,6 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,15$
Зимняя спячка, 10° С:				
1 неделя	$31,4 \pm 2,0^{**}$	$40 \pm 3,1$	$14,3 \pm 1,2^{**}$	$7,3 \pm 0,7^{**}$
1 месяц	$67,0 \pm 5,0^{**}$	$50,3 \pm 3,4$	$28,5 \pm 2,4^{**}$	$11,5 \pm 1,0^{**}$
Фосфорилазная активность, мкм Рi/г ткани/мин				
Контроль, лето:				
общая	$20,5 \pm 0,84$	$36,4 \pm 1,4$	$22,5 \pm 0,72$	$15,0 \pm 1,0$
a	$15,5 \pm 0,53$	$17,3 \pm 0,7$	$15,1 \pm 0,92$	$9,5 \pm 0,64$
b	$5,0 \pm 0,45$	$19,1 \pm 0,8$	$7,4 \pm 0,95$	$5,5 \pm 0,63$
Контроль, осень:				
общая	$15,6 \pm 0,7^*$	$31,7 \pm 2,5$	$17,6 \pm 0,8^*$	$13,1 \pm 1,0$
a	$10,8 \pm 0,9^*$	$11,4 \pm 1,1^*$	$10,5 \pm 0,7^*$	$8,0 \pm 0,6$
b	$4,8 \pm 0,6$	$20,3 \pm 1,7$	$7,1 \pm 0,4$	$5,1 \pm 0,7$
Зимняя спячка, 10 °С				
1 месяц:				
общая	$19,0 \pm 0,8^{**}$	$22,6 \pm 1,2^{**}$	$16,6 \pm 0,8$	$7,0 \pm 0,5^{**}$
a	$16,0 \pm 0,9^{**}$	$15,5 \pm 1,1^{**}$	$10,0 \pm 0,6$	$5,0 \pm 0,3^{**}$
b	$3,0 \pm 0,3^{**}$	$7,1 \pm 0,7^{**}$	$6,6 \pm 0,9$	$2,0 \pm 0,3^{**}$
Глюкозо-6-фосфатазная активность, мкм Рi/г ткани/мин				
Контроль, лето	$4,1 \pm 0,45$	$0,11 \pm 0,01$	$0,7 \pm 0,3$	$0,71 \pm 0,07$
Контроль, осень	$4,2 \pm 0,32$	$0,25 \pm 0,03^*$	$0,72 \pm 0,017$	$0,78 \pm 0,067$
Зимняя спячка, 10 °С:				
1 неделя	$4,8 \pm 0,3$	0**	0**	0**
1 месяц	$7,8 \pm 0,08^{**}$	$0,25 \pm 0,04$	$0,37 \pm 0,03^{**}$	$0,56 \pm 0,04^{**}$

Примечание. Каждая величина — среднее из определений на 8—12 особях. Здесь и в табл. 2 звездочкой обозначены достоверные ($p < 0,05$) различия по сравнению с показателями летом, двумя звездочками — осенью.

щей не поступают, печень обеспечивает глюкозой энергетические потребности прежде всего нервной системы и эритроцитов.

Увеличение уровня депонированного в печени гликогена перед спячкой хорошо коррелирует с заметным понижением в этом органе фосфорилазой активности. Так, у лягушек общая фосфорилазная активность в печени понижается в 3 раза, а у сусликов только в 1,3 раза, однако у них это снижение идет за счет снижения активности фосфорилазы *a*.

Снижение общей фосфорилазной активности и ее *a*-формы осенью перед спячкой наблюдалось и в других органах лягушек, а также в миокарде сусликов. В икроножной мышце сусликов при этом общая фосфорилазная активность не претерпевала существенных изменений, однако в ней достоверно понижалась доля фосфорилазы *a*: от 47,5 до 36 % от общей активности фермента.

В отличие от фосфорилазы глюкозо-6-фосфатазная активность в большинстве тканей в осенний период не подвергается заметным изменениям. Исключение составляет печень лягушек, в которой активность фермента снижалась в 2,5 раза, что согласуется с понижением уровня гликемии [4], и икроножная мышца сусликов, в которой, напротив, наблюдалось достоверное увеличение глюкозо-6-фосфатазной активности.

Зимняя спячка ведет к значительному снижению запасов гликогена в печени, что особенно выражено при сравнительно кратковременной гибернации (1 и 3 недели). Так, при недельной спячке сусликов и лягушек

Таблица 2

Содержание гликогена, фосфоорилазная и глюкозо-6-фосфатазная активность в тканях озерной лягушки при зимней спячке ($M \pm m$)

Вариант опыта	Печень	Мышца	Миокард	Мозг
Гликоген, мкм/г влажной ткани				
Контроль, лето	$156 \pm 9,5$	$41 \pm 1,8$	—	$16,5 \pm 2,0$
Контроль, осень	$444 \pm 12,3^*$	$31 \pm 2,1^*$	$57 \pm 2,3$	$9,9 \pm 1,5^*$
Зимняя спячка 2—4 °С				
1 неделя	$80 \pm 5,5^{**}$	$38 \pm 4,1$	$73 \pm 1,8^*$	$22,0 \pm 0,5^{**}$
3 недели	$100 \pm 12,0^{**}$	$23 \pm 1,5^{**}$	—	$21,8 \pm 0,8^{**}$
6 недель	$137 \pm 7,3^{**}$	$48,3 \pm 2,7^{**}$	$125 \pm 4,6^{**}$	$26,0 \pm 2,4^{**}$
Фосфоорилазная активность, мкм Рi г/мин				
Контроль, лето:				
общая	$30 \pm 1,3$	$49 \pm 3,1$	$25 \pm 1,0$	$19 \pm 2,3$
a	$22 \pm 1,5$	$23,6 \pm 1,2$	$18 \pm 1,0$	$16 \pm 2,4$
b	$8 \pm 0,7$	$25,4 \pm 2,5$	$7 \pm 0,7$	$3 \pm 0,3$
Контроль, осень:				
общая	$11 \pm 0,4^*$	$30 \pm 0,8^*$	$9 \pm 1,0^*$	$14 \pm 0,55^*$
a	$9 \pm 0,7^*$	$12 \pm 0,6^*$	$9 \pm 1,0^*$	$7,2 \pm 0,19^*$
b	$2 \pm 0,3^*$	$18 \pm 0,7^*$	0*	$6,9 \pm 0,3^*$
Зимняя спячка 2—4 °С:				
1 неделя				
общая	$11 \pm 1,1$	$28 \pm 0,3$	$9 \pm 1,2$	$12,7 \pm 0,4$
a	$9 \pm 0,7$	$13 \pm 0,7$	$7 \pm 0,9$	$5,6 \pm 0,3^{**}$
b	$2 \pm 0,3$	$15 \pm 0,9^{**}$	$2 \pm 0,3$	$7,1 \pm 0,3$
6 недель				
общая	$25,8 \pm 1,2^{**}$	$35,2 \pm 0,4^{**}$	$21,6 \pm 0,2$	$18,1 \pm 0,5^{**}$
a	$11,6 \pm 0,9$	$21,7 \pm 0,8^{**}$	$9,7 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,4$
b	$14,2 \pm 1,4^{**}$	$13,5 \pm 0,5^{**}$	$11,9 \pm 0,4$	$11,5 \pm 0,5^{**}$
Глюкозо-6-фосфатазная активность, мкм Рi г/мин				
Контроль, лето	$5,1 \pm 0,15$	$0,84 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,08$	$0,73 \pm 0,05$
Контроль, осень	$2,1 \pm 0,2^*$	$0,93 \pm 0,045$	$0,76 \pm 0,11$	$0,92 \pm 0,06$
Зимняя спячка 2—4 °С:				
1 неделя	$0,8 \pm 0,13^{**}$	$0,64 \pm 0,12^{**}$	$0,28 \pm 0,11^{**}$	$0,50 \pm 0,08^{**}$
3 недели	$0,73 \pm 0,04^{**}$	0**	0**	$0,72 \pm 0,04^{**}$
6 недель	$1,76 \pm 0,18$	0**	$0,18 \pm 0,02^{**}$	$0,27 \pm 0,04^{**}$

количество гликогена в печени уменьшается соответственно в 4,2 и 5,6 раз. При месячной спячке сусликов, прерываемой периодическими пробуждениями, концентрация гликогена в печени ниже, чем в контроле, только в 2 раза.

Таким образом, периодические пробуждения, имеющие место у млекопитающих, способствуют частичному восполнению запасов гликогена в печени вследствие усиления глюконеогенеза [10]. У пойкилотермных животных лягушек (табл. 2) и ящериц [5] при пролонгировании зимней спячки от 1 до 5—6 недель убыль гликогена в печени также частично восполняется, видимо, за счет интенсификации глюконеогенеза.

Концентрация гликогена в разных скелетных мышцах гибернирующих сусликов изменяется по-разному в зависимости от топографии мышц, характера их обмена, длительности спячки [6]. В икроножной мышце сусликов (табл. 1) содержание гликогена не претерпевает существенных изменений в динамике спячки, а у лягушек (табл. 2) не меняется при недельной гибернации, достоверно снижается при трехнедельной спячке и увеличивается при 1,5-месячном зимнем оцепенении.

