

2

ISSN 0233-7673

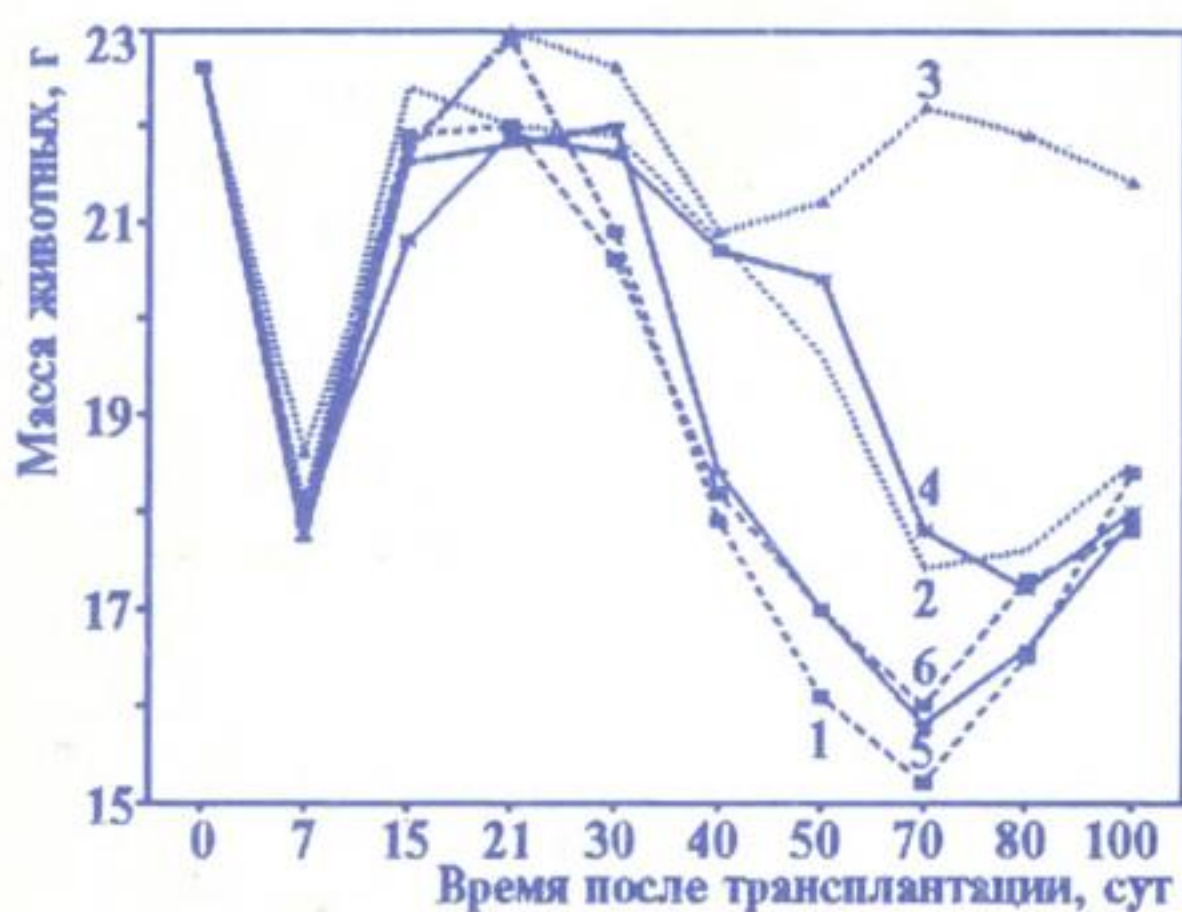
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1996

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ВОЗМОЖНОСТИ КРИОБИОЛОГИИ В РЕШЕНИИ
ИММУНОКОНФЛИКТНЫХ ПРОБЛЕМ ПРИ ПЕРЕСАДКЕ
ГИСТОНЕСОВМЕСТИМОГО КОСТНОГО МОЗГА А.Н.Гольцев,
Е.Д.Луценко, Л.В.Останкова, Т.Г.Дубрава, Е.В.Опанасенко

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАНИЯ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА И
1,2-ПРОПАНДИОЛА НА СОХРАННОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ
КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ С.Х.Межидов, И.М.Беляева,
А.М.Воротилин, В.А.Мусеев

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), Ф.Ф.Круз-Санчес (Испания), В.Де Лекер (Бельгия), В.И.Луговой (Харьков), В.Я.Малеев (Харьков), Г.Маттес (Германия), Г.Меримен (США), П.Мнержичка (Чехия), Ю.Ф.Пастухов (Санкт-Петербург), Е.Н.Попов (ответственный секретарь, 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), F.F.Cruz-Sanchez (Spain), W.De Loecker (Belgium), V.I.Lugovoj (Kharkov), V.Ya.Maleyev (Kharkov), G.Matthes (Germany), P.Mericka (Czechia), H.T.Meryman (USA), Yu.F.Pastukhov (Sankt-Petersburg), E.N.Popov (Executive Secretary, 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

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1996

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г., Опанасенко Е.В. Возможности криобиологии в решении иммуноконфликтных проблем при пересадке гистонесовместимого костного мозга 3
- Гулевский А.К., Щенявский И.И. Сезонные изменения внутриклеточного содержания одновалентных катионов в эритроцитах длиннохвостых сусликов 10
- Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Действие гемина и ДИДС на холодовой и гипертонический шок эритроцитов 13
- Стрибуль Т.Ф., Тымчук С.М., Супрун О.Г. Индукция амилолитических ферментов в эндосперме прорастающих семян кукурузы после низкотемпературной обработки 17

