

1

ISSN 0233-7673

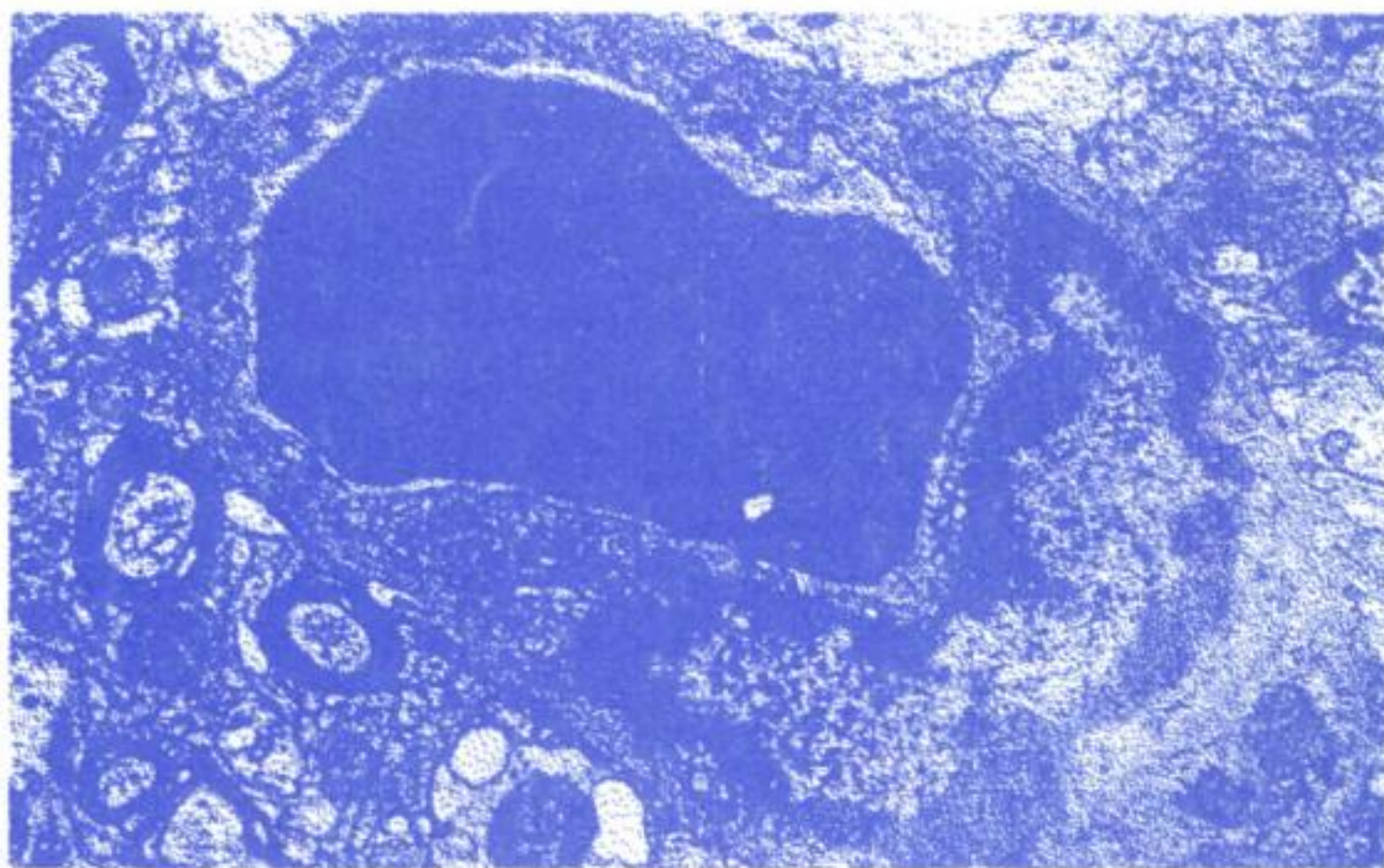
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1994

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ РОЛИ
КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА МИЕЛОТРАНСПЛАНТАТА В ПРОЯВЛЕНИИ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК *А.Н.Гольцев,
Е.Д.Луценко*

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА В НОРМЕ И ПРИ
ВОЗДЕЙСТВИИ ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ *А.М.Белоус,
Н.Г.Землянских*

ОБЩИЙ ПОДХОД К ПРОБЛЕМЕ ПОВЫШЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТО-
ЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА И ХОЛОДОВОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИ-
ЗМА *В.С.Марченко, Г.А.Бабийчук, В.В.Ломако, А.В.Шило, И.И.Ломакин,
Л.Н.Марченко*

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.Гольцев (Харьков), В.М.Гордиенко (Киев), К.Дж.Грин (Великобритания), В.Н.Гурин (Минск), Г.Ф. Жегунов (Харьков), В. Де Лекер (Бельгия), В.И.Луговой (Харьков), В.Я.Малеев (Харьков), Г.Маттес (Германия), Г.Меримен (США), П.Мнержичка (Чехия), Е.Я.Панков (Харьков), Ю.Ф.Пастухов (Санкт-Петербург), Ф.А.Приходько (ответственный секретарь, Харьков), Н.С.Пушкарь (Харьков), А.Роу (США), Б.П.Сандомирский (Харьков), А.С.Снурников (Харьков), С.Сумида (Япония), А.А.Цуцаева (Харьков), С.А.Шалимов (Киев), Э.З.Эмирбеков (Махачкала), Т.Н.Юрченко (Харьков)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А.Д.Бугров, В.Я.Волков, 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.Babiychuk (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.N.Gurin (Minsk), W.De Loecker (Belgium), V.I.Lugovoj (Kharkov), V.Ya.Maleyev (Kharkov), G.Matthes (Germany), P.Mericka (Czechia), H.T.Meryman (USA), E.Ya.Pankov (Kharkov), Yu.F.Pastukhov (Sankt-Petersburg), F.A.Prikhodko (Executive Secretary, Kharkov), N.S.Pushkar (Kharkov), A.W.Rowe (USA), B.P.Sandomirsky (Kharkov), S.A.Shalimov (Kiev), A.S.Snumikov (Kharkov), S.Sumida (Japan), A.A.Tsutsayeva (Kharkov), T.N.Yurchenko (Kharkov), L.Wang (Canada), G.F.Zhegunov (Kharkov)

EDITORIAL COUNCIL

A.D.Bugrov, P.A.Kaliman, V.V.Lemeshko, 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.Zaporozhan



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1994

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Гольцев А.Н., Луценко Е.Д. Криоконсервирование как возможный метод оценки роли компонентного состава миелотрансплантата в проявлении функциональной активности кроветворных клеток (3) ✓
- Белоус А.М., Землянских Н.Г. Молекулярная динамика белков цитоскелета в норме и при воздействии температурно-осмотических факторов (14)
- Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Ломако В.В., Шило А.В., Ломакин И.И., Марченко Л.Н. Общий подход к проблеме повышения проницаемости гемато-энцефалического барьера и холодовой устойчивости организма (24) ✓
- Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф. Экспериментальное изучение кинетики гипотонического и кислотного гемолиза эритроцитов человека методом малоуглового рассеяния (32)
- Жан Ченг, Ли Юминг Исследование влияния холода на физиологические характеристики кровообращения крысы и путей их регуляции 39
- Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Роль направленности градиента по хлору в механизме развития холодового шока эритроцитов (45)

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Украинцев А.Д., Туркин В.В., Тихомирова Л.А., Саламаха О.В., Федорова М.П. Хранение культуры клеток млекопитающих при температуре -70°C . Изменения в ультраструктуре клеток после криоконсервирования 49

КРИОМЕДИЦИНА

- Белоусов Ю.В., Савво В.М., Волошина Л.Г., Солодовниченко И.Г. Тепловидение как метод контроля эффективности применения ректальной гипотермии у детей с язвенной болезнью (53)

ХРОНИКА

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

This One



FCBS-Y1G-25RA

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Goltsev A.N., Lutsenko E.D.</i> Cryopreservation as a possible method of estimation of the role of myelograft component composition in the functional activity of hemopoietic cells	3
<i>Belous A.M., Zemlyanskikh N.G.</i> The normal molecular dynamics of cytoskeletal proteins and the effect of temperature and osmotic factors	14
<i>Marchenko V.S., Babichuk G.A., Lomako V.V., Shilo A.V., Lomakin I.I., Marchenko L.N.</i> General approach to the problem of increasing the permeability of hematoencephalic barrier and body cold resistance	24
<i>Gordienko E.A., Gordienko O.I., Kovalenko I.F., Rozanov L.F.</i> Experimental studies on the kinetics of hypotonic and acidic hemolysis of human erythrocytes by the method of small angle scattering	32
<i>Zhang Cheng, Li Yuming</i> The effect of cold environment on physiological characteristics of rat circuit and a study of pathway for regulation of blood flow circulation	39
<i>Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.</i> The role of chloride gradient direction in the mechanism of cold shock in erythrocytes	45

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Ukrainsev A.D., Turkin V.V., Tikhomirova L.A., Salamakha O.V., Fedorova M.P.</i> Preservation of the mammalian cell culture at -70°C . Ultrastructural changes in cells subjected to cryopreservation	49
--	----

CRYOMEDICINE

<i>Belousov Yu.V., Savvo V.M., Voloshina L.G., Solodovnichenko I.G.</i> Thermovision as a control method for the efficiency of rectal hypothermia in infants with ulcerous disease	53
--	----

CHRONICLE

DEFENSE OF THESES

Адрес редакции:
310015 Харьков, 15,
ул. Переяславская, 23,
тел. (0572) 72-10-39

Научный редактор *А.М.Белоус*
Редактор *З.В.Линевич*
Компьютерный набор и верстка: *И.А.Жутченко, З.В.Линевич, Л.В.Смык*

Подп. в печ. 29.12.93. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.
Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии
и криомедицины АН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16,
310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ РОЛИ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА МИЕЛОТРАНСПЛАНТАТА В ПРОЯВЛЕНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК

На основании обзора данных литературы, касающихся экспериментальных и клинических исследований изменения защитного потенциала костного мозга, предпринята попытка проанализировать роль и влияние модификации количественных и качественных параметров аксессуарных клеток, обладающих регуляторной активностью по отношению к кроветворным предшественникам (Т-клеток, моноцитарно-макрофагальных и др.), в определении функционального статуса миелотрансплантата. Обсуждается возможность изменения этих параметров после криоконсервирования костного мозга и селективной элиминации регуляторных клеток при использовании различных режимов криоконсервирования. Рассматривается возможность использования костного мозга для изучения механизмов защитного действия миелотрансплантации и коррекции различных уровней регуляции гемопоэза.

Необходимость обеспечения запасов и длительного хранения костного мозга для использования в клинической практике требует решения ряда важных вопросов, касающихся фундаментальных и прикладных аспектов общей проблемы низкотемпературного консервирования и трансплантации гемопоэтической ткани. Гетерогенность клеточных популяций костного мозга, в том числе и стволовых элементов, вариабельность их морфофункциональных характеристик обуславливают сложности в выборе оптимальных условий криоконсервирования как непосредственно гемопоэтических предшественников, так и суспензии в целом. К настоящему времени накоплен достаточный экспериментальный и клинический материал, свидетельствующий о том, что при использовании самых различных методов криоконсервирования наблюдаются выраженные изменения защитного потенциала криоконсервированного миелотрансплантата в сравнении с нативным [2]. В выполненных исследованиях, направленных на расшифровку механизма влияния криоконсервирования на кроветворную ткань и изменения ее исходного состояния, основное внимание уделялось вопросам оценки сохранности и функционального состояния стволовых и коммитированных кроветворных предшественников [2, 7]. Однако современные данные в области иммуногематологии позволяют предположить возможность модификации функциональной активности миелотрансплантата не только в результате изменения состояния непосредственно кроветворных предшественников, но и функциональных параметров, количественного содержания клеточных популяций миелотрансплантата, обладающих регуляторной активностью по отношению к кроветворным предшественникам и выполняющих аксессуарную функцию в гемопоэзе [9]. Есть основания считать, что различные режимы криоконсервирования могут по-разному изменять эти параметры костного мозга [25]. Идентификация клеточных популяций, различных гуморальных субстанций, обладающих модифицирующей активностью в отношении гемопоэтической функции стволовых элементов, представляет несомненный интерес. В конеч-

ном счете эти “факторы” в совокупности представляют собой координирующее кроветворное микроокружение, в котором гемопоэз аранжируется через отдельные или взаимосвязанные пути активации или ингибиции. В условиях миелотрансплантации “кроветворное микроокружение” может представлять собой не только клеточные элементы гемопоэтического плацдарма реципиента, но и определенные клеточные субпопуляции миелотрансплантата.

Вопрос о значении компонентного состава миелотрансплантата в проявлении функциональной активности донорских кроветворных предшественников в организме реципиента с аплазией кроветворения достаточно дискуссионен и требует дальнейшего рассмотрения. Значительная часть работ, выполненных в данном направлении, посвящена оценке роли Т-лимфоцитов миелотрансплантата [9, 10], причем их результаты являются достаточно противоречивыми. В ряде работ не получены доказательства участия костномозговых Т-клеток в регуляции функциональной активности миелотрансплантата. Обработка миелотрансплантата в цитотоксическом тесте моноклональными антителами (МАТ) к антигену Thy-1,2 или ОКТ-4, ОКТ-8 не изменяла динамику восстановления иммунологических показателей реципиентов и репопуляционной активности стволовых клеток [18]. Не изменялась приживляемость миелотрансплантата и после отработки МАТ к ОКТ-3 с целью предупреждения и снижения риска развития РТПХ (реакция трансплантат против хозяина) [20].

Тем не менее, во многих исследованиях указывается на участие Т-клеток миелотрансплантата в процессе колониеобразования и направленности дифференцировки кроветворных предшественников. Показано, например, ингибирующее действие Т-клеток на колониеобразующую активность костного мозга. В частности, отмечено усиление колониеобразования в агаровых культурах после удаления $Ly-2^+$ Т-клеток. По данным Шарпа и соавт. [33], после обработки костного мозга МАТ ОКТ-3, $Ly-3$ и $Ly-1$, вызывающих гибель примерно 90% Т-клеток, колониеобразующая способность (КОЕ-ГМ) повышалась почти в два раза. Подобные результаты получены после обработки костного мозга МАТ ОКТ-3 или ОКТ-11, удаления Т-клеток методом трехкратного розеткообразования или применения соевого агглютинаина, а также иммуномагнитного метода [2]. Повышение колониеобразования костного мозга нельзя связывать только с повышением концентрации в суспензии КОЕ_к, так как не исключена возможность удаления из костного мозга Т-клеток, обладающих супрессорной активностью в отношении КОЕ_к [11].

Наряду с этим показано и снижение защитного потенциала миелотрансплантата и, как следствие, сокращение сроков выживаемости облученных животных после удаления Т-лимфоцитов. Отмечено, в частности, снижение колониеобразующей активности и изменение характера дифференцировки КОЕ_с после трансплантации костного мозга, обработанного антисывороткой, к Thy-1,2-антигену или при элиминации $Thy-1,2^+$ клеток пеннинг-методом [2, 10]. Получены доказательства наличия в костном мозге субпопуляций Т-клеток, участвующих в формировании колоний и определяющих направление дифференцировки КОЕ_с [9].

Опыт клинического применения костного мозга также показывает, что удаление из аллогенного миелотрансплантата Т-лимфоцитов, наряду со снижением риска развития РТПХ, сопровождается ухудшением приживляемости костного мозга и замедлением темпов восстановления иммунной системы реципиентов [2].

Можно предположить, что донорские Т-клетки в костном мозге необходимы для процессов саморепликации и созревания клеток-предшест-

венников, за счет которых происходит устойчивое приживание трансплантата. Установлено, что стимулирующее действие Т-лимфоцитов на кроветворение реализуется после их активации и продукции интерлейкина-3 (ИЛ-3), регулирующего рост кроветворных предшественников гранулоцитарно-макрофагального ряда, эритропоэза, мегакариопоэза, а также полипотентных предшественников [24].

В целом, анализ приведенных работ не дает однозначного ответа об участии Т-лимфоцитов костного мозга в проявлении его репопуляционной и колониеобразующей активности в организме реципиента, что может быть обусловлено применением различных методических подходов и, в связи с этим, удалением субпопуляций Т-клеток различной степени зрелости, а, следовательно, обладающих неодинаковой регуляторной активностью в отношении кроветворных предшественников [10]. Важно, что даже при условии сохранения пула Т-клеток проявление их активности, особенно в случае трансплантации костного мозга, подвергавшегося воздействию каких либо физико-химических факторов, может изменяться с изменением компонентного состава миелотрансплантата за счет других клеток, также обладающих акцессорными свойствами и оказывающими влияние на функциональный статус введенных кроветворных предшественников в кооперации с Т-клетками миелотрансплантата [10].

В последние годы активно дискутируется вопрос о роли и трансплантатбельности стромальных элементов костного мозга и их предшественников, представляющих гетерогенную популяцию так называемых ПКМЕ, переносящих кроветворное микроокружение единиц, в создании регуляторного плацдарма для введенных кроветворных клеток [17]. Клетками, переносящими гемopoэтическое микроокружение при трансплантации, могут быть адгезивные элементы костного мозга, в частности макрофаги, адипоциты, фибробластоидные и эндотелиальные клетки. Действительно, есть данные, полученные при трансплантации кариотипированного костного мозга, о том, что некоторые из КОЕ_ф, создающие гемopoэтическую строму в организме облученного реципиента, были донорского происхождения [31]. Высказывается, однако, мнение, что фибробласты и их предшественники не поддерживают гемopoэз в культуре и не переносят микроокружение *in vivo*. Этот факт говорит о том, что КОЕ_ф хотя и являются компонентом комплексной системы в виде гемopoэтической стромы, все же отличаются от совокупной популяции ПКМЕ [17]. Более того, считают, что в целом ПКМЕ, введенные *in vivo*, не вносят вклад в регенерацию гемopoэтических стромальных клеток облученного реципиента [17]. Подтверждением служат результаты, свидетельствующие, что длительная культура адгезивных клеток химер костного мозга содержит пролиферирующие стромальные клетки только реципиентского происхождения [13]. Однако вероятность выявления в костном мозге стромальных клеток донорского происхождения может зависеть от ряда условий, в том числе времени идентификации после миелотрансплантации. Так, пролонгация сроков идентификации сопровождалась увеличением процента КОЕ_ф донорского типа независимо от дозы вводимых клеток облученным животным [31].

Экспансию стромальных элементов донорского происхождения наблюдал Кеофинг [23] при трансплантации костного мозга пациентам после общего облучения и обработки реципиентов циклофосфамидом. Последнее дает основание считать, что уровень содержания стромальных клеток донорского происхождения может зависеть от степени поражения стромы реципиента. Нет, однако, ответа, участвуют ли ПКМЕ в формировании кроветворного плацдарма (непосредственно или опосредованно) в ранние сроки после облу-

чения и трансплантации костного мозга, когда наблюдается токсическое поражение гемопоэтического микроокружения реципиента, обуславливающее низкий темп пролиферации кроветворных предшественников. В этих условиях их регенерация может осуществляться гемопоэтическими ростовыми факторами, вырабатываемыми как реципиентскими, так и акцессорными клетками миелотрансплантата.

О влиянии адгезивных клеток (АК) костного мозга на функциональное состояние КОЕс сообщается в работе [22], в которой показано, что после их удаления колониеобразующая активность миелотрансплантата снижается. Добавление АК, не обладающих колониеобразующей активностью, к надсадке в прежних соотношениях восстанавливало указанную функцию костного мозга. Тем не менее, показано [21], что защитный потенциал мышинового костного мозга определяется в основном фракцией клеток, прилипающих к пластику и одновременно обладающих способностью связываться со стромальным слоем. В этой популяции находятся кроветворные предшественники, формирующие колонии *in vivo* на 12-е сутки. Если такой механизм существует *in situ*, а именно связывание кроветворных предшественников рецепторами адгезии со стромой, он может быть пусковым механизмом акцепции стволовыми элементами регуляторных сигналов, запускающих их в пролиферацию и дифференцировку. Наличие такого механизма доказывается тем, что адгезированные на пластике макрофаги, относящиеся к стромальным элементам, способны сорбировать КОЕс костного мозга и при введении вместе с ними облученным реципиентам определять направленность дифференцировки предшественников за счет продукции регуляторных медиаторов [4].

К настоящему времени накоплен достаточный экспериментальный материал, подтверждающий продукцию множества регуляторных молекул стромальными элементами костного мозга и их взаимодействие *in vivo* и *in vitro* с гемопоэтическими предшественниками. Способностью продуцировать стимуляторы и ингибиторы роста кроветворных предшественников обладают различные клеточные популяции гемопоэтической системы, входящие в состав АК: моноциты, фибробласты, эндотелиальные клетки. Обнаружены факторы, оказывающие стимулирующее влияние на колониеобразующую способность кроветворных клеток (КСФ) в системе *in vivo* и в декстеровской культуре *in vitro* [12]. Эти клетки продуцируют, в частности, стимулятор роста предшественников гранулоцитопоза – Г-КСФ, ускоряющий восстановление нейтрофилов и их предшественников при трансплантации костного мозга [24]. Показано, что Г-КСФ взаимодействует с другими гемопоэтическими регуляторами, например, фактором, стимулирующим рост макрофагальных колоний М-КСФ/КСФ-1 [27]. При этом функция КСФ-1 может быть усилена синергическим фактором (СФ), также идентифицированным в кондиционных средах АК костного мозга [27] и являющимся продуктом жизнедеятельности фибробластоподобных клеток. Клетками, входящими в состав АК, продуцируется и ГМ-КСФ, менее ограниченный в стимулирующем действии на кроветворные предшественники костного мозга [24]. Применение рчГМ-КСФ у больных после прохождения курса химиотерапии сопровождается значительным увеличением циркулирующих предшественников гранулоцитов.

Экспериментально доказано, что стимуляция миелопоэза указанными факторами осуществляется при участии выделяемых АК костного мозга интерлейкинов, в частности ИЛ, который индуцирует продукцию ГМ-КСФ клетками, входящими в состав стромальных элементов, например фибробластами [12]. При этом в проявлении стимулирующего действия прослеживается четко выраженное кооперативное взаимодействие цитокинов. Вырабатываемый

макрофагами, фибробластоподобными, эндотелиальными клетками стимулирующий полипептид ИЛ-6 действует в синергизме с ИЛ-3, усиливая появление мультилинейных бластных колоний при культивировании гемопоэтической ткани [24]. В синергизме с ИЛ-3 взаимодействуют и ИЛ-6, ИЛ-1, КСФ-1, оказывая стимулирующий эффект на КОЕ_с костного мозга, обработанного 5-фторурацилом (5-ФУ), то есть на наиболее ранние предшественники гемопоэза. Причем показано, что популяция мультифакторотвечающих клеток с высоким пролиферативным потенциалом (ВПП) изменяет те или иные функциональные параметры в зависимости от концентрации регуляторных факторов [14]. Инкубация клеток костного мозга в жидкой культуре с ИЛ-6 и ИЛ-3 увеличивает число КОЕ_с и повышает их способность восстанавливать гемопоэз летально облученных мышей. Исследователи [16] показали, что как ИЛ-6, так и ИЛ-3 в сочетании с ИЛ-1 способны сокращать G₀ период ранних стволовых клеток с последующей экспансией новых мембранных структур и тем самым переводить клетки в состояние, более чувствительное к действию гемопоэтических факторов.

Перечисленные свойства интерлейкинов, возможность идентификации и получения рекомбинантных ростовых факторов позволили внедрить их в настоящее время в клиническую практику при лечении патологических состояний гемопоэза как самостоятельный метод терапии [12], так и при трансплантации нативного и криоконсервированного костного мозга [38].

Акцессорные клетки кроветворного микроокружения могут вырабатывать факторы, обладающие не только стимулирующей, но и ингибирующей активностью. В частности показано, что моноцитарно-макрофагальные клетки могут ограничивать миелопоэз секрецией колониингибирующего фактора – простагландина Е (ПГЕ) [12]. Проявление нормального миелопоэза зависит в значительной степени от баланса между двумя взаимоисключающими (оппозитными) активностями. Уже при концентрации молекул ПГЕ 10⁻⁹М наблюдается ингибция КСФ-зависимой пролиферации КОЕ-ГМ, коммитированных в направлении моноцитов [12]. Учитывая, что клетками, ответственными за образование ПГЕ в пределах костномозгового микроокружения являются моноцитарно-макрофагальные элементы, а ГМ-КСФ увеличивает продукцию моноцитами ПГЕ, становится понятным возможный механизм обратной регуляции моноцитопоэза с участием различных субпопуляций клеток моноцитарного ряда. ГМ-КСФ может индуцировать выработку моноцитами и макрофагами еще одного модулятора кроветворения – фактора некроза опухоли (ФНО), выделяемого также лимфоцитами, эндотелиальными клетками, кератоцитами. Показан синергизм действия ФНО и ИЛ-1, проявляющийся в продукции фибробластами ПГЕ [12], обеспечении радиозащиты организма, что, по-видимому, связано со способностью ФНО ингибировать пролиферацию кроветворных предшественников, повышая порог их радиустойчивости [6]. Вместе с тем ФНО, подобно ИЛ-1, может активировать лимфоциты, но в концентрации, превышающей концентрацию ИЛ-1. ФНО активирует Т-клетки, включая экспрессию ИЛ-2 рецепторов. Усиливающее/стимулирующее действие ФНО на лимфоциты может объясняться запуском под его влиянием синтеза и выделения клетками кроветворного микроокружения ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-2.

При действии индуцирующих сигналов макрофаги, фибробласты кроветворного микроокружения, могут ингибировать пролиферацию стволовой клетки, выделяя интерфероны – ИФ α и ИФ γ [12]. Действие ИФ γ на миелопоэз не ограничивается только прямым ингибирующим действием на гемопоэтические предшественники. В низких концентрациях ИФ γ может влиять на

миелопоэз опосредовано двумя способами: с одной стороны, может увеличивать супрессивный эффект естественных киллеров, с другой – может увеличивать продукцию КСФ моноцитами и активированными Т-лимфоцитами, действуя как стимулятор.

По мнению некоторых исследователей, ингибирующие факторы колониобразования могут также продуцироваться клетками В-ряда, эритроблантами, естественными супрессорными клетками самого костного мозга [11]. Механизм регуляции самих супрессорных клеток недостаточно изучен. Предполагают [1], что одним из регуляторов костномозговой супрессии может быть гистамин ввиду его известного влияния на Т-клеточную супрессию. Это подтверждается фактом существования в костном мозге популяции клеток, несущих рецепторы к гистамину, а также обнаружением ИЛ-3-зависимой пролиферации продуцирующих гистамин тучных и базофилоподобных клеток костного мозга [1]. Имеются данные о том, что ИЛ-3 и ГМ-КСФ усиливают синтез гистамина клетками костного мозга. Т.е. предполагается существование в нормальном костном мозге системы, направленной на сдерживание пролиферативных потенций костномозговых предшественников. Запуск системы при необходимости осуществляется тимическими гормонами или иными индукторами, приводящими к синтезу костномозговыми Т-клетками полипотентного гемопоэтического фактора ИЛ-3, который, помимо всего прочего, стимулирует пролиферацию тучных клеток с последующей либерализацией гистамина. Эндогенный гистамин одновременно активирует контрсупрессоры, что приводит к снятию антимиелогенного блока и усиленному колониобразованию.

