

2

ISSN 6233-7673

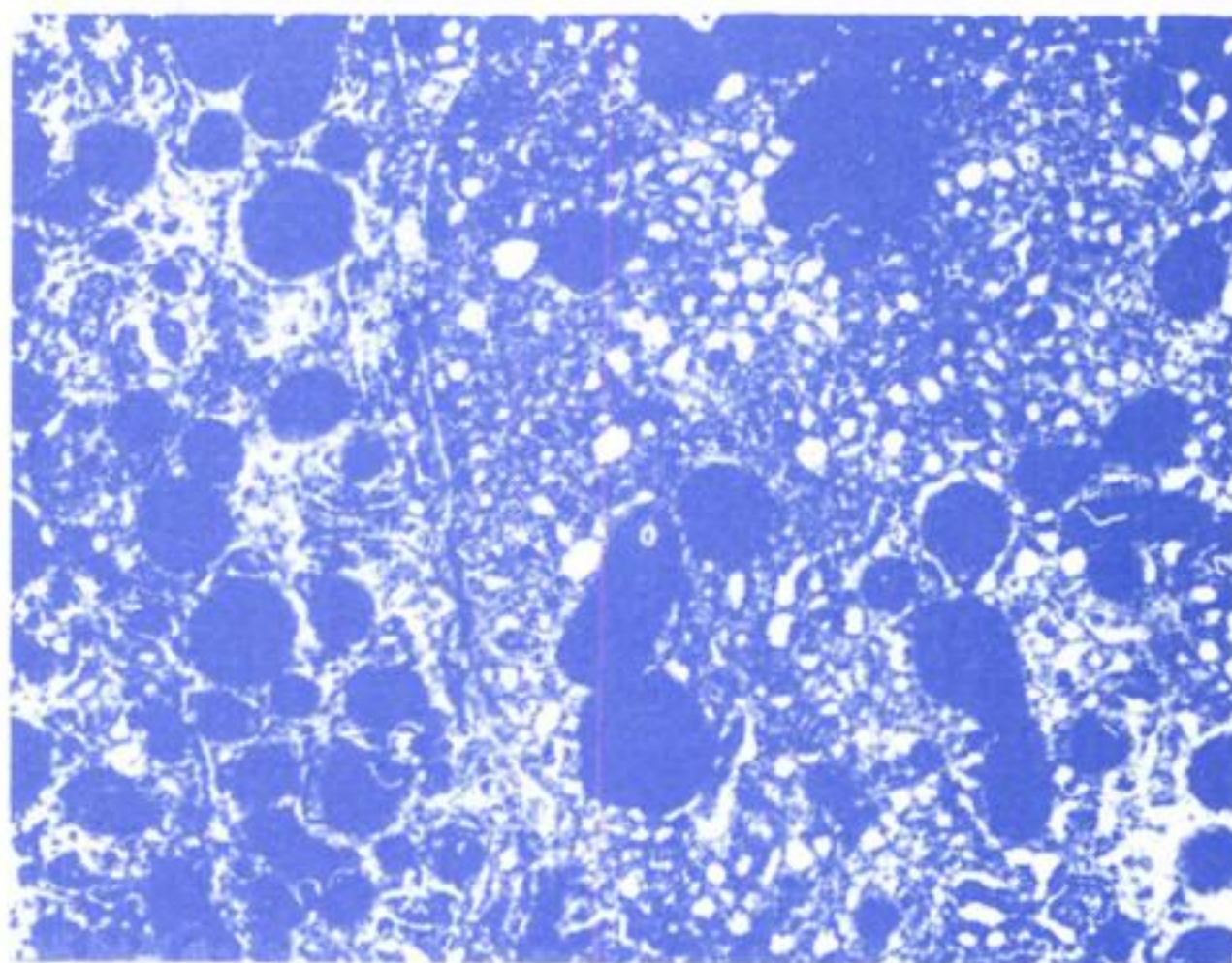
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1993

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПОИСКА НОВЫХ ЭНДОЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ
КРИОПРОТЕКТОРОВ Ю.И.Пичугин

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ОСМОЛЯР-
НОСТИ СРЕДЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ К ГИПЕР-
ТОНИЧЕСКОМУ СТРЕССУ Т.П.Бондаренко

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ МЕМБРАН В ТВЕРДОЙ
МАТРИЦЕ А.В.Зинченко, В.Д.Зинченко, В.А.Моисеев

ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ГЕПАТОЦИТОВ СВИНЕЙ НА ЭТАПАХ
ИХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ Г.Е.Загоруйко, Б.П.Сандомирский,
В.Ф.Тарасов

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 (ЧСФР), Е.Я.Панков (Харьков), Ю.Ф.Пастухов (Санкт-Петербург), Ф.А.Приходько (ответственный секретарь, Харьков), Н.С.Пушкар (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 (CSFR), 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.Snurnikov (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

2

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

1993

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

<i>Пичугин Ю.И.</i> Итоги и перспективы поиска новых эндоцеллюлярных криопротекторов	3
<i>Бондаренко Т.П.</i> Комбинированное действие температуры и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к гипертоническому стрессу	11
<i>Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Моисеев В.А.</i> Моделирование повреждения мембран в твердой матрице	17
<i>Загоруйко Г.Е., Сандомирский Б.П., Тарасов В.Ф.</i> Особенности ультраструктуры гепатоцитов свиней на этапах их криоконсервирования	23
<i>Петренко А.Ю., Росляков А.Д.</i> Окисление экзогенного NADH свежесыведенными и замороженно-отогретыми гепатоцитами	34
<i>Мануильский В.Д., Бондаренко А.М., Зубарь А.Н.</i> Каллусообразующая способность незрелых эмбрионов пшеницы при хранении их в условиях низких температур	39
<i>Погорелова Г.В., Жегунов Г.Ф.</i> Особенности кинетики функционирования лактатдегидрогеназы на разных этапах зимней спячки у сусликов <i>Gitellus undulatus</i>	44

КРИОМЕДИЦИНА

<i>Артемова Е.П., Сирота А.Р., Мокрецов В.Ю., Алехина Л.А.</i> Иммунокоррекция экспериментального аутоиммунного тиреоидита с помощью трансплантации криоконсервированного тимуса	50
--	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Стрибуль Т.Ф., Лихолат Д.А.</i> Фитогормональный статус растений кукурузы после погружения семян в жидкий азот	55
---	----

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

This One



XWBF-RSY-W3CW

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Pichugin Yu.I.</i> Results and perspectives in searching of new endocellular cryoprotectants	3
<i>Bondarenko T.P.</i> The combined effect of medium temperature and osmolarity on the resistance of erythrocytes to hypertonic stress	11
<i>Zinchenko A.V., Zinchenko V.D., Moiseyev V.A.</i> Modeling of membrane injury in the solid matrix	17
<i>Zagoruyko G.E., Sandomirsky B.P., Tarasov V.F.</i> Ultrastructural peculiarities in pork hepatocytes at different stages of cryopreservation	23
<i>Petrenko A.Yu., Roslyakov A.D.</i> Oxidation of exogenous NADH by isolated fresh and frozen-thawed hepatocytes	34
<i>Manuilsky V.D., Bondarenko A.M., Zubar A.N.</i> The callus-forming ability of immature wheat embryos during storage at low temperatures	39
<i>Pogorelova G.V., Zhegunov G.F.</i> Peculiarities of the kinetics of function of lactate dehydrogenase in ground squirrels <i>Citellus undulatus</i> at different stages of hibernation	44

CRYOMEDICINE

<i>Artemova E.P., Sirota A.R., Mokretsov V.Yu., Alekhina L.A.</i> The immune correction of experimental autoimmune thyroiditis by transplantation of cryopreserved thymus	50
---	----

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Stribul T.F., Likholat D.A.</i> The phytohormonal status of maize plants after plunging the seeds into liquid nitrogen	55
---	----

DEFENSE OF THESES

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

Научный редактор *В.И.Луговой*

Редактор *Л.А.Рябинина*

Компьютерный набор и верстка: *И.А.Жутченко, З.В.Линевич, Л.В.Смык*

Подп. в печ. 18.06.93. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.
Тираж 500 экз. Цена 50 крб. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16,
310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПОИСКА НОВЫХ ЭНДОЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ

На основании собственных исследований и обобщения литературных данных по проблеме поиска новых эндоцеллюлярных криопротекторов все известные проникающие криозащитные вещества выделяются в тип «эндоцеллюлярных криопротекторов-гидрофилов» и делается вывод о бесперспективности поиска новых эффективных криопротекторов этого типа. Исходя из зависимости цитотоксичности и криопротекторной активности диолов от их структуры и физико-химических свойств, рассматривается предположительный механизм действия веществ при криоконсервировании клеток. Количество эффективных эндоцеллюлярных криопротекторов-гидрофилов ограничивается двадцатью производными трех химических классов соединений: полиолов (диолов, глицерина), амидов и сульфоксидов. Дальнейший прогресс криоконсервирования связывается с поиском новых типов криопротекторов или физических воздействий на клетки с целью повышения их криорезистентности.

Более сорока лет назад криобиология как наука начала активно развиваться с применения криозащитных веществ при низкотемпературном консервировании клеточных суспензий [36]. За это время в качестве криопротекторов апробировано более 200 соединений [29, 30], но все известные в настоящее время криопротекторы имеют определенные недостатки: они не защищают многие биологические объекты от повреждающего действия замораживания, оказывают на них побочное токсическое действие [21, 22, 27]. Поэтому актуальной задачей является создание научно обоснованного подхода к поиску новых, более эффективных криопротекторов, не обладающих цитотоксическим действием. Пока не существует общепризнанной теории механизма действия криозащитных веществ, что затрудняет прогнозирование и поиск новых эффективных и нецитотоксичных криопротекторов. Самой ранней, коллигативной теории Лавлока [31] многие исследователи не придерживались в целом, так, Нэш [35], Коннор [25], Шраго [22], Бутрон [23] и другие предлагали поиск зависимости криопротекторной активности веществ от их структуры и физико-химических свойств. Однако должного развития эта тема не получила [10, 14, 22].

В последнее десятилетие в отделе криопротекторов Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины широко проводились исследования зависимости криопротекторной активности гомологических рядов известных классов химических соединений, основные представители которых уже проявили высокую криозащиту, от структуры и физико-химических свойств этих соединений. До сих пор известно в основном четыре класса химических соединений, представители которых обладают высокой криопротекторной активностью – это производные полиолов (диолов, глицерина, сахара), амидов, сульфоксидов и полимерные соединения [21, 26, 30]. Все эти классы веществ изучались в отделе криопротекторов ИПКиК АН Украины, и сейчас уже можно подвести определенные итоги. Традиционно криопротекторы классифицируют по

проницаемости в клетки на экстра- и эндоцеллюлярные. Экстрацеллюлярные криопротекторы не получили широкого применения, хотя перспективность их использования утверждается некоторыми исследователями [2, 22]. Обычно для криоконсервирования используют эндоцеллюлярные криопротекторы, из них наиболее часто диметилсульфоксид, глицерин, 1,2-пропандиол и этиленгликоль.

Необходимые требования, предъявляемые к эндоцеллюлярным криопротекторам, можно свести к трем [16, 17, 31, 34]: высокая гидрофильность, нетоксичность для биологических объектов в значительных концентрациях, сравнительно быстрое проникновение в клетки.

Основным повреждающим фактором для большинства биологических объектов является внутриклеточная кристаллизация воды. Для предотвращения этого основного фактора криоповреждений и служат эндоцеллюлярные криопротекторы. При медленных скоростях замораживания клеток, наряду с внутриклеточной кристаллизацией воды, существенными повреждающими факторами являются: чрезмерная дегидратация клетки, достижение ею критического минимального объема и критическое повышение концентрации солей и других веществ. Для предотвращения этих повреждающих факторов также используются криопротекторы эндоцеллюлярного действия, которые проникая в клетку не дают ей при вымораживании воды достигнуть критических степеней дегидратации, клеточного объема и концентрации растворенных веществ.

Молекулы органических соединений, обладающих сильной гидрофильностью, должны содержать химические группы, образующие сильные водородные связи с водой, такие как гидроксильная, амидная, сульфоксидная, перекисная, карбоксильная и аминная [18]. Однако последние три группы токсичны для клеток из-за сильной окислительной активности, кислотности и основности. Значит, всего три химические группы приемлемы для образования основы молекул криопротекторов, которые способны проявлять сильную гидрофильность. Можно выделить еще химические группы, которые образуют более слабые связи с водой, чем вышеуказанные, и гидрофильность которых недостаточна для проявления ими криопротекторной активности. Это такие группы, как простая эфирная, сложная эфирная, альдегидная, карбонильная и сульфоновая. Может быть, в сочетании с сильными гидрофильными группами эти группы способны образовывать соединения, отвечающие требованиям к эндоцеллюлярным криопротекторам? Оказывается, что для такого сочетания приемлема лишь простая эфирная группа. Остальные группы или не дают высокой суммарной гидрофильности, или увеличивают реакционную способность получаемых соединений (а значит, и токсичность), или уменьшают скорость проникновения получаемых веществ в клетки. Этот вывод основан на анализе химической структуры веществ, которые когда-либо использовались в качестве криопротекторов, исходя из многочисленных литературных данных [17, 29–35].

Сильные гидрофильные группы (гидроксильная, амидная и сульфоксидная) в соединении с гидрофобным углеводородным скелетом могут образовывать гомологические ряды соединений; гидрофильность которых будет зависеть от баланса гидрофильных и гидрофобных частей молекул. Используя такие гомологические ряды с плавными изменениями гидрофобно-гидрофильного баланса и величин физико-химических свойств, удалось упростить сложную картину зависимости

цитотоксичности и криопротекторной активности веществ от их структуры и физико-химических свойств [14, 15]. Ранее такой подход в криобиологии не применялся, хотя он широко используется в прикладной органической химии, фармакологии, токсикологии и т.д. [7]. И ни один из исследователей, изучавших взаимосвязь структуры химических соединений и их криопротекторной активности, не пытался провести систематизацию химических групп по законам структурной органической химии с учетом ограничений, предъявляемых требованиями к эндоцеллюлярным криопротекторам, с целью очертить тот возможный круг органических соединений, которые целесообразно испытать при криоконсервировании клеток в качестве эндоцеллюлярных криопротекторов. Такой анализ проведен нами и из него следует, что тип эндоцеллюлярных криопротекторов-гидрофилов исчерпывается углеводородными производными диолов, глицерина, амидов и сульфоксидов. Все эти соединения к настоящему времени уже апробированы в качестве криопротекторов [5, 6, 10, 11, 15, 17, 25, 26, 29–31].

Остановимся на общих закономерностях зависимости цитотоксичности и криопротекторной активности веществ от физико-химических свойств соединений, ранее выделенных гомологических рядов, на примере ряда диолов, биологические свойства которых изучены нами при криоконсервировании спермы карпа и эритроцитов человека [14, 15]. По данным корреляционного анализа [14, 15], физико-химические свойства диолов в пределах 15 соединений изученного ряда разделились на две взаимно некоррелирующие группы, отражающие гидрофобные и гидрофильные взаимодействия этих веществ. Это разделение можно объяснить тем, что каждая группа физико-химических свойств отражает определенный тип межмолекулярных взаимодействий, которые неравнозначны по силе. В первую группу вошли следующие физико-химические свойства: коэффициент распределения диолов в системе октанол – вода, адсорбция диолов на границе фаз гептан – вода и диэлектрическая проницаемость; во вторую: температура плавления водных растворов диолов, теплота смешения диолов с водой и динамическая вязкость диолов. Первая группа физико-химических свойств отражает гидрофобные взаимодействия, т.е. взаимодействие гидрофобных алкильных групп диолов как между собой (ассоциация), так и с гидрофобными частями других молекул среды (октанола, гептана), которые моделируют гидрофобные части биоструктур клетки, например билипидный слой мембраны. Этот тип межмолекулярных взаимодействий определяется слабыми вандерваальсовыми силами, энергия которых составляет 1–2 кДж/моль [20]. Вторая группа физико-химических свойств диолов отражает гидрофильные взаимодействия, т.е. взаимодействия –ОН групп диолов как между собой, так и с молекулами воды. Эта группа свойств может также характеризовать гидрофильные взаимодействия диолов с гидрофильными частями биомакромолекул. Энергия гидрофильных взаимодействий составляет 22–25 кДж/моль [20]. Если, как было отмечено, эти две группы физико-химических свойств не коррелируют между собой, то внутри каждой группы физико-химические свойства диолов в достаточной степени коррелируют между собой, т.е. являются взаимозависимыми, поэтому группу можно характеризовать каким-нибудь одним физико-химическим свойством. Гидрофобные взаимодействия диолов характеризовали по коэффициенту распреде-

ления, а гидрофильные – по температуре плавления 35%-ных водных растворов диолов, которая достаточно точно характеризует эвтектическую температуру.

Рассматривая предположительный механизм действия диолов, заметим, что биомакромолекулы и биоструктуры клетки более сильно реагируют на гидрофобные взаимодействия веществ, чем на гидрофильные, так как значительный вклад в поддержание стабильности нативной структуры белков, билипидного слоя мембран, липопротеиновых комплексов и т.п. вносят слабые гидрофобные связи между неполярными частями этих структур [1, 8, 9, 13, 19, 28]. Поэтому гидрофобные взаимодействия веществ с биомакромолекулами и биоструктурами клетки могут привести к разрушению их нативной структуры. Гидрофобные взаимодействия веществ, начиная с определенной величины коэффициента распределения или диэлектрической проницаемости среды, носят негативный по отношению к клеткам характер, заключающийся в высаливании белков, их коагуляции, солубилизации липидов, разрушении липопротеиновых комплексов, что проявляется в цитотоксичности этих веществ. Вопрос о токсичности соединений, используемых в качестве криопротекторов, на клеточном уровне, т.е. цитотоксичности, мало освещен в литературе, хотя в последнее время интерес криобиологов к этой проблеме возрастает [5, 15, 27]. Проблема цитотоксичности криопротекторов приобрела большое значение в связи с попытками криоконсервирования органов и клеток витрификацией, для достижения которой требуются большие концентрации защитных веществ, а также замораживания сложноорганизованных биологических объектов, чувствительных к токсическому действию таких нейтральных веществ, какими являются криопротекторы, даже в небольших концентрациях [27]. Автор [27] подчеркивает, что необходимо более глубокое понимание токсичности, позволяющее анализировать механизмы криоповреждений и биофизику молекулярной стабильности клеток, потому что замораживание и криопротекторы могут нарушать баланс между фундаментальными факторами, связанными с поддержанием стабильности биологических структур. Если ослабить цитотоксическое влияние криопротекторов, то можно добиться новых достижений в криобиологии.

Чем ближе защитное вещество по своим физико-химическим свойствам к воде, тем оно менее нарушает стабильность биомакромолекул, следовательно, менее повреждающе действует на клетки. К тому же сильные гидрофильные взаимодействия с водой носят позитивный характер, заключающийся в связывании воды и образовании мелкокристаллической структуры льда, близкой к аморфной, тем самым предотвращая основной повреждающий фактор – внутриклеточную кристаллизацию воды [6]. Приведем пример, который прекрасно показывает насколько важное значение имеют сильные гидрофильные взаимодействия веществ с водой для проявления ими криозащитного действия. Так, соединение 2,3-бутандиол имеет d, l-формы и рацемат, эвтектическая температура которых ниже -60°C , т.е. налицо сильные гидрофильные взаимодействия с водой и, соответственно, высокий уровень криопротекторной активности [14, 15, 24]. Но это соединение может иметь также и мезо-форму, эвтектическая температура которой всего -2°C , т.е. гидроксильные группы этой формы сильнее взаимодействуют между

собой, чем с водой при ее вымораживании, поэтому мезо-форма 2,3-бутандиола не проявляет криопротекторной активности, хотя так же нетоксична для эритроцитов человека, как и d, l-форма или рацемат [33].

Какой характер носит зависимость криопротекторной активности веществ от силы их гидрофильных взаимодействий? Казалось бы, чем сильнее гидрофильные взаимодействия веществ, тем выше должна быть их криопротекторная активность. Однако это не совсем верно. Так, зависимость криопротекторной активности диолов при криоконсервировании эритроцитов человека от силы гидрофильных взаимодействий этих диолов, характеризовавшейся величиной температуры плавления их 35%-ных растворов, носит скачкообразный характер: диолы с температурой плавления их 35%-ных растворов выше -10°C не обладают криопротекторной активностью, а с температурой плавления ниже -10°C — проявляют криопротекторную активность на одинаково высоком уровне вне зависимости от дальнейшего снижения этих температур плавления [14, 15]. У криопротекторов других химических классов, а именно диметилсульфоксида и некоторых амидов, сила гидрофильного воздействия еще выше, чем у диолов [3], однако, все эти вещества обладают величиной криопротекторной активности при консервировании эритроцитов человека [32] или спермы быка [4, 29], находящимися на одинаковых уровнях, поэтому, вероятней всего, криозащитная активность веществ определяется их коллигативными свойствами, а сильные гидрофильные взаимодействия с водой являются лишь условием или основой для проявления их коллигативных свойств.

В общем, сильные гидрофильные взаимодействия веществ являются положительным фактором, а усиление гидрофобных взаимодействий — отрицательным; но по мере увеличения числа и длины алкильных групп в молекулах веществ в гомологических рядах происходит ослабление гидрофильных взаимодействий и усиление гидрофобных, т.е. влияние этих двух факторов проявляется одновременно в отрицательную сторону, а к тому же увеличивается молекулярная масса веществ, что уменьшает скорость их проникновения в клетки. Поэтому вещества наиболее слабого цитотоксического действия на клетки и сильной криопротекторной активности находятся в начале гомологических рядов. Как было выяснено ранее, тип эндоцеллюлярных криопротекторов-гидрофилов исчерпывается тремя химическими классами — это производные полиолов (диолов и глицерина), амидов и сульфоксидов, и уже можно оценить общее количество веществ, составляющих этот тип. Так, для криоконсервирования биологических объектов, которые по криорезистентности и устойчивости к токсическому действию веществ, подобных эритроцитам человека, приемлемо следующее количество соединений: из ряда диолов — девять [6, 15, 24], из ряда глицерина — три [5, 12], из ряда амидов — шесть [10] и из ряда сульфоксидов — всего два [29]. Следовательно, тип эндоцеллюлярных криопротекторов-гидрофилов исчерпывается двадцатью соединениями. Причем для использования в практике криоконсервирования достаточно шести — десяти веществ — это этиленгликоль, 1,2-пропандиол, метилцеллозольв, глицерин, диметилформамид, диметилсульфоксид, метилацетамид и метанол. Однако и эти вещества, как известно, не сохраняют на достаточно высоком уровне многие биологические объекты при их криоконсервировании, поэтому поиск новых типов криопротекторов является актуальным, а

поиск новых соединений внутри типа эндоцеллюлярных криопротекторов-гидрофилов – уже бесперспективен. Сейчас необходимы качественно новые подходы к поиску веществ, способных предохранить клетки от повреждающего действия замораживания, поэтому методически целесообразно было выделить все известные эндоцеллюлярные криопротекторы в отдельный тип «эндоцеллюлярных криопротекторов-гидрофилов», так как это название отражает их основной признак.

В публикациях по криобиологии пока нет сообщений об открытии новых типов эндоцеллюлярных криопротекторов, иного механизма действия, чем у известных проникающих криозащитных веществ. Поэтому в настоящее время следует совершенствовать режимы криоконсервирования, применять комплексные криоконсервирующие среды, основным компонентом которых останутся эндоцеллюлярные криопротекторы-гидрофилы. Можно применять дополнительные воздействия на процесс льдообразования, например, для снятия переохлаждения использовать инициаторы кристаллизации льда, а для получения более мелкокристаллической структуры льда – модификаторы фазового перехода вода – лед и т.д. [22]. Иногда полезно использовать различные типы добавок, способствующие сохранению определенных структур клетки, например для мембран – сахара или компоненты куриного желтка. Целе-направленный поиск такого рода добавок также актуален. Может быть, осуществлять поиск веществ, повышающих устойчивость биологических систем к токсическому воздействию криопротекторов-гидрофилов, которые применяются в больших концентрациях с целью достижения витрификации [27]? По-видимому, не до конца исчерпаны возможности экстра- и эндоцеллюлярных криопротекторов. Однако, по-нашему мнению, более перспективной является практическая реализация идей: экзо- и эндогенное торможение метаболизма клеток может иметь защитное действие и от повреждающих факторов, проявляющихся при криоконсервировании [11]; сорбция белков на мембранах может приводить к увеличению устойчивости и самих белков, и мембран к повреждающим действиям [1]. Первые шаги в этом направлении уже сделаны [2] на примере «холодовой адаптации» эритроцитов человека и некоторых других клеток путем их инкубации при 4–0 °С с полиэтиленоксидом-1500, что значительно повысило криорезистентность этих клеток. Итак, дальнейший прогресс криоконсервирования произойдет при условии открытия новых типов криопротекторов или физических воздействий, которые повысят криорезистентность биологических объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахсенов С.А. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. – М.: Наука, 1990. – 117 с.
2. Белоус А.М. Криоконсервация эритроцитов: роль белков цитоскелета // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем. – Харьков, 1989. – С. 3–13.
3. Белоусов В.П., Морачевский А.Г., Панов М.Ю. Тепловые свойства растворов неэлектролитов. – Л.: Химия, 1981. – 264 с.
4. Бугров А.Ф. Разработка теории и практики криоконсервации спермы быков-производителей : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1983. – 40 с.
5. Верховская Л.З., Карташов В.Ф., Кошый С.В. и др. Криозащитная активность алкоксизамещенных глицерина // Криоконсервирование клеток и тканей. – Харьков, 1989. – С. 8–15.
6. Воротилин А.М. Криоконсервирование эритроцитов человека под защитой криопротекторов на основе низкомолекулярных диолов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1987. – 32 с.

