

З

ISSN 0233-7673

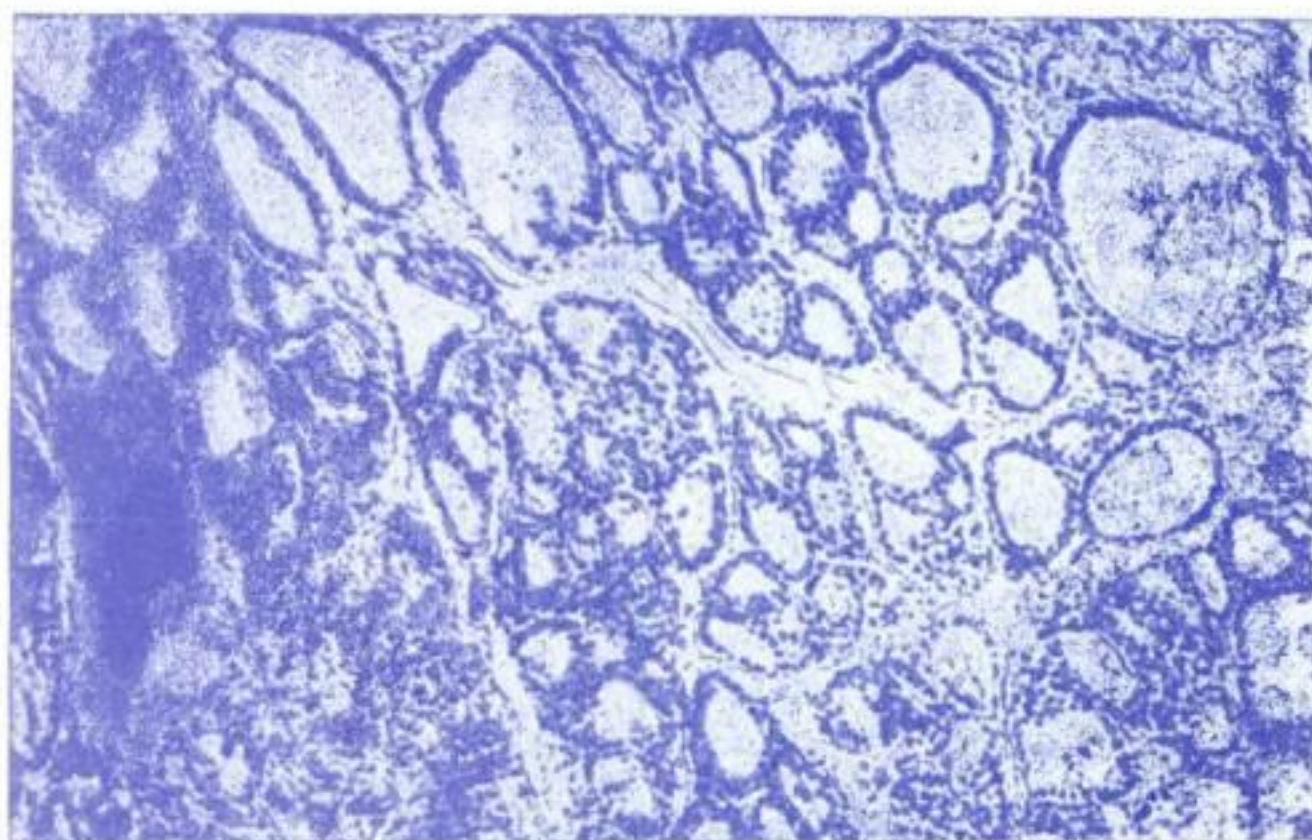
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ЧУЙКО В.А. Функциональная активность трансплантата криоконсервированной при -196°C щитовидной железы

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

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

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

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

Главный редактор В. И. Грищенко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

С. И. Аксенов (Москва), Г. А. Бабийчук (Харьков), А. М. Белоус (зам. главного редактора, Харьков), М. Е. Бекер (Рига), Ю. П. Благой (Харьков), Л. Вонг (Канада), А. Н. Гольцов (Харьков), В. М. Гордиенко (Киев), К. Дж. Грин (Великобритания), А. М. Гурин (Минск), Г. Ф. Жегунов (Харьков), В. Де Лекер (Бельгия), В. И. Луговой (Харьков), В. Я. Малеев (Харьков), Г. Маттес (ФРГ), Г. Меримен (США), П. Мнержичка (ЧСФР), Е. Я. Панков (Харьков), Ю. Ф. Пастухов (Санкт-Петербург), Ф. А. Приходько (ответственный секретарь, Харьков), Н. С. Пушкирь (Харьков), А. Роу (США), Б. П. Сандомирский (Харьков), А. С. Снурников (Харьков), С. Сумида (Япония), А. А. Цуцаева (Харьков), С. А. Шалимов (Киев), Т. Н. Юрченко (Харьков), Э. З. Эмирбеков (Махачкала)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Editor-in-Chief V. I. Grishchenko

EDITORIAL BOARD

S. I. Aksenov (Moscow), G. A. Babychuk (Kharkov), A. M. Belous (Associated Editor, Kharkov), M. E. Beker (Riga), Yu. P. Blagoj (Kharkov), E. Z. Emirbekov (Makhachkala), A. N. Goltsev (Kharkov), V. M. Gordiyenko (Kiev), C. J. Green (Great Britain), V. M. Gurin (Minsk), W. De. Loecker (Belgium), V. I. Lugovoj (Kharkov), V. Ya. Maleyev (Kharkov), G. Mattes (Germany), P. Mericka (CSFR), H. T. Meryman (USA), E. Ya. Pankov (Kharkov), Yu. F. Pastukhov (Sankt-Petersburg), F. A. Prikhodko (Executive Secretary (Kharkov), S. N. Pushkar (Kharkov), A. W. Rowe (USA), B. P. Sandomirsky (Kharkov), S. A. Shalimov (Kiev), A. S. Snurnikov (Kharkov), S. Sumida (Japan), A. A. Tsutsayeva (Kharkov), T. N. Yurchenko (Kharkov), L. Wang (Canada), G. F. Zhegunov

EDITORIAL COUNCIL

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



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Чуйко В. А. Функциональная активность трансплантата криоконсервированной при -196°C щитовидной железы	3
Шпакова Н. М., Бондаренко В. А. Чувствительность эритроцитов к холодовому шоку в средах, содержащих соли и неэлектролиты	15
Осецкий А. И., Гурина Н. М., Загнойко В. И. Термопластические свойства замороженной плазмы крови зимоспящих животных	20
Новиков А. М., Вепринцев Б. Н., Утешев В. К., Смолихина Т. И., Линник Т. П. Влияние переохлаждения и криопротекторов на внутриклеточную кристаллизацию в зародышах выюна	27
Савич И. М. Трансформация углеводных составляющих изопероксидаз проростков кукурузы при холодовом стрессе	33
Шаравара А. А., Цвиренко С. В., Ястребов А. П. Изучение действия холода на состояние системы крови красной полевки двух популяций, обитающих в различных климато-географических зонах	38

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Грищенко В. И., Луцкая Л. И., Дахно Ф. В. Криоконсервирование ооцитов и эмбрионов человека	43
--	----

КРИОМЕДИЦИНА

Грохольский А. П., Данилевский Ю. Н., Миклашевич В. В., Мостицкий А. В., Противень Н. Ф., Худзинский В. М. Криодиатермокоагуляция при лечении больных с опухолевидными заболеваниями слизистой оболочки полости рта и кожи лица	50
---	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

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

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

This One



Матеріал захищений авторським правом 5WU7-0S6-LUWX

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Chuyko V. A.</i> Functional activity of the transplantant of thyroid gland cryopreserved at -196°C	3
<i>Shpakova N. M., Bondarenko V. A.</i> The sensitivity of erythrocytes to cold shock in media containing salts and nonelectrolytes	15
<i>Osetsky A. I., Gurina N. M., Zagnoyko V. I.</i> Thermoplastic properties of frozen blood plasma of hibernating animals	20
<i>Novikov A. N., Veprintsev B. N., Uteshev V. K., Smolikhina T. I., Linnik T. P.</i> The effects of supercooling and cryoprotectants on the intracellular crystallization in loach embryos	27
<i>Savich I. M.</i> Transformation of carbohydrate components of isoperoxidases of maize seedlings under the cold stress	33
<i>Sharavara A. A., Tsvirenko S. V., Yastrebov A. P.</i> The investigation of cold effect on the state of blood system of two populations of <i>Clethrionomys rutilus</i> inhabiting various climatic and geographic zones	38

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Grishchenko V. I., Lutskaya L. I., Dakhno F. V.</i> Cryopreservation of human oocytes and embryos	43
--	----

CRYOMEDICINE

<i>Grokholsky A. P., Danilevsky Yu. N., Miklashevich V. V., Mastitsky A. V., Protiyen N. F., Khudzinsky V. M.</i> Cryodiathermocoagulation in the treatment of patients with tumor diseases of the mouth mucosa and face skin	50
---	----

BRIEF COMMUNICATION

<i>Nardid O. A., Zagnoyko V. I., Moiseyev V. A., Gulevsky A. K.</i> The effect of hypothermia on the permeability of erythrocyte membranes for ferricyanide ions . .	53
--	----

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

Научный редактор *А. М. Белоус*
Редактор *З. В. Личевич*
Технический редактор *В. Н. Волкова*

Сдано в набор 17.04.92. Подп. в печать 27.07.92. Формат $70 \times 108^{1/16}$. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Усл. кр. отт. 5,4. Уч. изд. л. 5,1. Тираж 535 экз. Зак. 2-148. Цена 1 р. 20 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской типографии № 16. 310003, Харьков-3, ул. Университетская, 16. Зак. 1118.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАТА КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ПРИ -196°C ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Проводилось морфологическое и биохимическое исследование трансплантата, также определялось содержание тиреоидных и тиреотропного гормонов в крови у экспериментальных животных и у больных после трансплантации им щитовидной железы. Установлено, что сниженное в результате тиреоидэктомии содержание тироксина после пересадки щитовидной железы восстанавливается, в то время как уровень трийодтиронина остается низким. Трансплантация щитовидной железы приводит к уменьшению повышенного в результате тиреоидэктомии уровня тиреотропного гормона в крови. Данные о восстановлении уровня тиреоидных и тиреотропного гормонов коррелируют с улучшением клинического состояния больных, что свидетельствует об эффективности трансплантации криоконсервированной щитовидной железы.

Трансплантация эндокринных клеток, тканей и органов является физиологическим методом компенсации гормональной недостаточности, и поэтому ее использование с указанной целью является эффективным методом лечения эндокринных заболеваний [7, 14].

Важнейшим условием успешного приживания эндокринного трансплантата, в том числе и щитовидной железы, в организме является сохранение в тиреоидной паренхиме основных метаболических путей, способности к образованию и секреции гормонов, восприятию нейрогуморальных сигналов и последующей их передаче внутрь клеток. Нейрогуморальная регуляция исключительно важна для поддержания функциональной активности трансплантата, поскольку основное регулирующее влияние на него (особенно на ранних стадиях, когда нарушены привычные для него связи с организмом, осуществляемые путем крово-, нерво- и лимфоснабжения) оказывают циркулирующие в крови биологически активные вещества. Благодаря сигналам, поступающим в клетку с помощью этих соединений, в трансплантате поддерживается на определенном уровне активность метаболических процессов, а также специфических для эндокринных органов функций: гормонообразования и секреции. С другой стороны, тиреоидные гормоны, образующиеся в трансплантате, вовлекаются в общую нейрогуморальную регуляцию организма, оказывая влияние на процессы роста и размножения клеток, метаболизм, вегетативные функции. Наряду с этим они контролируют секрецию гипофизом специфического регулятора щитовидной железы — тиреотропного гормона.

С указанных позиций мы пытались проанализировать функцию криоконсервированного тиреоидного трансплантата. Важно было установить, сохраняет ли криоконсервированная и хранившаяся продолжительное время при температуре -196°C щитовидная железа способность приживать, приспособливаться к новым условиям, восстанавливать свою специфическую активность, реагировать на циркулирующие в крови стимуляторы, включаться в общую систему нейроэндокринного регулирования.

Для исследования функции криоконсервированного трансплантата были использованы морфологические и биохимические методы (органификация йодидов, активность аденилатциклазы).

О функциональной активности тиреоидного трансплантата, его включении в систему нейрогуморальной регуляции организма посредством

восстановления прямых и обратных связей с гипофизом судили на основании определения уровня тиреоидных и тиреотропного гормонов в крови.

Изучение микроскопического строения аутотрансплантата криоконсервированной тиреоидной паренхимы и его функционального состояния, а также исследование уровня тиреоидных и тиреотропного гормонов в крови производилось на 20 сут после ее пересадки тиреоидэктомированным животным. Считается, что наилучшие условия для приживания тиреоидного трансплантата создаются при возникновении дефицита тиреоидных гормонов, а у крыс этот дефицит образуется, как правило, на 20 сут после удаления щитовидной железы [16].

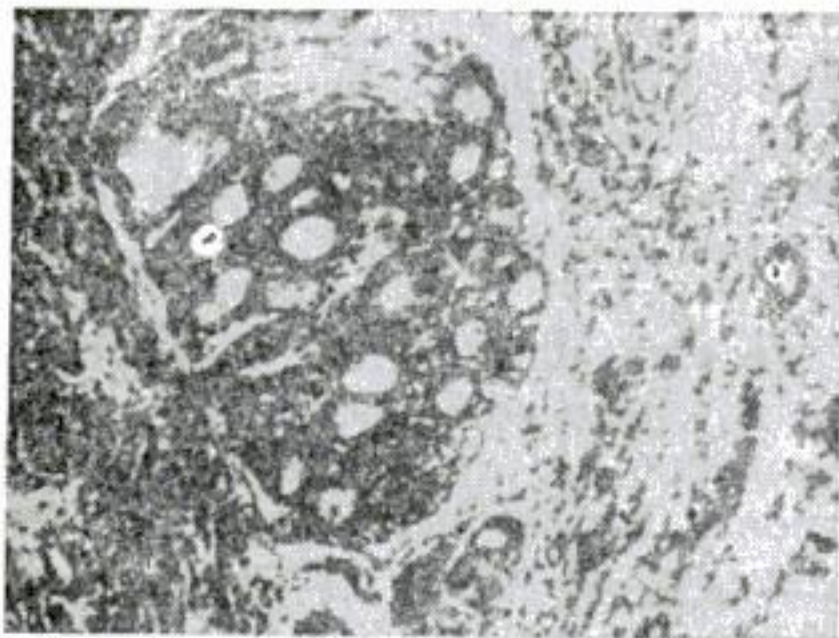
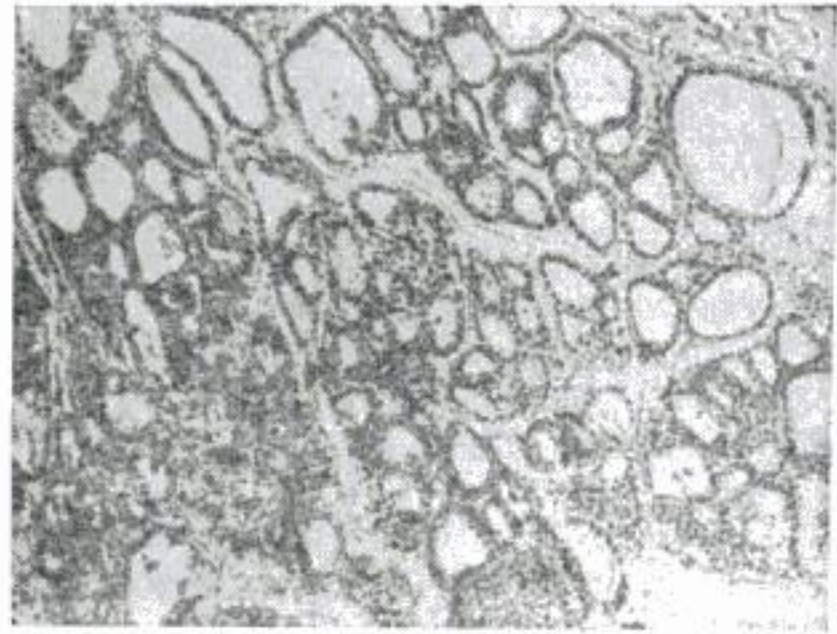
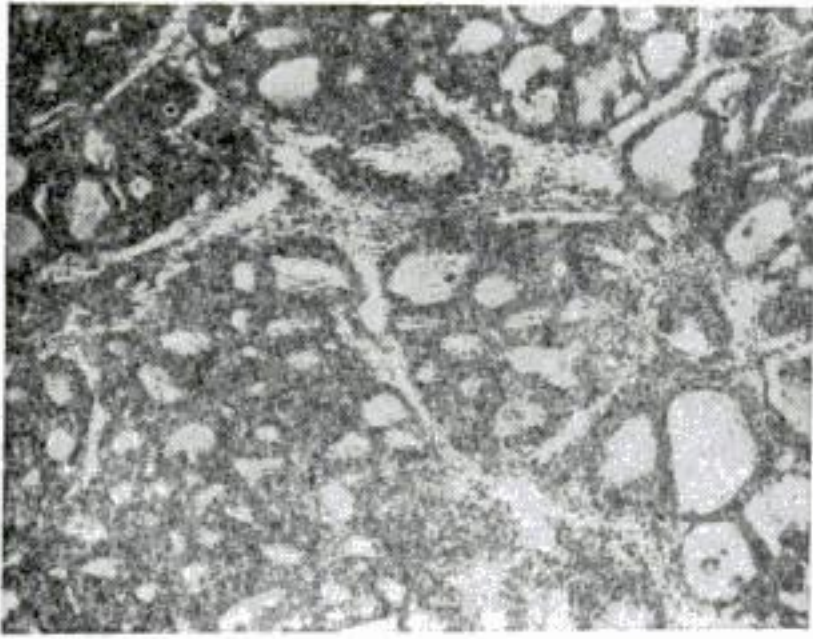


Рис. 1. Участок интактной щитовидной железы крыс. Увеличение $\times 80$

Рис. 2. Участок криоконсервированной и хранившейся при -196°C 20 суток щитовидной железы крыс. Увеличение $\times 80$

Рис. 3. Участок 20-суточного трансплантата щитовидной железы крыс, хранившегося при -196°C . Увеличение $\times 80$

Показано, что в норме структура интактной щитовидной железы крыс характеризуется типичным для данного эндокринного органа строением (рис. 1). Основной структурной единицей является фолликул, стенка которого выстлана слоем эпителиальных клеток. Фолликул заполнен коллоидом с большим количеством резорбционных вакуолей. Между фолликулами располагается строма, состоящая из соединительной ткани, в которой встречается наибольшее количество фолликулярных клеток, так называемая интерфолликулярная ткань. Клетки, выстилающие полость фолликулов, как правило, призматической формы. Ядра этих клеток сочные. Коллоид, заполняющий фолликулы, имеет разную степень плотности.

Микроскопическое строение щитовидной железы после криоконсервирования и 20-суточного хранения при -196°C изменяется следующим образом. Отдельные фолликулы приобретают извилистость и сморщиваются (рис. 2). Встречаются обособленные группы фолликулов или отдельные, растянутые большие фолликулы, которые окружены плоским слоем эпителиальных клеток. Коллоид в них, как правило, густой. Количество резорбционных вакуолей значительно снижено. Чаше, чем в железах, подвергавшихся криоконсервированию, встречаются десквамированные

участки эпителия (рис. 2). В криоконсервированной щитовидной железе отсутствуют грубые нарушения, разрывы, которые обязательно возникают при замораживании других тканей [20—22].

Все выявленные изменения в строении щитовидной железы носят умеренный характер, что указывает на незначительное повреждающее действие криоконсервирования.

На рис. 3 представлены участки криоконсервированного тиреоидного трансплантата, извлеченного из организма крыс на 20 сут. Трансплантат представляет собой участок тиреоидной паренхимы, который отделен от окружающей ткани соединительнотканной капсулой. В строении тиреоидной паренхимы произошли существенные изменения. В отличие от

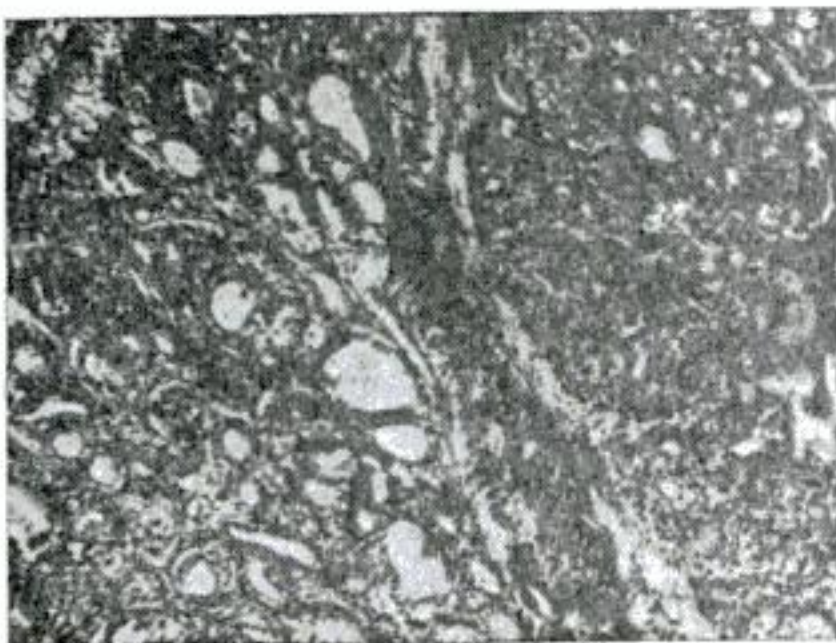
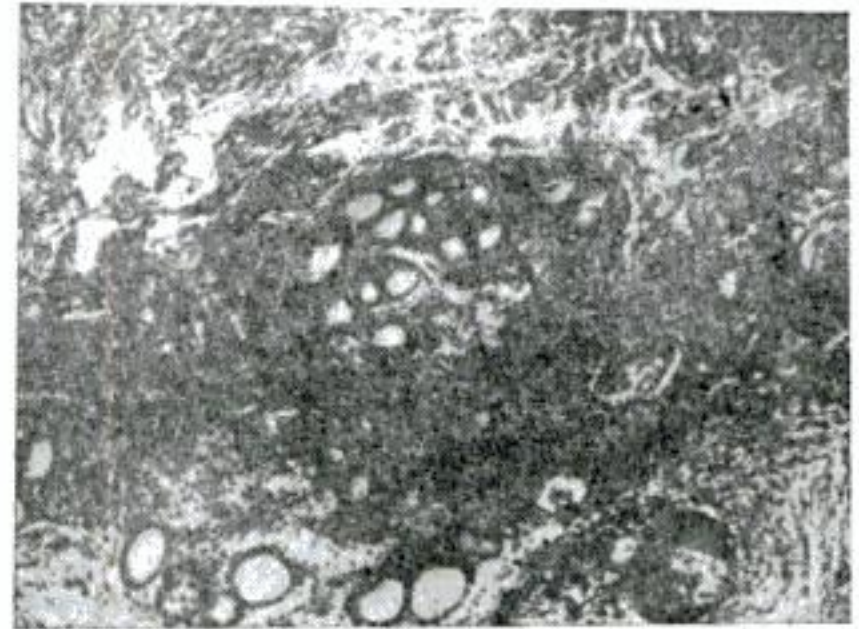
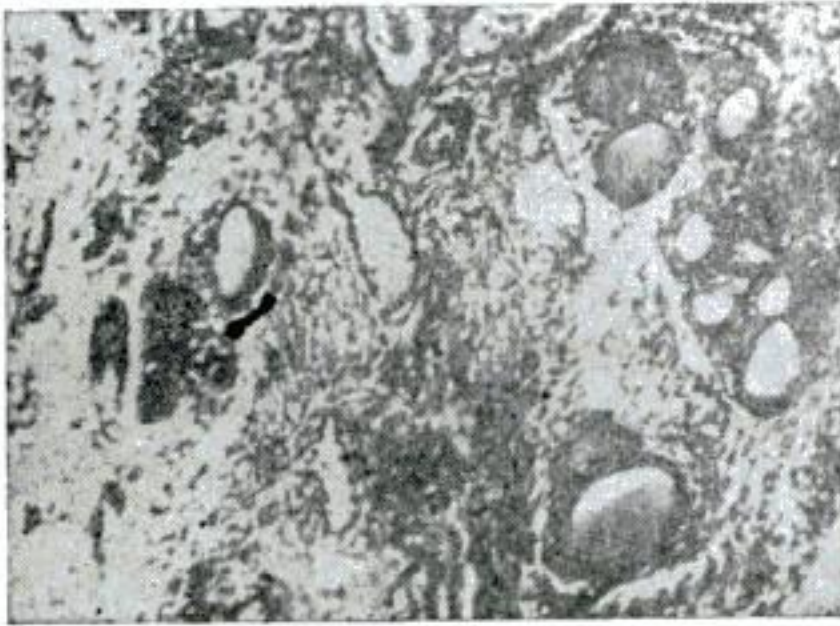


Рис. 4. Участок 20-суточного трансплантата щитовидной железы крыс, хранившегося при -196°C . Увеличение $\times 112$

Рис. 5. Участок 20-суточного трансплантата щитовидной железы крыс, хранившегося при -196°C . Увеличение $\times 80$

Рис. 6. Участок 20-суточного трансплантата щитовидной железы крыс, хранившегося при -196°C . Увеличение $\times 40$

интактной щитовидной железы, в которой фолликулы равномерно распределены по всей поверхности и образуют ячеистую структуру (рис. 1), в трансплантате фолликулы представлены разрозненно распределенными группами, состоящими из различного количества фолликулов. Встречаются скопления, состоящие из различного количества фолликулов и напоминающие по своей форме гроздь винограда или отдельные небольшие группы по 5—6 фолликулов (рис. 3). Фолликулы в трансплантате значительно варьируют как по форме, так и по размерам. Ряд из них имеет обычную правильную конфигурацию, они заполнены ацидофильным, иногда базофильным коллоидом. Вместе с тем изредка встречаются сморщенные фолликулы, утратившие обычную для них форму. Эпителий их отслоен от соединительной основы. В ряде фолликулов в коллоидном веществе содержатся клеточные дескваматы (рис. 4, 5). Около 1/4 части трансплантата (преимущественно в центральной его части) подверглось деструкции, некрозу и замещению соединительной тканью, в отдельных участках которой обнаруживаются зоны склерозирования. В петлях соединительнотканного остова трансплантата много форменных элементов крови. Встречаются

разрушенные эпителиальные клетки, иногда в виде скоплений, разделенных тонким слоем соединительной ткани (рис. 4, 5).

Наряду с явлениями деструкции в трансплантате отчетливо проявляются признаки интенсивного роста и новообразования сосудов, которые не только врастают в соединительнотканную капсулу, но и обнаруживаются в периферическом слое трансплантата. Одним из основных признаков репарации в трансплантате является образование микрофолликулов, которые обнаруживают тенденцию к перераспределению и комплексованию с последующим формированием фолликулярного строения (рис. 5, 6). В некоторых новообразованных фолликулах обнаруживается коллоид, в то время как другие фолликулы коллоида не содержат. Эпителиальные клетки сохраняют правильное строение, высота слоя этих клеток, выстилающих полость фолликулов, существенно не отличается от аналогичного показателя в интактной тиреоидной паренхиме.

Таким образом, изменения в микроскопическом строении трансплантата криоконсервированной щитовидной железы свидетельствуют об определенных структурных перестройках, которые отражают процесс адаптации тиреоидной паренхимы к новым условиям функционирования. Эти условия включают в себя: изменение привычного места расположения, утрату связей с окружающими тканями и организмом в целом за счет денервации, деваскуляризации и делимфатизации (следствие этого — развитие в тиреоидной паренхиме ишемического процесса). Обнаруженные перестройки в структурной организации тиреоидного трансплантата, подвергнутого криоконсервированию, незначительно отличаются от таковых в трансплантате незамороженной щитовидной железы. Различия между интактными и консервированными трансплантатом носят скорее качественный, а не количественный характер. Криоконсервация, как правило, удлиняет период адаптации, замедляет развитие репаративных процессов. Однако, уже к 10—14 суткам основные деструктивные процессы в трансплантате замедляются и на смену им приходят компенсаторные и репаративные процессы [1, 2, 8]. Эти наблюдения согласуются с работами других авторов.