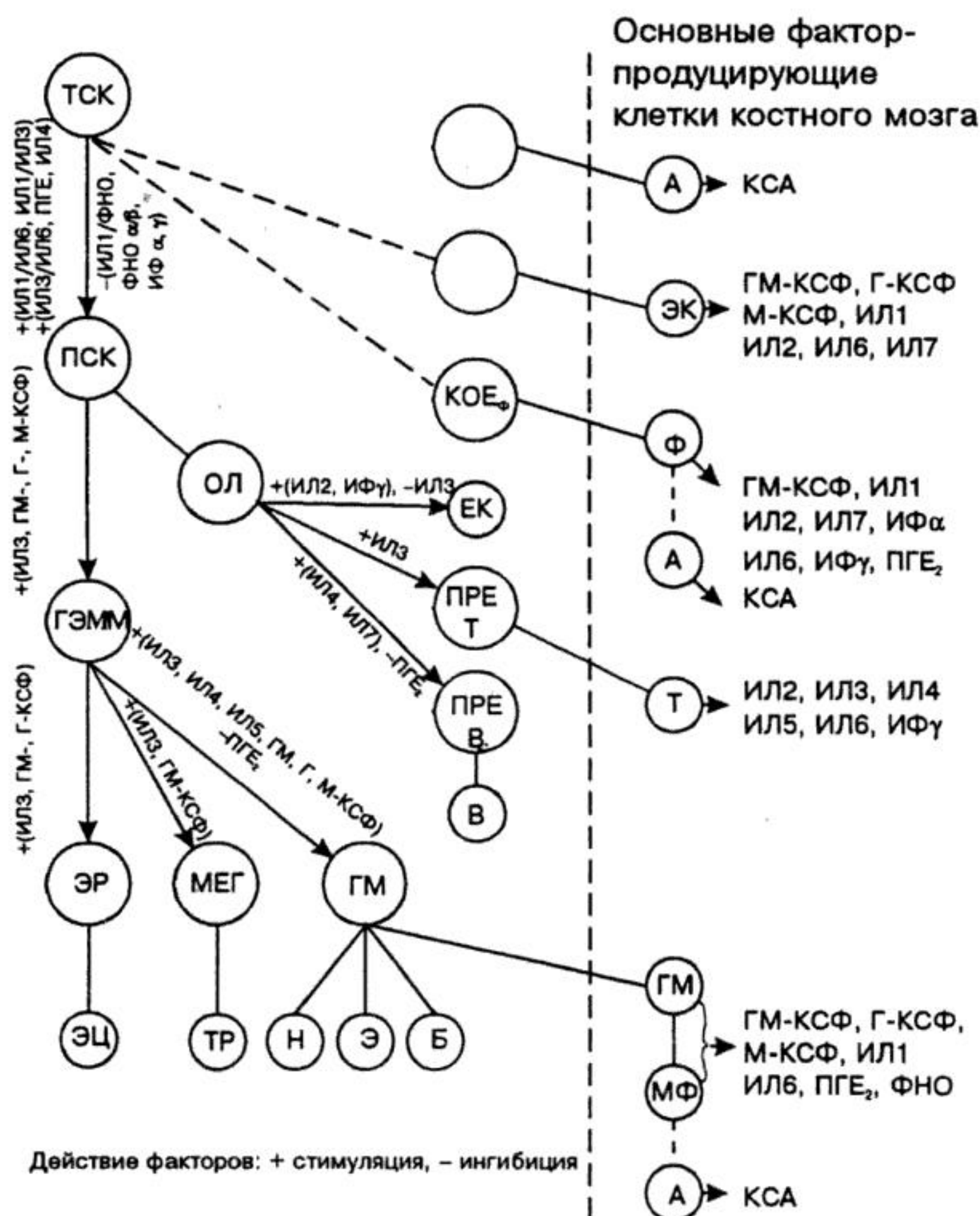
Некоторыми авторами показано присутствие в костном мозге клеток, не обладающих колониестимулирующей активностью, но вовлекаемых в регуляцию гемопоэза [32]. Такие клетки проявляют фагоцитарную активность и являются криочувствительными. Удаление этой популяции или ее гибель при криоконсервировании приводят к отмене стимулирующего действия кондиционной среды из культуры клеток плаценты человека на гемопоэз в системе *in vitro*. Приведенный анализ убедительно доказывает существование в костном мозге клеток, продуцирующих регуляторные факторы противоположного эффекта. Тем не менее вопрос регуляции пролиферации и дифференцировки КОЕ в условиях изменения баланса регуляторных факторов-ингибиторов и стимуляторов, механизма взаимоотношения продуцирующих их популяций между собой и с кроветворными предшественниками достаточно сложен и требует дальнейшего изучения. Например, удаление из костного мозга ингибиторпродуцирующей популяции не приводит к стимуляции, а стимулятопродуцирующие – к ингибции пролиферации КОЕ_c [8]. Вероятно, регуляция функции кроветворных предшественников может протекать по принципу каскадных событий с подключением самых различных промежуточных клеточных популяций. Исходя из концепции возможной трансплантатбельности акцессорных клеток костного мозга и изложенного материала, можно сделать вывод, что изменение “сбалансированного” их содержания в миелотрансплантате под действием тех или иных факторов может отражаться на функциональном статусе введенных кроветворных предшественников. Есть основания полагать, что такие изменения в содержании или функциональной активности описанных выше регуляторных клеток могут происходить и после криоконсервирования, широко используемого в настоящее время метода длительного хранения гемопоэтической ткани [7]. Например, после криоконсервирования клеток селезенки или воздействия на них гипотонического шока, ассоциированного с процессом замораживания-оттаивания, существен-

но снижается функциональная активность Т-клеток, оцененная по включению ^3H -тимидина после стимуляции митогенами. При этом в В-клетках такие изменения наблюдались в меньшей степени [34]. Кряжев [5], используя тест розеткообразования Е-, ЕАС-РОК для оценки количественного содержания Т- и В-лимфоцитов в кадаверном костном мозге до и после криоконсервирования, также показал более выраженное изменение состояния рецепторного аппарата на Т-клетках. Такие изменения, однако, не наблюдались при криоконсервировании свежезаготовленного донорского костного мозга. Не изменялся при этом и ответ Т-клеток костного мозга в СКЛ. Возможно, что такие различия – следствие различных модификаций мембранных структур еще до криоконсервирования за счет альтерации последних в процессе аутолиза клеток. Вместе с тем надо учитывать, что более существенная роль в изменении количественных и качественных параметров Т-клеток костного мозга, по крайней мере экспериментальных животных мышей, принадлежит используемому режиму замораживания–оттаивания [28]. Так, при определении поглощения кислорода тимоцитами, криоконсервированными с 10%-ми ПЭО и ДМСО, отмечено, что добавление сукцината в инкубационную среду значительно стимулировало (в 3 раза) дыхание клеток, криоконсервированных под защитой ПЭО-400, и только в 1,3–1,4 раза – под защитой ДМСО, что свидетельствует о более выраженном повреждении плазматических мембран клеток в случае применения ПЭО-400 [7]. Более того, на примере Т-лимфоцитов периферической крови показано, что даже при одних и тех же режимах криоконсервирования структурные и функциональные свойства клеток могут селективно и индивидуально изменяться. На фоне незначительного снижения общего количества Т-клеток, выделенных методом розеткообразования с эритроцитами барана, значительно снижалось количество T_μ и T_γ клеток, что говорит о большей криочувствительности Fc-рецепторов, чем Е-рецепторов [30]. Показана различная степень бласттрансформирующей активности криоконсервированных в одном режиме Т-клеток на митоген фитолакки и ФГА [35]. Авторами отмечено, что снижение числа жизнеспособных Т-клеток после замораживания–отогрева ассоциировалось со снижением интенсивности ответа на фитолакку, указывая на возможность селективной гибели этой субпопуляции при криоконсервировании.

Значительный интерес представляют работы по криоконсервированию и оценке функциональной активности стромальных элементов костного мозга. Босвелл [15] показал, что стромальные предшественники костного мозга мышей могут быть успешно криоконсервированы и после отогрева способны формировать микроокружение в длительной культуре. Жильбер [19] также считает, что техника длительного культивирования костного мозга может быть использована для оценки функционального состояния криоконсервированного миелотрансплантата. Следует, однако, отметить, что сохранность стромальных элементов, так же как и отмеченная выше сохранность Т-лимфоцитов, может зависеть от выбора метода криоконсервирования. Криоконсервирование костного мозга под защитой 10%-го ДМСО со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -20°C с последующим погружением образцов в азот обеспечивало 45–50%-ную сохранность $\text{КОЕ}_\text{ф}$, а криоконсервирование с ПЭО–400 в аналогичной концентрации и с такой же скоростью замораживания обеспечивало жизнеспособность не более 10–15% $\text{КОЕ}_\text{ф}$ [3]. При этом наблюдается определенная корреляция между сохранностью предшественников стромальных элементов при тех или иных режимах криоконсервирования и колониеобразующей функцией трансплантируемого костного мозга ($\text{КОЕ}_\text{с}$).

На основании имеющихся данных о наличии в костном мозге различных типов аксессуарных клеток есть основание считать, что криоконсервирование может влиять на каждую из этих клеточных популяций. В экспериментах [26], в частности, показано, что при трансплантации криоконсервированного костного мозга под защитой 10%-го ДМСО количество колоний миелоидного типа существенно не изменялось в сравнении с трансплантацией нативного костного мозга, но снижалось количество колоний эритроидного типа на фоне увеличения колоний смешанного типа. Вместе с тем трансплантация костного мозга, криоконсервированного под защитой глицерина или ПЭО-400, сопро-

Схема возможных межклеточных взаимодействий в регуляции гемопоэза



ТСК – тотипотентная стволовая клетка; ПСК – полипотентная стволовая клетка. Предшественники: ГЭММ – гранулоцито-макрофагально-эритро-мегакариоцитарный; ГМ – гранулоцито-макрофагальные; ЭР – эритроидные; МEG – мегакариоцитарные; ОЛ – общий лимфоидный; ПРЕ-В – В-лимфоцитов; ПРЕ-Т – Т-лимфоцитов; А – адипоцит; ЭЦ – эритроцит; ТР – тромбоцит; Н – нейтрофил; Э – эозинофил; Б – базофил; М – моноцит; МФ – макрофаг; Ф – фибробласт; ЭК – эндотелиальная клетка; Т, В – лимфоциты; ЕК – естественные киллеры

вождалась преимущественным формированием колоний эритроидного типа за счет снижения в 1,5–2 раза колоний миелоидного типа [7]. Не исключая возможности преимущественной гибели/инактивации при различных режимах криоконсервирования кроветворных предшественников, формирующих тот или иной тип гемопоэтических колоний [2], развитие такой феноменологии можно в полной мере отнести за счет изменения после криоконсервирования качественных и количественных параметров акцессорных клеток костного мозга, определяющих направление дифференцировки КОЕ_с [25]. В этой связи представляют интерес работы [36], в которых на примере мононуклеаров периферической крови человека показано, что после программного замораживания суспензии со скоростью 1 °С/мин до –70 °С с использованием 10%-го ДМСО наблюдается дисбаланс между популяцией моноцитов, продуцирующей ИЛ-1, способной обуславливать экспансию миелоидного ростка кроветворения [4, 29] и популяцией, погибающей после криоконсервирования, обладающей супрессорной активностью в отношении иммунокомпетентных клеток за счет продукции ПГЕ. В результате суспензия криоконсервированных мононуклеаров в большей степени, чем свежие клетки, продуцировала ИЛ-1. При использовании иного режима криоконсервирования – непрограммного замораживания до –70 °С, указанные субпопуляции оставались в прежнем соотношении. Более поздние работы [37] показали, что при программном замораживании мононуклеаров погибают СД-8⁺-клетки, через которые реализуют свое супрессивное действие ПГЕ-2-образующие клетки и которые ингибируют продукцию ИЛ-2. Конечным результатом исследований является демонстрация более высокой продукции криоконсервированными мононуклеарами ИЛ-2. Костный мозг также содержит естественные клетки супрессоры [11] и доказательством того, что криоконсервирование может элиминировать эту субпопуляцию регуляторных клеток костномозгового микроокружения, является большая продукция ИЛ-2 криоконсервированными клетками костного мозга, чем нативными [25].

Таким образом, анализ представленных работ дает основание считать, что в костном мозге млекопитающих присутствуют клеточные популяции, обладающие “трансплантабельностью” и выполняющие акцессорные функции в отношении регуляции функционального статуса донорских кроветворных предшественников и гемопоэза в целом. Следовательно, защитный потенциал (функциональная полноценность) миелотрансплантата определяется сохранностью не только кроветворных предшественников, но и клеток, представляющих собой компоненты координирующего кроветворного микроокружения. Эти клетки могут проявлять различную устойчивость к действию физико-химических факторов, реализуемых в процессе замораживания–оттаивания, и в таком случае криоконсервирование имеет не только прикладное значение при решении проблемы длительного хранения гемопоэтической ткани, но также может выступать в роли фактора селекции, элиминирующего из костного мозга при различных режимах замораживания–отогрева те или иные субпопуляции акцессорных элементов. В связи с этим криоконсервирование может рассматриваться как дополнительный инструмент в расшифровке механизма защитного действия миелотрансплантации, определении и коррекции различных уровней регуляции миелопоэза, изменения “иммуноагрессивного” потенциала костного мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляев Н.Н., Закирьянова Г.К. Антимитогенный фактор костного мозга и его регуляция гистамином // Иммунология. – 1991. – № 3. – С. 27–30.

2. Голыцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на иммунобиологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. ... д-ра мед. наук. – Харьков, 1988. – 35 с.
3. Голыцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток КОЕ_с в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Проблемы криобиологии. – 1993. – № 4. – С. 34–40.
4. Кравцов В.Д., Ласунская Е.Б., Фрейдлин И.С. Взаимодействие макрофагов и стволовых кроветворных клеток мышей *in vivo* и *in vitro* // Цитология. – 1989. – 31, № 8. – С. 359–362.
5. Кряжев Л.Н., Стражникова Г.А., Пластинина А.Н. Содержание Т- и В-популяций лимфоцитов в кадаверном костном мозге // Гематология и трансфузиология. – 1987. – 32, № 12. С. 29–31.
6. Кривенко С.И., Карканица Л.В., Санин А.В. Изучение радиопротективных эффектов рекомбинантного фактора некроза опухолей для кроветворных предшественников мыши // Иммунология. – 1991. – № 5. – С. 32–35.
7. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А.А.Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
8. Лорд Б.И., Цырлова И.Г. Эндогенные регуляторы пролиферации гемопоэтических колониобразующих клеток: их роль в защите стволовых кроветворных клеток и регуляции гуморального иммунного ответа // Иммунология. – 1983. – № 4. – С. 32–34.
9. Манько В.М., Поверенный А.М., Батырбеков А.А. и др. Изменение направления дифференцировки стволовых клеток костного мозга при удалении Т-лимфоцитов антимозговой сывороткой // Иммунология. – 1983. – № 4 – С. 32–34.
10. Мирошниченко И.В., Ярилин А.А., Шарова Н.И. и др. Активированные предшественники Т-лимфоцитов, несущие Thy-1 антиген // Иммунология. – 1987. – № 2. – С. 29–32.
11. Цырлова И.Г. Межсистемные взаимодействия в регуляции гуморального иммунитета; иммуносупрессорные клетки эритроидной природы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Новосибирск, 1987. – 30 с.
12. Aglietta M. Positive and negative signals in the control of myelopoiesis // Haematologica. – 1989. – 74, № 1. – P. 121–127.
13. Bentley S.A., Knutsen T., Whang-Peng J. The origin of hematopoietic microenvironment in continuous bone marrow culture // Exp. Hematol. – 1982. – 10, № 3. – P. 367–372.
14. Bertoncello I., Kriegler A.B., Bradley T.R. The effect of interleukin-6 on hemopoietic stem cell subsets resolved by Rhodamine 123 // Exp. Hematol. – 1990. – 18, № 6. – P. 550–554.
15. Boswell A. Cryopreservation of marrow and stromal progenitor cells: use of long-term liquid culture as a measure of the recovery of renewable hemopoietic and stromal cells // Exp. Hematol. – 1983. – 11, № 4. – P. 315–323.
16. Brandt J.E., Srouf E.F., Leemhuis T. Acquisition of class II major histocompatibility antigen by human CD34⁺, HLA-DR⁺ marrow cells *in vitro* is cytokine-dependent and associated with entrance into cell cycle // Exp. Hematol. – 1990. – 18, № 6. – P. 557–561.
17. Chertkov J.L., Drize N.J., Gurevitch O.A. et al. Origin of hemopoietic stromal progenitor cells in chimeras // Exp. Hematol. – 1985. – 13, № 11. T P. 1217–1223.
18. Geissler D., Konovalinka G., Poschel C. et al. The repopulation capacity of bone marrow grafts following pretreatment with monoclonal antibodies against T lymphocytes in rhesus monkeys // Transplantation. – 198. – 45, № 2. – P. 301–307.
19. Gilibert R., Ayats R., Puntì C. Autologous bone marrow transplantation: interest of long term bone marrow cultures (LTBMC) in assessing grafting ability // Exp. Hematol. – 1990. – 19, № 6. – P. 457–463.
20. Gilmore M.J., Prentice H.G., Jones E.P. et al. Allogenic bone marrow transplantation: the monitoring of granulocyte macrophage colonies following the collection of bone marrow mononuclear cells and after the subsequent *in vitro* cytolysis of OKT 3 positive lymphocytes // Br. J. Haematol. – 1983. – 55, № 4. – P. 587–595.
21. Gordon M.J., Bearpark A.D., Clarke D. Haemopoietic stem cell subpopulations in mouse and man: discrimination by differential adherence and marrow repopulating ability // Bone Marrow Transplantation. – 1990. – 5, № 12. – P. 6–7.
22. Kannourakis J. Fractionation of normal and beta-thalassemic human hemopoietic progenitor cells by immunomagnetic beads // Exp. Hematol. – 1987. – 5, № 11. – P. 1103–1109.
23. Keofing A., Singer J.W., Killen P.D. Donor origin of the *in vitro* hematopoietic microenvironment after marrow transplantation in man // Nature. – 1982. – 298, № 2. – P. 280–286.
24. Leary A.C., Ikebuchi K., Hirai Y. et al. Sinergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha // Blood. – 1988. – 71, № 6. – P. 1759–1763.
25. Lei C.M., Yoezheng Q., Meng P.L. Interleukin-2 production of human marrow cells increased significantly after cryopreservation // Cryobiology. – 1990. – 27, № 6. – P. 627(a).
26. Liu P., Poon K., Crook L. et al. Hemopoietic activities of cryopreserved murine fresh and postmortem bone marrow cells // Cryobiology. – 1979. – 16, № 4. – P. 513–516.
27. McNiece I.K., Bradley T.R., Kriegler A.B. Detection of murine hemopoietin-1 in media conditioned by EMT6 cells // Exp. Hematol. – 1987. – 15, № 8. – P. 854–858.

28. *Milson T.J., Keller R.H.* The variable effect of cryopreservation on peripheral blood mononuclear populations // *J. Clin. Lab. Immunol.* – 1982. – 7, N. 1. – P. 205–213.
29. *Morrissey P., Charrier K. et al.* The influence of IL-1 treatment on the reconstitution of the hemopoietic and immune systems after sublethal radiation // *J. Immunol.* – 1988. – 140, N. 4. – P. 4204–4210
30. *Pustai-Markos Z., Ebenfeld R., Scheinve H.* Fc receptor human T lymphocytes in frozen-thawed peripheral blood cells // *Cryobiology.* – 1984. – 21, N. 4. – P. 427–434.
31. *Riersma A., Brackbank K., Ploemacher R.* Recovery of hemopoietic stromal progenitor cells after lethal total-body irradiation and bone marrow transplantation in mice // *Transplantation.* – 1985. – 40, N. 2. P. 198–201.
32. *Schlunk T., Ruber E., Schleyer M.* Survival of human bone marrow progenitor cells after freezing: improved detection in the colony-formation assay // *Cryobiology.* – 1986. – 18, N. 2. – P. 111–117.
33. *Sharp T., Sachs S., Fanci A. et al.* T-cell depletion of human bone marrow using monoclonal antibody and complement-mediated lysis // *Transplantation.* – 1983. – 35, N. 2. P. 112–120.
34. *Strong D., Sell K., Greif D.* Differential susceptibility of murine T and B lymphocytes to freeze-thaw and hypotonic shock // *Cryobiology.* – 1974. – 11, N. 2. – P. 127–138.
35. *Venkataraman M., Westerman M.P.* Susceptibility of human T-cells, T-cell subsets and B cells to cryopreservation // *Cryobiology.* – 1986. – 23, N. 2. – P. 199–308.
36. *Venkataraman M., Westerman M.P.* Cryopreservation enhances interleukin-1 production in human mononuclear cells // *Cryobiology.* – 1990. – 27, N. 2. – P. 137–142.
37. *Venkataraman M.* Cryopreservation-induced enhancement of interleukin-2 production in human peripheral blood mononuclear cells // *Cryobiology.* – 1992. – 29, N. 2. – P. 165–175.
38. *Yang J., Liu B.L., Tang J.M. et al.* Effects of murine multi-CSF (IL-3) and cryopreservation on bone marrow and hematopoietic stem cells in murine // *Cryobiology.* – 1988. – 25, N. 6. – P. 487.

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

Поступила 09.02.93

А.М.ГОЛЬЦЕВ, О.Д.ЛУЦЕНКО

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЯК МОЖЛИВИЙ МЕТОД ОЦІНКИ РОЛІ КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ МІЕЛОТРАНСПЛАНТАТА В ВИЯВЛЕННІ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КРОВОТВОРНИХ КЛІТИН

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

На підставі огляду даних літератури стосовно експериментальних і клінічних досліджень змін захисного потенціалу кісткового мозку зроблено спробу проаналізувати роль і вплив модифікації кількісних і якісних параметрів аксесорних клітин, які мають регуляторну активність по відношенню до кровотворних попередників (Т-клітин, моноцитарно-макрофагальних і ін.), в визначенні функціонального статусу міелотрансплантата. Обговорюється можливість змінення цих параметрів після кріоконсервування кісткового мозку і селективної елімінації регуляторних клітин при використуванні різних режимів кріоконсервування. Розглядається можливість використання кріоконсервування кісткового мозку для вивчення механізмів захисної дії міелотрансплантації і корекції різних рівнів регуляції гемопоезу.

A.N. GOLTSEV, E.D. LUTSENKO

CRYOPRESERVATION AS A POSSIBLE METHOD OF ESTIMATION OF THE ROLE OF MYELOGRAFT COMPONENT COMPOSITION IN THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF HEMOPOIETIC CELLS

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

Basing of the review of literature data concerning experimental and clinical studies on the changes in protective potential of bone marrow, an attempt has been made to analyze the role of modification of quantitative and qualitative parameters of accessory cells having the regulatory activity to hemopoietic precursors (T-cells, monocyte-macrophage cells, etc.) in the functional status of myelograft. The possibility of changes in these parameters after bone marrow cryopreservation and selective elimination of regulatory cells using different freezing regimes is discussed. A possibility to use cryopreserved bone marrow to study the mechanisms of protective action of myelotransplantation and correction of different levels of hemopoiesis regulation is considered.

А.М.Белоус, Н.Г.Землянских**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА В НОРМЕ И ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**

В работе проанализирован литературный материал, посвященный вопросам структурной организации цитоскелета и его роли в поддержании целостности клетки. Особое внимание уделено влиянию температуры и криопротекторов на состояние элементов цитоскелета, степень полимеризации и их регуляцию различными клеточными системами.

Белки цитоскелета играют важную роль в стабильности клеток [1] при воздействии экстремальных температур и осмотически активных факторов (криоконсерванты, криопротекторы). Это связано с тем, что F-филаменты и микротрубочки образуют прочные связи с якорными белками мембраны, поддерживая тем самым форму и объем клетки. Во-вторых, цитоскелетные структуры регулируют пространственное распределение внутриклеточных органелл и макромолекул, которые интегрируют процессы метаболизма и рецепции. В случае необратимого повреждения трехмерной сети цитоскелетных белков в условиях криоконсервирования клетки становятся нежизнеспособными.

В третьих, структурно-функциональная перестройка белков цитоскелета в направлении золь $\rightleftharpoons$ гель может являться важной для торможения (или активации) метаболических реакций в процессе баутов гибернирующих животных и холодового оцепенения пойкилотермных.

В данном сообщении суммированы литературные и собственные данные, касающиеся участия белков цитоскелета в ответной реакции клеток при температурно-осмотическом воздействии. Все эукариотические клетки содержат три типа цитоскелетных структур – микрофиламенты, микротрубочки, промежуточные филаменты и различные “минорные белки”, которые контролируют стабильность и полимерное состояние, а также связь с плазматическими мембранами актиновых и тубулиновых систем. При стрессовых температурных и (или) осмотических воздействиях особое значение имеют процессы, связанные с фазовыми перестройками тубулина и актина, которые являются основными белками, формирующими сеть микрофиламентов и микротрубочек в клетке [11].

Мономерная форма G-актина – это белок с м. м. 41,5 кДа, который содержит стабилизатор – прочно связанный один ион Ca^{2+} , и одну молекулу АТФ, ассоциированную с белком слабыми связями. F-актин представляет полимерную форму и формирует тонкие микрофиламенты, образующие трехмерную сеть в цитоплазме. При поступлении в клетку внешнего сигнала с плазматической мембраны соотношение G и F-актина в цитозоле изменяется, что влияет на вязкость белков и пространственное расположение органелл, изменяя их функциональную активность. Полимеризация актина, осуществляемая в два этапа, происходит при достижении критической концентрации G-актина, соответствующей величины ионной силы раствора, pH и температуры [4]. Так, скорость этого процесса максимальна при концентрации KCl и NaCl в диапазоне 0,10–0,15 М [4]. Ионы Ca^{2+} , наоборот, подавляют полимеризацию микротрубочек и актина, если их концентрация в цитозоле повышается. Процесс

сборки G-актина в F-микрофиламенты стимулируется в присутствии АТФ, а также различных минорных актинсвязывающих белков. Как видно, одни из них образуют прочные связи между филаментами и способствуют их полимеризации, а другие, фрагментирующие белки, регулируют длину отдельных филаментов или микротрубочек.

Функциональная активность большинства “минорных” актинсвязывающих и фрагментирующих белков прямо или опосредовано регулируется уровнем $[Ca^{2+}]_{in}$, продуктами распада фосфоинозитольных липидов и кальмодулином.

“Минорные” белки цитоскелета (α -актинин, винкулин, виментин, спектрин и др.) в посттрансляционном периоде подвергаются ковалентным модификациям: фосфорилированию, ацетилированию, метилированию, карбоксилированию и частичному протеолизу. Наиболее изученным является процесс фосфорилирования белков, который контролируется активностью двух ферментативных систем – протеинкиназами и фосфатазами, различающимися по своему отношению к специфическим субстратам, кофакторам и субклеточному распределению. Существуют мембраносвязанные и растворимые цитозольные формы этих ферментов, которые весьма чувствительны к изменению уровня цАМФ, Ca^{2+} , фосфоинозитидов и кальмодулина. Например, согласно данным [6] активаторы протеинкиназы С регулируют объем и изменяют форму клеток, что сопровождается усилением фосфорилирования белков цитоскелета. При этом следует иметь в виду, что в цитоплазме ядродержащих клеток содержится большое число регуляторных белков, контролирующих полимерное состояние микротрубочек и актиновых филаментов.

В последнее время открыты новые типы цитозольных “минорных” белков, регулирующих состояние белков цитоскелетной сети. Так например, цитосипалин и аддуцин – кальмодулинзависимые белки, связывающие тубулин или актин с другими цитоскелетными белками; кофилин – белок с м. м. 21 кДа, контролирующий процесс поли- и деполимеризации G-актина; талин – актинсвязывающий белок, семейство кольпактинов, Ca^{2+} – связывающие белки мембранного скелета и ряд других [22].

Существенную роль в регуляции стабилизации состояния белков цитоскелета и геометрии клеток играют внутриклеточные протеинкиназы, основная масса которых локализована в сети микрофиламентов под плазматической мембраной. Различные сигнальные вещества, связывающиеся с рецепторами мембран, могут оказывать влияние на цитоскелетные белки именно через изменение функции протеинкиназ.

Нами установлено [5], что при 0 °С и осмотическом сжатии эритроцитов человека, вызванном гипертоническим раствором полиэтиленоксида, увеличивается включение ^{32}P в белки спектрин-актинового комплекса в тенях эритроцитов. Одной из возможных причин этого феномена может быть изменение активности сАМР – независимой спектринкиназы, либо структурные изменения субстрата фосфорилирования – спектрина в условиях температурно-осмотического воздействия на клетку.

Второй основной компонент клеточного цитоскелета – система микротрубочек состоит из тубулина – глобулярного белка, образованного α - и β -цепями. Тринадцать таких гетеродимеров, соединяясь друг с другом, образуют цилиндрическую структуру. Полимеризация тубулина сопрово-

ждается гидролизом одной молекулы GTP и протекает в 2 этапа: нуклеация и элонгация. Эффективность полимеризации зависит от так называемых MAP_s-белков (microtubule associated proteins), одни из которых (кинезин) могут перемещаться по микротрубочкам, используя энергию гидролиза АТР, а другие MAP-2 с м. м. около 300 кДа и τ -белки (55–60 кДа) являются ассоциированными с микротрубочками слабыми связями и обладают способностью стимулировать их полимеризацию. В изолированном состоянии эти белки являются термостабильными. Существует еще одна группа MAP – так называемые STOP-белки, которые обладают свойством ингибировать деполяризацию тубулина. Также как и актиновые филаменты, микротрубочки, построенные в основном из тубулина, определяют геометрию клетки и играют роль системы, регулирующей пространственную организацию клетки и внутриклеточный транспорт везикул и органелл в нужное место.

В системе *in vitro* MAP и τ -белки способны не только ускорять полимеризацию и конденсировать трубочки в пучки [9], но и взаимодействовать с актиновыми и промежуточными филаментами. Вискозиметрические исследования показывают, что в присутствии MAP2 и γ -белков вязкость смеси микротрубочек и микрофиламентов существенно повышается [9]. Существует мнение, что MAP2-белки принимают участие в прикреплении мембранных структур эндоплазматического ретикулума и митохондрий к трубочкам. В связывании микротрубочек с мембранными структурами могут участвовать и другие белки, например, спектрин из мозга животных [11].

Регуляция полимерного состояния микротрубочек осуществляется путем фосфорилирования MAP1 и MAP2 различными cAMP-зависимыми протеинкиназами, а также киназой – рецептора EGF, специфической MAP2-киназой, Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназой и инсулин-зависимой протеинкиназой.

В настоящее время структура и функция белков микротрубочек в условиях нормы и некоторых видах патологии достаточно хорошо описаны [9, 13]. Вместе с тем сведения о влиянии холода и криопротекторов на их свойства весьма ограничены. В отличие от актина, полимеризация тубулина *in vitro* происходит в основном в присутствии GTP.