Особо следует отметить сохранение высокого уровня гликогена в мозге эндо- и эктотермных животных в течение всех исследованных сроков спячки. По данным гистологических исследований [8], высокая концентрация гликогена обнаружена в нейронах сетевидного образования среднего мозга,

в медиальных отделах зрительного бугра, в кортикальных нейронах, гибернирующих ежей. Высокое содержание гликогена, а также глюкозы [5] в мозге эндо- и эктотермных животных при гибернации свидетельствует о том, что центральная нервная система при глубокой зимней спячке, по-видимому, не испытывает недостатка в энергетическом субстрате.

Высказывается мнение [9] о том, что количество гликогена в головном мозге при зимней спячке может регулировать ее продолжительность. Фосфорилазная активность несколько увеличивается в печени гибернирующих сусликов и снижается в других органах (табл. 1). Одновременно во всех органах изменяется соотношение фосфорилаз *a* и *b* в сторону увеличения активной формы фермента. Это особенно заметно в случае замеров фосфорилазной активности при 10 °С, то есть температуре тела гибернирующих животных. У лягушек недельная спячка не приводит к существенному изменению фосфорилазной активности в тканях (табл. 2). Более длительная (6 недель) гибернация повышает активность этого фермента главным образом за счет малоактивной фосфорилазы *b*. Исключение составляет икроножная мышца, в которой при 6-недельной спячке активность фосфорилазы *a* увеличивается по сравнению с недельной спячкой от 46 до 61 % общей активности фермента.

Таким образом, способность тканей, прежде всего печени, к фосфоролитическому расщеплению гликогена при гибернации эндо- и эктотермного животного сохраняется на высоком уровне. Одновременно у млекопитающих увеличивается доля фосфорилазы *a* от общей активности фермента, что особенно ясно видно в случае замеров ферментативной активности при температуре, соответствующей температуре тела гибернирующего животного.

Повышение доли активной формы фермента в условиях зимней спячки при значительном понижении регуляции ферментативной активности со стороны гормональной и нервной систем можно, видимо, рассматривать как компенсаторную реакцию, облегчающую возможность утилизации гликогена в условиях резкого снижения температуры тела и скорости обменных процессов.

Исследование глюкозо-6-фосфатазной активности показало фазовость ее изменения в процессе спячки (табл. 1, 2). При кратковременной (1 и 3 недели) спячке наблюдается снижение активности фермента во всех органах лягушки и суслика, кроме печени суслика. При удлинении спячки до 4—6 недель глюкозо-6-фосфатазная активность увеличивается в печени сусликов и лягушек соответственно на 62 и 120 % относительно уровня во время недельной спячки. При этом у сусликов она в 1,9 раз превышает контрольную величину. Некоторое увеличение глюкозо-6-фосфатазной активности при месячной зимней спячке наблюдается также в мышцах, миокарде, мозге сусликов. Наблюдаемые в печени изменения, видимо, связаны с усилением процессов глюконеогенеза. Об этом свидетельствуют не только увеличение при длительной спячке содержания в печени гликогена и возрастание глюкозо-6-фосфатазной активности, но и активация других ферментов глюконеогенеза [1].

Полученные результаты показали наличие сходства в изменении количества гликогена и активности ферментов, участвующих в его утилизации в тканях эндо- и эктотермного организма при подготовке к спячке и в ее динамике.

Таким образом, при гибернации у сусликов и лягушек сохраняется высокая потенциальная способность к фосфоролитическому расщеплению гликогена, у сусликов увеличивается доля фосфорилазы *a* в общей активности фермента. Глюкозо-6-фосфатазная активность понижается при кратковременной спячке во всех тканях, кроме печени суслика. При удлинении спячки она увеличивается в печени и у сусликов в 1,9 раз превышает уровень контроля.

1. Давдова Г. М., Усатенко М. С. Активность ферментов глюконеогенеза в печени сусликов *Citellus suslicus* // Журн. эволюц. биохимии и физиологии.— 1970.— 6, № 1.— С. 35—41.
2. Желудкова З. П. Активная и неактивная фосфоорилаза в печени куриных эмбрионов и влияние на нее кортизона // Там же.— 1966.— 2, № 3.— С. 143—148.
3. Лукомская И. С., Городецкий В. К. Применение глюкозооксидазы для специфического количественного определения глюкозы в крови // Вопр. мед. химии.— 1960.— 6, № 3.— С. 193—198.
4. Львова С. П. Характеристика энергетического обмена в тканях озерной лягушки в разные сезоны года // Укр. биохим. журн.— 1978.— 50, № 6.— С. 744—748.
5. Львова С. П. Особенности энергетического метаболизма ящурки *Eremias arguta* при зимней спячке // Журн. эволюц. биохимии и физиологии.— 1980.— 16, № 5.— С. 524—527.
6. Львова С. П., Чубуркова С. С. Содержание гликогена и фосфоорилазная активность в различных мышцах крыс и сусликов при гипотермии, самосогревании и зимней спячке // Укр. биохим. журн.— 1983.— 55, № 1.— С. 39—44.
7. Прохорова М. И., Тупикова З. Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1965.— 220 с.
8. Штарк М. Б. Мозг зимне спящих.— Новосибирск: Наука, 1970.— 240 с.
9. Badry K. S., Taha H. M. Hibernation — hypothermia and metabolism in hedgehogs; changes in some organic components // Comp. Biochem. Physiol.— 1983.— A74, N 1.— P. 143—148.
10. Galster W., Morrison P. R. Gluconeogenesis in arctic ground squirrel between periods in hibernation // Amer. J. Physiol.— 1975.— 228, N 1.— P. 325—330.

Дагестанский гос. ун-т,
г. Махачкала

Поступила 29.09.86

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.58

В. С. Шугалей, Т. Х. Шортанова, Н. И. Самойлик, Т. Н. Головина

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА И ИНТЕНСИВНОСТЬ СПОНТАННОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ТКАНЯХ ЗИМОСПЯЩИХ СУСЛИКОВ

В исследовании биохимических механизмов зимней спячки внимание исследователей привлекает проблема сохранения интегративных функций метаболических систем в условиях низких температур, при которых у незимоспящих обычно наблюдаются необратимые нарушения метаболизма, несовместимые с жизнью. В настоящей работе определяли содержание белка, мочевины, активность трансаминаз, аспартат- и аланин-трансаминаз (АСТ и АЛТ), интенсивность спонтанного перекисного окисления липидов в мозге и других тканях зимоспящих сусликов.

Объектом исследования служили суслики (*Citellus pigmaeus* Pall.), отловленные в предгорьях Северного Кавказа на высоте 1800—2000 м. Суслики в октябре — ноябре в лабораторных условиях погружались в состояние зимней спячки. Животных брали в опыт через 4 мес спячки с ректальной температурой $5 \div 9^\circ \text{C}$. Контролем служили животные, которые жили в лабораторных условиях при температуре 20°C и в спячку не впадали. Зимоспящих и контрольных животных обследовали одновременно. Было взято в опыт 10 зимоспящих и 10 бодрствующих сусликов. Содержание общего белка в тканях определяли по методу Лоури, активность АЛТ и АСТ — по методу Т. С. Пасхиной, содержание мочевины — по реакции с диацетилмонооксимом. Интенсивность спонтанного перекисного окисления определяли по накоплению малонового диальдегида.

Данные, изложенные в табл. 1, свидетельствуют о сохранении потенциальной активности АСТ и АЛТ в больших полушариях, стволовой части мозга и мозжечке зимоспящих сусликов. Это согласуется с отсутствием изменений в содержании общего белка ткани мозга. Ранее нами было показано [2], что активность аргиназы в мозге зимоспящих не отличается от аналогичной активности у бодрствующих животных. Аргиназа является основным ферментом, ответственным за образование мочевины. Содержание мочевины в тканях зимоспящих было ниже, чем у бодрствующих животных.

Таблица 1

Активность аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) в отделах мозга и сыворотке крови зимоспящих и бодрствующих сусликов, мкмоль пирувата/мг ткани/ч

Животные	Большие полушария	Стволовая часть	Мозжечок	Сыворотка крови
АСТ				
Зимоспящие	34,60 ± 2,18	31,93 ± 1,71	33,35 ± 1,79	0,53 ± 0,03
Бодрствующие	39,74 ± 1,81	37,40 ± 1,69	43,12 ± 1,97	0,69 ± 0,05
АЛТ				
Зимоспящие	2,17 ± 0,19	2,08 ± 0,71	2,40 ± 0,19	1,08 ± 0,10
Бодрствующие	1,59 ± 0,29	1,45 ± 0,25	1,55 ± 0,31	1,02 ± 0,07

(табл. 2). У зимоспящих отмечались значительные индивидуальные колебания уровня свободной мочевины. Показано, что при спячке продолжительностью 2 мес наблюдается увеличение количества мочевины в мозге. Исследования [4] свидетельствуют о существенных колебаниях уровня мочевины у сусликов в зависимости от глубины и продолжительности спячки. Это можно объяснить цикличностью зимней спячки, которая как известно, не является монотонным гипобиозом, а включает периодические пробуждения. При обследовании в начальные сроки после последнего пробуждения содержание мочевины в тканях может быть снижено. К концу цикла она накапливается в тканях, что, возможно, и служит одним из сигналов к пробуждению.