При сопоставлении строения аутологичных, криоконсервированных с димексидом, и аллогенных, криоконсервированных с ПЭО-400 тиреоидных трансплантатов [13], обнаруживаются определенные различия между указанными группами трансплантатов в динамике морфологических изменений. В то время как в аутологичном трансплантате на 20 сут сохраняются основные функциональные элементы тиреоидной паренхимы, аллогенный криоконсервированный трансплантат в эти же сроки, а также на 30 сут представляет собой перерожденную ткань, не содержащую фолликулов. Было бы логично предположить, что причиной указанных деструктивных изменений в криоконсервированном с ПЭО-400 трансплантате является неадекватность применяемого метода консервирования. Однако этому противоречат два обстоятельства. Пересадка аутологичных, криоконсервированных с ПЭО-400 щитовидных желез, сопровождается восстановлением уровня тиреоидных гормонов в крови у предварительно тиреоидэктомизированных животных [4]. К тому же, в 3-х из 4-х криоконсервированных с ПЭО-400 аллогенных тиреоидных трансплантатах на 60 сут обнаруживаются на периферии сравнительно крупные фолликулы, стенка которых состоит из высоких тироцитов с куполообразным выпячиванием на апикальном конце. Интерфолликулярный коллоид вакуолизирован, в центре его находятся ядра тироцитов. Мелкие фолликулы содержат густой коллоид [13].

Оба факта указывают, что аллогенный, криоконсервированный с ПЭО-400 трансплантат приживает и функционирует, однако вследствие иммунологического конфликта или особенностей применяемого для крио-

консервирования протектора динамика структурных перестроек в нем (отражающая приспособление к новым условиям функционирования) несколько отличается от характера структурных изменений в трансплантате щитовидной железы, криоконсервированной с диметилсульфоксидом.

Представленные выше данные подтверждают высказанные Кристиани [17, 18] положения о возможности регенерации щитовидной железы после ее пересадки; при этом ведущее значение в регенерации тиреоидного трансплантата отводится капсуле, вблизи которой находятся альвеолы, начинающие развиваться после трансплантации.

Описано сохранение групп фолликулов в периферических участках тиреоидной паренхимы морских свинок, замороженной в твердой углекислоте или парах азота [24]. Приводятся данные об удовлетворительном сохранении структуры трансплантата и захвата им радиоактивного йода при использовании в качестве криопротектора глицерина [23, 24]. При этом большая выживаемость тиреоидэктомированных крыс наблюдалась после трансплантации им консервированной с глицерином щитовидной железы, чем железы, замороженной без криопротектора. В 3-месячных трансплантатах выявлено прогрессивное увеличение участков железистой ткани, хотя значительную площадь их составляла соединительная ткань. К данному сроку морфологическое строение криоконсервированного трансплантата щитовидной железы мало чем отличалось от микроструктуры трансплантата незамороженной тиреоидной паренхимы. Имеются доказательства приживления к 20 сут криоконсервированного тиреоидного трансплантата у кролей и собак, сохранения его микроскопического строения [2]. В работе указывается на отставание восстановительных процессов в трансплантате криоконсервированной щитовидной железы по сравнению с интактной, что согласуется с нашими наблюдениями [18]. Высказывается предположение [1, 3], что функционирование криоконсервированного тиреоидного трансплантата обеспечивается двумя механизмами: в ранние сроки после пересадки сохранившимися, переживающими фолликулами, а в более поздние — новообразованными фолликулами. Криоконсервированный трансплантат при этом сохраняет способность к функционированию даже после 2 мес. хранения при температуре -79°C , что согласуется с нашими данными о возможности сохранения щитовидной железы крыс при температуре -196°C не менее 20 сут.

Полученные нами результаты, а также анализ имеющихся данных свидетельствуют о сохранении при консервации с криопротекторами основных структурных элементов щитовидной железы. При последующей трансплантации криоконсервированной тиреоидной паренхимы тиреоидэктомированным животным отмечено ее приживление и восстановление функциональной активности. Изменения в структуре тиреоидного трансплантата в основном согласуются с характером протекающих в нем биохимических процессов.

Ниже приведены данные об активности в криоконсервированном тиреоидном трансплантате аденилатциклазной системы, являющейся одним из центральных звеньев в регуляции функции щитовидной железы [15].

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о снижении на 30 % базальной активности аденилатциклазной системы мембран клеток криоконсервированного тиреоидного трансплантата. Ранее нами исследовалось состояние аденилатциклазной системы в криоконсервированной щитовидной железе [12]. При этом было показано, что базальная активность аденилатциклазы сравнительно устойчива к действию замораживания. Это обстоятельство позволяет предположить, что обнаруженное уменьшение базальной активности аденилатциклазы в криоконсервированном тиреоидном трансплантате не является результатом неадекватности используемого метода консервирования, а вызвано снижением в нем в

Таблица 1

Активность аденилатциклазы (пМ ЦАМФ/мг белка) в криоконсервированной тиреоидной паренхиме человека, пересаженной кролям

Условия эксперимента	Базальная активность	40 мМ NaF	50 мЕ ТТГ
Тиреоидная паренхима до пересадки (контроль)	39,43	409,47	121,56
Криоконсервированный трансплантат (20 сут)	24,65	121,14	31,63

$n = 4$; в каждом опыте объединились 3—4 трансплантата

результате происходящих (в процессе адаптации к новым условиям функционирования) перестроек активности и количества функционирующих клегок. Эти же изменения могут являться причиной снижения активности аденилатциклазы, стимулируемой фторидом. В еще большей степени, чем базальная или стимулируемая фторидом, снижается в трансплантате активность аденилатциклазы, стимулируемой тиреотропным гормоном. Поскольку само замораживание тиреоидной паренхимы не изменяет стимулируемую ТТГ активность аденилатциклазы, то ее снижение, как и подобные изменения базальной и стимулируемой фторидом аденилатциклазы, связаны, по-видимому, с процессом трансплантации. Большая выраженность этих изменений в гормоночувствительной аденилатциклазе обусловлена особенностями структурной организации этой системы, включающей в себя гормонорецептор, N-регуляторный белок, и собственно аденилатциклазу

Таблица 2

Органификация йодидов в криоконсервированном 20-суточном тиреоидном трансплантате крыс (% от стандарта)

Условия эксперимента	Включение ^{131}I в белки
Криоконсервированный трансплантат (контроль)	$0,175 \pm 0,026$
KI $1 \cdot 10^{-6}$ М	$0,059 \pm 0,007^*$
Мерказолил $1 \cdot 10^{-3}$ М	$0,072 \pm 0,008^*$
Адреналин $1 \cdot 10^{-6}$ М	$0,210 \pm 0,038$

* Достоверно к контролю.

процессах в трансплантате. Учитывая, что адаптация тиреоидной паренхимы к неблагоприятным условиям окружающей среды после ее пересадки сопровождается существенным (примерно 25 %) уменьшением количества фолликулов и освобождением тиреоглобулина, то не исключено, что именно этот гликопротеин оказывает ингибирующее влияние на процесс взаимодействия гипоталамического тиреотропного гормона с аденилатциклазой, как это имеет место в нормальной щитовидной железе [19].

В табл. 2 приведены данные о характере органификации йодидов в криоконсервированном тиреоидном трансплантате. Они свидетельствуют о некотором снижении способности тиреоидного трансплантата к органификации йодида. Поскольку ранее было установлено, что само по себе замораживание тиреоидной паренхимы до -196°C с криопротектором и без него не приводит к снижению органификации йодидов, то логично предположить, что обнаруженное в трансплантате снижение этого процесса

[4]. Указанная многокомпонентная система весьма чувствительна как к структурным перестройкам мембран тироцитов, так и к изменению химического состава этих клеток. Целый ряд соединений образующихся в клетках, могут оказывать модулирующее влияние на гормоночувствительную аденилатциклазу [9, 10]. Не исключено, что подобными свойствами обладают некоторые вещества, накапливающиеся при деструктивных или репаративных про-

является результатом структурно-функциональных изменений, происходящих в результате пересадки, а не повреждений, вызываемых замораживанием — оттаиванием. Последующие эксперименты с ингибиторами органификации (табл. 2) подтвердили это предположение. Угнетение процесса органификации избытком йодида свидетельствует о сохранении регулируемости, что предполагает сохранение структурных элементов процесса и их функциональной активности, хотя и в редуцированном виде.

Снижение функциональных процессов в криоконсервированном трансплантате щитовидной железы выявлено в опытах на кроликах [12]. Функциональную активность криоконсервированного тиреоидного трансплантата мы оценивали по содержанию тиреоидных и тиреотропного гормонов в крови крыс. Вначале у этих животных удалялась собственная щитовидная железа, которая затем консервировалась и хранилась 20 сут при температуре -196°C . После этого она трансплантировалась этим же крысам в гетеротопическую позицию. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 3.

Таблица 3

Уровень тиреоидных (нМ/л) и тиреотропного (мЕ/мл) гормонов в крови тиреоидэктомизированных крыс при ауто трансплантации им криоконсервированной (-196°C) щитовидной железы

Условия эксперимента	Уровень гормонов в крови		
	Тироксин	Трийодтиронин	ТТГ
1. Контроль	$31,84 \pm 3,88$	$0,52 \pm 0,08$	$0,80 \pm 0,12$
2. Тиреоидэктомия	$19,00 \pm 5,50^*$	$0,15 \pm 0,1^*$	$2,37 \pm 0,65$
3. Трансплантация (20-е сутки)	$42,55 \pm 4,95^{**}$	$0,18 \pm 0,03$	$1,15 \pm 0,21$

* Достоверно к п. 1; ** достоверно к п. 2.

Отмечено, что уровень тиреоидных гормонов тироксина и трийодтиронина в крови крыс на 20 сут после удаления у них щитовидной железы снижается. В наибольшей степени это касается трийодтиронина: содержание его снижается более чем в три раза, в то время как уменьшение содержания тироксина не превышает 40 %. После тиреоидэктомии увеличивается почти в три раза содержание тиреотропного гормона, что соответствует существующим в литературе представлениям о функциональной взаимосвязи между клетками передней доли гипофиза и щитовидной железой. В последующем периоде, на 20-е сутки после пересадки криоконсервированной тиреоидной паренхимы, восстановлению содержания тироксина в крови соответствует снижение до контрольных значений уровня тиреотропного гормона в крови.

Возможной причиной лишь частичной нормализации уровня трийодтиронина в крови тиреоидэктомизированных крыс после трансплантации им щитовидной железы является снижение способности к дейодированию тироксина периферическими тканями. Поскольку низкий уровень трийодтиронина обнаруживается при трансплантации криоконсервированной, а не интактной щитовидной железы [4], то не исключено, что ингибирующее действие на дейодиназу в периферических тканях оказывают вещества, образующиеся при замораживании. Кроме того, ингибирование дейодиназы может быть результатом увеличения в крови содержания тиреоидных гормонов, наблюдаемого при трансплантации криоконсервированной тиреоидной ткани [11].

В пользу предположения о возможном ингибирующем влиянии криоконсервированного трансплантата на активность дейодиназы могут свидетельствовать данные о сниженном содержании трийодтиронина в крови

тиреоидэктомированных крыс после трансплантации им криоконсервированной с ПЭО-400 щитовидной железы [4—6].

Пересадка криоконсервированной щитовидной железы, помимо увеличения содержания тироксина (на фоне сниженного уровня трийодтиронина), сопровождается уменьшением содержания тиреотропного гормона в крови. Эти данные указывают, что в криоконсервированном трансплантате сохраняется способность к образованию тироксина, и он включается в регуляцию образования и секреции ТТГ передней доли гипофиза.

Нами была исследована возможность трансплантации аутологичной криоконсервированной и хранившейся при -196°C (вплоть до одного года) щитовидной железы с целью лечения гипотиреоза. Тактика проводимого лечения [7] заключалась в том, что железа больных, удаленная в результате хирургического лечения диффузного токсического зоба, замораживалась по соответствующей программе [14], переносилась в сосуд Дьюара с жидким азотом, где и хранилась в течение 4—5, 8—12 мес. до возникновения у данных больных гипотиреоза. В табл. 4 приведены результаты исследований криоконсервированных тканей до трансплантации.

Таблица 4

Органификация йодидов в тиреоидной паренхиме человека, консервированной и хранившейся при температуре -196°C 6 и 12 мес

Условия эксперимента	% включения ^{125}I к стандарту		
	Базальная активность	KI, $1 \cdot 10^{-3}$ М	Мерказолил, $1 \cdot 10^{-3}$ М
Незамороженная ткань (контроль)	$0,096 \pm 0,024$	$0,043 \pm 0,005^{**}$	$0,040 \pm 0,004^{**}$
Хранение 6 мес.	$0,242 \pm 0,047^{*}$	$0,080 \pm 0,032^{**}$	$0,072 \pm 0,023^{**}$
Хранение 12 мес.	$0,156 \pm 0,044$	$0,067 \pm 0,011^{**}$	$0,055 \pm 0,011^{**}$

* Достоверно к контролю.

** Достоверно к базальной активности.

Они показывают, что при хранении тиреоидной паренхимы человека 6 и 12 мес. при -196°C существенно увеличивается способность этой ткани органифицировать йодид и сохраняется чувствительность данного процесса к избытку йодида калия и мерказолилу. Сопоставление действия на процесс органификации медленного замораживания — оттаивания и медленного замораживания с последующим хранением в течение одного года показало, что стимулирующее действие на органификацию йодидов оказывает уже сам процесс замораживания щитовидной железы без ее последующего хранения при -196°C (при использовании идентичных в обоих случаях условий: скорости замораживания $1-3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и криопротектора — 10 % димексида) [12].

В основе стимулирующего действия на щитовидную железу могут лежать перестройки в конформационном состоянии молекул: тиреоглобулина и пероксидазы, к которым приводит как непосредственно замораживание — оттаивание [3], так и взаимодействие с диметилсульфоксидом [25], или комбинированное влияние диметилсульфоксида и замораживания на щитовидную железу [12]. Длительное хранение тиреоидной паренхимы при температуре -196°C не нарушает механизма регуляции включения йодида в белки, поскольку оба применяемых ингибитора — йодид калия (в избыточной концентрации) и мерказолил снижают активность данного процесса в той же степени, что и в незамороженной щитовидной железе (табл. 4).

В табл. 5 приведены данные об активности аденилатциклазы в тиреоидной паренхиме человека, консервированной и хранившейся в течение 1 года при температуре -196°C . Как видно из данных таблицы, ба-

Активность аденилатциклазы в срезах щитовидной железы человека, криоконсервированной и хранившейся один год при -196°C (пМ/цАМФ/мг белка)

Характер эксперимента	Базальная активность	NaF (40 мм)	ТТГ (50 мЕ)	Адреналин 10^{-6} М
Незамороженная тиреоидная паренхима (контроль)	$2,47 \pm 0,88$	$5,45 \pm 1,89$	$3,20 \pm 0,80$	$1,5 \pm 0,5$
Хранившаяся 12 мес. при -196°C	$2,50 \pm 1,23$	$6,41 \pm 1,23$	$6,78 \pm 1,37^*$	$5,56 \pm 2,23^*$

* Достоверно к контролю.

зальная и стимулируемая фторидом аденилатциклаза в щитовидной железе после криоконсервирования и хранения при -196°C в течение года не отличается от активности этого фермента в незамороженной тиреоидной паренхиме. Вместе с тем активность аденилатциклазы, стимулируемая ТТГ и адреналином, после 12 мес. хранения возрастает по сравнению с таковой в незамороженной ткани. Следует отметить, что используемая в работе тиреоидная паренхима представляет собой патологически измененную ткань, которая к тому же длительно подвергалась воздействию тиреостатических средств (мерказолил), оказывающих многообразное влияние на процессы гормонообразования. Это могло явиться одной из причин снижения чувствительности к гормонам: ТТГ и адреналину. В процессе криоконсервирования и длительного хранения способность аденилатциклазы реагировать на ТТГ и адреналин восстанавливается. Можно предположить, что в основе этого эффекта лежат конформационные изменения молекул рецепторов гормонов — тиреотропина и адреналина, которые являются белками или гликопротеинами, встроенными в плазматическую мембрану тироцитов, а также изменения физико-химических (pH , вязкость) или некоторых функциональных свойств мембран, в частности их барьерно-транспортных функций. Нарушения как молекулярных, так и клеточных процессов в тиреотоксически измененной щитовидной железе могут быть обусловлены как патогенетическими факторами, вызывающими данное заболевание, так и лекарственной терапией, которая сопровождается блокированием SH -содержащих аминокислотных групп в белках. Указанные группы выполняют чрезвычайно важную роль в функционировании рецепторных белков.

Представленные данные о сохранении (и даже нормализации) при хранении (-196°C) исследуемых показателей функциональной активности щитовидной железы послужили основанием для использования криоконсервированной и хранившейся при -196°C тиреоидной паренхимы в качестве трансплантата при лечении больных гипотиреозом.

Основанием к отбору больных для проведения указанного лечения явилось развитие и постепенное нарастание у них признаков гипотиреоза: сонливости, умственной и физической заторможенности, сухости кожи, появления отеков и т. д., которые наблюдались через 2—6 мес. после резекции тиреотоксически измененной железы и не компенсировались заместительной терапией с помощью гормональных препаратов. Наряду с указанными признаками тиреоидной недостаточности заметно снижалась способность культи щитовидной железы к аккумуляции йодида; у больных послеоперационным гипотиреозом она обычно составляла 4—6 % от вводимого изотопа (норма — 15—30 %).

Наряду с основными показателями, отражающими состояние тиреоидной функции, у данной группы больных на протяжении 12 мес. после транс-

Таблица 6

Уровень тиреоидных (T_4 и T_3) и тиреотропного (ТТГ) гормонов в крови больных послеоперационным гипотиреозом после аутоимплантации им криоконсервированной и хранившейся 4—6 мес. (-196°C) тиреоидной паренхимы

Срок обследования	T_4 , нМ/л	T_3 , нМ/л	ТТГ, мЕ/мл
До трансплантации (контроль)	$46,38 \pm 3,47$ $n = 16$	$0,99 \pm 0,07$ $n = 16$	$38,17 \pm 7,39$ $n = 13$
После трансплантации			
14 сут	$66,09 \pm 8,03^*$ $n = 7$	$1,47 \pm 0,18$ $n = 12$	$33,57 \pm 8,56$ $n = 6$
2—4 мес.	$67,97 \pm 6,04$ $n = 7$	$1,36 \pm 0,19$ $n = 7$	$21,53 \pm 5,05^*$ $n = 12$
6 мес.	$66,60 \pm 5,49^*$ $n = 10$	$1,38 \pm 0,18$ $n = 7$	9,60 $n = 2$
8—10 мес.	$84,67 \pm 3,21$ $n = 3$	$1,28 \pm 0,20$ $n = 6$	17,0 $n = 2$
12 мес.	$86,52 \pm 6,69$ $n = 5$	$1,58 \pm 0,10$ $n = 8$	$9,73 \pm 3,19$ $n = 2$

* Достоверно по отношению к контролю.

плантации определялось содержание тиреоидных и тиреотропного гормонов в крови. Результаты исследований приведены в табл. 6.

Приведенные в табл. 6 данные свидетельствуют о том, что уже на 14 сут после трансплантации больным аутологичной тиреоидной паренхимы (криоконсервированной и хранившейся при температуре -196°C в течение 4—8 мес.) в крови у них происходит увеличение уровня тироксина (статистически достоверно) и трийодтиронина (статистически недостоверно), которое сохраняется в последующие (2—4 и 6 мес.) сроки обследования. Начиная же с 8-го месяца, уровень тиреоидных гормонов в крови больных возрастает в еще большей степени. Параллельно с увеличением содержания тиреоидных гормонов в крови происходит снижение уровня ТТГ. Через 6 и 12 мес. после трансплантации уровень данного гормона составлял около 9 мЕ/мл, в то время как до трансплантации этот показатель был резко увеличен и составлял 38,18 мЕ/мл.

Клиническое обследование больных гипотиреозом, которым производилась трансплантация щитовидной железы, выявило значительное улучшение их состояния уже к 14—21-м суткам после трансплантации. У подавляющего числа больных (у 30 из 32) отмечалось существенное снижение или полное исчезновение таких проявлений гипотиреоза как сонливость, умственная и физическая отсталость, сухость кожи, отечность. Ни в одном из случаев не возникала необходимость в дополнительной гормональной терапии.

Таким образом, трансплантация больных гипотиреозом криоконсервированной тиреоидной паренхимы сопровождается нормализацией содержания в крови тиреоидных и тиреотропного гормонов. На основании восстановления содержания тироксина до значений, близких к физиологической норме, которое влечет за собой снижение содержания ТТГ в крови, существенно увеличенного у больных гипотиреозом, можно предположить, что трансплантат включается в систему нейроэндокринной регуляции.

Как следует из данных, полученных при исследовании йодаккумуляционной функции культи и трансплантата криоконсервированной тиреоидной паренхимы, в организме больных гипотиреозом оба указанных образования служат источниками йодида для последующего биосинтеза тиреоидных гормонов [7]. Вместе с тем они фиксируют не менее 15 % йодида, поступающего в организм, что соответствует низшим значениям физиологической нормы для данного процесса в щитовидной железе. Сопоставление йодаккумуляционной активности культи и тиреоидного трансплантата показало, что восстановление йодаккумуляционной функции культи совпа-

дает по времени с нормализацией уровня тироксина в крови. В тех случаях, когда содержание тиреоидных гормонов в крови не восстанавливается, йодаккумулятирующая активность культи носит гипотиреоидный характер. Следовательно, восстановление функциональной активности культи у больных гипотиреозом после трансплантации им криоконсервированной щитовидной железы опосредовано тиреоидными гормонами, уровень которых в результате функционирования трансплантата возрастает. Не исключено, однако, что определенное информационное значение в данном процессе могут играть и другие биологически активные соединения, которые образуются в тиреоидной паренхиме при ее трансплантации и приживлению в организме реципиента.

Подытожим результаты изучения структуры и функциональных процессов в криоконсервированной щитовидной железе, пересаженной как экспериментальным животным, так и больным гипотиреозом. Криоконсервированный тиреоидный трансплантат претерпевает в организме определенные структурные и функциональные изменения, которые связаны в большей степени с адаптацией к новым, непривычным для него условиям функционирования и, в меньшей мере, обусловлены влиянием замораживания — оттаивания. Наряду с деструкцией, на разных стадиях переживания трансплантата в нем обнаруживаются признаки восстановления структуры и функциональной активности. Криоконсервированная щитовидная железа после трансплантации сохраняет способность к образованию тиреоидных гормонов, что обеспечивает компенсацию тиреоидной недостаточности в организме, обусловленную снижением уровня тиреоидных гормонов.

На основании представленных факторов, а также отсутствия неблагоприятных побочных эффектов при трансплантации криоконсервированной и хранившейся при -196°C тиреоидной паренхимы, сравнительной простоте и доступности данной операции следует заключить, что трансплантация криоконсервированной щитовидной железы является физиологически обоснованным методом лечения тиреоидной недостаточности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беличенко Л. И. Ауто- и гомопластика как критерий эффективности консервирования щитовидной железы замораживанием // Гематология и переливание крови. — Киев: Здоров'я, 1973. — С. 97—102.
2. Беличенко Л. И., Яралова В. П. О жизнеспособности свободных гомотрансплантантов щитовидной железы, консервированных глубоким замораживанием // Ортопедия. — 1969. — № 5. — С. 195—198.
3. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка. — 1982. — 255 с.
4. Даценко Б. М., Чуйко В. А., Алюшина А. А., Брук Г. З. Функция щитовидной железы, подвергнутой глубокому охлаждению (-196°C) // Проблемы эндокринологии. — 1975. — 21, № 2. — С. 86—90.
5. Даценко Б. М., Чуйко В. А., Брук Г. З. и др. Трансплантация криоконсервированной (-196°C) щитовидной железы // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. — Киев: Наук. думка, 1974. — С. 49—59.
6. Даценко Б. М., Чуйко В. А., Алюшина А. А. Содержание тиреоидных гормонов в крови тиреоидэктомизированных крыс // Криобиология и криомедицина. — 1975. — Вып. 1. — С. 96—98.
7. Македонская В. А. Клиническая и функциональная оценка трансплантации ткани щитовидной железы, подвергнутой низкотемпературной консервации и хранению при -196°C : Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — 1986, Харьков. — 16 с.
8. Мицкевич М. С. Восстановление функциональной активности щитовидной железы после глубокого охлаждения (-196°C) // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1958. — № 2. — С. 149—160.
9. Перцева М. Н. Мембранный комплекс гормон — рецептор — аденилатциклаза и его функциональное формирование в онтогенезе // Успехи современной биологии. — 1982. — 93, № 3. — С. 382—396.

10. Ткачук В. А. Участие аденилатциклазы в проведении гормонального сигнала через мембрану // Укр. биохим. журн.— 1981.— 53, № 2.— С. 5—27.
11. Чуйко В. А., Онуфриева Г. А., Митасов В. И. Реакция коры надпочечников на гомо-трансплантацию щитовидной железы — свежей и криоконсервированной (-196°C) // Криобиология и криомедицина.— 1976.— Вып. 1.— С. 77—79.
12. Чуйко В. А., Утевский А. М. Биохимия криоконсервированной щитовидной железы.— Киев: Наук. думка, 1985.— 216 с.
13. Шенберг М. Г. Морфологические исследования криоконсервированных трансплан-тантов щитовидной железы // Криобиология и криомедицина.— 1976.— Вып. 2.— С. 75—77.
14. А.с. 935050 СССР, МКИ А01D 1/02. Способ консервирования щитовидной железы / Н. С. Пушкар, А. М. Утевский, В. А. Чуйко и др.— Опубл. 15.06.82, Бюл. № 22.
15. Bech K., Madsen S. N. Human thyroid adenylate cyclase in non-toxic goitre: sensi-tivity to TSH, fluoride and thyroid stimulating immunoglobulins // Clin. Endocrin.— 1978.— N 8.— P. 457—466.
16. Brooks S. R. Endocrine tissue transplantation.— London: Springfield, 1962.— 165 p.
17. Cristiani I. Transplantation du tissue thyroïdien dans les rigides transparentes // C. R. Soc. Biol.— 1903.— P. 55.
18. Cristiani I. Conservation du tissue thyroïdien vivant dans l'eau selee physiologique // C. R. Soc. Biol.— 1904.— P. 56.
19. Hashizume K., Fenri C., De Groot L. J. Thyroglobulin inhibition of thyrotropin binding thyroid plasma membranes // J. Clin. Endocrinol. Met.— 1978.— 46, N. 4.— P. 679—685.
20. Heard B. E. The histological appearance of some normal tissues at low temperatu-res // Br. J. Surg.— 1955.— 42.— P. 430—437.
21. Heard B. E. Nuclear crystals in slowly frozen tissues at very low temperatures // Br. J. Surg.— 1955.— 42.— P. 639—663.
22. Trusal L. R., Gusman A. W., Baker C. J. Characterization of freeze-thaw-induced ultrastructural damage to endothelial cells *in vitro* // In vitro.— 1984.— 20, N. 4.— P. 353—364.
23. Parkes A. S. Functional grafts of fresh or stored thyroid tissue // Endocrinology.— 1959.— 18, N 1.— P. 35—36.
24. Stewart J. H., Stewart R. D. H., Woodruff M. F. A. The storage of rat thyroid tissue at subzero temperatures // Proc. Soc. Univ. Utago. Med. School.— 1955.— 33, N. 1.— P. 26—27.
25. Szmal H. H. Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biolo-gical systems // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1975.— 243, N 1.— P. 20—29.