При обработке клеток коллемеидом, винбластином, винкристином или колхицином микротрубочки деполимеризуются и распадаются [11]. Процесс деполимеризации микротрубочек обусловлен тем, что эти вещества связываются с тубулиновым димером и устраняют его из участия в процессе полимеризации. В регуляции структурного состояния белков цитоскелета важную роль играет Ca^{2+} . Его взаимодействие с кальмодулином изменяет активность ферментативных систем, регулирующих свойства белков цитоскелета. Регуляторное действие на агрегатное и конформационное состояние белков цитоскелета комплекса Ca –кальмодулин опосредуется кальмодулин-связывающими белками, которые в свою очередь ассоциированы с F-актином и тубулином (таблица).

Установлено [33], что Ca^{2+} -зависимое связывание кальдесмона и τ -белков с кальмодулином препятствует взаимодействию их с актином и тубулином. Из этого следует, что связывание этих белков с кальмодулином или белками цитоскелета зависит от концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$, который модулирует их структурно-функциональное состояние.

Поскольку основная масса актина локализована преимущественно на периферии клеток, изменение ее гелеобразной структуры оказывает существенное влияние на устойчивость плазматической мембраны и клетки в целом.

Таким образом, в клетках существует достаточно сложная регуляторная система, контролирующая состояние белков цитоскелета и, в частности, силу их ассоциации с плазматической мембраной. При анализе роли белкового цитоскелета в стабильности (или нестабильности) клеток в условиях криоконсервирования важное значение имеют вопросы, связанные с действием температуры, осмотических факторов либо их комбинаций. Говоря о температурном факторе, в настоящее время, согласно большинству данных [26], единая микротрабекулярная сеть уже при охлаждении клеток до 4 °С распадается аналогично тому, как это происходит при удалении из клеток Mg^{2+} или добавлении цитохалазинов и колхицинов.

Однако это не всегда связано с потерей их устойчивости к действию замораживания. При определенных условиях процесс распада цитоскелетной сети может быть причиной холодостабильности клеток. Изменение осмотичности среды также сильно влияет на цитоскелетную систему. В частности, при эквilibрации клеток в различных гипертонических растворах электролитов и неэлектролитов формируются спиккулы на поверхности мембраны, что связано с локальным скоплением в этих местах цитоскелетных белков, которые подвергаются биохимической модификации (окисление SH-групп в актине и образование высокомолекулярных агрегатов) [28]. Причиной спиккулообразования может быть также Ca^{2+} -зависимая активация системы мембранных рецепторов доменов и протеинкиназ, регулирующих прямо или косвенно функцию белков цитоскелета. Снижение уровня АТФ в клетке также оказывает аналогичный ответ. В работе [7] показано, что при стимуляции рецепторных доменов макрофагов биологически активными соединениями происходит полимеризация актина в примембранных областях, изменяется форма и динамика клетки. Считают, что основная роль в изменении состояния актиновых микрофиламентов принадлежит гелъзолину, активность кото-

Кальмодулинсвязывающие белки (КСБ), ассоциированные с основными протеинами цитоскелета

Наименование	Основные белки цитоскелета, ассоциированные с КСБ	Тип биоматериалов, содержащих КСБ
Кальдесмон	F-актин	Мышца желудка, аорта, матка, тромбоциты, культивированные клетки почек
Белок 135 кДа	F-актин	Мускульный желудок куриных эмбрионов
Кальспектрин/фодрин/	F-актин	Мозг, надпочечники, гипофиз
Тау-фактор (τ-белки)	Тубулин	Мозг (микроканалыцы)

рого регулируется Ca^{2+} и фосфоинозитами. В присутствии микромолярных концентраций Ca^{2+} гелъзолин активно связывается с боковой поверхностью актиновых филаментов, реализуя процесс фрагментации и кэпирования белков. Фосфоинозиты, в частности фосфатидил - 4,5-бифосфат и фосфоинозит-4-монофосфат, также участвуют в активировании взаимодействия гелъзолина с актином. При частичной дегидратации клеток в гипертонических растворах криопротекторов в цитозоле скорее всего формируется стабильный гелъ. При этом, если исходная дегидратация, инициирующая формирование гелъа, комбинируется с температурой до 0 °С, клетка приобретает повышенную устойчивость к действию замораживания. Снижение температуры до 0 °С, как фактор повышения устойчивости клеток, в опытах *in vitro* на изолированных цитоскелетах эритроцитов приводило к повышению их устойчивости к диссоциирующему действию гипертонических растворов NaCl [2]. Влияние пониженных температур на стабильность цитоскелетных гелъей по всей видимости связано с реорганизацией взаимодействий различными типами цитозольных белков. Например, в работе [27] показано, что скорость ассоциации и диссоциации в системе, сформированной из актина и α -актинина, является функцией температуры, и скорость сшивок между белками с температурой возрастает. Снижение температуры до 4 °С или повышение концентрации Ca^{2+} вызывает обычно распад, а повышение температуры и снижение указанного выше катиона в цитоплазме – сборку микротрубочек. Деполимеризация микротрубочек как и актиновых филаментов сильно нарушает жизнедеятельность клетки, поскольку разрушение этой системы дезорганизует структурную организацию промежуточных филаментов. Однако в тех случаях, когда STOP-белки блокируют процесс деполимеризации микротрубочки могут сохранять свои свойства и при низких температурах. Полагают [9], что это происходит в результате кэпирования STOP-белками полярных концов микротрубочек.

Инфузории, которые содержат 2 типа систем микротрубочек – цитоплазматическую и кортикальную, при низкой температуре могут полностью сохранять стабильность кортикальной системы, где более высокое содержание ацетилированных форм тубулина [30]. Показано, что микротрубочки, содержащие ацетилированный α -тубулин, более стабильны к градиентам температур. Количество холодоустойчивых микротрубочек зависит также и от концентрации динеина, добавление которого делает их холодоустойчивыми. Считают [17], что имеется некий фактор, не входящий в активный центр АТФазы динеина, но присутствующий в его составе, который может придавать холодоустойчивые свойства этой цитоскелетной системе.

Состояние микротрубочек в основном контролируется уровнем Ca^{2+} , который ингибирует их сборку, влияя непосредственно на тубулин, или вызывает кальмодулин-зависимое ингибирование, в котором участвуют τ -MAP-2 белки. При физиологических величинах ионного состава в клетке деполимеризация микротрубочек под влиянием Ca^{2+} или комплексом Ca^{2+} -кальмодулином менее чувствительна к Ca^{2+} , чем сборка [33].

В работе [10] в опытах *in vitro* установлено, что при замораживании актина как в мономерной, так и полимерной форме он подвергается конформационным и агрегатным изменениям после отогрева нарушается. Из

такого замороженного состояния процесс полимеризации и деполимеризации этого белка. Вместе с тем в составе клетки при взаимодействии с другими компонентами цитоскелета и охлаждении до 0 °C актин может формировать гели, которые более устойчивы к действию ультранизких температур и осмотическим факторам [3]. Изменение объема и формы эритроцитов под влиянием осмотических факторов опосредуется комплексом спектрин-белок 4.1-актин и комплексом актин-белок 4.9-миозин. Согласно данным [7] уменьшение объема эритроцитов крысы в гипертонических средах сопровождается увеличением скорости Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта и Na^+/H^+ обмена. Подобного рода объем-зависимая регуляция переносчиков устраняется при тепловой инактивации спектрина и мало зависит от присутствия ингибиторов кальмодулина, протеинкиназы C и G_i -белка.

Таким образом, согласно имеющимся данным [7], ансамбли определенных белков цитоскелета являются необходимым компонентом механизма объемзависимой регуляции транспорта указанных выше ионов, который может не включать в себя стадии, связанные с активацией протеинкиназ вторичными мессенджерами (циклические нуклеотиды, Ca^{2+}). Важно, что при осмотическом сжатии в эритроцитах повышается концентрация Ca^{2+} [8], нарушающая состояние примембранного комплекса цитоскелета.

Структурно-функциональное состояние белков цитоскелета достаточно интенсивно изменяется под влиянием криопротекторов. В экспериментах [35] на гепатоцитах в первичной культуре клеток показано, что инкубация с 2%-м ДМСО приводит к значительным изменениям распределения актиновых фибрилл в клетках, в результате чего они становятся более компактными, а на периферии формируются примембранные кольцевые структуры. При этом ДМСО индуцирует в гепатоцитах резкое повышение концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$, которое осуществляется как в результате высвобождения Ca^{2+} из внутренних депо, так и за счет входа $\text{Ca}^{2+}_{\text{out}}$ через плазматическую мембрану. Существенную роль в репарации белков цитоскелета играют не только отдельные виды криопротекторов, но и экзогенные нуклеотиды. Отдельные данные [24] указывают, что в присутствии ДМСО или глицерина, а также негидролизующих аналогов GTP (гуанилимидодифосфат, гуанил- β , γ -метилендифосфат), АТР или ИТР поддерживается стадия элонгации микротрубочек. Эти соединения включаются в Е-участки полимеризованного тубулина и ингибируют их разборку, которая наступает в отсутствие GTP. Поэтому стабильность микротрубочек может быть повышена продуктами GTP, которые формируют ковалентно ассоциированные комплексы с тубулином. Согласно данным [25], при гидролизе GTP в GDP происходит деполимеризация микротрубочек, которая может быть предотвращена растворами глицерина, который увеличивает скорость начальной стадии сборки и тормозит деполимеризацию микротрубочек. Некоторые ионы (например Mg^{2+}) увеличивают скорость как сборки, так и диссоциации микротрубочек в зависимости от концентрации в среде.

При экспонировании яйцеклеток коровы в растворах 1,5 М этиленгликоля и пропиленгликоля распределение актина в цитоплазме было нормальным, однако при этом происходило уменьшение размеров митотического веретена, которое изменяет свою форму в зависимости от структурного состояния F-микрофиламентов и микротрубочек [32]. У

яйцеклеток, криоконсервированных с ДМСО, распределение актина носило точечный характер, подмембранный цитоскелетный слой выглядел прерывистым, а клетки после удаления криопротектора свой объем не восстанавливали. При этом тубулиновая система, после замораживания–отогрева в присутствии указанных выше криопротекторов была в состоянии полимеризации.

По имеющимся данным [18] инкубация растительных клеток в 5%-м растворе ДМСО вызывает частичную фрагментацию и снижает флюоресценцию актиновых волокон, однако это позволяет выжить клеткам после замораживания до -196°C . При замене в среде инкубации ДМСО цитохалазином Д происходило полное разрушение актиновых микрофиламентов и потеря жизнеспособности клеток. Эти опыты прямо указывают на существенную роль цитоскелетных белков в выживаемости клеток после их криоконсервирования. При повышении концентрации ДМСО до 1,4 М (10%) критическая точка концентрации, вызывающая полимеризацию, снижается в 8–10 раз [12]. При этом формируются в основном истинные микротрубочки, хотя при высокой концентрации тубулина появляются также слои из протофиламентов. В регуляции сборки микротрубочек, разрушенных воздействием холода, принимают участие различные белки – MAP2, кальмодулин и др. Фосфорилирование этих белков регулируется cAMP, Ca^{2+} или кальмодулином, который контролирует длину и ориентацию микротрубочек путем влияния на специфические кэпирующие белки цитозоля. Согласно гипотезе, представленной ранее [21], существуют и другие слабосвязанные белки, регулирующие полимеризацию микротрубочек, хотя их природа достаточно не изучена. Некоторые данные [23] свидетельствуют, что при этом важную роль играют белки, ассоциированные с центрами организации микротрубочек, а также двухвалентные катионы Mg^{2+} .

Доказательством существования различных классов еще малоизученных цитоскелетных белков, повышающих их устойчивость к холодовому воздействию, являются опыты [15, 15], в которых было обнаружено, что из мозга различных видов антарктических рыб, обитающих при температурах $0-4^{\circ}\text{C}$, при помощи таксола можно изолировать микротрубочки и ассоциированные с ними MAP с м. м. 410–34 кДа. Добавление таких MAP в среду с тубулином индуцирует сборку микротрубочек при $+5^{\circ}\text{C}$ с включением в их состав шести MAP с м. м. 60–300 кДа. Указанные выше MAP, а также одна из изоформ α -тубулина, так называемый α -1-тубулин, отсутствующий в клетках теплолюбивых рыб, по-видимому, обладают специфическими свойствами, индуцировать сборку микротрубочек при низких температурах, так как выделенные аналогичные MAP из тканей быка, встраиваясь в тубулин, также способствовали сборке микротрубочек при 0°C . Более того, среди цитозольных белков, ассоциированных с микротрубочками антарктических рыб, обнаружены также полипептиды с м. м. 32 и 430 кДа, которые стимулируют сборку тубулина при 0°C .

Новые свойства тубулин может приобрести при смешивании с другими белками. Например, если полимеризовать тубулин из мозга быка с динеином, выделенным из спермиев быка, то образуются устойчивые к холоду микротрубочки [17]. При смешивании тубулина из мозга быка с белками из мозга других животных эффект холодоустойчивости не возникает. Поэтому считают, что количество холодоустойчивых микротрубочек может зависеть от содержания динеина, так как добавление динеина

к холодоустойчивым микротрубочкам индуцирует в них стойкость к холодовому воздействию. Из приведенных данных следует, что в растворе динеина, очевидно, содержится некий, пока неидентифицированный белковый фактор, повышающий холодоустойчивость микротрубочек.

Для научнообоснованной защиты структур от действия холода и осмотически активных веществ следует более детально исследовать молекулярные и клеточные механизмы репарации замороженно-отогретых клеток. Согласно единичным сообщениям [20], процесс распада актиновых филаментов под влиянием холода и Ca^{2+} можно предотвратить внесением в инкубационную среду стехиометрического количества АТФ-G-актина, который вызывает соединение концов фрагментов и увеличение длины микрофиламентов. Здесь важным является также степень ассоциации F-филаментов с мембраной – процесс, который, очевидно, носит достаточно селективный характер, так как согласно данным [31], экзогенный ^{125}J -актин *in vitro* быстро связывается и именно с мембранной фракцией клеток. Характер этого взаимодействия определяется влиянием АТР, протеазами и другими видами нуклеотидов (например АМРРNP).

Концентрация внутриклеточных ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ также очень сильно влияет на процессы полимеризации цитоскелетных белков. Известно, что более активное влияние на процесс сборки десмина оказывают Mg^{2+} по сравнению с Na^+ , а также температура, при повышении которой от 2 до 37 °С интенсивность полимеризации белка увеличивается [29]. Степень сборки микротрубочек в большей мере зависит от ионной силы, температуры, и в меньшей степени от величины рН. При температуре 0 °С в присутствии Ca^{2+} микротрубочки, полимеризованные таксомом, распадаются, а после обработки ЭГТА и повышения температуры до 37 °С эта цитоскелетная система вновь реполимеризуется. При распаде микротрубочек под влиянием холодового воздействия из их состава в раствор переходят его составляющие белки – кинезин и MAP-1. При холодовом воздействии на клетки не вся масса микротрубочек разрушается, так как согласно данным [14], примерно 10% холодоустойчивых трубочек сохраняется в виде коротких фрагментов после охлаждения эмбриональных клеток до 0 °С, они являются центрами их организации при повышении температуры до 37 °С.

При воздействии на белки цитоскелета непроникающих криопротекторов, вызывающих дегидратацию клетки, их состояние изменяется. Так, установлено, что в присутствии 6%-го раствора ПЭГ α -актинин вызывает резкое увеличение вязкости актина. Считают [19], что связывание воды молекулами ПЭГ, индуцирующее дегидратацию цитозоля, способствует сшиванию нитей актина в пучки в присутствии α -актинина. Приведенные данные показывают, что в присутствии криопротекторов жизнеспособность клеток в процессе охлаждения может быть повышена благодаря их способности прямо или косвенно стабилизировать трехмерную сеть цитоскелета. Проникающие в клетку криопротекторы действуют таким образом, что ДМСО, глицерин, этиленгликоль, этанол повышают степень полимеризации актина, т.е. их ассоциацию мономеров белка в структуры более высокого порядка. На способности глицерина стабилизировать микротрубочки основано его применение в методиках по выделению целостных микротрубочек из клеток.

В заключение можно отметить, что до настоящего времени данные о механизмах, лежащих в основе перестройки белков цитоскелета при охлаждении до 0 °С, действии криоконсервантов, замораживании и репарации клеток во многом остаются неясными. Поэтому углубленное изучение этих механизмов позволит в будущем научно обосновать применение различного рода биорегуляторов и стабилизаторов, контролирующих устойчивость белков цитоскелета клеток к действию факторов криоконсервации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М. Роль регуляторных систем, модулирующих состояние белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии // Проблемы криобиологии. – 1992. – N. 4. – С. 3–14.
2. Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Руденко С.В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток // Проблемы криобиологии. – 1992. – N. 4. – С. 14–26.
3. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1988. – 30 с.
4. Браун А.Д., Моженок Т.П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. – Л.: Наука, 1987. – 230 с.
5. Землянских Н.Г. Структурно-функциональные изменения мембран эритроцитов в процессе криоконсервирования под защитой ПЭО–1500: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1991. – 19 с.
6. Кравцов Г.Н., Дулин Н.О., Котелевцев Ю.В., Постнов Ю.В. Регуляция формы и объема эритроцитов человека протеинкиназами А и С // Биохимия. – 1988. – 53, N. 8. С. 1296–1303.
7. Орлов С.Н., Покудин Н.И., Рязский Г.Г. и др. О механизме регуляции транспорта ионов через плазматическую мембрану при уменьшении объема клетки // Биол. мембраны. – 1988. – 1988. – 5, N. 10. – С. 1030–1041.
8. Орлов С.Н., Гурло Т.Г. Механизмы активации транспорта ионов при изменении объема клетки // Цитология. – 1991. – 33, N. 11. – С. 101–111.
9. Северин Ф.Ф. Белки, ассоциированные с микротрубочками // Биохимия. – 1991. – 56, N. 6. – С. 963–975.
10. Сокол Л.В., Примаков А.И., Котляров А.О. и др. Термоиндуцированные перестройки полимерной и мономерной форм актина // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии: Сб. науч. трудов. – Киев: Наук. думка, 1989. – С. 22–27.
11. Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. – М.: Мир, 1987. – 117 с.
12. Algaier J., Himes R.H. The effects of DMSO on the kinetics of tubulin assembly // BBA. Protein Structure. and Mol. Enzymol. – 1988. – 954 /P.47/, N. 3. – P. 235–243.
13. Bohm K.J., Vater W., Under E. Zur Struktur von Microtubuli / Ed. Wiss. Z. Berlin Friedrich-Schiller-Univer., Jena. Naturwiss R., 1987. – v. 36, N. 2. – P. 144–146.
14. Cohen E., Binet St., Meininger V. In situ appearance of the cold-stable microtubules in the growing axons on the tectal plate of mouse investigated immunocytochemically after PEG embedding // Dev. Brain Res. – 1987. – 36, N. 2. – P. 171–180.
15. Detrich H.W., Prasad V., Ludnena R. Cold-stable microtubules from Antarctic fishes contain unique α -tubulins // J. Biol. Chem. – 1987. – 262, N. 7. P. 8360–8366.
16. Detrich H.W., Neighbors B.W., Sloboda R.D. Microtubule associated proteins from Antarctic fishes // Cell Motil. and Cytoskeleton. – 1990. – 17, N. 3. – P. 174–186.
17. Eyer J., White D., Gagnon C. Presence of a new microtubule cold-stabilising factor in bull sperm dynein preparations // Biochem. J. – 1990. – 270, N. 3. P. 821–824.
18. Gazeau C., Morisset Ch., Hansz J. et al. Ability of Actin Filament Depolymerizing Drug Cytochalasin D to Promote Survival at –196 °C of suspended Carrot and Catharanthus Cells // In: Proc. 29th Annual Meeting Soc. for Cryobiology, Ithaca-New-York, 1992. – P. 49.
19. Grazi E., Trombetta G., Margi E. et al. The actin gelling activity of chicken gizzard α -actinin physiological temperature is triggered by water sequestration // FEBS Lett. – 1990. – 272, M. 1–2. – P. 149–151.
20. Grazi E., Trombetta G. Substoichiometric concentrations of AMP-G-actin are required to rankle Ca-F-actin fragments at low temperature // Struct. and Funct. Cytoskeleton. Biol. and Physiol. Aspects: Proc. Eur. Symp.: Lyon, Apr. 13–16, 1988. Paris, London. – 1988. – P. 571.
21. Hesketh J.E. Regulation of microtubule assembly // J. Biochem. – 1985. – 17, N. 7. – P. 761–856.
22. Iwig M. Zur struktur und funktion der microfilamente // Wiss. Z. Friedrich-Schiller-Univ. Jena Naturwiss R., 1987. – 36, N. 2. – P. 182–188.

23. *McBeath E.* Microtubule detachment from the microtubule-organising centre as a key event in the complete turnover of microtubules in cells // *Eur. J. Cell Biol.* – 1990. – 52, N. 1. – P. 1–16.
24. *Mejillano M.R., Barton J.S., Nath J. et al.* GTF analogue interacts with the tubulin exchangeable site during assembly and upon binding // *Biochemistry.* – 1990. – 29, N. 5. – P. 1208–1216.
25. *O'Brien E.T., Erickson H.P.* Assembly of pure tubulin in the absence of free GTF: effect of magnesium, glycerol, ATF and the nonhydrolyzable GTF analogues // *Biochem.* – 28, N. 3. – P. 1413–1422.
26. *Porter K.* Structural organisation of the cytomatrix // *Organ. Cell Metab.: Proc. NATO Adv. Res. Work Shop Hanstholm Aug. 31–Sept. 4, 1985.* – New York–London. – 1986. P. 9–25.
27. *Sato M., Schwarz W.H., Pollard T.D.* Dependence of mechanical properties of actin / L-actin gels on deformation rate // *Nature.* – 1987. – 557, N. 1. P. 122–134.
28. *Small J.W., Draeger A., Rinnerthaler G. et al.* Cytoskeleton reorganisation and motility // *Eur. J. Cell Biol.: Suppl.* – 1990. – 51, N. 30. – P. 7.
29. *Stromer M., Ritter M.A., Pang Y.* Effect of cations temperature of kinetics of desmine assembly // *Biochem J.* – 1987. – 246, N. 1. – P. 75–81.
30. *Torres A., Delgado P.* Effect of cold and nocodazole treatments on the microtubular systems of *Paramecium* in interphase // *J. Protozool.* – 1989. – 6, N. 2. – P. 113–119.
31. *Tranter M.P., Sugrue St. P., Schwarz M.A.* Evidence for a direct nucleotide sensitive interaction between actin and liver cell membranes // *J. Cell Biol.* – 1989. – 109, N. 6, Pt. 1 – P. 2833–2840.
32. *Williams R.C.J., Correia J.J., De-Vries A.L.* Formation of microtubules at low temperature by tubulin from Antarctic fish // *Biochemistry.* – 1985. – 24, N. 11. – P. 2740–2748.
33. *Wolff J.* Regulation of the *in vitro* assembly of microtubules by calcium and calmodulin // *Struct. and Funct. Cytoskeleton Biol. and Physiopathol. Aspects: Proc Eur. Symp., Lyon, Apr. 13–16, 1988.* – Paris, London. – 1989. – P. 477–490.
34. *Yin H.L., Hortwig I.H.* The structure of the macrophage actin skeleton // *J. Cell Sci.* – 1988. – Suppl N.9. – P. 169–184.
35. *Yamamoto N.* Effect of dimethyl sulfoxide on cytosolic ionised calcium concentration and cytoskeletal organisation of hepatocytes in a primary culture // *Cell Struct. and Funct.* – 1989. – 14, N. 1. P. 75–85.

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

Поступила 19.03.93

А.М.БІЛОУС, Н.Г.ЗЕМЛЯНСЬКІХ

МОЛЕКУЛЯРНА ДИНАМІКА БІЛКІВ ЦИТОСКЕЛЕТУ У НОРМІ ТА ПРИ ДІЇ ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧНИХ ФАКТОРІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

У роботі зроблен аналіз літературного матеріалу, присвяченого питанням структурної організації цитоскелету і його ролі у підтримці цілісності клітини. Особливу увагу було приділено впливу температури та кріопротекторів на стан елементів цитоскелету, ступінь полімеризації та їх регуляцію різними клітинними системами.

A.M.BELOUS, N.G.ZEMLYANSKIKH

THE NORMAL MOLECULAR DYNAMICS OF CYTOSKELETAL PROTEINS AND THE EFFECT OF TEMPERATURE AND OSMOTIC FACTORS

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

The literature data devoted to the structural arrangement of cytoskeleton and its role in the maintainance of cell integrity have been analyzed. The attention has been paid to the effects of temperature and cryoprotectants on the state of cytoskeletal elements, the degree of polymerization and regulation by different cellular systems.

**В.С.Марченко, Г.А.Бабийчук, В.В.Ломако, А.В.Шило,
И.И.Ломакин, Л.Н.Марченко**

ОБЩИЙ ПОДХОД К ПРОБЛЕМЕ ПОВЫШЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА И ХОЛОДОВОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА

В работе рассматривается роль функционального состояния гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) в структуре терморегуляторных реакций охлажденного мозга. Определены резонансные частоты ритмических холодовых воздействий, способные увеличить проницаемость ГЭБ при искусственном охлаждении до величин, характерных для гибернирующих животных. На основе анализа данных литературы и результатов собственных исследований обосновывается новый подход к проблеме повышения холодовой устойчивости организма. Развита представления о феномене реакции "ожидания" гипотермии, которая на нейрoхимическом уровне заключается в формировании комплекса условий, обеспечивающих сохранение через 24 ч после охлаждения в нейронах гипоталамуса норадреналина на уровне, близком к норме. Обсуждаются структурно-функциональные механизмы образования энграмм "терморегуляторной" памяти.

В настоящее время не существует достаточно эффективного способа повышения холодовой устойчивости организма и защиты его от повреждающего действия охлаждения. Однако известны уникальные случаи, когда после глубокого охлаждения (ректальная температура ниже 19 °C) жизнедеятельность организма человека полностью восстанавливается, что указывает на наличие скрытых резервных возможностей организма и на наше неумение их активизировать.

Для повышения холодовой устойчивости организма проводят различные мероприятия (закаливание, применение криопротекторов и др.). Одним из возможных путей более эффективного решения этой проблемы является применение гипотермии [8]. Действительно, с одной стороны, гипотермические воздействия могут привести к функциональным нарушениям регуляторных систем, изменению структуры мембран, модификации генома, в том числе нервно-глиального комплекса, а с другой — следы тех же температурных воздействий служат элементами формирования терморегуляторного условного рефлекса и явлений адаптации [6, 16]. Это сближает следовые реакции с механизмами "вегетативной" памяти, в основе которой лежит образование связей не только между центрами анализаторов и центрами эффекторов, но и между отдельными элементами эффекторных систем: тканевыми процессами, сосудистыми реакциями, изменениями гормональной ситуации и т.д. [6, 9, 15]. Такая постановка вопроса приводит к понятию "холодовой" или "терморегуляторной" памяти и связана с изучением стрессорных состояний и эмоций, которые, как известно, играют большую роль в формировании "вегетативной памяти" [6]. Поэтому заслуживает внимания нетрадиционный подход к проблеме стресса, согласно которому приблизительно через 24 ч после возникновения реакции "тревоги" у животных происходит повторная активация нейроэндокринной системы [12]. К тому же, данная гипотеза хорошо согласуется с работами иных научных школ. Так, при исследовании поляризационной доминанты у кроликов отмечено без всяких воздействий появление доминантной двигательной реакции на следующей день, когда животное было помещено в обстановку, характерную для условий эксперимента [3-14].

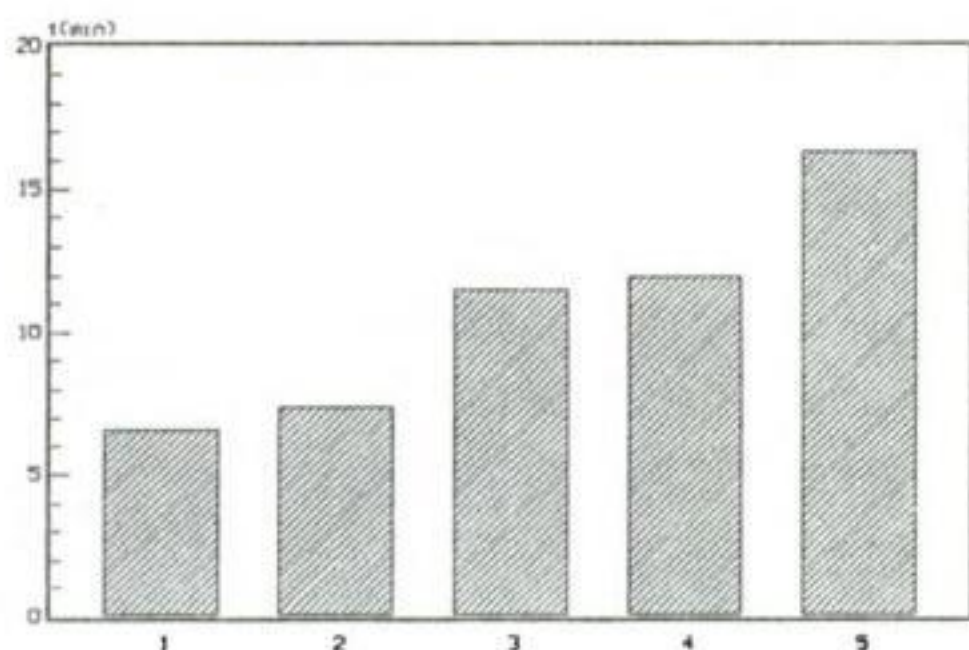


Рис. 1. Холодовая устойчивость после КЦГ 32 °С и ритмического холодового воздействия: 1 – исходные данные; 2 – наркоз; 3 – 24 ч после КЦГ; 4 – 48 ч после КЦГ; 5 – 24 ч после ритмического холодового воздействия

лимбической области [22]. Интересно отметить, что у животных проницаемость ГЭБ для ^{32}P и ^{135}I через 12 ч после стресса (плавание в воде в течение 3 ч) приходит к исходному уровню, но повторно возрастает через 18–24 ч [18]. Подобным образом в сходных условиях происходят изменения и в периферических органах, в том числе в печени. Например, при резком снижении атмосферного давления повторное повышение активности фенилаланингидроксилазы обнаружено через 24 ч после воздействия [12]. Через сутки активируются специфические регенераторные процессы после частичной гепатэктомии, острой кровопотери, острой почечной ишемии [12].