Таблица 2

Содержание мочевины (мкмоль/г ткани) и общего белка (мг/г ткани) в тканях зимоспящих и бодрствующих сусликов

Животные	Мочевина				Белок	
	мозга	печени	сердца	сыворотки	мозга	печени
Зимоспящие	3,55 ± 0,28	3,85 ± 0,57	3,63 ± 0,32	7,55 ± 1,54	38,37 ± 2,12	58,1 ± 4,52
Бодрствующие	6,15 ± 0,75	5,61 ± 0,46	6,59 ± 0,78	6,16 ± 0,88	36,0 ± 3,72	44,8 ± 4,83

Отсутствие изменений в содержании общего белка в тканях, сохранение активности трансаминаз свидетельствуют об определенной стабильности азотистого обмена в ходе зимней спячки. Одним из показателей состояния мембран клеток является интенсивность спонтанного перекисного окисления. По нашим данным, содержание одного из продуктов перекисного окисления липидов малонового диальдегида (МДА) в тканях мозга и печени зимоспящих и бодрствующих животных одинаково (табл. 3) и близко к значению, найденному у крыс [1]. Однако ткани сусликов и крыс коренным образом отличаются по способности к спонтанному перекисному окислению в условиях инкубации *in vitro*. В мозге зимоспящих сусликов прирост МДА был незначителен, в печени его не удалось обнаружить после многочасовой инкубации ткани. В аналогичных условиях инкубация тканей крысы дает 10-кратный прирост количества МДА [1].

Таблица 3

Интенсивность спонтанного перекисного окисления в мозге и печени зимоспящих и бодрствующих сусликов, нмоль МДА/г ткани

Животные	Мозг		Печень	
	Без инкубации	Инкубация 1 ч	Без инкубации	Инкубация 2 ч
Зимоспящие	22,85 ± 2,56	39,05 ± 2,78	17,46 ± 1,19	22,17 ± 4,5
Бодрствующие	16,75 ± 2,16	43,55 ± 5,87	19,26 ± 3,15	30,17 ± 6,85

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что понижение температуры тела при гипобии у зимоспящих не оказывает существенного влияния на активность ферментов при температуре 37 °С. Наиболее важным отличием тканей зимоспящих от тканей незимоспящих животных является повышенная устойчивость мембран зимоспящих (по данным исследования ПОЛ), что может быть обусловлено присутствием в клетках эндогенных антиоксидантов. По нашим данным, в тканях зимоспящих существенно повышается активность пероксидазы и других ферментов, удаляющих свободные радикалы и перекиси. Это согласуется с литературными данными о том, что эритроциты зимоспящих отличаются повышенной стабильностью, а в тканях значительно повышается содержание токоферола [3].

1. Ломакина Л. В. Влияние низкой температуры на перекисное окисление липидов и интенсивность протеолиза в тканях мозга и печени крыс // Укр. биохим. журн.— 1980.— 52, № 3.— С. 305—308.
2. Шугалей В. С., Кричевская А. А., Козина Л. С. Температурная чувствительность ферментов синтеза мочевины в мозге зимоспящих хомяков и крыс в ходе холодовой акклиматизации // Биохимическая эволюция.— Л.: Наука, 1973.— С. 208—212.
3. Экологическая физиология животных.— Л.: Наука, 1979.— С. 183—258.
4. Эмирбеков Э. З. Азотистый метаболизм мозга при гипотермии и зимней спячке.— Махачкала: Дагучпедгиз, 1969.— 136 с.

Ростовский гос. ун-т,
Кабардино-Балкарский гос. ун-т,
г. Нальчик

Поступила 09.11.83

УДК 577.122.5 : 57.015.3

Г. Ф. Жегунов

АКТИВАЦИЯ СИНТЕЗА БЕЛКА В ТКАНЯХ СУСЛИКОВ НА НАЧАЛЬНОМ ЭТАПЕ ПРОБУЖДЕНИЯ ОТ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

Известно, что в течение всего периода зимней спячки гетеротермные животные систематически пробуждаются и разогреваются от 1 ÷ 5 °С до 37 °С каждые 10—15 дней [4]. Однако остается неизвестным механизм, обеспечивающий приспособление клеток зимоспящих к функционированию в разных условиях. Показано, что во время зимней спячки процесс синтеза белков протекает на очень низком уровне, но спустя 3—5 ч после начала пробуждения грызунов в различных тканях наблюдается существенное усиление синтеза белков [1,3], которое может быть одним из механизмов приспособления гибернаторов. Представляло интерес выяснить, происходит ли стимуляция синтеза белков на начальном этапе пробуждения еще при низкой температуре тела гетеротермов.

Синтез белка изучался в зимний период у пробуждающихся сусликов, а также у крыс изотопным методом, с использованием ³H-лейцина. Изотоп вводился животным внутривенно из расчета 50 мкКи на 100 г веса. Спустя 1 час животных декапитировали, извлекали органы и брали навески по 10 мг. Кусочки тканей гомогенизировали в 10 % ТХУ, дальнейшую обработку вели на нитроцеллюлозных фильтрах [2].

Установлено, что через час после начала пробуждения при температуре тела животных 12 ÷ 15 °С в ткани сусликов попадает значительное количество меченых аминокислот. При этом отмечен высокий уровень включения метки в белки клеток всех исследованных тканей (таблица). Наиболее активно протекает синтез белков в корковом слое почки, а также в сердце. Интенсивность синтеза у пробуждающихся сусликов всего в 1,5—2 раза была ниже, чем у крыс.

Из представленных данных следует, что активация синтеза белков у зимоспящих происходит уже на начальных этапах пробуждения, еще при низкой температуре тела грызунов. Это позволяет предположить наличие у гибернаторов специального механизма стимуляции процесса синтеза белков, который может реализоваться уже на начальных этапах разогрева животных.

Уровень включения ^3H -лейцина в белки различных тканей пробуждающегося суслика и крысы (количество распадов на 1 мг белка в мин)

Животные	Левый желудочек		Предсердие		Печень		Поджелудочная железа		Почка		Пул меченых аминокислот в крови в момент декапитации животных
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Пробуждающийся суслик	380	3160	340	1120	300	8850	250	7800	650	12850	9200
Крыса	530	3400	—	—	1100	4000	—	—	—	—	10500

Примечание. 1 — интенсивность включения метки в белки; 2 — пул свободных меченых аминокислот в тканях, определялся одновременно с измерением скорости включения метки в белки. Представлены результаты типичного эксперимента для каждой группы животных.

1. Жегунов Г. Ф., Микулинский Ю. Е. Активация синтеза белка в тканях зимоспящих животных при пробуждении // Укр. биохим. журн.— 1987.— № 5.— С. 71—77.
2. Кеннел Д. Использование фильтров для разделения радиоактивных ДНК, РНК и белка // Методы исследования нуклеиновых кислот.— М.: Мир, 1970.— С. 138—144.
3. Палладин А. В., Хайкина Н. И. Биохимия белков в центральной нервной системе при различных функциональных состояниях // Докл. АН СССР.— 1955.— 202, № 2.— С. 319—323.
4. Wong L. C. H. Live at low temperature: mammalian hibernation // Cryo-Lett.— 1985.— 6, N 4.— P. 257—274.

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

Поступило 16.06.87

УДК 57.043

Т. М. Сидякина, В. С. Ледаков, М. Ю. Чумакова

СИСТЕМА АВТОМАТИЧЕСКОГО ПОДДЕРЖАНИЯ УРОВНЯ ЖИДКОГО АЗОТА В ХРАНИЛИЩАХ ХБ-0,5

Широкое использование криоконсервации для длительного хранения клеток крови, костного мозга, микроорганизмов, клеточных культур животного и растительного происхождения при азотных температурах привело к созданию низкотемпературных банков различных биологических объектов как у нас в стране, так и за рубежом. При криоконсервации биологические объекты хранятся в сосудах с жидким азотом при температуре кипения — 196 °С либо в парах азота при температуре не выше —150 °С. Повышение температуры хранения может привести к потере жизнеспособности из-за рекристаллизации внутриклеточного льда. В крупных низкотемпературных банках успешно используются хранилища биопродуктов ХБ-0,5 емкостью 500 л жидкого азота, разработанные ВНИИ гелиевой техники. Существенным недостатком хранилищ ХБ-0,5 является отсутствие автоматического устройства для заправки хранилищ жидким азотом, а также системы поддержания уровня жидкого азота и контроля температуры.

С целью повышения надежности термостатирования и снижения затрат на ручную заправку жидким азотом в низкотемпературном банке Всесоюзной коллекции микроорганизмов ИБФМ АН СССР разработана система автоматического поддержания уровня АПУ-1 в хранилищах ХБ-0,5. Система АПУ-1 состоит из поплавкового датчика уровня с магнитным контактом, блока управления с воздушным компрессором

КВМ-10 для подъема давления в транспортном сосуде с жидким азотом АСД-100 и гибкого переливного сифона.