7. Голубев А.А., Люблина Е.И., Толоконцев Н.А. и др. Количественная токсикология. – Л.: Медицина, 1973. – 287 с.
8. Дузу П. Криобиохимия. – М.: Мир, 1980. – 280 с.
9. Жили М. Физическая химия денатурации белков. – М.: Мир, 1968. – 270 с.
10. Линник Т.П. Зависимость криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1987. – 19 с.
11. Мелехов Е.И. О возможном принципе регуляции повреждения и защитной реакции клетки // Журн. общ. биологии. – 1983. – 44, N 3. – С. 386–397.
12. Паращук Ю.С., Шраго М.И., Калугин Ю.В. и др. Сравнительная оценка цитотоксичности и криозащитной эффективности глицерина и его алкиловых эфиров при замораживании спермиев человека // Криобиология. – 1989. – N 1. – С. 40–43.
13. Пирузян Л.А. Действие физиологически активных веществ на биологические мембраны. – М.: Наука, 1974. – 387 с.
14. Пичугин Ю.И. Зависимость цитотоксичности и криопротекторной активности диолов от их структуры и физико-химических свойств: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1988. – 18 с.
15. Пичугин Ю.И., Новиков А.Н. Зависимость цитотоксичности и криопротекторной активности диолов от их структуры и физико-химических свойств // Криоконсервирование клеток и тканей. – Харьков, 1989. – С. 15–28.
16. Пушкарь Н.С., Наконечный А.А., Калугин Ю.В. Некоторые вопросы механизма действия криопротекторов // Актуальные вопросы консервации и трансплантации костного мозга и крови. – Харьков, 1972. – С. 98–113.
17. Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию. – Киев: Наук. думка, 1975. – 343 с.
18. Соколов Н.Д. Водородная связь. – М.: Наука, 1964. – 311 с.
19. Структура и стабильность биологических молекул // Под ред. М.В.Волькинштейна. – М.: Мир, 1973. – 584 с.
20. Шахпаронов М.И. Введение в современную теорию растворов. – М.: Высш. школа, 1975. – 296 с.
21. Шраго М.И., Гучок М.М., Калугин Ю.В. Некоторые принципы направленного синтеза криопротекторов // Актуальные проблемы криобиологии. – Киев: Наук. думка, 1981. – С. 157–188.
22. Шраго М.И., Новиков А.Н., Ханина Л.А. Криопротекторы и криоконсерванты (основные направления исследований) // Криобиология. – 1986. – N 3. – С. 8–13.
23. Boudron P., Arnoud F. Comparison of the Cryoprotection of Red Blood Cells by 1,2 Propanediol and Glycerol // Cryobiology. – 1984. – 21, N 3. – P. 349–358.
24. Boudron P. Levo- and dextro-2,3-Butanediol and Their Racemic Mixture very Efficient Solutes for Vitrification // Cryobiology. – 1990. – 27, N 1. – P. 55–69.
25. Connor K.W., Achwood-Smith M.I. Ineffectiveness of dimethyl sulfox as a cryoprotective agent // Cryobiology. – 1973. – 10, N 1. – P. 87–90.
26. Doebbler G.F. Review and discussion of structure and function // Cryobiology. 1966. – 3, N 1. – P. 2–5.
27. Fahy G.M. The Relevance of cryoprotectant «Toxicity» to Cryobiology // Cryobiology. – 1986. – 23, N 1. – P. 1–13.
28. Hateri Y., Hanstein W.G. Solubilization of particulate proteins and nonelectrolytes by chaotropic agents // Proc. Nat. Acad. Science. – 1969. – 62, N 4. – P. 1129–1136.
29. Jeyendran R.S., Graham E.F. Cryoprotective compounds for bull spermatozoa // Cryobiology. – 1977. – 14, N 6. – P. 703.
30. Karow A.M. Cryoprotectants – a new class of drugs // J. Pharm. and Pharmacol. – 1969. – 21, N 4. – P. 209–213.
31. Lovelock J.E. The mechanism of protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing // Biochem. et Biophys. Acta. – 1953. – 11, N 1. – P. 28–36.
32. Lovelock J.E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing // Biochem. J. – 1954. – 56, N 2. – P. 265–270.
33. Mehl P., Boudron P. Cryoprotective of red blood cells by 1,3-butanediol and 2,3-butanediol // Cryobiology. – 1988. – 25, N 1. – P. 44–54.
34. Maryman H.T. Cryoprotective agents // Cryobiology. – 1971. – 8, N 2. – P. 173–183.
35. Nash T. Chemical Constitution and Physical Properties of Compounds able to Protect Living Cells against Damage due to Freezing and Thawing // Cryobiology / N.T.Meryman. – London and New York: Acad. press. – P. 178–207.
36. Polge C., Smith A., Parkes L. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures // Nature. – 1949. – 164, N 4219. – P. 666.

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

Поступила 09.04.92

Ю.И.ПИЧУГИН

ПІДСУМКИ І ПЕРСПЕКТИВИ ПОШУКУ НОВИХ ЕНДОЦЕЛЮЛЯРНИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м. Харків

На підставі власних досліджень і узагальнення літературних даних по проблемі пошуку нових ендоцелюлярних кріопротекторів усі відомі проникаючі кріозахисні речовини виділяються у тип «ендоцелюлярних кріопротекторів-гідрофілів» і робиться висновок про безперспективність пошуку нових ефективних кріопротекторів цього типу. Виходячи із залежності цитотоксичності і кріопротекторної активності діолів від їх структури і фізико-хімічних властивостей, розглядається передбачуваний механізм дії речовин при кріоконсервуванні клітин. Кількість ефективних ендоцелюлярних кріопротекторів-гідрофілів обмежується двадцятьма похідними трьох хімічних класів сполук: поліолів (діолів, гліцерину), амідів і сульфоксидів. Подальший прогрес кріоконсервування пов'язується з пошуком нових типів кріопротекторів чи фізичних впливів на клітини з метою підвищення їх кріорезистентності.

Yu.I.PICHUGIN

RESULTS AND PERSPECTIVES IN SEARCHING OF NEW ENDOCELLULAR CRYOPROTECTANTS

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

Summarizing own results and literature data on the problems of searching new endocellular cryoprotectants, the known permeable cryoprotective agents have been singled out into the type of endocellular hydrophilic cryoprotectants. It has been concluded that the search of new effective cryoprotectants within this type is not promising. Basing on the dependence between the cytotoxicity and cryoprotective efficiency of diols and their structure and physico-chemical properties, a possible mechanism of action of agents during cryopreservation of cells is considered. The number of effective endocellular hydrophilic cryoprotectants is limited by twenty derivatives of the following three chemical classes: polyols (diols, glycerol), amides, and sulfoxides. Further progress in cryopreservation is associated with the search of new cryoprotectant types or physical effects on cells with the purpose of increasing their resistance to freezing.

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ОСМОЛЯРНОСТИ СРЕДЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

Изучена взаимосвязь между исходной осмолярностью среды, в которой находятся эритроциты и их устойчивостью к действию гипертонического стресса (3000 мМ NaCl) при различных температурах. Показано, что предварительная инкубация клеток при 0 °С в 950 мМ растворе NaCl и последующий перенос в 3000 мМ раствор NaCl при 37 °С приводят к исчезновению осмотической и температурной компонент в реакции клеток на гиперосмотический стресс. Достигнутое состояние клеток можно рассматривать как исключительно стабильное, поскольку речь идет о 180-минутной инкубации в 3000 мМ растворе NaCl. Полученные результаты обсуждаются с позиции взаимосвязи между физико-химическим состоянием цитоплазматического геля, которое контролируется температурой и осмолярностью среды, и физическим состоянием плазматической мембраны, которое контролируется температурой.

Принцип, используемый для решения целого ряда экспериментальных криобиологических задач, заключается в выявлении роли температуры как фактора, управляющего состоянием клеток при переносе их в неизотонические условия [2]. Указанный подход в качестве управляющего фактора включает также тоничность среды, т.е. фактор, способный модифицировать состояние клеток в широком диапазоне температур. Существенный интерес представляет выявление взаимосвязи между исходной температурой и осмолярностью среды, при которых находятся клетки, и их устойчивостью к действию гипертонического стресса при различных температурах. Это обусловлено тем, что гипертонический стресс является ведущим фактором криоповреждения [1, 2], что позволяет использовать перенос клеток в сильно гипертонические растворы при положительных температурах как процесс, моделирующий замораживание.

Объектом исследования служила донорская кровь человека, полученная с Харьковской областной станции переливания крови. Эритроциты отмывали от плазмы и других форменных элементов крови 3-кратным центрифугированием в 10 объемах 0,15 М раствора NaCl, приготовленного на 5 мМ фосфатном буфере, рН 7,4 (все используемые растворы готовились на этом буфере). Из полученной эритромаcсы готовилась суспензия эритроцитов с 2%-м гематокритом, на всех этапах обработки клеток контролировалась барьерная функция мембраны по выходу гемоглобина.

В первой группе экспериментов использовался подход, при котором на этапе предварительной инкубации были выбраны 2 области тоничности – 450 мМ NaCl, что соответствует области, обеспечивающей минимальную гипертоническую чувствительность [3] по сравнению с физиологической (150 мМ NaCl) и гипертонической (1000 мМ), сенсibiliзирующей клетки к холодовому шоку [3]. Вторая область – 950 мМ – соответствует правой «ветви» гипертонической чувствительности на шкале осмолярности [4], и состояние клеток в этой области можно рассматривать как температурно-осмотическую сенсibiliзацию. Последнее доказывается появлением в указанной области осмолярности чувствительности клеток к сдвигу температуры (холодовой шок), сдвигу

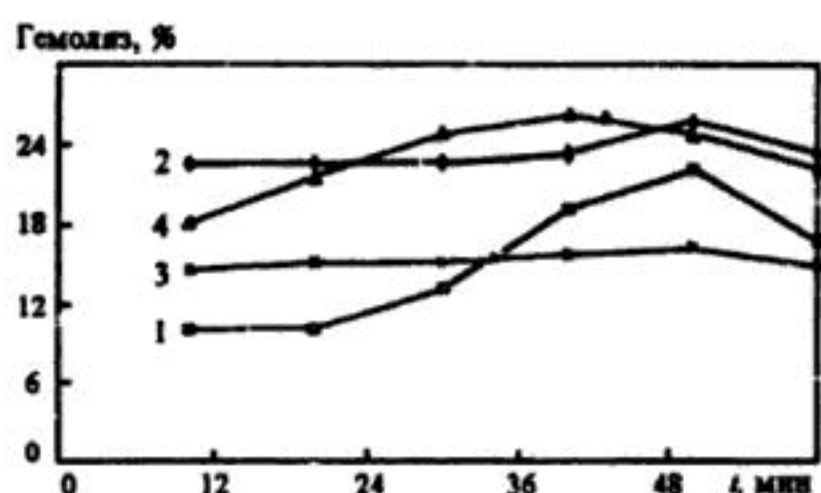


Рис. 1. Временная зависимость влияния начальных условий обработки клеток 450 мМ раствором NaCl на чувствительность эритроцитов к гипертоническому стрессу (180 мин, 3000 мМ раствор NaCl): 1 — изотермический перенос 37→37 °С; 2 — неизо-термический перенос 37→0 °С; 3 — изотермический перенос 0→0 °С; 4 — неизо-термический перенос 0 °С→37 °С

осмотическую устойчивость, а при 150 мМ можно говорить о состоянии осмотической, но не температурной чувствительности.

В наших экспериментах был использован принцип перекрестного изменения температуры, когда клетки инкубировались в исходных растворах при фиксированной температуре (например, 37 °С), затем переносились в сильно гипертонический раствор NaCl (3 М), находящийся при другой фиксированной температуре (например, 0 °С). Перекрестный вариант имел место и когда осуществлялся обратный перенос в 3 М раствор NaCl при 37 °С клеток, находившихся при 0 °С. Дополнительными вариантами служили изотермические переносы 37→37 и 0→0 °С.

На первом этапе оценивалось влияние исходной инкубации эритроцитов в 450 и 950 мМ растворах NaCl при 0 и 37 °С в течение 10–60 мин на их устойчивость к переносу в 3 М раствор NaCl. Время инкубации клеток после переноса составляло 180 мин.

Полученные данные представлены на рис. 1. На графике можно выделить две особенности. Начальная инкубация эритроцитов в присутствии 950 мМ раствора NaCl (рис. 2) проявляется в более высокой чувствительности клеток к переносу в 3 М раствор NaCl по сравнению с 450 мМ раствором NaCl (рис. 1). Вторая особенность заключается в том, что продолжительность выдерживания клеток на предварительном этапе перед переносом в сильно гипертоническую среду не влияет на их чувствительность к гипертонии, по крайней мере, в используемом нами временном интервале (10–60) мин. При этом максимальная чувствительность эритроцитов наблюдалась после инкубации в присутствии 950 мМ NaCl при 37 °С и переноса в 3 М NaCl при 0 °С. Этот вариант соответствует комбинированному температурно-осмотическому воздействию, включающему гиперосмотический и температурный шок.

Наибольший интерес представляют данные о состоянии клеток, предварительно инкубированных в 950 мМ NaCl, т.е. характеризующихся выраженной температурно-осмотической чувствительностью при переносе 0→37 °С. В этом случае наблюдается исчезновение как температурной, так и осмотической компоненты в реакции клеток. Для исследуемой

осмолярности в сторону ее уменьшения (постгипертонический лизис) и в сторону ее повышения (гиперосмотический шок) [1, 2]. Следует отметить, что в зависимости от исходных условий чувствительность клеток к гипертоническому стрессу или к сдвигу температуры может быть избирательной по отношению к каждому из этих факторов. Состояние клеток в области осмолярности 950–1000 мМ можно рассматривать как отражающее их температурно-осмотическую чувствительность, соответственно состояние клеток при 450 мМ — как отражающее их температурно-

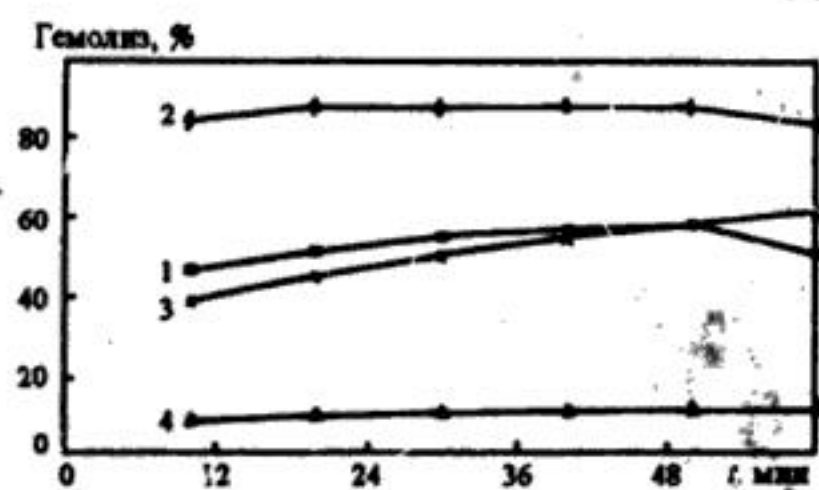


Рис. 2. Временная зависимость влияния начальных условий обработки эритроцитов 950 мМ раствором NaCl на их чувствительность к гиперосмотическому стрессу (180 мин, 3000 мМ NaCl). Обозначения, как на рис. 1

можно ответить сравнивая эти данные с результатами работы [4], а также анализируя верхние и нижние ветви кривых на рис. 2. Во-первых, если исключить вариант комбинированного воздействия на эритроциты ($37 \rightarrow 0$) °C, то окажется, что инкубация с 950 мМ раствором NaCl приводит к появлению значительной чувствительности клеток к изотермическому переносу ($37 \rightarrow 37$ °C и $0 \rightarrow 0$ °C). В присутствии 450 мМ раствора NaCl при изотермических вариантах наблюдается высокая устойчивость клеток. Последнее означает, что в этом случае мы имеем дело с вариантом неизотермической устойчивости, т.е. ситуацией, обратной таковой при холодовом шоке, когда имеет место неизотермическая чувствительность. В обоих случаях управляющим фактором является температура, и в обоих случаях практически отсутствует гемолиз на предварительном этапе.

Анализ полученных данных, в сравнении с известными данными литературы [2–4], позволяет сделать заключение, что обнаруженное явление можно объяснить только существенно расширив наши представления относительно конкретных элементов механизмов, контролирующих осмотическую и температурную устойчивость клеток. Таким дополнительным элементом может являться представление о взаимосвязи между физико-химическим состоянием цитоплазматического геля, которое контролируется осмолярностью и температурой среды [5], и физическим состоянием мембраны, которое контролируется температурой [1]. Ключевым элементом связи является число и прочность контактов между цитоплазматическим гелем и плазматической мембраной. Если число и прочность контактов назвать факторами I-го порядка, то в этом контексте факторами II-го порядка будут число и прочность связей в пределах цитоплазматического геля, его способность включать или отдавать воду, а также фазовое состояние липидов мембраны. Кроме того, по-видимому, сюда можно отнести и состояние интегральных белков (цитоплазматические участки удерживания геля). Факторы III-го порядка — это локальные факторы, связанные с разделением микрофаз в плоскости мембраны при изменении формы клеток, сдвиге температуры, появлении термоупругих напряжений и т.д.

Во второй группе экспериментов был существенно расширен диапазон начальных условий: клетки инкубировались не при двух фиксированных значениях осмолярности, а в широком ряду осмолярности (150–3000 мМ). Как и в первом случае, на втором этапе клетки переносились в 3 М

области осмолярности, включающей 3 М NaCl, подобные данные получены впервые. По нашему мнению, они являются важной основой для расширения представлений о механизмах температурной и осмотической устойчивости клеток. В данном случае достигнутое состояние клеток можно рассматривать как исключительно стабильное, так как речь идет о 180-минутной инкубации клеток в 3 М растворе NaCl.

В чем заключается особенность полученных данных? На этот вопрос

раствор NaCl. Время инкубации на первом этапе составляло 10 и 60 мин, на втором – 180 мин. Полученные данные представлены на рис. 3 и 4. В качестве исходной точки анализа был избран изотермический вариант 37→37 °С. Видно (рис. 3, кривая 1), что повышение тоничности среды предварительной инкубации (10 мин) выше 650 мМ приводит к резкому возрастанию гипертонической чувствительности клеток, при этом максимум отмечается при 1000–1200 мМ. Дальнейшее повышение тоничности сопровождалось снижением гипертонической чувствительности клеток. При сдвиге температуры на втором этапе (37→0 °С) не отмечалось каких-либо существенных изменений в профиле кривой (рис.

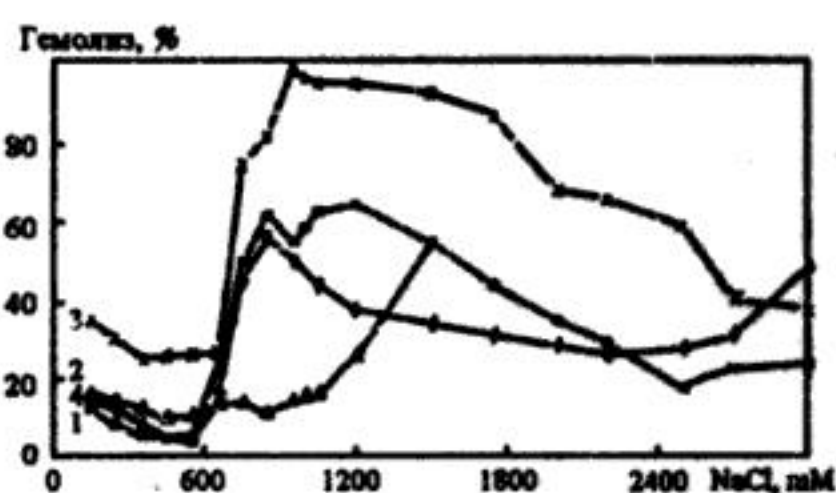


Рис. 3. Влияние начальных условий обработки эритроцитов растворами NaCl (150–3000 мМ) в течение 10 мин на их чувствительность к гиперосмотическому стрессу (180 мин, 3000 мМ NaCl). Обозначения, как на рис. 1

3, кривая 2), отражающих взаимосвязь между гипертонической чувствительностью клеток и тоничностью среды на первом этапе. Обращает на себя внимание только одно существенное отличие – график сдвинут вверх по оси ординат. Фактически это означает резкое увеличение числа нестабильных клеток при переходе через критическую область (650 мМ) в область максимальной сенсibilизации (1000–1200 мМ). Из сопоставления данных, представленных на рис. 1–4, видно, что при последующем повышении

тоничности процессы идут практически одинаково. Соответственно можно говорить о двух популяциях клеток, одна из которых характеризуется осмотической чувствительностью (рис. 3, кривая 1), другая – температурной чувствительностью (рис. 3, кривая 2). Следует отметить, что в интервале тоничности 1000–3000 мМ соотношение между ними не зависит от исходной тоничности среды. Вероятнее всего, однако, что отмеченная особенность указывает не на различия в популяциях, а на изменение кинетики гемолиза при переходе от изотермических к неизотермическим условиям. Возможно также, что при сдвиге температуры происходит более ранняя модификация структурных механизмов, контролирующих реактивность клеток по отношению к долговременному осмотическому шоку. Например, у всех клеток происходит уменьшение одного и того же числа контактов, связывающих цитоплазматический гель с мембраной.

При изотермическом варианте 0→0 °С (рис. 3, кривая 3) отмечается значительное сужение области максимальной чувствительности клеток и смещение ее из 1000–1200 в область 650–950 мМ. Оба эти максимума отмечаются на изотермической кривой (рис. 3, кривая 1) и, кроме того, некая особенность наблюдается на неизотермическом графике (рис. 3, кривая 3, левый пик). Следует указать также на наличие более высокой общей устойчивости клеток в этом случае по сравнению с кривыми 1 и 2 (рис. 3). При анализе второго неизотермического варианта 0→37 °С (рис. 3, кривая 4) отмечается расширение области исходной осмолярности, в пределах которой клетки приобретают высокую гипертоническую устойчивость, что проявляется в сдвиге кривой вправо по оси абсцисс.

Область критической осмолярности, при переходе через которую гипертоническая чувствительность резко возрастает, смещается с 450 до 1100–1500 мМ. Чем можно объяснить данный феномен? Наиболее привлекательной гипотезой является возрастание вклада факторов II-го порядка в общую структурную стабильность клеток. Можно допустить, что в этом случае стабильность возрастает благодаря формированию при 0 °С прочного цитоплазматического геля, когда низкая температура и дегидратация действуют однонаправленно, т.е. осмотическая дегидратация вызывает увеличение числа контактов между молекулами белков, а низкая температура — увеличение прочности этих контактов. Однако следует отметить, что при низкой температуре с возрастанием прочности белковых контактов может иметь место формирование недостаточно прочных контактов между цитоплазматическим гелем и липидами (по крайней мере, в отдельных участках мембраны). При повышении температуры ограничения, накладываемые белками, могут сниматься, контакты между гелем и мембраной будут более прочными. Исходя из этих представлений, можно говорить о том, что в варианте 37→37 °С ослабляется вклад факторов II-го порядка, а именно температурно-зависимой стабилизации цитоплазматического геля. Если характерные времена для проявления вкладов факторов I и II-го порядков в общую стабильность клеток будут существенно несогласованы, например гель будет формироваться или разрушаться медленней, чем контакты между цитоплазматическими белками и мембраной, то вариант 37→0 °С можно объяснить резким ослаблением вклада факторов I-го порядка (т.е. уменьшается число контактов между мембраной и скелетом, а прочный гель еще не сформирован). В варианте 0→37 °С вклад факторов I-го порядка становится значительным, и цитоплазматический гель не успевает разрушиться. Для подобного механизма важным становится значение осмолярности наружной среды по аналогии с нагрузкой, накладываемой на две «склеиваемые» поверхности. При повышении осмолярности среды будет иметь место повышение стабильности клеток в результате формирования контактов и сдавливания противоположных липидной и белковой поверхностей. Данные, представленные на рис. 4, показывают, что увеличение времени обработки клеток на первом этапе инкубации (60 мин) существенно не изменяет общую картину. Однако обращает на себя внимание факт нивелирования различий, характерных для изотермических вариантов 0→0 °С и 37→37 °С, т.е. осмотическая компонента воздействия устраняет температурную. Это проявляется в смещении графика 0→0 °С по оси ординат, что отражает уменьшение осмотической устойчивости клеток при увеличении продолжительности их обработки при 0 °С. Гель в этом случае может быть весьма прочным, но число контактов между ним и мембраной со временем может уменьшаться. Такой же сдвиг по оси ординат характерен и для графика 0→37

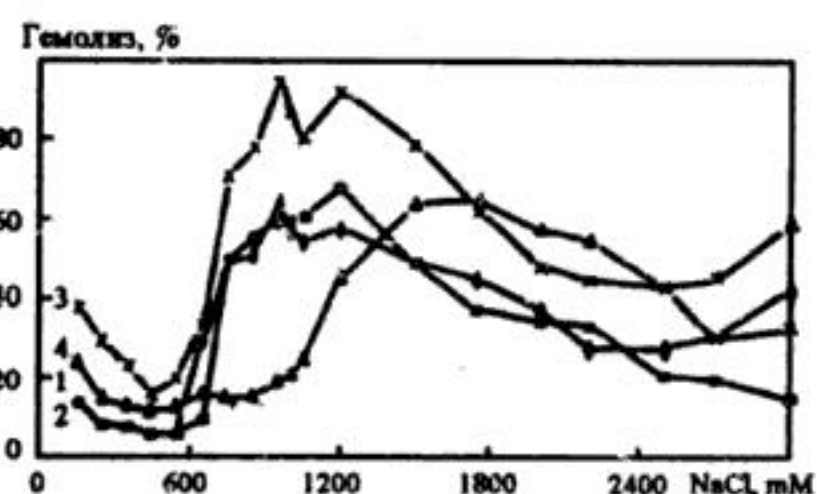


Рис. 4. Влияние начальных условий обработки эритроцитов растворами электролита (150–3000 мМ NaCl) в течение 60 мин на их чувствительность к гиперосмотическому стрессу (180 мин, 3000 мМ NaCl). Обозначения, как на рис. 1

°C. Учитывая тот факт, что сдвиг вверх по оси ординат в обоих случаях характерен для нисходящей ветви графиков (область осмолярности выше области, при которой наблюдается максимальная чувствительность клеток), можно заключить, что осмотический стресс дестабилизирует гель по мере увеличения продолжительности обработки клеток на первом этапе инкубации. Иными словами наблюдается постепенное уменьшение вклада факторов II-го порядка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 255 с.
2. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1989. – 49 с.
3. Поздняков В.В., Бондаренко В.А. Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гиперосмотическому стрессу в 4 М NaCl // Криобиология. – 1989. – № 1. – С. 47–49.
4. Поздняков В.В., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Осмолярность среды как принцип устойчивости к замораживанию // Физико-химическое и биологическое действие криопротекторов. – Киев: Наук. думка, 1990. – С. 124–130.
5. Clark A.H., Ross-Murphy S.B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels // Biopolymers. – 1987. – P. 57–192.

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

Поступила 30.10.91

Т.П.БОНДАРЕНКО

КОМБІНОВАНА ДІЯ ТЕМПЕРАТУРИ І ОСМОЛЯРНOSTІ СЕРЕДОВИЩА НА ТРИВКІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ДО ГІПЕРТОНІЧНОГО СТРЕСУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Вивчено взаємозв'язок між початковою осмолярністю середовища, в котрому знаходяться еритроцити, і їх стійкістю до дії гіпертонічного стресу (3000 мМ NaCl) при різних температурах. Показано, що попередня інкубація клітин при 0 °C в 950 мМ розчині NaCl і перенесення в 3000 мМ розчин NaCl при 37 °C є наслідком зникнення осмотичної і температурної компонент в реакції клітин на гіперосмотичний стрес. Досягнутий стан клітин можна розглядати як виключно стабільний, оскільки йдеться про 180-хвилинну інкубацію в 3000 мМ розчині NaCl. Одержані результати обговорюються з позиції взаємозв'язку з фізико-хімічним станом цитоплазматичного геля, який контролюється температурою і осмолярністю середовища, і фізичним станом плазматичної мембрани, що контролюється температурою.

T.P.BONDARENKO

THE COMBINED EFFECT OF MEDIUM TEMPERATURE AND OSMOLARITY ON THE RESISTANCE OF ERYTHROCYTES TO HYPERTONIC STRESS

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

The interrelation between the initial osmolarity of the medium where erythrocytes are placed and their resistance to hypertonic stress (3000 mM NaCl) was studied at different temperatures. It has been demonstrated that the preliminary incubation of cells at 0 °C in a 950 mM NaCl solution and subsequent transfer to a 3000 mM NaCl solution at 37 °C lead to the disappearance of osmotic and temperature components in the response of cells to hypertonic stress. The achieved condition of cells may be considered as very stable because we deal with the 180 min incubation in a 3000 mM NaCl solution. The obtained results are discussed in terms of interrelation between the physico-chemical state of cytoplasmic gel that is controlled by temperature and medium osmolarity, and the physical state of plasma membrane controlled by temperature.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ МЕМБРАН В ТВЕРДОЙ МАТРИЦЕ

Повреждения биологических мембран при замораживании-оттаивании моделировали с помощью искусственной системы в виде лецитин-холестериновой (ЛХ) пленки, нанесенной на медный проводник в лаковой изоляции. Показано, что после цикла замораживания-оттаивания возрастает проводимость ЛХ пленки в 1,5–2 раза по сравнению с проводимостью перед замораживанием. В предложенной модели повреждения, наступающие в твердофазном состоянии системы, объясняются действием термомеханических напряжений и электрических явлений на границах раздела фаз.