К сожалению экспериментальные данные такого рода не были в полной мере учтены в работах, посвященных сформировавшейся в процессе эволюции реакции "ожидания". Суть последней состоит в том, "что в зависимости от вида и интенсивности однократного внешнего воздействия формируется специфическая системная приспособительная реакция, готовящая организм к повторной "встрече" с данным воздействием через сутки. Подготовка происходит за счет реализации функциональных резервов и структурных перестроек, которые обеспечивают меньшее напряжение органов и тканей, принимающих участие в конкретном адаптационном процессе" [12].

По нашему мнению, аналогичный подход может быть полезен при исследовании отсроченных терморегуляторных реакций организма на охлаждение, если при этом учесть особое состояние центральной нервной системы (ЦНС) и ее влияние на энергообеспечивающие системы периферии, в частности через регуляцию проницаемости ГЭБ.

Захват ^3H -серотонина уменьшался через 24 ч после одиночного электросудорожного шока, тогда как кинетические характеристики захвата ^3H -норадреналина (НА) и высвобождения ^3H -серотонина не изменялись. Показано изменение проницаемости гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) у животных, перенесших сильный эпилептический припадок, причем через 2 ч после введения каиновой кислоты ГЭБ еще не изменялся, но через 24 ч проницаемость его повышалась, особенно в

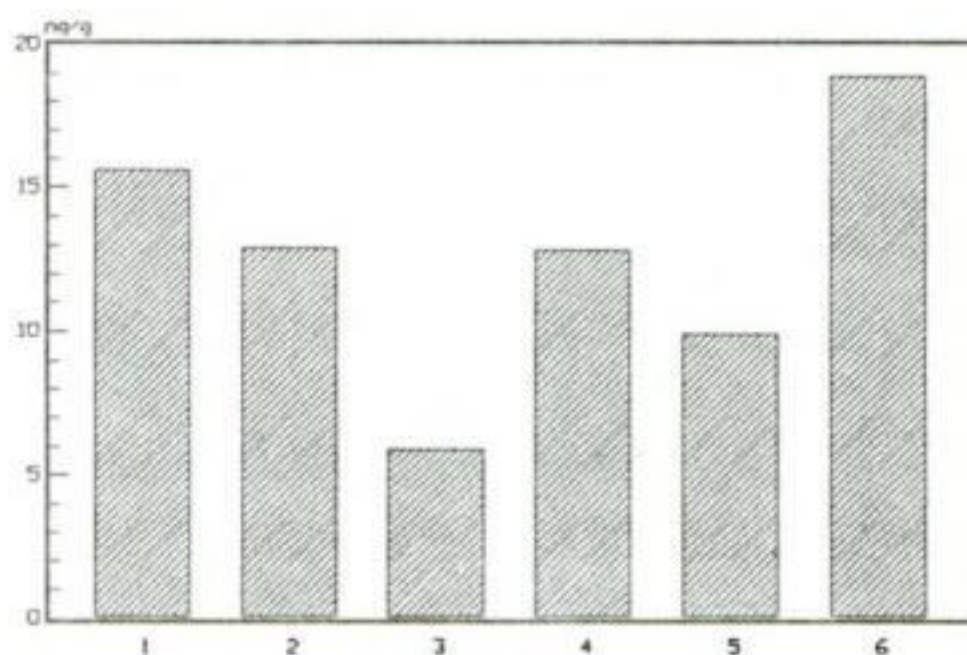


Рис. 2. Содержание норадреналина в ткани гипоталамуса крыс при КЦГ 32 °С: 1 – исходные данные; 2 – наркоз; 3 – КЦГ; 4 – через 24 ч после КЦГ; 5 – повторная КЦГ; 6 – через 24 ч после повторной КЦГ

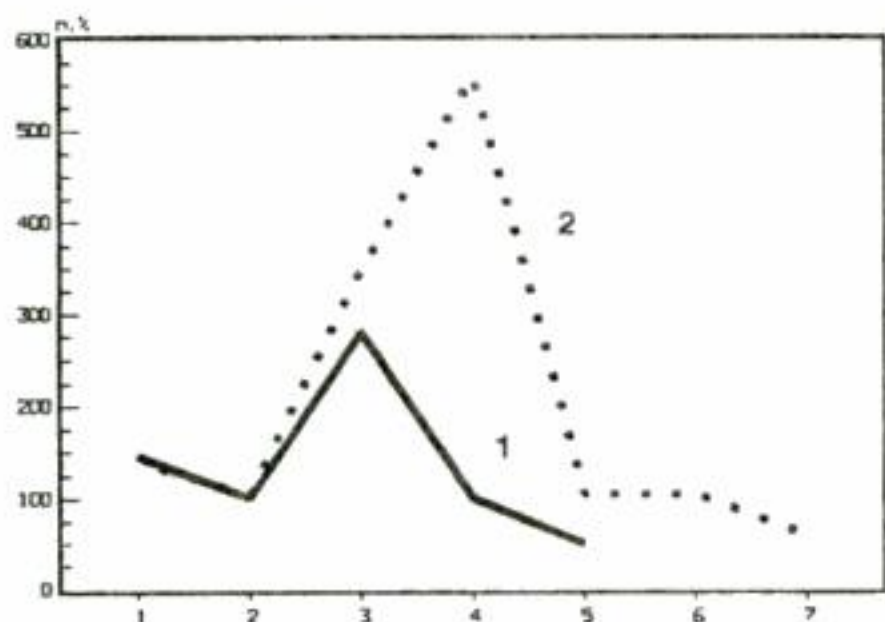


Рис. 3. Уровень (n) секреции ^3H -норадреналина в головном мозге крыс в динамике КЦГ. 1 – кора; 2 – гипоталамус. По оси абсцисс: 1 – исходные данные; 2 – наркоз; 3 – 36°C ; 4 – 34°C ; 5 – 32°C ; 6 – через 6 ч после КЦГ; 7 – через 24 ч после КЦГ

Так, при изучении процессов холодовой адаптации выявлены “следы” предшествующих температурных воздействий, модифицирующие терморегуляторные реакции спустя длительный период времени после прекращения действия холода. Экспериментальные данные указывают на отсроченное формирование следовых эффектов на уровне химической терморегуляции и их однонаправленность с изменениями при длительной холодовой акклиматизации. Наряду с изучением адаптивных изменений физиологических функций после повторных тренировок или длительной акклиматизации имеются данные, свидетельствующие о возникновении явлений типа адаптации уже после однократного температурного воздействия: наблюдали “следовые” эффекты в активности моноаминоксидазы, содержании РНК в цитоплазме нейронов и глии и др. После кратковременного прерывистого воздействия холода выявлено накопление РНК в цитоплазме нейронов преоптической области и в ядрах их глиальных клеток сателлитов, а также клеток перинейрональной глии и в маммиллярных телах гипоталамуса. Через 2 сут изменения в преоптической области сохранялись, а в глии маммиллярных тел сменялись уменьшением количества РНК [17]. Эти и подобные им факты (например то, что уже однократное помещение животного в тепловую камеру изменяет уровень реакции на все последующие воздействия, т.е. явление, сходное с адаптацией, наблюдается уже после однократного термического воздействия [15]), заставили нас изучить влияние кранио-церебральной гипотермии (КЦГ) на холодовую устойчивость животных.

Эксперименты проведены на крысах самцах линии Вистар массой 180–200 г из питомника АМН СССР “Столбовая”. КЦГ и ритмические холодовые воздействия осуществляли на установке для программного охлаждения, созданной в СКТБ с ОП ИПКиК АН Украины. Повторный сеанс гипотермии проводили через 24 ч после первого. В ходе экспериментов измеряли температуру в коре головного мозга, в среднем ухе (что соответствует температуре гипоталамуса), в прямой кишке при помощи электронного термометра термисторами СТЗ–18. Для блокирования рефлекторных терморегуляторных реакций организма экспериментальных животных наркотизировали

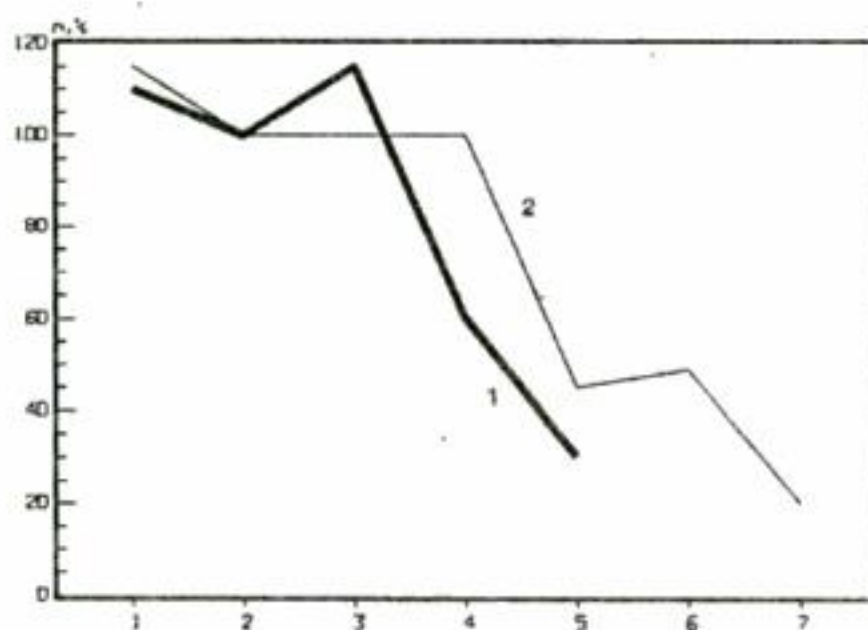


Рис. 4. Уровень (n) секреции ^3H -ГАМК в головном мозге крыс в динамике КЦГ. 1 – кора; 2 – гипоталамус. По оси абсцисс: 1 – исходные данные; 2 – наркоз; 3 – 36°C ; 4 – 34°C ; 5 – 32°C ; 6 – через 6 ч после КЦГ; 7 – через 24 ч после КЦГ

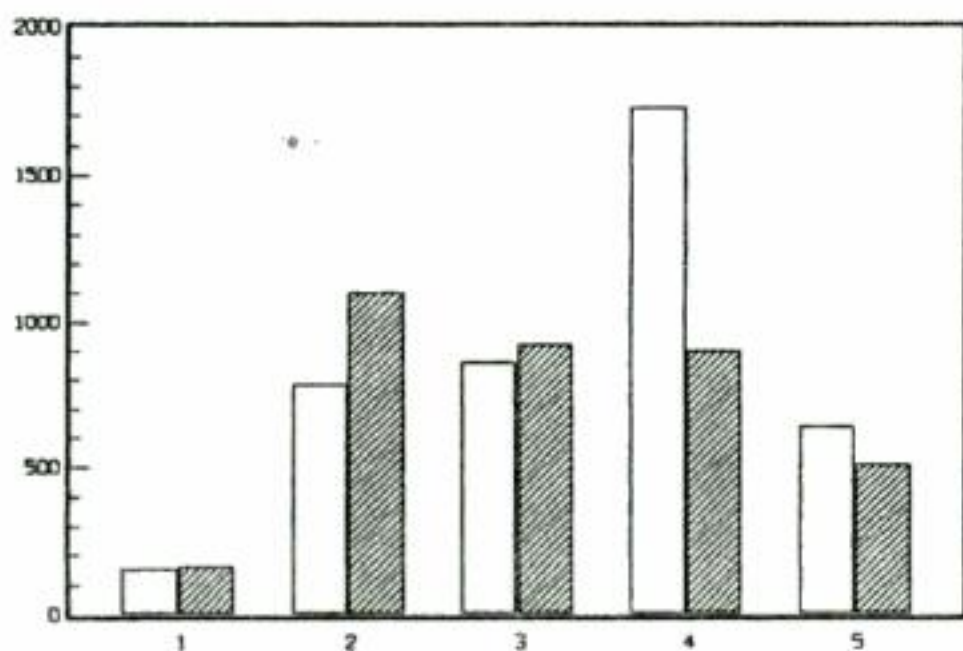


Рис. 5. Проницаемость ГЭБ для ^3H -норадреналина при одно- и двукратном воздействии КЦГ 32°C (в расп./мин – 500 мкл). 1 – наркоз; 2 – КЦГ; 3 – через 24 ч после КЦГ; 4 – повторная КЦГ; 5 – через 24 ч после повторного применения КЦГ. □ – передний гипоталамус; ▨ – задний гипоталамус. Уровень ^3H -норадреналина в крови 10770 ± 120

ткань гипоталамуса фиксировали в 2% глутаральдегидном и 1% осмиевом фиксаторе на фосфатном буфере. После обезвоживания в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне образцы заключали в смесь эпоксидных смол эпон–аралдит. Ультратонкие срезы изготавливали с помощью ультрамикротомы УМПТ–4, окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Просмотр и фотографирование осуществляли на электронном микроскопе ЭМВ–100БР при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Для проведения электрофизиологических экспериментов животным проводили стереотаксическую операцию по вживлению электродов в сенсорную область коры, передний и задний гипоталамус. Биоэлектрическую активность в диапазоне 0,1–15 Гц отводили монополярно и регистрировали на энцефалографе BST–1.

Корреляционно-спектральный анализ ЭЭГ проводили в автономном режиме на ЭВМ СМ–4. Обработывали пары дискретизированных во времени реализаций длиной 30 и 300 с (дискретность оцифровки 0,03 с).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили традиционными методами [7]. Установлено, что однократная КЦГ до ректальной температуры 32°C повышает устойчивость крыс к действию субнулевых температур. Интересно отметить, что эффект (длительность плавания в ледяной воде) наиболее выражен спустя 24 ч после применения КЦГ и сохраняется через 48 ч (рис. 1).

Для возможного объяснения такого явления мы предположили,

внутрибрюшинными инъекциями смеси тиопентала натрия и оксибутирата натрия из расчета 30 мг/кг и 100 мг/кг массы, соответственно.

Содержание НА и А в тканях определяли триоксииндоловым флюоресцентным методом [10, 11]. Изучение секреции и проницаемости ГЭБ гипоталамуса для ^3H -НА проводили радиоизотопным методом *in vivo* с использованием *push–pull* канюли и *ex vivo* на переживающих срезах гипоталамуса [2, 4]. Содержание общего белка определяли по методу Лоури. Для электронно-микроскопических исследований

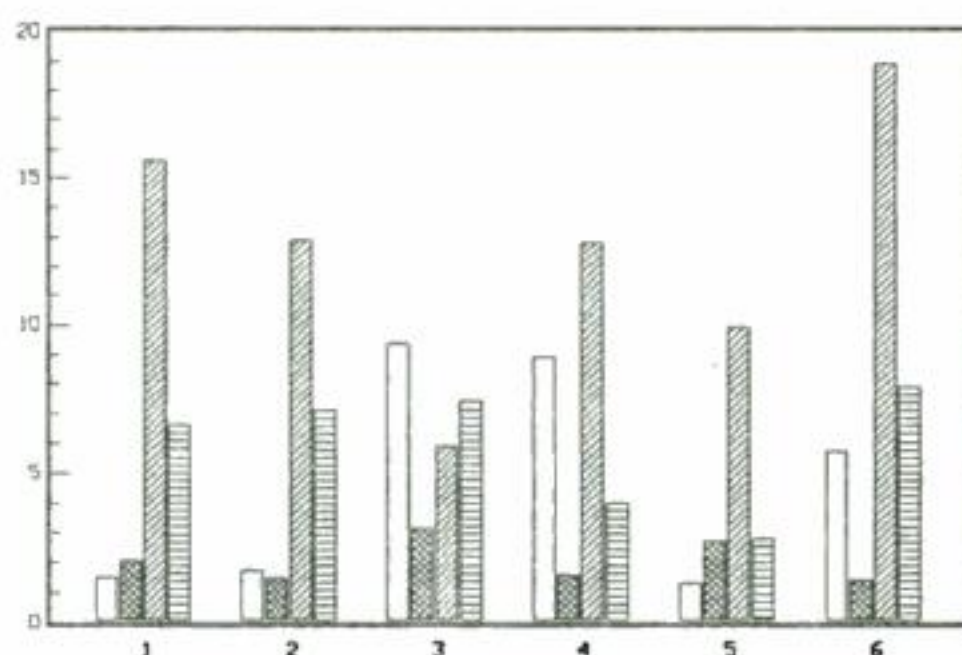


Рис. 6. Влияние двукратного воздействия КЦГ 32°C на некоторые звенья норадренергической системы организма крыс. 1 – исходные данные; 2 – наркоз; 3 – КЦГ; 4 – через 24 ч после КЦГ; 5 – повторная КЦГ; 6 – через 24 ч после повторной КЦГ. □ – проницаемость НА через ГЭБ (значения уменьшены в 100 раз (расп./мин $\times$ 500 мкл); ▨ – секреция НА (Кв); ▤ – содержание НА в ткани гипоталамуса (нг/г); ▧ – уровень НА в крови (нмоль/л)

Влияние гипотермических воздействий и биологически активных веществ на проницаемость ГЭБ для ^3H -адреналина ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Коэффициент проницаемости ГЭБ для ^3H -адреналина					
	Весь мозг	ПГГ	ЗГГ	Таламус	Гиппокамп	Кора
Контроль наркоза, $t_r = 38-36^\circ\text{C}$	0.06 ± 0.009	0.05 ± 0.009	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.012	0.05 ± 0.09	0.04 ± 0.009
КЦГ $34 + 32^\circ\text{C}$	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.11 ± 0.01
0.1 КЦГ, $38-36^\circ\text{C}$	0.21 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.01
0.1 КЦГ, $34-32^\circ\text{C}$	0.35 ± 0.05	0.35 ± 0.05	0.36 ± 0.04	0.39 ± 0.05	0.30 ± 0.04	0.23 ± 0.03
0.1 R 36°C	0.46 ± 0.06	0.52 ± 0.06	0.31 ± 0.05	0.51 ± 0.05	0.43 ± 0.04	0.51 ± 0.05
ζ КЦГ 36°C	0.66 ± 0.07	0.66 ± 0.06	0.69 ± 0.08	0.77 ± 0.08	0.62 ± 0.07	0.49 ± 0.06
ζ КЦГ 32°C	1.11 ± 0.11	0.71 ± 0.05	1.26 ± 0.09	1.24 ± 0.09	1.04 ± 0.06	1.24 ± 0.09
ТРНП 20 мкг*	0.73 ± 0.1	0.69 ± 0.05	0.68 ± 0.09	0.79 ± 0.09	0.80 ± 0.11	0.91 ± 0.03
ТРНП 40 мкг*	0.79 ± 0.12	0.77 ± 0.09	0.67 ± 0.08	0.88 ± 0.1	0.79 ± 0.09	0.83 ± 0.10
КЦГ $32^\circ\text{C} + 20$ мкг ТРНП	0.83 ± 0.12	0.73 ± 0.11	0.75 ± 0.13	0.76 ± 0.11	0.83 ± 0.15	1.00 ± 0.20
КЦГ $32^\circ\text{C} + 40$ мкг ТРНП	0.47 ± 0.10	0.43 ± 0.08	0.58 ± 0.09	0.43 ± 0.07	0.47 ± 0.07	0.39 ± 0.06
0.1 R + 20 мкг ТРНП	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.02
ζ КЦГ $32^\circ\text{C} + 20$ мкг ТРНП	0.18 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.04	0.20 ± 0.06	0.17 ± 0.04	0.25 ± 0.08
ζ КЦГ $32^\circ\text{C} + 40$ мкг ТРНП	0.27 ± 0.05	0.30 ± 0.06	0.30 ± 0.06	0.22 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.38 ± 0.07
ζ КЦГ $32^\circ\text{C} +$ гепарин 1000 ЕД	0.55 ± 0.09	0.54 ± 0.08	0.48 ± 0.08	0.64 ± 0.11	0.52 ± 0.10	0.62 ± 0.12
ПЭО-1500 0.5 мл	0.34 ± 0.05	0.34 ± 0.05	0.35 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.29 ± 0.04	0.35 ± 0.05

Примечание. КЦГ - краниocereбральная гипотермия до ректальной температуры $36, 34$ и 32°C ; 0,1 КЦГ - ритмическое холодное воздействие парами азота на голову животного длительностью 1 с с частотой 0,1 Гц (продолжительность воздействия 2 ч); 0,1 R - такое же воздействие, но на каудальные терморесепторы животного; ζ КЦГ - такое же воздействие на голову животного с обратной связью по ζ -ритму биоэлектрической активности неокортекса; ТРНП - терморегуляторный нейропептид; ПЭО - полиэтиленоксид с м. м. 1500; Кл - коэффициент проницаемости ГЭБ, рассчитанный как отношение радиоактивности структуры мозга в распадах в мин (расп./мин) к радиоактивности крови в расп./мин; * - работа выполнена совместно с член-кор. РАН, Ю.Ф.Пастуховым.

что приблизительно через сутки после КЦГ в ЦНС формируется реакция "ожидания" гипотермии. Основные моменты нашей гипотезы мы попытались проследить на примере норадренергической функциональной системы, которая, с одной стороны, отражает стрессорный ответ организма, а с другой - участвует в специфических терморегуляторных процессах. В связи с этим нами в новом свете были рассмотрены данные по изучению содержания, секреции, захвата и проницаемости через ГЭБ ^3H -НА при КЦГ и после ее одно-и двукратного воздействия, а также рассмотрено состояние ГАМКергических процессов, так как гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) ускоряет спонтанную утечку эндогенного НА [20, 21]. Анализ экспериментальных данных показал, что реакция "ожидания" гипотермии на нейрoхимическом уровне заключается в формировании комплекса условий, обеспечивающих сохранение через 24 ч после КЦГ НА в крови и гипоталамусе на достаточном уровне, близком к исходному (рис. 2).

Так, если уже через 6 ч после КЦГ наблюдается устойчивая тенденция к нормализации синаптической передачи и проницаемости ГЭБ, то

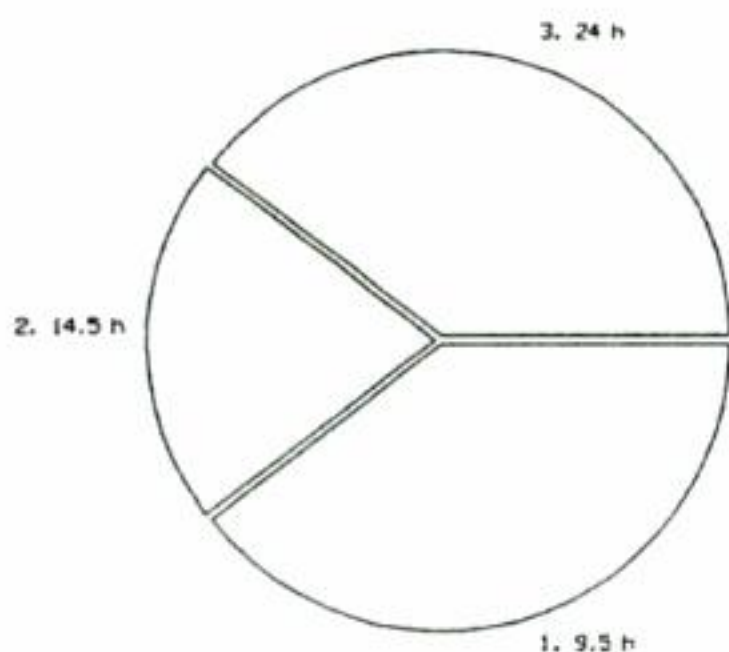


Рис. 7. Изменение проницаемости ГЭБ гипоталамуса после КЦГ 32 °С. 1, 2, 3 – максимумы проницаемости ГЭБ (2000 – 2500 расп./мин – 200 мкл) в течение суток после воздействия

приблизительно через сутки происходит повторное снижение активности комплекса нейрохимических процессов, приводящих к уменьшению уровня НА и повышению активности норадреналинсберегающих систем мозга (рис. 3–5). После повторного сеанса КЦГ изменения активности норадренергической системы мозга подобны ответу на первичное воздействие гипотермии. Однако создается впечатление, что система реагирует более экономно и специфично (рис. 6).

Таким образом, можно предположить участие норадренергической системы гипоталамуса в подготовке организма к повторным воздействиям охлаждения, что определяет актуальность ее всестороннего изучения для разработки способов повышения холодовой устойчивости млекопитающих. Тем не менее, применяя КЦГ, удается повысить холодовую устойчивость организма только на 70–75 % (рис. 1). Это обусловлено тем, что наряду с положительным эффектом (в нашем случае повышение проницаемости ГЭБ и т.п.) КЦГ обуславливает стресс-реакции. При любом стрессе в той или иной степени расходуются энергетические ресурсы организма, например, гликоген печени. Поэтому, даже при оптимизации регулирующих воздействий ЦНС, существует энергетический предел компенсаторных возможностей организма не действие охлаждения. Однако, по нашему мнению, есть возможность повысить проницаемость ГЭБ, не затрагивая гистогематических барьеров печени, и без существенного стресса.

Во-первых, для инициации многих терморегуляторных реакций организма непрерывное воздействие холода является достаточным, но не необходимым условием, так как холодовые терморорецепторы обрабатывают информацию с частотой 0,1 Гц [13]. Во-вторых, следует обратить внимание на волнообразный характер восстановительных следовых процессов изменения проницаемости ГЭБ (рис. 7), что с учетом математических разработок [13] позволяет предположить наличие в исполнительных механизмах каналов ГЭБ существенных резонансных явлений на частоте 0,1–0,6 с. Тем более, что описанный выше процесс проницаемости ГЭБ сопровождается возрастанием пространственной синхронизации биоэлектрической активности коры и гипоталамуса в этом же диапазоне час-

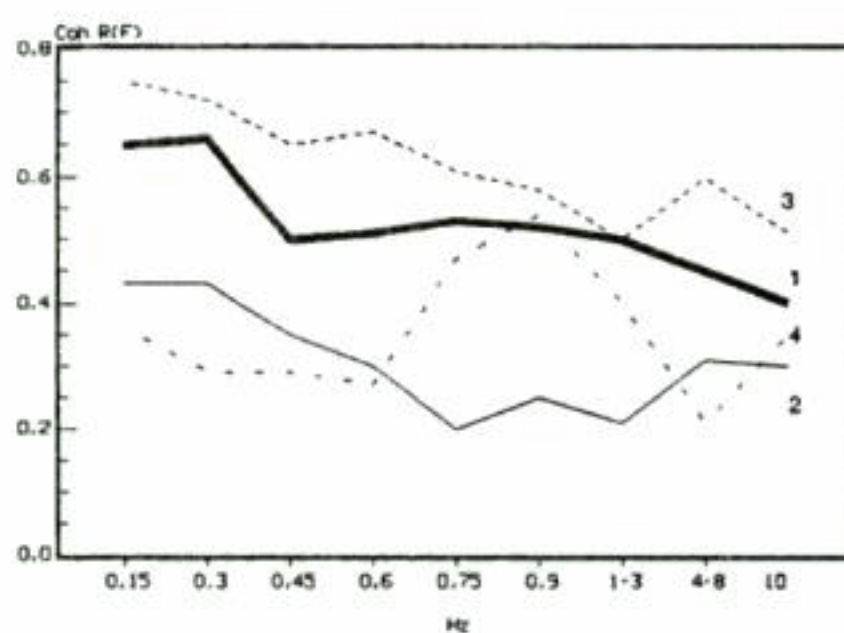


Рис. 8. Влияние КЦГ 32°С на когерентность биоэлектрической активности коры головного мозга крыс. 1 – нормотермия; 2 – КЦГ I этап; 3 – КЦГ II этап; 4 – КЦГ III этап

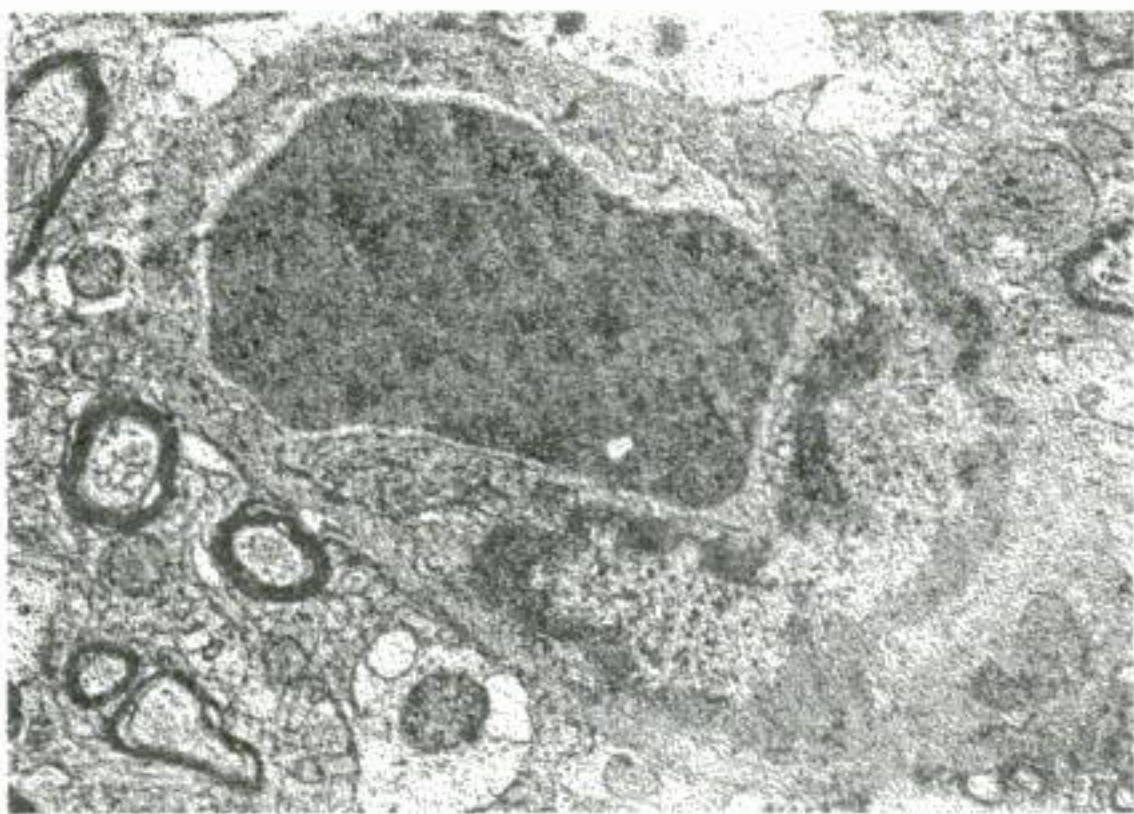


Рис. 9. Ультраструктура ГЭБ переднего гипоталамуса крысы после ритмических холодовых воздействий на каудальные терморесепторы $\times 48000$

тот. Нами установлено, что при этом происходит замедление скорости охлаждения животного в 1,5–2,0 раза, но только в случае наличия квазинусоидального ритма, мощность спектра которого повышается в 1,5–2,0 раза. В этих условиях возрастают значения функции когерентности секундного ритма коры, достигая значений 0,7–0,9 (рис. 8).