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

Поступила 23.01.92

В. А. ЧУЙКО

ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ТРАНСПЛАНТАТА КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ПРИ -196°C ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Проводилось морфологічне та біохімічне дослідження трансплантата, а також ви-значався зміст тиреоїдних і тиреотропного гормонів крові експериментальних тварин і у хворих після трансплантації їм щитовидної залози. Встановлено, що знижений у результаті тиреоїдектомії зміст тироксина після пересадки щитовидної залози від-новлюється, в той час як рівень трийодтироніна залишається низьким. Трансплантація щитовидної залози призводить до зменшення підвищеного в результаті тиреоїдектомії рівня тиреотропного гормона у крові. Дані відновлення рівня тиреоїдних і тиреотроп-ного гормонів коригують з поліпшенням клінічного стану хворих, що свідчить про ефективність трансплантації щитовидної залози.

V. A. CHUYKO

FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE TRANSPLANTANT OF THYROID GLAND CRYOPRESERVED AT -196°C

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

Morphological and biochemical studies of the transplantants have been carried out. The contents of thyroid and thyrotropic hormones in blood of experimental animals and in patients after transplantation of the thyroid gland were determined. It has been found

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

УДК 57.043

Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко

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

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

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

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

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

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

вень сенсibilизации эритроцитов к холодовому шоку коррелирует с изменением проницаемости мембраны для ионов K^+ на предварительном этапе перед охлаждением [2], неодинаковая чувствительность к охлаждению клеток, инкубируемых в средах с NaCl или сахарозой, может быть обусловлена различиями в характере развития процессов, связанных с нарушением осмотического равновесия на мембране и возрастанием клеточной проницаемости.

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

Таблица 1

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

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

Примечание: * $P < 0,05$.

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

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

Для оценки такого макроскопического параметра, как объем клеток, было произведено измерение гематокрита, выражаемого как относительный объем, достигаемый в средах, содержащих гипертонические растворы

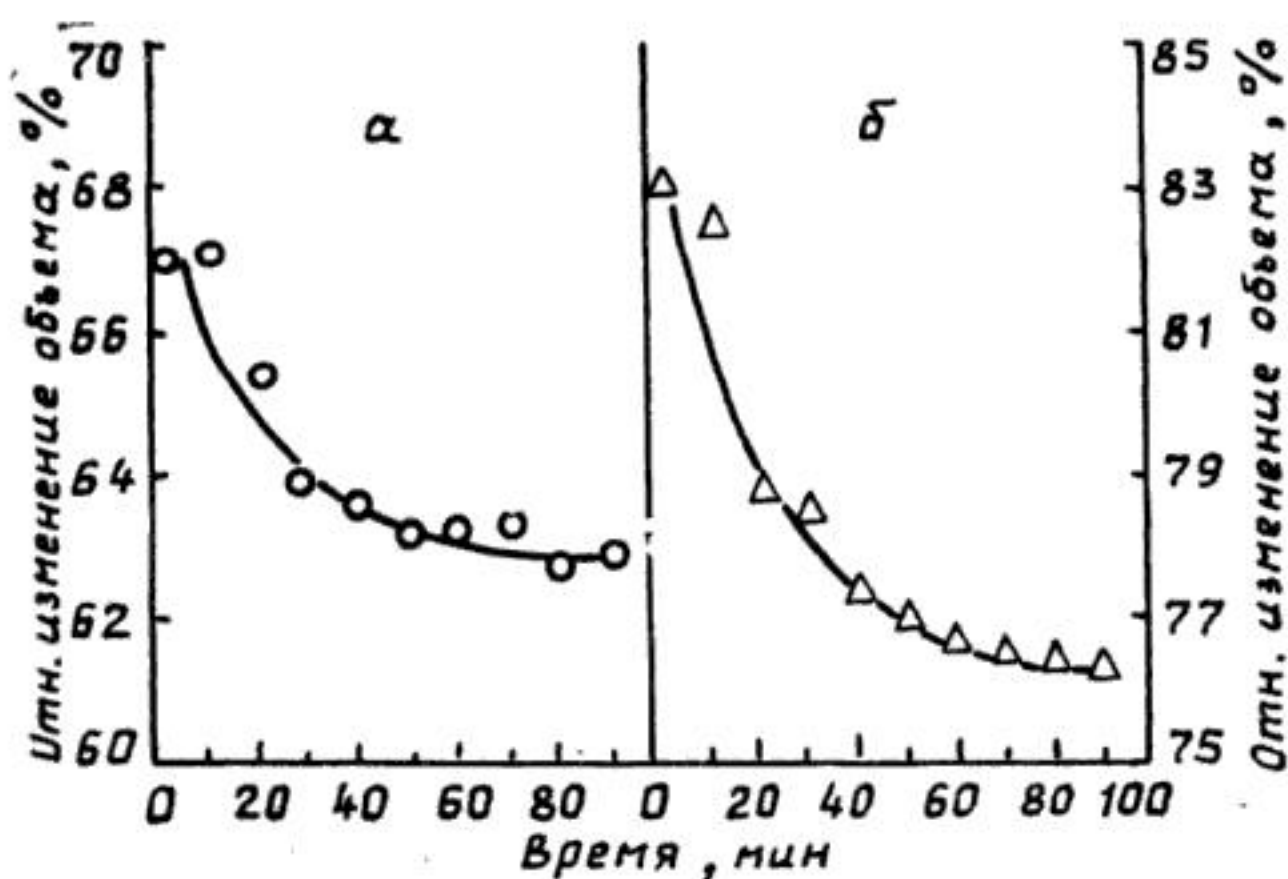


Рис. 1. Изменение объема эритроцитов в зависимости от продолжительности инкубации в присутствии 1,20 моль/л NaCl (а) и 0,86 моль/л сахарозы (б) при температуре 37 °С

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

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

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

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

Таким образом, при температуре инкубации 37 °С переход эритроцитов к состоянию равновесия по катионам (отражающий появление долгоживущих дефектов бислоя, проницаемых для ионов Na^+) маловероятен. Более вероятно появление короткоживущих дефектов бислоя, проницаемых для ионов Na^+ , на каком-то из этапов инкубации клеток. Поглощение части ионов Na^+ и сопутствующее этому процессу ингибирование дополнительного уменьшения объема клеток, сопровождающего потерю ионов K^+ и воды, может привести к снижению чувствительности эритроцитов к последующему охлаждению. Иными словами, поглощение части ионов Na^+ мож-

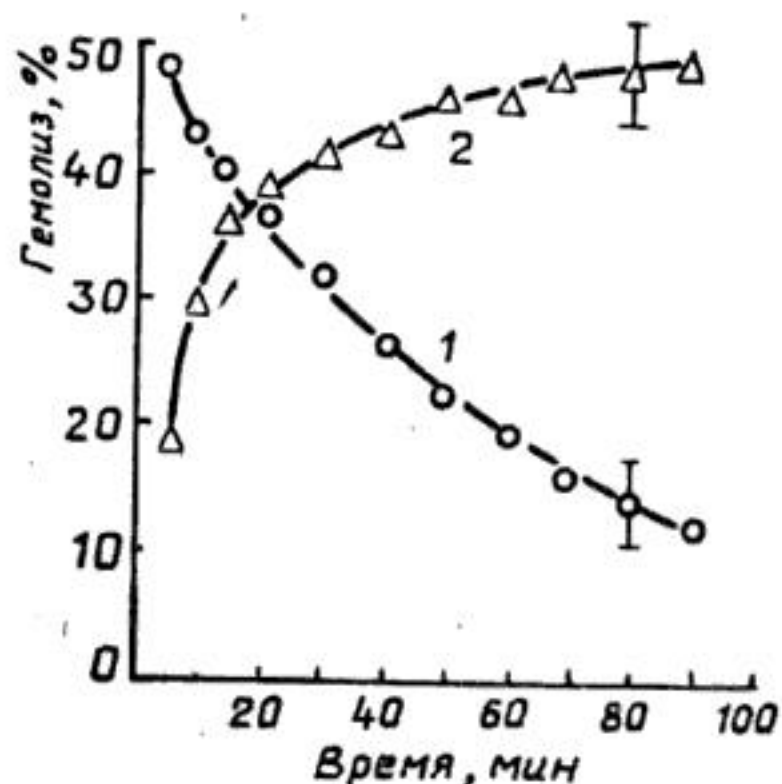


Рис. 2. Влияние продолжительности инкубации при 37 °С на гемолиз эритроцитов в средах, содержащих 1,20 моль/л NaCl (1) и 0,86 моль/л сахарозы (2)

но рассматривать как протектирующий фактор, ослабляющий действие гипертонического стресса по мере увеличения продолжительности инкубации эритроцитов. В то же время указанный механизм может не проявлять себя в случае, когда эритроциты инкубируются в сахарозе, что связано с относительно большим размером молекул этого неэлектролита и, соответственно, с менее выраженной способностью сахарозы проникать в клетки.

Различия в уровне чувствительности эритроцитов к холодовому шоку в зависимости от продолжительности инкубации в присутствии 1,20 моль/л NaCl и 0,86 моль/л сахарозы видны из данных, представленных на рис. 2.

В процессе гипертонической инкубации при 37 °С в присутствии 1,20 моль/л NaCl чувствительность эритроцитов к холодовому шоку снижается. Обратная зависимость наблюдается, если клетки инкубировать в присутствии 0,86 моль/л сахарозы. В последнем случае по мере увеличения продолжительности инкубации чувствительность эритроцитов к холодовому шоку возрастает.

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

Поступила 02.09.91

Н. М. ШПАКОВА, В. А. БОНДАРЕНКО

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

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
АН України, м. Харків

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

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

N. M. SHPAKOVA, V. A. BONDARENKO

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

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

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

УДК 57.043:612.111:536.54

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

ТЕРМОПЛАСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЗАМОРОЖЕННОЙ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЗИМОСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ

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

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

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

зультатов. Это связано с особенностями структуры белковых глобул, состоящих из «твердофазного» ядра 1 (рис. 1) и «жидкофазной» периферии [7]. При этом «жидкофазная» периферия делится на область 2, недоступную растворителю, ограниченную так называемой контактной поверхностью 3 [1], и область 4, контактирующую с растворителем. Поэтому при изучении влияния определенных компонентов среды на конформационную подвижность белка прежде всего представляет интерес динамика тех фрагментов молекул, которые находятся за контактной поверхностью и непосредственно взаимодействуют со средой. В этом смысле перечисленные экспериментальные методы являются малоэффективными, так как или дают усредненную по всему объему молекулы информацию о тепловом движении атомов, или нечувствительны к малым (до 1 %) добавкам в растворитель характерных модификаторов среды.

В настоящей работе рассмотрена новая методика изучения низкотемпературной динамики белковых молекул. Она состоит в том, что раствор биополимера заливается в специальное деформационное устройство, описание и принцип работы которого рассмотрены ранее [9], охлаждается в нем до температуры жидкого азота, после чего к закристаллизованному образцу прикладываются внешние напряжения и начинается его отогрев с заданной скоростью. При этом в координатах $\epsilon - T$ регистрируются термопластические кривые, отражающие величину деформации ϵ находящегося под постоянной внешней нагрузкой образца к моменту достижения им температуры T .

Вид этих кривых прежде всего определяется структурой замороженных растворов. В том случае, когда охлаждение раствора идет достаточно медленно ($V_{\text{охл.}} \leq 1^\circ\text{C/мин}$), замороженный образец представляет собой поликристаллическую матрицу, состоящую из кристаллов льда различной величины и формы, особый интерес в которой представляют межзеренные границы. В случае водных растворов белков эти границы включают в себя вытесненные из кристаллов льда белковые молекулы (рис. 2). Если исследуемый раствор содержит криопротекторные вещества, то при его охлаждении в межкристаллические прослойки выталкиваются также молекулы криопротектора.

Низкотемпературная пластическая деформация образцов с рассмотренной структурой имеет ряд особенностей. В области температур $T < T_{\text{gb}}$, где T_{gb} — температура стеклования (кристаллизации) жидких фракций в межзеренных границах, их пластическая деформация в основном реализуется за счет сдвигов в кристаллах льда (рис. 2, позиция 1). Это обусловлено тем, что напряжения сдвига в плотноупакованных базисных плоскостях кристаллов льда с гексагональной решеткой значительно

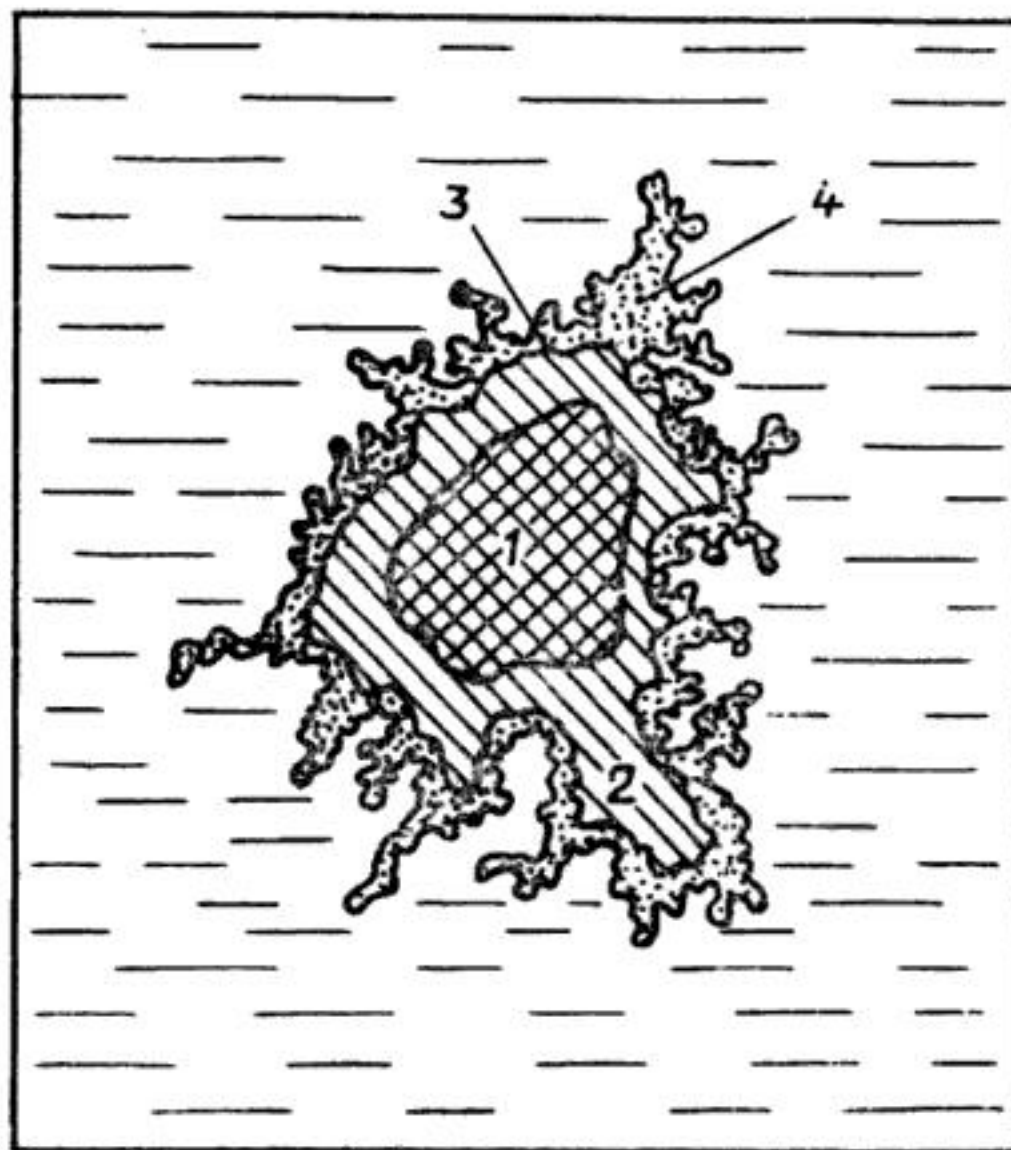


Рис. 1. Схематическое изображение структуры находящейся в растворе белковой молекулы: 1 — «твердофазное» ядро; 2 — область «жидкофазной» периферии, недоступная растворителю; 3 — контактная поверхность; 4 — область «жидкофазной» периферии, контактирующая с растворителем

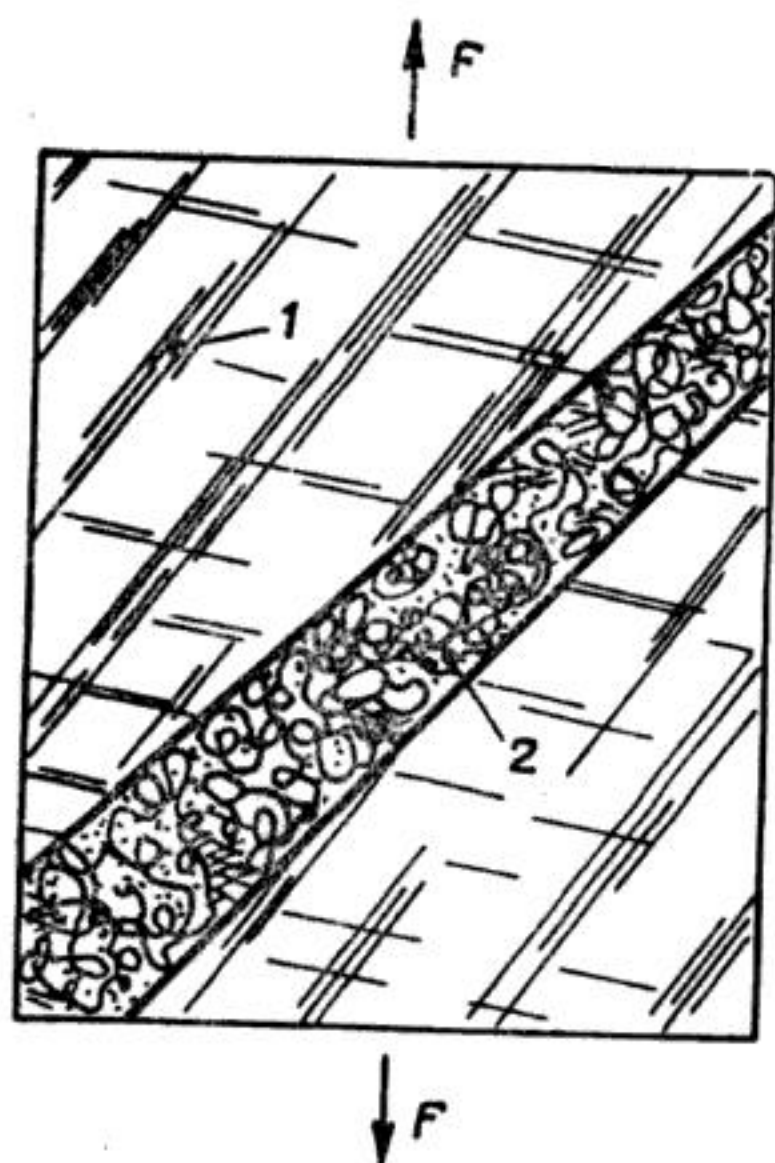


Рис. 2. Фрагмент закристаллизованного водного раствора белка, находящегося под действием приложенной внешней нагрузки F : 1 — линии пластического скольжения в кристаллах льда; 2 — межзеренная граница, включающая в себя выталкиваемые при образовании кристаллов льда белковые молекулы вместе со связанной с ними водой

Это существенно упрощает трактовку экспериментальных данных.

Типичные термопластические кривые, полученные на замороженных образцах плазмы крови суслика (кривая 2) и физиологического раствора (кривая 1) под нагрузкой $\sigma_1 = 200 \text{ г/мм}^2$, показана на рис. 3. Согласно рисунку, деформация обоих образцов в области низких температур, т. е. при повышении их температуры от -80 до -37°C одинакова. Это означает, что механизмы их пластической деформации идентичны и связаны с пластикой кристаллов льда. В этом случае в области тем-

ниже, чем в застеклованных фрагментах межзеренных границ, армированных белковыми молекулами. В области температур $T > T_{gb}$, когда в межзеренных границах существуют жидкие фракции, напротив, пластическая деформация образцов осуществляется за счет межзеренных сдвигов. В предельном случае при полностью расплавленных границах отдельные кристаллиты смещаются под нагрузкой относительно друг друга по практически жидким прослойкам. Естественно, что переход через температуру T_{gb} , т. е. смена механизмов пластической деформации образцов, сопровождается резким изменением вида термопластической кривой. Этот эффект можно положить в основу метода изучения фазового состояния различных компонентов биологической системы.

Здесь следует особо отметить, что при реализации данной методики скорость отогрева образцов во всем исследуемом диапазоне температур должна быть постоянной. В этом случае изучаемый образец проходит одинаковые по величине температурные интервалы за одинаковые промежутки времени, т. е. время нахождения его под нагрузкой к моменту достижения любой заданной температуры строго фиксировано.

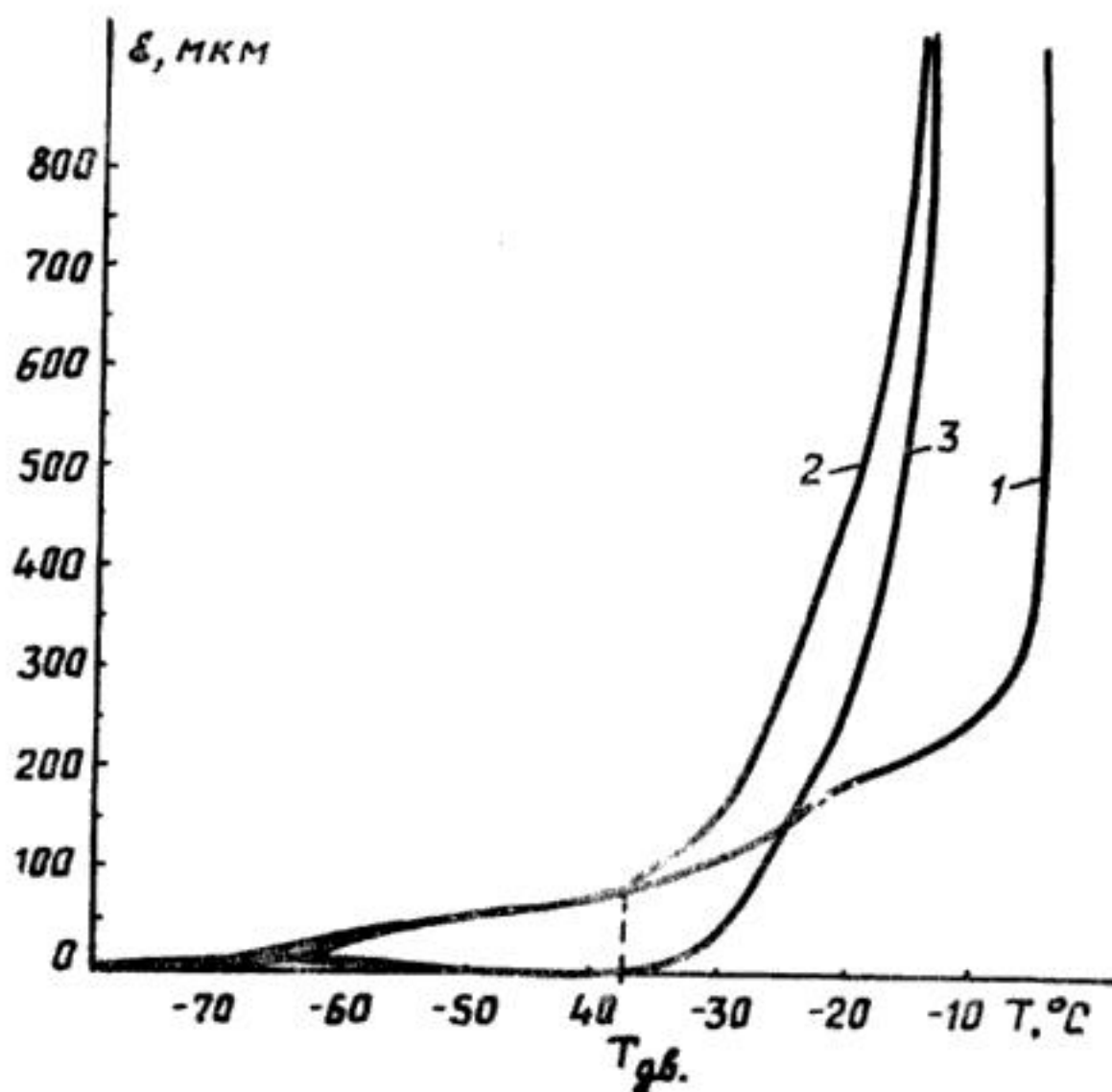


Рис. 3. Термопластические кривые замороженных образцов физиологического раствора (1) и плазмы крови суслика (2, 3)

ператур, где предел текучести σ_T образовавшихся кристаллов льда выше приложенной нагрузки σ_1 , пластическая деформация отсутствует. При достижении в процессе нагрева образцов температуры T_σ , соответствующей равенству $\sigma_1 = \sigma_T$, начинается их пластическая деформация, которая монотонно нарастает в интервале температур ($T_\sigma \dots T_{gb}$). После достижения температуры T_{gb} в образцах плазмы крови суслика начинается плавление растворителя во «внешних областях» белковых молекул (рис. 1, позиция 4), находящихся в межзеренных прослойках. С этого момента начинается отличие пластического течения этих образцов от образцов физиологического раствора. Вид термопластической кривой $\epsilon = \epsilon(T)$ здесь связан с эффективной вязкостью межзеренных прослоек, которая зависит от подвижности внешних фрагментов входящих в прослойки белковых молекул. В свою очередь эта подвижность практически полностью определяется фазовым состоянием и свойствами среды в области 4 (рис. 1). Если вязкость среды высока и фрагменты задемпфированы, то скольжение молекул относительно друг друга затруднено. При уменьшении вязкости среды и повышении подвижности внешних фрагментов межмолекулярное скольжение облегчается, что приводит к увеличению скорости пластической деформации $\dot{\epsilon}$ всего образца.

При низких температурах ($-100 \dots -20^\circ\text{C}$) даже незначительные изменения химического состава среды могут существенно трансформировать ее диаграмму фазовых состояний и менять упруго-пластические и вязкостные характеристики. Именно поэтому метод термопластической деформации в этом диапазоне температур очень чувствителен к химическому составу межзеренных прослоек. Особый интерес в данном случае представляют дифференциальные термопластические кривые, которые позволяют выделить межзеренное скольжение в чистом виде. Фактически дифференциальная кривая (рис. 3, кривая 3) представляет собой разность пластической деформации двух образцов: рабочего и эталонного. В качестве эталонного образца использовался закристаллизованный физиологический раствор, что позволяло вычесть деформацию, связанную с дислокационной пластичностью во всем исследованном интервале температур (рис. 3). В результате регистрируемые дифференциальные термопластические кривые отражают процессы, происходящие в межзеренных прослойках при непрерывном нагреве исследуемых образцов.

Серия таких кривых, полученная на образцах плазмы крови сусликов, показана на рис. 4. Образцы плазмы крови брались при декапитации животных — длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*), находившихся в различных физиологических состояниях: зимней спячке (температура тела животных, измеренная перед опытом термометром в ректуме, лежала в пределах $5 \dots 10^\circ\text{C}$), при искусственно вызванном пробуждении (температура тела животных 27°C) и бодрствовании (температура тела животных 37°C). Животные в состоянии зимней спячки и искусственного пробуждения подвергались изучению в январе — феврале, бодрствующие — в июне месяце. Антикоагулянтный раствор содержал 2 % глюкозы, 3 % трехзамещенного цитрата натрия, pH 7,4.