В последнее время возрос интерес исследователей к физическим явлениям, сопровождающим процессы кристаллизации стеклования различных биологических жидкостей и криозащитных сред. Показано, что в ходе замораживания-нагрева жидкостей в температурном диапазоне от температуры стеклования и ниже наблюдается сложная совокупность взаимосвязанных физических явлений: развиваются термомеханические напряжения, возникают акустическая эмиссия, генерация импульсных электрических полей, электромагнитное излучение и др. [1, 2, 5, 6]. Интерес криобиологов к этим явлениям вызван тем, что в нормальных физиологических условиях живые системы не подвергаются действию подобных механических и электрических факторов, возникающих в условиях криоконсервирования. Можно ожидать, что криоконсервирование клеточных суспензий будет сопровождаться развитием термомеханических напряжений и сопутствующих им электрических явлений на границах раздела между клеткой и средой суспендирования. Другими словами, влиянию указанных выше факторов будет в первую очередь подвергаться цитоплазматическая мембрана.

Настоящие исследования были предприняты с целью выявления на модельных мембранах возможных последствий, наступающих в результате замораживания-нагрева и пребывания мембраны в твердофазной матрице. В работе наблюдали за нарушениями целостности модельной мембраны после замораживания-нагрева в различных средах на основании анализа электропроводности мембранной системы.

Использовали модельные мембраны, изготовленные из лецитина и холестерина в виде эквимольной смеси, растворенной в диоксане в концентрации 10–20% массовой доли.

Мультислойную мембрану получали, нанося раствор лецитина с холестерином на изолированный медный провод в лаковой изоляции типа ПЭВ диаметром 0,62 мм. Искусственная мембрана образовывалась после испарения растворителя на воздухе. Как было нами показано,

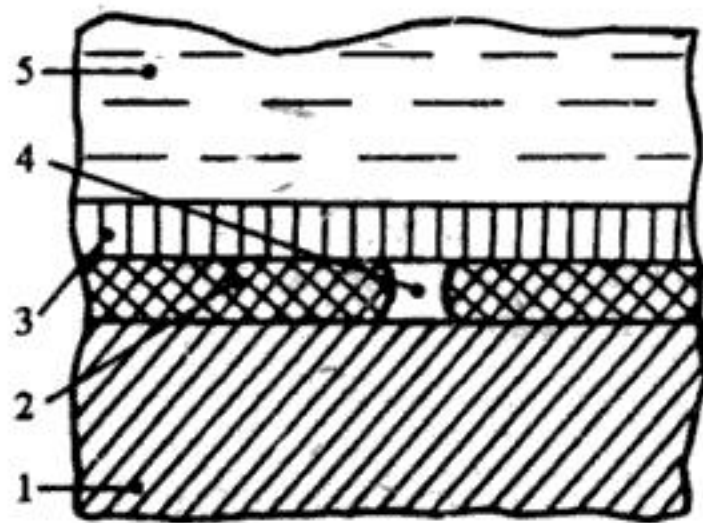


Рис. 1. Схематическое изображение модельной мембранной системы: 1 – проводник, 2 – лаковая изоляция, 3 – лецитин-холестериновая пленка, 4 – дефект в лаковой изоляции, 5 – среда погружения

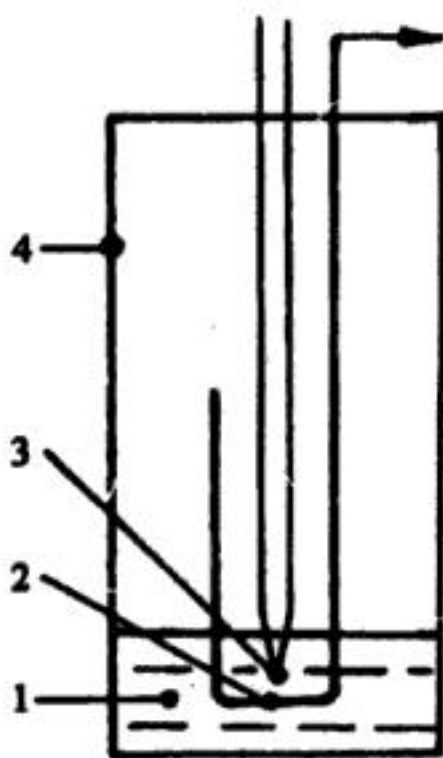


Рис. 2. Схема измерительной ячейки: 1 – исследуемый раствор, 2 – проводник для нанесения модельной мембраны, 3 – термопара, 4 – стакан из нержавеющей стали

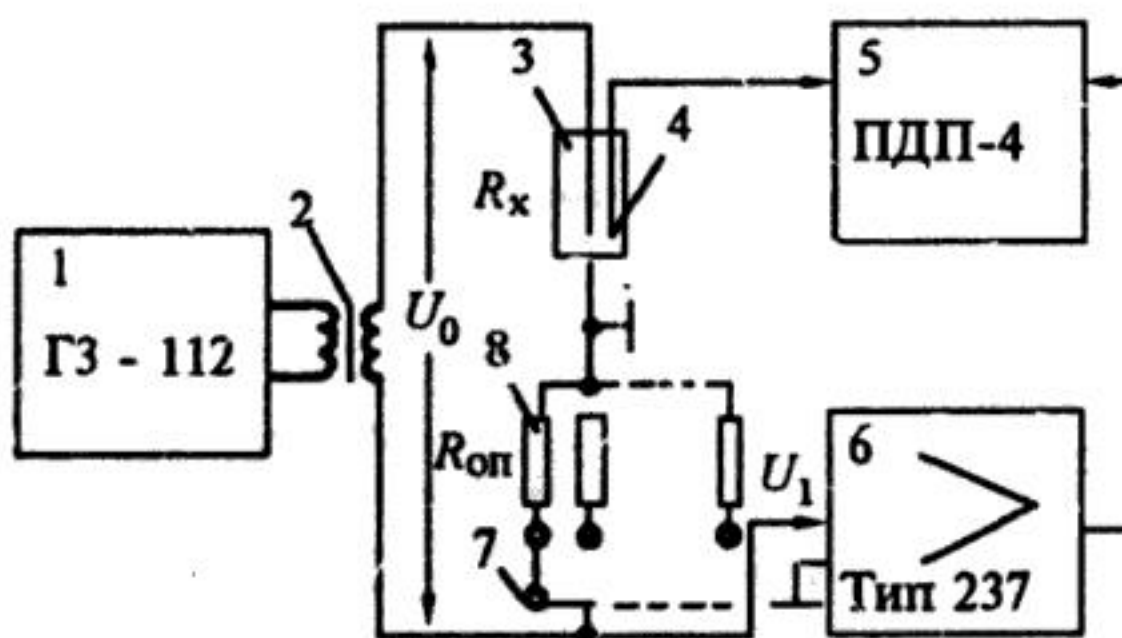
лецитин–холестериновая (ЛХ) мембрана на лаковой изоляции провода удерживается прочнее, чем на неизолированном проводе. Схема получаемой таким способом модельной системы показана на рис. 1. Удобство такой модельной системы в данном эксперименте состоит в том, что здесь мембрана не разделяет две жидких среды и, следовательно, не подвержена деструктивному действию осмотических факторов при замораживании–нагреве. Таким образом, можно утверждать, что основной механизм нарушения целостности модельной мембраны в результате замораживания–нагрева будет связан с термомеханическими напряжениями и с электрическими явлениями на границе раздела между мембраной и средой.

Полученную модельную мембрану помещали в измерительную ячейку, которую заполняли различными водными растворами, используемыми обычно в технологии криоконсервирования. Измерительная ячейка (рис. 2)

представляет собой тонкостенный стакан из нержавеющей стали с толщиной стенок 0,62 мм. В центре стакана расположена медь–константановая термопара для измерения температуры.

На рис. 3 показана схема экспериментальной установки для измерения электропроводности. Измерительная ячейка 4 с сопротивлением R_x включена последовательно с опорным резистором $R_{оп}$. К цепочке R_x и $R_{оп}$ приложено переменное напряжение U_0 , амплитуда которого под-

Рис. 3. Схема экспериментальной установки для измерения электропроводности: 1 – генератор звуковой частоты, 2 – согласующий трансформатор, 3 – измерительная ячейка, 4 – термопара, 5 – двухкоординатный самописец, 6 – усилитель, 7 – переключатель диапазонов, 8 – опорные резисторы



держивается неизменной. В ходе эксперимента регистрируется напряжение $U_{оп}$ на опорном резисторе $R_{оп}$:

$$U_{оп} = U_0 \frac{R_{оп}}{R_{оп} + R_x}.$$

При $R_{оп} < R_x$ величина $U_{оп}$ пропорциональна проводимости исследуемой мембранной системы в ячейке 4. Диапазон измерения проводимости в использованной нами установке изменяется 14 ступенями в пределах от 1 миллисименса до 50 микросименс на всю шкалу переключением 14 опорных резисторов. Стандартное значение U_0 устанавливается и периодически проверяется при подключении вместо R_x и $R_{оп}$ калибро-

вочных прецизионных резисторов. При этом амплитуда U_0 контролируется по значению напряжения $U_{оп}$ или по отклонению пера самописца, которые при подключенных калибровочных резисторах должны иметь неизменную величину.

Измерение проводимости производили на частоте 30 Гц, напряжение на мембране составляло 20 мВ. Проводимость как функцию температуры записывали на двухкоординатном самописце ПДП4-002.

Охлаждение образцов производили погружением ячейки 4 в жидкий азот, средняя скорость снижения температуры составляла 200 °С/мин. Для нагрева образца пользовались двумя способами: быстрый нагрев в водяной бане при температуре 22–25 °С (время нагрева от –196 °С до 0 °С составляло при этом способе около 20 мин); медленный нагрев путем самоотгрева в воздухе (при температуре воздуха 22 °С время нагрева от –196 до 0 °С составляло около 2 ч. Для приготовления растворов использовали бидистиллат, хлористый калий марки ХЧ, полиэтиленгликоли фирмы “Мерк” марки “Пурум”, яичный лецитин производства Харьковского завода химреактивов и холестерин фирмы “Алдрих”.

Прежде чем проводить исследования модельной ЛХ мембраны, мы изучали температурные зависимости проводимости тех растворов, в которые предполагалось помещать мембрану. Для этого в измерительной

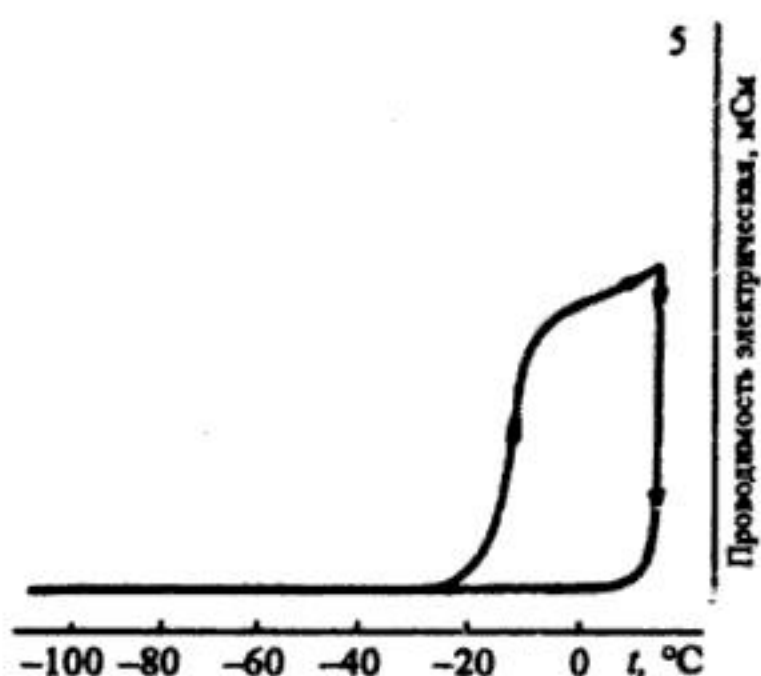


Рис. 4. Зависимость проводимости ячейки с физиологическим раствором и с неизолированным проводником 2 (см. рис. 2) от температуры при охлаждении и медленном нагреве

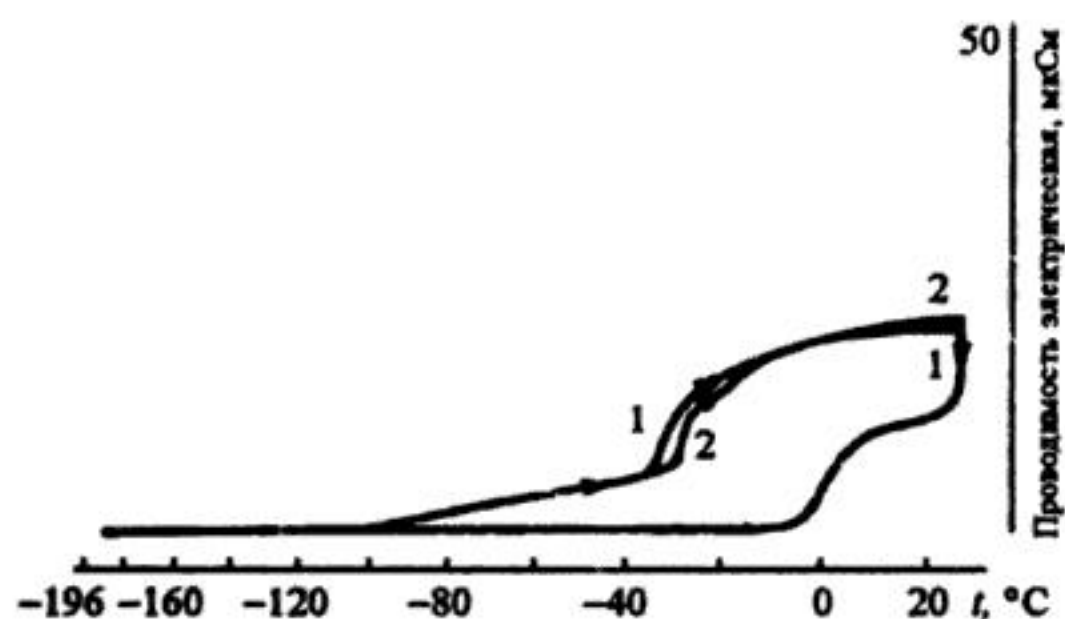


Рис. 5. Зависимость проводимости ячейки с физиологическим раствором и с проводником 2 (см. рис. 2) в лаковой изоляции без ЛХ пленки от температуры при охлаждении и быстром нагреве: 1 и 2 – соответственно первый и второй циклы охлаждения–нагрева

ячейке (рис. 2), заполненной исследуемым раствором, устанавливали проводник 2 без изоляции либо в лаковой изоляции без ЛХ пленки.

На рис. 4 показана температурная зависимость проводимости ячейки, заполненной физиологическим раствором с неизолированным проводником 2 при охлаждении–нагреве в режиме медленного повышения температуры (самоотгрев в воздухе). Гистерезисный характер полученной зависимости объясняется тем, что при охлаждении и нагреве существуют значительные температурные градиенты между центральной и периферической частями ячейки. Температура на рис. 4 и на последующих рисунках соответствует показаниям термопары в центре ячейки. Важно отметить, что сразу после завершения цикла охлаждения–нагрева

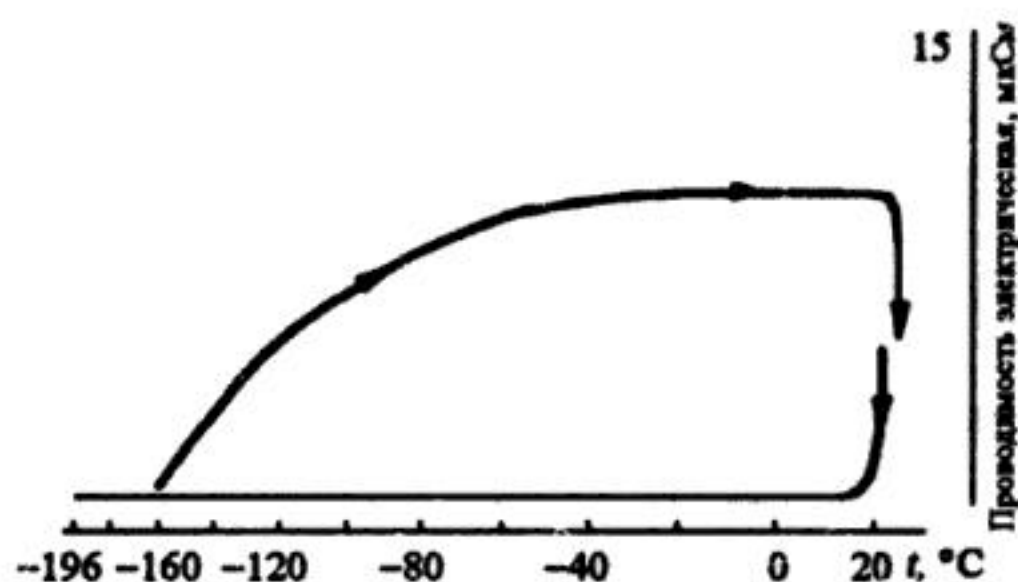


Рис. 6. Зависимость проводимости модельной системы с ЛХ пленкой в физиологическом растворе от температуры при охлаждении и быстром нагреве

что проводимость осуществляется через дефекты изоляции и поры в лаковом слое, и эффективная поверхность контакта с жидкостью меньше, чем в первом случае.

На рис. 5 представлена аналогичная температурная зависимость для системы физиологический раствор – проводник в лаковой изоляции в режиме более быстрого нагрева (погружением ячейки в водяную баню с температурой 25 °С). Видно, что на этапе нагрева проводимость начинает возрастать при более низких температурах в центре ячейки, чем в рассмотренном выше случае медленного нагрева. Это объясняется большими значениями температурных градиентов и вкладом в проводимость периферических частей образца. При повторном цикле охлаждения–нагрева (кривая 2) наблюдается незначительное отличие в значениях проводимости в области промежуточных температур, что связано, вероятно, с тепловыми деформациями лаковой изоляции и с изменением эффективной площади пор в пленке. Однако после завершения цикла охлаждения–нагрева проводимость принимает, как и в предыдущем случае, значение, близкое к первоначальному.

На рис. 6 показана температурная зависимость проводимости для системы с ЛХ пленкой в физиологическом растворе. Из сравнения с рис. 5 видно, что общая величина проводимости системы до замораживания примерно в 4 раза ниже, чем в отсутствие ЛХ пленки. Такое уменьшение проводимости служило для нас показателем того, что пленка на лаковой изоляции образовалась и закрыла определенную часть дефектов изоляции, как показано схематически на рис. 1.

Как видно из рис. 6 проводимость системы после завершения цикла охлаждения–нагрева примерно в два раза превышает начальное значение проводимости. Если образец после оттаивания выдержать 20–30 мин при температуре 22 °С, то проводимость постепенно возвращается к исходному значению. Этот факт указывает на возникновение дефектов в ЛХ

проводимость при 22 °С принимает то же значение, которое было до начала охлаждения.

Если в ячейке установить проводник 2 с лаковой изоляцией без ЛХ пленки, то температурная зависимость проводимости качественно подобна изображенной на рис. 4 с тем отличием, что численные значения проводимости примерно на два порядка меньше. Это объясняется тем,

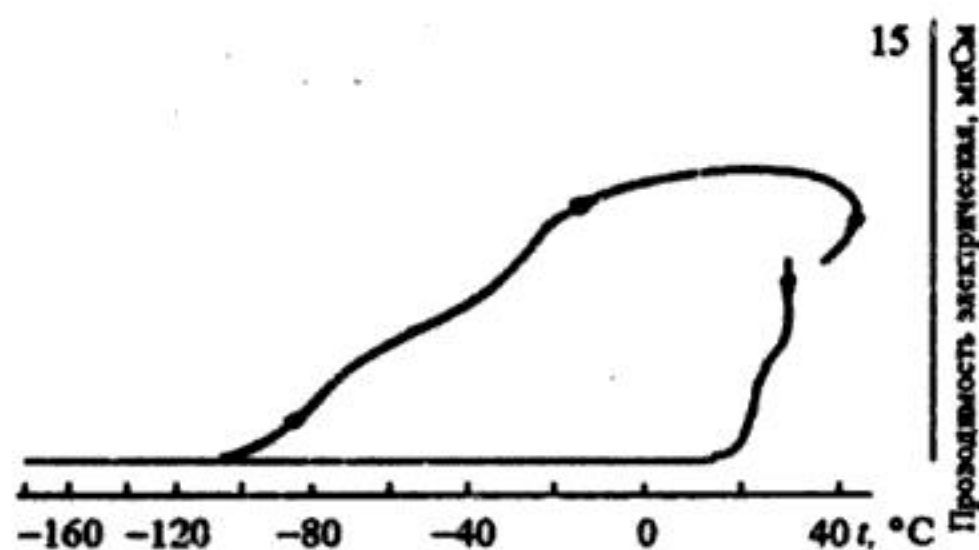


Рис. 7. Зависимость проводимости модельной системы с ЛХ пленкой в 15%-м растворе ПЭГ-300 от температуры при охлаждении и быстром нагреве

пленке в процессе замораживания и их «залечивание» во время экспозиции при температуре выше 0 °С.

На рис. 7 и 8 показаны аналогичные зависимости для систем с ЛХ пленкой в растворах ПЭГ-300 и ПЭГ-1000. Видно, что в растворе ПЭГ-300 проводимость системы на этапе нагрева начинает возрастать при более низкой температуре, чем в растворе ПЭГ-1000. Это находится в

качественном согласии с известными диаграммами физического состояния водных растворов криопротекторов [4], согласно которым жидкая фаза в растворах низкомолекулярного вещества существует при более низкой температуре, чем в растворах высокомолекулярного вещества из того же гомологического ряда. Как и в рассмотренном выше случае, значение проводимости сразу после оттаивания более высокое, чем перед замораживанием, и наблюдается постепенное уменьшение проводимости в оттаянных образцах («залечивание» дефектов). Возможность подобного «залечивания» дефектов в мембранах путем латеральной диффузии липидов постулировалась ранее [3]. В рассмотренных примерах существование такого механизма иллюстрируется экспериментально. Замораживание пленки, не погруженной в жидкий раствор, и последующий медленный нагрев не приводят к подобному возрастанию проводимости.

На основании полученных результатов можно предложить модель развития повреждения мембран в твердофазной замороженной матрице. Согласно высказанной нами ранее гипотезе [2], одной из причин повреждения мембран может быть развитие электрических полей, т.е. разрушение может носить электрическую природу. Другой фактор, который следует принимать в расчет, связан, вероятно, с существованием механических напряжений на границах между мембраной и твердой матрицей в замороженном растворе, т.е. природа повреждений в этом случае чисто механическая. Наконец, эти факторы могут действовать совместно, поскольку известно, что электрические поля в материале могут быть вызваны механическим действием [5]. Однако все указанные факторы действуют именно в твердой матрице.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воротилин А.М., Зинченко А.В., Моисеев В.А., Аненко В.И. Влияние механического фактора на повреждение клеток при нагреве // Криобиология. – 1988. – № 3. – С. 31–35.
2. Грищенко В.И., Моисеев В.А., Зинченко А.В. О диэлектрическом пробое мембран при криоконсервировании биологических объектов // Докл. АН СССР. – 1989. – 308, № 1. – С. 215–217.
3. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах. – Киев: Наук. думка, 1988. – 206 с.
4. Зинченко А.В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур –150 – 0 °С: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. – Харьков, 1983. – 22 с.

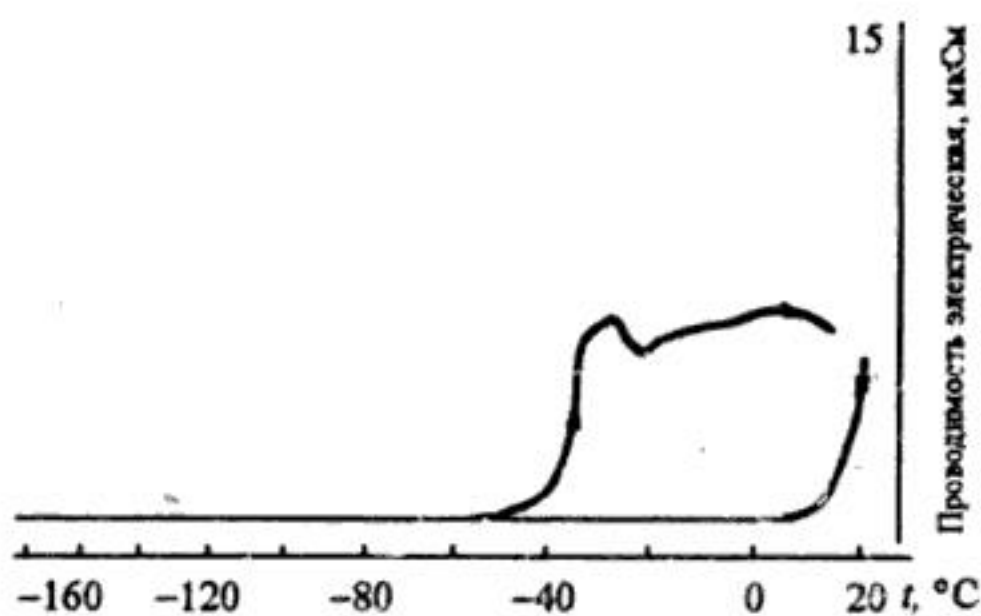


Рис. 8. Зависимость проводимости модельной системы с ЛХ пленкой в 15%-м растворе ПЭГ-1000 от температуры при охлаждении и быстром нагреве

5. Зинченко А.В., Моисеев В.А. Механоэлектрические явления в растворах криопротекторов при замораживании-нагреве // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. – Харьков: Б.и., 1990. – С. 50–56.
6. Куракса В.М., Милешкин М.Б. Сравнительная оценка механических нарушений структуры твердой фазы при неравновесном замораживании и отогреве жидкостей // Криобиология и криомедицина. – 1983. – Вып. 13. – С. 32–36.

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

Поступила 17.02.92

О.В.ЗИНЧЕНКО, В.Д.ЗИНЧЕНКО, В.О.МОЙСЕЕВ

МОДЕЛЮВАННЯ ПОШКОДЖЕННЯ МЕМБРАН У ТВЕРДІЙ МАТРИЦІ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Пошкодження біологічних мембран при заморожуванні-відтаюванні моделювали за допомогою штучної системи у вигляді лецитин-холестеринової (ЛХ) плівки, нанесеної на мідний провідник в лаковій ізоляції. Показано, що після циклу заморожування-відтаювання зростає провідність ЛХ плівки у 1,5 – 2 рази порівняно з провідністю перед заморожуванням. У запропонованій моделі пошкодження, яке настає у твердофазному стані системи, пояснюється дією термомеханічних напруг і електричних явищ на межах розподілу фаз.

A.V.ZINCHENKO, V.D.ZINCHENKO, V.A.MOISEYEV

MODELING OF MEMBRANE INJURY IN THE SOLID MATRIX

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

Injury to biological membranes by freeze-thawing was modeled using a system of lecithin-cholesterol (LC) film applied to an insulated copper conductor. It has been shown that the conductivity of LC film increases after freeze-thawing by 1.5–2-fold as compared to that before freezing. In the suggested model, the injury appearing in the solid state may be explained by the action of thermomechanical tensions and electric effects at the interfaces.