Повышение пространственной синхронизации секундного ритма

происходит в неокортексе только при наличии высокой линейной связи с биоэлектрической активностью заднего гипоталамуса, повышенной в 2–3 раза секрецией и проницаемостью ГЭБ для НА в области гипоталамуса.

Именно поэтому ритмические холодовые воздействия на терморесептивные поля крыс с обратной связью по секундному ритму неокортекса, значительно усиливая мощность спектра частотой 0,1–0,6 с, приводят к существенному увеличению проницаемости ГЭБ для терморегуляторных веществ и повышению холодовой устойчивости организма (таблица).

Нами показано, что ритмические холодовые воздействия увеличивают более чем в 2 раза устойчивость крыс к действию субнулевых температур. Эффект наиболее выражен через 24 ч после воздействия (рис. 1). Происходящие при этом изменения активности ГЭБ обратимы и носят функциональный характер. Не отмечено нарушений в ультраструктуре элементов ГЭБ и печени (рис. 9). При электронно-микроскопических исследованиях синапсов гипоталамуса крыс было обращено особое внимание на структуру шипиков. Интересно отметить, что после ритмических холодовых воздействий в синапсах гипоталамуса обнаружен шипиковый аппарат, состоящий из вакуолей, разделенных тяжами электронноплотного материала. Как правило, эта структура отсутствует в подкорковых образованиях и встречается только в коре больших полушарий [5]. Некоторые авторы предполагают, что “в синапсе под влиянием нервных импульсов, медиации и при участии биогенных аминов воспринимаются биологически целесообразные сигналы и формируется характер ответа. Эта информация запечатлевается в постсинаптической области на развивающихся мембранах шипикового аппарата и в виде энграммы хранится в мозгу и используется в течение жизни” [8]. Хотя такая интерпретация ультраструктурных механизмов образования энграммы памяти весьма спорна, в механизмах “терморегуляционной памяти” она представляется весьма вероятной.

Таким образом, как ультраструктурный, так и функциональный “след” ритмических холодовых воздействий, по нашему мнению, следует, в первую очередь, искать в терморегуляторных центрах гипоталамуса. Такая постановка вопроса, наряду с объектами исследования, парамет-

рами воздействия, определяет и новые подходы к изучению проблемы холодовой устойчивости организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Ломакин И.И., Белостоцкий А.В. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. – Киев: Наук. думка, 1992. – 207 с.
2. Бредбери М. Концепция гемато-энцефалического барьера. – М.: Медицина, 1983. – 480 с.
3. Боголепов Н.Н. Ультраструктура синапсов в норме и патологии. – М.: Медицина, 1975. – 94 с.
4. Годухин О.В., Жарикова А.Д. Push-pull канюля для локальной перфузии головного мозга с одновременной регистрацией электрической активности // Физиол. журн. СССР. 1979. – 65, N 1. – С. 141–143.
5. Гольдинов Г.В., Кудрявцева Н.Н. Изменение милливольтного потенциала структур мозга под влиянием микрополяризации, модулирующей следовые процессы // Физиологический журн. СССР. – 1979. – 65. – С. 344–351.
6. Ильюченко Р.Ю. Память и адаптация. – Новосибирск: Наука, 1979. – 165 с.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
8. Манина А.А. Ультраструктурные основы деятельности мозга. – М.: Медицина, 1976. – 184 с.
9. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика. – М.: Наука, 1981. – 280 с.
10. Меньшиков В.В. Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. – Ч. 2. – М., 1974. – С. 27–35.
11. Резников А.Г. Методы определения гормонов. – Киев: Наукова думка, 1980. – С. 345–346.
12. Реушкин В.Н. Механизмы адаптации в биоритмологическом аспекте // Вестник АМН СССР. – 1981. – N 12. – С. 50–54.
13. Росин Я.А. О математическом моделировании гисто-гематических барьеров // Физиология гисто-гематических барьеров. – М.: Наука, 1977. – С. 37–41.
14. Русинов Е.В. Когерентный анализ ЭЭГ при развитии следовых процессов поляризационной доминанты у кроликов // Журн. высшей нервной деятельности. – 1987. – 37, вып. 2. – С. 305–312.
15. Слоним А.Д. Следовые реакции и температура среды // Физиологич. журн. СССР. – 1982. – 69, N 2. – С. 172–177.
16. Слоним А.Д., Швецова Е.И. Химическая терморегуляция после “ускоренной” адаптации к холоду // Физиологич. журн. СССР. – 1982. – 59, N 8. – С. 1262–1267.
17. Филипченко Р.Е., Певзнер Л.З. Следовые изменения количества РНК в нейронах и нейроглии. гипоталамических ядер головного мозга после кратковременного прерывистого воздействия холода // Цитология. – 1977. – 19, N 5. – С. 527–531.
18. Юдина Т.В. Исследование состояния проницаемости гистогематических барьеров в санитарно-токсикологическом эксперименте: Автореф. дис. ... канд.биол.наук. – М., 1972. – 16 с.
19. Gordon C.J., Heath J.B. Reassessment of the neural control of body temperature: importance of oscillating neural and motor components // Compar. Biochem. Physiol. – 1983. – 74A, N 3. – P. 479–489.
20. Yessian N.H., Armenian A.R., Bunitian H.C. Effect of aminobutyric acid on brain serotonin and catecholamines // J. Neurochem. – 1969. – 16. – P. 1425–1433.
21. Yessaian N.H., Demirjian A.H., Tozalakian B.V. Effect of GABA, picrotoxin and bicuculin on loss of noradrenaline and serotonin from rat brain mesencephalic region in vitro // J. Neurochem. – 1977. – 28. – P. 1151–1153.
22. Zucker D.K., Wooten G.F., Lothman E.W. Blood-brain barrier changes with kainic acid induced limbic seizures // Exp. Neurol. – 1983. – 79, N 2. – P. 422–433.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
АН Украины, г. Харьков

Поступила 15.04.93

В.С.МАРЧЕНКО, Г.П.БАБИЙЧУК, В.В.ЛОМАКО, О.В.ШИЛО, І.І.ЛОМАКІН, Л.М.МАРЧЕНКО
ЗАГАЛЬНИЙ ПІДХІД ДО ПРОБЛЕМИ ПІДВИЩЕННЯ ПРОНИКНОСТІ ГЕ-
МАТОЕНЦЕФАЛІЧНОГО БАР'ЄРУ І ХОЛОДОВОЇ СТІЙКОСТІ ОРГАНІЗМУ

інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Розглядається роль функціонального стану гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) у структурі терморегуляторних реакцій охолодженого мозку. Визначені резонансні частоти ритмічних холодових впливів, що здатні збільшити проникність ГЕБ при штучному охолодженні до значень, що характерні для гібернуючих тварин. На підставі аналізу даних літератури і результатів власних досліджень обґрунтовується новий підхід до проблеми підвищення холодової стійкості організму, розвиваються уявлення про феномен реакції “очикування”

гіпотермії, котра на нейрохімічному рівні полягає у формуванні комплексу умов, які забезпечують збереження через 24 г після охолодження в нейронах гіпоталамуса норадреналіну на рівні, близькому до норми. Обговорюються структурно-функціональні механізми утворення енграм "терморегуляторної" пам'яті.

V.S. MARCHENKO, G.A. BABIUCHUK, V.V. LOMAKO, A.V. SHILO, I.I. LOMAKIN, L.N. MARCHENKO

GENERAL APPROACH TO THE PROBLEM OF INCREASING THE PERMEABILITY OF HEMATOENCEPHALIC BARRIER AND BODY COLD RESISTANCE

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

The role of functional state of the hematoencephalic barrier (HEB) in the structure of thermoregulatory reactions of cooled brain are considered. Resonance frequencies of rhythmic cold applications capable of increasing the HEB permeability upon artificial cooling to values specific to hibernators have been determined. Basing on the analysis of literature data and own results, a new approach is substantiated to the problem of increasing the body resistance to cold, and conceptions are developed on the phenomenon of the reaction of "expecting" hypothermia that at the neurochemical level consists in the formation of complex conditions providing for the maintainance of adrenaline at a nearly normal level in 24 hr after cooling in hypothalamus neurons. Structure-functional mechanism of the formation of engrams of thermoregulatory memory are discussed.

УДК 57.043

Е.А.Гордиенко, О.И.Гордиенко, И.Ф.Коваленко, Л.Ф.Розанов

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ГИПОТОНИЧЕСКОГО И КИСЛОТНОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ

Кратко описаны некоторые известные характеристики метода светорассеяния. Измерена интенсивность малоуглового рассеяния суспензией человеческих эритроцитов после контакта клеток с водными растворами глицерина различной концентрации и с кислотой (рН 2.4) средой. Показано, какие параметры могут быть использованы в качестве диагностических тестов.

В настоящее время для диагностического анализа цитометрических характеристик клеток и получения гистограмм распределения различных количественных параметров, характеризующих их состояние, все шире применяется метод светорассеяния. В современных цитографах наряду с электрическим методом часто измеряются экстинкция и рассеяние электромагнитных волн [7]. В то время как рутинные методы требуют затраты большого времени для измерения тех или иных цитометрических характеристик даже нескольких сотен клеток, спектроскопические методы позволяют анализировать клетки с большими скоростями. Наиболее подробное описание методов анализа клеток, основанных на измерении рассеяния света, имеется в [5]. Теоретический анализ процессов поглощения и рассеяния электромагнитных волн малыми частицами дан в работах [1,2].

Если свет проходит через совершенно однородную среду, он не рассеивается. Рассеяние вызывают только неоднородности в ней, какими являются взвешенные в жидкости клетки или макромолекулы. Рассмотрим вначале основные предположения, из которых исходит анализ процесса рассеяния света суспензией клеток. Рассеянный клетками свет имеет ту же частоту, что и падающий на них свет. Поэтому волны в пада-

ющем пучке и рассеиваемые различными неоднородностями в одном и том же направлении в принципе могут интерферировать (гасят или усиливают друг друга). Однако систематическое соотношение между фазами падающей и рассеянной волн отсутствует, если неоднородности расположены хаотично, так что практически интенсивности света должны складываться без учета фазы, как будто бы рассеяние является некогерентным. Взаимные расстояния, в три раза превышающие радиус частиц, являются достаточными для того, чтобы рассеивающие частицы можно было бы считать независимыми рассеивателями. При этом расстояние между ними должно значительно превышать длину световой волны. Если рассеивающими частицами являются эритроциты, концентрация которых в крови составляет около 5 млрд на мл, то, как легко оценить, достаточно развести кровь примерно в несколько тысяч раз, чтобы условие независимости клеток-рассеивателей выполнялось с запасом.

Еще одно условие, которое значительно упрощает анализ и интерпретацию результатов измерения по светорассеянию, заключается в пренебрежении влиянием многократного рассеяния. Если тонкий слой исследуемого вещества содержит N невзаимодействующих рассеивающих частиц, то интенсивность рассеяния слоем в N раз больше интенсивности рассеяния отдельной частицей и, следовательно, за счет рассеяния слоем поглощается в N раз больше энергии из падающего пучка, чем для одной частицы. Эта простая зависимость (прямая пропорциональность числу рассеивающих частиц) имеет место лишь в том случае, если падающее на частицу излучение одно и то же независимо от положения частицы в слое. Если слой достаточно толстый, то за счет поглощения проходящей через

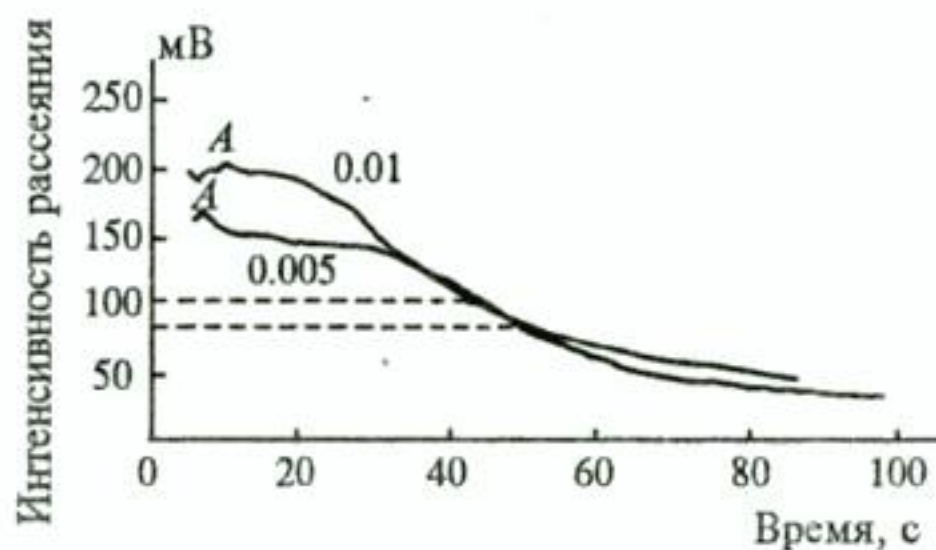


Рис. 2. Зависимость интенсивности рассеяния вперед суспензией эритроцитов от времени, после добавления 0.01 мл или 0.005 мл крови к 5%-му водному раствору глицерина

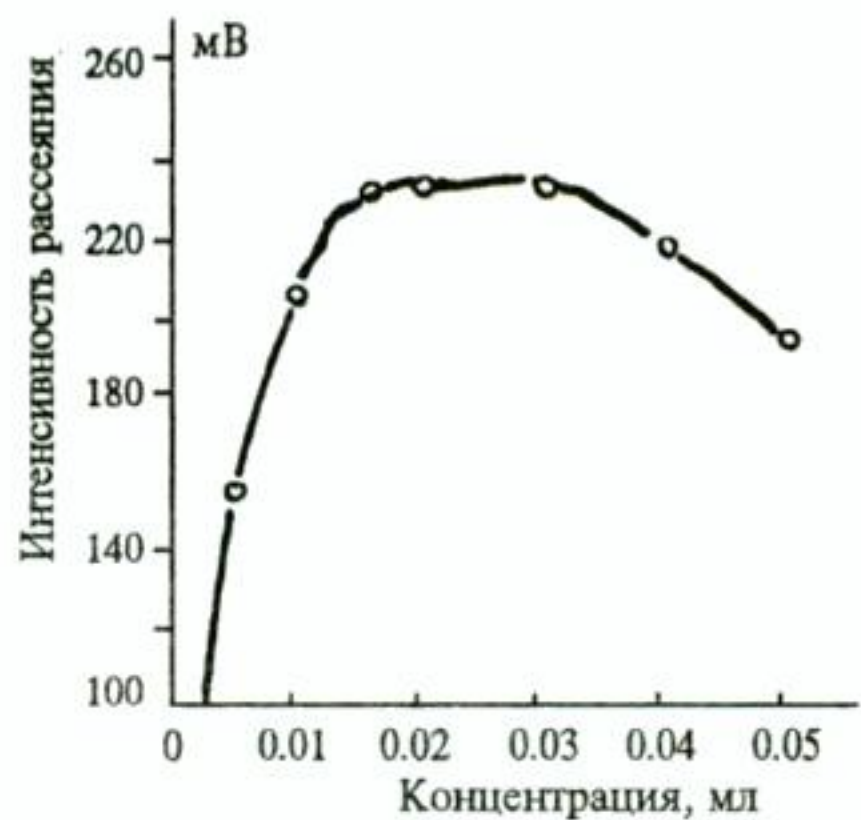


Рис. 1. Зависимость интенсивности рассеяния вперед суспензией эритроцитов от количества крови, добавленной к 3 мл физиологического раствора

него электромагнитной волны до частицы, расположенной в глубине слоя, будет доходить значительно менее интенсивная волна, чем до частицы, расположенной ближе к поверхности облучения, что нарушает прямую пропорциональность между количеством рассеивающих частиц и интенсивностью рассеиваемого света. Другими словами, для обеспечения условия $I \sim N$, то есть когда преобладающим является однократное рассеяние, необходимо, чтобы оптическая толщина l излучае-

мого объекта была малой, а именно $k \cdot l < 0.1$. Очевидно, что для проверки отсутствия или наличия нежелательного эффекта многократного рассеяния необходимо, например, удвоить концентрацию клеток в исследуемой среде. Если при этом удвоится и интенсивность рассеянного света, то основную роль играет однократное рассеяние. Удовлетворить указанному выше условию можно как за счет уменьшения толщины слоя l , так и за

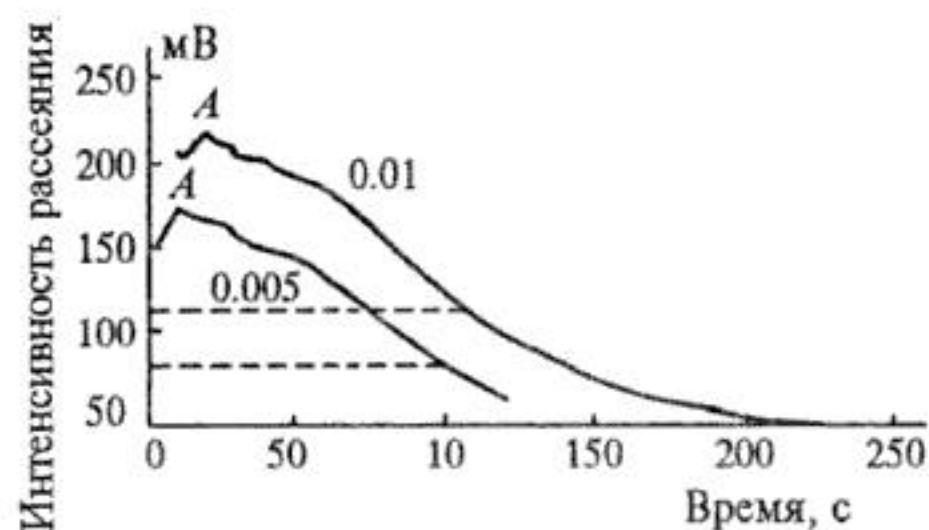


Рис. 3. Зависимость интенсивности рассеяния вперед суспензией эритроцитов от времени после контакта 0.01 мл или 0.005 мл крови с 10%-м водным раствором глицерина

эффективны. В 1 мл крови человека содержатся [6] 5 млрд эритроцитов, 250–500 млн. тромбоцитов и 5–8 млн. лейкоцитов. Плазма крови в 1 мл содержит примерно 0.035–0.053 г альбумина, 0.031–0.033 г глобулина, 0.002–0.004 г фибриногена и 0.00007–0.00012 г глюкозы. Поскольку эритроциты составляют подавляющее большинство клеток крови в первом приближении рассеянием от прочих компонентов можно пренебречь. Средний объем эритроцита составляет 87 мкм^3 . Поэтому для исследования цитометрических характеристик эритроцитов и клеток других фракций крови, очевидно, необходимо использовать длину волны в облучающем пучке порядка $\lambda \sim 1 \text{ мкм}$. С учетом того обстоятельства, что клеточная суспензия представляет собой разбавленный водный раствор и коэффициент преломления воды по отношению к вакууму равен 1.33, получаем, что длина волны непосредственно в клеточной суспензии будет при этом составлять $(1/1.33) \text{ мкм}$.

Очень маленькие частицы, больший размер которых значительно меньше длины рассеиваемой волны (каковыми являются, например, белковые молекулы в плазме), приводят к так называемому рэлеевскому рассеянию, характеристики которого не зависят от их размера. Индикатрисса рэлеевского рассеяния одинакова для всех частиц с размерами, много меньшими длины волны падающего света. Поэтому по рэлеевскому рассеянию определить размер рассеивающих частиц нельзя.

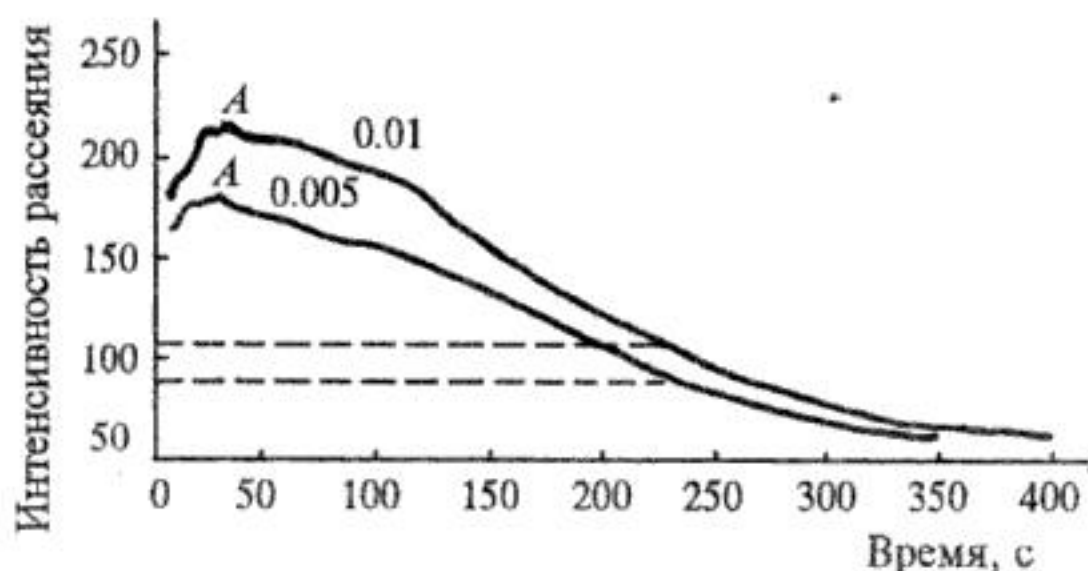


Рис. 4. Зависимость интенсивности рассеяния вперед суспензией эритроцитов от времени после контакта 0.01 мл или 0.005 мл крови с 20%-м водным раствором глицерина

Подчеркнем, что со спектроскопической точки зрения клетки биологического происхождения представляют собой так называемые “мягкие” частицы, коэффициент преломления которых по отношению к коэффициенту преломления внеклеточной среды незначительно превышает единицу. Последнее обстоятельство

(небольшой коэффициент преломления) приводит к сосредоточению основной части рассеянного клетками света в области малых углов по отношению к направлению луча, падающего на клеточную суспензию.

Как отмечалось выше, если размер частиц примерно совпадает с длиной падающей волны, то главный вклад в экстинкцию дает рассеяние, а не поглощение. В теории рассеяния важнейшим параметром является параметр $x = \pi D / \lambda$, где D – диаметр рассеивающей (сферической) частицы, а λ – длина падающей на нее волны [2]. Эффективный диаметр эритроцита составляет примерно 5.6 мкм, следовательно, $x = 22.4$.

В соответствии со строгой теорией рассеяния света на сферических частицах по мере увеличения параметра x от 1 до 20 индикатрисса рассеяния становится все более вытянутой в направлении малых углов, а отношение рассеяния вперед и назад возрастает в сотни раз. В области $x > 20$ индикатрисса рассеяния распадается на несколько лепестков. С ростом значения параметра x число максимумов в индикатриссе рассеяния становится больше. Таким образом, индикатрисса рассеяния дифрагированного излучения состоит из ряда лепестков, симметричных относительно оптической оси и убывающих по интенсивности с увеличением угла дифракции [2]. Для произвольно ориентированных частиц индикатрисса рассеяния может иметь довольно сложную форму, так как около направлений, поперек которых протяженность рассеивающей частицы большая, образуется большее число лепестков, чем около направлений, поперек которых ее протяженность меньше.

Очень важное обстоятельство заключается в том, что вблизи направления вперед рассеяние связано главным образом с дифракцией, внутренним отражением и дважды преломленным излучением [2] и не-сферические частицы рассеивают так же, как и шар с той же площадью поверхности. Это обусловлено тем, что для сравнительно крупных частиц рассеяние вперед определяется в основном дифракцией, которая зависит от площади частицы, но не от ее коэффициента преломления. Дифракционная компонента составляет около половины общего рассеянного света, причем свыше 80% дифрагированного света лежит в пределах узкого переднего лепестка диаграммы рассеяния. Интенсивность дифракционной компоненты в области малых углов не зависит от показателя преломления материала рассеивающей частицы относительно среды, а зависит только от диаметра частиц D_0 . Поскольку отраженная и преломленная составляющие распределяются в широких угловых пределах изме-

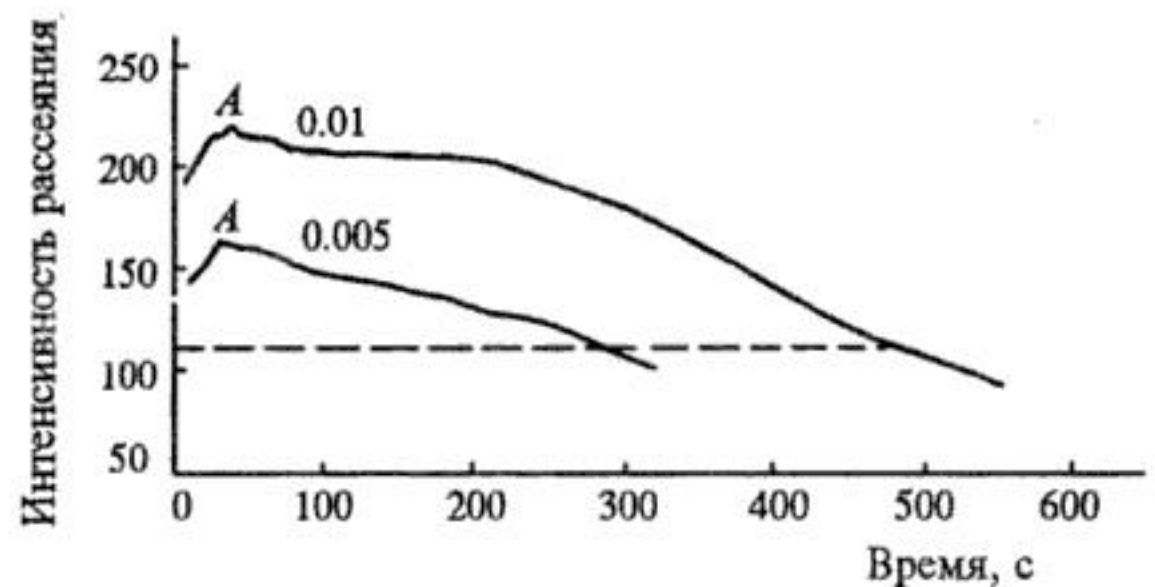


Рис. 5. Зависимость интенсивности рассеяния вперед суспензией эритроцитов от времени после контакта 0.01 мл или 0.005 мл крови с 30%-м водным раствором глицерина

рение рассеяния в области малых углов будут почти нечувствительными к отражательной способности частиц и их внутреннему строению. Расчетная зависимость эффективного диаметра от полной интенсивности рассеяния S в области углов от 0.5° до 2° удовлетворительно аппроксимируется уравнением $S = cD_0^n$. При показателе преломления

частицы относительно окружающей среды 1.05, что соответствует клеткам в водной среде, для $D_0 = 7-18$ мкм наилучшее приближение дает выражение $S = 0.29D_0^3$, то есть интенсивность рассеянного вперед излучения оказывается прямо пропорциональной объему рассеивающей частицы (а при наличии многих частиц – и количеству рассеивающих частиц). По этой причине рассеяние в центральный лепесток наиболее удобно для определения размеров клеток [5]. Именно поэтому рассеяние вперед в области малых углов можно использовать для определения объемов несферических частиц, оптические свойства которых неизвестны. Хотя несферические частицы вблизи направления вперед рассеивают аналогично шарам равного сечения, различие растет с увеличением угла рассеяния, так что реально угол рассеяния нужно брать небольшим.