На рисунке представлена схема датчика уровня поплавкового типа с магнитным контактом. Датчик состоит из нержавеющей трубки диаметром 25 мм 1 с зажимом 2 на конце для установки в горловину 3 хранилища ХБ-0,5. В трубку при помощи втулки из пробкового дерева 4 вставлен геркон 5, который реагирует на положение постоянного магнита 6, укрепленного на коромысле 7 поплавок при помощи спирали 8, конец которой является ограничителем опускания поплавка 9. Коромысло 7 поплавка изготовлено из нержавеющей проволоки диаметром 2 мм, а сам поплавок 9, отслеживающий положение уровня жидкого азота в хранилище, выполнен из пенопласта. Через горловину 3 хранилища ХБ-0,5 выведены два тонких провода 10 от геркона к блоку управления. Данная конструкция датчика обеспечивает срабатывание магнитного контакта и начало заправки хранилища ХБ-0,5 жидким азотом при опускании уровня 11 в пределах 10 мм от заданного положения.

Разработанная система автоматического поддержания уровня АПУ-1 успешно используется в низкотемпературном банке Всесоюзной коллекции микроорганизмов. Система проста в изготовлении и надежна в эксплуатации. Погрешность поддержания уровня жидкого азота в хранилище ХБ-0,5 при использовании системы АПУ-1 не превышает 10 мм. Использование системы АПУ-1 позволяет сократить потери жидкого азота более чем в три раза по сравнению с ручной заправкой, что дает существенную экономию затрат на жидкий азот.

Всесоюзная коллекция микроорганизмов,
Ин-т биохимии и физиологии
микроорганизмов АН СССР,
г. Москва

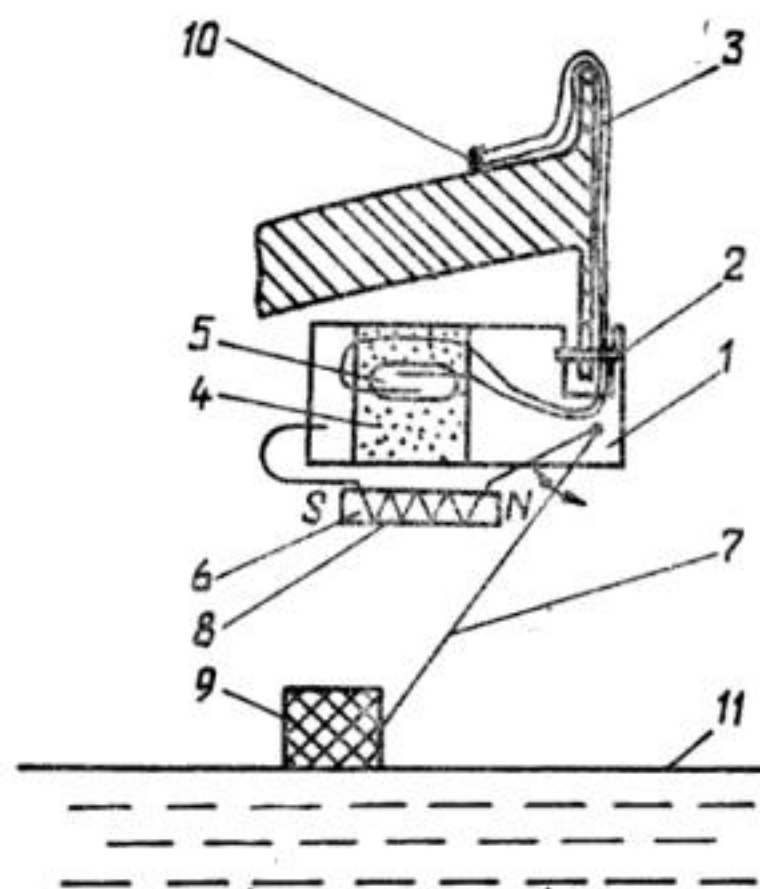


Схема датчика уровня поплавкового типа с магнитным контактом (обозначения см. в тексте)

Поступило 25.06.85

УДК 615.387

Л. К. Стусь, В. М. Куракса

ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИХ КИСЛОТНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Эритроцитарная популяция периферической крови здорового взрослого человека состоит из неравнозначных в функциональном отношении клеток: молодых эритроцитов, зрелых и старых клеток, процентное соотношение которых может значительно варьировать от донора к донору [3]. В настоящее время для оценки эритроцитов применяют морфологические, биохимические и биофизические методы, дающие полную информацию о состоянии клеток. Среди них метод кислотных эритрограмм, позволяющий судить о гетерогенности эритроцитарной суспензии как одного из важнейших ее свойств.

Цель нашего исследования состояла в изучении корреляции между гемолизом эритроцитов периферической крови человека при гипотермическом хранении и их исходной кислотной резистентностью.

Кровь, заготовленную на «глюглицере», перемешивали, разливали в пробирки по 5 мл, герметично закрывали и помещали в холодильную камеру, где она хранилась

течение трех недель при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. Исходное состояние суспензии эритроцитов оценивали в день взятия крови у донора по их устойчивости к кислотному гемолизу [4], для чего вычисляли количество эритроцитов (в процентах), гемолизировавшихся между двумя отсчетами времени при получении эритрограммы по формуле:

$$\Delta n_i = \frac{\Delta N(t)}{N_{\text{полн}}} = \frac{1}{H_0 - H_\infty} \frac{dH}{dt}, \quad (1)$$

где $\Delta N(t)$ — количество эритроцитов в единице объема пробы, подвергающихся гемолизу в момент времени t , $N_{\text{полн}}$ — исходное количество эритроцитов в единице объема пробы, принимаемое за 100 %, H_0 — начальное значение экстинкции, H_∞ — конечное значение экстинкции в пробе. Суммарная стойкость эритроцитов к кислотному гемолизу оценивается по формуле [1]:

$$P = \sum_{i=1}^n \Delta n_i t_i = \sum_{i=1}^n \frac{\Delta N(t)}{N_{\text{полн}}} t_i, \quad (2)$$

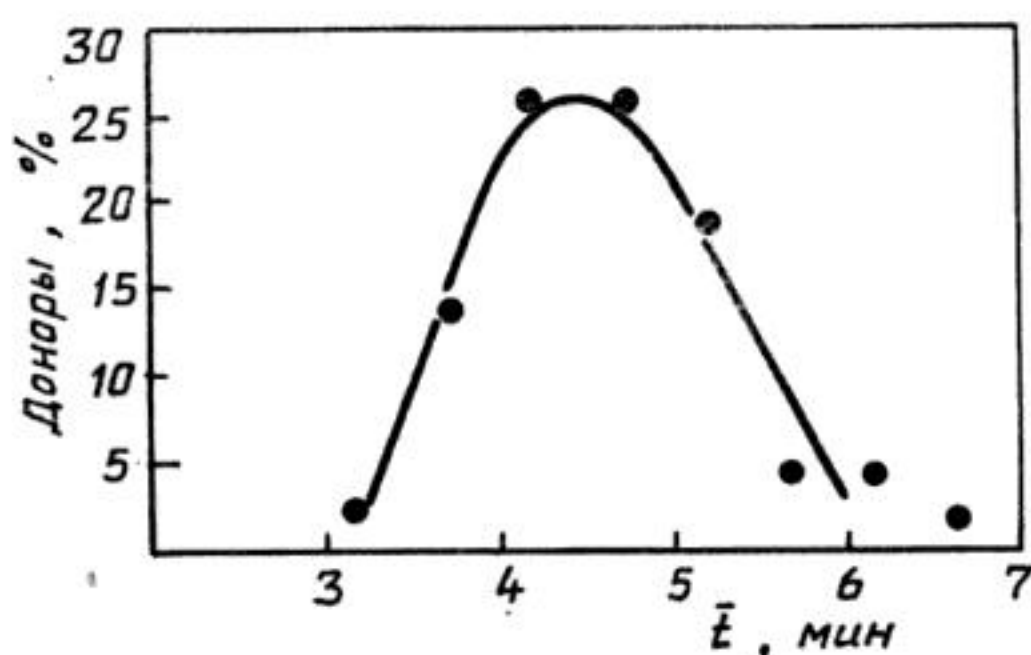


Рис. 1. Распределение доноров по исходным значениям среднего времени кислотного гемолиза эритроцитов ($n = 42$)