Из представленных на рис. 4 результатов следует, что образцы из плазмы крови бодрствующих сусликов обладают максимальной термопластической деформацией. При повышении температуры этих образцов от -196 до -20°C их термопластическая деформация достигает значений $1320 \dots 1350$ мкм. Согласно полученным экспериментальным данным, суммарная термопластическая деформация образцов в интервале температур $-196 \dots -20^\circ\text{C}$ резко уменьшается при переходе животных в состояние зимней спячки. Так, термопластическая деформация образца, полученного из плазмы крови суслика с температурой тела 27°C , в интервале $-196 \dots -20^\circ\text{C}$ составляет 405 мкм. При сканировании в этом же интервале темпе-

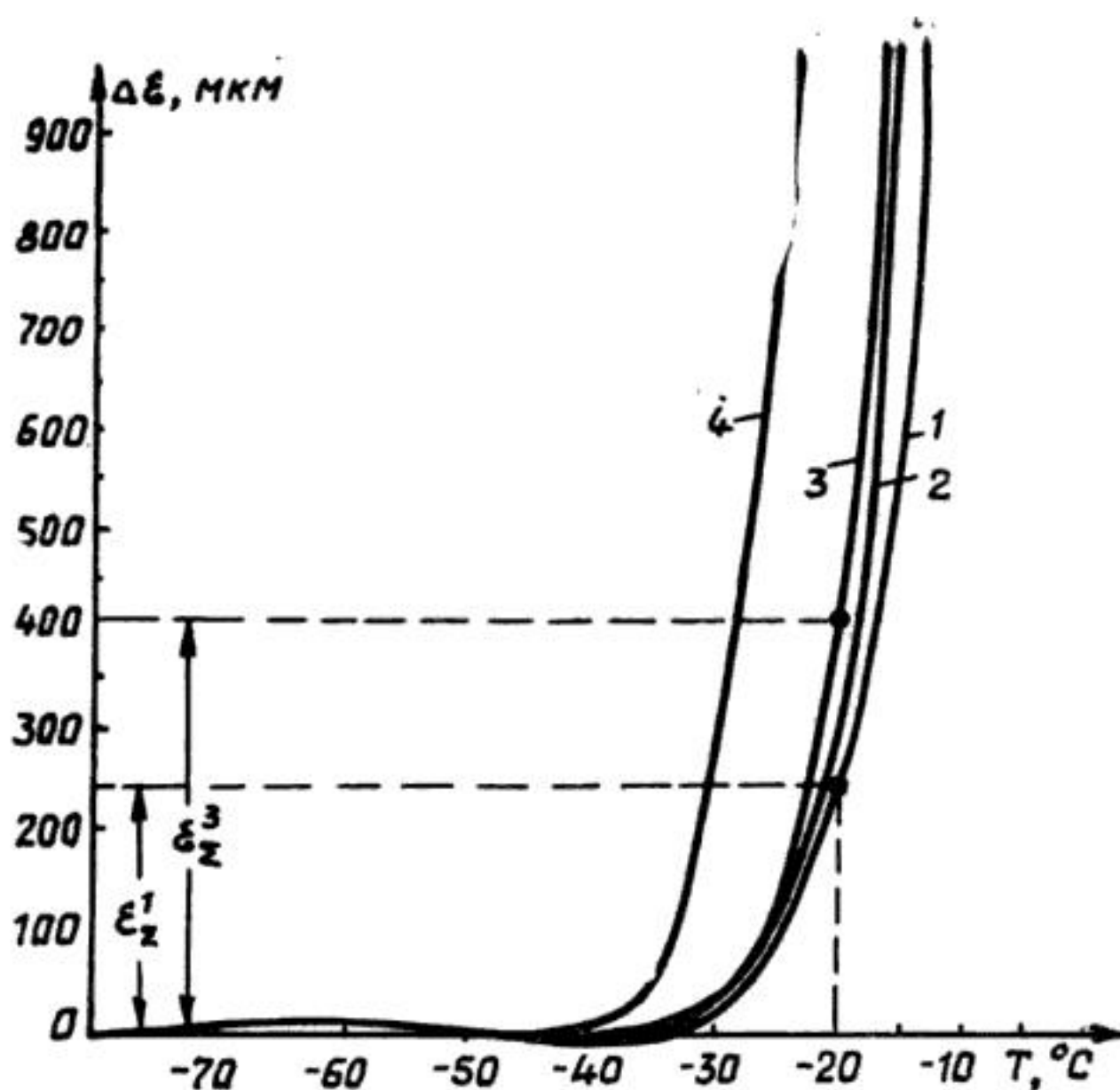


Рис. 4. Дифференциальные термопластические кривые замороженных образцов плазмы крови сусликов, находившихся в различных физиологических состояниях: 1, 2 — зимней спячки, $t=5$, $t=10$ °C; 3 — искусственно вызванном пробуждении, $t=27$ °C; 4 — бодрствования, $t=37$ °C, где t — ректальная температура

а у бразца из плазмы крови суслика с температурой тела 5 °C его термопластическая деформация составляет всего 240 мкм.

Эффект резкого уменьшения термопластической деформации образцов из плазмы крови сусликов при переходе животных в состояние зимней спячки наглядно показан на рис. 5. Представленная здесь зависимость $\epsilon_z = \epsilon_z(t_{\text{рект}})$ получена на основании рассмотренных термопластических кривых (рис. 4). При этом деформация ϵ_z в каждом из четырех исследованных случаев (температура тела животного 5, 10, 27, 37 °C) определялась

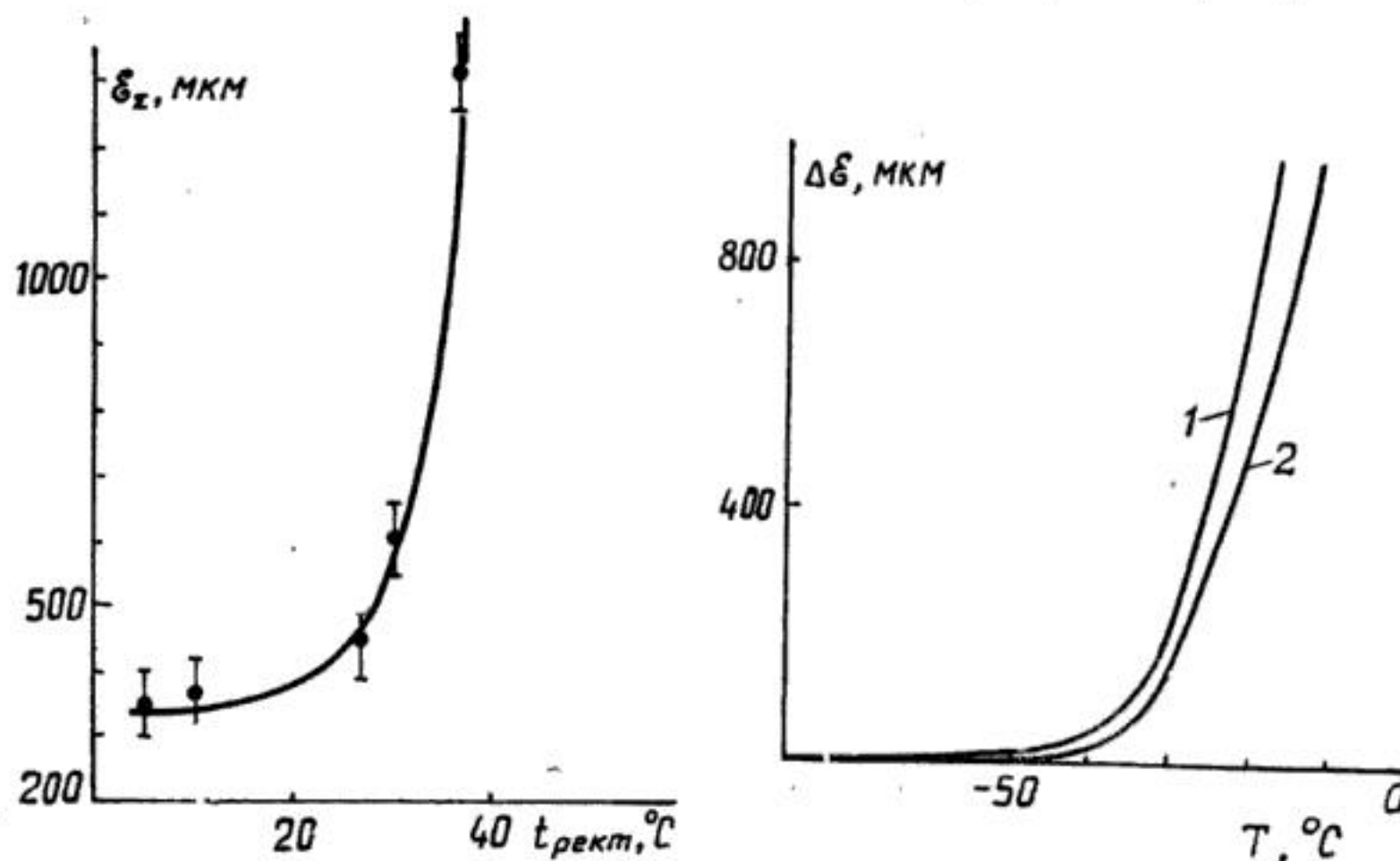


Рис. 5. Влияние температуры тела животного на суммарную термопластическую деформацию замороженных образцов плазмы крови сусликов в интервале температур $-196 \dots -20$ °C

Рис. 6. Влияние малых добавок глицерина на термопластическую деформацию замороженных растворов сывороточного альбумина человека: 1 — термопластическая кривая физиологического раствора с 7 %-ной добавкой сывороточного альбумина человека (САЧ); 2 — термопластическая кривая физиологического раствора с 7 %-ной добавкой (САЧ) и 1 %-ной добавкой глицерина

как суммарная термопластическая деформация замороженного образца к моменту достижения им температуры -25°C . Столь резкое уменьшение величины ϵ_2 (в 4 раза) нельзя объяснить изменением концентрации или структуры находящихся в плазме биомолекул, так как процесс пластической деформации рассмотренных систем определяется в основном свойствами контактирующей с этими молекулами среды в межзеренных прослойках.

Для подтверждения этого факта была проведена серия экспериментов на образцах, представляющих собой физиологический раствор с 7 %-ной добавкой сывороточного альбумина человека (САЧ). Результаты этих экспериментов показаны на рис. 6. Согласно представленным термопластическим кривым, активное скольжение в межзеренных прослойках начинается здесь с температуры $T_{gb} \approx -50^{\circ}\text{C}$ (рис. 6, кривая 1), что практически совпадает с началом межзеренного скольжения в образцах из плазмы крови бодрствующих сусликов (рис. 4, кривая 4). Для подтверждения принципиальной возможности ингибировать это скольжение за счет модификации среды в образцы перед их охлаждением до -196°C добавлялся глицерин в концентрации 0,5 ; 1; 2 %. Кривая 2 на рис. 6 наглядно отображает замедление межзеренного течения замороженного белкового раствора при малых добавках глицерина (1 %). Этот факт можно объяснить только уменьшением флуктуационной подвижности поверхностных фрагментов белковых молекул (рис. 1, область 4), так как добавки глицерина в водные растворы, не содержащие белковых молекул, резко инициируют пластическое течение замороженных образцов. В то же время эксперименты показали, что эффект ингибирования межзеренного скольжения за счет добавок глицерина существенно меньше эффекта, наблюдаемого в организме входящего в гипобиоз суслика. Данный эффект может быть связан с появлением в плазме естественных модификаторов, которые могут адсорбироваться на белковых молекулах и достаточно сильно менять микровязкость среды непосредственно в области 4 (рис. 1). В результате даже незначительное процентное содержание таких модификаторов в растворе может существенно изменять флуктуационную динамику фрагментов белка, находящихся за контактной поверхностью.

Полученные результаты не позволяют сделать выводы о природе возможных модификаторов. В данном случае они могут включать в себя как вновь синтезируемые вещества, так и целый ряд гормонов, нейромедиаторов, продуктов обмена веществ. К изменению термопластических характеристик замороженных образцов может привести и достаточно сильное изменение концентрации липидов в плазме крови животных. Для выяснения природы веществ, приводящих к обнаруженным специфическим изменениям свойств плазмы крови сусликов, находящихся в состоянии гипобиоза, необходимы более детальные исследования. Принципиальную возможность для их проведения дают методики, основанные на термопластической деформации замороженных образцов плазмы крови, так как они обладают высокой чувствительностью к процентному содержанию этих веществ в изучаемых средах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биополимеры / Под ред. Ю. Иманиси. — М.: Мир, — 1988. — 544 с.
2. Брустовецкий Н. Н., Маевский Е. И., Гогвадзе В. Г. Возможные биохимические механизмы подавления окислительного метаболизма у зимнеящих животных // Механизмы зимней спячки: Сб. научных трудов. — Пущино — 1987. — С. 32—39.
3. Буриштейн Э. А. Тушение флуоресценции белков 1 Принципы метода. Растворы триптофана, тирозина и денатурированных белков // Биофизика. — 1968. — 13, № 3. — С. 433—437.
4. Гольданский В. И., Крупянский Ю. Ф., Фролов Е. Н. Роль конформационных состояний в реакционной способности белковых молекул // Молекулярная биология. — 1983. — 17, № 3. — С. 532—542.

5. Гордон Р. Я., Бочарова Л. С., Попов В. И. и др. Структурно функциональные основы метаболизма РНК в мозге зимнеявляющихся в период зимней спячки // Механизмы зимней спячки.— Пушино.— 1987.— С. 168—175.
6. Загнойко В. И., Гулевский А. К., Мишнев Л. Г. Синтез белка в органах длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*) при различных функциональных состояниях // Известия АН СССР.— 1989.— № 6.— С. 862—869.
7. Лифшиц И. М., Гросберг А. Ю., Хохлов А. Р. Объемные взаимодействия в статистической физике полимерной макромолекулы // Успехи физ. наук.— 1979.— 127, № 3.— С. 353—389.
8. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии.— М.: Наука.— 1974.— 256 с.
9. Осецкий А. И., Гурина Т. М. Изучение фазового состояния замороженных растворов и биосистем методом термопластической деформации // Проблемы криобиологии.— 1992.— № 2.— С. 24—28.
10. Хочачко П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация.— М.: Мир.— 1988.— 567 с.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины
АН Украины, Харьков

Поступила 12.04.91

О. І. ОСЕЦЬКИЙ, Т. М. ГУРИНА, В. І. ЗАГНОЙКО

ТЕРМОПЛАСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЗАМОРОЖЕНОЇ ПЛАЗМИ КРОВІ ЗИМОСПЛЯЧИХ ТВАРИН

Інститут проблем криобіології і криомедицини
АН України, м. Харків

У роботі подані результати дослідження низькотемпературної теплової динаміки білкових молекул методом термопластичної деформації заморожених розчинів плазми крові. Показано, що метод дуже чутливий до змін фазового стану молекул і до малих добавок у розчинник речовин, які є інгібіторами теплової динаміки верхніх шарів білкових глобул. Цей ефект наочно продемонстрований на зразках плазми крові зимосплячних тварин. Показано, що інгібування флуктуаційної рухомості реакційно здатних верхніх шарів білкових глобул у плазмі крові ховрахів, котрі знаходяться у стані зимової сплячки, пояснюється синтезуванням у цьому стані природних модифікаторів, які різко підвищують мікрів'язкість середовища у верхніх шарах білкових глобул.

A. I. OSETSKY, T. M. GURINA, V. I. ZAGNOYKO

THERMOPLASTIC PROPERTIES OF FROZEN BLOOD PLASMA OF HIBERNATING ANIMALS

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

Low temperature thermal dynamics of protein molecules was studied by the method of thermoplastic deformation of frozen solutions of blood plasma. The method appeared to be very sensitive to changes in phase state of molecules and small additives inhibiting the thermal dynamics of surface layers of protein globules. The effect is demonstrated on specimens of blood plasma of hibernating animals. The inhibition of fluctuating mobility of reaction-capable surfaces of protein globules in blood plasma of hibernating ground squirrels may be due to synthesizing of natural modifiers which increased sharply the medium microviscosity in surface layers of protein globules.

А. Н. Новиков, Б. Н. Вепринцев, В. К. Утешев, Т. И. Смолихина,
Т. П. Линник

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЯ И КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КРИСТАЛЛИЗАЦИЮ В ЗАРОДЫШАХ ВЬЮНА

Изучено влияние степени переохлаждения, скорости охлаждения, концентрации ДМСО во внеклеточной среде, присутствия в среде мембраноактивных веществ на внутриклеточную кристаллизацию зародышей вьюна. Показано, что для уменьшения вероятности внутриклеточной кристаллизации зародышей вьюна при их замораживании целесообразно использовать совокупность воздействий: медленную скорость охлаждения ($<0,6^\circ\text{C}/\text{мин}$), снижение степени переохлаждения во внешней среде, применение добавок мембраноактивных веществ, способствующих повышению проницаемости мембран и оболочки зародышей для воды и криопротектора.

Считается, что повреждение зародышей в процессе глубокого замораживания в основном связано с образованием кристаллов льда и их перекристаллизацией в клетке [3]. Показанная нами ранее [1] значительная роль внутриклеточной кристаллизации в повреждениях, возникающих при охлаждении зародышей вьюна, определила необходимость более детального изучения влияния на этот процесс ряда факторов: концентрации криопротекторов во внеклеточной среде, времени экспозиции зародышей в растворе криопротектора, степени переохлаждения, скорости охлаждения, присутствия в криозащитной среде мембраноактивных веществ. Предлагаемый в настоящей работе материал следует считать первым этапом дальнейших исследований, направленных на разработку методов криоконсервирования зародышей рыб.

Работа выполнена на ранних зародышах вьюна *Misgurnus fossilis* L., который широко используется как модельный объект эмбриологических исследований и особенности эмбрионального развития которого хорошо изучены [2]. Несомненным преимуществом этого объекта является то, что икринки вьюна прозрачные, в отличие, например, от икры лягушки, и это позволяет легко наблюдать процесс кристаллизации. Для наблюдения использовали метод криомикроскопии в отраженном свете.

Стимуляцию созревания ооцитов, искусственное оплодотворение, инкубацию оплодотворенной икры и развивающихся зародышей проводили по методу А. А. Нейфаха [5]. В опытах использовали зародышей на стадиях гастрюляции (стадии 10—17). Зародышей выдерживали определенное время в криозащитном растворе, затем с частью раствора переносили в криоприставку и охлаждали с заданной скоростью при непрерывном наблюдении до -15°C . Фиксировали температуру начала внеклеточной кристаллизации по моменту появления первого внеклеточного кристалла льда, температуру начала и завершения внутриклеточной кристаллизации зародышей — по изменению их цвета и прозрачности. Для характеристики процесса кристаллизации зародышей использовали следующие величины, определенные с указанной в каждом случае погрешностью при $p = 0,05$: температуру начала внеклеточной кристаллизации ($\pm 0,5^\circ\text{C}$); температуру начала и конца внутриклеточной кристаллизации (соответственно $\pm 0,5^\circ\text{C}$ и $\pm 0,6^\circ\text{C}$); температуру закристаллизовывания 50 % зародышей ($\pm 0,5^\circ\text{C}$); количество незакристаллизовавшихся зародышей при -10°C ($\pm 3,5\%$).

В качестве криозащитных растворов использовали растворы диметилсульфоксида (ДМСО, СССР, марки «ХЧ» (различной концентрации с $pH = 7,2-7,3$, доведенным $0,2\text{ M}$ трис- HCl буфером (Reanal, Венгрия). В качестве мембраноактивных добавок применяли полипропиленгликоль-

425, поливинилпирролидон-12000 (ПВП-12000), полиэтиленоксид-1500 (ПЭО-1500), олеат аммония (все СССР). Обработка результатов исследований проведена регрессионным анализом [7] на ЭВМ СМ-4.

Наблюдение за развитием процесса кристаллизации зародышей вьюна в поле зрения микроскопа показало, что внутриклеточная кристаллизация зародышей происходит только при их контакте с растущими кристаллами льда во внешней среде, т. е. инициируется кристаллами льда внешней среды. Возникшие кристаллы внеклеточного льда в среде без крио.

Таблица 1

Влияние концентрации ДМСО в среде на процесс внутриклеточной кристаллизации зародышей вьюна

Концентрация ДМСО, %	Температура начала внеклеточной кристаллизации, °С	Температура начала внутриклеточной кристаллизации, °С	Температура закристаллизовывания 50 % зародышей, °С	Температура завершения внутриклеточной кристаллизации, °С	Количество незакристаллизовавшихся зародышей при -10 °С, %
0	-2,3	-4,0	-4,1	-4,2	0
5,0	-4,2	-4,3	-4,9	-6,1	0
7,5	-4,3	-4,3	-5,2	-7,1	5
10,0	-5,1	-5,1	-5,9	-11,3	10
15,0	-7,9	-7,9	-8,9	-14,7	13

Время экспозиции в растворах ДМСО 20 мин, скорость охлаждения $0,6 \pm 0,1$ °С/мин. В этих условиях наблюдалась отдельно кристаллизация жидкости оболочки при температуре $-3,0 + -3,3$ °С, бластодермы и желтка при $-4,0 + -4,2$ °С.

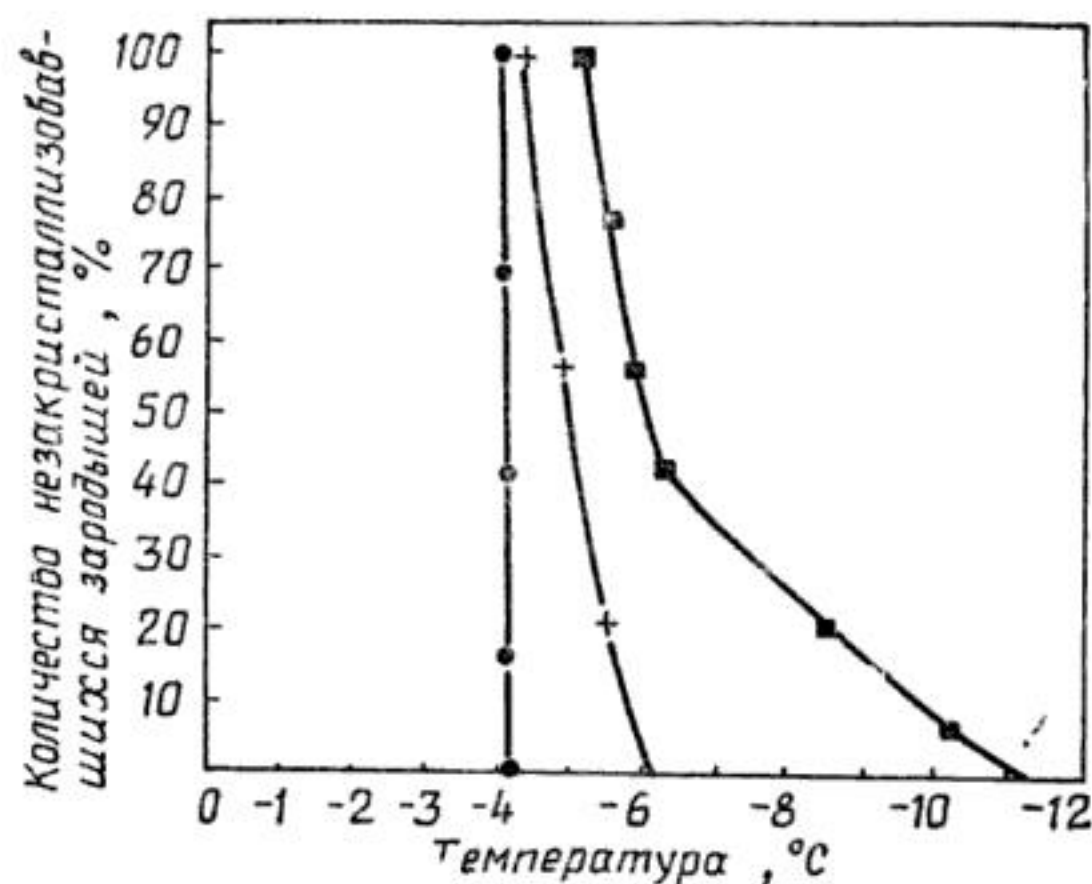


Рис. 1. Характер кристаллизации зародышей вьюна при охлаждении в присутствии ДМСО со скоростью $0,6$ °С/мин: —○— концентрация ДМСО 0 %; —+— ДМСО 5 %; —□— ДМСО 10 %

В присутствии ДМСО внутриклеточная кристаллизация в зародышах начинается сразу же после образования кристаллов льда во внешней среде, при этом бластодерма и желток кристаллизуются одновременно с оболочкой. При повышении концентрации ДМСО в среде увеличивается температурный интервал, при котором происходит кристаллизация зародышей, а также возрастает количество зародышей, незакристаллизовавшихся при -10 °С (рис. 1). Следовательно, добавление в среду ДМСО активирует процесс внутриклеточной кристаллизации на ее начальном этапе,

протектора не сразу, а только при снижении температуры на $0,7-1,0$ °С вызывают кристаллизацию оболочки зародышей. Кристаллизация бластодермы и желтка наступает при дальнейшем снижении температуры примерно на $1,7$ °С практически одновременно у всех наблюдаемых зародышей. Следовательно, инициированному образованию внутриклеточных кристаллов льда в зародышах препятствует два барьера: наружная оболочка и внутренняя мембрана, окружающая бластодерму и желток (табл. 1).

но одновременно замедляет процесс на конечных его стадиях и при этом тем больше, чем выше содержание ДМСО в среде.

В ранних наших работах [4, 6] высказано предположение, что вероятность внутриклеточной кристаллизации определяется восприимчивостью внутриклеточной среды к инициированию льдообразования кристаллами льда извне, а также барьерными свойствами мембраны. Указанная восприимчивость среды зависит от степени связывания воды, вязкости содержимого клетки, способности ингибировать зародышеобразование льда. Добавление в среду ДМСО за принятое время экспозиции приводит к частичному обезвоживанию и насыщению зародышей, но при малых концентрациях недостаточному. Поэтому из-за более низкой температуры замерзания внешней среды в момент ее кристаллизации создается большее переохлаждение внутриклеточной среды, при этом нарушаются барьерные свойства оболочки и внутренней мембраны зародыша. Повышение концентрации ДМСО в среде приводит к более значительному обезвоживанию и насыщению зародышей крипротектором, к тому же зародыши дополнительно обезвоживаются и растущими вовне кристаллами льда. В результате инициирование льдообразования внутриклеточной среды зародышей затрудняется, что и вызывает наблюдаемое замедление скорости кристаллизации зародышей на конечном этапе тем большее, чем выше концентрация ДМСО (рис. 1) в среде.

Увеличение степени переохлаждения среды при криоконсервации резко сокращает температурный диапазон, в котором происходит внутриклеточная кристаллизация зародышей (табл. 2). Так при переохлаждении до 4,4 °C процесс кристаллизации у всех наблюдаемых зародышей завершается в течении 10 с от начала появления первого кристалла во внешней среде. Уменьшение величины переохлаждения до 1,2 °C при той же скорости охлаждения замедляет этот процесс. Повышение скорости охлаждения (табл. 2) сокращает температурный диапазон процесса внутриклеточной кристаллизации, но в меньшей степени, чем увеличение степени переох-

Таблица 2

Влияние степени переохлаждения внешней среды и скорости охлаждения на процесс внутриклеточной кристаллизации зародышей выюна

Концентрация ДМСО % (в/в)*	Скорость охлаждения, °C/мин	Переохлаждение внешней среды, °C**	Температура начала внеклеточной кристаллизации, °C	Температура начала внутриклеточной кристаллизации, °C	Температура закристаллизовывания 50 % зародышей, °C	Температура завершения внутриклеточной кристаллизации, °C	Количество незакристаллизовавшихся зародышей при -10 °C, %
10,0	0,55	4,4	-9,1	-9,1	-9,1	-9,2	0
10,0	0,60	1,2	-5,9	-5,9	-6,6	-10,9	8
10,0	1,58	1,1	-5,8	-5,8	-6,1	-9,5	0

* Время экспозиции в растворе ДМСО 20 мин. ** Точка замерзания 10 % раствора ДМСО = -4,7 °C.

лаждения. Таким образом, видно, что и увеличение степени переохлаждения, и повышение скорости охлаждения влияют на процесс внутриклеточной кристаллизации одинаково: активируют его. Следует ожидать, что полное устранение переохлаждения внешней среды и снижение скорости охлаждения < 0,6 °C/мин существенно уменьшит вероятность внутриклеточной кристаллизации зародышей при их замораживании.