Индикатрисса светорассеяния разбавленной суспензии эритроцитов имеет два максимума при малых углах (3° и 9°), которые соответствуют величинам диаметра эритроцитов в их толщине. При переводе клеток в гипотоническую среду вследствие набухания эритроцитов происходит перераспределение интенсивностей в максимумах, что указывает на увеличение доли эритроцитов соответствующего размера. Угловое положение максимумов при этом меняется незначительно. В связи с этим авторы работы [3] предложили в качестве параметра, характеризующего набухание эритроцитов, выбрать отношение интенсивностей рассеяния света

Зависимость времени достижения максимальной интенсивности светорассеяния и времени снижения интенсивности рассеяния на 50% от максимальной величины суспензией эритроцитов после добавления 0.01 мл донорской крови человека к 3 мл водного раствора глицерина от концентрации этого раствора

Объемная концентрация глицерина	t_1 , с	$t_{1/2}$, с
0.05	9 ± 3	42 ± 5
0.1	17 ± 3	105 ± 10
0.2	31 ± 5	220 ± 15
0.3	43 ± 5	372 ± 15
0.4	58 ± 10	681 ± 20

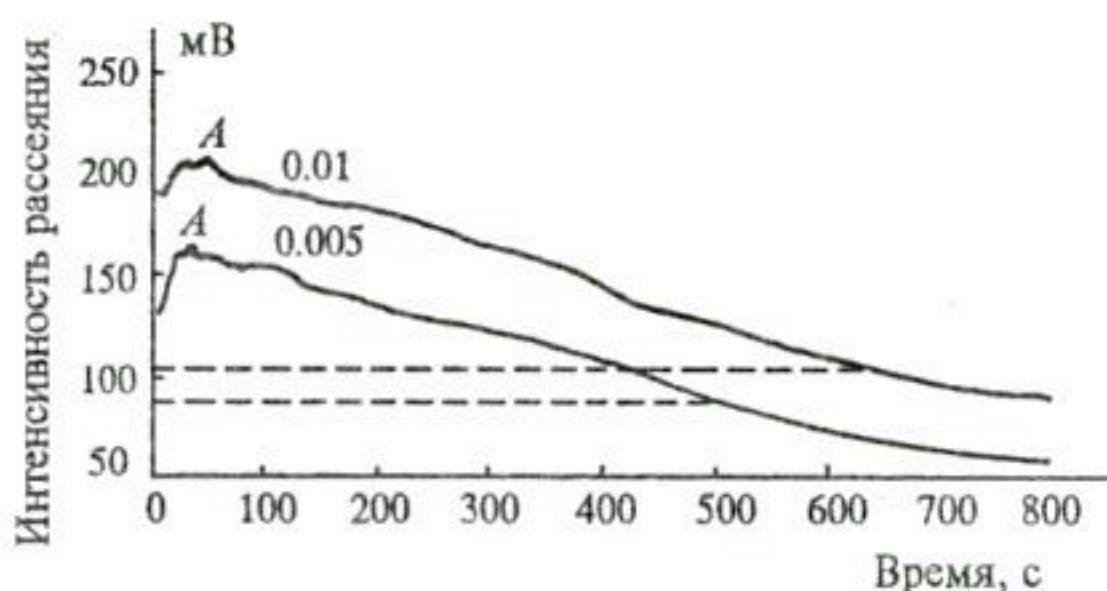


Рис. 6. Зависимость интенсивности рассеяния вперед суспензией эритроцитов от времени после контакта 0.01 мл или 0.005 мл крови с 40%-м водным раствором глицерина

под углом 3° и 9° . Измерение рассеяния света с длиной волны порядка 1 мкм вперед под углом 9° к направлению падающего пучка мы провели на приборе, изготовленном фирмой “Криокон”. Нами исследована зависимость интенсивности рассеяния вперед суспензией эритроцитов с различными количествами клеток в ней. В 3 мл физиологического раствора добавляли 0.0025 мл, 0.005 мл, 0.01 мл, 0.02 мл, 0.03 мл, 0.04

мл и 0.05 мл донорской крови с гематокритом 0.45. На рис 1 приведена калибровочная кривая, из которой следует, что при добавлении к физиологическому раствору более, чем 0.015 мл крови, интенсивность рассеяния не увеличивается.

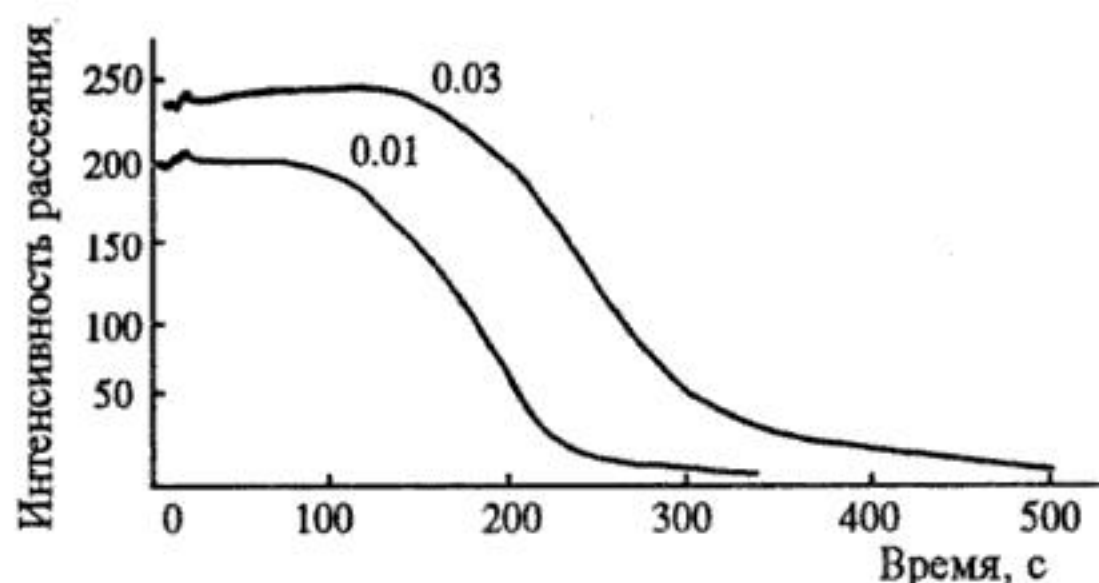


Рис. 7 Зависимость интенсивности рассеяния вперед суспензией эритроцитов от времени после контакта 0.01 мл или 0.03 мл крови с кислой средой (pH 2.4)

Очевидно, при этом количество клеток в суспензии становится настолько большим, что возникает эффект многократного рассеяния. Следовательно, регистрацию кинетических эффектов, связанных с увеличением объема клеток или уменьшением их количества при гипотоническом лизисе или кислотном гемолизе эритроцитов следует проводить, добавляя в соответствующие растворы (к 3 мл) не более 0.01 мл крови. С другой стороны уменьшение количества клеток в суспензии, соответствующее добавлению к 3 мл раствора менее, чем 0.005 мл крови, как следует из калибровочной кривой, приводит к значительному уменьшению интенсивности рассеянного вперед света, что является неблагоприятным фактором. Поэтому при исследовании явления гипотонического и кислотного гемолиза использовали добавление к 3 мл раствора 0.005 мл или 0.01 мл крови. На рис. 2–6 показана временная зависимость рассеяния вперед под углом 9° к направлению падающего пучка после контакта 0.01 мл или 0.005 мл донорской крови человека с 3 мл водного раствора глицерина с концентрациями 5, 10, 20, 30 и 40%. В таблице показаны время, при котором, как следует из экспериментов, интенсивность рассеяния вперед достигает максимального значения t_A а также экспериментально измеренное среднее время 50%-го гемолиза эритроцитов $t_{1/2}$ при различных концентрациях глицерина во внеклеточной среде. Нами измерено t_1 и $t_{1/2}$ для пяти образцов донорской крови при контакте с 20 и 30%-м водным раствором глицерина. При контакте с 20%-м раствором глицерина время от добавления клеток в раствор до момента, при котором рассеяние вперед на угол 9° градусов по отношению к направлению падающего пучка становится максимальным, составило 31 ± 5 с, а время 50%-го гемолиза составило 220 ± 15 с, а при контакте с 30%-м раствором соответственно 43 ± 5 и 372 ± 15 с. С учетом полученных и литературных данных можно утверждать, что выход t_A $t_{1/2}$ за указанные пределы свидетельствует о патологических отклонениях и может служить диагностическим тестом при массовом обследовании больных. На рис. 7, 8 показана

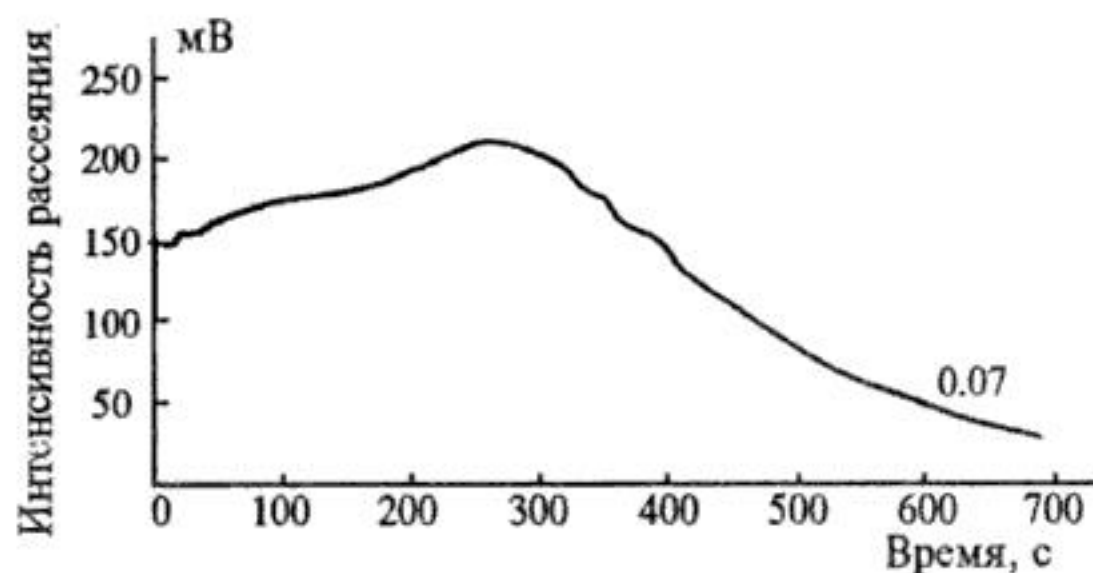


Рис. 8. Зависимость интенсивности рассеяния вперед суспензией эритроцитов от времени после контакта 0.07 мл крови с кислой средой (pH 2.4)

На рис. 7, 8 показана

на зависимость интенсивности рассеяния вперед суспензией эритроцитов от времени после добавления к 3 мл кислой среды 0.01, 0.03 и 0.07 мл крови.

Наличие максимумов на кривых, соответствующих второму и третьему из перечисленных случаев объясняется тем, что в соответствии с калибровочной кривой (рис. 1) уменьшение количества клеток в процессе кислотного гемолиза в случае добавления сравнительно больших количеств крови к кислой среде приводит к увеличению интенсивности рассеяния до тех пор, пока количество клеток не уменьшится до значений, соответствующих левой от максимума половине калибровочного графика. Таким образом приемлемой для тестирования крови является только концентрация клеток, которая имеет место при добавлении к 3 мл кислой среды 0.01 мл крови. На соответствующем графике (рис. 7) хорошо просматривается время задержки гемолиза (около 100 с), а точка перегиба на кривой "интенсивность рассеяния – время" $I(t)$ (которая обычно определяется как точка, соответствующая максимуму кривой dI/dt), согласуется с нормальными показателями крови. Таким образом продолжительность задержки кислотного гемолиза и указанное выше время "максимального гемолиза" могут служить диагностическими экспресс-тестами. Кроме того в качестве диагностических тестов могут быть использованы следующие параметры зависимости интенсивности рассеяния вперед от времени: а) время, при котором интенсивность рассеяния после контакта 3 мл водного раствора глицерина (20 или 30%) с 0.01 мл исследуемой крови достигает максимального значения, б) время, за которое эта интенсивность рассеяния уменьшается вдвое (что соответствует широко применяемому для тестирования параметру – времени 50%-го гемолиза при гипотоническом лизисе).

Авторы выражают благодарность руководству научно-производственной фирмы "Криокон" за предоставленную возможность провести исследования на приборе, изготовленном фирмой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борен К., Хафман Д. Поглощение и рассеяние света малыми частицами. – М.: Мир, 1986. – 860 с.
2. Ван де Хюлст Г. Рассеяние света малыми частицами. – М.: Иностран. лит-ра, 1961. – 536 с.
3. Татаринцев Б.А., Цверко В.А., Черенкевич С.Н., Комяк А.И. Способ определения набухания эритроцитов // Вестник Белорусск. гос. ун-та. – 1980. – Сер. 1, N 1. – С. 30–33.
4. Терсков И.А., Гительзон И.И. Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. – 1957. – N 11, вып. 2. – С. 259–266.
5. Mullaney P.F., Dean P.N. The small angle light scattering of biological cells. Theoretical consideration // Biophys. J. – 1970. – 10, N 3. P. 764–772.
6. Neelakantaswamy P.S., Asper K.F., Rajaratham A., Das N.P. Conductometric method of determined the hematocrit value of blood // Rev. Sci. Instrum. – 1983. – 54, N 9. – P. 1186–1190.
7. Steinkamp J.A. Flow cytometry // Rev. Sci. Instrum. – 1984. – 55, N 9. – P. 1375–1400.

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

Поступила 27.10.92

Є.О.ГОРДІЄНКО, О.І.ГОРДІЄНКО, І.Ф.КОВАЛЕНКО, Л.Ф.РОЗАНОВ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ КІНЕТИКИ ГІПОТЕРМІЧНОГО І КИСЛОТНОГО ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ МЕТОДОМ МАЛОКУТОВОГО РОЗСІЯННЯ

Институт проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Коротко описані деякі відомі характеристики методу світлорозсіання. Виміряна інтенсивність малокутового розсіання суспензією людських еритроцитів після контакту

клітин з водними розчинами гліцерину різноманітної концентрації і з кислим (pH 2.4) середовищем. Показано, які параметри можуть бути використані для діагностичних тестів.

E.A.GORDIYENKO, O.I.GORDIYENKO, I.F.KOVALENKO, L.F.ROZANOV

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE KINETICS OF HYPOTONIC AND ACIDIC HEMOLYSIS OF HUMAN ERYTHROCYTES BY THE METHOD OF SMALL ANGLE SCATTERING

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

A brief description of some known characteristics of the light scattering method has been presented. The intensity of small angle scattering of the suspension of human erythrocytes has been measured after exposure to the aqueous solutions of glycerol at different concentrations and acidic (pH 2.4) medium. Parameters that may be used as diagnostic test have been determined.

UDC 57.043

Zhang Cheng, Li Yuming

THE EFFECT OF COLD ENVIRONMENT ON PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF RAT CIRCUIT AND A STUDY OF PATHWAY FOR REGULATION OF BLOOD FLOW CIRCULATION

In order to clarify the changes in physiology of the circuit in cold environment, the present experiment describes the effect of cold on the performance parameters of the rat circuit. It has been demonstrated that the right ventricular systolic pressure (RVSP), the mean pulmonary arterial pressure (MPAP) and the output of right ventricle (Q_R) were higher, the wedge pressure (WP) was low in cold environment (2 °C) when compared with these parameters in the normal environment (16 °C). These findings suggest that the blood flowing from right ventricle to lungs and back to the left atrium became easy and the pulmonary circulation rate increased, and it provides sufficient energy for body needs in cold environment. It is known in the world that the output of both ventricles remains very nearly equal. However, in our experiment, a new method of heart catheter for output was used. We found that the output of right ventricle (Q_R) is significantly different from the output of left ventricle (Q_L), and Q_R/Q_L is about 0.74 at normal temperature, and it is about 0.88 in cold environment. It is suggested that there is a pathway for the regulation of blood flow. The pathway lies in branches and between aorta and pulmonary veins. The left ventricle ejects the blood into the aorta, and then the main part of blood into the branch arteries, and the other part of blood flows through the pathway into the pulmonary veins and back to the left atrium directly. The resistance of the pathway is regulated by changes in oxygen and carbon dioxide pressure in the sacs of the lungs and blood. The Q_R/Q_L is regulated by resistance of the pathway under different conditions. The idea above is very important, and no one has ever informed it before.

The effect of low temperature on the physiological function of the heart was described previously [1–5], here we are more concentrated on effect of cold environment on the physiological characteristics of circuit.

It is significant to understand the effect of cold on physiological characteristics of the circuit in environment physiology and hibernation. In order to clarify the changes in physiology of the circuit in cold environment, the present experiment will describe the effect of cold on the right ventricular systolic pressure (RVSP), peak rate of right ventricular pressure rise (dp_R/dt_{max}), peak rate of right ventricular pressure decline ($-dp_R/dt_{max}$), mean pulmonary arterial pressure (MPAP), wedge pressure (WP), resistance of pulmonary circuit t (R_p), output of right ventricle (Q_R), mean aorta pressure (MAP), left ventricular systolic pressure (LVSP), peak rate of left ventricular pressure rise (dp_L/dt_{max}), peak rate of left ventricular pressure decline ($-dp_L/dt_{max}$), resistance of systemic circuit (R_s), output of left ventricle (Q_L), and heart rate (HR). Ten male Wistar rats that lived in cold environment (2 °C) and ten rats that lived in normal environment (16 °C)

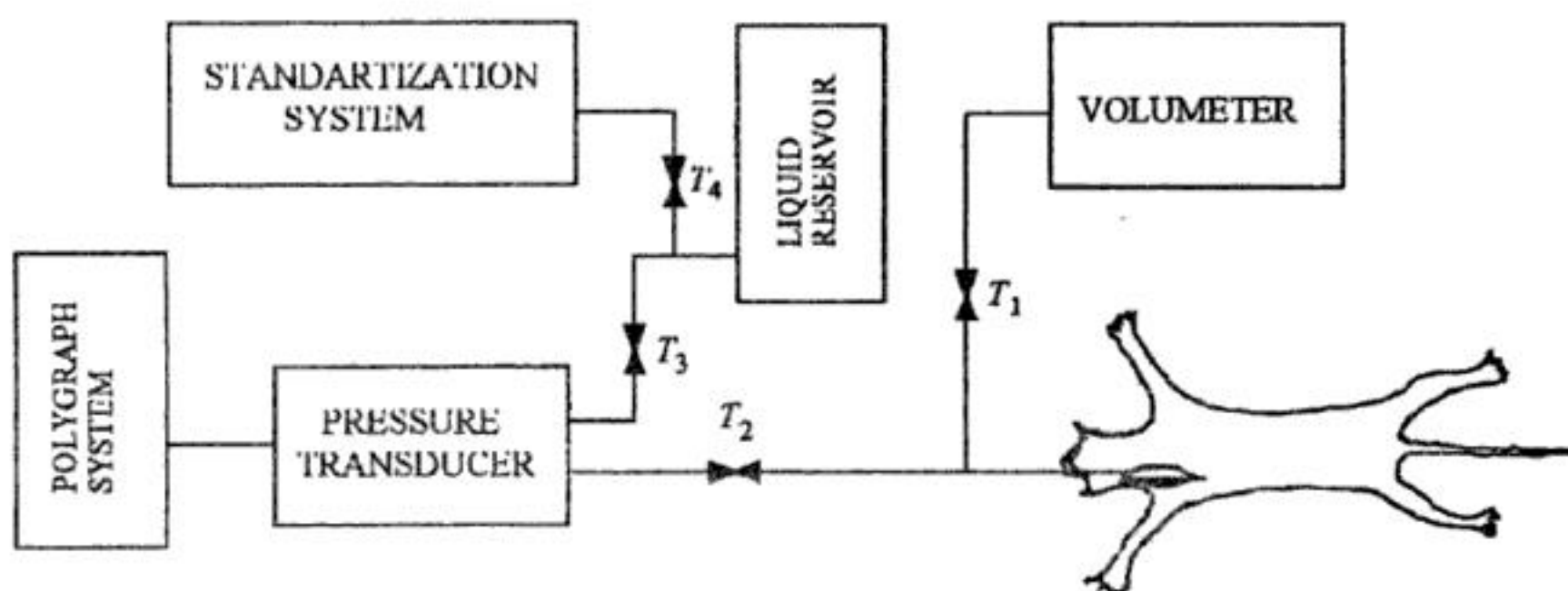


Fig. 1. Scheme of measurement for the performance parameters of rat circuit

were raised for 3 days. Their weight is about 270 to 300 g. The rats were anesthetized with urethane (20%, 0.5 ml/100 g).

The right *vena jugularis externa* was carefully dissected. A plastic catheter (1 mm - DI) was inserted from right *vena jugularis externa* through *vena cava*, right atrium and right ventricle into the pulmonary artery (Fig. 1). The following physiological parameters were recorded with a 4-channel polygraph system, Model ST-42, manufactured in Shanshai China: RVSP, RVEDP, dp_R/dt_{max} , $-dp_R/dt_{max}$, MPAP, WP and HR. The LVSP and MAP were recorded by the same method when the catheter was inserted from cephalic artery into aorta and left ventricle. Up to now, in determination the cardiac output, only indirect methods are available. The major experimental procedures to measure the cardiac output make use of many methods, such as Flick's principle, the Stewart-Hamilton indicator dilution technique. The impedance method, modern electromagnetic or ultrasonic flowmeters, etc. , but these methods are not much exact [6-9].

In our experiment, a new method using catheter to measure the cardiac output was designed. The catheter was inserted into pulmonary artery through the right *vena jugularis externa*, and MPAP was recorded and, in turn, switch T_1 was opened and a volume of blood (a) flowed out from the pulmonary artery through the catheter into a volumeter for a relatively short time, usually 20 to 30 s. After that, switch T_1 was closed and the mean pulmonary arterial pressure (MPAP') was recorded immediately.

Let us recall Ohm's law for calculation of the blood flow through blood vessels, and the following formula (A) may be obtained:

$$\text{right ventricle output } (Q_R) = \frac{\text{mean pulmonary artery pressure} - \text{left atrial pressure (MPAP)}}{\text{resistance of pulmonary circuit } (R_p)} \quad (A)$$

Since the left arterial pressure remains very nearly zero, this formula becomes:

$$Q_R = \frac{MPAP}{R_p} \quad (B)$$

Table 1

The Effect of Cold on Changes in Physiology of Pulmonary Circuit

Environment	RVSP, mm Hg	dp_1/dt_{max} , mm Hg/s	$-dp_1/dt_{max}$, mm Hg/s	MPAP, mm Hg	WP, mm Hg	R_p , mm Hg ·min/ml	Q_R , ml/min
Normal ($n=10$)	32.78±4.38	1500±245	965±113	16.72±3.40	8.44±2.51	0.91±0.23	18.85±1.83
Cold ($n=10$)	36.78±3.46	1595±273	895±177	19.44±2.17	5.78±1.64	0.93±0.12	21.14±1.91
<i>P</i> value	< 0.05	NS	NS	< 0.05	< 0.05	NS	< 0.05

The mean ±SD are the results of the rats in each group. *P* is cold group compared with normal group. Q_R was obtained according to the formula (E).

After opening the switch T_1 , the mean pulmonary arterial pressure (MPAP) decreases to MPAP' and the cardiac output of right ventricle can be calculated according to the following formula (C):

$$Q_R = \frac{MPAP'}{R_p} + \Delta Q \quad (C)$$

It has been found in our experiment that after opening the switch T_1 the pulmonary circuit resistance (R_p) is nearly constant during 40 s, so the following equation is obtained:

$$\frac{MPAP}{R_p} = \frac{MPAP'}{R_p} + \Delta Q$$

and

$$R_p = \frac{MPAP - MPAP'}{\Delta Q} \quad (D)$$

$$Q_R = \frac{MPAP \cdot \Delta Q}{MPAP - MPAP'} \quad (E)$$

where ΔQ is the volume of blood that flows from the pulmonary artery into volumeter through the catheter per minute. $\Delta Q = q/t \cdot 60$ where t is the given time usually 20 to 30 s.

According to the same principles, the systemic circuit resistance (R_s) and left ventricle output (Q_L) can be calculated by Eq. F and Eq. G:

$$R_s = \frac{MAP - MAP'}{\Delta Q'} \quad (F)$$

$$Q_L = \frac{MAP \cdot \Delta Q'}{MAP - MAP'} \quad (G)$$

Table 2

The Effect of Cold on Changes in Physiology of Systemic Circuit

Environment	LVSP, mm Hg	dp_1/dt_{max} , mm Hg/s	$-dp_1/dt_{max}$, mm Hg/s	MAP, mm Hg	R_s , mm Hg ·min/ml	Q_L , ml/min
Normal ($n=10$)	145.64±21.20	5640±1238	3578±1032	105.14±8.43	4.01±1.04	25.49±2.68
Cold ($n=10$)	137.14±15.70	5438±1146	3470±785	102.50±6.01	4.14±0.92	24.16±3.01
<i>P</i> value	NS	NS	NS	NS	NS	NS

The mean ±SD are the results of the rats in each group. *P* is cold group compared with normal group. Q_L was obtained according to the formula (G).