Г.Е.Загоруйко, Б.П.Сандомирский, В.Ф.Тарасов**ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ГЕПАТОЦИТОВ СВИНЕЙ НА ЭТАПАХ ИХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ**

Проведено светооптическое, электронно-микроскопическое и морфометрическое исследование динамики структурной организации гепатоцитов на этапах их криоконсервирования. Установлено, что в норме в паренхиме печени свиней выявляются темные умеренно обезвоженные гепатоциты, светлые гепатоциты с признаками умеренных дистрофических изменений эргастоплазмы и промежуточные по оптической плотности паренхиматозные клетки в процентном отношении 50:20:30. Перфузия печени вызывает усугубление дистрофических изменений в светлых гепатоцитах (30%). После дезагрегации печени в суспензии изолированных гепатоцитов соотношение двух основных субпопуляций клеток, четко различающихся по степени выраженности изменений структуры органелл, остается неизменным и составляет 70:30%. Замораживание-оттаивание вызывает увеличение в суспензии гепатоцитов объемной доли поврежденных клеток с 30 до 50%. Сделан вывод о том, что на этапах криоконсервирования наименее выраженным структурным изменениям подвергаются темные умеренно обезвоженные гепатоциты, объемная доля которых в паренхиме печени животных составила 50%. Следовательно, умеренная дегидратация гепатоцитов способствует повышению устойчивости этих клеток к воздействию различных этапов криоконсервирования.

В широком спектре функционально-метаболических свойств гепатоцитов особое место занимают процессы катаболизма и детоксикации разнообразных веществ эндо- и экзогенного происхождения. Метаболические свойства гепатоцитов, их функциональная гетерогенность в значительной мере обусловлены положением клеток в гистоструктуре печеночной балки. Так, перипортальные гепатоциты наиболее эффективны в плане синтеза белков плазмы крови, а процессы внешней секреции и детоксикации более интенсивны в клетках паренхимы, локализованных вокруг центральной вены [6]. Однако эти функциональные различия в метаболических свойствах морфологически не закреплены, и в зависимости от условий гепатоциты потенциально способны выполнять разнообразные биохимические превращения, характерные для всей популяции клеток паренхимы печени. Установлено, что ферментативные процессы, направленные на инактивацию и детоксикацию ксенобиотиков, осуществляются преимущественно в элементах эндоплазматической сети гепатоцитов, содержащей универсальную систему множественных форм цитохром-Р-450-зависимых монооксидаз и гидролаз [5]. Многие биологически активные соединения белково-пептидной природы катаболизируются лизосомными катепсинами [9]. Следовательно, в цитоплазме гепатоцитов структурно-функциональный комплекс, состоящий из множества взаимодействующих органелл: эндоплазматическая сеть — лизосомы — митохондрии, координирует и осуществляет процессы инактивации и детоксикации разнообразных по природе ксенобиотиков.

Способность паренхиматозных клеток печени к биотрансформации чужеродных веществ послужила основанием для проведения экспериментальных исследований по изучению особенностей метаболизма ксенобиотиков в аллогенных, ксеногенных свежесыводенных и криоконсервированных гепатоцитах [1—3, 8]. Результаты этих исследований позволили разработать соответствующие рекомендации для клинического применения метода экстракорпоральной гемоперфузии через взвесь



Рис. 1. Этапы технологии криоконсервирования гепатоцитов свиньи

криоконсервированных гепатоцитов при лечении больных с острой печеночной и печеночно-почечной недостаточностью [4, 10].

Несмотря на достигнутые успехи в получении интактных изолированных паренхиматозных клеток печени, морфологические исследования динамики структурной организации гепатоцитов на этапах их криоконсервирования немногочисленны [7].

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния различных этапов криоконсервирования на ультраструктуру изолированных ксеногепатоцитов свиней, используемых для клинического применения при проведении экстракорпоральной гемоперфузии.

Получение однородной по структурно-функциональным показателям суспензии ксеногепатоцитов свиньи осуществляли по разработанной нами технологии (рис. 1).

Половозрелые свиньи массой 90–120 кг доставлялись в виварий ИПКиК АН Украины, где проходили санитарную обработку, премедикацию и помещались в операционную. Соблюдая асептику, производили срединную лапаротомию с дополнительным разрезом параллельно правой реберной дуге, канюлирование нижней полой вены для последующей перфузии органа. Параллельно над диафрагмой пережимали нижнюю полую вену, для чего производили торако- и диафрагмотомию, пересекали печеночно-двенадцатиперстную связку и портальную вену. Отмывочную перфузию осуществляли по замкнутому контуру при помощи роликового насоса со скоростью 200 мл/мин, по окончании которой орган выделяли из организма и помещали в термостатированную емкость и далее перфузировали раствором, содержащим коллагеназу при температуре 37 °С в течение 15 мин. В процессе перфузии производили удаление желчного пузыря. После перфузии раствором коллагеназы печень взвешивали, помещали в стерильный сосуд, находящийся при температуре 0 °С и осуществляли ее механическую дезаг-

регацию металлическим гребнем. Полученную таким образом суспензию печеночных клеток смешивали со средой выделения и фильтровали через нейлоновый фильтр. Затем в отмытый клеточный осадок добавляли 10%-й раствор ДМСО до конечной концентрации 5% в клеточной взвеси. После 10–15 мин эквilibрации клеток паренхимы печени в криоконсервирующем растворе ДМСО суспензию гепатоцитов разливали в стерильные одноразовые контейнеры и герметично закупоривали. Замораживание проводили по следующей программе: от 0 °С до –5 °С со скоростью 1 °С/мин. При достижении температуры –5 °С термостатировали в течение 10 мин, индуцировали кристаллизацию и далее охлаждали до –140 °С со скоростью 10 °С/мин.

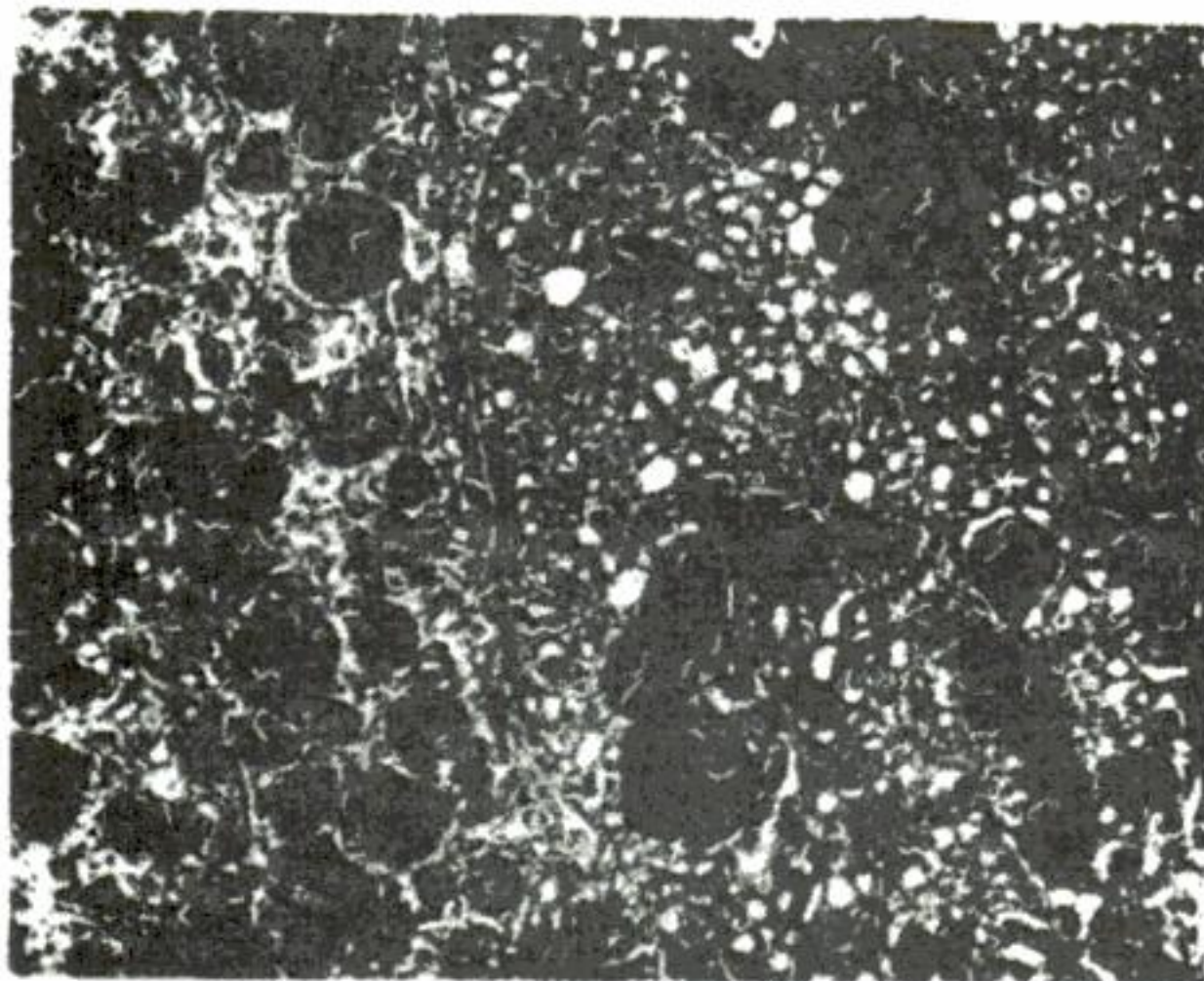
Структурные изменения гепатоцитов оценивали на этапах их выделения и криоконсервирования с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Кусочки нативной печени и после перфузии органа, а также суспензию гепатоцитов до и после замораживания-оттаивания фиксировали в 2%-м забуференном растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (рН = 7,2) при 4 °С в течение 4 ч. После отмытки образцов фосфатным буфером проводили постфиксацию в 1%-м растворе четырехоксида осмия на фосфатном буфере в течение 4 ч при 4 °С. Затем образцы обезвоживали в спиртах возрастающей крепости (50–100 °), пропитывали эпоксидными смолами (эпон и арадит) и полимеризовали блоки при 60 °С в течение 24 ч. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме УМТП-4, контрастировали и просматривали в электронном микроскопе ЭВМ-100Л. На окрашенных Азуром II полутонких срезах кусочков ткани печени с помощью окулярной сетки ($N_0=250$ точек) при увеличении светового микроскопа $\times 400$ определяли в препаратах относительные объемы различных по оптической плотности гепатоцитов: темных, промежуточных, светлых. В серии электронно-микроскопических снимков свежееизолированных гепатоцитов (100 клеток) и после замораживания-оттаивания (100 клеток) изучали распределение паренхиматозных клеток печени в зависимости от степени деструкции и вакуолизации структурно-функциональных элементов эргастоплазмы.

В норме печень половозрелых свиней характеризуется относительно однородной структурой гепатоцитов, объединенных элементами стромы в структурно-функциональные комплексы: печеночные балки, трабекулы. В зависимости от интенсивности окраски (оптической плотности), в паренхиме определяются темные, промежуточные и светлые гепатоциты со сложно структурированной эргастоплазмой (рис. 2).

Темные гепатоциты – это умеренно обезвоженные клетки, для которых характерна довольно плотная упаковка в цитоплазме субклеточных структур. Темные гепатоциты существенно меньших размеров, чем остальные клетки паренхимы, неправильной формы с пикнотично измененным ядром, в котором доминирует гетерохроматин. Элементы эндоплазматической сети уменьшены в размерах и уплощены. Многочисленные петли гранулярного ретикулума определяются преимущественно в области перикариона. Темные митохондрии часто неправильной формы и содержат мелкозернистый электронно-плотный матрикс.

В цитоплазме светлых гепатоцитов увеличено содержание гиалоплазмы, вследствие чего субклеточные структуры расположены менее плотно друг к другу. Наблюдается увеличение размеров ядра и абсолютного

Рис. 2. Ультраструктура гепатоцитов свиней в норме. Темные клетки со сложно структурированной эргастоплазмой. x5000

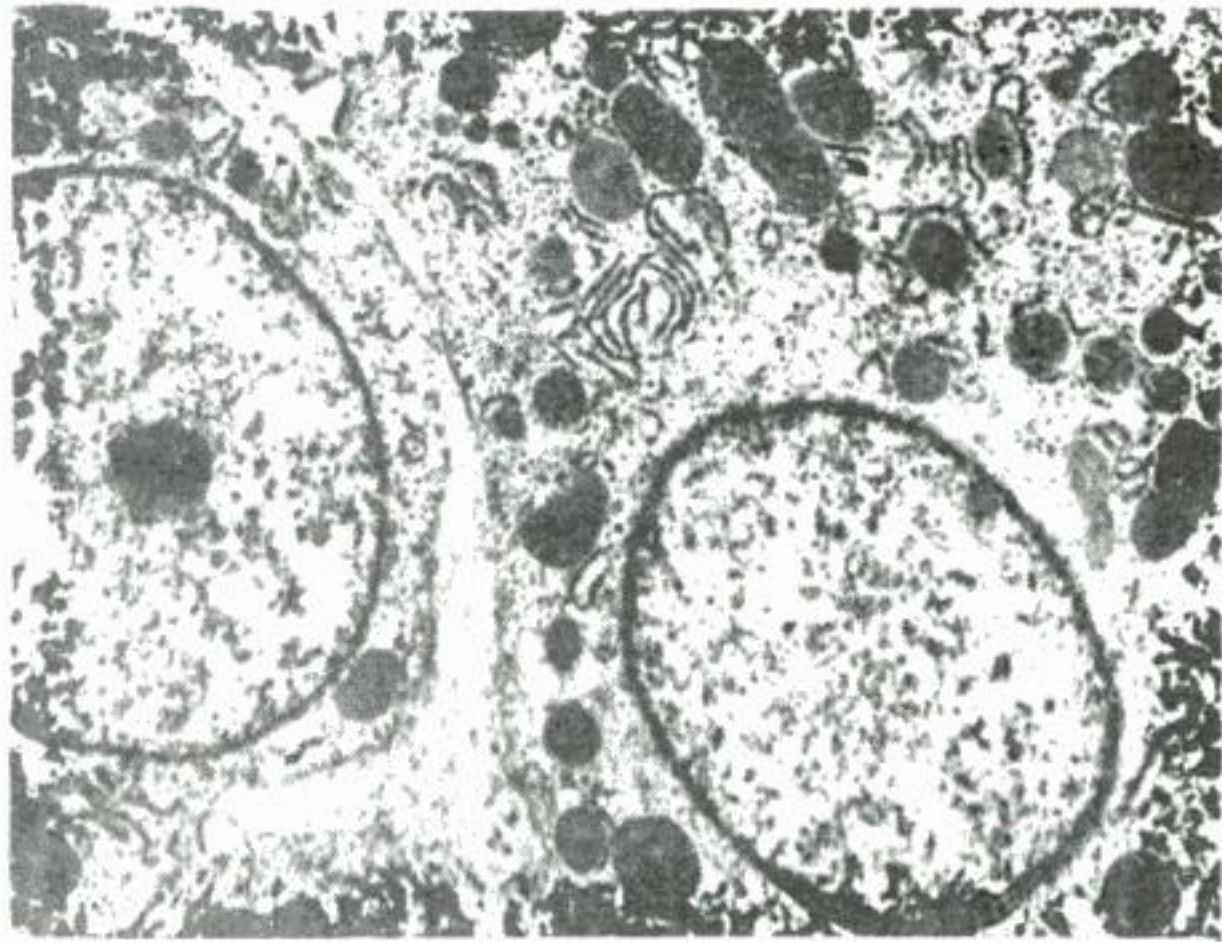


объема цитоплазмы светлых гепатоцитов. Ядра в таких клетках чаще округлой формы, содержат четко контурированное ядрышко и множество мелкодисперсных глыбок эухроматина. Гетерохроматин узкой полоской расположен вдоль периметра сечения внутренней ядерной мембраны. Многочисленные элементы эндоплазматической сети представлены светлыми везикулами разных размеров и неравномерно расширенными канальцами. Заметно удлинённые, петли гранулярного ретикулума выявляются не только в области перикариона, но и окаймляют множество светлых, иногда умеренно набухших митохондрий, в которых содержится небольшое количество крист. В цитоплазме светлых гепатоцитов определяются участки отека, разрежения и лизиса субклеточных структур, возрастает содержание лизосом и лизосомоподобных образований, гранул липофусцина, уменьшается количество гликогена и липидных включений.

Промежуточные по оптической плотности гепатоциты имеют морфологические черты сходства с темными и светлыми клетками. В цитоплазме таких гепатоцитов выявляются светлые и темные митохондрии, умеренно набухшие и уплощенные везикулы и канальцы эндоплазматической сети. В ядрах определяется примерно равное содержание гетеро- и эухроматина. Однако независимо от “вариаций” структурной организации темных, промежуточных и светлых гепатоцитов доминирующими компонентами цитоплазмы клеток паренхимы печени являются эндоплазматическая сеть, гранулярный ретикулум и митохондрии (рис. 2). По данным проведенного морфометрического анализа, на долю темных гепатоцитов приходится 50, переходных – 20 и светлых – 30% объема паренхимы печени. Следует отметить, что выявленная гетерогенность ультраструктуры гепатоцитов обусловлена различным морфофункциональным состоянием клеток и отражает общебиологический принцип “перемежающейся активности” множества структурно-функциональных элементов органов висцеральных систем.

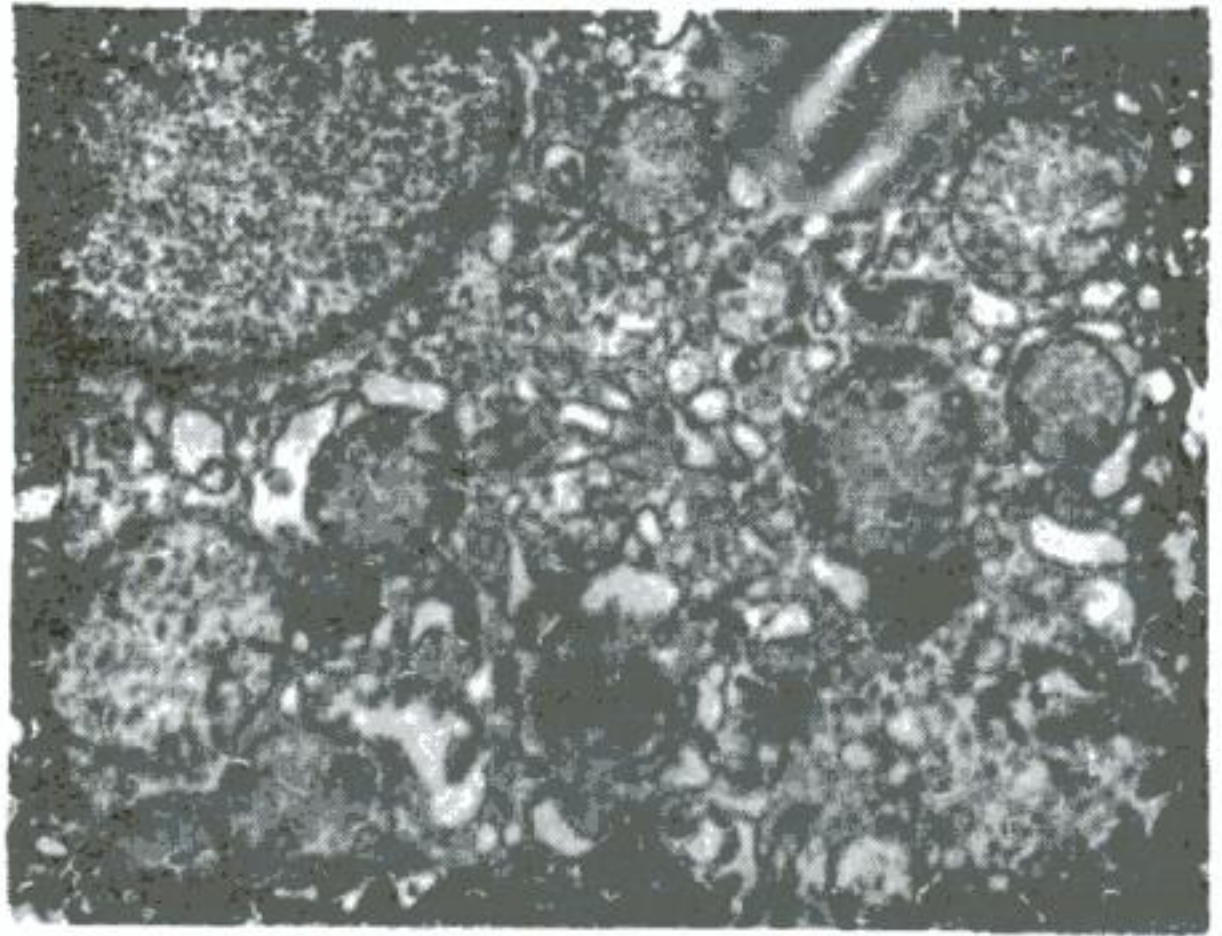
После перфузии органа в печени существенно возрастает объемная доля стромального компонента вследствие увеличения объема интерстициальной жидкости, содержащей компоненты буферного раст-

Рис. 3. Ультраструктура гепатоцитов свиней после перфузии органа. Набухание клеток и уменьшение содержания хроматина в ядрах. $\times 5000$



вора и коллагеназу. В паренхиматозном компоненте перфузированной печени наблюдается расширение межклеточных пространств, определяются свободно лежащие гепатоциты преимущественно сглаженной овальной формы. Эти данные свидетельствуют о значительном ослаблении межклеточных контактных взаимодействий типа "гепатоцит $\rightleftharpoons$ гепатоцит". Несмотря на уменьшение межклеточных взаимодействий и увеличение размеров щелевых пространств, на билиарном полюсе гепатоцитов в местах формирования желчных капилляров сохраняются контакты по типу десмосом. В печени определяются в основном светлые гепатоциты и клетки с признаками умеренных дистрофических изменений эргастоплазмы. После перфузии наблюдается умеренное тотальное набухание цитоплазмы гепатоцитов и уменьшение плотности упаковки внутриклеточных структур (рис. 3). В результате умеренного набухания гепатоцитов в цитоплазме увеличивается расстояние между субклеточными структурами, округляется форма клеток, происходит деформация и расхождение десмосом. В популяции паренхиматозных клеток печени выделяются две группы гепатоцитов, отличающиеся друг от друга ультраструктурой элементов эргастоплазмы. Первая группа – гепатоциты, в цитоплазме которых определяются небольших размеров темные округлой формы митохондрии с электронно-плотным матриксом и нечетко выраженными кристами, уплощенные частично фрагментированные узкие каналы гранулярного ретикулума, множество мелких везикул эндоплазматической сети, набухшие округлые ядра с разреженным эухроматином и утолщенной ядерной оболочкой. Цитоплазма таких клеток умеренно отечна, имеет разрыхленную "зернисто-сетчатую" структуру и содержит довольно большое количество гранул гликогена. Вторая группа клеток также представлена светлыми гепатоцитами. Однако в цитоплазме таких клеток выявляются округлые набухшие митохондрии с неравномерно просветленным матриксом и редуцированными кристами (рис. 4). Определяются светлые вакуолизированные органеллы с единичными радиально расположенными кристами и отдельными комочками разрушенного матрикса. Канальцы гранулярного ретикулума резко расширены. Определяется мультивезикуляция элементов эндоплаз-

Рис. 4. Ультраструктура гепатоцитов свиней после перфузии органа. Светлые клетки, в цитоплазме которых выявляются набухшие митохондрии с редуцированными кристами. $\times 7000$



матической сети, существенное снижение содержания гранул гликогена. Выявляются участки повреждения плазмолеммы и появления элементов эндоплазматической сети и липидных капель в интерстициальном пространстве.

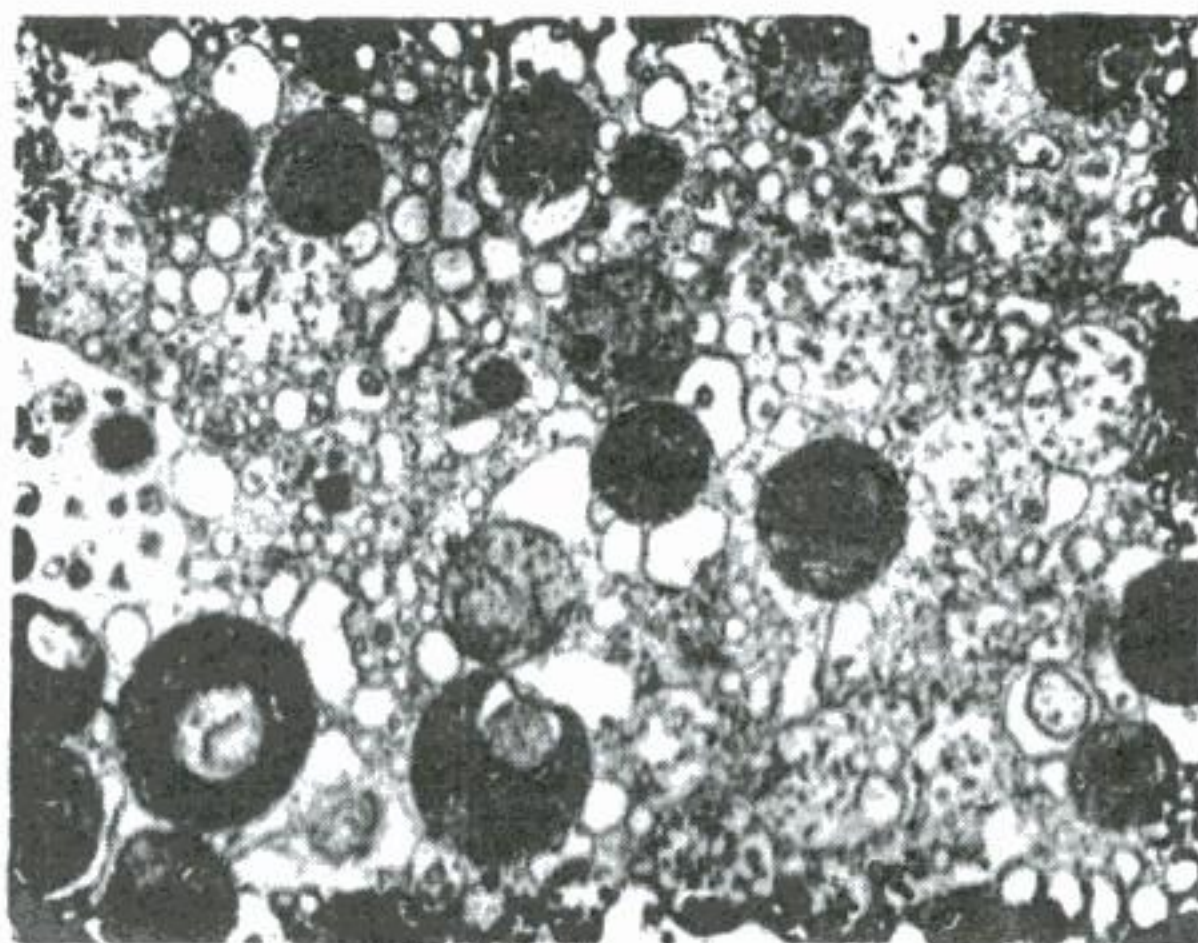
Проведенный морфометрический анализ позволил установить, что примерно 70% паренхиматозных клеток печени относятся к первой группе и 30% составляют гепатоциты, в цитоплазме которых обнаруживаются признаки дистрофических изменений и повреждений субклеточных структур.

В суспензии клеток печени свиней выявляются многочисленные изолированные гепатоциты и единичные клеточные агрегаты, состоящие из 2–3 гепатоцитов. Эти агрегаты образованы в результате адгезии изолированных гепатоцитов друг к другу и вследствие сохранения межклеточных контактов типа десмосом на билиарном полюсе печеночных клеток. Изолированные гепатоциты преимущественно овальной формы со сглаженной поверхностью. В межклеточном пространстве определяются фрагменты цитомембран, митохондрии, везикулярные и мелкодисперсные структуры, липидные капли. В суспензии гепатоцитов выявляются две группы клеток, различающихся по ультраструктуре элементов эргастоплазмы.