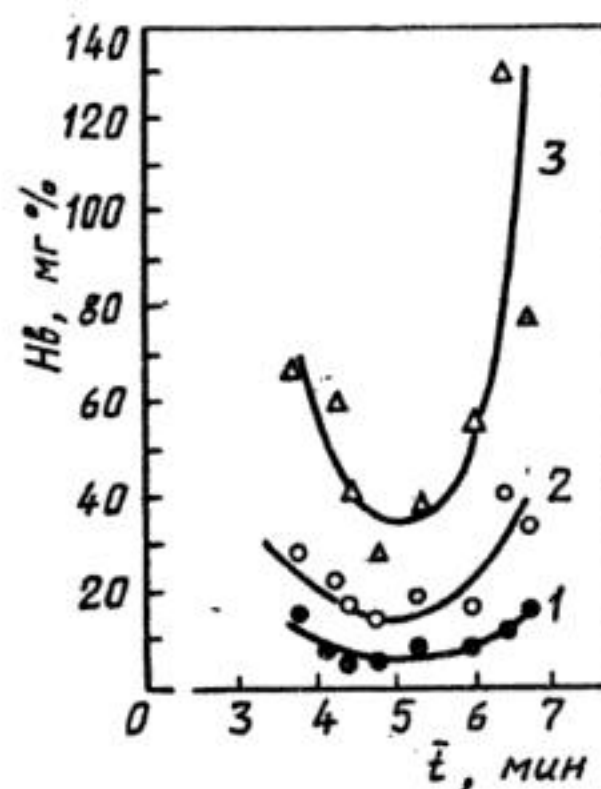


Рис. 2. Содержание свободного гемоглобина в консервированной крови в зависимости от среднего времени кислотного гемолиза эритроцитов в исходном состоянии: кривая 1 — на 7 сут хранения; 2 — на 14 сут; 3 — на 20 сут хранения

где P — суммарная стойкость эритроцитов, Δn_i — % эритроцитов, распавшихся за время между двумя отсчетами концентрации эритроцитов при получении эритрограмм, t_i — время в минутах, отсчитанное от начала гемолиза. Переходя в формуле (2) от суммирования к интегрированию, можно показать, что суммарная стойкость эритроцитов (P) по смыслу есть среднее время кислотного гемолиза эритроцитов в пробе — $\bar{t}$:

$$P \sim \frac{1}{N_{\text{полн}}} \int_0^\infty t \frac{dN}{dt} dt = \bar{t}. \quad (3)$$

Состояние эритроцитов в процессе гипотермического хранения оценивали по количеству свободного гемоглобина в надосадке консервированной крови после центрифугирования [2]. Образцы тестировали на 3, 5, 7, 9, 12, 13, 15, 19, 20, 22-е сутки хранения.

Нами установлено, что распределение доноров ($n = 42$) по значению среднего времени кислотного гемолиза эритроцитов подчиняется нормальному закону распределения (Рис. 1). Это свидетельствует о том, что исходное состояние эритроцитарной суспензии разных доноров изменяется в широких пределах. В качестве рабочей гипотезы выдвинуто предположение, что эритроциты доноров, которые в исходном состоянии более устойчивы к действию гемолитика, должны лучше переносить гипотермичес-

кое хранение. Результаты эксперимента, в котором определялся уровень гемолиза эритроцитов разных доноров (с различной исходной кислотной резистентностью) при различных сроках хранения, представлены на рис. 2. Они, однако, не подтвердили выдвинутое предположение. Оптимальный диапазон начальных значений кислотной резистентности эритроцитов, обеспечивающий минимальное повреждение эритроцитов при гипотермическом хранении, оказался ограниченным как со стороны слаборезистентных клеток, так и со стороны высокоустойчивых к действию гемолитика образцов:

$$4,5 \text{ мин} \leq \bar{t} \leq 5,75 \text{ мин.} \quad (4)$$

Неожиданным оказалось то обстоятельство, что отклонение среднего времени кислотного гемолиза эритроцитов от оптимума в сторону более высокой кислотной резистентности также неблагоприятно сказывается на результатах гипотермического хранения, как и отклонение в сторону более низкой кислотной резистентности. По-видимому, и то и другое явление вызвано отклонениями в возрастном составе эритроцитов крови разных доноров, обуславливающее, в конечном счете, пониженную сохранность при гипотермическом хранении.

Таким образом, при проведении исследований на эритроцитах донорской крови необходимо учитывать их исходное состояние. Предварительное тестирование суспензии эритроцитов может оказаться полезным в практической работе станций переливания крови при обосновании сроков хранения и использования заготавливаемой консервированной крови. Знание исходного состояния суспензии эритроцитов позволит стандартизировать донорскую кровь, проводить ее целенаправленный отбор и установить очередность использования консервированной крови.

1. Гительзон И. И., Терсков И. А. Факторы, влияющие на стойкость эритроцитов в сосудистом русле // Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов.— 1961.— Вып. 2.— С. 169—213.
2. Рождественская М. А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови // Актуальные вопросы переливания крови.— М.: Медгиз, 1955.— С. 55—58.
3. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования.— М.: Медицина, 1975.— 382 с.
4. Терсков И. А., Гительзон И. И. Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика.— 1957.— 2, N 2.— С. 259—266.

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

Поступило 18.07.85.

УДК 577.152.311 : 597.5 : 612.014.46

С. И. Дрокин, А. Г. Бибенко, Е. Ф. Копейка

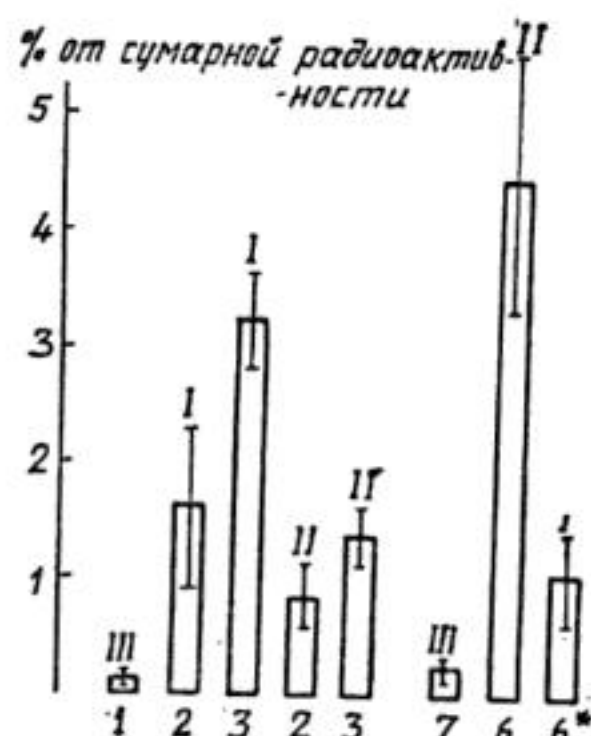
ФОСФОЛИПАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В СПЕРМАТОЗОИДАХ КАРПА *Cyprinus carpio* И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ ФАКТОРОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Ранее было установлено [2,3], что в сперматозоидах (СП) карповых рыб в норме, при эквilibрации с криопротекторами и после криоконсервирования лизофосфатидилхолин (ЛФХ) присутствовал лишь в следовых количествах. Однако имеются сообщения [6] о его достаточно большом содержании в молоках некоторых видов рыб. В СП быка и барана показано увеличение фракции ЛФХ после низкотемпературного охлаждения — оттаивания [4]. Появление и рост количества ЛФХ может быть следствием активации фосфолипазы, которая, в частности в СП млекопитающих, стимулируется повышением концентрации Ca^{2+} при pH 7—8 [7]. Фосфолипаза A_2 участвует в гидролизе мембранных липидов СП, необходимом для проявления акросомной реакции, и в освобождении свободных жирных кислот для дальнейшего их использования в энергетических целях. Но продукты гидролиза фосфатидилхолина (ФХ) — свободные жирные кислоты (СЖК) и ЛФХ даже в малых количествах могут оказывать негативное влияние на мембраны клеток [1].

Указанное выше проявление активности фосфолипазы было изучено на СП млекопитающих и на клетках различных тканей. На СП рыб нам подобные исследования

неизвестны. В связи с этим представляется целесообразным исследовать фосфолипазу в СП карпа и изучить влияние эквilibрации в среде с криопротектором этиленгликолем (ЭГ) и криоконсервирования на ее активацию.