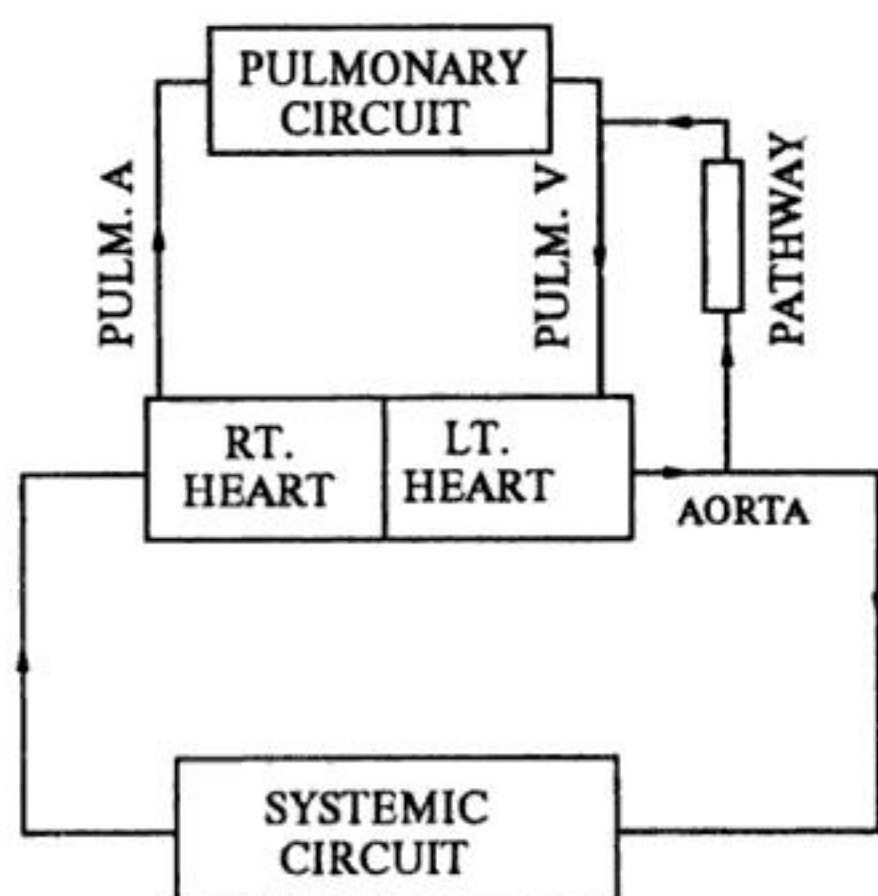


Fig. 2. Scheme of circulation with the pathway for regulation of blood flow (by Zhang Cheng and Li Yuming)

catheter was inserted from cephalic artery into aorta and left ventricle, and the parameters of systemic circuit were measured.

where MAP' is the mean aortic pressure after the switch T_1 was opened for a given time, ΔQ is the volume of blood that flows out from the aorta per minute. $\Delta Q^I = q/t \cdot 60$ here t is the given time, usually 20 to 30 s. At first, the catheter with 0.9% salt solution containg 25 μ /ml heparin was inserted from right *vena jugularis externa* through *vena cava*, right atrium and right ventricle into the pulmonary artery, and the parameters of the pulmonary circuit were measured. Thereafter, the flowed blood from the pulmonary artery was injected into the right *vena jugularis externa*, then, the vein was ligated. After that the

Table 3

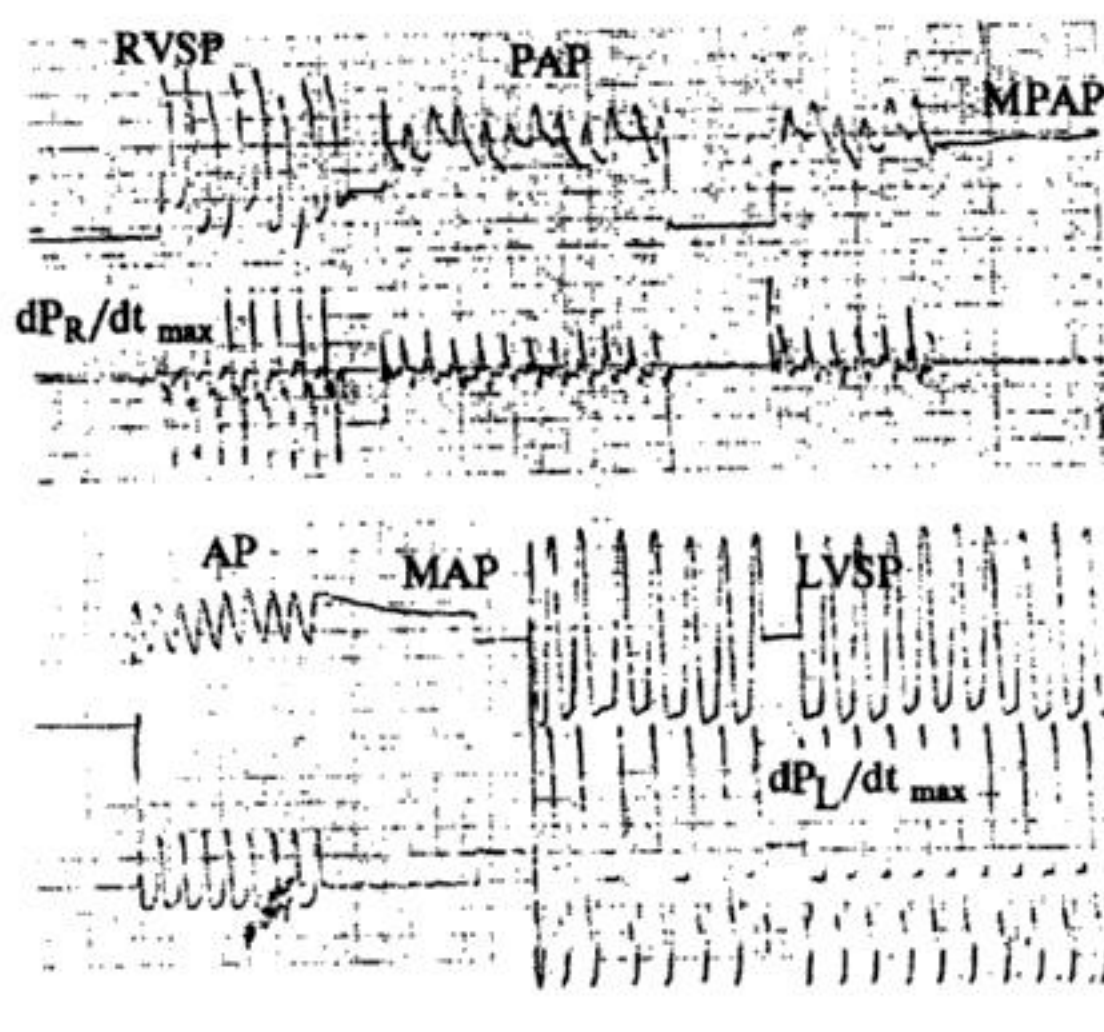
The Effect of Cold on Changes of the Relationship Between Q_R and Q_L

Environment	HR, beats/min	Q_R , ml/min	Q_L , ml/min	Q_I/Q_L , %
Normal ($n=10$)	379 ± 37	$18.85 \pm 1.83^*$	$25.47 \pm 2.68^*$	74
Cold ($n=10$)	403 ± 27	$21.14 \pm 1.91^{**}$	$24.16 \pm 3.01^{**}$	88

The Q_L and Q_L are taken from Table 1 and Table 2, respectively. $^*P < 0.01$ for differences between Q_L and Q_L in normal environment. $^{**}P < 0.02$ for differences between Q_L and Q_L in cold environment.

Table 1 shows that the RVSP, MPAP and Q_R were higher and WP was lower in cold environment when compared with these parameters in normal

Fig. 3. The recordings of performance in the normal environment (group I-3 at 16 °C). The RVSP and MPAP are expressed in mm: 1 mm = 1 mm Hg, and $\pm dp_R/dt_{max}$ is 1 mm = 100 mm Hg/s. The LVSP and MAP are 1 mm = 5 mm Hg, $\pm dp_L/dt_{max}$ is 1 mm = 200 mm Hg/s



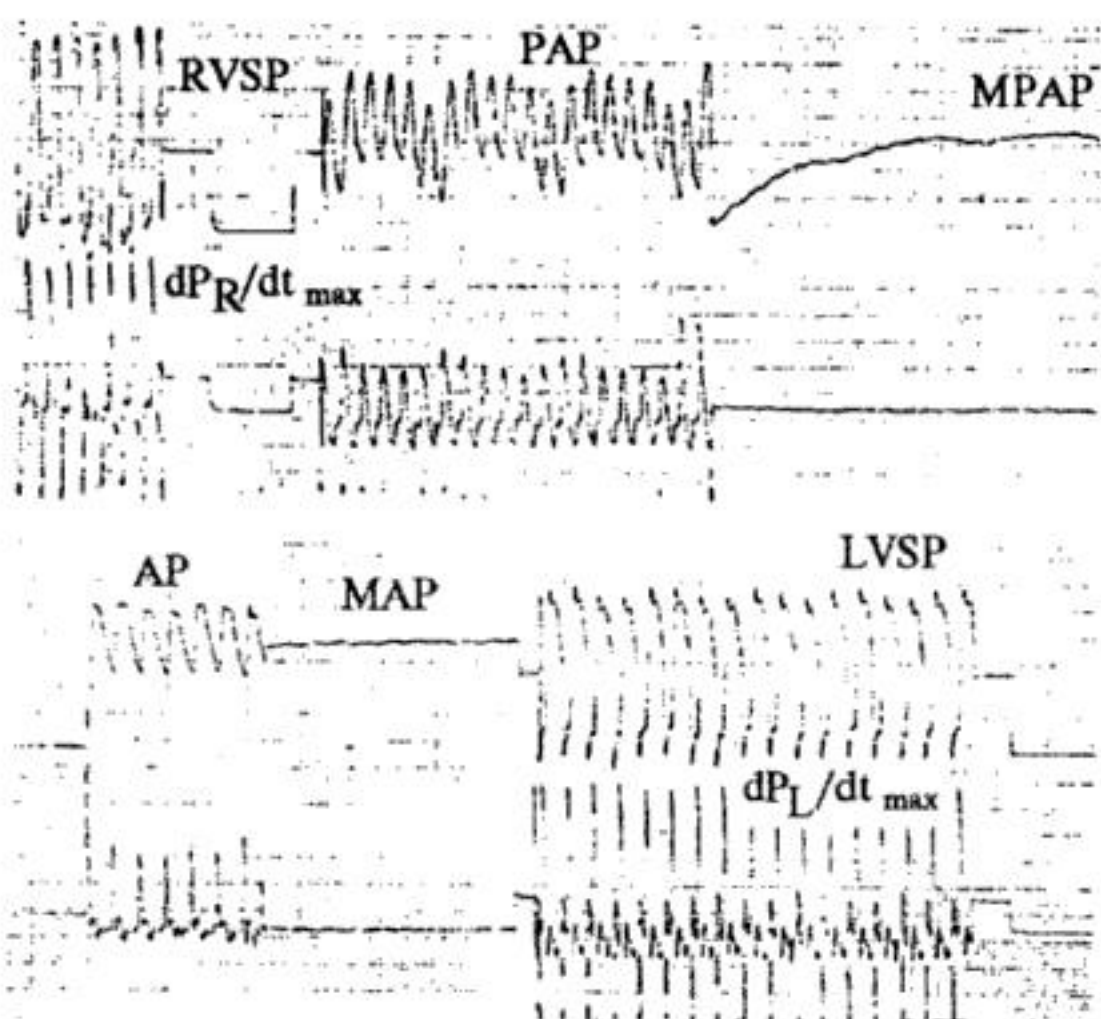


Fig. 4. The recordings of performance in cold environment (group II-2, at 2 °C)

environment. The observed differences were statistically significant. Table 2 shows that the observed differences of each parameter in the systemic circuit were not statistically significant. Table 3 shows that the output of right ventricle (Q_R) is significantly different from the output of left ventricle (Q_L) and Q_R/Q_L is about 0.74 in normal condition and Q_R/Q_L is about 0.88 in cold environment.

As can be seen from Table 1, RVSP, MPAP and Q_R were higher, WP was lower in cold environment when compared with these parameters in normal condition. These findings suggest that the blood flowing from right ventricle to lungs and back to left atrium becomes easy and the pulmonary circulation rate increases and it provides sufficient energy for body needs in cold environment.

It is generally believed that the output of both ventricles remains similar [10, 11]. However, it has been found in our experiment that the output of right ventricle differs significantly from that of left ventricle, as can be seen from Table 3, and the Q_R/Q_L is about 0.74 at normal temperature, and Q_R/Q_L is about 0.88 in cold environment. These findings suggest that there is a pathway for regulation of blood flow that lies in bronchus between aorta and pulmonary veins (Fig. 2). The pathway circulation can be of physiologic importance because there are direct anastomotic connection capillaries between the bronchial and pulmonary veins. The left ventricle ejects blood into aorta, and then the main part of the blood flows into branch arteries and the other part of blood goes through the pathway into the pulmonary veins and back to left atrium directly. The resistance of the pathway is regulated by nerves through changes in oxygen and carbon dioxide in the sacs and partial pressure of oxygen and carbon dioxide in blood, etc.

The pathway's arterioles have the contractile tissue in their walls. However, many vascular muscles are innervated by sympathetic vasoconstrictor fibers. Selective constriction of these vessels can be used to regulate the resistance of the pathway under different conditions. In the cold environment, the Q_R and Q_R/Q_L were higher when compared with these parameters in the normal condition. These findings suggest that the resistance of pathway and the circulation rate increase. It provides sufficient energy for body needs in the cold environment.

The effect of cold environment on the parameters of the systemic circuit appeared to be less apparent.

The Project is supported by the National Natural Foundation of China.

REFERENCES

1. Cheng Z., Fensyou X., Zhaohuei W., Zhanying Gao. The effect of adrenaline on physiological characteristics of the isolated toad heart at low temperature and after freeze-thaw // *Cryobiology*. – 1982. – 19. – P. 520.
2. Yingmao C., Cheng Z., Zihou L. et al. Effect of different temperatures on physiological function of the isolated rabbit heart // *Chinese J. Appl. Physiol.* – 1990. – 6. – P. 373 (in Chinese).
3. Offerijns F.G.J. Cryobiology of the heart // *Eur. J. Cardiol.* – 1975. – 3. – P. 85.
4. Rapatz G. Resumption of activity in frog hearts after freezing to low temperature // *Biodynamica*. – 1970. – 11. – P. 1.
5. Jinssheng G., Shiguen L. Effects of cold hypoxia on pulmonary extravascular water in rats // *Chinese J. Appl. Physiol.* – 1988. – 4. – P. 36 (in Chinese).
6. Zhaolans T., Xiaoge S. The impedance method of measurement of cardiac output (CO) of the rabbit // *Ibid.* – 1987. – 3. – P. 139 (in Chinese).
7. Anshao M., Qigxin M. Comparative evaluation of the impedance cardiography and the dye dilution technique for measuring cardiac output in normal adults // *Ibid.* – 1987. – 3. – P. 142 (in Chinese).
8. Zhi M., Xiaoyan L., Zhiwu W. Application of impedance cardiograms and dye dilution for estimating cardiac output of rabbits during hypoxia // *Ibid.* – 1986. – 2. P. 128 (in Chinese).
9. Yan W., Xieyong W. Assessment of cardiac function by two dimensional Doppler echocardiography in 100 healthy newcomers to high altitude // *Ibid.* – 1989. – 5. – P. 271 (in Chinese).
10. Robbert C.L. *Physiology of the Heart and Circulation*. – Chicago: Year Book Med. Publ., Inc. – 1981.
11. Gnyton A.C. *Textbook of Medical Physiology*. – Philadelphia: N.B.Saunders Co., 1986.

Laboratory of Low Temperature Physiology,
Chensde Medical College, Chensde,
Hebei, The People's Republic of China

Received for publication 26.02.93

ЖАН ЧЕНГ, ЛІ ЮМІНГ

ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ХОЛОДУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПАРАМЕТРИ КРОВО- ОБІГУ ЩУРІВ ТА ШЛЯХІВ ЙОГО РЕГУЛЯЦІЇ

Лабораторія низькотемпературної фізіології, Медичний коледж Ченсде,
КНР

Досліджували дію холоду на функціональні параметри кровообігу щурів. Встановлено, що систолічний тиск правого шлуночка, середній тиск в легеневій артерії і викид крові з правого шлуночка (Q_R) збільшувались, а кліновидний тиск знижувався в умовах холоду (2°C) порівняно з названими параметрами при нормальній температурі (16°C). Одержані результати свідчать про те, що потік крові в кровообігу підвищується, забезпечуючи таким чином достатню кількість енергії для потреб організму в умовах холоду. Відомо, що викид крові з обох шлуночків майже однаковий. Проте наші експерименти із застосуванням серцевого катетера показали, що викид крові із правого шлуночка (Q_R) значно відрізняється від викиду з лівого (Q_L), а Q_R/Q_L складає біля 0,74 при нормальній температурі і 0,88 на холоді. Очевидно, існує шлях регуляції потоку крові. Цей шлях проходить по відгалуженнях судин між аортою і легеневими венами. Лівий шлуночок викидає кров у аорту, після того основна частина крові надходить у розгалуження артерій, а інша частина у легеневі вени і назад прямо у ліве передсердя. Резистентність шляху регулюється змінами у тискові кисню і двоокису вуглецю у мішечках легенів і у крові. Q_R/Q_L регулюється резистентністю шляху в різноманітних умовах.

ЖАН ЧЕНГ, ЛИ ЮМИНГ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХОЛОДА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАК- ТЕРИСТИКИ КРОВООБРАЩЕНИЯ КРЫСЫ И ПУТЕЙ ЕГО РЕГУЛЯЦИИ

Лаборатория низкотемпературной физиологии, Медицинский колледж
Ченсде, КНР

Исследовали действие холода на функциональные параметры кровообращения крысы. Установлено, что систолическое давление правого желудочка, среднее давление в легочной артерии и выброс крови из правого желудочка (Q_R) увеличивались, а клиновидное давление понижалось в условиях холода (2°C) по сравнению с этими параметрами при нормальной

температуре (16 °C). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ток крови из правого желудочка к легким и обратно в левое предсердие облегчается, а скорость легочного кровообращения повышается, обеспечивая таким образом достаточное количество энергии для нужд организма в условиях холода. Известно, что выброс крови из обоих желудочков почти одинаков. Однако наши эксперименты с применением сердечного катетера показали, что выброс крови из правого желудочка (Q_R) значительно отличается от такового из левого желудочка (Q_L), а Q_R/Q_L составляет около 0,74 при нормальной температуре и 0,88 на холоде. Вероятно, существует путь регуляции тока крови. Этот путь проходит по ветвям сосудов между аортой и легочными венами. Левый желудочек выбрасывает кровь в аорту, затем основная часть крови поступает в разветвления артерий, а другая часть в легочные вены и обратно прямо в левое предсердие. Резистентность пути регулируется изменениями в давлении кислорода и двуокиси углерода в мешочках легких и крови. Q_R/Q_L регулируется резистентностью пути в различных условиях.

УДК 57.043

В.В.Рамазанов, В.А.Бондаренко

РОЛЬ НАПРАВЛЕННОСТИ ГРАДИЕНТА ПО ХЛОРУ В МЕХАНИЗМЕ РАЗВИТИЯ ХОЛОДОВОГО ШОКА ЭРИТРОЦИТОВ

Изучали влияние направленности градиента по хлору в интактных и дегидратированных эритроцитах на холодовую чувствительность клеток в гипертоническом растворе сахарозы. Показано, что направленность действия ингибитора анионного транспорта ДИДС на холодовой шок эритроцитов зависит от концентрации NaCl в среде инкубации. Если клетки были предварительно дегидратированы, то действие ДИДС независимо от концентрации соли приобретало однонаправленный характер.

Осмотические потоки воды и хлора, контролируемые белком полосы-3 мембран эритроцитов [7], в условиях замораживания направлены из клетки, и эта направленность в фазе оттаивания, т.е. в условиях, когда быстро уменьшается в среде концентрация электролитов [1], изменяется на обратную. Частичная дегидратация эритроцитов в присутствии криопротекторов в среде инкубации, а также дегидратация в присутствии умеренно гипертонических растворов сахарозы и солей [1], способствуют возрастанию уровня сохранности клеток при замораживании и при действии гипертонического шока. Указанная особенность может быть связана со снижением величин градиентных потоков хлора и воды при последующем замораживании эритроцитов [1].

В данной статье анализируются результаты исследования влияния холодового шока на интактные и дегидратированные эритроциты.

В работе использовались эритроциты донорской крови, отмытые раствором, содержащим 150 мМ NaCl и 20 мМ фосфат (pH 7.4). Дегидратированные эритроциты, истощенные по хлору и калию, получали следующим образом. Эритроциты отмывали раствором, содержащим 270 мМ сахарозу и 20 мМ фосфат. Гематокрит доводили до 2%, и суспензию инкубировали при 37 °C 60 мин. После обработки эритроциты отмывали раствором для инкубации и до использования оставляли при 4 °C. Подобная процедура приводит к потере внутриклеточного хлора, калия, воды и уменьшению объема клетки [2,3].

Холодовой шок эритроцитов в среде, содержащей 0.86 М сахарозу и 0-400мМ NaCl, осуществляли как было описано [6]. Для блокирования потоков хлора через мембрану использовали ингибитор анионного транспорта ДИДС (4,4'-диизотиоциано-стильбен-2,2'-дисульфонат). На рис. 1, а представлены результаты исследования холодового шока эритроцитов. Видно, что возрастание концентрации соли в среде инку-

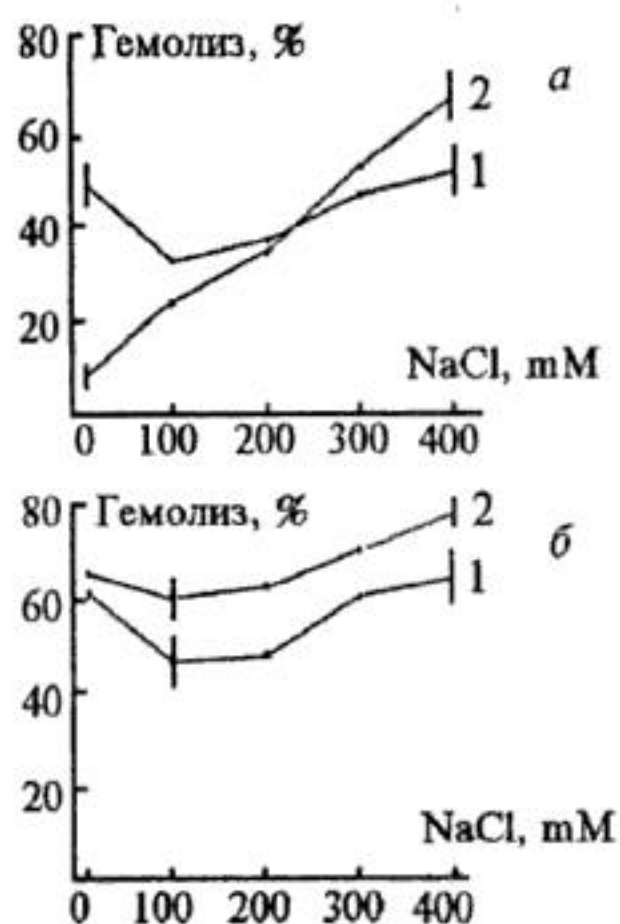


Рис. 1. Чувствительность эритроцитов к охлаждению от 37 °С до 0 °С после инкубации 10 мин в среде, содержащей 0,86 М сахарозу и 0–400 мМ NaCl: 1 – контроль; 2 – ДИДС, 10 мкМ; а – интактные эритроциты; б – дегидратированные эритроциты

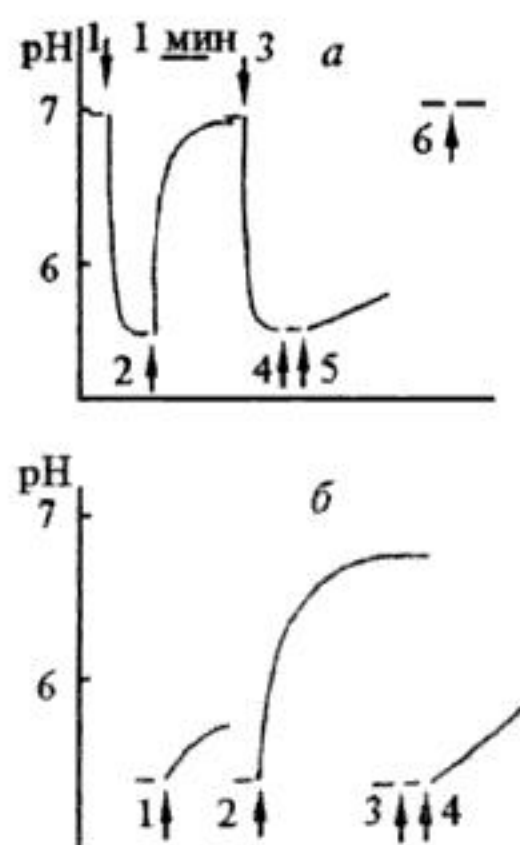
бации в интервале 0–100 мМ NaCl приводит к снижению уровня холодового шока, тогда как в интервале концентраций NaCl 150–400 мМ имеет место обратный процесс. Использование ингибитора анионного транспорта ДИДС показало (рис. 1, а; кривая 2), что в отсутствие соли действие ДИДС приводит к значительному снижению холодовой чувствительности эритроцитов. Возрастание концентрации NaCl в среде до 200 мМ приводит к полному устранению влияния ингибитора на холодовую чувствительность клеток. Повышение концентрации NaCl до 300–400 мМ приводит к тому, что присутствие ДИДС вызывает возрастание холодовой чувствительности эритроцитов по сравнению с его блокирующим действием в безсолевой среде. Указанный эффект соли при концентрации 400 мМ на действие ДИДС является достаточно выраженным, хотя транспорт хлора в клетку при таких концентрациях NaCl не происходит, что обусловлено существованием механизма, ограничивающего поступление анионов в клетку [5]. Следует отметить, что уровни холодового шока в среде, содержащей 0,86 М сахарозу и в среде, содержащей 0,86 М сахарозу плюс 400 мМ NaCl, практически не различаются между собой, несмотря на большую разницу в ионной силе для каждой из сред (рис. 1, а; кривая 1). В то же время в присутствии ингибитора анионного транспорта ДИДС уровни холодового шока эритроцитов для двух указанных вариантов значительно различаются между собой (рис. 1, а; кривая 2), и в данном случае уже исключается действие факторов, связанных с движением хлора через мембрану. Для более детального выяснения роли направленности градиента по хлору в механизме, контролирующем холодовую чувствительность эритроцитов, клетки были предварительно дегидратированы в изотоническом растворе сахарозы.

На рис. 2, а представлены результаты регистрации сдвига рН суспензии эритроцитов в термостатируемой ячейке с рН электродом.

Сдвиг рН для указанных условий сопряжен с однонаправленным потоком хлора через мембрану [4]. В безсолевой среде, содержащей 0,86 М сахарозу внесение эритроцитов приводит к закислению среды инкубации, добавление NaCl приводит к защелачиванию суспензии клеток. В то же время в среде, содержащей 0,86 М сахарозу и 400 мМ NaCl внесение эритроцитов не приводит к повышению рН среды инкубации. Напротив, комбинирование дегидратированных эритроцитов с указанной средой приводит к защелачиванию среды, и это защелачивание блокируется в присутствии ингибитора анионного транспорта ДИДС (рис. 2, б).

Дегидратированные эритроциты были подвергнуты холодовому шоку в гипертоническом растворе сахарозы в присутствии низких и высоких концентраций NaCl. Результаты, представленные на рис. 1, б, показывают, что предварительная дегидратация клеток приводит к возрастанию хо-

Рис. 2. Сдвиг pH суспензии эритроцитов в термостатируемой при 37 °С ячейке с pH-электродом: *а* – интактные эритроциты: 1, 3, 6 – добавлено 50 мкл осадка эритроцитов; 2, 5 – добавлено 150 мМ NaCl; 4 – добавлен ДИДС (10 мкМ); 1, 3 – среда содержит 0,86 М сахарозу; 6 – содержит 0,86 М сахарозу+400 мМ NaCl; *б* – дегидратированные эритроциты: 1, 2, 4 – добавлено 50 мкл осадка эритроцитов; 3 – добавлен ДИДС (10 мкМ); 1 – среда содержит 0,86 М сахарозу; 2, 3 – среда содержит 0,86 М сахарозу+150 мМ NaCl



лодовой чувствительности при всех использованных концентрациях NaCl в среде инкубации, при этом характер зависимости процесса от количества электролита остается неизменным (рис. 1, б; кривая 1) при сравнении с интактными эритроцитами (рис. 1, а; кривая 1). Присутствие в среде инкубации ингибитора анионного транспорта ДИДС приводит к росту уровня холодового шока практически при всех используемых концентрациях NaCl, при этом характер зависимости процесса от концентрации NaCl остается неизменным (рис. 1, б; кривая 2). В то время как для интактных эритроцитов зависимость холодовой чувствительности от содержания NaCl в среде инкубации в присутствии ДИДС приобретала иной характер (рис. 1, а). Это указывает на то, что влияние ингибитора анионного транспорта ДИДС на холодовую чувствительность интактных эритроцитов при концентрации соли в среде инкубации не более 200 мМ связано с блокированием дегидратации клеток.

Вероятно, что поглощение дегидратированными эритроцитами анионов хлора в условиях осмотического сжатия клеток (рис. 2, б), должно противодействовать процессу дополнительного обезвоживания, в то время как блокирование транспорта хлора в данных условиях должно устранять указанное противодействие. Возрастание холодовой чувствительности дегидратированных эритроцитов в присутствии ДИДС (рис. 1, б) может говорить о существовании компоненты дегидратации–регидратации клеток, связанной с направлением движения анионов хлора через мембрану. Снижение холодовой чувствительности эритроцитов при повышении в среде инкубации концентрации NaCl до 100 мМ (рис. 1, а) вероятно происходит вследствие уменьшения при этом потери ионов хлора и калия [2,3]. В данных условиях при осмотическом выходе воды из клетки концентрация электролитов в цитоплазме возрастет и концентрация хлора должна составить около 300 мМ [1]. При концентрации хлора в среде инкубации, соответствующей указанному значению компонента однонаправленного потока хлора из клетки устраняется и остается только компонента самообмена данного аниона. В данном случае действие ДИДС на холодовую чувствительность эритроцитов может определяться его способностью блокировать самообмен анионов хлора через мембрану. Однако в условиях возможного равенства концентраций анионов хлора по обе стороны мембраны действие ДИДС на холодовую чувствительность эритроцитов не выявляется (рис. 1, а). Вероятно, что холодовая чувствительность эритроцитов определяется также механизмами, которые

запускаются разностью в ионной силе растворов между внеклеточной и внутриклеточной средой. При этом действие ингибитора анионного транспорта ДИДС может быть связано не только с блокированием однонаправленных потоков хлора через мембрану, но и с его непосредственным влиянием в мембране на взаимодействие белка полосы 3 с цитоскелетом [5].

Таким образом, холодочувствительность эритроцитов в среде, содержащей 0.86 М сахарозу и 0-400 мМ NaCl может определяться компонентой дегидратации-регидратации, связанной с направлением движения анионов хлора через мембрану. В условиях, когда однонаправленные потоки хлора блокированы, холодочувствительность эритроцитов может определяться величиной разности в ионной силе раствора между внеклеточной и внутриклеточной средой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Харьков, 1988. — 30 с.
2. Bernhardt I., Borning M., Glaser R. Investigation on the control of ion transport in human erythrocytes. 1. Passive Rb efflux and possibilities of its influence // *Acta Biol. Med. Germ.* — 1982. — 41, N. 3. — P. 531-539.
3. Glaser R., Svetina S., Brumen., Lerche D. et al. Stationary ionic states of human red blood cells—consequences for planning and evaluation of experiments // *Stud. Biophys.* — 1980. — 81, N. 1. — P. 43-47.
4. Jackson P., Morgan D.B. The relation between the membrane cholesterol content and anion exchange in the erythrocytes of patients with cholestasis // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1982. — 693, N. 1. — P. 99-104.
5. Jennings M.L. Structure and function of the red blood cell anion transport protein // *Annual Rev. Biochem. Biophys. Chem.* — 1989. — 18, N. 2. — P. 397-420.
6. Jung C.Y., Green F.A. Hypertonic cryohemolysis: Ionophore and pH effects // *J. Membrane Biol.* — 1978. — 39, N. 2-3. — P. 273-284.
7. Macey R.I. Transport of water and urea in red blood cell // *Am. J. Physiol.* — 1984. — 246, N. 1. — P. 195-203.