Первая группа гепатоцитов – изолированные клетки, в цитоплазме которых определяются три разновидности митохондрий: мелкие гиперосмированные органеллы с локальными участками просветления матрикса, темные округлые митохондрии увеличенных размеров с плотно упакованными кристами и мелкозернистым матриксом, умеренно набухшие митохондрии с просветленным матриксом и единичными фрагментированными кристами (рис. 5). Канальцы гранулярного ретикулума существенно расширены, на их боковой поверхности выявляются в небольшом количестве рибосомы. Элементы эндоплазматической сети представлены множеством светлых везикул различных размеров преимущественно округлой формы, лизосомы и лизосомоподобные частицы без признаков повреждения. Существенно уменьшается содержание в цитоплазме клеток гранул гликогена.

Вторая группа клеток – гепатоциты с признаками тотальной умеренной вакуолизации митохондрий и везикуляции элементов эндоплазматической сети (рис. 6). В многочисленных пузырьках выявляются мелкодисперсные хлопьевидные массы. В большинстве набухших мито-

Рис. 5. Ультраструктура изолированных гепатоцитов свиней. В цитоплазме клетки определяются гиперосмированные митохондрии, темные округлые органеллы и умеренно набухшие просветленные митохондрии с единичными кристами. $\times 10000$

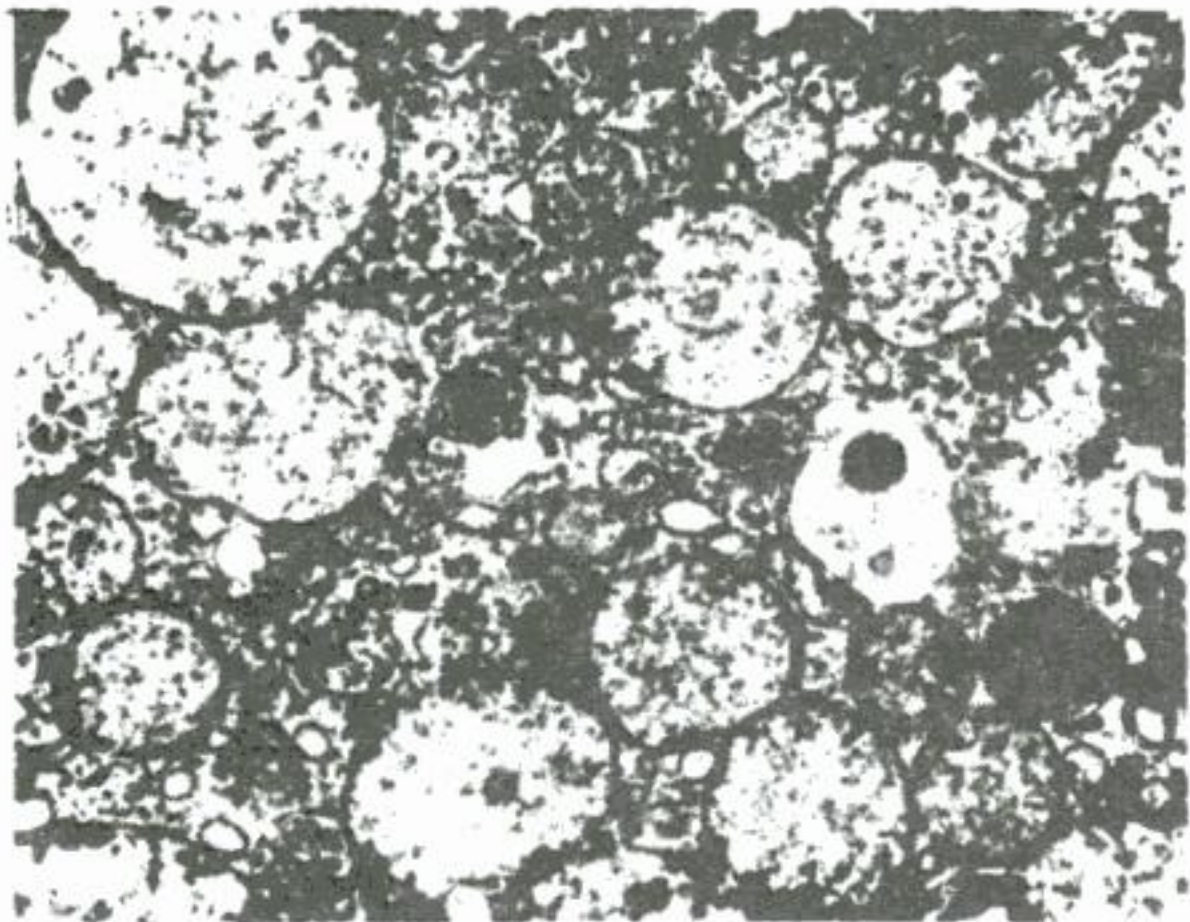


хондрий наблюдается фрагментация и лизис крист, определяются участки повреждения наружной митохондриальной мембраны, полное просветление матрикса этих органелл. Вблизи поврежденных лизосом выявляются зоны разрежения и лизиса элементов эргастоплазмы. Плазмолемма таких гепатоцитов местами повреждена, “перфорирована” и нечетко выражена. Обнаруживаются участки мультивезикуляции поврежденной плазмолеммы. В набухших ядрах существенно уменьшается содержание хроматина, наблюдается фрагментация ядрышка. Небольшое количество гранул гликогена определяется в области перикариона.

Результаты проведенного морфометрического анализа свидетельствуют о том, что постперфузионное диспергирование печени свиней с целью получения суспензии изолированных гепатоцитов, во-первых, не изменяет количественное соотношение двух групп гепатоцитов (70:30%), во-вторых, существенно не влияет на ультраструктуру эргастоплазмы изолированных паренхиматозных клеток печени.

После криоконсервирования и последующего оттаивания (37°C) в суспензии изолированных гепатоцитов также определяются две разновидности клеток. Первая, довольно представительная группа гепатоцитов, в цитоплазме которых выявляются незначительные повреждения субклеточных структур. Клетки преимущественно овальной формы. На поверхности таких гепатоцитов определяются единичные локальные участки мультивезикуляции плазмолеммы. В цитоплазме клеток выявляются три вида митохондрий: набухшие умеренно вакуолизированные органеллы с единичными фрагментированными кристами и неравномерно просветленным матриксом, темные митохондрии округлой формы с небольшим количеством коротких крист и мелкозернистым гомогенным матриксом, гиперосмированные органеллы небольших размеров, округлой формы с плотно упакованными кристами и локальными участками просветления матрикса (рис. 7). Элементы гладкой эндоплазматической сети представлены множеством мелких везикул без признаков набухания и повреждения. Цистерны гранулярной эндоплазматической сети фрагментированы, неравномерно расширены. На их внешней боковой поверхности определяются в небольшом количестве прикреп-

Рис. 6. Ультраструктура изолированных гепатоцитов свиней. В цитоплазме клеток наблюдается тотальное набухание митохондрий и везикуляция элементов гладкой эндоплазматической сети. x10000



ленные рибосомы. Ядра в цитоплазме клеток умеренно набухшие, округлой формы, с четко выраженной ядерной оболочкой, в которой выявляются отдельные повреждения в виде единичных локальных разрывов наружной ядерной мембраны. Лизосомы небольших размеров, округлой формы, с гомогенным электронно-плотным содержимым без признаков повреждения лизосомальной мембраны. Гранулы гликогена в небольшом количестве диффузно распределены по всему объему клеток.

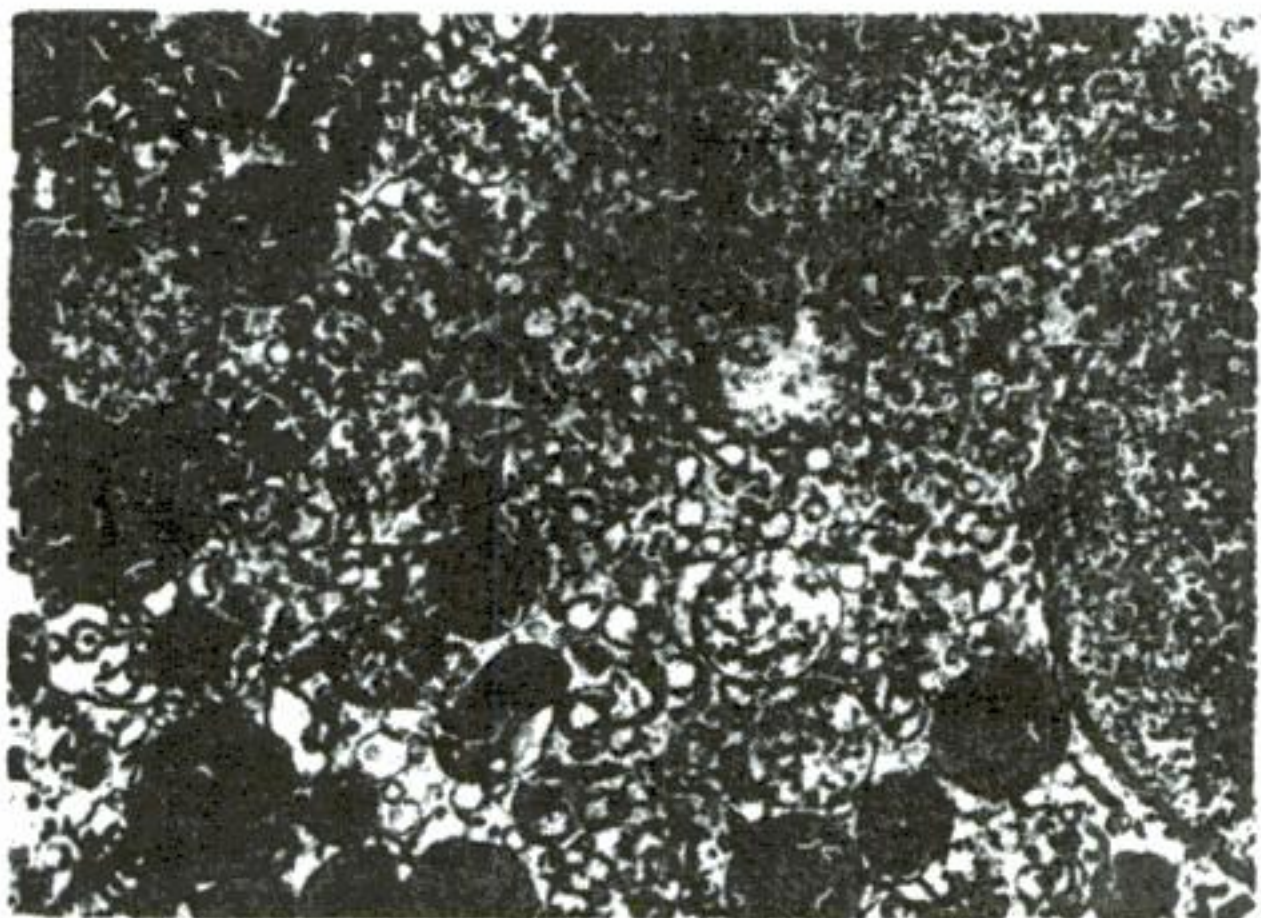
В целом, ультраструктура криоконсервированных гепатоцитов мало отличается от таковой, характерной для клеток печени первой группы из суспензии изолированных гепатоцитов. Вторая группа клеток — изолированные гепатоциты преимущественно округлой формы с морфологическими признаками тотальной везикуляции элементов эргастоплазмы (рис. 8). На поверхности таких клеток определяются обширные участки повреждений в виде разрывов, десквамации и мультивезикуляции плазмолеммы. Многочисленные митохондрии округлой формы, умеренно вакуолизированы и содержат единичные короткие фрагментированные кристы. Матрикс органелл просветлен, в нем определяются в небольшом количестве мелкодисперсные и хлопьевидные образования. В популяции митохондрий обнаруживаются отдельные частично или полностью разрушенные органеллы. Ядра в цитоплазме изолированных гепатоцитов светлые и содержат небольшое количество мелкодисперсного эухроматина, который диффузно распределен в объеме кариоплазмы. Кариотека местами повреждена, определяются локальные участки разрыва и отслоения наружной ядерной мембраны. Гладкая эндоплазматическая сеть представлена множеством округлых светлых везикул, внутри которых иногда выявляются в небольшом количестве нитчатые структуры и хлопьевидные массы. Элементы гранулярной эндоплазматической сети расположены преимущественно в зонах скопления митохондрий и в виде уплощенных канальцев оплетают эти органеллы. В просветленной везикулярной эргастоплазме четко контурируются плотные осмиефильные небольших размеров первичные лизосомы без видимых признаков повреждения плазматической мембра-

ны. В области расположения ядра выявляются в небольшом количестве гранулы гликогена и мелкие липидные включения.

Проведенный морфометрический анализ позволил установить, что после криоконсервирования—оттаивания на долю светлых гепатоцитов с признаками умеренной тотальной везикуляции элементов эргастоплазмы приходится до 50% от всего количества изолированных клеток и 50% составляют гепатоциты, в цитоплазме которых определяется небольшое количество умеренно поврежденных субклеточных структур. Таким образом, последовательные этапы криоконсервирования существенно изменяют ультраструктуру гепатоцитов свиней.

Перфузия печени приводит к появлению в паренхиме органа до 30% гепатоцитов с признаками умеренных дистрофических изменений эле-

Рис. 7. Ультраструктура изолированных гепатоцитов свиней после замораживания—оттаивания. В цитоплазме клетки выявляются три вида митохондрий: мелкие гиперосмированные, темные округлые органеллы с короткими кристами и вакуолизированные светлые органеллы. $\times 8000$



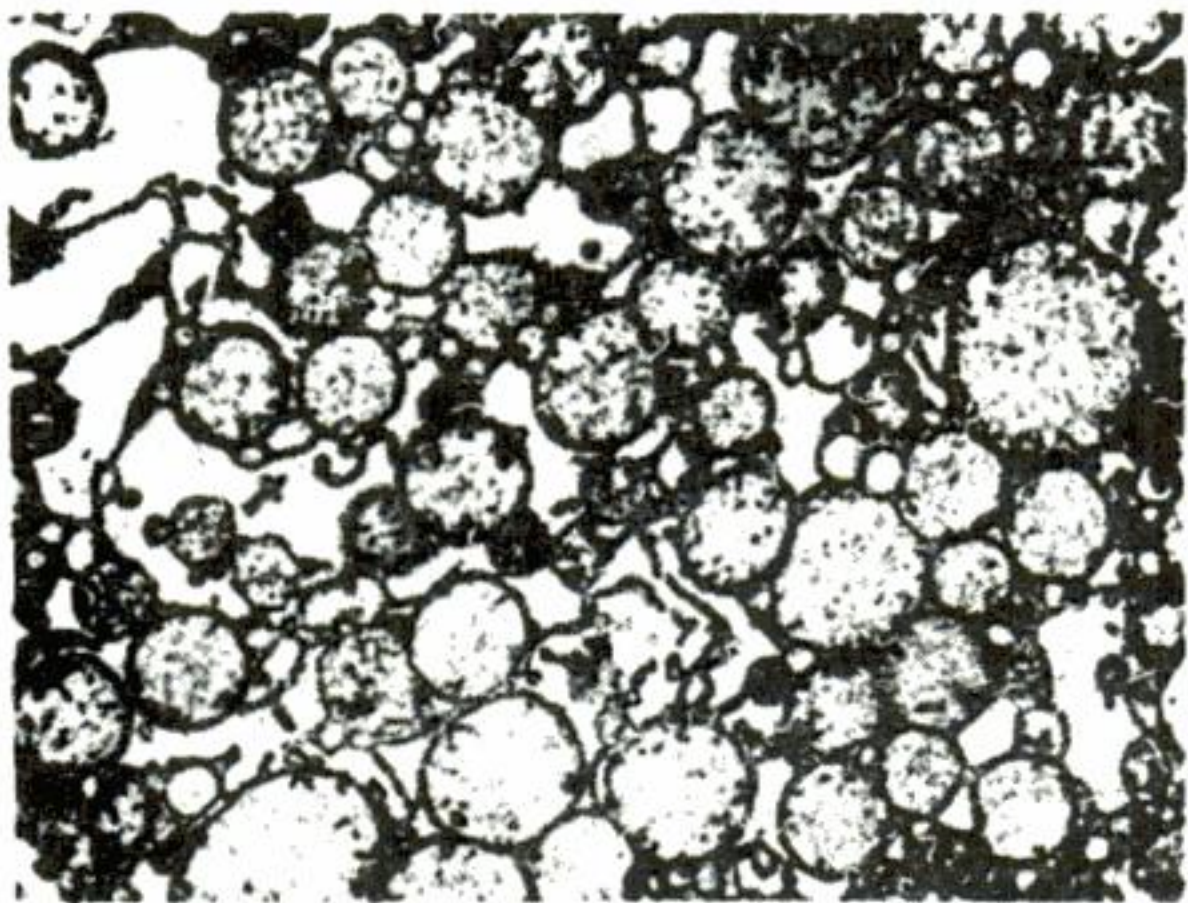
ментов эргастоплазмы. При этом дистрофическим изменениям подвергаются преимущественно светлые гепатоциты в цитоплазме которых уже в норме выявлены участки внутриклеточного отека, набухание митохондрий, разрыхление и локальный лизис эргастоплазмы.

Дезагрегация печени и последующее получение изолированных гепатоцитов приводят к развитию более выраженных структурных изменений эргастоплазмы во всех клетках. Однако количественное соотношение двух основных групп гепатоцитов, четко различающихся по степени выраженности изменений ультраструктуры органелл, остается неизменным и составляет 70:30%.

Замораживание—оттаивание вызывает существенное увеличение в суспензии гепатоцитов объемной доли поврежденных клеток с 30 до 50%. Вероятно, этот прирост происходит за счет того количества промежуточных по оптической плотности гепатоцитов, которые подвергаются в процессе замораживания—оттаивания определенным деструктивным изменениям. В норме объемная доля таких клеток составляет 20%.

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что на этапах криоконсервирования наименее выраженным структурным изменениям подвергаются темные умеренно обезвоженные гепатоциты, объемная доля которых в паренхиме печени животных составляет 50%.

Рис. 8. Ультраструктура изолированных гепатоцитов свиней после замораживания-оттаивания. В цитоплазме клеток определяется тотальное набухание митохондрий и везикуляция элементов гладкой эндоплазматической сети. $\times 8000$



Следовательно, умеренная дегидратация гепатоцитов способствует повышению устойчивости этих клеток к воздействию различных этапов криоконсервирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андриенко А.Н., Кравченко Л.П., Семенченко О.А. Длительное хранение изолированных гепатоцитов в условиях глубокой гипотермии: биохимические исследования // Патофизиологические аспекты действия холода на организм. – Харьков, 1989. – С. 3–8.
2. Говоруха Т.П., Жуликова Е.П., Юрченко Т.Н. Влияние длительной гипотермии на структурно-метаболические показатели клеток печени // Патофизиологические аспекты действия холода на организм. – Харьков, 1989. – С. 27–31.
3. Зимина Л.Н., Суббота Н.П. Структурное состояние гепатоцитов трупной печени человека на этапах гипотермического хранения // Патофизиологические аспекты действия холода на организм. – Харьков, 1989. – С. 45–49.
4. Маргулис М.С., Ерухимов Е.А., Андрейман Л.А. и др. Гемоперфузия через взвесь живых донорских гепатоцитов при лечении тяжелой печеночной недостаточности // Хирургия. – 1987. – N 12. – С. 107–110.
5. Мишин В.М., Ляхович В.В. Множественные формы цитохрома Р-450. – Новосибирск: Наука, 1985. – 181 с.
6. Розен В.Б., Матарадзе Г.Д., Смирнова О.В., Смирнов А.Н. Половая дифференцировка функций печени. – М.: Медицина, 1991. – 336 с.
7. Сандомирский Б.П., Загоруйко Г.Е., Панков Е.Я., Тарасов В.Ф. Структурные проявления деинтоксикационной способности криоконсервированных клеток паренхиматозного компонента печени // Науч.-практ. конф. "Структурно-функциональные единицы и их компоненты в органах висцеральных систем в норме и патологии": Тез. докл., Харьков, ХОП ВНМО, 1991. – С. 229–231.
8. Суббота Н.П. Влияние замораживания на детоксикационную активность аллогенных гепатоцитов // Влияние охлаждения на биологические объекты. – Харьков, 1990. – С. 149–154.
9. Штрауб Р., Болис Л. Рецепторы мембран для лекарств и гормонов. Междисциплинарный подход: Пер. с англ. / Под ред. Р.Штрауб, Л.Болис. – М.: Медицина, 1983. – С. 10–32; 133–141; 262–278.
10. Шумаков В.И., Арзуманов В.С., Онищенко Н.А. и др. Лечение тяжелой печеночной недостаточности перфузией крови больных через взвесь криоконсервированных гепатоцитов // Хирургия. – 1990. – N 2. – С. 113–116.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины
АН Украины, г. Харьков;
НИИ биологии при ХГУ

Поступила 03.03.92

Г.Е.ЗАГОРУЙКО, Б.П.САНДОМИРСЬКИЙ, В.Ф.ТАРАСОВ

ОСОБЛИВОСТІ УЛЬТРАСТРУКТУРИ ГЕПАТОЦИТІВ СВИНЕЙ НА ЕТАПАХ ЇХ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м. Харків

Проведено світлооптичне, електронно-мікроскопічне і морфометричне дослідження динаміки структурної організації гепатоцитів на етапах їх кріоконсервування. Встановлено, що у нормі в паренхімі печінки свиней виявляються темні помірно обезвожені гепатоцити, світлі гепатоцити з ознаками поміркованих дистрофічних змін ергастоплазми і проміжні по оптичній щільності паренхіматозні клітини у процентному відношенні 50:20:30. Перфузія печінки викликає посилення дистрофічних змін у світлих гепатоцитах (30%). Після диспергації печінки в суспензії ізольованих гепатоцитів співвідношення двох основних субпопуляцій клітин, які чітко розрізняються по мірі вираженості змін ультраструктури органел, залишається незмінним і складає 70:30%. Заморожування-відтаювання викликає збільшення в суспензії гепатоцитів об'ємної долі пошкоджених клітин з 30 до 50%. Зроблено висновок про те, що на етапах кріоконсервування найменш вираженим структурним змінам піддаються темні помірно обезвожені гепатоцити, об'ємна частина котрих у паренхімі печінки тварин склала 50%. Тобто помірна дегідратація гепатоцитів сприяє підвищенню стійкості цих клітин до впливу різних етапів кріоконсервування.

G.E.ZAGORUYKO, B.P.SANDOMIRSKY, V.F.TARASOV

ULTRASTRUCTURAL PECULIARITIES IN PORK HEPATOCYTES AT DIFFERENT STAGES OF CRYOPRESERVATION

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

Research Institute for Biology at the State University of Kharkov

The dynamics of structural arrangement of hepatocytes at different stages of cryopreservation was studied using the light microscopic, electron-microscopic and morphometric methods. It has been found that moderately dehydrated dark hepatocytes, light hepatocytes with signs of mild dystrophic changes in ergastoplasm, and parenchymatous cells intermediate by optical density are normally found in pork liver parenchyma with the percentage ratio of (50:20:30)%, respectively. Perfusion of the liver promoted dystrophic changes in light hepatocytes (30%). After dispersion of the liver in suspension of isolated hepatocytes, the (70:30)% ratio of two main subpopulations with different ultrastructural impairments remained unchanged. Freeze-thawing increased the volume fraction of damaged cells in the hepatocyte suspension from 30 to 50%. It has been concluded that lesser structural alterations occur in moderately dehydrated *dark* hepatocytes whose volume fraction in the liver of animals is 50%. Hence the moderate dehydration of hepatocytes increases their resistance to the effect of cryopreservation at different stages.

А.Ю.Петренко, А.Д.Росляков**Окисление экзогенного NADH свежевыделенными и замороженно-отогретыми гепатоцитами**

Экзогенный NADH не проникает в свежевыделенные гепатоциты, но окисляется после повреждения плазматической мембраны с помощью дигитонина. Отмывка цитоплазматических ферментов, участвующих в переносе NADH в митохондрии, предотвращает окисление NADH. Замораживание-отогрев приводит к окислению NADH в дыхательной цепи митохондрий. Потребление кислорода в этом случае не предотвращается отмывкой клеток, но полностью ингибируется пируватом. Угнетение потребления кислорода в присутствии пирувата обусловлено быстрым окислением NADH лактатдегидрогеназой (ЛДГ). Трехкратная промывка гепатоцитов не снимает, но уменьшает активность ЛДГ до уровня, сравнимого с дыхательной цепью митохондрий. Результаты показывают, что замороженно-отогретые клетки могут использоваться в качестве модели для изучения взаимодействия цитоплазматических и митохондриальных ферментных систем.

Известно, что в клетках животных цитоплазматический NADH окисляется в дыхательной цепи митохондрий [9]. Митохондриальные и цитоплазматические компартменты имеют несмешиваемые пулы пиридиновых нуклеотидов. При этом восстановительные эквиваленты проникают в митохондрии с помощью различных челночных систем [4, 10], которые окисляют цитоплазматический NADH и переносят восстановительные эквиваленты в виде субстратов в дыхательную цепь. В связи с отсутствием переносчиков пиридиновых нуклеотидов в биологических мембранах изучать распределение восстановительных эквивалентов между цитоплазмой и митохондриями затруднительно.

Установлено, что быстрое замораживание-отогрев суспензии клеток и субклеточных структур без применения криопротекторов вызывает нарушение барьерных свойств биологических мембран, слабо влияя на активность ферментов [1]. В связи с этим возникает возможность изучения взаимодействия цитоплазматических и митохондриальных систем в условиях, при которых барьер проницаемости плазматических и субклеточных мембран для ионов и метаболитов отсутствует. Интерес также представляет сравнение данных, полученных на замороженно-отогретых и пермеабиллизированных клетках, с учетом того, что в последних целостность плазматических мембран нарушена, а внутриклеточных сохранена [7].