Изменение времени экспозиции зародышей в растворе ДМСО в пределах 5, 20, 60 мин не оказывает влияния на процесс их кристаллизации при охлаждении со скоростью 0,6 °C/мин, результаты определения исследуемых показателей не изменяются в пределах точности эксперимента. Факт отсутствия влияния времени экспозиции зародышей в растворе ДМСО

с учетом данных по влиянию концентрации ДМСО, а также переохлаждения и скорости охлаждения на исследуемый процесс можно объяснить только незначительной проницаемостью оболочки зародышей для воды и криопротектора. И, видимо, для установления равновесия процесса обезвоживания и насыщения зародыша криопротектором требуется время большее, чем 60 мин, что вызовет трудности, связанные с токсичностью криопротектора.

Прибавление в криозащитную среду, содержащую 10 % ДМСО, мембраноактивных веществ изменяет характер процесса внутриклеточной кристаллизации зародышей (табл. 3). Полипропиленгликоль-425, ПВП-12000, а также олеат аммония активируют процесс внутриклеточной кристалли-

Таблица 3

Влияние мембраноактивных веществ на процесс внутриклеточной кристаллизации зародышей выюна

Вещество, добавленное к 10% ДМСО	Концентрация мембраноактивного вещества, % (в/в)	Температура начала внутриклеточной кристаллизации, °С	Температура начала внутриклеточной кристаллизации, °С	Температура закристаллизования 50% зародышей, °С	Температура завершения внутриклеточной кристаллизации, °С	Количество незакристаллизовавшихся зародышей при -10 °С, %
Полипропиленгликоль-425	—	—5,3	—5,3	—6,5	—11,3	13
—»—	2,0	—5,2	—5,3	—6,0	—8,0	0
—»—	5,0	—5,1	—5,1	—6,0	—8,0	0
Поливинилпирролидон-12000	2,0	—5,2	—5,3	—5,6	—9,4	11
—»—	5,0	—5,2	—5,3	—5,4	—9,9	10
Полиэтиленоксид-1500	1,0	—5,3	—5,5	—6,0	—15,0	21
—»—	2,0	—5,6	—5,8	—6,7	—15,0	31
—»—	3,5	—5,0	—5,1	—5,3	—15,0	3,3
—»—	5,0	—5,5	—5,5	—5,6	—5,7	0
Олеат аммония	0,05	—5,1	—5,1	—5,6	—10,0	8
—»—	0,15	—4,9	—4,9	—5,4	—6,1	0

зации зародышей. ПЭО-1500 в диапазоне концентраций 1,0—3,5 % — замедляет этот процесс, при этом максимальное влияние проявляется при концентрации 2 % (при -10 °С остается незакристаллизованными 31 % зародышей, см. табл. 3).

Известно [3, 6], что вещества данного ряда могут адсорбироваться на поверхности мембраны или оболочки, а также способны растворяться в неполярных компонентах оболочки или мембраны. Первое можно оценить по величине их поверхностной активности на границе раздела вода —

Таблица 4

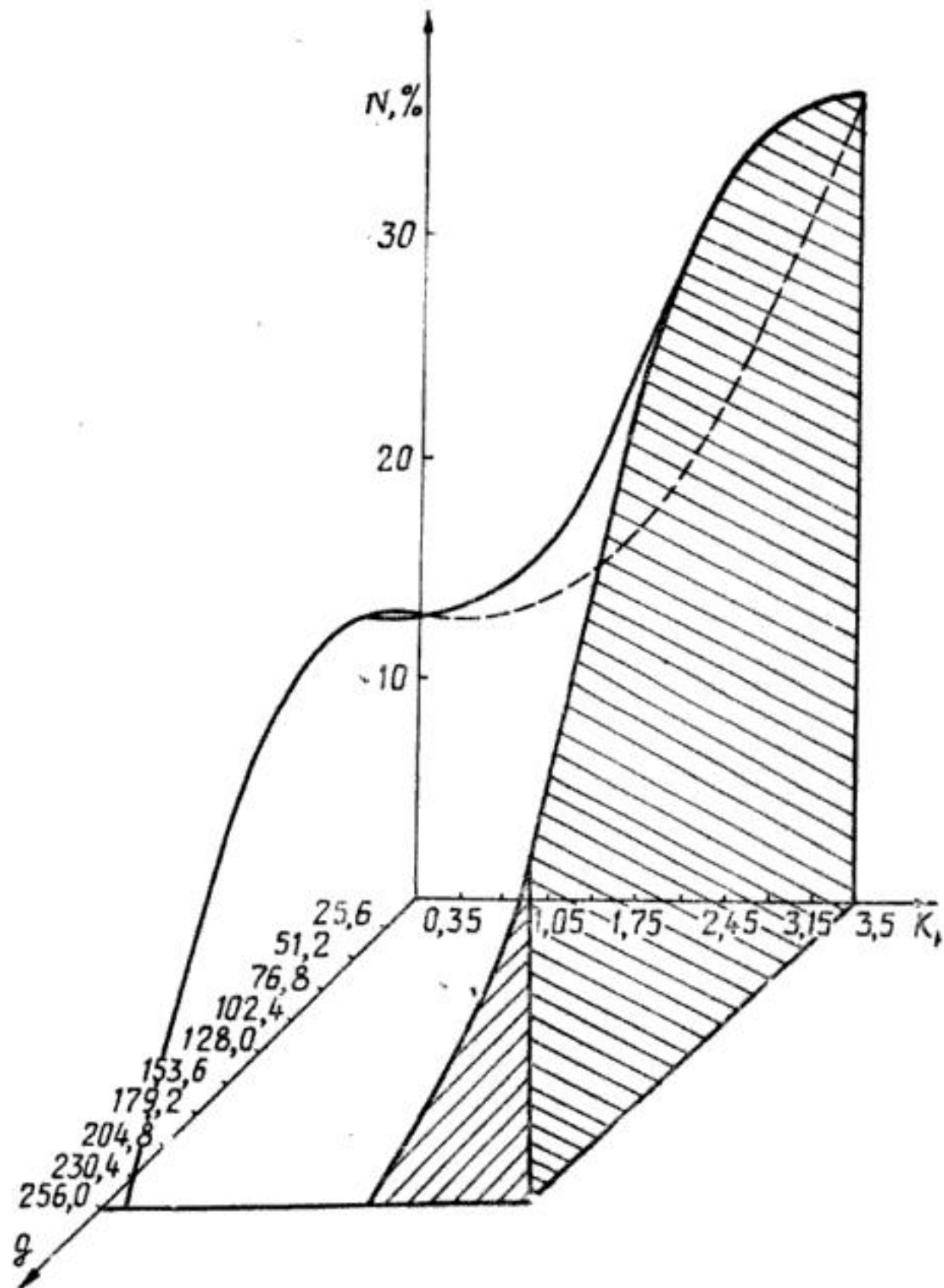
Физико-химические свойства мембраноактивных добавок к криозащитной среде

Вещество	Поверхностная активность на границе раздела фаз вода-гептан, г, эрг. см/г	Коэффициент распределения в системе вода-хлороформ, K_p
Полипропиленгликоль-425	256,0	2,10
Поливинилпирролидон-12000	159,0	0,004
Полиэтиленоксид-1500	183,0	3,50
Олеат аммония	180,0	0,89

неполярная фаза (г), второе — величиной коэффициента распределения в системе вода-неполярная фаза (K_p). При этом чем больше величины g и K_p , тем выше способность веществ к адсорбции и растворению в неполярных компонентах, соответственно. Однако влияние исследованных веществ на процесс внутриклеточной кристаллизации зародышей в зависимости от указанных свойств не так однозначно (табл. 3 и 4). Адсорбция

молекул вещества на оболочке или мембране зародыша способствует, с одной стороны, усилению их барьерных свойств, т. е. понижает вероятность инициирования внутриклеточного образования льда кристаллами внешнего льда, с другой стороны — уменьшает проницаемость оболочки для воды и криопротектора. Напротив, способность веществ растворяться в неполярных компонентах оболочки и мембраны зародыша приводит к ослаблению их барьерных свойств, но одновременно увеличивает проницаемость для воды и криопротектора [3,6]. Следовательно, способность веществ адсорбироваться на поверхности и растворяться в неполярных компонентах

Рис. 2. Зависимость вероятности внутриклеточной кристаллизации зародышей вьюна от поверхностной активности (g) и коэффициента распределения (K_p) исследованных мембраноактивных веществ (уравнение 1). N — количество незакристаллизовавшихся зародышей вьюна при -10°C , %



мембраны или оболочки зародышей, оцениваемые соответственно по величине g и K_p , могут приводить как к активации, так и к замедлению процесса внутриклеточной кристаллизации зародышей.

Методом множественной регрессии [7] получено уравнение зависимости вероятности внутриклеточной кристаллизации от поверхностной активности и коэффициента распределения исследованных веществ:

$$N = 13,0 + 22,4g - 41,8g^2 - 8,41K_p + 31,8 K_p^2 \quad (1),$$

где N — количество незакристаллизовавшихся зародышей вьюна при -10°C , %; g — поверхностная активность веществ на границе раздела фаз вода — гептан в эрг. см/г; K_p — коэффициент распределения веществ в системе вода — хлороформ. Модель адекватна при $p = 0,01$. На рис. 2 представлено графическое изображение полученной модели. Как видно из рис. 2, искомая зависимость величины N от указанных свойств изученных веществ носит сложный характер. В исследуемом интервале значений g

и K_p , вероятность процесса внутриклеточной кристаллизации зародышей вьюна увеличивается в присутствии веществ, свойства которых находятся в области $g \approx 200-250$ эрг. см / г и $K_p \approx 0,004-1,1$. Полипропиленгликоль-425, имеющий характеристики свойств, близкие к указанному сочетанию, действительно активизирует процесс внутриклеточной кристаллизации зародышей вьюна. Как следует из анализа уравнения (1) и рис. 2, наиболее благоприятное действие на исследуемый процесс оказывают вещества, поверхностная активность которых находится в области 50—100 эрг. см/г и одновременно коэффициент распределения на уровне 2,5—3,5. В присутствии веществ с таким сочетанием свойств следует ожидать 36 % незакристаллизовавшихся зародышей вьюна при -10°C . Ни одно из исследованных веществ такого сочетания g и K_p не имеет. Можно предположить, что вещества с $g = 50-70$ эрг. см/г и коэффициентом распределения 3,5 и выше будут максимально снижать вероятность внутриклеточной кристаллизации зародышей вьюна при их охлаждении. У веществ, имеющих g на уровне 200—250 эрг. см. /г и $K_p \approx 0,004-1,1$, более выражена способность адсорбироваться на поверхности оболочки зародыша или мембраны, следовательно, и способность повышать их барьерные свойства. Но это, как видим, не приводит к уменьшению вероятности внутриклеточной кристаллизации, напротив, данный процесс активизируется из-за понижения проницаемости оболочки зародышей для воды и криопротектора. Вещества, обладающие $g \approx 50-70$ эрг. см/г и $K_p \approx 3,5$, способны растворяться в неполярных компонентах оболочки или мембран зародышей, то есть изменять их проницаемость для воды в сторону повышения. Таким образом, можно предположить, что повышение проницаемости оболочки и мембран зародышей вьюна для воды и криопротектора имеет более существенное значение для снижения вероятности внутриклеточной кристаллизации, чем усиление их барьерных свойств.

Данные о влиянии концентрации ДМСО во внешней среде, времени экспозиции зародышей в ней, а также скорости охлаждения и степени переохлаждения внешней среды на процесс внутриклеточной кристаллизации зародышей вьюна при их охлаждении свидетельствует о незначительной скорости массового обмена «зародыши — внешняя среда». Это является серьезным препятствием для управления процессами кристаллизации внутри зародыша. Для максимального уменьшения вероятности внутриклеточного кристаллообразования в зародышах вьюна при их замораживании целесообразно использовать совокупность воздействий: медленная скорость охлаждения ($<0,6^\circ\text{C}/\text{мин}$); уменьшение степени переохлаждения во внешней среде, применение добавок мембраноактивных веществ, способствующих повышению проницаемости мембран и оболочки зародышей вьюна для воды и криопротектора. Рекомендуется применение мембраноактивных веществ со значениями $g \approx 50-70$ эрг. см/г и $K_p \geq 3,5$ в качестве перспективных ингибиторов внутриклеточной кристаллизации в криозащитной среде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вепринцев Б. Н., Новиков А. Н., Утешев В. К., Смолихина Т. И. Действие ДМСО и субнулевых температур на зародышей вьюна // Криобиология.— 1989.— № 2.— С. 16—21.
2. Костомарова А. А. Вьюн *Misgurnus fossilis* L. // Объекты биологии развития.— М.: Наука, 1975.— С. 308—323.
3. Кулешова Л. Г. Кинетика льдообразования в живых клетках и модельных системах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1983.— 24 с.
4. Кулешова Л. Г., Новиков А. Н. Влияние ряда факторов на процесс инициирования внутриклеточной кристаллизации // I Всесоюз. биофиз. съезд.— М., 1982.— Т. 2.— С. 4.
5. Нейфах А. А. Использование метода радиоактивной инактивации ядер для исследования их функций в раннем развитии рыб // Журн. общей биологии.— 1959.— Т. 20.— С. 202—213.

6. Новиков А. Н., Кулешова Л. Г., Розанов Л. Ф. К вопросу о внутриклеточной кристаллизации // Криобиология и криомедицина.— Киев: Наук. думка, 1980.— Вып. 6.— С. 45—49.

7. Стьюпер Э., Брюггер У., Джурс П. Машинный анализ связи химической структуры и биологической активности.— М.: Мир, 1982.— 253 с.

Ин-т биофизики РАН, г. Пущино;

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины

АН Украины, г. Харьков

Поступила 05.04.89

О. М. НОВИКОВ, Б. М. ВЕПРИНЦЕВ, В. К. УТЕШЕВ

Т. І. СМОЛІХІНА, Т. П. ЛІННИК

ВПЛИВ ПЕРЕОХОЛОДЖЕННЯ І КРІОПРОТЕКТОРІВ НА ВНУТРІКЛІТИННУ КРИСТАЛІЗАЦІЮ В ЗАРОДКАХ В'ЮНА

Інститут біофізики РАН, м. Пущино,

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

АН України, м. Харків

Вивчено вплив ступеня переохолодження, швидкість охолодження, концентрації ДМСО у позаклітинному середовищі, присутності в середовищі мембраноактивних речовин на внутріклітинну кристалізацію зародків в'юна. Показано, що для зменшення вірогідності внутріклітинної кристалізації зародків в'юна при їх заморожуванні доцільно використати сукупність впливів: повільну швидкість охолодження $< 0,6^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, зниження ступеня переохолодження в зовнішньому середовищі, застосування добавок мембраноактивних речовин, які сприяють підвищенню проникності мембран і оболонки зародків для води і кріопротектора.

A. N. NOVIKOV, B. N. VEPRINTSEV, V. K. UTESHEV, T. I. SMOLIKHINA,

T. P. LINNIK

THE EFFECTS OF SUPERCOOLING AND CRYOPROTECTANTS ON THE INTRACELLULAR CRYSTALLIZATION IN LOACH EMBRYOS

Institute of Biological Physics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences, Kharkov

The effects of supercooling extent, cooling rate, DMSO concentration inside the cell, and the presence of membrane active agents on the intracellular crystallization of loach embryos were studied. It has been shown that the combination of effects should be used to diminish the probability of intracellular crystallization in loach embryos on freezing, namely slow cooling $< 0.6^{\circ}\text{C}$, lesser extracellular supercooling, addition of membrane active compounds to increase the loach embryo permeability of membranes and envelope for water and cryoprotectants.

УДК 577.15:58.036

И. М. Савич

ТРАНСФОРМАЦИЯ УГЛЕВОДНЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ ИЗОПЕРОКСИДАЗ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ ПРИ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ

Изучены углеводные составляющие свободных и ионосвязанных изопероксидаз проростков кукурузы в норме и при гипотермии. Показано, что холодовой стресс изменяет углеводные компоненты изоферментов как в количественном, так и в качественном отношении. При этом происходит усиление корреляционной взаимосвязи между изоформами пероксидаз.

В проведенных ранее исследованиях было обнаружено, что холодовой стресс изменяет удельную активность [2], аминокислотный состав [3], сродство к донорам водорода [4] изоформ пероксидазы проростков кукурузы.

В связи с тем, что изменчивость отдельных изопероксидаз проростков может служить диагностическим критерием устойчивости растений к охлаждению [5], предпринято дальнейшее изучение свойств изоформ пероксидазы при холодовом воздействии.

Известно, что большинство пероксидаз растений содержит в своем составе углеводные остатки [6,7], однако неясно происходит ли трансформация углеводного состава отдельных изопероксидаз при гипотермии. Поэтому целью настоящей работы было изучение возможной изменчивости изопероксидаз — гликопротеидов при холодовом стрессе.

Материалом исследования служили самоопыленные линии кукурузы различной холодоустойчивости: Р 2306, Р 2325, Р 2327, Р 2328, 05349, 04731, ИК 184—2, ХЛГ 162 — холодоустойчивые; Р 2516, 0634, ВИР 26 ТВ, ХЛГ 142 — среднехолодоустойчивые; А672, 05394 — неустойчивые к холоду. Зерна проращивали в термостате в течение 7 суток при температуре 28 °С. У части проростков срезали листья и выделяли свободные и связанные пероксидазы последовательной экстракцией *трис*-глициновым буфером, *pH* 8,3, содержащим 30 % сахарозы, и 1 М раствором NaCl. Другую часть проростков помещали в холодильную камеру при температуре 8÷9 °С на 2 сут, а затем температуру снижали до 2÷3 °С [3] и после выдерживания при этой температуре в течение 2 сут выделяли пероксидазы из листьев, как описано выше.

Для разделения белков на гликозилированные и лишенные углеводных составляющих использовали методику с конканавалином А [1] в следующей модификации. После осаждения белков 80 % ацетоном и центрифугирования [3] осадок еще раз промывали 80 % ацетоном, подсушивали на воздухе и суспендировали в растворе конканавалина А, приготовленном в насыщенном растворе NaCl из расчета 2,5—3,0 мг лектина на 1 мг белка. После выдерживания 3,5—4,0 ч при комнатной температуре пробы центрифугировали при 4000 *g* в течение 10 мин. Надосадочную жидкость, представляющую негликозилированные белки, собирали, а осадок промывали 1 мл дистиллированной воды и растворяли в 100—200 мкл 1 М раствора глюкозы. Через 1 ч жидкость центрифугировали при 4000 *g* в течение 10 мин и отбирали надосадочную часть, содержащую пероксидазы — гликопротеиды. В отдельных опытах после осаждения белков конканавалином А осадок суспендировали в растворе, содержащем 1 М глюкозы и 1 М маннозы. После диализа против дистиллированной воды гликозилированные и негликозилированные белки лиофильно высушивали и, растворив в 30 % сахарозе, использовали для изоэлектрофокусирования (ИЭФ).

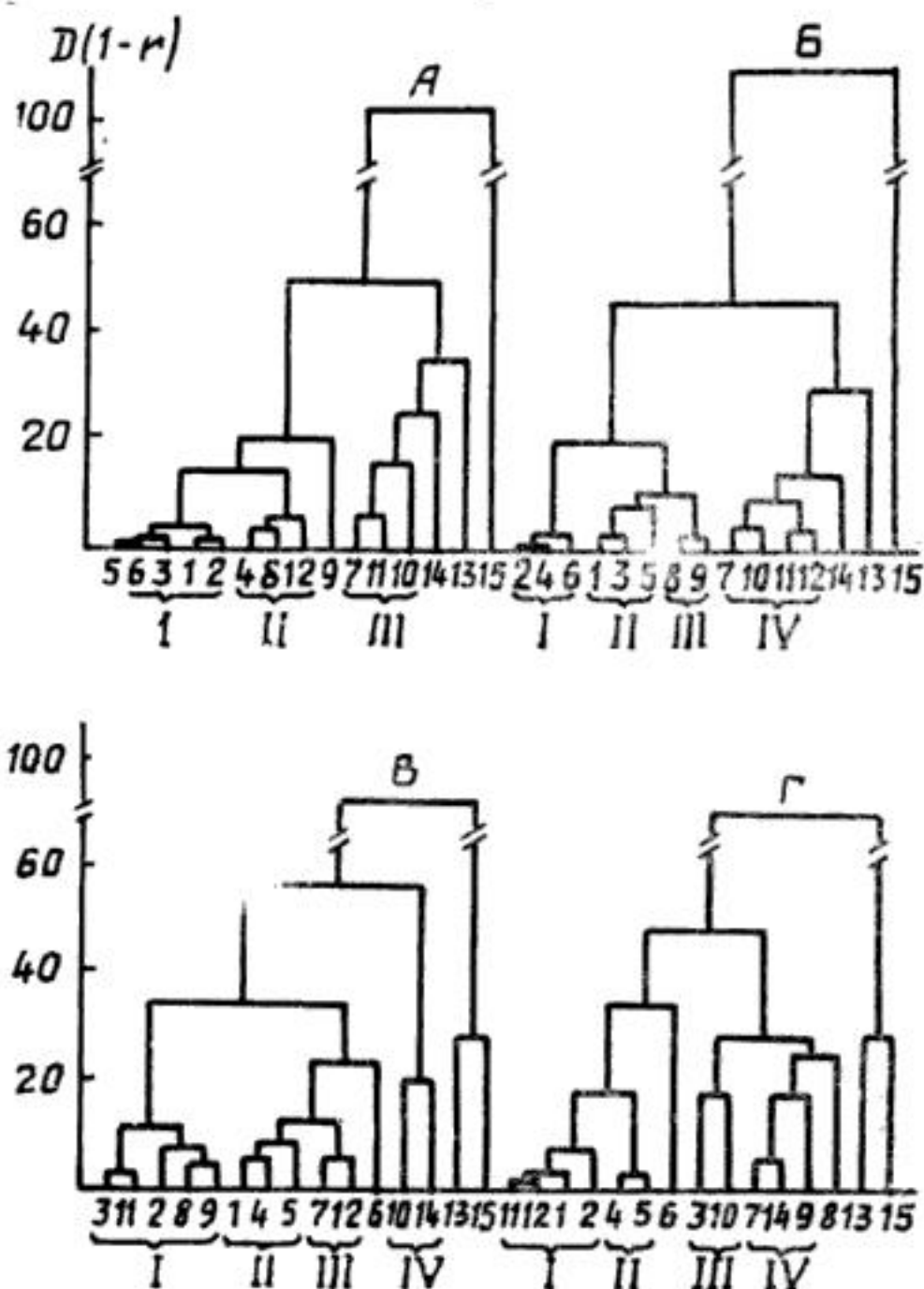
ИЭФ проводили в пластинках 5 % полиакриламидного геля, содержащего 2 % амфолинов с диапазоном *pH* 3,5—10,0 на приборе «Мультифор» фирмы «ЛКБ» (Швеция) [3]. Для идентификации изоэлектрических точек (ИЭТ) использовали смесь белков-маркеров с известными ИЭТ фирмы «Серва» (ФРГ). После завершения ИЭФ пероксидазы проявляли растворами солянокислого бензидаина и пероксида водорода с последующим сканированием гелей с помощью лазерного денситометра [4].

Относительное содержание изоферментов рассчитывали по площадям полученных пиков, приняв их сумму за 100 %. Эксперименты проводили в 3—4-кратной повторности. Обработку цифровых данных осуществляли на ЭВМ ЕС—1022 методом кластерного анализа по минимуму произведений $D(1-r)$, где D — евклидово расстояние, r — коэффициент корреляции.

Данный метод основан на принципе перевода в растворенное состояние пероксидаз, предварительно осажденных избытком конканавалина А, концентрированными растворами сахаров. Это позволяет получать различные фракции пероксидаз, содержащие как остатки глюкозы, так и остатки глюкозы и маннозы. Из литературных данных известно, что пероксидаза,

иммобилизованная на конканавалин А-сефарозе, хорошо смывалась 0,5 М раствором глюкозы [6]. В настоящем исследовании использована удвоенная концентрация глюкозы и маннозы.

Как показали результаты экспериментов, изоферментный состав свободной пероксидазы, содержащей остатки глюкозы, был несколько редуцирован по сравнению с суммарным препаратом. Последнее указывает на то, что не все изоформы пероксидазы содержали мономеры глюкозы. Основная ферментативная активность, по данным ИЭФ и лазерной денситометрии, была сосредоточена в зонах с ИЭТ от 3,9 до 5,7 и небольшая часть —



Дендрограммы самоопыленных линий кукурузы, построенные с учетом соотношения свободных изопероксидаз-гликопротеидов с остатками глюкозы (А, Б) и остатками глюкозы и маннозы (В, Г) по данным ИЭФ:

А, В — контроль; Б, Г — опыты после охлаждения;

1 — 04731, 2 — Р 2328, 3 — Р 2325, 4 — А 672, 5 — Р 2306, 6 — Р 2327, 7 — Р 2516, 8 — ВПР 26 ТВ, 9 — ИК 184-2, 10 — ХЛГ 142, 11 — 05394 с. 1302, 12 — ХЛГ 162, 13 — 05394 с. 1300, 14 — 0634, 15 — 05349; 1—15 — самоопыленные линии кукурузы; I—IV — выделившиеся кластеры

в щелочной области pH от 9,1 до 10,65. Группирование образцов по принципу сходства — различия изоформ пероксидазы с помощью одного из методов многомерной статистики привело к образованию трех кластеров (рисунк).

Наибольшее количество изоформ пероксидазы содержали образцы второго и третьего кластеров. После холодового воздействия на проростки резко изменялось соотношение изоферментов, что приводило к совершенно иной кластеризации образцов. При этом второй кластер включал только холодоустойчивые самоопыленные линии. Ни одна из линий кукурузы, составивших четыре кластера, не содержала изоформы пероксидазы с ИЭТ 7,2 и 8,3. Последнее свидетельствует о том, что изменение углеводного состава данных двух изоформ после холодового стресса было так велико, что линии, их содержащие, были выведены за пределы достоверных кластеров.

Разделение свободных пероксидаз, содержащих остатки глюкозы и маннозы, методом ИЭФ позволило выявить две новые изоформы с ИЭТ 8,8 и 9,2. Углеводные составляющие последних, очевидно, полностью лишены глюкозных мономеров и содержат, в основном, остатки маннозы. Кроме того, значительно увеличивалась доля кислых изоформ, что также свидетельствует о наличии маннозы в их составе. Математическая обработка данных по соотношению изопероксидаз-гликопротеидов с остатками глюкозы и маннозы приводила к образованию четырех кластеров. Первый

кластер содержал пять линий кукурузы, третий и четвертый — по две (рисунок).

После криостресса происходили существенные изменения в соотношении изопероксидаз и несмотря на то, что исследуемые образцы также группировались в четыре кластера, их состав был иной (рисунок). Несовпадение состава кластеров В и Г говорит в пользу того, что охлаждение приводит не только к количественным изменениям в содержании свободных изопероксидаз, но и к качественной трансформации их углеводных компонентов.

Корреляционный анализ содержания свободных изоформ пероксидазы и изоформ-гликопротеидов позволил выявить достоверную взаимосвязь между группой щелочных изоферментов суммарного препарата и кислыми изопероксидазами-гликопротеидами с остатками глюкозы, а также между изоформами с остатками глюкозы и маннозы с ИЭТ 7,2—8,8 и некоторыми изопероксидазами, содержащими остатки глюкозы (учитывались только коэффициенты корреляции 0,7 и выше). Холодовый стресс, как показано выше, изменял соотношение изопероксидаз-гликопротеидов, что приводило к изменению коэффициентов корреляции между ними. При этом количество высоких коэффициентов корреляции становилось намного большим. Усиливалась взаимосвязь между щелочными (ИЭТ 8,3, 9,2 и 10,65), нейтральными (ИЭТ 7,2) и кислыми (ИЭТ 3,5, 4,1 и 5,0) изоформами с остатками глюкозы и маннозы, с одной стороны, и щелочной группой суммарного препарата и изопероксидазами, содержащими мономеры глюкозы, с другой.