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

Поступила 15.06.93

В.В.РАМАЗАНОВ, В.А.БОНДАРЕНКО

РОЛЬ СПРЯМОВАНОСТІ ГРАДІЄНТА ПО ХЛОРУ В МЕХАНІЗМІ РОЗВИТКУ ХОЛОДОВОГО ШОКУ ЕРИТРОЦИТІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Вивчали вплив спрямованості градієнта по хлору в інтактних і дегідратованих еритроцитах на холодочувствительність клітин у гіпертонічному розчині сахарози. Показано, що спрямованість дії інгібітора анионного транспорту ДИДС на холодочувствительність еритроцитів залежить від концентрації NaCl в середовищі інкубації. Якщо клітини були попередньо дегідратовані, то дія ДИДС незалежно від концентрації солі набирала односпрямованого характеру.

V.V.RAMAZANOV, V.A.BONDARENKO

THE ROLE OF CHLORIDE GRADIENT DIRECTION IN THE MECHANISM OF COLD SHOCK IN ERYTHROCYTES

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

The influence of the direction of chloride gradient on the cold sensitivity of intact and dehydrated erythrocytes was studied in hypertonic sucrose solutions. It has been demonstrated that the direction of the effect of anionic transport inhibitor DIDS on the cold shock in erythrocytes depends on the NaCl concentration in the incubation medium. In preliminary dehydrated cells, the DIDS effect was unidirectional independently of the salt concentration.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 57.043

**А.Д.Украинцев, В.В.Туркин, Л.А.Тихомирова, О.В.Саламаха,
М.П.Федорова**

ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ -70°C . ИЗМЕНЕНИЯ В УЛЬТРАСТРУКТУРЕ КЛЕТОК ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Разработан способ хранения клеточной культуры ВНК-21 при температуре -70°C . Определен предельно допустимый срок хранения клеток. Методом электронной микроскопии исследовано ультратонкое строение клеток после криоконсервирования. Показано, что метод электронной микроскопии обладает высокой информативностью для оценки качества клеточной культуры и прогнозирования процесса культивирования клеток.

Одной из самых важных проблем при создании производств различных биопродуктов на основе клеточных культур является проблема сохранения эталонных, производственных и посевных культур. Основным методом длительного поддержания культур клеток в жизнеспособном состоянии является хранение концентрированных суспензий клеток при низких температурах. Наиболее распространен способ хранения клеток в жидком азоте при температуре -196°C [1]. Следует отметить, что данный способ требует специального оборудования как для проведения процесса замораживания по специальной программе, так и для самого хранения в жидком азоте. В настоящее время разрабатывается самое разнообразное оборудование для замораживания и хранения биоматериала с широким диапазоном минусовых температур (-40 , -70 , -130 , -150°C). Применение этих холодильников могло бы значительно упростить процесс хранения клеточных культур, особенно для небольших лабораторий и производств. Следует отметить, что максимально возможная продолжительность хранения зависит от вида клеточной культуры, состава питательной среды, процесса подготовки клеток к замораживанию, концентрации клеток и многих других факторов.

Целью нашего исследования явилась разработка способа хранения культуры клеток ВНК-21 при температуре -70°C и изучение ультраструктуры клеток после криоконсервирования.

В работе была использована клеточная культура ВНК-21 (клон 13). Клетки выращивались до и после криоконсервирования в суспензии в колбах объемом 250 мл (заполнение 70–80 мл) на термостатированной качалке G-24 (фирмы "New Brunswick", США) при скорости вращения ротора качалки (170 ± 5) об/мин и температуре $(36 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$.

Пересевы производили отъемно-доливным способом через 3 сут, посевная концентрация клеток составляла $(0,4 \pm 0,1) \cdot 10^6$ кл/мл, конечная концентрация клеток составляла $(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^6$ кл/мл, доля жизнеспособных клеток составляла $(97 \pm 1)\%$.

Концентрацию клеток определяли прямым подсчетом в камере Горяева, жизнеспособность оценивали по окрашиванию красителем трипановым синим (фирмы "Serva", ФРГ).

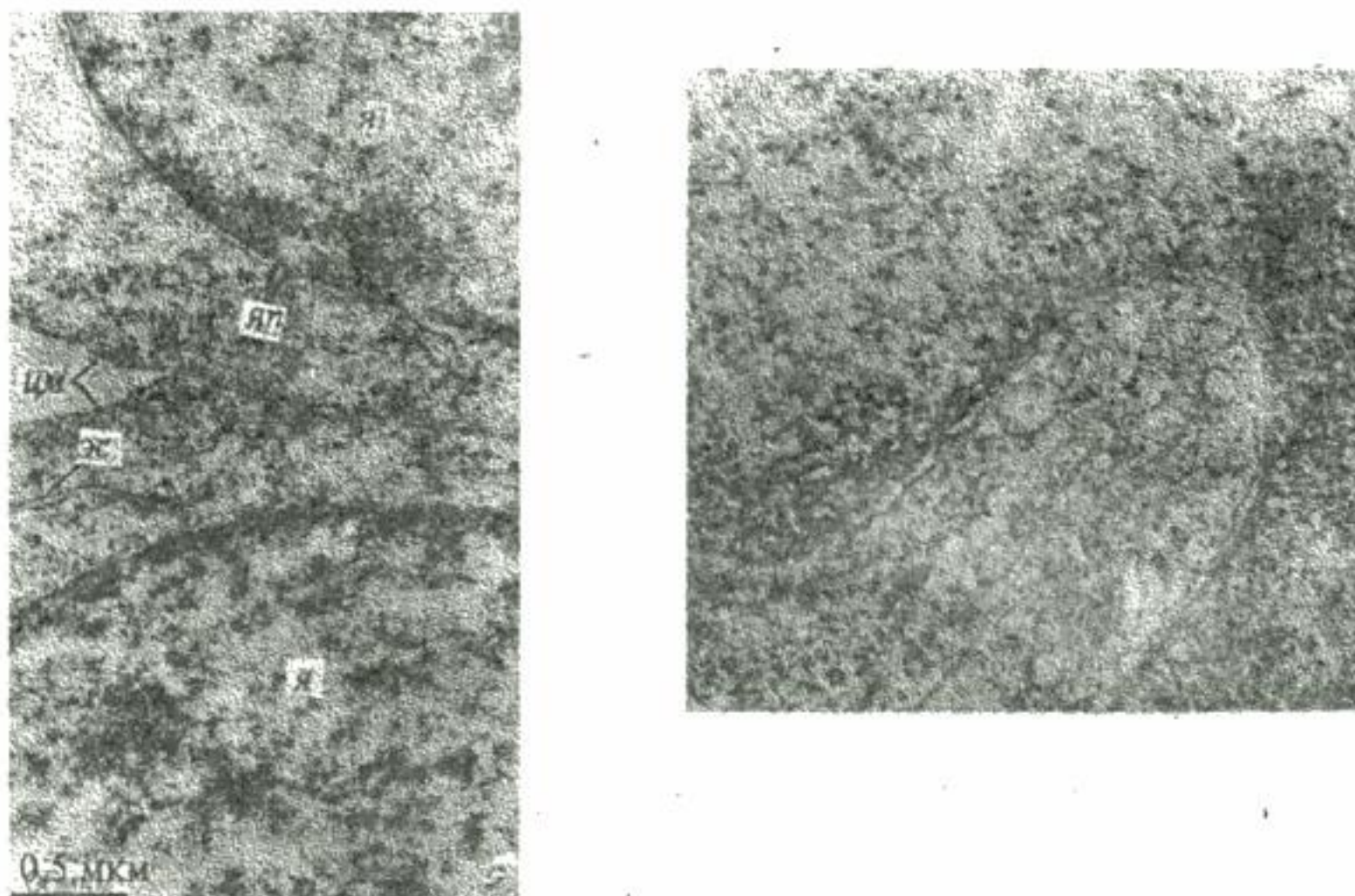


Рис. 1. Ультратонкое строение клеток ВНК-21 после криоконсервирования. Вариант 1. Условные обозначения: *в* – вакуоли, *м* – митохондрии, *мт* – микротрубочки, *р* – рибосомы, *цм* – цитоплазматическая мембрана, *эс* – эндоплазматическая сеть, *я* – ядро, *яп* – ядерные поры

В работе использовалась модифицированная питательная среда Игла. В качестве криопротектора использовался диметилсульфоксид (ДМСО) фирмы "Merck", ФРГ. Содержание ДМСО в среде для криоконсервирования составляло 10%. Материал для электронно-микроскопического исследования фиксировали 50%-м глутаровым альдегидом на какодилатном буфере с последующей дефиксацией 1% OsO_4 на том же буфере, обезвоживали в ряду спиртов возрастающей концентрации и заключали в эпоксидные смолы (аралдит). Ультратонкие срезы готовили на ультратоме фирмы LKB (Швеция), контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу [2] и просматривали в микроскопе JEM-100 В при напряжении 100 кВ. Нами был разработан следующий способ криоконсервирования клеток. Трехсуточную клеточную культуру осаждали на роторной центрифуге We-2 (ЧССР), заменяли ростовую питательную среду средой для криоконсервирования. Замораживали культуру в стеклянных флаконах вместимостью 50 мл и в стеклянных матрацах вместимостью 250 мл. Объем заполнения флакона составлял 5 мл, матраца – 80 мл. Концентрация клеток составляла $(7 \pm 2) \cdot 10^6$ кл/мл. Клетки выдерживали 20 мин при комнатной температуре, 20 мин – при температуре 4 °С, затем клетки помещались в низкотемпературный холодильник фирмы "Revco" (США) при температуре –70 °С. Размораживание клеток проводили на водяной бане при температуре 37 °С. В первую очередь представлял интерес вопрос о предельно допустимых сроках хранения клеток при температуре –70 °С. Оказалось, что предельно допустимый срок хранения клеточной культуры ВНК-21 при температуре –70 °С составляет 8–9 мес. Если срок хранения клеток при температуре –70 °С не превышал предельно допустимого, то после размораживания доля жизнеспособных клеток составляла не менее 95%, а ростовые свойства при культивировании в суспензии не изменялись по сравнению с таковыми до замораживания. В случае, если срок хранения клеток при температуре –70 °С превышал предельно допустимый более, чем на 2 мес, то



Рис. 2. Ультратонкое строение клеток ВНК-21 после криоконсервирования. Вариант 3. Условные обозначения те же, что и на рис. 1

после размораживания клеток доля жизнеспособных клеток составляла менее 80%, клетки теряли способность к росту.

Если же срок хранения клеточной культуры при температуре -70°C не превышал предельно допустимый срок на 1–2 мес, то после размораживания доля жизнеспособных клеток составляла не менее 90%, однако в части опытов клетки теряли способность к росту, как можно предположить, из-за нарушения клеточной ультраструктуры вследствие криоконсервирования. С целью проверки этого предположения было проведено электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры клеток. К настоящему времени исследована ультраструктура различных клеток после криоконсервирования [3, 4, 5]. Показано, что наиболее чувствительными к действию повреждающих факторов при замораживании являются митохондрии, цитоплазматическая мембрана, ядерная мембрана, эндоплазматическая сеть, ядрышко. К сожалению, данные по этому вопросу немногочисленны и носят фрагментарный характер. Сведения по ультратонкому строению клеток ВНК-21 при криоконсервировании в литературе отсутствуют. В нашей работе было изучено ультратонкое строение клеток ВНК-21, хранившихся при температуре

-70 °C в течение 8–9 мес, прошедших после размораживания 4-го пассажа (вариант N 1), 12 пассажей (вариант N 2), а также клеток, хранившихся при температуре -70 °C и взятых непосредственно после размораживания (вариант N3) – эти клетки потеряли способность к росту. Оказалось, что ультратонкое строение клеток ВНК-21 в вариантах 1 и 2 по основным параметрам сходно (рис. 1). Клетки ограничены цитоплазматической мембраной толщиной 70–80 А, которая образует небольшое число выростов. Ядро (округлой, овальной формы) окружено ядерной оболочкой, состоящей из двух мембран (внутренней и внешней), разделенных перинуклеарным пространством.

На внешней мембране располагаются рибосомы. Внешняя и внутренняя мембраны соединяются, образуя ядерные поры. Нуклеоплазма заполнена ДНК-содержащим материалом и ядрышком, состоящим из фиброгранулярного материала. Цитоплазма содержит органеллы и включения. Основными органеллами клеток ВНК-21 являются митохондрии, эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи, имеющие типичное строение. Наличие большого количества рибосом в цитоплазме, интенсивное развитие ядрышка и гранулярного эндоплазматического ретикулума свидетельствует о высоком развитии белок-синтезирующей системы клеток и их стабильной жизнеспособности. Это подтверждается тем, что клетки способны к делению. Наряду с основными органеллами в клетках ВНК-21 наблюдается наличие микротрубочек и вакуолярных образований (рис. 1,б), число последних невелико. Ультратонкое строение клеток (вариант N 3) отличается от такового для вариантов 1 и 2 (рис. 2). Изменения в строении клеток относятся к ядерному аппарату и основным органеллам клетки. Следует заметить, что эти изменения у различных клеток выражены не в одинаковой степени (большая и меньшая степени деструкции). Изменения в ультраструктуре клеток ВНК-21 сводятся к распаду ядрышка, сильному расширению перинуклеарного пространства, к просветлению цитоплазмы, матрикса митохондрии, сильным расширением каналов эндоплазматического ретикулума и появлению в цитоплазме большого числа вакуолей (рис. 2, а-в).

Данные изменения ультраструктуры сходны с таковыми, обнаруженными в различных типах клеток другими авторами [3–5]. Однако, у большей части клеток ВНК-21 они носят необратимый характер, клетки с незначительной степенью деструкции, вероятно, способны к делению, но вследствие их незначительного количества клеточная популяция в целом теряет способность к росту.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jacob G., Kurzer M.N., Fuller B.J. An assessment of tumor cell viability after *in vitro* freezing // Cryobiology. – 1985. – 22. – P. 417–426.
2. Reynolds E.S. The use of lead citrate of high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. – 1963. – 17, N. 1. – P. 208–212.
3. Trump B.F., Goldblatt W.A., Griffin C.C. et al. Effects of freezing and thawing on the ultrastructure of mouse hepatic parenchymal cells // Lab. Invest. – 1964. – 13. – P. 697–1002.
4. Trump B.F., Young D.C., Arnold E.A., Stowell R.E. Effects of freezing and thawing on structure, chemical constitution and function of cytoplasmic structure // Fed. Proc. – 1965. – 24. – P. 144–168.
5. Shilon H., Jancu M., Sheinfeld M., Kraiem Z. The influence of cryopreservation on the ultrastructural morphology of human thyroid cells // Cryobiology. – 1987. – 24. – P. 303–310.

Всесоюзный научно-исслед. и проектно-конструкторский
ин-т прикладной биохимии, г. Москва

Поступила 20.10.91

А.Д.УКРАЇНЦЕВ, В.В.ТУРКІН, Л.А.ТИХОМИРОВА, О.В.САЛАМАХА, М.П.ФЕДОРОВА
ЗБЕРІГАННЯ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ССАВЦІВ ПРИ ТЕМПЕРАТУРІ -70°C . ЗМІНИ В УЛЬТРАСТРУКТУРІ КЛІТИН ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Всесоюзний науково-дослідний і проектно-конструкторський інститут прикладної біохімії, м. Москва

Розроблено спосіб зберігання клітинної культури ВНК-21 при температурі -70°C . Визначено гранично допустимий строк зберігання клітин. Методом електронної мікроскопії досліджено будову клітин після кріоконсервування. Показано, що метод електронної мікроскопії має високу інформативність для оцінки якості клітинної культури і прогнозування процесу культивування клітин.

A.D.UKRAINTSEV, V.V.TURKIN, L.A.TIKHOMIROVA, O.V.SALAMAKHA, M.P.FEDOROVA
**PRESERVATION OF THE MAMMALIAN CELL CULTURE AT -70°C . UL-
TRASTRUCTURAL CHANGES IN CELLS SUBJECTED TO CRYOPRESERVA-
TION**

**All-Union Research and Project-Design Institute for Applied Biochemistry,
Moscow**

A method has been developed for preservation of the cell culture ВНК-21 at -70°C . The limit of storage period has been determined. The ultrathin structure of cells has been examined by the method of electron microscopy. The method has been demonstrated to be highly informative for the estimation of quality of cell culture and prognosis of cell cultivation.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 616.33/34-053.3-073.65:616-079.4

**Ю.В.Белоусов, В.М.Савво, Л.Г.Волошина,
И.Г.Солодовниченко**

**ТЕПЛОВИДЕНИЕ КАК МЕТОД КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ПРИМЕНЕНИЯ РЕКТАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ У ДЕТЕЙ
С ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ**

Для оценки эффективности применения метода ректальной гипотермии (РГ) в комплексном лечении язвенной болезни использовали тепловизионный метод исследования. Установлено, что характер тепловизионных признаков зависит от периода заболевания, выраженности воспалительного процесса слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, что позволяет использовать их в качестве одного из критериев эффективности лечения, в частности применения РГ у детей.

Известно, что в развитии язвенной болезни имеют место кортико-висцеральные, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковые и местные гастроуденальные нарушения. Наряду с повышением агрессивности кислотно-пептического фактора отмечается нарушение в антиоксидантной системе на общем и местном уровне [4]. Воспалительный процесс в желудке и кишечнике, как правило, сопровождается нарушением гемодинамики и тканевой гипоксией. В настоящее время возникновение и прогрессирование язвенной болезни [5] связывается с воспалительным процессом в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки, вызванным пилорическим хеликобактером. Современные методы лечения

язвенной болезни у детей не позволяют воздействовать на все звенья патогенетической цепи заболевания. Это послужило поводом для разработки [3] метода ректальной гипотермии (РГ) и применения его в комплексном лечении язвенной болезни. Мы основывались на имеющихся клинко-экспериментальных исследованиях последних лет, свидетельствующих о том, что воздействие низкой температуры на афферентные терморецепторы прямой кишки корригирует обмен катехоламинов, нормализует их, повышает активность центров переднего гипоталамуса и сопровождается нормализацией функции гипофизарно-надпочечниковой системы, способствует повышению резистентности и сопротивляемости организма, оказывает общее тонизирующее действие на больного. Существенная роль придается рефлекторному действию холода на различные уровни вегетативной нервной системы и органы параллельной иннервации. Кроме того, непосредственное холодовое и механическое раздражение нервных окончаний прямой кишки, имеющих тесные анатомические связи с солнечным сплетением, приводит к развитию рефлекторной ваготомии.

РГ проводилась с помощью гипотерма "Холод-2Ф" в положении ребенка на боку, с согнутыми в коленях ногами. В прямую кишку, на глубину 7–8 см, вводился стерильный охладитель-наконечник с циркулирующей внутри жидкостью (8 ± 1) °С. Курс лечения состоял из 10–12 сеансов РГ, проводимых ежедневно в течение 30 мин на фоне общепринятой терапии с применением перорально метронидазола в возрастных дозировках.

Для оценки эффективности проведенного лечения, помимо клинических данных, результатов эндоскопии и морфологического исследования слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, интрагастральной рН-метрии, электрогастрографии, использовался метод дистанционной термометрии.

Тепловизионный метод исследования, основанный на определении инфракрасного излучения тела человека, относится к электрофизиологическим методам, совершенно безвреден для организма, не требует введения контрастных или других фармпрепаратов, не обременителен для ребенка, совершенно безболезнен. В основе его лежит регистрация температуры в симметричных зонах и выявление очагов термоасимметрии. В норме температура тела человека распределяется симметрично относительно срединной линии (чаще позвоночный столб) и разница температур (Δt) в симметричных областях, превышающая 0,5, считается патологической. Любой процесс, протекающий с локальным изменением температуры в шок-органе (в сторону гипо- или гипертермии) может быть диагностирован с помощью дистанционной термометрии [1, 2]. Многочисленные публикации свидетельствуют о высокой эффективности метода в диагностике онкозаболеваний различной локализации, острой хирургической патологии, нарушений периферической иннервации и кровообращения, хронических воспалительных заболеваний. Неинвазивность метода позволяет использовать его для наблюдения за динамикой патологического процесса, эффективностью лечения. Дистанционное термометрическое исследование (аппаратом "Рубин-2") было проведено 27 детям в возрасте 9–15 лет, получавших в комплексе лечения по поводу обострения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки РГ. У 12 (44,4%) из них эндоскопически была выявлена свежая язва луковицы двенадцатиперстной кишки на фоне поверхностного дуоденита

и гипертрофического гастрита, у 9 (33,3%) детей наличие язвенного дефекта сочеталось с поверхностным поражением слизистой луковицы двенадцатиперстной кишки и желудка, у 1 (3,7%) ребенка с дуоденальной язвой изменения слизистой желудка носили смешанный характер. В 5-ти случаях (18,5%) наличие бульбарной язвы сочеталось с множественными эрозиями антрального отдела желудка и двенадцатиперстной кишки. Проведенная термометрия позволила выявить у 24 детей (88,9%) очаги гипертермии в эпигастральной и пилорoduodenальной зонах. У 3-х детей (11,1%) термоасимметрия кожных покровов живота не регистрировалась (эндоскопически поражения слизистой носили поверхностный, а в одном случае смешанный характер). Очаги гипертермии у всех детей были неправильной формы, однородной структуры, у 16 (59,3%) больных – больших размеров, у 8 (29,6%) – средних, Δt колебалась от 0,8 до 2 °С, составив в среднем 1,7 °С.

Повторное термометрическое исследование передней поверхности туловища проводилось после окончания курса РГ, то есть через 10–14 дней после первичной термографии. У всех детей на фоне улучшения общего состояния, ликвидации или уменьшения болевого синдрома значительно уменьшились в размерах очаги гипертермии, причем у 21 (87,5%) из 24 детей структура их стала неоднородной, а Δt колебалась от 0,5 до 1,5 °С, составив в среднем 1,2 °С. При контрольной эндоскопии отмечена эпителизация язвенного дефекта и эрозий, значительное уменьшение отека и гиперемии слизистой. У трех детей очаги гипертермии в эпигастрии практически не изменились в размерах и интенсивности свечения, сохранялся умеренный болевой синдром, заживление язвы находилось на II стадии процесса, хотя общее состояние, сон и аппетит улучшились, уменьшились признаки интоксикации.

Таким образом, характер тепловизионных признаков зависит от периода заболевания, выраженности воспалительного процесса слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, что позволяет использовать их в качестве одного из критериев эффективности лечения, в частности применения РГ у детей. Считаем целесообразным более детальное изучение отдаленных результатов влияния ректальной гипотермии на организм детей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрейчин М.А., Гнатович И.Г., Вадзюк С.Н. Характеристика термограмм кожи передней поверхности туловища у детей с разным тонусом симпатической и парасимпатической нервной системы // Физиол. журн. – 1989. – 35, N 2. – С. 57–61.
2. Белоусов Ю.В., Волошина Л.Г. Тепловизионный метод в дифференциальной диагностике хронического холецистохолангита и дискинезии желчевыводящих путей у детей // Педиатрия. – 1986. – N 5. – С. 33–34.
3. Белоусов Ю.В., Савво В.М., Васильевский В.Ю., Солодовниченко И.Г., Мхитарьянц А.М. Влияние регионарного охлаждения на исход хронического гастродуоденита и язвенной болезни у детей // Патофизиологические аспекты действия холода на организм: Сб. науч. тр. – Харьков, 1989. – С. 18–22.
4. Перелегина И.А., Антипина Ж.В., Жукова Е.А., Беленцова Е.А. Состояние антиоксидантной защиты организма при хроническом гастродуодените и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у детей // Педиатрия. – 1990. – N 9. – С. 111.
5. Мазурин А.В., Ильина А.Я., Сафонов А.Б., Шакаров М. Актуальные вопросы лечения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у детей // Педиатрия. – 1991. – N 1. – С. 32–35.

19-я детская клин. больница, г. Харьков;
ХИУВ

Поступила 09.02.93

Ю.В.БІЛОУСОВ, В.М.САВВО, Л.Г.ВОЛОШИНА, І.Г.СОЛОДОВНИЧЕНКО
ТЕПЛОБАЧЕННЯ ЯК МЕТОД КОНТРОЛЮ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИКОРИС-
ТАННЯ РЕКТАЛЬНОЇ ГІПОТЕРМІЇ У ДІТЕЙ З ВИРАЗКОВОЮ ХВОРО-
БОЮ

19 Дитяча клінічна лікарня, м. Харків; Харківський інститут удоскона-
лення лікарів

Ефективність ректальної гіпотермії (РГ) у комплексному лікуванні виразкової хвороби оцінювали методом теплобачання. Встановлено, що характер тепловізійних ознак залежить від періоду захворювання, запалювального процесу слизистої оболонки шлунку та дванадцятипалої кишки, що дозволяє використовувати їх як один з критеріїв ефективності лікування, наприклад у разі застосування РГ у дітей.

YU.V.BELOUSOV, V.M.SAVVO, L.G.VOLOSHINA, I.G.SOLODOVNICHENKO
THERMOVISION AS A CONTROL METHOD FOR THE EFFICIENCY OF
RECTAL HYPOTHERMIA IN INFANTS WITH ULCEROUS DISEASE

Pediatric Clinical Hospital N 19; Institute for Doctors' Advancement of
Kharkov

To estimate the efficiency of rectal hypothermia (RH) in the complex treatment of ulcerous disease, the thermovision was used. It has been found that the type of thermovisual parameters depends on the period of the disease, the extent of inflammatory process in the gastroduodenal mucosa that allows it to be used as a criterion of the efficiency of treatment, especially in cases of RH in infants.

ХРОНИКА

III Рабочее совещание по криоэлектронной микроскопии

С 30 августа по 3 сентября 1993 г. в г. Эндховене (Голландия) проходило III Рабочее совещание по криоэлектронной микроскопии, организованное фирмой "Филипс" и Голландским обществом электронной микроскопии.

На совещании обсуждались методики препарирования биологических объектов, методы их быстрого замораживания, замораживания-замещения, криоультратомии, иммунно-электронной микроскопии с маркированием золотом. Большое внимание уделялось вопросам криопрепарирования и исследования замороженных и гидратированных образцов, контроля витрификации систем для электронной микроскопии, интерпретации изображений, автоматической электронной томографии. Обсуждались проблемы замораживания и сохранения структуры биологических образцов рентгеновского анализа.

А. С. Капрельяниц

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины в декабре 1993 г. А.Ю. Петренко защищена диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук на тему: “Энергетическое состояние и метаболизм ксенобиотиков в изолированных гепатоцитах в зависимости от условий выделения и криоконсервирования клеток”.

Было установлено, что гепатоциты, выделенные разработанным неферментативным методом, включающим перфузию печени раствором, содержащим комплексоны ионов Ca^{2+} , ее дезагрегацию с использованием вибрации и отделение интактных клеток от поврежденных, характеризуются высоким эндогенным дыханием, обладают способностью накапливать АТФ и синтезировать глюкозу, метаболизировать ксенобиотики, образовывать монослой при культивировании, потенциал-зависимо поглощать липофильный катион тетрафенилфосфоний. Применение вибрации позволяет получать либо митохондрии, с высокими показателями эффективности окислительного фосфорилирования, либо суспензию одиночных клеток, которая при низкотемпературном центрифугировании в изотонической сахарозной среде разделяется на две фракции, одна из которых содержит гепатоциты с интактной плазматической мембраной, а другая – с поврежденной. Клетки с поврежденной плазматической мембраной сохраняют способность к биотрансформации ксенобиотиков и функциональную активность митохондрий в среде внутриклеточного типа.

Сравнительный анализ гепатоцитов, выделенных неферментативным и ферментативным методами, не выявил существенных различий в барьерных свойствах цитоплазматической и митохондриальной мембран, способности клеток к культивированию, а также биотрансформации ксенобиотиков. Выявлено, что замораживание–отогрев гепатоцитов в среде без криопротекторов приводит к необратимым повреждениям плазматической мембраны, угнетению функций внутриклеточных митохондрий и эндоплазматического ретикулума, увеличению активности гликолиза. Основной причиной снижения монооксигеназной и дыхательной активностей является потеря цитоплазматических и митохондриальных субстратов и кофакторов. Замороженно-отогретые гепатоциты могут быть использованы в качестве модели для изучения взаимодействия цитоплазматических и митохондриальных ферментных систем. Разработанный метод криоконсервирования гепатоцитов позволяет в значительной степени сохранить жизнеспособность, уровень АТФ и дыхательную активность клеток.

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

1 1994

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. — "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском языках. Объем 5,6 печ. л., периодичность четыре номера в год. 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.

Our Journal PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY is published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences in Russian and in English. 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.

Subscription orders should be addressed to
Editor-in-Chief V.I. Grishchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the Ukrainian Academy of Sciences
23 Pereyaslavskaya Str., 310015 Kharkov, The Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84

ИНДЕКС 70474

ISSN 0233-7673. ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ 1994. №1. 1-56