В настоящей работе исследовали окисление экзогенного NADH в интактных, пермеабиллизированных и замороженно-отогретых гепатоцитах крыс. Гепатоциты выделяли из крыс линии Вистар массой 200–250 г. Для этого брюшную полость анестезированного тиопенталом животного вскрывали, вводили канюлю в воротную вену и закрепляли ее лигатурой. После начала перфузии верхнюю полую вену надсекали для оттока раствора. Перфузию проводили средой, содержащей 140 мМ NaCl, 6 мМ KCl, 3 мМ NaHCO₃, 2 мМ ЭДТА, 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4, при 37 °C в течение 25–30 мин со скоростью 50 мл/мин в атмосфере воздуха. После окончания перфузии печень извлекали из брюшной полости, помещали в среду диспергирования, содержащую 250 мМ сахарозы, 5 мМ KCl, 2 мМ K₂HPO₄, 0,8 мМ MgCl₂, 1,2 мМ CaCl₂, 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4, 1% бычьего сывороточного альбумина, измельчали ножницами на кусочки

Рис. 1. Потребление кислорода интактными (а, б) и замороженно-отогретыми гепатоцитами (Гц) до (в, г) и после (д, е) промывки



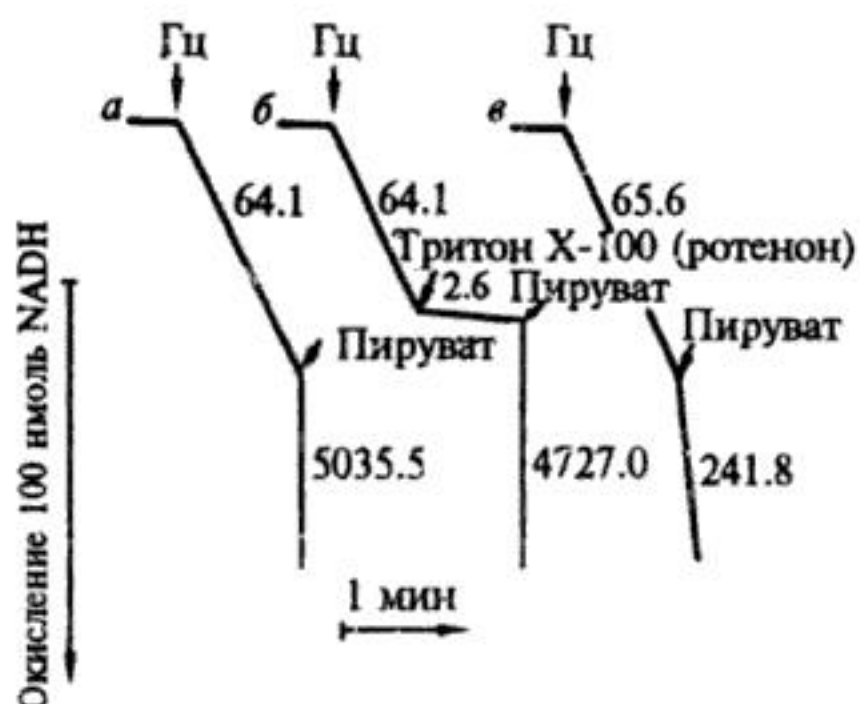
величиной 2–3 мм и подвергали вибрации, как было описано ранее [2]. Полученную суспензию фильтровали и центрифугировали при 100 g в течение 4 мин. Осадок клеток промывали в среде диспергирования.

Дыхательную активность гепатоцитов определяли полярографически с помощью закрытого электрода Кларка в ячейке объемом 1 мл при 37 °C в среде Дюльбекко (“Серва”, Германия). Концентрация клеток в ячейке составляла 2 млн. После регистрации эндогенного дыхания в течение 3–5 мин в среду вносили добавки в следующих концентрациях: NADH – 0,6 мМ, сукцинат – 2 мМ, пируват – 2 мМ, дигитонин – 20 мкг/млн клеток, ротенон – 2 мкМ, дыхательную активность выражали в нмолях O₂/мин/млн клеток. Окисление NADH регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм. В кювету, содержащую 2 мл среды Дюльбекко, вносили гепатоциты (1 млн/мл) и 0,3 мМ NADH. Остальные добавки использовали в концентрациях, указанных выше. Скорость окисления выражали в нмолях NADH/мин/млн клеток. Содержание лактата и пирувата в нейтрализованных хлорных экстрактах клеток определяли спектрофотометрически [6]. Жизнеспособность определяли по прокрашиванию клеток 0,3%-м раствором трипанового синего. Подсчет клеток проводили в камере Горяева.

Жизнеспособность свежевыделенных гепатоцитов, оцененная по окрашиванию, трипановым синим, составляла более 80%. Экзогенный сукцинат, слабо проникающий через плазматическую мембрану [11], не более чем на 30% увеличивал скорость потребления кислорода, которая составляла (11,7 ± 0,4) нмоля O₂/мин/млн клеток. NADH также слабо (10–15%) стимулировал эндогенное дыхание, а ротенон ингибировал его на 50% (рис. 1, а). Эти данные согласуются с результатами работ, выполненных на гепатоцитах, выделенных традиционным методом (с использованием коллагеназы) [11, 12], и свидетельствуют об интактности и метаболической активности используемых клеток.

Повреждение плазматической мембраны с помощью дигитонина приводило к снижению скорости дыхания на 70% вследствие высвобождения части цитоплазматических субстратов и ферментов (рис. 1, б). Это дыхание слабо ингибировалось ротеноном. Добавка NADH в 4 раза увеличивала потребление кислорода, а после его исчерпания дыхательная активность была значительно выше, чем до внесения NADH. Ротенон ингибировал потребление кислорода как в присутствии NADH, так и

Рис. 2. Окисление NADH в замороженно-отогретых гепатоцитах до (а, б) и после (в) промывки



после его исчерпания до уровня дыхания в присутствии дигитонина. Промывка пермеабилizированных клеток предотвращала окисление NADH.

Замораживание-отогрев intactных гепатоцитов в среде без криопротекторов (как и обработка дигитонином) приводила к прокрашиванию трипановым синим ядра и цитоплазмы всех клеток. При этом скорость дыхания снижалась до уровня пермеабилizированных клеток. Экзогенный NADH в 20 раз стимулировал потребление кислорода, скорость которого была значительно выше скорости эндогенного дыхания intactных клеток, а также пермеабилizированных в присутствии NADH (рис. 1, б–д). Дыхательная активность практически полностью подавлялась ротеноном, а также пируватом. Сукцинат, добавленный после ротенона или пирувата усиливает дыхание, что свидетельствует о сохранении активности дыхательной цепи в условиях эксперимента. Трехкратная промывка замороженно-отогретых клеток приводила к полному угнетению эндогенного дыхания, но не влияла на NADH-стимулируемое потребление кислорода, а также действие ротенона (рис. 1, д, е). Добавка пирувата не ингибировала скорость дыхания в присутствии NADH, но снижала количество кислорода, которое расходуется на его утилизацию. Спектрофотометрическая регистрация показала, что после замораживания-отогрева экзогенный NADH окислялся со скоростью $(64,1 \pm 5,8)$ нмоль NADH/мин/млн клеток (рис. 2 а, б). Скорость его окисления полностью подавлялась ротеноном или детергентом тритоном X = 100 (в конечной концентрации 0.1%). Пируват, добавленный в кювету, до промывки клеток увеличивал окисление NADH в 100 раз, а после промывки — в 3.5 раза (рис. 2, в). Содержание лактата и пирувата в гепатоцитах составляло $(485,0 \pm 52,1)$ и $(61,2 \pm 7,3)$ нмоль/млн клеток соответственно и не изменялось после замораживания-отогрева. Добавка пирувата к гепатоцитам, окисляющим NADH, как до, так и после промывки приводила к накоплению лактата.

Изучение конкуренции между митохондриальными и цитоплазматическими ферментными системами за NADH сопряжено с рядом трудностей. Intactные клетки непроницаемы для пиридиновых нуклеотидов [2]. Поэтому слабая стимуляция дыхания в присутствии экзогенного NADH связана с присутствием поврежденных клеток в свежесодержимой суспензии. После пермеабилizации плазматической мембраны дигитонином NADH окисляется в митохондриях, так как потребление кислорода подавляется ротеноном. При этом барьерные свойства внутренней мембраны митохондрий для пиридиновых нуклеотидов сохраняются, а NADH транспортируется с помощью челночных переносчиков [4,

10]. Это подтверждают данные о том, что отмывка субстратов и ферментов, участвующих в переносе NADH в митохондриях, предотвращает потребление кислорода. Увеличить проницаемость внутренней мембраны митохондрий для пиридиновых нуклеотидов, сохранив при этом активность дыхательной цепи, можно обработкой ультразвуком [8]. Однако это приводит к переориентации мембраны и не может быть использовано в условиях клеток. Применение детергентов вызывает растворение мембраны и потерю кооперативности действия ферментов, участвующих в окислении NADH. Другая возможность – это инкубация митохондрий в гипотонических условиях [9], при которых стимулируется окисление NADH в присутствии экзогенного цитохрома C. Однако этот подход подвергся критике в работе [5], где было показано, что гипотония вызывает не столько изменение проницаемости внутренней мембраны для NADH, сколько внешней для цитохрома C, который стимулирует окисление NADH по антимицин А-нечувствительному пути.

Результаты работы свидетельствуют о том, что замораживание–отогрев интактных клеток приводит к снятию барьера для NADH как плазматической, так и внутренней митохондриальной мембран, сохраняя при этом активность дыхательной системы. Действительно, высокая скорость потребления кислорода в присутствии NADH полностью ингибируется ротеноном, но не угнетается после отмывки компонентов челночных систем переноса пиридиновых нуклеотидов в митохондриях. Использование быстрого замораживания–быстрого отогрева для снятия барьерных свойств мембран обладает рядом преимуществ. Во-первых, его действие высокоспецифично, так как кристаллы льда, образующиеся при охлаждении, повреждают почти исключительно биологические мембраны [1]. Во-вторых, после замораживания–отогрева клетка сохраняет морфологическую целостность и в значительной степени внутриклеточную организацию. В-третьих, процедура замораживания–отогрева проста и легко воспроизводима. В настоящей работе на модели замороженно–отогретых гепатоцитов исследовали взаимодействие между лактатдегидрогеназой (ЛДГ) и дыхательной цепью митохондрий в присутствии экзогенного NADH. После замораживания–отогрева NADH окисляется исключительно в митохондриях, так как ротенон полностью подавляет этот процесс. После исчерпания NADH скорость дыхания значительно выше, чем до его добавки. Это, очевидно, связано с окислением в дыхательной цепи субстратов, восстановленных в присутствии NADH. В пользу этого предположения свидетельствуют данные об угнетении этого прироста дыхания ротеноном, а также его полное предотвращение путем промывки гепатоцитов. Внесение пирувата приводит к столь быстрому окислению NADH, что потребление кислорода предотвращается практически сразу и полностью. Накопление лактата при этом свидетельствует о том, что окисление NADH происходит за счет ЛДГ. Активность ЛДГ более чем в 100 раз выше активности дыхательной цепи митохондрий, что и приводит к быстрой утилизации ЛДГ, но ее активность снижается в 20 раз. Можно предположить, что лактатдегидрогеназная активность, которая сохранилась после промывки клеток обусловлена работой фермента, локализованного внутри митохондрий [3]. При этом в присутствии пирувата дыхательная цепь выигрывает конкуренцию за NADH и окисляет его с максимальной скоростью, а митохондриальная ЛДГ «запасает» излишки NADH. Таким образом, приведенные данные

свидетельствуют о том, что быстрое замораживание – быстрый отогрев клеток в среде без криопротекторов вызывает глубокие изменения структуры мембран, результатом чего является перераспределение субстратов, кофакторов и ферментов между средой, цитоплазматическим и митохондриальным компартментами. Вместе с тем сохраняется активность не только растворимых ферментов (например, ЛДГ), но и сложных, высококоординированных мембранно-связанных систем, таких как митохондриальная дыхательная цепь. Эти данные позволяют рассматривать замораживание–отогрев в качестве одного из методических подходов для изучения взаимодействия цитоплазматических и митохондриальных ферментных систем в клетке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 256 с.
2. Петренко А.Ю., Гришук В.П., Сукач А.Н. и др. Энергетическое состояние гепатоцитов сытых крыс, выделенных с помощью ЭДТА и вибрации // Биохимия. – 1989. – 54, N 12. – С. 1952–1956.
3. Brandt R.B., Laux J.E., Spainhour S.E., Kline E.S. Lactate dehydrogenase in rat mitochondria // Arch. Biochem. Biophys. – 1987. – 259, N 2. – P. 412–422.
4. Dawson A.G. Oxidation of cytosolic NADH formed during aerobic metabolism in mammalian cells // TIBS. – 1979. – P. 171–175.
5. Ernster L., Bharai B.S., Nordenbrand K. Origin of phosphorylation coupled to the oxidation of extramitochondrial NADH // FEBS lett. – 132, N 1. – P. 6–9.
6. Gutmann I., Wahlefeld A.W. L-(+)-lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD // Methods of Enzymology Analyses / Bergmeyer H.U. ed., New York: Acad. Press, 1974. – P. 1464–1468.
7. Katz J., Wals P.A. Studies with digitonin-treated rat hepatocytes // J. Cell. Biochem. – 1985. – 28, N 3. – P. 207–228.
8. Lee C.P., Ernster L. Studies of the energy transfer system of submitochondrial particles // Eur. J. Biochem. – 1968. – 3, N 4. – P. 391–400.
9. Lehninger A.L. Phosphorylation coupled to oxidation of dihydrodiphosphopyridine nucleotide // J. Biol. Chem. – 1951. – 190, N 2. – P. 345–359.
10. Lopez-Aiarcon L., Eboli M.L. Oxidation of reduced cytosolic nicotinamide adenine dinucleotide by the malate-aspartate shuttle in the K-562 human leukemia cell line // Cancer Research. – 1986. – 46, N 11. – P. 5589–5591.
11. Mapes J.P., Harris R.A. On the oxidation of succinate by parenchymal cells isolated from rat liver // FEBS lett. – 1975. – 51, N 1. – P. 80–83.
12. Orrenius S., Jewell S.A., Thor H. et al. Drug-induced alteration in the surface morphology of isolated hepatocytes // Isolation, Characterization and Use of Hepatocytes / Harris R.A., Cornell N.W., eds, Elsevier Biomed., New York, Amsterdam, Oxford. – 1983. – P. 333–340.

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

Поступила 22.04.91

О.Ю.ПЕТРЕНКО, А.Д.РОСЛЯКОВ

ОКИСЛЕННЯ ЕКЗОГЕННОГО NADH СВІЖОВИДІЛЕНИМИ І ЗАМОРОЖЕНО-ВІДІГРІТИМИ ГЕПАТОЦИТАМИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Екзогенний NADH не проникає у свіжовиділені гепатоцити, але окислюється після пошкодження плазматичної мембрани за допомогою дігітоніна. Відмивання цитоплазматичних ферментів, які беруть участь у перенесенні NADH в мітохондрії запобігає окисленню NADH. Заморожування–відігрівання призводить до окислення NADH в дихальному ланцюгу мітохондрій. Споживання кисню в цьому випадку не запобігається відмиванням клітин, але повністю інгібується піруватом. Зменшене вживання кисню в присутності пірувата обумовлене швидким окислінням NADH лактатдегідрогеназою (ЛДГ). Триразове промивання гепатоцитів не знімає, а зменшує активність ЛДГ до рівня того ж, що і в ланцюзі мітохондрій. Результати показують, що заморожено-відігріті клітини можуть бути використані як модель для вивчення взаємодії цитоплазматичних і мітохондріальних ферментних систем.

•

A.YU.PETRENKO, A.D.ROSLYAKOV

OXIDATION OF EXOGENOUS NADH BY ISOLATED FRESH AND FROZEN-THAWED HEPATOCYTES

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

Exogenous NADH does not penetrate inside freshly isolated hepatocytes but it is oxidized after injury of plasma membrane by digitonin. Removal of cytoplasmic enzymes participating in the transport of NADH to mitochondria prevents the NADH oxidation. Freeze-rewarming results in NADH oxidation in the mitochondrial respiratory chain. The oxygen consumption in this case is not prevented by washing of cells but it is completely inhibited by pyruvate. The inhibition of oxygen consumption in the presence of pyruvate is due to rapid NADH oxidation with lactate dehydrogenase (LDH). Washing of hepatocytes by three times decreases the LDH activity to the level comparable to that of the mitochondrial respiratory chain. Our results indicated that frozen-rewarmed cells may be used as a model to study the interactions between plasma and mitochondrial membrane systems.

УДК 581.143.6:57.043

В.Д.Мануильский, А.М.Бондаренко, А.Н.Зубарь

КАЛЛУСООБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ НЕЗРЕЛЫХ ЭМБРИОНОВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ХРАНЕНИИ ИХ В УСЛОВИЯХ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

Показано, что незрелые эмбрионы пшеницы (НЭП) выдерживают замораживание до -196°C и при этом сохраняют способность к каллусообразованию, для чего они должны пройти этапы эквilibрации и криопротекции, а затем субнулевой дегидратации. Таким образом удается осуществить длительное хранение НЭП и решить проблему постоянного обеспечения материалом исследований, связанных с получением новых форм растений методами клеточной селекции.

При создании новых форм сельскохозяйственных растений методами клеточной селекции и биотехнологии встает проблема быстрого получения большого количества исходного материала (популяций культивируемых клеток). Возможным путем решения этой проблемы является использование культуры незрелых эмбрионов пшеницы, которые сейчас широко применяются в исследованиях, направленных на получение самоклональных форм пшеницы. Такие подходы связаны, в частности, с тем, что геном незрелых эмбрионов, в отличие от зрелых семян, очевидно, более лабилен и при действии мутагенных факторов позволяет значительно расширить спектр получаемых наследственно измененных форм растений, а также повысить в итоге эффективность их отбора [1, 2].

Основной сложностью работ, проводимых с эмбрионами, не завершившими свое развитие, является то, что в искусственных условиях хранения их клетки быстро теряют жизнеспособность и регенерационную функцию, а также переходят в состояние покоя.

Хранить незрелые эмбрионы в замороженном состоянии не удастся, поскольку они содержат до 50% слабосвязанной воды, которая при кристаллизации разрушает структурно-функциональную организацию меристем и резко снижает жизнеспособность тканей [5]. Другим важным аспектом проблемы является то, что в полевых условиях получение незрелых эмбрионов пшеницы в больших количествах ограничено сроками вегетационного периода развития растений, а в искусственных условиях

требуются значительные площади закрытого грунта. Целью работы, таким образом, являлась разработка подходов, позволяющих осуществить длительное хранение незрелых эмбрионов пшеницы с использованием методов подготовки тканей к криоконсервации и длительному хранению в условиях глубокого замораживания. Существующая по этим вопросам литература практически не рассматривает проблему длительного хранения незрелых эмбрионов. Описаны биотехнологические приемы, позволяющие хранить при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ семена, закончившие вегетацию [6, 7], либо меристематические ткани, изолированные из семян и побегов [10]. Предлагаемый нами подход с использованием глубокого замораживания для длительного хранения незрелых эмбрионов пшеницы имеет ряд преимуществ, поскольку позволяет исключить дозревание зародышей в процессе их хранения и культивирования, а также в любой момент в течение года использовать их в экспериментальной работе.

В экспериментах использовали семена озимой пшеницы сорта Харьковский II, которые на 16–20-е сут после самоопыления изолировались из растений, выращенных в полевых условиях. Из этих семян после стерилизации в лабораторных условиях извлекали эмбрионы [4]. Затем эмбрионы пшеницы помещали на разное время в растворы криопротектора ДМСО для установления оптимальных режимов криопротекции. Прошедшие эту процедуру зародыши подвергали пролонгированной дегидратации над CaCl_2 в эксикаторе, а затем замораживали до температуры жидкого азота $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Замораживание проводили со скоростью $280\text{--}300\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а отогрев – со скоростью $180\text{--}200\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Эмбрионы в процессе замораживания, отогрева и хранения в жидком азоте находились в пластмассовых ампулах объемом до 3 см^3 . Ампулы открывали только после полного отогрева эмбрионов. Культивирование зародышей после отогрева проводили на среде Гамборга В5. Каллусы получали в чашках Петри при температуре $(29 \pm 0,5)\text{ }^{\circ}\text{C}$. О выживании эмбрионов судили по их способности образовывать каллус. Экспериментальные данные обрабатывали статистически [8].

Наиболее эффективным периодом в онтогенезе пшеницы при выполнении работ по биотехнологии, в частности по регенерации соматоклонов из культивируемых клеток, является фаза, которую эмбрионы достигают к 14-му дню своего развития после самоопыления [3]. Каллусы, полученные из таких эмбрионов, обычно обладают наивысшей регенерационной способностью. Более молодые и более развитые эмбрионы формируют каллусы, из которых получение регенерантов представляет, как правило, значительную трудность. Поэтому первым этапом данной работы явилось изучение влияния фазы онтогенеза (количество дней после самоопыления) на выживаемость эмбрионов после воздействия на них криопротекторов. По существующей в настоящее время биотехнологии подготовка растительных объектов с высоким содержанием воды (имеются в виду меристемы побегов, апикальные ткани проростков) к глубокому замораживанию сопровождается обработкой тканей проникающими криопротекторами, позволяющими частично модифицировать компартмент слабосвязанной воды клетки [10]. В наших экспериментах наиболее эффективным оказался диметилсульфоксид (ДМСО), который проникая в ткани оказывал криозащитное действие. Однако сложность состоит в подборе оптимальных доз воздействий с учетом возраста незрелых эмбрионов. Как свидетельствуют данные, приве-

Т а б л и ц а 1
Жизнеспособность незрелых эмбрионов пшеницы сорта Харьковская II при их инкубации в водных растворах ДМСО, %

Варианты эксперимента	Количество суток после самоопыления				
	14	16	18	20	22
Контроль (без обработки)	82.6	86.4	88.1	85.9	84.3
Обработка ДМСО (0,3%-й раствор)	62.3	72.7	82.9	67.1	63.4
Обработка ДМСО (0,5%-й раствор)	54.7	62.0	67.4	60.2	56.7
Обработка ДМСО (0,7%-й раствор)	48.7	55.5	56.9	53.1	52.2

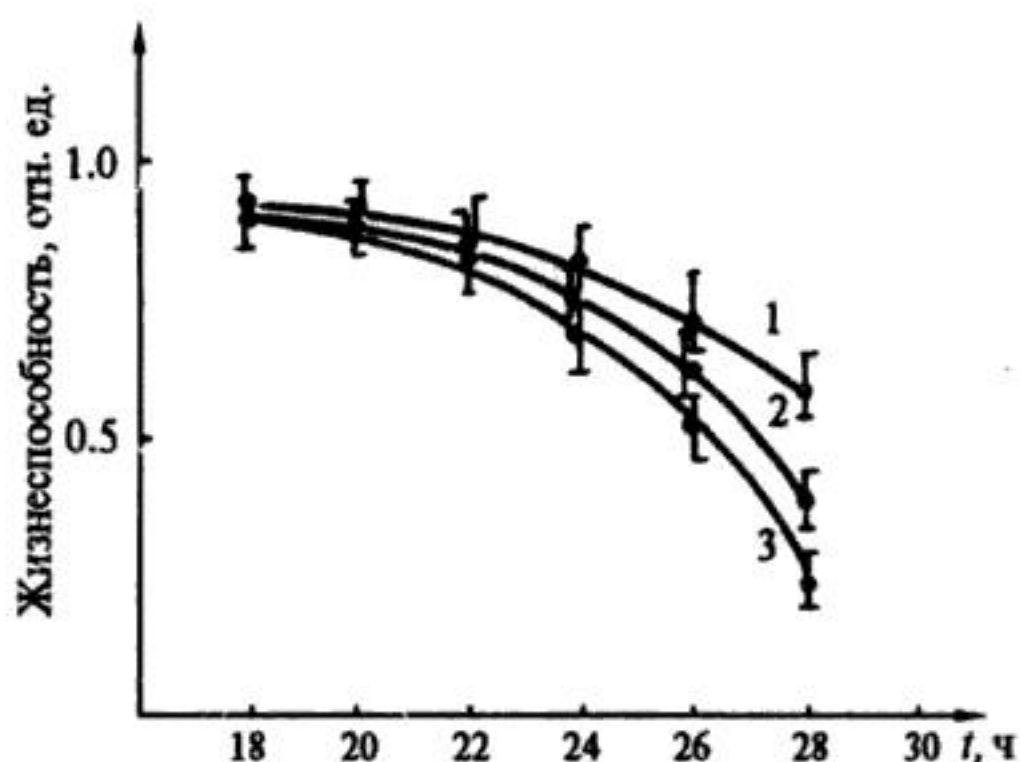
денные в табл. 1, оптимальным для обработки ДМСО оказался период через 16–20 сут после самоопыления. Этот оптимум, в принципе, совпадает с периодом онтогенеза эмбрионов, когда они обладают способностью формировать каллусы с высокой регенерационной способностью. В то же время следует отметить что обработка незрелых эмбрионов растворами ДМСО несколько снижала их регенерационную способность. Такое подавление на ранних этапах

развития происходило более интенсивно. Так, обработка 0,5%-м раствором ДМСО ингибировала каллусообразующую способность на 14-е сут после сомоопыления на 45,3%, в то время как в более поздние периоды развития каллус не образовывали только около 33% незрелых эмбрионов пшеницы. Существенное влияние на жизнеспособность эмбрионов пшеницы оказывала также продолжительность обработки тканей растворами ДМСО. Как показано на рисунке, эта зависимость, если принять количество образовавшихся каллусов без обработки за единицу, имела вид кривой с резким падением через 24 ч инкубации в криопротекторе. Некоторое возрастание образования каллусов из незрелых эмбрионов пшеницы при непродолжительных периодах инкубации может объясняться действием криопротектора как физиологически активного вещества [10].

Важным условием сохранения жизнеспособности семян с высоким содержанием воды при их глубоком замораживании является, наряду с обработкой криопротекторами, также и их дегидратация. В первую очередь это относится к семенам ортодоксального типа. Из литературы известно [9], что ткани зародыша семян, относящихся к рекальцитратному типу, только в отдельных случаях удается дегидратировать с сохранением их жизнеспособности. В этом случае достижение критической влажности осуществимо только на зрелых семенах при положительных температурах. В наших экспериментах аналогичные режимы дегидратации не-

Т а б л и ц а 2
Жизнеспособность незрелых эмбрионов пшеницы сорта Харьковская II через 18 сут после самоопыления и инкубации в 0,5%-м растворе ДМСО, %

Варианты эксперимента	Температура дегидратации, °С				
	-2	0	2	4	8
Контроль (без обработки)	63.9	84.1	88.0	88.1	74.3
Обработка 0,5%-м раствором ДМСО	44.1	61.4	67.4	67.5	51.3



Изменение жизнеспособности незрелых эмбрионов пшеницы на 14-е сут после самоопыления при их инкубации в различных по концентрации растворах ДМСО: 1 – 0,5%-ный, 2 – 1,0%-ный, 3 – 2,0%-ный

зрелых эмбрионов пшеницы при комнатной температуре приводили к существенному снижению образования каллусов. Поэтому проводилась пролонгированная субнулевая дегидратация зародышей после обработки криопротекторами в эксикаторе над CaCl_2 . Как свидетельствуют данные, приведенные в табл. 2, наиболее эффективными для такой дегидратации оказались температуры в интервале $4 - 2^\circ\text{C}$. Продолжительность дегидратации незрелых эмбрионов пшеницы на 16-е сут после самоопыления составила не более 3 сут. На скорость дегидратации в вакуум-эксикаторе с CaCl_2 оказывали влияние объем дегидратируемого материала, а также поглощающая способность хлористого кальция.

Оптимальным для дегидратации являлось помещение 10 г незрелых эмбрионов пшеницы в чашки Петри в один слой на высоте 3–4 см над поверхностью CaCl_2 . При больших объемах материала и многократно используемом хлористом кальции время дегидратации увеличивалось, что негативно сказывалось на формировании каллусов из незрелых эмбрионов.

Наилучшие результаты при глубоком замораживании и хранении в жидком азоте дегидратированных эмбрионов пшеницы были получены при их обработке до замораживания 0,5%-м раствором ДМСО. При этом после замораживания до -196°C и отогрева при 40°C каллусообразующую способность сохраняли от 58,3 до 62,4% эмбрионов. Изменения в режимах замораживания–отогрева, как правило, вызывали уменьшение количества морфогенных каллусов.

Предложенный способ длительного хранения незрелых эмбрионов пшеницы с сохранением их морфогенной способности в условиях глубокого замораживания позволяет расширить использование этих объектов при проведении исследований в области клеточной селекции и решить проблему постоянного обеспечения таких работ исходным материалом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко А.М., Зубарь А.Н., Вакула Т.М., Рожковский С.В. Биотехнологические методы в селекции растений // Генная и клеточная инженерия в решении фундаментальных проблем биотехнологии. – Тарту: 1989. – С. 141–144.
2. Бутенко Р.Г., Джардамалиев Ж.К., Гаврилова Н.Ф. Каллусообразующая способность эксплантатов из разных органов различных сортов озимой пшеницы // Физиология растений. – 1986. – 33, Вып. 2. – С. 350–355.
3. Гапоненко А.К., Голубева О.Н. Морфологические процессы в культуре соматических клеток пшеницы // Респ. конф. «Генная и зиготная селекция растений»: Материалы конф., Кишинев: Б.и., 1987. – С. 133–135.