Сперма для исследований была получена у карпов *Cyprinus carpio* после предварительного инъектирования им экстракта гипофиза сазана. Она разводилась средой, приготовленной на трис — HCl буфере с pH 8, в которую входили: 3,22М ЭГ, 165мМ маннита и 160 мМ трис — HCl. Перед разведением спермы в каждую пробу добавляли 2,1 мМ фосфатидилхолина, 1,2,-ди [I-¹⁴C] — пальмитоила с удельной радиоактивностью 444 Бк/мМ, которую затем озвучивали при частоте 22 кГц в течение 3 мин. После разведения 0,3 мл свежеполученного семени средой в соотношении 1 : 1 (по объему) суспензия повторно была обработана ультразвуком в тех же условиях. Визуально (увеличение 600х) озвученные СП ничем не отличались от свежеполученных. В дальнейшем были проведены следующие варианты опыта: 1 — контроль —



Распределение ¹⁴C в липиды — продукты гидролиза ¹⁴C-ФХ ($p < 0,05$); *появление ¹⁴C-ЛФХ здесь связано с тем, что по паспорту I стеароил-2I-¹⁴C-арахидоил содержит до 2% I-¹⁴C арахидоила; I-¹⁴C-ЛФХ; II-¹⁴C-СЖК; III-¹⁴C-ЛФХ и ¹⁴C-СЖК в контроле. 1, 2, 3, 6, 7 — см. варианты опыта

экстракция липидов сразу после озвучивания суспензии СП; 2 — эквilibрация суспензии СП при 20 °C в течение 30 мин; 3 — криоконсервирование суспензии СП, а затем эквilibрация при 20 °C в течение 30 мин; 4 — эквilibрация суспензии СП при 5 °C в течение 30 мин; 5 — эквilibрация суспензии СП при 20 °C в течение 30 мин (в среде отсутствует ЭГ); 6 — эквilibрация суспензии СП при 20 °C в течение 30 мин (в среде ФХ, 1,2-ди [I-¹⁴C] -пальмитоил заменен на 4,2мМ ФХ, 1 стеароил-2 [I-¹⁴C]-арахидоил с удельной радиоактивностью 222Бк/мМ); 7 — контроль — экстракция липидов сразу после озвучивания суспензии СП (для среды, содержащей ФХ, 1 стеароил-2 [I-¹⁴C]-арахидоил). Экстракция и тонкослойная хроматография липидов, а также определение радиоактивности в пятнах ЛФХ, ФХ и СЖК проводились, как описано у Кейтса [5]. Гидролитическое действие фосфолипазы оценивалось по распределению ¹⁴C во фракции ФХ, ЛФХ и СЖК. Суммарная радиоактивность пятен принималась за 100 %.

В результате проведенных экспериментов гидролиз экзогенного ¹⁴C-ФХ был обнаружен только во 2, 3 и 6-ом вариантах опыта (рисунок). В связи с тем,

что в 4 и 5-ом вариантах радиоактивные продукты гидролиза ¹⁴C-ФХ не обнаружены, необходимо отметить в первом случае роль понижения температуры инкубации, во втором — отсутствие в среде ЭГ, который, возможно, в наших условиях опыта играет важную роль во взаимодействии ¹⁴C-ФХ с фосфолипазой, так как после его добавления найдены ¹⁴C-ЛФХ и ¹⁴C-СЖК. Этот эффект достоверно усиливается после криоконсервирования СП, причем ¹⁴C-ЛФХ количественно превышает ¹⁴C-СЖК. Возможно, это связано с использованием СЖК в энергетических целях, т. е. с дальнейшим расщеплением.

В эксперименте по 6-му варианту, когда использовался радиоактивный ФХ, меченый только во 2-ом положении глицерина, отмечается существенное увеличение ¹⁴CЖК и незначительное ¹⁴C-ЛФХ, что дает основание предполагать присутствие в СП карпа фосфолипазы A₂.

Таким образом, было установлено, что под влиянием ЭГ и низкотемпературного охлаждения — оттаивания отмечается усиление фосфолипазной активности в СП карпа. Однако трудно пока сказать, происходит активация фермента или улучшается доступность к экзогенному субстрату реакции. Уровень гидролиза достаточно низкий, продуктов реакции мало и остается неясным, могут ли они оказывать сколько-нибудь заметное влияние на свойства СП.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев.: Наук. думка, 1982. — 256 с.
2. Дрокин С. И., Копейка Е. Ф. Влияние криопротекторов на липиды сперматозоидов карпа // Криобиология. — 1985. — № 4. — С. 36—38.

3. Дрокин С. И., Забелинский С. А., Копейка Е. Ф. Влияние низкотемпературной консервации на фосфолипиды и их жирные кислоты сперматозоидов рыбы белого амура и индюка (сравнительные аспекты) // Журн. эволюц. биохимии и физиологии — 1985. — № 1. — С. 79—82.
4. Жильцов Н. З., Голубь В. С. Действие глубокого замораживания на фосфолипидный состав живчиков быка и барана // Вопросы воспроизводства сельскохозяйственных животных. — 1964. — № 3. — С. 23—28.
5. Кейтс М. Техника липидологии. — М.: Мир, 1975. — 322 с.
6. Сидоров В. С. Экологическая биохимия рыб. Липиды. — Л.: Наука, 1983. — 240 с.
7. Kenichi O., Ryuzo Y., Thomas T. F. Phospholipase A of guinea pig spermatozoa: its preliminary characterization and possible involvement in the acrosome reaction // Develop. Growth a. Differ. — 1982. — 24, N 4. — P. 305—310.

Ин-т проблем криобиологии и
криомедицины АН УССР, г. Харьков,
Харьковский государственный
зоологический парк

Поступило 21.08.87.

ХРОНИКА

IV МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ВОДА И ИОНЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ»

С 24 по 29 мая 1987 г. в г. Бухаресте была проведена IV Международная конференция «Вода и ионы в биологических системах» под эгидой ЮНЕСКО Румынской академией медицинских наук с Румынским биофизическим советом на базе биофизической лаборатории медицинского факультета. На пленарных заседаниях были заслушаны доклады: Г. И. Лихтенштейна (Черноголовка) «Роль воды в определении динамической структуры белков и мембран», Курта Вютриха (Цюрих) «Определение пространственной структуры белков методом ядерного магнитного резонанса», Стюарта Мак Лохлима (Нью-Йорк) «Экспериментальные параметры и новые теоретические модели электростатических и электрокинетических свойств биологических мембран», Дороти Хоткин (Оксфорд) «Распределение воды и ионов цинка в кристаллах инсулина».

Одним из наиболее актуальных вопросов, затронутых на симпозиумах, являлся вопрос о регуляции структурно-функционального состояния биологических мембран различного происхождения. Специальное заседание секции было посвящено исследованию воды и ионов в системах с патологией. Доклады, представленные в данной секции, посвящены в основном изучению вопросов нарушения функционирования воды и ионов при патологии сердечно-сосудистой системы, при старении, в процессах образования и терапии опухолей как на уровнях организма, тканей, клеток, так и на молекулярном уровне. Большое количество работ содержало данные о влиянии воды и ионов на структуру и свойства белков в растворе и в клетке.

Важные для криобиологического применения вопросы рассмотрены в работе исследователей из КНР, изучавших кинетику замораживания воды и ее термодинамическое состояние в биомолекулах, а также в работе группы авторов из Венгрии и Австрии, которые исследовали термические свойства растворов полиэтиленгликоля (ПЭГ). Большой интерес вызвали работы советских авторов. В докладе А. А. Липатова и др. были рассмотрены результаты исследования структуры А-формы ДНК методом дифракции синхротронного излучения. Установлена структура водно-ионной оболочки ДНК в А-форме сравнительно с В-формой для ионов цезия и натрия. Работа В. И. Лобышева была посвящена изучению влияния изотопного обмена в водных растворах на термодинамику тепловых переходов в биополимерах. Механизмы кооперативности и антикооперативности при связывании ионов металлов с ДНК и полинуклеотидами рассмотрены в докладе В. А. Сорокина и Ю. П. Благого, а в работе С. В. Корниловой и др. выполнен анализ влияния связывания ионов на конформацию ДНК и представлены результаты по влиянию ионов на генетические системы клеток, в частности на сенсibilизацию ионизирующего излучения. Несколько докладов, представленных в основном советскими учеными, были посвящены действию лекарственных веществ и гормонов на движение воды и ионов через мембраны.

В. А. Моисеев

СИМПОЗИУМ ПО НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМУ КОНСЕРВИРОВАНИЮ КЛЕТОК, ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ

В работе VI симпозиума, проходившего в г. Галле (ГДР), по проблемам низкотемпературного консервирования клеток, тканей и органов приняло участие около 102 ученых, представителей криобиологических центров ГДР, ФРГ, Англии, Японии, Франции, ЧССР и СССР. По проблеме фундаментальной криобиологии представлены результаты исследований, касающиеся структурно-метаболических перестроек мембран, клеток и консервирующих сред в зоне умеренно низких и ультранизких температур. Заслуживает внимания развитие детальных исследований характера кристаллизации криозащитных композиционных сред, которые при замораживании обладают свойством витрификации. В серии докладов (ГДР, Франция, ФРГ) было сообщено, что композиционные среды на основе ДМСО и производных пропандиола или бутантриола при замораживании образуют стеклообразные формы льда, среди которых преобладают кубические формы, оказывающие очень слабое разрушающее действие на биологические объекты. Обращает на себя внимание то, что в ряде криобиологических лабораторий (ГДР, Англия) возобновлены и расширены исследования характера перекисного окисления липидов и свободнорадикальных реакций на этапах консервации клеток и органов. Значительное внимание было уделено проблемам криоконсервации репродуктивных клеток животных (быка) и человека в ГДР, ФРГ, ЧССР. Проводятся как фундаментальные, так и прикладные разработки. Замораживание спермы производится под защитой глицерина и ДМСО в соломинках и пластиковых трубчатых микроконтейнерах по разработанным программам. В этом аспекте уровень отечественных исследований не отстает от достигнутого за рубежом. Серия докладов освещала вопросы криоконсервации костной ткани под защитой сложных композиционных сред на основе ДМСО. Отдельное заседание было посвящено биотехнологической проблеме — криоконсервации культуральных клеток растений (ГДР, ФРГ). Эта проблема весьма актуальна в связи с высоким экономическим эффектом и народнохозяйственным значением.