ИЭФ ионосвязанных пероксидаз-гликопротеидов показало их больший полиморфизм по сравнению со свободными. Так, у пероксидаз, содержащих остатки глюкозы, проявлялась дополнительная ферментативная активность в зонах с ИЭТ 7,8; 9,4; 9,7; 10,0 и 10,2. Однако отсутствовали изоформы, свойственные свободной фракции с ИЭТ 3,5; 5,7; 7,2 и 8,3 (таблица).

Математическая обработка данных по соотношению изоферментов сгруппировала образцы в три кластера в опытах без охлаждения и в пять—

Таблица 1

Кластеризация самоопыленных линий кукурузы по соотношению ионосвязанных изопероксидаз-гликопротеидов листьев 7-дневных проростков

Класте- ры ИЭТ	С остатками глюкозы									С остатком глюкозы и маннозы								
	Контроль			После охлаждения						Контроль				После охлаждения				
	I	II	III	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	I	II	III	IV	V	
3,3	4,7	7,2	9,7	5,0	0	5,4	8,4	9,4	2,6	4,8	4,5	0,5	2,6	0	4,4	2,1	1,6	
3,9	8,5	20,3	4,3	10,7	10,0	11,7	8,7	13,7	6,4	3,1	15,4	6,8	5,6	6,8	9,2	14,8	6,4	
4,1	20,6	11,3	17,9	17,5	13,6	8,9	6,9	0	7,7	10,9	7,5	9,5	9,4	13,8	7,2	11,7	4,4	
4,3	19,7	20,3	12,0	20,6	33,4	17,2	10,7	13,1	3,6	6,7	16,5	8,0	15,9	17,5	12,9	8,3	7,1	
5,0	0	0	9,3	0	0	0	2,9	0	0	17,7	0	16,9	8,5	0	0	0	0	
5,1	24,2	10,8	10,0	23,1	11,3	12,0	4,9	11,5	23,3	3,9	13,2	2,7	4,6	27,6	14,6	10,9	13,1	
6,5	0	4,4	7,3	0	15,4	7,6	0	0	2,4	0	0	7,7	7,8	0	0	0	18,0	
7,2	—	—	—	—	—	—	—	—	3,1	0	0	0	0	0	0	1,2	0	
7,8	4,9	5,5	4,7	2,4	0	2,3	6,0	8,9	5,1	8,3	1,9	0	7,7	1,1	10,4	3,4	4,0	
8,3	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	3,4	
8,8	0	3,7	3,6	0	0	4,1	1,6	0	0,4	9,9	0	0	3,7	0	0	0	7,1	
9,1	3,6	4,5	0	0	0	3,8	20,8	5,0	9,2	0,3	4,1	0	5,1	0	4,1	25,9	3,3	
9,2	7,1	3,1	7,4	0	6,4	2,7	4,9	0	1,5	10,4	7,8	28,3	18,9	33,3	10,3	0	4,6	
9,4	0	5,8	3,0	2,5	0	2,2	7,1	9,0	9,6	0	6,2	2,7	4,5	0	9,5	3,8	8,0	
9,7	13,7	4,5	5,9	15,8	4,3	5,4	6,0	5,6	12,3	1,7	4,4	5,3	3,9	0	8,7	4,3	7,7	
10,0	4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,1	0	0	0	5,0	0	0	
10,2	0	0	14,5	0	2,3	0	0	0	0	0	0	5,2	3,5	0	0	0	0	
10,65	0	17,9	25,3	2,4	3,3	16,5	11,0	8,6	12,7	21,6	15,4	6,4	15,4	0	10,4	12,2	12,1	

в опытах после охлаждения проростков (таблица). В последнем случае холодный стресс, изменив соотношение связанных изопероксидаз, способствовал более тонкой дифференциации линий по степени сходства и различия изоферментных спектров. Основная доля ферментативной активности приходилась на кислую группу с ИЭТ 3,9—5,1, а также на щелочную с ИЭТ 9,1—10,65, что свидетельствовало о наибольшей гликозилированности этих изопероксидаз.

Анализ изоферментного состава пероксидаз, содержащих остатки глюкозы и маннозы, позволил выявить две дополнительные изоформы у отдельных образцов кукурузы с ИЭТ 7,2 и 8,3, что указывает на отсутствие в составе данных изопероксидаз остатков глюкозы (таблица). Математическая обработка данных по соотношению изопероксидаз ионносвязанной фракции в опытах без охлаждения сгруппировала самоопыленные линии в четыре кластера, а после охлаждения проростков — в пять. Из таблицы видно, что распределение ферментативной активности отдельных изоформ пероксидазы по кластерам было неравнозначно и имелись значительные отличия в опытах с охлаждением по сравнению с контролем. Последнее указывает на то, что так же, как и у свободной фракции, холодный стресс оказывал значительное влияние на углеводный состав ионносвязанных пероксидаз.

Результаты корреляционного анализа выявили тесную взаимосвязь между группой ионносвязанных щелочных изоформ, содержащих остатки глюкозы и маннозы с ИЭТ 9,2—10,0, с кислыми изопероксидазами (ИЭТ 4,1; 4,3; 6,5), в состав которых входили только остатки глюкозы. После холодного стресса количество высоких коэффициентов корреляции (0,7 и выше) значительно возрастало. При этом обнаружена тесная взаимосвязь кислых изоформ суммарного препарата ионносвязанной фракции с кислыми и нейтрально заряженными изоферментами, содержащими мономеры глюкозы и маннозы. Кроме того, значительно усиливалась взаимосвязь между щелочными изопероксидазами с остатками глюкозы и изоформами, содержащими глюкозу и маннозу.

Из представленных результатов можно заключить, что большинство свободных и ионносвязанных изопероксидаз проростков кукурузы являются гликопротеидами. В их состав входят в различных соотношениях остатки глюкозы и маннозы. С помощью лазерной денситометрии и кластерного анализа показано, что холодный стресс существенно изменяет углеводный состав изоформ пероксидазы как в количественном, так и в качественном отношении. Последнее является, по-видимому, следствием изменения метаболических процессов в клетках, связанных с изменением активности специфических ферментов углеводного обмена. Результатом этого являются пострепликационные изменения углеводных компонентов изопероксидаз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Головацкий И. Д., Савчик Б. А. Применение конканавалина А для выделения гликопротеинов и их электрофоретического разделения параллельно с другими белками // Биополимеры и клетки. — 1987. — 3, № 3. — С. 137—139.
2. Савич И. М., Тажибаева Т. Л., Перуанский Ю. В. Удельная активность изопероксидаз проростков кукурузы и пшеницы в условиях температурного стресса // Физиология и биохимия культ. растений. — 1988. — 20, № 2. — С. 128—133.
3. Савич И. М. Аминокислотный состав щелочных изопероксидаз кукурузы при действии низкотемпературного стресса // Прикладная биохимия и микробиология. — 1989. — 25, № 5. — С. 634—643.
4. Савич И. М. Трансформация сродства изопероксидаз проростков кукурузы к донорам водорода при гипотермии // Известия АН Каз. ССР. Серия биол. — 1989. — № 2. — С. 16—22.
5. Савич И. М., Перуанский Ю. В. Биохимическое обеспечение диагностики криоустойчивости зерновых // Физиология и биохимия культ. растений. — 1990. — 22, № 1. — С. 13—19.

6. *Hendriks T., Berg B. M., Schram A. W.* Cellular location of peroxidase isoenzymes in leaf tissue of *Petunia* and their affinity for concanavalin A-Sepharose // *Planta*.— 1985.— 164, № 1.— P. 89—95.
7. *Robertis E., Kutchan T., Kolattukudy P. E.* Cloning and sequencing of cDNA for a highly anionic peroxidase from potato and the induction of its RNA in suberizing potato tubers and tomato fruits // *Plant Mol. Biol.*— 1988.— 11, № 1.— P. 15—26.

Казахский НИИ земледелия
им. В. Р. Вильямса, п. Алмалыбак,
Алма-Атинская обл.

Поступила 28.05.90

I. M. САВИЧ

ТРАНСФОРМАЦІЯ ВУГЛЕВОДНИХ СКЛАДНИКІВ ІЗОПЕРОКСИДАЗ ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ ПРИ ХОЛОДОВОМУ СТРЕСІ

Казахський НДІ землеробства ім. В. Р. Вільямса,
сел. Алмалибак Алма-Атинської обл.

Вивчено вуглеводні складові вільних та іонозв'язаних ізопероксидаз проростків кукурудзи в нормі і при гіпотермії. Показано, що холодний стрес змінює вуглеводні компоненти ізоферментів як у кількісному, так і в якісному відношенні. При цьому відбувається посилення кореляційного взаємозв'язку між ізоформами пероксидаз.

I. M. SAVICH

TRANSFORMATION OF CARBOHYDRATE COMPONENTS OF ISOPEROXIDASES OF MAIZE SEEDLINGS UNDER THE COLD STRESS

V. R. Williams Kasakh Research Institute for Agriculture, settlement
of Almalybak, the Alma-Ata Region

Carbohydrate components of free and ion-bound isoperoxidases of maize seedlings were studied under normothermic and hypothermic conditions. Cold stress has been demonstrated to change carbohydrate components of isoenzymes both quantitatively and qualitatively. The enhancement of correlation interrelationship between isoperoxidases was observed.

УДК 612.014.43:612.119

А. А. Шаравара, С. В. Цвиренко, А. П. Ястребов

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ХОЛОДА НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ КРОВИ КРАСНОЙ ПОЛЕВКИ ДВУХ ПОПУЛЯЦИЙ, ОБИТАЮЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ КЛИМАТО- ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ЗОНАХ

В экспериментах на животных широко распространенного вида красная полевка, обитающих в различных климато-географических зонах, изучены реакции эритронов и потребления кислорода при действии холода. Обнаружены особенности состояния периферической крови и пролиферативных процессов в костном мозге, обеспечивающие более высокую реактивность северных представителей вида при воздействии низкой температуры.

Низкие температуры, воздействуя на организм животных и человека, вызывает существенные сдвиги большинства физиологических констант, в том числе и показателей системы крови, которая отражает не только развитие адаптивных процессов, но и возникающие патологические изменения. Для экспериментального изучения реакций системы крови на

действие холода обычно используются различные лабораторные животные — мыши, крысы, кролики. Однако моделирование охлаждения на таких животных не позволяет выявить участие эволюционно выработанных и закрепленных адаптивных механизмов [9] в реактивности системы крови при действии данного экстремального фактора. В связи с этим представляет интерес исследование не только узкоспециализированных, обитающих исключительно в условиях Крайнего Севера, видов [10], но и широко распространенных в направлении север — юг. Под влиянием различных климатических условий внутри вида формируются популяции с существенно различной степенью адаптированности к холоду. В настоящей работе использованы дикие животные — представители вида *Clethrionomys rutilus* — красная полевка [2, 3] с полуострова Ямал и из Курганской области. Первые, обитая в регионе с преимущественно низкими температурами, обладают более совершенными адаптивными реакциями на холод, чем вторые [8,9].

Целью исследования явилось выяснение внутривидовых популяционных особенностей морфофункционального состояния эритрона и обмена веществ, а также их изменения под влиянием холода.

Отловленных в августе — сентябре 1988 года животных перевозили в г. Свердловск и до экспериментов выдерживали в течение 2 мес. в виварии при 18 °С и достаточной по калорийности и составу диете. В работе использовали 3—4-месячных самцов. В эксперименте полевок изучаемых популяций содержали в климатокамере VT-1000 (ГДР) с щелочным поглотителем избытка влаги и углекислоты при 0 °С в течение двух недель. Ежедневно исследовали общее потребление кислорода животными при 20 °С с помощью газоанализатора МН-51-30. Общепринятыми методами изучали гематологические показатели периферической крови и костного мозга. Для более полной оценки гемопоэза использовали расчетные показатели: индекс созревания эритробластов — отношение полихроматофильных и оксифильных нормоцитов ко всем клеткам эритроидного ряда; соотношение лейко: эритро — отношение количества элементов лейкопоэза к числу элементов эритроидного ростка [6]. Методом радиоавтографии *in vivo* с ³H-тимидином (удельная активность 890 КБк/моль) исследовали пролиферативную активность миелокариоцитов [4]. Вычисляли абсолютное содержание в бедре эритрокариоцитов, находящихся в S-фазе, т. е. синтезирующих ДНК, а также индекс метки на способные к делению эритроидные клетки — процентное содержание клеток, находящихся в S-фазе среди эритробластов, пронормоцитов и базофильных нормоцитов.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью параметрических методов [5], реализованных на миниЭВМ «Электроника ДЗ-28».

При изучении эволюционно выработанных адаптивных реакций со стороны системы крови на действие холода несомненный интерес представляет сравнительная характеристика гематологических показателей интактных животных. Так, у северной популяции полевок достоверно выше показатели содержания гемоглобина: $(156,6 \pm 3,7)$ г/л против $(146,6 \pm 1,7)$ г/л, и эритроцитов: $(10,63 \pm 0,45)$ Т/л против $(9,16 \pm 0,48)$ Т/л у полевок из Курганской области. При этом показатели осмотической резистентности эритроцитов, изученные по проценту клеток, выдержавших гемолиз, были также выше у северных представителей вида, соответственно $(0,61 \pm 0,10)$ % против $(0,28 \pm 0,02)$ % в 0,4 %-ном гемолизирующем растворе хлорида натрия ($p < 0,05$) и $(18,02 \pm 4,85)$ % против $(11,83 \pm 2,10)$ % в 0,5 %-ном растворе. Вместе с тем при обнаруженных особенностях периферической крови у северных представителей вида наблюдаются более низкие показатели пролиферации в эритроидном ростке костного мозга (табл. 1,2).

Представленные результаты свидетельствуют, что различия в условиях обитания, связанные в основном с температурным режимом [11], су-

Таблица 1

Эритрограмма полевок из различных климато-географических зон

Показатель	n	Животные с п-ва Ямал	Животные из Курганской обл.
Ретикулоциты*, $\times 10^{10}/л$	8	$14,31 \pm 0,35$	$23,90 \pm 2,39$
Миелокариоциты*, $\times 10^6/бедро$	8	$7,19 \pm 0,64$	$9,55 \pm 0,40$
Эритроидный росток костного мозга*, $\times 10^6/бедро$	8	$1,91 \pm 0,19$	$2,44 \pm 0,14$
Способные к делению клетки эритроид- ного ростка костного мозга, $\times 10^6/бедро$	10	$0,71 \pm 0,13$	$0,79 \pm 0,09$
Индекс созревания эритробластов*	8	$0,63 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,02$
Соотношение лейко:эритро*	8	$3,23 \pm 0,28$	$2,51 \pm 0,12$

Знаком * отмечены показатели, имеющие статистически достоверные различия между группами.

Таблица 2

Пролиферативная активность эритроидного ростка костного мозга по данным авторадииграфии с 3H -тимидином

Показатель	Полевки с п-ва Ямал		Полевки из Курганской обл.	
	Интакт	14 сут охлаждения	Интакт	14 сут охлаждения
Абсолютное содержа- ние эритроидных кле- ток в S-фазе, $\times 10^6/бедро$	$1,54 \pm 0,06$	$3,88 \pm 0,41^{**}$	$2,32 \pm 0,31^*$	$1,61 \pm 0,23$
Индекс метки на спо- собные к делению эритроидные клетки, %	$28,05 \pm 2,50$	$49,28 \pm 4,78^{**}$	$46,05 \pm 7,25^*$	$43,01 \pm 10,31$

Примечание: * — различия статистически достоверны между интактными животными из различных климато-географических зон, ** — различия статистически достоверны в сочетании опыт — контроль.

щественно сказываются на эритроидном кроветворении. При этом формируется различное морфофункциональное состояние эритрона, характеризующееся смещением эритроцитарного равновесия в сторону его повышения у северных животных. Последнее обеспечивается за счет большей резистентности эритроцитов к разрушающим факторам и увеличения скорости созревания клеток эритроидного ростка костного мозга. Обнаруженные особенности имеют исключительно важное приспособительное значение. Поддержание более высокого уровня эритроцитов при большей скорости созревания клеток и меньшей пролиферативной активности эритрокариоцитов обеспечивает, по-видимому, большую реактивность эритрона у северных животных, что может реализоваться в условиях Заполярья, где формируется своеобразный гипоксический синдром [1], требующий активации кислородтранспортной функции крови. Таким образом проявляется характерная и для других тканей большая экономичность функционирования систем у обитателей Севера [7]. Последнее положение подтверждает обнаруженный нами более низкий исходный уровень потребления кислорода северными животными, а более высокую реактивность функциональных систем — динамика его изменения при холодовом воздействии (рис. 1).

Холодовое воздействие на животных с различным уровнем закрепленной адаптации к данному фактору внешней среды выявляет и ряд особен-

ностей в реагировании эритрона. Под влиянием низкой температуры у животных из средней полосы на 3 сутки воздействия снижается содержание эритроцитов на 11,0 % ($p < 0,05$) и увеличивается содержание гемоглобина на 9,4 % ($p < 0,05$), что может быть связано с развитием гемолиза и сгущением крови. На 14 сутки действия холода эти показатели возвращаются к исходному уровню. У северной популяции животных в исследуемые сроки наблюдаются незначительные, статистически недостоверные колебания содержания гемоглобина и эритроцитов. При этом в периферической крови северных полевок растет осмотическая резистентность эритроцитов в 0,46 % растворе хлорида натрия на 68 % ($p < 0,05$) без ее достоверных изменений в 0,4% и 0,5 %-ных растворах. У животных из средней полосы осмотическая резистентность эритроцитов в 0,4 %-ном гемолизирующем растворе хлорида натрия существенно не меняется, превышая исходный уровень на 10,7 %, а в 0,46 % и 0,5 %-ных растворах снижается соответственно на 67,6 % и на 29,0 %. Изменения эритропоэза под влиянием холода представлены на рис. 2 и в табл. 2. У северных животных признаки стимуляции эритропоэза, обнаруживаемые на 3 сут воздействия, усиливаются к исходу двух недель содержания в холоде. Полевки из средней полосы реагируют иначе: в исследованные сроки не наблюдается признаков стимуляции эритропоэза, а по ряду параметров видна тенденция к его понижению. Однако, суммируя данные, можно предположить, что волна пролиферации в эритроэне животных из средней полосы также имеет место, но является менее длительной, начинается после 3 сут и заканчивается до 14 сут действия холода.

Представленные результаты свидетельствуют о различной реакции изучаемых популяций красной полевки на действие низкой температуры.

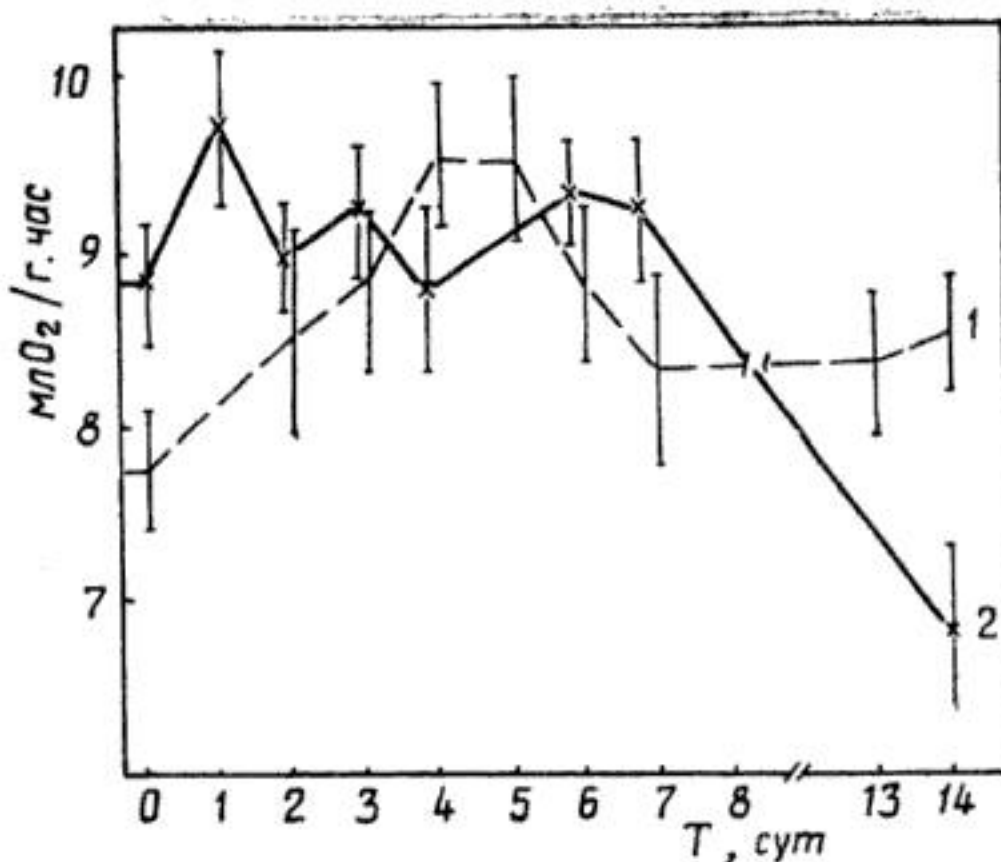


Рис. 1. Динамика потребления кислорода красной полевкой при действии холода: 1 — животные северной популяции; 2 — животные средней полосы

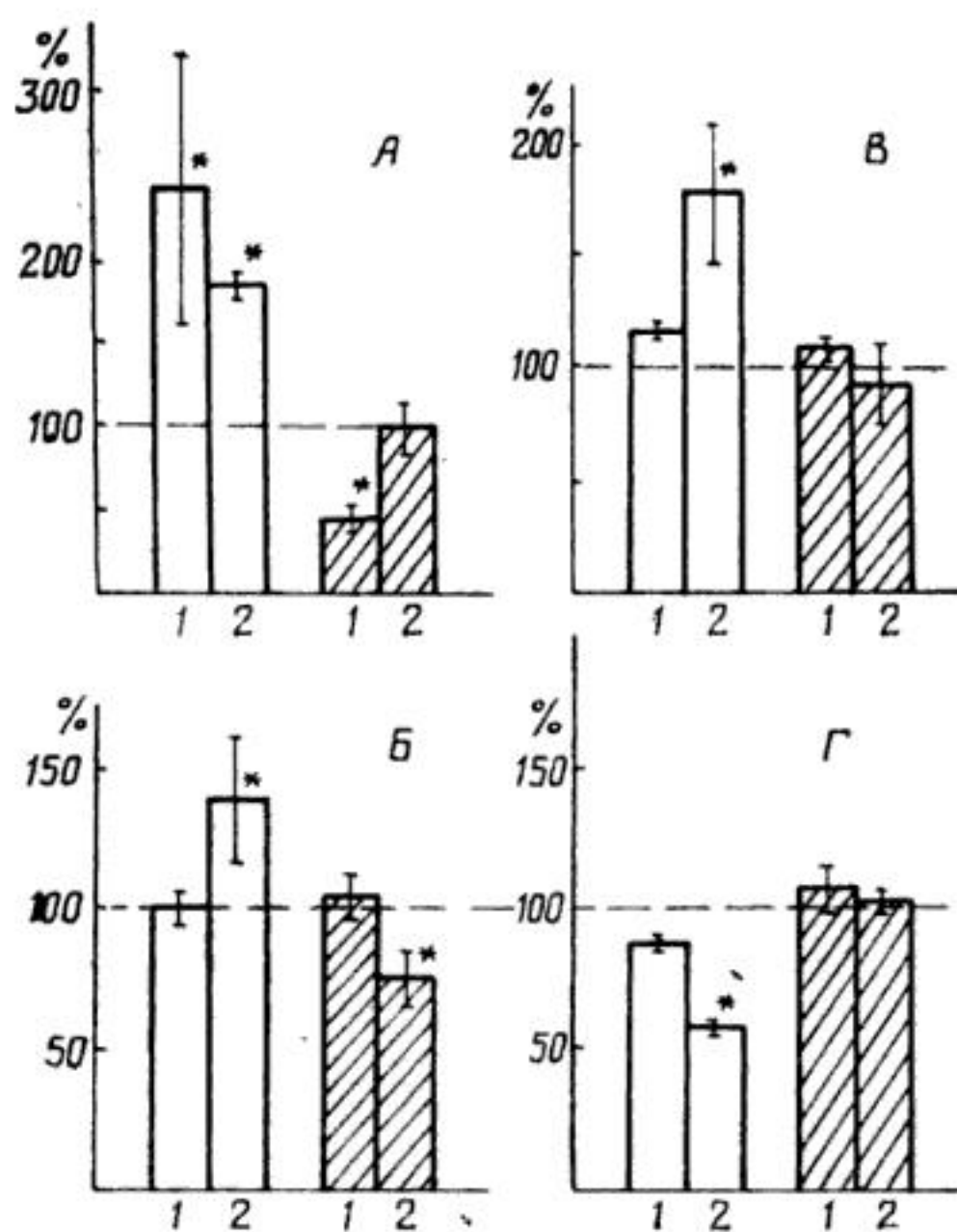


Рис. 2. Изменение показателей гемопоэза красной полевки при действии холода в процентах к исходному уровню. Светлые столбики — северные животные, темные — животные из средней полосы. Длительность охлаждения: 1 — 3 сут, 2 — 14 сут. А — ретикулоциты, г/л; Б — миелокариоциты, 10^6 /бедро; В — эритроидный росток костного мозга, 10^6 /бедро; Г — лейкоэритро

У северных животных обнаруживаются адаптивные сдвиги, проявляющиеся в экономизации метаболизма и, соответственно, оптимизации эритропоеза, что обеспечивает более выраженные реактивные сдвиги в ответ на действие специфического в данных условиях фактора — холода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авцын А. П., Марачев А. Г., Матвеев Л. Н. Циркумпольный гипоксический синдром // Вестн. АМН СССР.— 1979.— № 6.— С. 32—39.
2. Бородин П. А. Гематологическая и цитохимическая характеристика сибирской красной полевки, обитающей в горно-лесном поясе Северного Урала // Экология и охрана горных видов млекопитающих: Материалы III Всесоюз. школы (Нальчик, окт. 1984). М., 1987.— С. 32—33.
3. Громов И. М., Поляков И. Я. Полевки (*Microtinae*). Фауна СССР. Млекопитающие.— Т. 3, вып. 8.— Л.: Наука, 1977.— 254 с.
4. Епифанова О. И., Терских В. В., Захаров А. Ф. Радиоавтография.— М.: Высшая школа, 1977.— 246 с.
5. Закс Л. Статистическое оценивание.— М.: Статистика, 1976.— 586 с.
6. Кост Е. А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования.— М.: Медицина, 1968.— 436 с.
7. Кривошеев В. Г., Бурмакин В. Н. О направлениях адаптации субарктических полевок // Видовые и природно-климатические адаптации организма животных. Физиологогенетические исследования: Реф. докл. III Всесоюз. совещания по экологической физиологии, биохимии и морфологии.— Новосибирск, 1967.— С. 58—61.
8. Кривошеев В. Г., Бурмакин В. Н. Об основных направлениях морфофизиологических адаптаций субарктических полевок // Вопр. эволюционной и популяционной экологии животных: Тр. Ин-та экологии растений и животных УФАИ СССР.— Свердловск, 1969.— Вып. 71.— С. 138—148.
9. Кривошеев В. Г., Бурмакин В. Н. Изменчивость адаптивных морфофизиологических признаков полевок с широкими и узкими ареалами // Биологические проблемы Севера.— 1971.— Вып. 42.— С. 5—36.
10. Кривошеев В. Г., Уманцева Н. Д. Эколого-физиологические исследования сибирского и копытного леммингов // Экология полевок и землероек на северо-востоке Сибири.— Владивосток, 1979.— С. 50—68.
11. Марачев А. Г. Эритропоез и его регуляция у жителей Севера // Физиология человека.— 1977.— 3, № 6.— С. 1046—1049.