4. Зубарь А.Н. Применение факторной оптимизации процесса стерилизации зрелых зерновок пшеницы, используемых для введения в культуру // Применение достижений биотехнологии в сельском хозяйстве: Тез. докл. – Уфа: Б. и., 1987. – С. 105–107.
5. Мануильский В.Д. Принципы стабилизации растительных мембран при формировании состояния криорезистентности // Физиол. и биохимия культ. растений. – 1990. – 22, N 4. – С. 315–326.
6. Писов А.С. Сохранение семян и меристем высших растений с помощью глубокого замораживания. – Пушкино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1982. – 14 с.
7. Хоромайлов Н.Г. Национальное хранилище семян мировых растительных ресурсов на Кубани // Бюл. ВИР. – 1978. – 77. – С. 3–9
8. Урбах В.Ю. Биометрические методы. – М: Наука, 1964. – 415 с.
9. Pritchard, H.W., Prendergast, F.G. Effect of desiccation and cryopreservation on the in vitro viability of embryos of the recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* K. // J. Exp. Bot. – 1986. – 37, N 182. – P. 1388–1397.
10. Withers, L.A. Tissue culture storage for genetic conservation // IBPGR Secretariat. – Rome, 1980. – P. 91.

Ин-т физиологии растений и генетики
АН Украины, г. Киев

Поступила 20.02.91

В.Д.МАНУІЛЬСЬКИЙ, А.М.БОНДАРЕНКО, А.Н.ЗУБАР

КАЛЛУСОУТВОРЮЮЧА ЗДАТНІСТЬ НЕДОЗРІЛИХ ЕМБРІОНІВ ПШЕНИЦІ ПРИ ЗБЕРІГАННІ ЇХ В УМОВАХ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Інститут фізіології рослин і генетики АН України, м. Київ

Показано, що незрілі ембріони пшениці (НЕП) витримують замороження до -196°C і при цьому зберігають здатність до каллусоутворення, для чого вони мають пройти етапи еквілібрації і криопротекції, після того – субнульової дегідратації. Таким чином вдається здійснити тривале збереження НЕП і вирішити проблему постійного забезпечення матеріалом досліджень, пов'язаних з одержанням нових форм рослин методами клітинної селекції.

V.D.MANUILSKY, A.M.BONDARENKO, A.N.ZUBAR

THE CALLUS-FORMING ABILITY OF IMMATURE WHEAT EMBRYOS DURING STORAGE AT LOW TEMPERATURES

Institute for Plant Physiology and Genetics of the Ukrainian Academy of Sciences, Kiev

Immature wheat embryos (IWE) have been shown to withstand freezing to -196°C and to maintain the callus-forming ability. For this aim they should be subjected to equilibration and cryoprotection and then to dehydration at subzero temperatures. This allows to store IWE for a long time thus solving the problem of continuous supply of materials for studies associated with production of new plant forms by cell selection.

Г.В.Погорелова, Г.Ф.Жегунов

**ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ЗИМНЕЙ
СПЯЧКИ У СУСЛИКОВ *Citellus undulatus***

Изучали кинетику функционирования лактатдегидрогеназы (ЛДГ КФ 1.1.1.27) в печени миокарда и скелетных мышцах спящих, пробуждающихся и активных сусликов (*Citellus undulatus*). Показано, что у гибернирующих сусликов общая активность ЛДГ выше, чем при пробуждении и в активном состоянии, что коррелирует с изменением кинетических констант фермента. Во всех тканях изучаемых животных наблюдалась высокая термоустойчивость фермента.

Зимоспящие животные обладают способностью в течение нескольких часов повышать или понижать температуру своего тела на 30–35 °С [5, 13]. Каким же образом модифицируется структура и функция клеток зимоспящих животных, обеспечивая адекватное функционирование органов и тканей при низких и при высоких температурах? Считается, что одним из основных механизмов приспособления метаболических систем является модификация структуры и функции протеинов, особенно ферментов [4, 5, 7, 8, 12]. Ранее при изучении сезонных изменений было показано, что у гибернирующих животных наблюдаются отличия в функционировании ферментов в зависимости от времени года. В частности, в работах [9, 10] обнаружено, что кинетические свойства пируваткиназы существенно различаются у гибернирующих зимних и активных сусликов. В обоих исследованиях показаны изменения температурной зависимости K_m ферментов, смещение и изменения наклона кривых активности на графиках Аррениуса и изменение чувствительности энзимов к различным аллостерическим эффекторам, а также особенности изоферментного спектра пируваткиназы. Однако отсутствуют данные о возможности изменения кинетических свойств ферментов гликолиза в течение одного баута. Отсутствуют также данные о возможности появления на разных этапах зимней спячки специфических изоформ ферментов, способных модифицировать метаболизм клеток. В связи с особенностями протекания гликолиза в аэробных и анаэробных условиях на разных этапах зимней спячки [11], а также учитывая функциональные особенности различных органов, изучали кинетику функционирования ЛДГ в скелетных мышцах, миокарде и печени.

Опыты проведены на длиннохвостых сусликах (*Citellus undulatus*) (зимоспящие животные) и морских свинок (незимоспящие млекопитающие). Суслики содержались в условиях холодной камеры при температуре окружающей среды 2–4 °С. Исследовали следующие группы животных: 1 – суслики в состоянии спячки, температура тела 2–5 °С, 2 – суслики на стадии пробуждения, при этом температура тела повышалась за 5 ч от 2–5 до 35–36 °С, 3 – суслики активные, бодрствующие между баутами, температура тела — 38 °С. Активность ЛДГ изучали в препаратах из печени, миокарда и мышц передних конечностей. Кусочки ткани массой 50 мг гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 2.5 мл раствора: NaCl 50 мМ, L-гистидин 20 мМ, сахароза 250 мМ, pH 7.0, и путем центрифугирования при 50 000 g в течение 60 мин получали цитозольную

фракцию клеток, в которой и изучали активность фермента. Скорость реакции определяли на спектрофотометре Уникам SP 8000 в инкубационной среде следующего состава: трис-HCl буфер 0.05 М, рН 7.4; NADH 1×10^{-4} М. В качестве субстрата использовали пируват натрия, концентрацию которого варьировали для построения зависимости скорости реакции от концентрации субстрата от 1.5×10^{-6} М до 3×10^{-3} М. K_M вычисляли на основе экспериментальных данных по зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, строя указанную зависимость по Лайнуиверу–Берку и выражая K_M в мМ. При исследовании температурной зависимости функционирования ЛДГ общую активность определяли в диапазоне температур от 5 до 38 °С при насыщающих концентрациях субстрата. По полученным кривым строили зависимость скорости реакции от температуры и вычисляли температурный коэффициент Q_{10} , а также строили график Аррениуса и рассчитывали значение энергии активации E_a по формуле:

$$E_a = 2.3 R \frac{\lg V_1 - \lg V_2}{1/T_1 - 1/T_2},$$

где R – универсальная газовая постоянная, $\lg V_1$ и T_1 – координаты произвольно выбранной точки 1, $\lg V_2$ и T_2 – координаты произвольно выбранной точки 2. Концентрацию белка определяли по методу Лоури

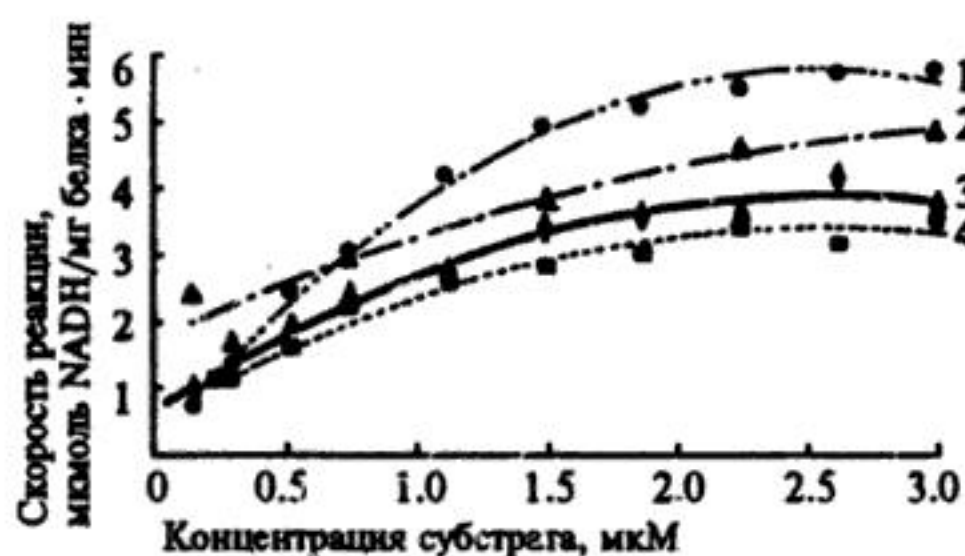


Рис. 1. Активность лактатдегидрогеназы скелетных мышц сусликов и морских свинок в зависимости от концентрации субстрата: 1 – морские свинки, 2 – гибернирующие суслики, 3 – активные суслики, 4 – пробуждающиеся суслики

[1]. Полученные результаты обрабатывались статистически [2, 3].

Показано, что наиболее высокой активностью в мышечной ткани обладает фермент морских свинок по сравнению с гибернаторами (рис. 1). Это отличие обусловлено тем, что фермент мышечной ткани

Т а б л и ц а 1
Кинетические характеристики функционирования ЛДГ в скелетных мышцах сусликов по сравнению с таковыми у морских свинок

Состояние животных	Константа Михаэлиса K_M , мМ	Энергия активации E_a кал	Температурный коэффициент Q_{10}
Гибернация	1.34×10^{-7}	1.21×10^4	1.62304
Пробуждение	4.32×10^{-7}	1.71×10^4	1.63876
Бодрствование	3.05×10^{-7}	1.58×10^4	1.64622
Морские свинки	1.15×10^{-7}	1.79×10^4	1.64291

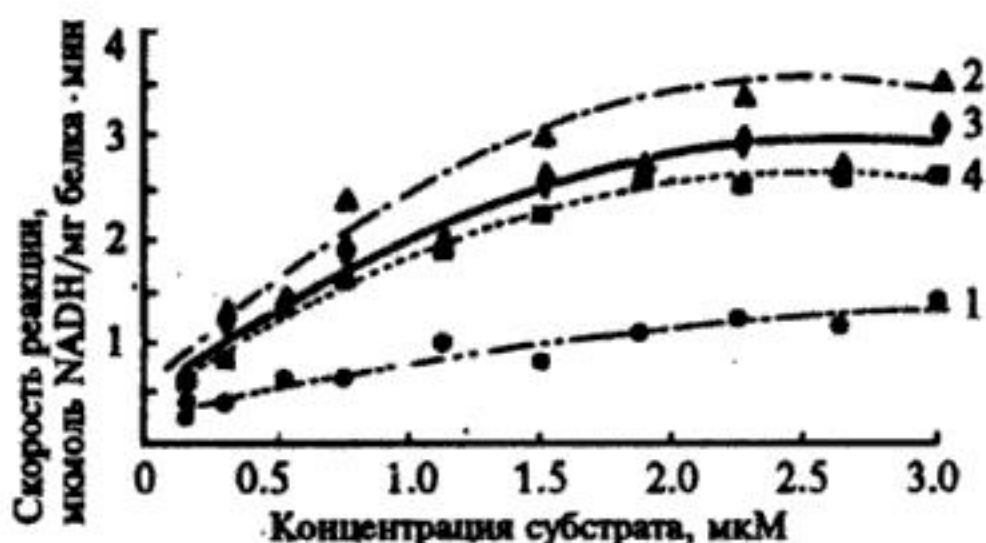
морских свинок имеет наименьшее значение K_m , а значит наибольшее сродство к субстрату реакции (табл. 1).

При сравнении активности мышечной ЛДГ у сусликов в различных функциональных состояниях (рис. 1) отмечено, что наибольшей активностью обладает фермент мышц гибернирующих животных. При пробуждении и разогреве животных активность энзима снижается на треть и в дальнейшем остается на этом уровне у активных животных. Кинетический анализ показал, что повышенная активность фермента у гибернирующих животных связана с меньшим значением K_m , что говорит о повышенном сродстве фермента к субстрату в период оцепенения. При пробуждении K_m ЛДГ становится выше, уменьшается сродство фермента к субстрату, и в результате скорость реакции снижается. Объяснением этого может быть усиление аэробного метаболизма и уменьшение вклада в него гликолиза.

Кроме того, известно, что для достижения состояния гибернации необходимо угнетение окислительных путей обмена с целью снижения уровня метаболизма в целом. В связи с этим возможна инаktivация пируватдегидрогеназы путем ковалентной модификации, что перекрывает ввод пирувата (ПВ) в цикл Кребса и его дальнейшее окисление [14,16]. В результате ЛДГ восстанавливает ПВ в лактат. При этом физиологические концентрации пальмитоил-карнитина ингибируют пируваткиназу скелетных мышц гибернирующих животных, и митохондрии преимущественно окисляют жирные кислоты [16, 17].

С другой стороны, при гибернации активируется глюконеогенез из аминокислот, глицерола и лактата, требующий NAD^+ [12]. Можно пред-

Рис. 2. Активность лактатдегидрогеназы печени сусликов и морских свинок в зависимости от концентрации субстрата: 1 – морские свинки, 2 – гибернирующие суслики, 3 – активные суслики, 4 – пробуждающиеся суслики



положить, что при гибернации на фоне общего угнетения гликолиза лактатдегидрогеназная реакция может играть важную роль перевода ПВ в необходимый для глюконеогенеза лактат и сопряженного окисления $NADH \rightarrow NAD^+$, который также необходим для глюконеогенеза [12, 17, 18]. Изложенное может объяснить изменения активности ЛДГ в различных состояниях сусликов. Изменения константы сродства энзима к субстрату могут свидетельствовать также о возможном изменении конформации или изоферментного состава ЛДГ при выходе сусликов из состояния зимней спячки или действии на энзим при этом каких-либо модификаторов (рН, температура, ионы, биологически активные вещества и т.д.).

В тканях печени и миокарда незимоспящих животных зарегистрирована меньшая активность ЛДГ по сравнению с гибернаторами (рис. 2, 3). Фермент этих тканей морских свинок характеризуется наибольшим значением K_m , а следовательно, наименьшим сродством к

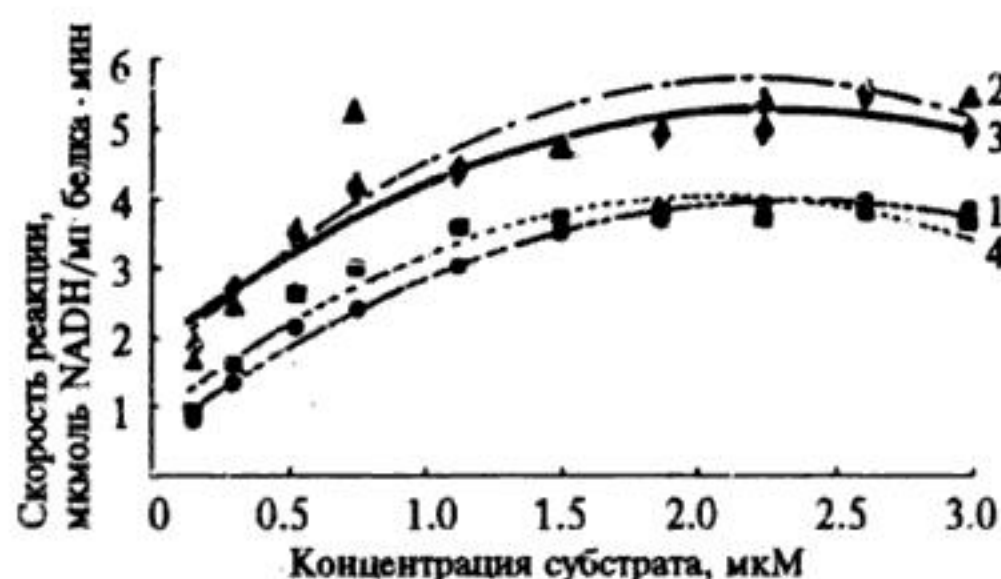


Рис. 3. Активность лактатдегидрогеназы миокарда сусликов и морских свинок в зависимости от концентрации субстрата: 1 - морские свинки, 2 - гибернирующие суслики, 3 - активные суслики, 4 - пробуждающиеся суслики

субстрату. У гибернирующих животных наибольшая активность ЛДГ в тканях печени и миокарда была в состоянии оцепенения. При пробуждении и разогреве животных активность ЛДГ снижается. В активном состоянии вновь происходит повышение активности исследуемого фермента. Кинетический анализ показал, что такое поведение фермента может быть обусловлено наименьшим значением K_m у гибернирующих животных, т.е. большим сродством к субстрату (табл. 2, 3). У пробуждающихся и активных животных фермент характеризуется несколько более низким сродством к субстрату и меньшим значением U_{max} по сравнению со спящими животными. Сказанное выше может быть связано с преобладанием анаэробного метаболизма в состоянии гибернации и накопления лактата [5, 11, 13] в различных органах. При пробуждении и бодрствовании преобладает уже аэробный метаболизм, и, видимо, за счет этого активность ЛДГ снижается. Наиболее значительное понижение активности отмечается в момент пробуждения, что связано, скорее всего, с эффектом Пастера: торможением процесса гликолиза увеличивающейся концентрацией кислорода [4, 11].

Более высокая активность ЛДГ в органах спящих сусликов по сравнению с пробуждающимися и активными может быть результатом изменения изоферментного спектра. В литературе имеются данные о смещении изоферментного спектра ЛДГ в миокарде гетеротермов в период оцепенения по сравнению с летним периодом [6, 8]. При этом наблюдалось преобладание М-субъединиц ЛДГ, что в норме характерно для скелетных мышц. Хотя эти данные нуждаются в дополнительной проверке,

Таблица 2

Кинетические характеристики функционирования ЛДГ в печени сусликов по сравнению с таковыми у морских свинок

Состояние животных	Константа Михаэлиса K_m , мкМ	Энергия активации E_a , кал	Температурный коэффициент Q_{10}
Гибернация	2.11×10^{-7}	6.01×10^4	1.57878
Пробуждение	3.21×10^{-7}	1.78×10^4	1.64155
Бодрствование	2.64×10^{-7}	1.41×10^4	1.63929
Морские свинки	1.63×10^{-6}	3.04×10^4	1.65576

сам факт модификации изоферментного спектра ЛДГ мог бы объяснить изменения в общей активности фермента миокарда в динамике баута. При анализе температурной зависимости ЛДГ обнаружена низкая температурная чувствительность данного фермента: значения Q_{10} составляют лишь 1.5–1.6 (табл. 1, 2, 3). Энергия активации лишь в печени гибернирующих сусликов несколько выше, чем в

других состояниях. Представляет интерес выяснение причин такой высокой температурной устойчивости данного фермента.

Таким образом, у гибернирующих млекопитающих общая активность ЛДГ выше, чем в остальных состояниях, что связано, по-видимому, с преобладанием анаэробного типа метаболизма при гибернации и переходом на преимущественно аэробный метаболизм при пробуждении.

Специфика активности ЛДГ изучаемых тканей сусликов отражает разную интенсивность гликолитических процессов у гибернаторов в раз-

ных тканях и органах. Существенные отличия в активности и кинетике функционирования ЛДГ у морских свинок и сусликов свидетельствуют о специфичности ЛДГ у гибернирующих животных.

Работа выполнена в рамках приоритетного финансирования ГКНТ Украины по теме: "Исследование особенностей регуляции клеточного метаболизма в условиях искусственного и естественного гипобиоза".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высш. школа, 1980. – С. 224–226.
2. Курский М.Д., Костерин С.А., Рыбальченко В.Н. Биохимическая кинетика. – Киев: Вища школа, 1977. – 264 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.
4. Ленинджер А. Биохимия. – М.: Мир, 1976. – 477 с.
5. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. – М.: Мир, 1988. – С. 390, 447–449.
6. *Animal Adaptation to Cold // Comparative and Environmental Physiology / Ed.: L.C.H. Wang.* – Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, 1989. – 4. – P. 32–35.
7. Baldwin J., Aleksuk M. Adaptation of enzymes to temperature: lactate and malate dehydrogenases from platypus and echidna // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1973. – 44B. – P. 363–370.
8. Baldwin J. Adaptation, constraint and convergence among vertebrate LDH isozymes: an evolutionary perspective // *Canadian Journal of Zool.* – 1988. – 66, N 5. – P. 1011–1013.
9. Behrich H.W., Johnson C.E. Regulatory properties of pyruvate kinase from liver of the summer active Arctic ground squirrel // *Can. J. Biochem.* – 1974. – 52. – P. 547–559.
10. Behrich H.W. Temperature and the regulation of enzyme activity in the hibernator. Isoenzymes of liver pyruvate kinase from the hibernating and non-hibernating Arctic ground squirrel // *Can. J. Biochem.* – 1974. – 52. – P. 894–902.
11. Galster W.A., Morrison P.R. Cyclic changes in carbohydrate concentrations during hibernation in the Arctic ground squirrel // *Am. J. Physiol.* – 1970. – 218. – P. 1228–1232.
12. Galster W.A., Morrison P.R. Gluconeogenesis in Arctic ground squirrels between periods of hibernation // *Am. J. Physiol.* – 1975. – 228. – P. 325.
13. Hochachka P.W., Somero G.N. The adaptation of enzymes to temperature // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1968. – 27. – P. 659–668.
14. Storey K.B. Integrated control of metabolic rate depression via reversible phosphorylation of enzymes in hibernating mammals // *Living in the cold. II, Malan A., Canguilhem B. / Ed.: John Libbey.* – Eurotext. – Paris, 1989. – P. 309–319.
15. Wang L.C.H. Energetic and field aspects of mammalian torpor: The Richardson's ground squirrel // *Strategies in cold. Natural torpidity and thermogenesis / Ed.: L.Wang, J. Hudson.* – Academic Press, 1978. – P. 109–145.

Т а б л и ц а 3

Кинетические характеристики функционирования ЛДГ в миокарде сусликов по сравнению с таковыми у морских свинок

Состояние животных	Константа Михаэлиса K_m , мкМ	Энергия активации E_a , кал	Температурный коэффициент Q_{10}
Гибернация	3.65×10^{-7}	1.50×10^4	1.63434
Пробуждение	5.40×10^{-7}	2.02×10^4	1.64438
Бодрствование	4.61×10^{-7}	1.79×10^4	1.64570
Морские свинки	4.89×10^{-7}	2.65×10^4	1.65512

16. *Jacoe M.E.* Adjustments of metabolic pathways in the pectoralis muscles of the bat, *Eptesicus fuscus*, related to carbohydrate sparing during hibernation // *Physiol. Zool.* – 1983. – 56. – P. 648.
17. *Jacoe M.E.* Maintenance of the pectoralis muscle during hibernation in the big brown bat, *Eptesicus fuscus* // *J. Comp. Physiol.* – 1983 152B. – P. 97.
18. *Jacoe M.E.* Protein metabolism in the pectoralis muscle and liver of hibernating bat, *Eptesicus fuscus* // *J. Comp. Physiol.* – 1983. – 152B. – P. 137.

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

Поступила 08.10.92

Г.В.ПОГОРЕЛОВА, Г.Ф.ЖЕГУНОВ

ОСОБЛИВОСТІ КІНЕТИКИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ НА РІЗНИХ ЕТАПАХ ЗИМОВОЇ СПЛЯЧКИ У ХОВРАХІВ *Citellus undulatus*

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Вивчали кінетику функціонування лактатдегідрогенази (ЛДГ КФ 1.1.1.27) у печінці, міокарді і скелетних м'язах сплячих, під час пробудження і активних ховрахів *Citellus undulatus*. Показано, що у гібернуючих ховрахів загальна активність ЛДГ вища, ніж під час пробудження і у активному стані, що корелює із зміною кінетичних констант фермента. У всіх тканинах тварин, що вивчаються, спостерігається висока термостійкість фермента.

G.V.POGORELOVA, G.F.ZHEGUNOV

PECULIARITIES OF THE KINETICS OF FUNCTION OF LACTATE DEHYDROGENASE IN GROUND SQUIRRELS *Citellus undulatus* AT DIFFERENT STAGES OF HIBERNATION

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

The kinetics of functioning of lactate dehydrogenase (LDH, CF 1.1.1.27) in the liver, myocardium and skeletal muscles of hibernating, arousing and active ground squirrels *Citellus undulatus* was studied. It has been demonstrated that the total LDH activity is higher in hibernating ground squirrels than in arousing and active animals that correlates with a change in kinetic constants of the enzyme. The enzyme in all tissues of studied animals appeared to be highly resistant to cooling.

Е.П.Артемова, А.Р.Сирота, В.Ю.Мокрецов, Л.А.Алехина

**ИММУНОКОРРЕКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
АУТОИММУННОГО ТИРЕОИДИТА С ПОМОЩЬЮ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ТИМУСА**

Мышам с аутоиммунным тиреоидитом свободно пересаживали сингенные тимусы от интактных животных и изучали некоторые показатели их иммунного статуса, лимфоидную инфильтрацию щитовидной железы наряду с изучением морфофункциональной структуры трансплантатов тимуса через 10 и 30 дней после их подсадки животным-реципиентам. Показано, что аутооттрансплантация криоконсервированного тимуса сроком на 10 и 30 дней животным с экспериментальным аутоиммунным тиреоидитом снимала сенсibilизацию лимфоцитов к экстракту щитовидной железы и уменьшала площадь лимфоидной инфильтрации щитовидной железы в два раза, что свидетельствовало о супрессии заболевания. В тканях трансплантата тимуса через 10 дней после его подсадки отмечали снижение пролиферативных и обменных процессов, а через месяц – выраженные деструктивные и дистрофические изменения.

Известно что между вилочковой и щитовидной железами существуют тесные взаимосвязи, когда экспериментальная тиреоидэктомия либо недостаток тиреоидных гормонов вызывают атрофические изменения в тимусе [2, 9], а неонатальная тимэктомия животных приводит к развитию экспериментального и усилению спонтанного аутоиммунного тиреоидита [6, 8]. Эти данные служат обоснованием для применения тимических гормонов в лечении аутоиммунного тиреоидита. Для восстановления Т-клеточного иммунитета используются Т-активин, тимулин, в то время как спектр продуцируемых вилочковой железой гормонов и биологически активных веществ значительно шире. Трансплантация клеток и тканей эндокринных органов используется для лечения различных эндокринных заболеваний, к которым относятся и аутоиммунные, такие как сахарный диабет I типа, некоторые формы гипотиреоза [1, 3, 4, 5, 13]. Нами не найдено в литературе специальных исследований, посвященных изучению влияния трансплантации органов на течение и лечение аутоиммунных заболеваний, в частности аутоиммунного тиреоидита. Надо полагать, что разработка методов аллотрансплантации вилочковой железы – нативной и криоконсервированной – может оказаться эффективной в профилактике и лечении аутоиммунных форм тиреоидной патологии, что требует предварительных исследований на животных.

Цель экспериментального исследования заключалась в создании модели аутоиммунного тиреоидита (ЭАТ) на линейных мышях СВА; изучении влияния аутооттрансплантации интактного криоконсервированного сингенного тимуса на течение заболевания у мышей с ЭАТ; определении морфофункциональной структуры трансплантатов тимуса в различные сроки после подсадки.