Ряд докладов был сделан по проблемам банков клеток и тканей (ГДР, ЧССР), а также криоконсервации клеток поджелудочной железы (ГДР), роговицы (ГДР, Англия), фрагментов скелетной мускулатуры и лимфоцитов. По данной проблеме имеются определенные успехи в ГДР. Разработана методика криоконсервации клеток поджелудочной железы, которые пересаживаются с успехом в клинику. Для криоконсервации фрагментов мышечной ткани используется ДМСО с добавками таурина и аминокислот.

А. М. Белоус

24-е ЕЖЕГОДНОЕ ЗАСЕДАНИЕ ОБЩЕСТВА КРИОБИОЛОГИИ

С 22 по 26 июня 1987 г. в г. Эдмонтоне (Канада) состоялось 24-е ежегодное заседание Общества криобиологии. На заседании было представлено более 100 докладов по фундаментальным и прикладным проблемам криобиологии и криомедицины из ведущих криобиологических центров различных стран. Среди сообщений, касающихся проблемы физико-химических свойств воды и растворов при низких температурах, следует отметить обзорные доклады П. Мэйзура (США) и М. Лэ Мэгера (Канада), в которых рассмотрены теоретические аспекты значения осмотических градиентов и концентрационных эффектов растворенных веществ в реакции клеточных систем на температурные сдвиги. В докладах Т. Ченза (США) и Д. Рейда (США) обобщены современные данные по изучению процессов зародышеобразования, роста кристаллов льда, а также закономерностей витрификации — девитрификации в физиологических растворах. В большинстве докладов, которые были посвящены проблеме устойчивости мембранных структур при низких температурах, приведено экспериментальное подтверждение роли дегидратации, вызванной вымораживанием воды, в термодинамических фазовых переходах липидных бислоев и дестабилизации мембран, а также в нарушении функциональных свойств ряда мембраносвязанных ферментов. В докладе В. И. Лугового и В. А. Коптелова (СССР) были представлены данные о меха-

низмах криповреждения аденилатциклазы гепатоцитов при замораживании — оттаивании. В сообщениях по проблеме адаптаций к низким температурам были приведены сведения о метаболических и гормональных сдвигах в организмах гибернирующих и негибернирующих животных при низких температурах, о механизмах естественной устойчивости некоторых насекомых к замораживанию, о генетических аспектах криоустойчивости растений.

Значительное число докладов на заседании Общества было посвящено вопросам поиска и обоснования оптимальных режимов замораживания и защитных сред при криоконсервировании клеточных суспензий и тканей, адекватных условий при гипотермической перфузии и хранении органов (печень, почки, сердце). В ряде сообщений представлены результаты изучения 1,2-пропандиола в качестве нового криопротектора для криоконсервирования тромбоцитов, гранулоцитов, клеток костного мозга (Х. Янг и др., Канада; Ф. Арно и др., Великобритания; И. Гарсиа и др., Испания).

В сообщениях, которые касались вопросов аппаратного оснащения криобиологических исследований, основное внимание уделялось дальнейшему совершенствованию криомикроскопа как универсального исследовательского инструмента, необходимого для решения фундаментальных и прикладных криобиологических задач. Совершенствование прибора идет в направлении использования серийно выпускаемых образцов в комплексе с ЭВМ, что позволяет существенно автоматизировать работы на приборе и использовать его в режиме анализа (распознавания) образов.

В. И. Луговой

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР защищены диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. В работе Е. Ф. Исаченко «Криповреждения спермы быков при низкотемпературной консервации в облицованных гранулах» изучено влияние скоростей замораживания на микроструктуру спермиев быка, суспендированных в лактозо-желточно-глицериновой среде. Медленные, ускоренные и быстрые режимы замораживания приводят к значительным нарушениям в мембранном и двигательном аппарате клеток, криповреждения в меньшей степени выражены при увеличении скорости замораживания от 30 до 50 °С/мин и сводятся до минимума при скорости 40 °С/мин. И. А. Вотякова в исследовании «Влияние факторов низкотемпературного консервирования на биологическую полноценность гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека» (экспериментальное исследование) установила, что криопротекторы ПЭО-400 и ДМСО оказывают влияние на скорость пролиферации клеток-предшественников грануломоноцитопоза эмбриональной печени в культуре и в зависимости от исходного состояния клеток ингибируют или стимулируют рост клеточных агрегатов в культуре. Показана отрицательная роль переохлаждения в повреждении клеток и осуществлено замораживание без переохлаждения, обеспечивающее однородность процесса кристаллизации в контейнере. О. Б. Колоколова в диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук «Влияние температуры насыщения почки криопротектором, искусственного гипобиоза и фармакологической подготовки донора на эффективность защиты органа от низкотемпературного повреждения» с помощью ультразвукового метода измерения концентрации криопротектора в перфузате исследовала динамику насыщения почки диметилсульфоксидом (ДМСО) при двух температурных режимах (18 ÷ 20 °С и 10 ÷ 12 °С). Установлено, что оптимальным температурным режимом является температура 18 ÷ 20 °С. Предварительное введение донору ДМСО и α -токоферола способствует лучшей сохранности показателей клеточного метаболизма почки после замораживания — отогрева.

УДК 615.832.9:616—001.186

Критерии летальных и обратимых изменений в тканях после криовоздействий / Сандомирский Б. П. // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 3—7.

В работе изложены методологические подходы к комплексной оценке степени жизнеспособности тканей после криовоздействий в эксперименте и клинике. На основании анализа собственных экспериментально-клинических исследований и данных литературы обсуждаются понятия о первичном и вторичном крионекрозе и механизмах формирования этих состояний. Ил. 3. Табл. 2. Библиогр.: 2 назв.

УДК 612.111.043:547.422

Влияние температуры и криопротекторов на структурно-функциональное состояние эритроцитов зрелого организма и плода человека / Цымбал Л. В., Гаврилова И. И., Моисеев В. А. // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 7—11.

Методом ЭПР-спиновых зондов показаны различия в динамической структуре мембран и состоянии цитозоля эритроцитов плода человека по сравнению с клетками взрослых людей. Обнаружено коррелирующее с этими различиями изменение проницаемости мембран эритроцитов плода человека в отношении парамагнитных ионов. Проникающие криопротекторы эффективнее защищают эритроциты плода человека, поддерживая нативную гетерогенность и связанную с ней барьерную функцию мембран. Ил. 5. Библиогр.: 6 назв.

УДК 612.112.95—001.26.089.843

Изучение морфофункциональных свойств моноцитарно-макрофагальных элементов перитонеального экссудата облученных мышей после трансплантации нативного и криоконсервированного костного мозга / Цуцаева А. А., Лобасенко Н. П. // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 12—17.

Исследования проведены на линейных мышах, облученных летальной дозой после внутривенного введения нативного и криоконсервированного костного мозга. Отмечены некоторые особенности и различия в характере и динамике восстановления клеток в исследуемых опытных группах. Обсуждаются причины и механизмы различных реакций у облученных животных в зависимости от вида миелотрансплантата в различные сроки пострadiaционного периода. Ил. 3. Табл. 2. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043.576.5

Внеплановый синтез ДНК в культивируемых клетках после криоконсервации / Семенова Е. Г. // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 17—20.

При консервации клеток наблюдалось повреждение и репарация ДНК. Сделан вывод, что любое экспериментальное воздействие на клетку можно начинать не раньше, чем через 15—17 дней после размораживания. Ил. 2. Табл. 2. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043

Холодовой шок фосфолипидных везикул. Влияние охлаждения на барьерные свойства мембран / Дегтярев А. В., Бондаренко В. А., Белоус А. М. // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 20—27.

Снижение температуры приводит к уменьшению площади на молекулу фосфолипида и развитию термоупругих эффектов в мембранах фосфолипидных везикул. Предполагается, что термоупругие эффекты являются причиной холодового шока фосфолипидных везикул, а также играют важную роль в терморегуляции клеточной активности и развитии поврежденных клеток при криоконсервации. Ил. 5. Библиогр.: 13 назв.

УДК 57.043:611.013.15.014.41

Сверхмедленное замораживание ооцитов свиньи / Дахно Ф. В., Вишневский В. И., Каталевская Л. Г., Долгина Р. Е., Душейко А. Г. // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 27—29.

Ооциты свиньи замораживали со сверхмедленной скоростью в полиэтиленовых ампулах со стержневыми инициаторами кристаллизации льда. В качестве криопротектора применялся диметилсульфоксид. Показано, что сохранность ооцитов свиньи, по данным суправитального окрашивания, составляет в среднем 45 % и не зависит от способа инициации льда. Культивирование ооцитов после замораживания — оттаивания свидетельствовало об их дальнейшем развитии и выявило некоторые преимущества инициаторов из нержавеющей стали. Табл. 2. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043:612.35.46:547.422.426.1

Влияние криопротекторов на ДНК-синтезирующую способность клеток печени и почек животных / Козлова В. Ф., Сигал Н. С. // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 29—34.