Свердловский гос. ордена Трудового
Красного Знамени мед. ин-т

Поступила 07.12.89

А. А. ШАРАВАРА, С. В. ЦВІРЕНКО, О. П. ЯСТРЕБОВ
ВИВЧЕННЯ ДІЇ ХОЛОДУ НА СТАН СИСТЕМИ КРОВІ
ЧЕРВОНОЇ ПОЛІКИ ДВОХ ПОПУЛЯЦІЙ, ЯКІ ЗНАХОДЯТЬСЯ
В РІЗНИХ КЛІМАТО-ГЕОГРАФІЧНИХ ЗОНАХ

Свердловський державний медичний інститут

В експериментах на тваринах широко розповсюдженого виду червона полівка, які знаходяться в різних клімато-географічних зонах, вивчені реакції еритрона і споживання кисню при дії холоду. Виявлені особливості стану периферичної крові і проліферативних процесів у кістковому мозку, які забезпечують більш високу реактивність північних представників виду при впливі низької температури.

A. A. SHARAVARA, S. V. TSVIRENKO, A. P. YASTREBOV
THE INVESTIGATION OF COLD EFFECT ON THE STATE OF BLOOD
SYSTEM OF TWO POPULATIONS OF *CLETHRIONOMYS RUTILUS*
INHABITING VARIOUS CLIMATIC AND GEOGRAPHIC ZONES

Order of the Red Banner of Labour Medical Institute of Sverdlovsk

Erythron reactions and oxygen consumption in *Clethrionomys rutilus*, a widely spread species inhabiting various climatic and geographical zones, were studied at low temperatures. Some peculiarities have been revealed in the state of peripheral blood and proliferative processes of bone marrow responsible for the higher reactivity of Northern species at low temperatures.

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ООЦИТОВ И ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

В работе представлен обзор исследований, посвященных проблеме криоконсервирования эмбрионов и яйцеклеток человека. На основании обобщения данных, полученных учеными ведущих центров мира, авторы статьи описывают механизмы криоповреждения и криозащиты. Подчеркивается значимость стадии развития эмбрионов и вида криопротектора, режима криоконсервирования и отогрева для эффективности криоконсервирования. Убедительно показано, что использование криоконсервированных эмбрионов повышает успех экстракорпорального оплодотворения.

В последнее десятилетие для лечения бесплодия получил широкое распространение метод оплодотворения *in vitro* (ОИВ). Суть метода заключается в том, что ооцит получают путем пункции преовуляторных фолликулов, культивируют *in vitro*, инсеминируют спермой мужа и после дробления эмбрион трансплантируют в матку пациентки.

Несмотря на достигнутые успехи, даже в ведущих центрах мира частота наступления беременности не превышает 12—13 %. Большинство исследователей объясняют неудачи в программе ОИВ десинхронизацией стадий развития эмбриона и эндометрия.

При гистологическом исследовании эндометрия была показана [16] асинхронность его созревания на день эмбриотрансплантации. Эндометрий может задерживаться в развитии, быть нормальным или опережать степень развития, достигнутую на день введения человеческого хорионического гонадотропина (ЧХГ). Решением проблемы, вероятно, может быть использование консервированных эмбрионов, которые можно трансплантировать в полость матки в последующем, наиболее приемлемом менструальном цикле пациентки.

Несмотря на относительно небольшое количество исследований, целью которых была разработка методов консервации эмбрионов, авторы их высказывают однозначное мнение о том, что наиболее перспективным является метод криоконсервирования.

С целью повышения эффективности ОИВ, как правило, проводится стимуляция овуляции для получения большего количества ооцитов. Часть из них может быть использована в программе ОИВ, а часть можно криоконсервировать, хранить и использовать для оводонации в последующие менструальные циклы. Перенос донорских ооцитов, оплодотворенных *in vitro*, в эндометрий реципиентки расширяет возможности использования технологии ОИВ в состояниях, когда женские гаметы отсутствуют, в случаях недостаточной функции яичников, наличии препятствий для получения ооцитов или генетической патологии гамет. Криоконсервированные ооциты могут быть также использованы для диагностики оценки взаимодействия спермий — ооцит, для выяснения причин бесплодия на клеточном уровне, при тестировании оплодотворяющей способности гамет у пар, когда не наступала беременность в естественных циклах или когда попытки оплодотворения не удавались при инсеминации спермой мужа.

Хотя ооцит-донация медицински аналогична добации спермы, относительная недоступность женских гамет и трудность процесса синхронизации овуляции у донора со зрелостью эндометрия реципиентки делают проблему донации яйцеклетки существенно сложнее донации спермиев.

Убедительно показано [11], что использование криоконсервированных эмбрионов повышает успех ОИВ. По имеющимся данным [11], в 1985 г. в мире насчитывалось 13 групп из 36, использовавших в программе ОИВ

криоконсервирование. Только 3 группы подвергли криоконсервации неоплодотворенные ооциты и оплодотворяли их после отогрева. В 10 центрах криоконсервировали эмбрионы, причем в 7 — на стадии 2—8 бластомеров, в остальных — на стадии бластоцисты. Криопротектор ДМСО применяли в 6 центрах, глицерол — 3, 1, 2—пропандиол — 4. В настоящее время число таких групп многократно увеличилось.

Выживаемость эмбрионов и яйцеклеток при криоконсервации зависит от скорости охлаждения, вида криопротектора и способа отогрева [19, 21]. При охлаждении клеток до субнулевых температур лед образуется вначале в окружающей среде, в результате чего клетка сильно переохлаждается, что приводит к формированию различных по величине потенциалов между внеклеточными и внутриклеточными растворами. Если затем клетка до более низких температур охлаждается медленно, то при транспорте внутриклеточной воды разница химических потенциалов уменьшается [21]. При охлаждении клетки с более высокой скоростью недостаточно времени для того, чтобы клетка сохранила осмотическое равновесие путем выхода воды. В таком случае внутриклеточное содержимое начнет переохлаждаться при субнулевых температурах до тех пор, пока не уравновесятся химические потенциалы за счет внутриклеточного образования кристаллов льда.

При медленном замораживании имеется достаточно времени для постепенной дегидратации в ответ на градиент осмотического давления, возникающего в процессе замораживания, чего нет при быстром замораживании. Установлено [33], что внутриклеточное образование льда в яйцеклетках мыши происходит интенсивно при температуре от -40 до -45 °C. При этом выживаемость клеток значительно выше, если охлаждение до -50 °C вести очень медленно ($0,2-0,5$ °C/мин) при быстром последующем замораживании до -196 °C. Криомикроскопические данные [33] подтвердили, что при температурах выше -50 °C в яйцеклетках содержится еще достаточно воды для образования внутриклеточного льда. Чем больше размер клетки, тем ниже должна быть скорость замораживания для того, чтобы не формировались внутриклеточные кристаллы. Большая по размерам клетка не успевает обезводиться при быстрых скоростях замораживания, и оставшаяся в ней вода подвергается внутриклеточной кристаллизации, летальной для клетки. Когда замерзает внеклеточная вода, в клетке повышается концентрация растворимых веществ, а бластомеры эмбриона теряют воду в ответ на разницу осмотического давления вне и внутри клетки. Эта разница увеличивается при охлаждении эмбриональных клеток до более низких температур, если только охлаждение не проводится достаточно медленно с тем, чтобы вода, выходя из клеток, сохраняла осмотическое равновесие [1].

Детальное изучение процессов внутриклеточной кристаллизации в ооцитах и эмбрионах показало [18, 20], что на выживаемость клеток влияет скорость отогрева. По мнению Чен [7], оттаивание замороженных ооцитов следует проводить как можно быстрее. В экспериментах на эмбрионах мышей было установлено [35], что эмбрионы, замороженные до -40 °C по медленному режиму и погруженные затем в жидкий азот, выживают только после быстрого отогрева. При медленном отогреве они погибают вследствие развития внутриклеточной рекристаллизации.

Первое сообщение об успешном использовании замороженного эмбриона млекопитающих опубликовано в 1972 г. [32], когда живые мышата были получены после отогрева и трансплантации медленно охлажденных до -196 °C 8-клеточных эмбрионов под защитой криопротектора ДМСО. В модификациях этот метод был использован для криоконсервации и последующей трансплантации эмбрионов у кролика [33], овцы [37], коровы [28], человека [31]. Оказалось, что медленное замораживание эмбрионов до низкой температуры (-80 °C) требует медленного отогрева [32]; пере-

нос эмбрионов в жидкий азот при субнулевой температуре (-30°C , -40°C) требует быстрого отогрева [28]; стадия развития эмбрионов, оптимальная для криоконсервации, у разных видов животных различная [28]; глицерин может быть использован как криопротектор для более поздних стадий развития эмбрионов [5]. Эти важные наблюдения стали основой для организации промышленного получения эмбрионов у крупного скота и овец с целью создания криобанка эмбрионов высокопродуктивных пород. Созданы криобанки от различных линий мышей и других видов животных с целью генетической селекции [22]. При анализе данных генетического исследования эмбрионов мышей и различных видов животных, хранившихся в криобанках, установлено, что замораживание эмбрионов является эффективным методом сохранения генофонда животного мира [35].

Наиболее близкими по структурным и функциональным свойствам к человеческим являются ооциты и эмбрионы приматов. Отработка методов их криоконсервации позволит соответственно совершенствовать методику криоконсервирования яйцеклеток и эмбрионов человека. В эксперименте показано [3], что уровень выживания криоконсервированных — оттаянных эмбрионов приматов увеличивается с числом клеток эмбриона. Так, для 4-клеточной стадии он составляет 66 %, а для 8-клеточной — 89 %. У приматов получили результаты [3], сходные с данными [24] для человека. Эмбрионы на стадии 8 бластомеров легче подвергаются криоконсервированию, чем четырехклеточные [24]. При замораживании ооцитов приматов по оптимальному [10] режиму (медленная скорость замораживания, криопротектор 1,5 М ДМСО, быстрый отогрев) не наблюдали отличия в оплодотворяемости криоконсервированных ооцитов по сравнению с контрольными нативными ооцитами. Эти данные имеют важное значение в связи с развитием программы низкотемпературного хранения ооцитов человека.

С 1981 г. ученые для криоконсервации человеческих эмбрионов начали применять принципы, разработанные для эмбрионов мышей и крупного рогатого скота [30]. Оказалось, что человеческие эмбрионы лучше выживают после криоконсервации до субнулевых температур на стадии 4—8 бластомеров, в то время как эмбрионы коров переживают криоконсервирование, как правило, на стадии поздней морулы — бластоцисты [24]. После переноса криоконсервированного — оттаянного 8-клеточного эмбриона человека была впервые достигнута беременность [30]. Авторами было замечено, что эмбрионы оставались жизнеспособными, несмотря на повреждение при криоконсервировании нескольких отдельных бластомеров. При использовании глицерина в качестве криопротектора могут возникать массовые клеточные повреждения в результате внутриклеточного образования льда. Нарушение эмбрионального развития может происходить, если повреждено более чем 50 % отдельных бластомеров. Эмбрионы человека могут благополучно переносить замораживание и отогрев даже при наличии нерезко выраженного внутриклеточного или мембранного повреждения, то есть можно говорить о сохранении регенерационной способности зигот после криоконсервации. По одним данным [29], эмбрионы человека на более ранней стадии дробления трудно поддаются криоконсервации, уровень их выживания составляет всего 20 %. По другим данным [13], наилучшие результаты получены при замораживании эмбрионов человека на стадии пронуклеусов под защитой пропандиола. Перенос реципиентами эмбрионов с бластомерами неравного размера или фрагментами цитоплазмы в сочетании с нормальными клетками может привести к беременности [24]. Авторы заключили, что требованием для трансплантации эмбриона пациентке является сохранность не менее 50 % клеток эмбриона. Выживание 4- и 8-клеточных эмбрионов человека, криоконсервированных с ДМСО при медленном способе замораживания до -80°C , составляет соответственно 46 и 57 %. Имеется сообщение [24] о рождении ребенка из криоконсервиро-

ранного эмбриона при использовании ДМСО в качестве криопротектора. Авторами замечено, что медленное замораживание до низких субнулевых температур (-80°C) перед хранением в жидком азоте способствует сохранению существенно более высокого уровня жизнеспособности эмбрионов, чем при медленном охлаждении до температуры -30°C , -40°C с последующим переносом в жидкий азот. Были получены еще две беременности под защитой ДМСО [39]. По методике, которая была разработана для криоконсервирования бластоцист коров [9], успешно консервированы человеческие бластоцисты. Автор использовал среду с глицерином и методику медленного охлаждения бластоцист до относительно высоких субнулевых температур (-40°C) перед хранением в жидком азоте. Криоконсервирование эмбрионов поздних стадий до относительно высоких субнулевых температур можно считать альтернативой метода медленного замораживания эмбрионов на ранних стадиях дробления до низких субнулевых температур (-80°C).

Для замораживания ооцитов и эмбрионов млекопитающих и человека применяются проникающие криопротекторы глицерин, ДМСО, 1,2-пропандиол и различные их комбинации с сахарами [6, 18, 25]. В качестве контейнеров, как правило, используются ампулы и пайеты. Введение криопротектора в среду вызывает сжатие клеток с последующим возвратом к изотоническому объему. В случае, если концентрация непроникающих веществ в среде равна изотонической, аналогичные процессы, приводящие к изменению клеточного объема, происходят при отмывании клеток от криопротектора.

Глицерин оказывается эффективным при замораживании бластоцист человека [12], ДМСО — при замораживании 2-, 4-х дневных эмбрионов человека, 1,2-пропандиол наиболее эффективен на ранних стадиях развития эмбрионов человека [27], при этом жизнеспособность 1—4-клеточных человеческих эмбрионов достигает 87,5 %. Имеются сообщения об успешном применении 1,2-пропандиола также для человеческих ооцитов [4]. И все же предпочтение отдают пропандиолу в противоположность глицерину. При криоконсервации зигот человека на стадии двух пронуклеусов в медленном режиме под защитой 1,2-пропандиола дробление после оттаивания и культивирования отмечалось в 81,6 % и несущественно отличалось от контроля (89,4 %). По имеющимся данным [12], при замораживании по медленному режиму под защитой $1,5\text{ М ДМСО}^{2/3}$ оттаянных бластоцист развиваются в культуре и пригодны для трансплантации, по сравнению с $1/3$ оттаянных дробящихся эмбрионов.

Глицерин используют для криоконсервации спермы и эмбрионов ряда животных, но для криоконсервации ооцитов и эмбрионов человека он менее приемлем [13], авторы сообщили о плохих результатах применения глицерина при криоконсервации эмбрионов человека. Причиной может служить медленное проникновение глицерина в клетки и бластомеры.

Современные приемы удаления ДМСО глицерина и других соединений противоположны приемам их внесения. Выживаемость ооцитов и эмбрионов без удаления ДМСО после оттаивания, как известно, существенно снижается [38].

В качестве модели для разработки параметров протокола замораживания человеческих преовуляторных ооцитов пытались использовать режимы криоконсервирования мышинных ооцитов [15]. Человеческие ооциты имеют объем в три раза больше, чем мышинные. Волюметрические исследования при добавлении и удалении криопротекторов и изучение проницаемости криопротектора для мышинных ооцитов позволили определить протокол криоконсервирования для человеческих ооцитов, при котором происходят подобные изменения объема при эквilibрации с криопротектором и удалении криопротектора.

Некоторые авторы считают, что криоконсервация ооцитов человека может быть невозможной из-за особого расположения хромосом в ооците при замораживании [34], при этом увеличивается число полиплоидов после оплодотворения криоконсервированных ооцитов человека. Автор высказывает предположение, что возможное повреждение блестящей оболочки при замораживании и отогреве может приводить к полиспермии. По мнению Витингема [36], требуется дальнейшее изучение связи увеличения полиплоидов и криоконсервирования.

После криоконсервирования человеческих ооцитов с пропандиолом также встречается фрагментация цитоплазмы, как и после этапа эквипотенциации [14]. По мнению автора, по этой причине пропандиол нецелесообразно использовать для неоплодотворенных человеческих ооцитов.

Добавление ДМСО при комнатной температуре и медленная скорость охлаждения до -120°C перед погружением в азот преовуляторных ооцитов человека обеспечивает 83 % жизнеспособных клеток после оттаивания [26]. Практически аналогичные данные получили и другие авторы [2], показавшие, что 82 % оттаянных преовуляторных ооцитов человека, криоконсервированных по медленному режиму в присутствии ДМСО, оказались жизнеспособными, из них 75 % дробились до 2—6 бластомеров.

Сообщено [8] о первой успешной попытке глубокого замораживания и размораживания человеческих ооцитов. После инсеминации криоконсервированных — оттаянных ооцитов и переноса в матку получена беременность двойней. Процедура включала уменьшение размеров ооцита — кумулюс комплекса, добавление криопротектора ДМСО одномоментно, медленное замораживание между -7°C и -36°C после льдообразования и быстрое замораживание до -196°C перед хранением в жидком азоте. Размораживание достигалось быстрым погружением в ванночку с водой при 37°C , последующим разбавлением ДМСО в один прием. Эти результаты показывают, что человеческие преовуляторные ооциты могут быть успешно заморожены и храниться, что они способны оплодотворяться после оттаивания, при этом сохраняется хромосомная целостность. Однако нельзя полностью исключить возможность повреждающего влияния замораживания на хромосомы ооцитов человека. Подобное опасение высказывается, в частности, по поводу эмбрионов человека. Однако изучение физиологии животных, родившихся после трансплантации криоконсервированных эмбрионов, дает все основания считать, что замораживание не оказывает вредного влияния на эмбрионы, так как потомство рождается здоровым [35].

Опыт замораживания ооцитов с кумулюсом позволяет сделать вывод о лучшей выживаемости клеток с небольшим кумулюсом [8]. В исследованиях [8] при медленном замораживании и медленном оттаивании только один из 12 человеческих ооцитов (8 %) выжил после замораживания, остальные подверглись пикнозу с некоторым повреждением блестящей оболочки [8]. При медленном замораживании и быстром отогреве 90 % ооцитов человека не имеют морфологических повреждений, из них 83 % сохранили возможность быть оплодотворенными и 60 % продолжили деление [8].

Успешное криоконсервирование эмбрионов и ооцитов млекопитающих и человека возможно только при понимании всех сложных механизмов биохимических и физиологических процессов, сопровождающих процесс замораживания. При использовании новых криопротекторов и режимов замораживания необходимо изучить их действие прежде всего на генетический аппарат ооцитов и эмбрионов человека.

Таким образом, проблема криоконсервирования эмбрионов и ооцитов человека требует интенсивного изучения. Необходимы дальнейшие углубленные исследования влияния режимов криоконсервирования на мор-

фологические и функциональные свойства этих биообъектов. Полученные данные определяют тактику разработки эффективной криозащиты и особенности охлаждения применительно к яйцеклетке и эмбриону с учетом их морфологических и функциональных особенностей, осложняющих разработку методов криоконсервации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Грищенко В. И., Паращук Ю. С. Криоконсервация репродуктивных клеток.— Киев: Наук. думка, 1986. — 206 с.
2. Al-Hazahi, S., Dildrich, K., Van der ven H., Krebs, D. Erste Ergebnisseder Kryokon-servierung von menschlicher oocyten // Geb. Frauen. heilik.— 1986.— 46, N 9.— P. 643—644.
3. Balmaceda, J., Heitman, T., Garcia, M. et. al. Embryo cryopreservation in cynomol-gus monkeys // Fertil. Steril.— 1986.— 45, N 3.— P. 403—406.
4. Bernard, A., Amoedemhe, D. A., Shaw, R. et al. Effects of cryoprotectants on human oocyte // Lancet.— 1985.— N 2429.— P. 632—633.
5. Bilton, F. J., Moore, N. W. *In vitro* culture, storage and transter of goat embryos // Aust. J. Biol. Sci.— 1976.— 29, N 1.— P. 125.
6. Chang M. C. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation acti-vation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes // J. Exp. Zool.— 1955.— 128, N 2.— P. 378—405.
7. Chang M. C. Fertilization of rabbit ova *in vitro* // Nature.— 1959.— 184, N 1.— P. 446—467.
8. Chan, C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation // Lancet.— 1986.— N 8486.— P. 884—886.
9. Cohen, C. J., Simons, R. F., Edwards, R. G. et. al. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts // *In vitro* Fert. Embryo Trans.— 1985.— 2, N 1.— P. 59—64.
10. Demayo, F., Rawlins, R., Dukelow, W. Henogenous and *in virto* fertilization of frozen — thawed primate oocytes and blastomer separation of embryos // Fertil. Ster-il.— 1985.— 43, N 2. — P. 295—300.
11. Dieldrich, P., Al-Hazani, S., Van der Ven, H. Freezing of human embryos // Human Oocyte and Embryo Freezing.— Berlin, Heidelberg: Springer — Verlag, 1987.— P. 78—81.
12. Fehil'y, C. B., Cohen, J., Simons, R. F. et al. Cryopreservation of cleaving embryos and expended blastocysts in the human: a comparative study // Fertil. Steril.— 1985.— 44, N 5.— P. 638—644.
13. Feichtinger, W., Kafka, I., Kogowska, A. et al. Initial results of a cryopreser-vation program for human ova and embryos // Zentall. Gynakol.— 1986.— 108, N 5. —P. 305—315.
14. Feichtinger, W., Benko, I., Kemeter, P. Freezing human oocytes using rapid tech-niques // Human Oocyte and Embryo Freezing. — Berlin, Heidelberg: Springer — Verlag, 1987.— P. 101—110.
15. Fuller, B. J., Bernard, A. Successful *in vitro* fertilization of mouse oocytes after cryopreservation using glycerol // Cryo-Lett.— 1984.— 5, N 5.— P. 307—312.
16. Garcia, J. E., Acosta, A. A., Hsium, G., Jones, H. W. Advanced endometrial maturation after ovulation, induction with human menopausal gonadotropin — human-chorionic gonadotropin for *in vitro* fertilization/Fertil. Steril.— 1984.— 41, N 1.—P. 31.
17. Kasai, M., Airitahi, A., Chang M. C. Fertilization *in vitro* of rat ovarian oocytes after freezing and thawing // Biol. Reprod. 1979.— 21, N 6.— P. 839—844.
18. Leibo, S. P., Mazur, P. The role of glycerol and dimethylsulfoxide in protecting mouse embryos against freezing damage // Cell. Biol.— 1974.— 63, N 2.— P. 189.
19. Leibo, S. P. Nucleation temperatures of intracellular ice formation in mouse ova // Cryobiology.— 1976.— 13, N 6.— P. 646.
20. Mazur, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and likelihood of intracellularfreezing // J. Gen. Physiol.— 1963.— 47, N 2.— P. 357—369.
21. Mazur, P. The freezing of biological systems // Science.— 1970.— 169, N 5135.— P. 939—949.
22. Morbaater, L. E. Mouse embryo cryobanking // *In vitro* Fert. Embryo Trans.— 1986 3, N 1.— P. 28.
23. Mohr, L. P., Trounson, A. et al. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse // J. Reprod, Fertil.— 1980.— 52, N 1.— P. 189—196.
24. Mohr, L. R., Trounson, A., Freeman, L. Deep freezing and transfer of human embryos//J. *In Virto* Fert. Embryo Trans.— 1985.— 3, N 2.— P. 1—10.
25. Renard, J. J., Babinet, C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic with 1,2 — propanediol as a cryoprotectant // J. Exp. Zool.— 1984.— 23, N 2.—P. 443—448.
26. Ridha, M. T., Vaseen, A. A., Muhsen, S. A. et al. A technique for cryopreservation of human and camel preovulatory oocytes // Theriogenology.— 1986.— 25, N 1.— P. 188.

27. Testart, J., Lassal, B., Belaisch-Allart, J. et al. High pregnancy rate after early human embryo freezing // *Fertil. Steril.*—46, N 2.—P. 268—276.
28. Trounson, A. O., Shea, B. F., Ollis, G. W., Jaconson, M. E. Frozen storage and transfer of bovine embryos // *J. Anim. Sci.*—1978.—47, N 1.—P. 677.
29. Trounson, A. O., Leeton, J. C., Wood, C., Webb, J. et al. Pregnancies in human by fertilization *in vitro* and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle // *Science.*—1981.—212, N 495.—P. 681—682.
30. Trounson, A. Preservation of human eggs and embryos // *Fertil. Steril.*—1986—46, N 1.—P. 1—12.
31. Trounson, A., Peura, A., Kirby, C. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation // *Fertil. Steril.*—1987.—48, N 5.—P. 843—850.
32. Whittingham D. G., Leibo, S. P., Mazur, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C // *Science.*—1972.—178, N 2.—P. 411—414.
33. Whittingham D. G., Adams, C. E. Low temperature preservation of rabbit embryos // *J. Reprod. Fertil.*—1976.—47, N 1.—P. 269.
34. Whittingham D. G. Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C // *J. Reprod. Fertil.*—1977.—49, N 1.—P. 89—94.
35. Whittingham, D. G., Maureen, W., Farrant, J. et al. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C // *J. Reprod. Fertil.*—1979.—56, N 1.—P. 11—21.
36. Whittingham, D. G. Human oocyte and embryo freezing // *Human Oocyte and Embryo Freezing.*—Berlin, Heidelberg: Springer—Verlag, 1987.—P. 55—59.
37. Willadsen, S. M., Polge, C., Rowson, L. E., Moor, R. M. Deep freezing of sheep embryos // *J. Reprod Fertil.*—1976.—N 46, N 1.—P. 151.
38. Willadsen, S. M., Polge, C., Rowson, L. E. The viability of deep-frozen cow embryos // *J. Reprod. Fertil.*—1978.—52, N 2.—P. 391—393.
39. Zeilmaker, G. H., Alberda, A. T., Van Cent I. et al. Two pregnancies following transfer of intact frozen—thawed embryos // *Fertil. Steril.*—1984.—42, N 2.—P. 293—297.

Ін-т проблем криобіології
і кріомедицини АН України, Харків

Поступила 30.04.91

В. І. ГРИЩЕНКО, Л. І. ЛУЦЬКА, Ф. В. ДАХНО

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ООЦИТІВ І ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ

Інститут проблем криобіології і кріомедицини
АН України, м. Харків

В роботі подано огляд досліджень, присвячених проблемі кріоконсервування ембріонів і яйцеклітин людини. На підставі узагальнення даних, одержаних вченими ведучих центрів світу автори статті описують механізми кріопошкодження і кріозахисту. Підкреслюється значимість стадії розвитку ембріонів і виду кріопротекторів, режиму кріоконсервування і відігріву для ефективності кріоконсервування. Переконаливо показано, що використання кріоконсервування ембріонів підвищує успіх екстракорпорального запліднення.

V. I. GRISHCHENKO, L. I. LUTSKAYA, F. V. DAKHNO

CRYOPRESERVATION OF HUMAN OOCYTES AND EMBRYOS

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

A review of studies devoted to the problem of cryopreservation of human embryos and oocytes is presented. The mechanisms of cryoinjury and cryoprotection are described using the summarized data obtained by scientists of leading world centers. The importance of the embryo development stage and type of cryoprotectant, freeze—thawing regimes for the efficiency of cryopreservation is discussed. It has been shown that the use of cryopreserved embryos increases the success of *in vitro* fertilization.

*А. П. Грохольский, Ю. Н. Данилевский, В. В. Миклашевич.
А. В. Мастицкий, Н. Ф. Противень, В. М. Худзинский*

КРИОДИАТЕРМОКОАГУЛЯЦИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЕВИДНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА И КОЖИ ЛИЦА

Описан эффективный способ лечения опухолевидных заболеваний слизистой оболочки полости рта и кожи лица, сочетающий гипотермию, диатермокоагуляцию и поверхностную криодеструкцию.

В последние годы широкое распространение при лечении ряда заболеваний получило криотермическое лечение. Воздействие на патологическую биоткань при этом осуществляется отдельным применением высоких и низких температур или их сочетанием. Лечение различных заболеваний в стоматологии и дерматологии при помощи низких температур [1, 3, 5] заключается в замораживании, образовании зон некроза, затем отторжения с последующей эпителизацией и заживлением. Недостатком указанного способа является его сравнительно невысокая эффективность, обусловленная неполным разрушением патологической биоткани, а также возможная травматизация здоровых участков, что может вести к рецидиву и необходимости повторного лечения.