Опыты проводили на линейных мышях СВА, самках массой 20–22 г, 2-месячного возраста. Все животные были разделены на 4 группы: 1-я – интактные ($n=16$); 2-я – модель ЭАТ ($n=11$); 3-я – ЭАТ + аутооттрансплантация криоконсервированного сингенного тимуса от здоровых мышей

Некоторые показатели иммунного статуса и степень лимфоидной инфильтрации щитовидной железы мышей с ЭАТ после трансплантации криоконсервированного тимуса

Группа животных		Антитела, титры	РТМЛ, ед.	Лимфоидная инфильтрация, %
1-я	Интактные, $n=16$	0	1.0 ± 0.1	0
2-я	ЭАТ, $n=11$	1:80–1:640	$0.6 \pm 0.1^*$	27.9 ± 1.4
3-я	ЭАТ+ауто трансплантация на 10 дней, $n=10$	1:80–1:640	$0.9 \pm 0.08^*$	$14.5 \pm 1.2^*$
4-я	ЭАТ+ауто трансплантация на 30 дней, $n=10$	1:40–1:320	$1.1 \pm 0.1^*$	$13.8 \pm 1.6^*$

Примечание, * – достоверно в группе 2-й к 1-й; в группе 3-й, 4-й – к 2-й группе.

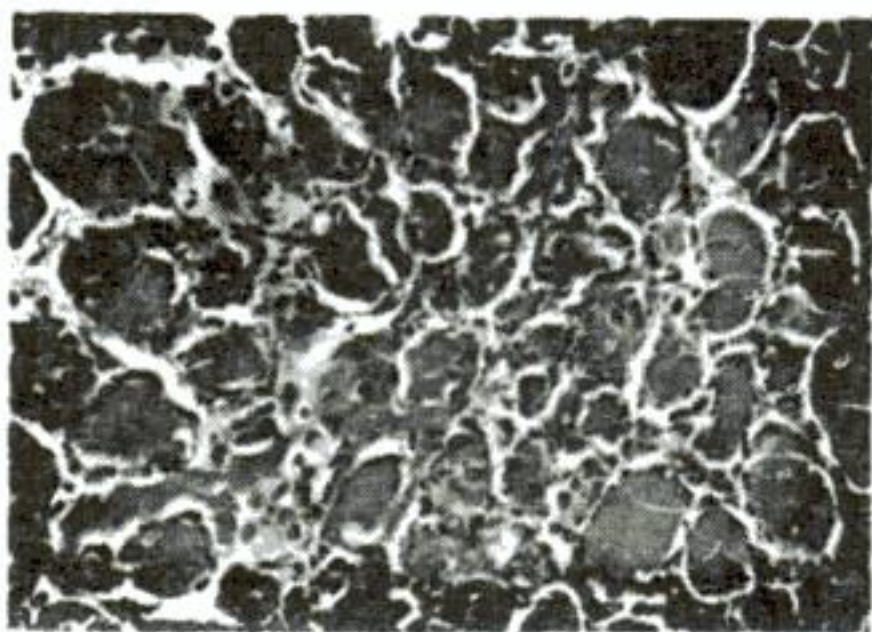
сроком на 10 дней ($n=10$); 4-я – ЭАТ + ауто трансплантация аналогично 3-й группе сроком на 30 дней ($n=10$).

Модель ЭАТ создавали на животных путем их иммунизации экстрактом цельной щитовидной железы с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1 в виде подкожных инъекций один раз в неделю (8 иммунизаций).

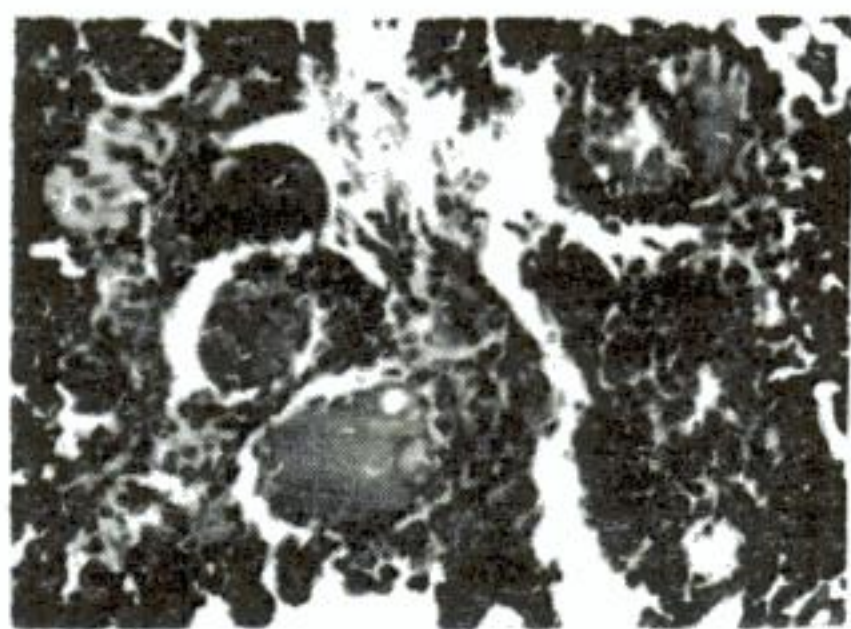
Криоконсервирование целого тимуса мышей проводили по методу, разработанному для щитовидной железы в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины [5]. Метод осуществляли в два этапа: I – охлаждение органа до $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$; II – замораживание и хранение органа при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. В качестве криопротектора использовали 12.5%-й раствор диметилсульфоксида. Трансплантацию интактного криоконсервированного тимуса мышам с ЭАТ проводили под эфирным наркозом путем свободного пересаживания органа подкожно на правой половине грудной клетки сроком на 10 и 30 дней.

Антитела к тканям щитовидной железы мыши определяли реакцией пассивной гемагглютинации (РПГА) с бараньими эритроцитами. Сенсibilизацию лимфоцитов к антигенам щитовидной железы определяли реакцией торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) в капиллярах и результаты оценивали при помощи координатной сетки (1 мм пробега – 10 единиц). Патоморфологические исследования щитовидной железы и трансплантатов тимуса проводили путем фиксации их в 10%-м нейтральном формалине с последующей окраской срезов гематоксилин эозином. Морфометрическое определение площади лимфоидной инфильтрации к общей площади среза щитовидной железы проводили с помощью окулярной сетки, содержащей 64 квадрата (площадь 64 мм^2), при увеличении окуляра $\times 7$ и объектива $\times 20$. Результаты выражали в процентах. Статистическую обработку цифрового материала осуществляли по методу Стьюдента с вычислением t -критерия.

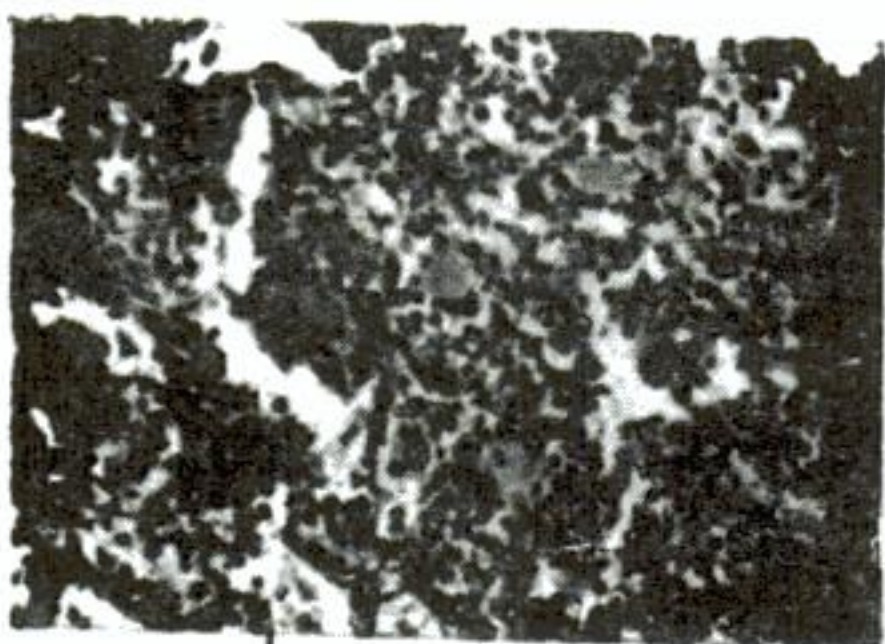
Течение ЭАТ у мышей 2-й группы характеризовалось образованием антитиреоидных антител в титрах 1:80 – 1:160, сенсibilизацией лимфоцитов организма к экстракту щитовидной железы – РТМЛ – 0.6 ± 0.1 единиц к 1.0 ± 0.1 единиц у интактных животных и аутоиммунным поражением щитовидной железы с площадью лимфоидной



a



б



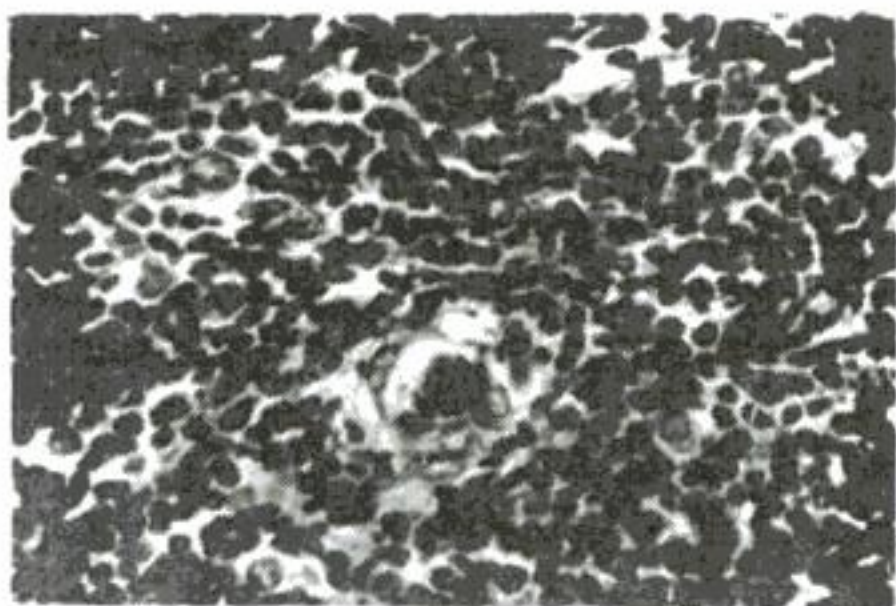
в

Рис. 1. Гистоструктура щитовидной железы мышей СВА в норме (*a*), при течении ЭТА (*б*) и через 10 дней после трансплантации криоконсервированного тимуса (*в*): *б* – фиброз клеток, диффузная лимфоидная инфильтрация (2-я группа), *в* – очаги лимфоидной инфильтрации (3-я группа). Окр. гемат.-эозин. $\times 20$

инфильтрации 27.9 ± 1.4 % (табл.). По данным литературы и при развитии и хронизации экспериментального аутоиммунного тиреоидита у мышей отмечали реактивность *T*- и *B*-клеток на собственный тиреоглобулин и увеличение цитотоксических $\text{Lyt } 2^{+}$ в тканях щитовидной железы [7].

При гистологическом исследовании щитовидной железы мышей СВА 2-й группы показано, что ткань органа состояла из крупных фолликулов с примесью более мелких. В просвете фолликулов обнаруживался плотный красный коллоид без вакуолей резорбции. Часть структуры щитовидной железы была изменена в результате разрушения фолликулов, фиброза клеток и характерной лимфоидно-плазмоцитарной инфильтрации органа (рис. 1).

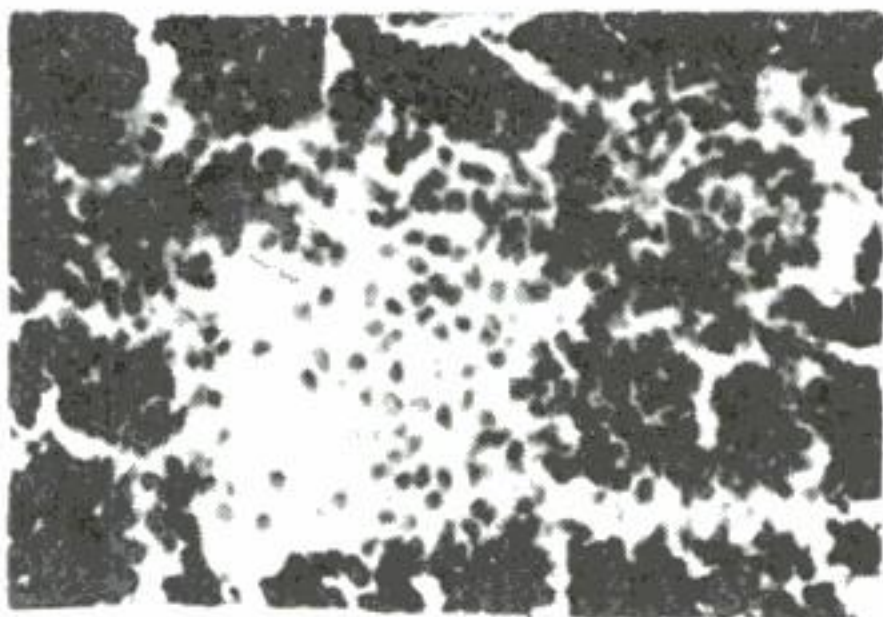
С целью иммунокоррекции заболевания мы пересаживали мышам с ЭАТ свободный трансплантат интактного криоконсервированного сингенного тимуса на различные сроки и сравнивали изучаемые параметры у животных с ЭАТ (2-я группа) с показателями у животных 3-й и 4-й групп. Ауто трансплантация тимуса мышам 3-й группы сроком на 10 дней не изменяла существенно титров антител, однако снимала сенсibilизацию лимфоцитов к экстракту щитовидной железы с 0.6 ± 0.1 до 0.9 ± 0.8 единиц. Наиболее выраженным положительным эффектом,



a



б



в

Рис. 2. Гистоструктура криоконсервированного трансплантата тимуса: *a* – intactный, тельце Гассалля; *б* – через 10 дней после аутоотрансплантации, дистрофические изменения тканей; *в* – через 30 дней после аутоотрансплантации, участки делимфотизации. Окр. гемат.-эозин. $\times 40$

достигнутым при пересадке криоконсервированного тимуса, продуцирующего, возможно, ряд тимических гормонов, являлось уменьшение площади щитовидной железы, занятой лимфоцитами, плазмócитами, макрофагами с $(27.9 \pm 1.4)\%$ у мышей с ЭАТ до $(14.5 \pm 1.2)\%$ после трансплантации наряду со снижением неспецифических поражений (рис. 1).

Увеличение срока нахождения криоконсервированного трансплантата тимуса у мышей с ЭАТ до 30 дней (4-я группа) приводило к снижению титров специфических анти tireоидных антител, отсутствию сенсibilизации лимфоцитов к экстракту щитовидной железы и уменьшению степени лимфоидно-плазмócитарной инфильтрации органа с $(27.9 \pm 1.4)\%$ во 2-й группе мышей до $(13.8 \pm 1.6)\%$ в исследуемой (табл.).

Сходные результаты были получены в [12] на линейных мышax с ЭАТ, которым вводили тимозин-5 в различные сроки иммунизации. В этой системе тимический гормон угнетал развитие заболевания (оценивалась степень лимфоидной инфильтрации щитовидной железы) у высокоотвечающей на иммунизацию тиреоглобулином линии животных. Полагают, что супрессия заболевания является результатом увеличения содержания супрессорных клеток, ограничивающих развитие аутоиммунного процесса [11]. Однако не исключено и прямое действие тимических гор-

монов на клетки лимфоцитарного инфильтрата щитовидной железы [10]. Полученное нами снижение объема лимфоидной инфильтрации щитовидной железы уже через 10 дней после пересадки тимуса позволяет предполагать прямое влияние тимического гормона.

При изучении морфофункциональной структуры трансплантатов тимуса спустя 10 дней после их пересадки животным с ЭАТ отмечали сохранение нормальной структуры органа наряду с расширением прослоек соединительной ткани, явлениями отека, снижением количества больших и малых лимфоцитов в мозговом и корковом слоях и некробиозом отдельных тимоцитов. Число клеток с митозом было снижено с 1.3% в норме до 0.5% в исследуемом трансплантате. Выявленные изменения свидетельствовали о снижении пролиферативных и обменных процессов наряду с началом развития дистрофических процессов (рис. 2). Через 30 дней после имплантации тимуса выявлялись участки нормальной структуры органа, в основном по периферии; граница между корковым и мозговым слоями была стерта обычно за счет заполнения тимоцитами мозгового вещества; количество иммунобластов резко уменьшено; число митозов в клетках снижено с 1.3% в интактном тимусе до 0.2% в исследуемом трансплантате; выявлялись участки исчезновения лимфоцитов – делимфотизации в результате усиленного распада клеток; отмечались выраженные деструктивные и дистрофические процессы с разрастанием соединительной ткани в строме органа (рис. 2). Следовательно, на модели экспериментального аутоиммунного тиреоидита была показана возможность супрессии заболевания путем пересадки свободного криоконсервированного трансплантата тимуса от интактного животного сроком на 10 и 30 дней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Алексанян М.Г., Казарян А.А.* Иммунологические показатели при аллотрансплантации культуры эндокринной части поджелудочной железы у больных сахарным диабетом // Журн. эксперим. и клинич. медицины. – 1986. 26, N 4. – С. 383–386.
2. *Кемилева З.* Вилочковая железа. – М.: Медицина, 1984. – 280 с.
3. *Туракулов Я.Х., Мухамедзянова И.Р., Исмаилов С.И., Ташходжаева Т.П.* Биохимические показатели функции тиреоидной ткани при ее консервации // Криобиология. – 1986. – N 2. – С. 7–10.
4. *Чуйко В.А., Исмаилов С.И., Туракулов Я.Х.* Консервация и трансплантация щитовидной железы –Ташкент: Медицина УзССР, 1989. – 125 с.
5. *А.с. 935050 СССР, МКИ² А01 N 1/02.* Способ криоконсервирования щитовидной железы / Н.С.Пушкар, А.М.Утевский, В.А.Чуйко и др. – Оубл. 15.06.82. Бюл. N 22.
6. *Cohen Sh., Dukstra Ch., Weltman A.* Sequential analysis of experimental autoimmune thyroiditis induced by neonatal thymectomy in Buffalo strain rat // Cell Immunol. – 1988. – 114, N 1. – P. 126–136.
7. *Conaway D., Giraldo A., David Sh., Kong Li-Chi.* In situ kinetic analysis of thyroid lymphocyte infiltrate in mice developing experimental autoimmune thyroiditis // Clin. Immunol. a Immunopathol. – 1989. – 53, N 2. – P. 346–353.
8. *Pontes de Carvalho L., Wick G., Roitt J.* Requirement of T-cells for the development of spontaneous autoimmune thyroiditis in Obese Strain (OS) chickens // J. Immunol. – 1989. – N 2. P. 750–753.
9. *Savino W., Wolf B., Araton-Spire S.* Thymic hormone containing cells. Fluctuations in the thyroid hormone levels in vivo can modulate the secretion of thymulin by the epithelial cells of young mouse thymus //Clin. Exp. Immunol. – 1984. – 55, N 3. – P. 629–635.
10. *Skowron-Cendesek A., Kubera M.* Effect of neonatal spleen and thymic implants on H-Y incompatible skin grafts //Folia biol. – 1989. – 37, N 12 – P. 101–104.
11. *Sztein M., Goldstein A.* Thymic-hormones –a clinical update //Springer Seminar Immunopathol – 1986. – N 1. – P. 1–18.
12. *Tomazic V., Suter C., Chretien P.* Experimental autoimmune thyroiditis: modulation of disease level in high and low responder mice by thymosin //Clin. Exp. Immunol. – 1984. – 58, N 1. – P. 83–89.

13. *Vsadel K., Teuber J., Paschke R., Junker M.* Transplantation of human endocrine tissues no nude mice a suitable in vivo model for the study of pathomechanisms involved in autoimmune thyroid disease //Acta endocrinol. – 1987. – N 281. – P. 77–81.

Філіал ін-та іммунології МЗ РФ г.Ташкент

Поступила 20.08.91

К.П.АРТЕМОВА, О.Р.СИРОТА В.Ю.МОКРЕЦОВ, Л.О.АЛЬОХИНА

ІМУНОКОРЕКЦІЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО ТИРЕОЇДИТА ЗА ДОПОМОГОЮ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КРІОНСЕРВОВАНОГО ТИМУСУ

Філіал інституту іммунології МЗ РФ, м.Ташкент

Мишам с аутоімуним тиреоїдитом вільно пересаджували сингенні тимуси від інтактних тварин і вивчали деякі показники їх імунного статусу, лімфоїдну інфільтрацію щитовидної залози поряд з вивченням морфофункціональної структури трансплантатів тимусу через 10 і 30 днів тваринам з експериментальним аутоімунним тиреоїдитом знімала сенсibilізацію лімфоцитів до екстракту щитовидної залози і зменшувала площу лімфоїдної інфільтрації щитовидної залози удвічі, що свідчило про супресію захворювання. У тканинах трансплантата тимусу через 10 днів після його підсадки відмічали зниження проліферативних і обмінних процесів, а через місяць – виражені деструктивні і дистрофічні зміни.

E.P.ARTEMOVA, A.R.SIROTA, V.YU.MOKRETISOV, L.A.ALEKHINA

THE IMMUNE CORRECTION OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE THYROIDITIS BY TRANSPLANTATION OF CRYOPRESERVED THYMUS

Branch of the Institute for Immunology, Tashkent

Free transplantation of syngene thymuses of intact animals was performed in mice with autoimmune thyroiditis. Parameters of their immune status and lymphoid infiltration of thyroid gland were studied as well as the structure-functional peculiarities of thymus grafts in 10 and 30 days after transplantation to recipients. It has been shown that the autotransplantation of cryopreserved thymus to animals with experimental autoimmune thyroiditis for 10 and 30 days removed the sensitization of lymphocytes to the thyroid extract and decreased the area of lymphoid infiltration of the thyroid gland by two-fold that indicated the suppression of the disease. In 10 days after

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043:581.14

Т.Ф.Стрибуль, Д.А.Лихолат

ФИТОГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ ПОСЛЕ ПОГРУЖЕНИЯ СЕМЯН В ЖИДКИЙ АЗОТ

Жизнеспособность семян растений после криоконсервации при температуре жидкого азота в значительной степени зависит от их способности выдерживать комплекс стрессовых факторов, возникающих при быстром снижении температуры (криостресс). В литературе отсутствуют четкие представления о механизмах изменения всхожести семян после глубокого замораживания. В частности, Стенвуд [1] показал, что жизнеспособность семян некоторых видов растений может возрастать после прямого погружения в жидкий азот, а других – снижаться. Одной из причин изменения энергии прорастания семян в этом случае может являться модификация фитогормонального статуса, возникающая после механических трансформаций зародыша при замораживании. В связи с этим в наших экспериментах изучалось содержание основных фитогормонов в этиолированных проростках кукурузы, полученных из семян, прошедших криоконсервацию с различными режимами замораживания.

Содержание фитогормонов в этилированных проростках кукурузы (Черновицкий 21), выращенных из семян, имеющих различную влажность, и замороженных путем прямого погружения в жидкий азот, мкг/г сух. в-ва

Варианты опыта	ГПВ	ИУК	ЗПВ	АБК
Контроль	без замораживания	3581.0 ± 62	2.2 ± 0.3	4.7 ± 0.6
Проростки кукурузы, полученные после замораживания семян 9%-й влажности	3527.7 ± 98	2.4 ± 0.4	3.8 ± 0.9	0.23 ± 0.02
Проростки кукурузы, полученные после замораживания семян 14%-й влажности	3467.8 ± 87	1.8 ± 0.1	2.8 ± 0.5	0.41 ± 0.04
Проростки кукурузы, имеющие большую линейную скорость роста после замораживания семян 14%-й влажности	6353.1 ± 79	2.4 ± 0.4	3.8 ± 0.8	0.36 ± 0.05

Примечание. ГПВ – гиббереллоподобные вещества, ИУК – индолилуксусная кислота.

Эксперименты проводили на 10-дневных проростках кукурузы (Черновицкий 21), выращенных в воздушном термостате при 27 °С. Семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге. Определение фитогормонов проводили по стандартной методике с разделением с помощью ТСХ и последующей регистрацией на ГЖХ высокого давления [2].

Как показано в таблице, содержание основных фитогормонов мало менялось в этилированных проростках, полученных из семян с влажностью 9% после их быстрого замораживания в жидком азоте. Исключение составляли только увлажненные до 14% влажности семена. В пробе этих семян после замораживания до -196 °С и проращивания увеличивалось количество проростков с повышенной скоростью линейного роста. В пробах с семенами кукурузы, которые до замораживания имели 9%-ю влажность, таких проростков обнаруживалось не более 4,7%. Эта величина статистически не выше, чем на контроле. При замораживании семян с 14%-й влажностью интенсивно растущих проростков было до 7.8%. Отбор этих проростков для определения фитогормонов показал, что у них увеличилось содержание ГПВ и немного АБК. Уровень остальных фитогормонов сохранялся примерно таким же, как и в остальных вариантах. Полученные данные свидетельствуют о том, что у увлажненных до определенного уровня семян кукурузы при стрессовых режимах замораживания трансформация зародыша семени приводит к некоторой модификации фитогормонального статуса, который в итоге определяет более интенсивный рост этилированных проростков на первых этапах развития.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стенвуд Р.С., Бесс Л.Н. Сохранение зародышевой плазмы путем глубокого замораживания / Холодостойкость растений. – М.: Колос, 1983. – С. 280–287.
2. А.с. 123052 СССР, МКИ⁴ G01 N 33/48 Способ определения АБК в тканях растений / С.В.Савинский, И.Ш.Кофман, Е.М.Ильяшук, Д.А.Лихолат. Оpubл. 23.05.86. Бюл. N 19.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины
АН Украины, г. Харьков;
Ин-т физиологии растений и генетики
АН Украины, г. Киев

Поступило 25.07.91

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины в октябре 1992 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук В.В.Ломако “Норадренергические процессы в гипоталамусе крыс после гипотермических воздействий”. Исследованы эффекты двукратных гипотермических воздействий на процесс высвобождения норадреналина нейронами гипоталамуса и динамику содержания катехоламинов (адреналина и норадреналина) в ткани гипоталамуса, надпочечников и крови. Высказано предположение об участии норадренергической системы головного мозга в механизмах центральной терморегуляции в ответ на повторное гипотермическое воздействие. Получены доказательства важной роли изменения уровня проницаемости гематоэнцефалического барьера в компенсаторных реакциях организма на охлаждение при различных режимах и кратности КЦГ.

Диссертационная работа М.И.Щетинского “Исследование взаимодействий криопротекторов с компонентами растворов и биологическими системами методом ЯМР” посвящена анализу межмолекулярных взаимодействий водных растворов криопротекторов с разными гидрофильными центрами и распределению их между клеткой и средой. Обнаружено влияние сывороточного альбумина человека на скорость протонного обмена между водой и гидроксильными группами глицерина. Установлена корреляция между характером вымораживания воды в биообъектах, естественно-устойчивых к холоду, и свойствами воды в системах, создаваемых искусственно при введении криозащитных веществ. Разработан способ оценки проникновения веществ в эритроциты человека. Определены коэффициенты распределения криопротекторов: ПЭГ-1500, ДМСО, ЭГ между внутри- и внеклеточной средой эритроцитов.

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

2¹⁹⁹³

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.

Подписная цена: на 3 мес. — 50 крб., на 6 мес. — 100 крб., на 9 мес. — 150 крб., на 12 мес. — 200 крб.

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. 1993. №2. 1-56