Установлено, что вслед за репликацией ДНК в изучаемых органах, особенно в почках, не всегда происходит пролиферация эпителиоцитов, что свидетельствует о преобладании внутриклеточной формы регенерации в этих клетках. Интенсивности и частоте патогенного влияния криопротекторов соответствует характер восстановительных реакций тканей, направленных на поддержание гомеостаза систем. Ил. 4. Табл. 4. Библиогр.: 6 назв.

УДК 612.8.015

Влияние низких температур на моноаминоксидазу мозга зимоспящих сусликов / Войтенко Н. Н. // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 34—38.

Изучали кинетику реакции дезаминирования серотонина МАО ствола головного мозга у сусликов, находящихся в спячке, выходящих из нее, бодрствующих и погружающихся в спячку животных. У сусликов, бодрствующих и находящихся в спячке, коэффициент кооперативности Хилла p_H , рассчитанный для зависимости (v) от $[S]_0$, был близок к 1,0. У сусликов, погружающихся в спячку и выходящих из нее, p_H был выше 1,0. Обсуждается возможность функционирования у бодрствующих и находящихся в спячке сусликов жестких форм МАО и температурных конформеров исходных форм МАО в переходные периоды. Ил. 2. Табл. 2. Библиогр.: 6 назв.

УДК 612.015.32:577.15:591.543.42

Содержание гликогена, фосфорилазная и глюкозо-6-фосфатазная активность в тканях суслика и лягушки при зимней спячке / Львова С. П. // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 39—43.

Исследовали печень, скелетную мышцу, миокард, мозг суслика и озерной лягушки при 1, 3, 4—6-недельной зимней спячке. Температура тела сусликов при спячке составила 8—10 °С, лягушек 2—4 °С. Найдено, что кратковременная спячка более значительно понижает количество гликогена в печени и мышцах, чем длительная. Глюкозо-6-фосфатазная активность в тканях, кроме печени сусликов, понижается при 1- и 3-недельной гибернации и заметно увеличивается в печени обоих видов животных при 4—6-недельной спячке. Табл. 2. Библиогр. 10 назв.

UDC 615.832.9:616—001.186

Criteria of lethal and reversible changes in tissues after cryoapplication / Sandomirsky B. P. // Kriobiologiya. — 1988. — N. 1. — P. 3—7.

Approaches to the complex evaluation of tissue viability after cryoapplication in the experiment and clinic are presented. Basing on the analysis of own experimental and clinical results, as well as on the literature data, conceptions of primary and secondary cryonecrosis and mechanisms of their development are discussed, 3 figs. 2 tables. Refs.: 2 titles

UDC 612.111.043:547.422

The effect of temperature and cryoprotectants on the structure-functional state of donor erythrocytes and human fetal red blood cells / Tsymbal L. V., Gavrilova I. I., Moiseyev V. A. // Kriobiologiya.— 1988.— N 1.— P. 7—11.

Differences between the dynamic structure of membranes and the state of cytosol in human fetal red blood cells and donor erythrocytes are shown using the method of EPR spin probes. Changes in the membrane permeability of fetal erythrocytes for paramagnetic ions have been found to correlate with the differences observed. It has been demonstrated that permeable cryoprotectants better protect fetal erythrocytes, thus maintaining the native heterogeneity and associated membrane barrier function. 5 figs. Refs.: 6 titles

UDC 612.112.95—001. 26.089.843

The investigation of morphofunctional properties of monocyte and macrophage elements of the peritoneal exudate of irradiated mice after transplantation of native and cryopreserved bone marrow / Tsutsayeva A. A., Lobasenko N. P. // Kriobiologiya.— 1988.— № 1.— P. 12—17.

Experiments were performed on line mice irradiated with a lethal dose after intravenous injection of native and cryopreserved bone marrow. Some peculiarities and differences in the nature and dynamics of cell reconstitution in experimental groups have been noted. Causes and mechanisms of different reactions in irradiated mice are discussed depending on the type of myelotransplantant in various periods after irradiation. 3 figs. 2 tables. Refs.: 7 titles

UDC 57.043.576.5

Unscheduled DNA synthesis in cultured cells after cryopreservation / Semenova E. G. // Kriobiologiya.— 1988.— N 1.— P. 17—20.

Cryoinjury and repair of DNA were observed in cryopreserved cells. It has been concluded that any experimental effect on cells may be exerted later than 15 to 17 days after thawing. 2 figs. 2 tables. Refs.: 7 titles

UDC 57.043

Cold shock in phospholipid vesicles. The effect of cooling on the membrane barrier properties / Degtyarev A. V., Bondarenko V. A., Belous A. M. // Kriobiologiya.— 1988.— N 1.— P. 20—27.

Lowering the temperature appeared to lead to decreasing the phospholipid molecule area and to the development of thermoelastic effects in phospholipid vesicle membranes. The thermoelastic effects have been suggested to cause cold shock in phospholipid vesicles and to play an important role in the thermoregulation of the cell activity and in the development of cellular cryoinjury. 5 figs. Refs.: 13 titles

UDC 57.043:611.013.15.014.41

Superslow freezing of swine oocytes / Dakhno F. V., Vishnevsky V. I., Katalevskaya L. G., Dolgina R. E., Dusheyko A. G. // Kriobiologiya.— 1988.— N 1.— P. 27—29.

Swine oocytes were frozen at a superslow rate in polyethylene ampules with rod initiators of ice crystallization. Dimethylsulfoxide was used as a cryoprotectant. It has been shown that the oocyte viability, as judged by supravital staining, is 45% and independent of the type of ice seeding. Cultures of frozen — thawed oocytes demonstrated their further development. Some advantages of stainless steel initiators have been found. 2 tables. Refs.: 5 titles

UDC 57.043:612.35.46:547.422.426.1

The effect of cryoprotectants on the DNA synthesising capacity of animal hepatocytes and kidney cells / Kozlova V. F., Sigal N. S. // Kriobiologiya.— 1988.— N 1.— P. 29—34.

The DNA replication in organs under study, especially in kidneys, was found not to be always followed by the proliferation of epithelial cells, thus suggesting preferential intracellular regeneration of these cells. The intensity and frequency of detrimental effect of cryoprotectants are in line with the mode of reparative tissue reactions directed to maintaining the homeostasis. 4 figs. 4 tables. Refs.: 6 titles

UDC 612.8.015

The effect of low temperatures on brain monoaminoxidase of hibernating ground squirrels / Voytenko N. N. // Kriobiologiya.— 1988.— N 1.— P. 34—38.

The kinetics of serotonin desamination of brain stem monoaminoxidase (MAO) in hibernating ground squirrels when arousing, awaking and entering the hibernation has been studied. The Hill's cooperativity coefficient n_H for the dependence of (v) upon $[S]_0$ has been calculated to be near 1.0 for active and hibernating animals. The n_H was more than 1.0 for ground squirrels entering the hibernation and arousing ones. The possibility of functioning hard MAO forms and temperature conformers of the initial forms of MAO in awaking and hibernating ground squirrels is discussed. 2 figs. 2 tables. Refs.: 6 titles

UDC 612.015.32:577.15:591.543.42

The content of glycogen, phosphorylase and glucose-6-phosphatase activities in tissues of ground squirrel and frog during hibernation / Lvova S. P. // Kriobiologiya.— 1988.— N 1.— P. 39—43.

Liver, skeletal muscle, myocard and brain tissues of ground squirrel and frog were studied during 1, 3 and 4 to 6 weeks of hibernation. Body temperature was 8 to 10 °C in hibernating ground squirrels and 2 to 4 °C in frogs. It has been found that the content of glycogen in liver and skeletal muscle is less during short — term hibernation than during long — term hibernation. The activity of glucose-6-phosphatase in all tissues under study other than ground squirrel liver decreased during 1 and 3 weeks of hibernation and increased markedly in liver of both species during 4 to 6 weeks of hibernation. 2 tables. Refs.: 10 titles

В издательстве «Наукова думка» в 1 кв. 1988 г.
выйдет в свет книга!

Альберт Ю. В. Списки литературы в научных изданиях. Составление и оформление. — 11 л. — 70к.

Даны рекомендации по составлению и редакционно-техническому оформлению прикнижных и пристатейных списков литературы в научных изданиях; приведены примеры библиографического описания различных видов документов в списках литературы и наиболее распространенные варианты их построения, сокращения названий отечественных издательств, принятые в библиографическом описании, другие справочные сведения. Имеется предметный указатель.

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

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

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

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

Our journal KRIOBIOLOGIYA (CRYOBIOLOGY) is published by Naukova Dumka Publ. Co. in Russian with abstracts in English. 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.

KRIOBIOLOGIYA is published 4 times a year.

Subscription Rates: 65 copecks for 3 months, 1 rouble and 30 copecks for 6 months, 2 roubles and 60 copecks for 12 months. Subscriptions to the journal are taken at SOYUZPECHAT agencies of the USSR Ministry of Communications.

Наукова думка

ISSN 0233-7673. Криобиология. 1988. № 1. 1-56