Известен также способ разрушения очага нагревом высокочастотного искрового разряда, возникающего между биотканью и электродом [2]. Разрушающим фактором служит точечная искра, образующаяся на конце электрода, к которому подводится ток высокой частоты и напряжения. Этот метод позволяет получать сравнительно высокую степень деструкции патологической биоткани при достаточно большой мощности воздействия (порядка 10...15 Вт). Недостатком является побочное действие токов высокой частоты на окружающие ткани, наличие обширной подкоагуляционной зоны, в которой ослаблены защитные свойства и понижены репаративные возможности биоткани, что замедляет отторжение участков некроза, пролонгирует заживление, сопровождается образованием косметического дефекта.

Известен также способ сочетанного воздействия высоких и низких температур [4].

Для повышения эффективности лечения опухолевидных заболеваний слизистой оболочки полости рта и кожи лица на кафедре терапевтической стоматологии Киевского медицинского института мы используем сочетанное воздействие низких и высоких температур.

Способ осуществляется с помощью аппарата «Криоэлектроника-1» выставлением соответствующей температуры на пульте управления и искрового генератора. В качестве искрового генератора при проведении диатермодеструкции используется электрофульгуратор, представляющий собой устройство типа «Дарсонваль» с активным электродом в виде углового зонда.

Методика. Вокруг патологического очага предварительно для создания защитной зоны проводится охлаждение здоровой биоткани при температуре 1...4 °С в течение 2...5 мин. Деструкция разросшейся ткани осуществляется нагревом до температуры 95...110 °С высокочастотным разрядом мощностью 0,6...0,8 Вт и частотой 110 кГц в течение 10—30 с. Затем нагретую патологическую ткань дополнительно охлаждают до температуры —120...—130 °С в течение 5—10 с.

Охлаждение здоровой биоткани расположенной вокруг патологической до температуры $1...4^{\circ}\text{C}$ в течение $2...5$ мин позволяет обезболить ее, замедлить циркуляцию крови и лимфы, блокировав ее вплоть до полного стаза, и создать вокруг патологической ткани защитную зону. Параметры процесса охлаждения выбраны исходя из требований умеренного охлаждения здоровой биоткани, не приводящего к необратимым измерениям в ней, то есть после снятия охлаждения здоровая биоткань возвращается в свое защитное состояние. Нагревание патологической ткани после создания защитной зоны до температуры $95...110^{\circ}\text{C}$ в течение $10...30$ с позволяет произвести деструкцию нагревом основной массы клеток внутри защитной зоны. Выполнение нагрева непосредственно после создания и во время сохранения защитной зоны позволяет обеспечить полученный при охлаждении лимфо- и гемостатический эффект холода, исключив при этом подпитку патологической ткани, за счет чего степень деструкции патологической ткани будет выше.

Параметры процесса нагрева (мощность $0,6...0,86$ Вт, частота 110 Гц) подобраны нами исходя из условия сохранения ранее созданной защитной зоны получения температуры $95...110^{\circ}\text{C}$ во всем объеме биоткани, способствующей максимальной деструкции патологического очага. В результате проведения процесса нагрева патологической биоткани степень деструкции ее будет достаточно высокой, однако при этом происходит угнетение защитных свойств и понижение репаративных возможностей биоткани, которое может привести к замедлению процессов регенерации и эпителизации и образованию грубых келлоидных рубцов, ухудшающих косметичность.

Охлаждение биоткани, подвергшейся высокотемпературной деструкции, температурой $-120...-130^{\circ}\text{C}$ в течение $5-10$ с, способствует только поверхностному замораживанию ее, активизации защитных свойств, повышению репаративных возможностей биоткани и ускорению процессов регенерации и эпителизации, что в целом ведет к сокращению сроков лечения, то есть повышению эффективности способа лечения, и кроме того, приводит к образованию нежного эпителиального слоя, обладающего высокой косметичностью.

Одновременно с этим и благодаря созданию и сохранению защитной зоны вокруг патологической ткани процесс распространения тепла затухает на границе патологическая ткань — здоровая биоткань, и нагрев не распространяется на здоровую биоткань, чем обеспечивается атравматичность воздействия.

Пример. Больной Н. И. В. обратился с жалобами на разрастание опухоли в области слизистой оболочки верхней губы ближе к углу рта. Образование появилось 4 года назад и, постоянно травмируясь, увеличивается в размере. Диагноз: одиночная фиброма слизистой оболочки верхней губы. Лечение: криотермическое воздействие.

Больной был подвергнут лечению в следующем порядке: сначала область вокруг фибромы охладили до 4°C , после чего фиброму нагревали до 95°C в течение 10 с с помощью высокочастотного разряда частотой 110 кГц, мощностью $0,68$ Вт. Во время нагрева фибромы температура области вокруг очага поддерживалась на уровне $10...15^{\circ}\text{C}$, чем исключалось распространение нагрева на здоровые ткани вокруг фибромы и их травматизация. Затем нагретый участок охлаждали до -120°C в течение $5-10$ с.

Больной оперативное вмешательство перенес хорошо. Отмечен небольшой отек слизистой. На вторые сутки операционное поле покрылось некротическим темно-серым распадом, на 4-е сутки начался процесс эпителизации и закончился на 10-е сутки с высокой косметичностью. Слизистая оболочка приобрела нормальную окраску и консистенцию.

Таким образом, полная эпителизация после однократного криотермического лечения фибромы достигалась за 10 суток.

Под нашим наблюдением и лечением находилось 290 больных в возрасте от 6 до 76 лет с доброкачественными мягкоткаными образованиями на слизистой оболочке полости рта и кожи лица с самой различной локализацией. По назологическим единицам опухолей все больные располагались следующим образом: папилломы — 130, капиллярные гемангиомы — 47, кожный рог — 34, фибромы — 49, пигментный невус — 30.

Криотермическое воздействие на ткани доброкачественных опухолей слизистой оболочки полости рта и кожи лица не нарушает общего состояния пациента, проходит почти безболезненно, все больные переносили оперативное вмешательство хорошо. В послеоперационном периоде прооперированный участок сам больной может обрабатывать мазью следующего состава: фурацилина — 0,05; борной кислоты — 2,0; анестезина — 3,0; ментола — 0,8; вазелина — 20,0; ланолина до 100,0.

Анализ отдаленных результатов криотермического лечения доброкачественных мягкотканых новообразований слизистой оболочки полости рта и кожи лица показал, что полное излечение наступает в 97,5 % случаев при хороших косметических результатах без осложнений. При патогистологическом исследовании в динамике отмечена менее выраженная воспалительная реакция окружающих новообразование здоровых тканей по сравнению с химическим или только диатермическим воздействием на них.

Применение предложенного способа криотермического лечения поверхностно расположенной патологической ткани и устройства для его осуществления при лечении различных заболеваний позволит за счет комбинированного воздействия обеспечить увеличение степени деструкции патологической ткани на 20...30 %, исключив при этом травматизацию здоровой биоткани, в 2—3 раза сократит сроки лечения различных заболеваний с высоким косметическим эффектом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балиева И. Л. Криохирurgia при лечении доброкачественных опухолей полости рта и гипертрофического гингивита // Материалы I съезда стоматологов Узбекистана (6—7 мая 1976 г.).— Ташкент, 1979.— С. 98—101.
2. Варава Т. Н., Рябоконь А. В. Применение высокочастотного тока в стоматологии // I съезд Всесоюз. научного медико-технического общества.— М.,— 1975.— С. 132—134.
3. Грохольский А. П., Данилевский Н. Ф. Результаты криотерапии болезней пародонта и слизистой оболочки полости рта и губ // Стоматология.— 1986.— № 2.— С. 25—27.
4. Данилевский Н. Ф., Грохольский А. П., Противень Н. Ф. и др. Применение криодиатермодеструкции при лечении лиц с заболеваниями пародонта и слизистой оболочки полости рта // Терапевтическая стоматология.— 1982.— Вып. 17.— С. 76—80.
5. Никитин В. А., Григорьева К. В., Реусова Е. П., Воронина Л. И. Экспериментально-клиническое обоснование криотерапии лейкоплакии // Стоматология.— 1974.— № 5.— С. 25—27.

Киевский мед. ин-т им. акад. А. А. Богомольца

Поступила 13.12.89

О. П. ГРОХОЛЬСЬКИЙ, Ю. М. ДАНИЛЕВСЬКИЙ, В. В. МИКЛАШЕВИЧ,
О. В. МАСТИЦЬКИЙ, М. Ф. ПРОТИВЕНЬ, В. М. ХУДЗИНСЬКИЙ
КРІОДІАТЕРМОКОАГУЛЯЦІЯ ПРИ ЛІКУВАННІ ХВОРИХ
З ПУХЛИНОПОДІБНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ
СЛИЗИСТОЇ ОБОЛОНКИ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ
І ШКІРИ ЛИЦЯ

Київський медичний інститут ім. акад. О. О. Богомольця

Описано ефективний спосіб лікування пухлиноподібних захворювань слизової оболонки рота і шкіри лиця, який сполучує гіпотермію, діатермокоагуляцію і поверхневу кріодеструкцію.

A. P. GROKHOLSKY, Yu. M. DANILEVSKY, V. V. MIKLASHEVICH,
A. V. MASTITSKY, N. F. PROTIVEN, V. M. KHUDZINSKY

CRYODIATHERMOCOAGULATION IN TREATMENT OF PATIENTS WITH TUMOR DISEASES OF MOUTH MUCOSA AND FACE SKIN

Academician A. A. Bogomolets Medical Institute of Kiev

An effective method of treatment of tumor diseases of mouth mucosa and face skin by combining hypothermia, diathermodestruction and surface cryodestruction is presented.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.111

О. А. Нардид, В. И. Загнойко, В. А. Мусеев, А. К. Гулевский

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ФЕРРИЦИАНИДНЫХ ИОНОВ

Известно, что развитию процесса гибернации в организме зимнеящих животных предшествует последовательный цикл биохимических, физиологических и поведенческих адаптационных реакций. В результате, гетеротермные животные способны длительное время сохранять клеточный гомеостаз и жизнеспособность при температурах близких к 0°C [4, 9]. По-видимому, такие адаптационные изменения происходят и в крови животных, так как ее форменные элементы должны выполнять свои функции в условиях глубокой гипотермии. Однако сведения о перестройках, в частности эритроцитов зимнеящих животных, при различных функциональных состояниях крайне малочисленны. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось исследование методом спектроскопии ЭПР-спинового зонда влияния гипотермии на барьерную функцию мембран эритроцитов *Citellus undulatus* в цикле зимней спячки. Выяснение адаптационных механизмов холодоустойчивости изолированных клеток гетеротермов важно не только в теоретическом, но и в практическом отношении, поскольку может явиться основой для создания новых методов гипотермического хранения биологического материала различного уровня организации.

Объектом исследования служила кровь, полученная при декапитации длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*), находившихся в различных физиологических состояниях — зимней спячке (ректальная температура $2\div 4^{\circ}\text{C}$) и искусственно вызванном пробуждении ($> 30^{\circ}\text{C}$), а также белых беспородных крыс. Животных в состоянии зимней спячки и искусственного пробуждения изучали в январе — марте.

Антикоагуляционный раствор содержал 2 % глюкозы, 3 % трехзамещенного цитрата натрия, pH 7,4.

О состоянии барьерной функции мембран эритроцитов судили по интенсивности сигнала ЭПГ спиновых зондов. Спектры ЭПР записывали на спектрометре Bruker ER-100D (ФРГ). Измерения проводили в тонкостенных стеклянных капиллярах с внутренним диаметром ~ 500 мкм. В качестве спинового зонда использовали стабильный иминоксильный радикал 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил (ТЕМПОН), дающий в разбавленном водном растворе спектр ЭПР, состоящий из трех линий почти одинаковой ширины и интенсивности. Спиновый зонд в образцы крови вводили непосредственно перед экспериментом следующим образом. К 100 мкл крови добавляли 25 мкл смеси, состоящей из равных объемов водных растворов спинового зонда (10^{-2} моль/л) и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1 моль/л). Спиновый зонд свободно диффундирует через мембраны эритроцитов, равномерно распределяясь вне и внутри последних [6, 8]. В этом случае уширение спектра ЭПР радикала, находящегося во внеклеточной среде, парамагнитным уширителем $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, не проникающим в норму через мембрану эритроцитов, позволяет в итоге исследовать нарушение барьерной функции мембраны для

феррицианида. Уменьшение интенсивности сигнала ЭПР спиновых зондов, находящихся в эритроцитах, характеризовало разрушение клеток.

На первом этапе исследовали состояние барьерной функции мембран эритроцитов белых беспородных крыс и длиннохвостых сусликов, которые находились в состоянии зимней спячки и после искусственного пробуждения. Как видно из рис. 1, наибольшей устойчивостью в процессе гипотермического хранения (5°C) обладают мембраны эри-

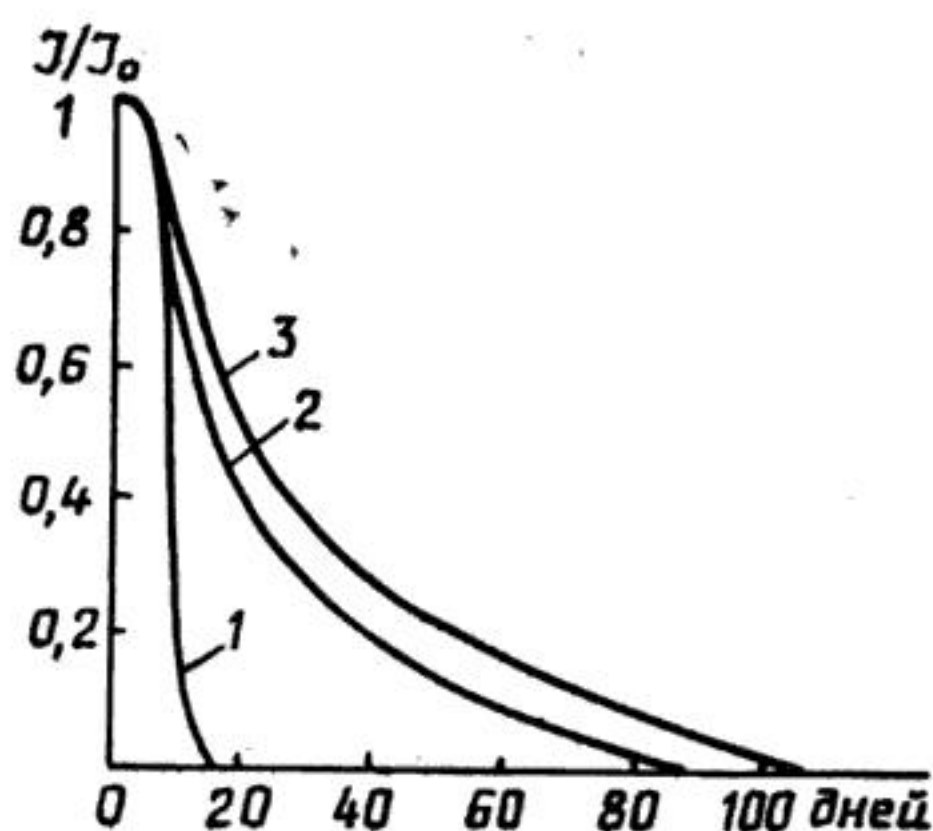


Рис. 1. Зависимость относительной интенсивности центрального компонента спектра ЭПР спинного зонда в крови крысы (1), проснувшегося (2) и спящего (3) сусликов от сроков ее гипотермического хранения

троцитов, взятые у спящих и просыпающихся животных и сохраняющие структурную целостность в течение 3—3,5 месяцев, тогда как эритроциты из крови крыс сохраняли структурную целостность лишь в течение 2 недель. Представленные результаты согласуются с данными о том, что эритроциты, выделенные из крови животных, находившихся в состоянии зимней спячки способны к длительному автономному гипотермическому хранению без нарушения целостности плазматических мембран клеток [2, 7]. Аналогичные результаты были получены и при изучении устойчивости клеточных культур, выделенных из организма гетеротермов, к действию пониженной температуры, $(5 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ [1], где они сохраняли свои свойства 4—5 месяцев. В тоже время клетки гомойотермов теряли специфические свойства при этих температурах в течение 4—5 недель хранения.

Полученные результаты, а также данные литературы свидетельствуют о том, что во время зимней спячки в организме животного происходят изменения, проявляющиеся в стабилизации эритроцитов, вследствие чего кровь, полученная у таких животных, способна к длительному гипотермическому хранению.

С чем связана стабильность эритроцитов зимнеспящих животных не выяснено. Можно предположить несколько альтернативных гипотез для объяснения выявленного феномена. Во-первых, возможно, что клетки крови гибернирующих животных изменяют (перестраивают) внутриклеточный метаболизм. Это способствует определенным структурным перестройкам белков цитоскелета, обеспечивающих сохранение формы и функции клетки в целом. Во-вторых, не исключено, что холодоустойчивость клеток этих животных связана с поступлением в кровь перед вхождением животного в спячку биостабилизаторов [5].

Для проверки данного предположения нами были проведены эксперименты, связанные с заменой плазмы крови исследуемых животных физиологическим раствором. Из представленных на рис. 2 результатов видно, что разница в сроках гипотермического хранения эритроцитов крысы, спящего и пробужденного суслика, с сохранением их барьерной функции, практически отсутствует, хотя тенденция наибольшей устойчивости эритроцитов спящего суслика сохраняется. Все это позволяет предположить, что кроме структурных и вязкостных изменений в мембране и цитозоле эритроцитов гибернирующего суслика [3], важную роль в поддержании их барьерной функции в условиях гипотермического хранения играет состав плазмы крови этого животного.

Хотелось бы также отметить особенность спектров ЭПР некоторых образцов крови сусликов, забой которых проводили в период вхождения животного в состояние спячки или выхода из нее, т. е. исследования проводились непосредственно в момент, когда животное изменяло свое физиологическое состояние. Спектры таких образцов представляли собой суперпозицию двух спектров от спиновых зондов, находящихся в двух различных окружениях (рис. 3, б). При этом линии большей интен-

сивности аналогичны линиям спектра от зондов, находящихся в цитозоле эритроцитов суслика в устойчивых состояниях зимней спячки или полностью проснувшегося животного, приведенном на рис. 3, а. Сказать что-либо конкретное о локализации зондов, дающих спектр с меньшей интенсивностью, кроме того, что их окружение имеет меньшую полярность, пока трудно. Учитывая особенности используемого метода, можно также утверждать, что эти зонды находятся в недоступном для парамагнитных фер-

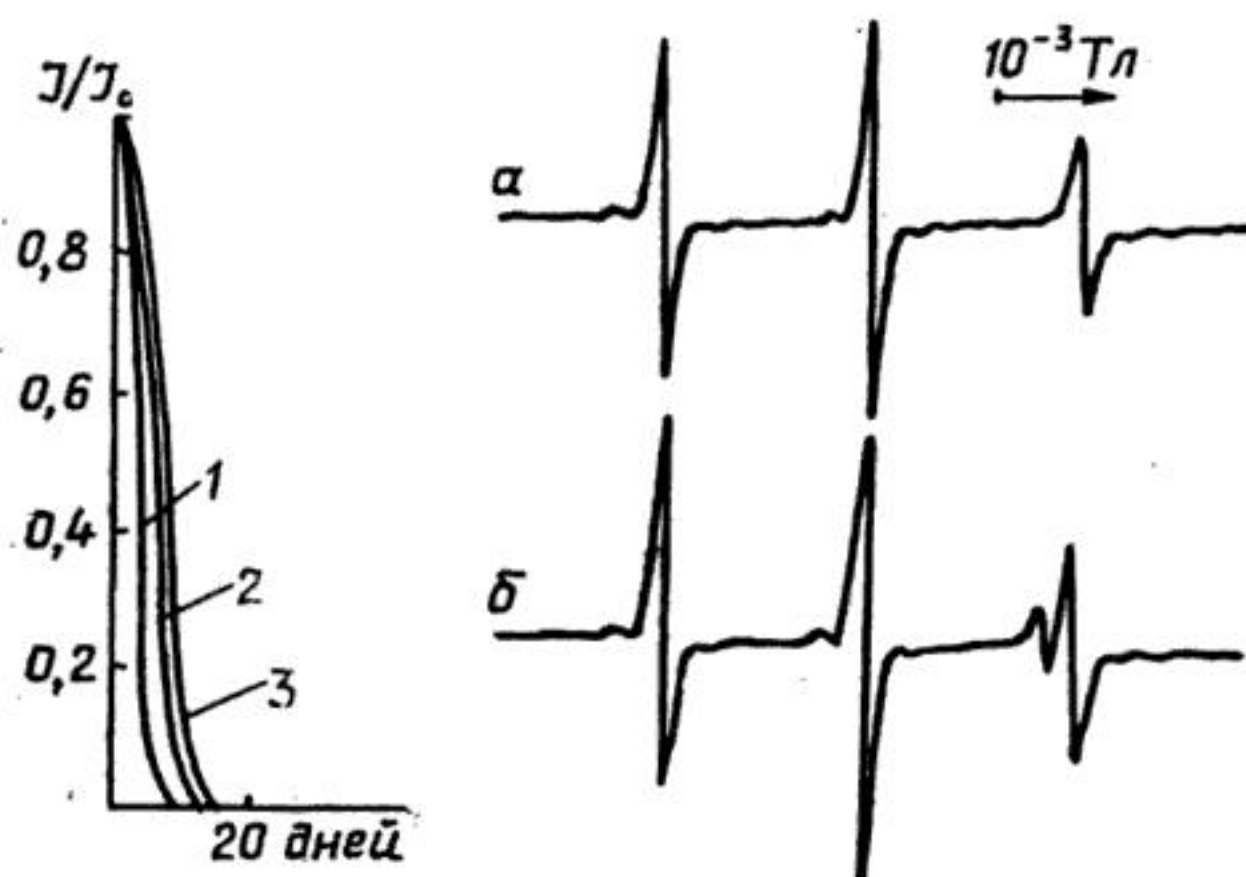


Рис. 2. Зависимость относительной интенсивности центрального компонента спектра ЭПР спинного зонда в эритроцитах крысы (1), проснувшегося (2) и спящего (3) сусликов, ресуспендированных в физрастворе от сроков их гипотермического хранения. Эритроциты получены из крови тех же животных, что и на рис. 1

Рис. 3. Спектры ЭПР спинного зонда, находящегося в крови спящего (а) и некоторых просыпающихся (б) сусликов

рицианидных ионов объема. Маловероятно, что этот спектр дают зонды, локализованные в других, кроме эритроцитов, форменных элементах крови, так как в норме мембраны этих клеток довольно хорошо проницаемы для феррицианида, и обычно разрешенный спектр ЭПР от зондов, находящихся в них, получить не удастся. Все это, а также нерегулярность появления спектров ЭПР крови сусликов подобных состояний, обладающих суперпозицией, требует для объяснения данного феномена дальнейших исследований.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о стабилизации структуры клеток, в частности эритроцитов сусликов в состоянии зимней спячки, направленной на поддержание их барьерной функции и во многом обусловленной наличием в плазме крови неких веществ-стабилизаторов. Возможно появление нетипичного спектра, представляющего собой суперпозицию спектров от спиновых зондов, находящихся в двух различных микроокружениях в крови гетеротермных животных, полученной в момент изменения их физиологического состояния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилюк Б. К. Низкотемпературная устойчивость культур клеток, изолированных из организма зимнеящих животных // Эволюционные аспекты гипобиоза и зимней спячки.— Л.: Наука,— 1986.— С. 143—145.
2. Загнойко В. И., Гулевский А. К., Щенявский И. И. и др. Особенности структурно-функционального состояния эритроцитов гомойотермных и гетеротермных животных в условиях гипотермического хранения // Журн. эволюцион. биохимии и физиологии.— 1991.— 27, № 4.— С. 36—42.
3. Репина С. В. Особенности термoinдуцированных структурных перестроек мембран эритроцитов гомойотермного и гетеротермного организмов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков,— 1990.— 18 с.
4. Хочачко П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация.— М.: Мир,— 1988.— 567 с.
5. Dawe A. R., Spurrier E. A. The blood-born for natural mammalian hibernation in the 13-lined ground squirrel and the woodchuck // Cryobiology.— 1972.— 9, N 3.— P. 163—172.

6. *Gavrilova J. J., Ivanov L. V., Moiseyev V. A.* Investigation of the membrane integrity of human erythrocytes at low temperatures using spin probes // *Cryo — Lett.* — 2, N 2. — P. 197—200.
7. *Kimzey S. L., Willis J. S.* Resistance of erythrocytes of hibernating mammals to loss of potassium during hibernation and during cold storage // *S. Gen. Physiol.* — 1971. — 58, N 6. — P. 620—633.
8. *Morse P. D.* Use of the spin label tempamine for measuring the internal viscosity of red blood cells // *Biochim. Biophys. Res. Comm.* — 1977. — 77, N 4. — P. 1486—1491.
9. *Wang L. C. H.* Life and low temperature: mammalian hibernation // *Cryobiology.* — 1985. — 6, N 2. — P. 257—274.

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

Поступила 14.02.92.

ШАНОВНІ ДРУЗИ!

На Україні за ініціативою наукових та педагогічних кіл створено Фонд «НАУКОВА ЗМІНА» — громадську організацію, основним завданням якої є виявлення та підтримка здібних дітей та студентської молоді з метою підготовки їх до наступної творчої наукової діяльності.

Фонд оголошує про своє народження і запрошує до своїх лав усі наукові колективи, які думають про своє майбутнє, всіх заінтересованих в тому, щоб не пересихала ріка нового знання.

На етапі свого становлення Фонд потребує матеріальної та фінансової допомоги і тому звертається до наукових і педагогічних колективів, нових організаційних структур виробничого, комерційного і банківського спрямування за підтримкою у цьому благодійному починанні.

Гроші, внесені у Фонд «Наукова зміна», будуть вкладені в талант дітей та молоді України, у формування науково-технічної еліти України. Всі, хто виявить бажання співпрацювати з Фондом, можуть обумовити ціл і навіть конкретні проекти, на які мусять піти надіслані кошти.

Благодійні внески від підприємств всіх форм власності, організацій та приватних осіб приймаються на розрахунковий рахунок № 1609975 в Ленінському відділенні Промбудбанку м. Києва / МФО 322227).

НАДЕЖНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ!

Для Вас на системе изолированных гепатоцитов, выделенных неферментативным методом, мы можем провести исследования по изучению влияния на печень любых ксенобиотиков и фармацевтических препаратов. При выполнении исследований мы проводим контроль метаболического состояния клеток печени по следующим параметрам: энергетическое состояние клеток (полярографические исследования, уровень адениновых нуклеотидов, мембранный потенциал); уровень перекисного окисления липидов, уровень основных метаболитов (лактат, пируват, глюкоза), содержание цитохрома Р 450; активность монооксигеназной системы; уровень биосинтетической активности и др.

Использование изолированных гепатоцитов экспериментальных животных как модели печени позволит Вам существенно удешевить и ускорить Ваши исследования.

*Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН Украины.
г. Харьков, 310015, ул. Переяславская, 23.
Справки по телефону: 72-01-35
Кравченко Лидия Петровна*

1р. 20 к.

3 1992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

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

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

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

Подписка принимается в агентствах и отделениях "Союзпечати", отделениях связи и общественными распространителями печати.

Our Journal PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY is published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences. The journal provides basic information to researchers investigating the various phenomena involved in the interaction between low temperatures and living cells or tissue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are of utmost importance with regard to preservation of cells, tissues and organs, cell damage caused by freezing, cold acclimation and hardiness in plants, mechanisms of cold survival in animals and microorganisms. The journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology and pharmaceuticals, low temperature techniques and equipment. A subscription to PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY includes 4 issues a year.

Наукова думка

ИНДЕКС 70474

ISSN 0233—7673. ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1992. №3. 1—56