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Межидов С.Х., Беляева И.М., Воротилин А.М., Моисеев В.А. Влияние сочетания поливинилпирролидона и 1,2-пропандиола на сохранность эритроцитов при криоконсервировании 22
- Лобынцева Г.С., Вотякова И.А. Действие диметилсульфоксида на гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека 25
- Грищенко Е.А., Рязанцев В.В., Гулевский А.К., Чаплай Е.В. Создание криобанка семян редких и исчезающих видов лекарственных растений Украины 31
- Линник Т.П., Терещенко А.В., Артеменко А.Б. Влияние белковых добавок к криозащитной среде на сохранность спермиев петуха при криоконсервировании 35
- Безуглый Н.Д., Гордиенко Н.А. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих в растворах криопротекторов. II. Оптимизация методик применения защитных веществ 39

КРИОМЕДИЦИНА

- Романец С.М. Особенности действия мембранотропных препаратов на сердечный цикл в условиях общей гипотермии 45
- Ковалев А.А. Повторные и множественные ксенотрансплантации культур криоконсервированных островковых клеток поджелудочной железы в лечении больных осложненным инсулинзависимым сахарным диабетом 48

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Эффект ионной силы на действие гемина при гипертоническом шоке эритроцитов 52
- Чижевский В.В., Луговой В.И., Мазалов В.К. Изменение электрофизиологических характеристик ЭЭГ головного мозга крыс после общего острого охлаждения на фоне введения ПЭО-400 53
- Тыныныка Л.Н. Уровень перекисного окисления липидов фрагментов ткани печени новорожденных и половозрелых свиней в зависимости от условий криоконсервирования 54
- Угаров Г.С. Холод и растения высоких широт 55

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Ostankova L.V., Dubrava T.G., Opanasenko E.V.</i> Application of cryobiology in solving immune-conflict problems when grafting a histocompatible bone marrow . . .	3
<i>Gulevsky A.K., Shenyavsky I.I.</i> Seasonal changes in the intracellular content of the monovalent cations in rbc of long-tailed ground squirrels	10
<i>Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.</i> The action of ionic strength on the development of the RBC susceptibility to hypertonic stress	13
<i>Stribul T.F., Timchuk S.M., Suprun O.G.</i> Induction of amilolytic enzymes in corn seed endosperm growing after low temperature treatment	17

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

<i>Mezhidov S.Kh., Belyaeva I.M., Vorotilin A.M., Moiseyev V.A.</i> Effect of a combination of polyvinyl pyrrolidone and 1,2-propanediol on the survival of RBC during cryopreservation	22
<i>Lobyntseva G.S., Votyakova I.A.</i> Action of dimethylsulfoxide on hemopoietic cells of human embryonic liver	25
<i>Grischenkova E.A., Ryazantsev V.V., Gulevsky A.K., Chaplay E.V.</i> Organization of a cryobank of the seeds of rare and extinct species of herbal plants of the Ukraine	31
<i>Linnik T.P., Tereschenko A.V., Artemenko A.B.</i> Effect of protein additives in cryoprotective medium on the integrity of rooster spermatozoa at cryopreservation	35
<i>Bezugly N.D., Gordienko N.A.</i> Osmotic response of mammalian oocytes and embryos in cryoprotective solutions. II. Optimization of the methods of applying cryoprotective substances . . .	39

CRYOMEDICINE

<i>Romanets S.M.</i> Particular features of the action of the membrane-tropic preparations on the heart cycle during total hypothermic treatment	45
<i>Kovalev A.A.</i> Repeated and multiple xenotransplantations of the cultures of cryopreserved insular cells of the pancreatic gland when treating the patients with complicated insulin-dependent diabetes mellitus	48

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.</i> Effect of the ionic strength to the action of hemin during hypertonic stress of RBC	52
<i>Chizhevsky V.V., Lougovoy V.I., Mazalov V.K.</i> Changes in electrophysiological characteristics of eeg of rat brain following acute total cooling after injection of PEO-400	53
<i>Tynynyka L.N.</i> The level of lipid peroxidation of the hepatic tissue fragments of the newborn and mature pigs depending on cryopreservation conditions	54
<i>Ugarov G.S.</i> Cold and high-altitude plants	55

Свидетельство о государственной регистрации: Серия КВ, №98 от 23.09.93

Адрес редакции:

310015, Харьков,
ул. Переяславская, 23,
тел. (0572) 72-10-39

Научный редактор *В.И.Луговой*

Редактор *Л.А.Рябинина*

Компьютерный набор и верстка: *Л.А.Рябинина, А.М.Шаталов*

Подп. в печ. 18.10.96. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.
Тираж 350 экз. Цена договорная. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем
криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской
типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

**А.Н.Гольцев, Е.Д.Луценко, Л.В.Останкова,
Т.Г.Дубрава, Е.В.Опанасенко**

**ВОЗМОЖНОСТИ КРИОБИОЛОГИИ В РЕШЕНИИ
ИММУНОКОНФЛИКТНЫХ ПРОБЛЕМ ПРИ ПЕРЕСАДКЕ
ГИСТОНЕСОВМЕСТИМОГО КОСТНОГО МОЗГА**

Изучены особенности развития реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ) в зависимости от компонентного состава криоконсервированного миелотрансплантата. Очевидна необходимость поиска таких режимов обработки аллогенного костного мозга, которые при минимизации его РТПХ-активности обеспечивали бы максимум защитного потенциала.

Отсутствие удовлетворительных профилактических мер по предупреждению развития иммунного конфликта в виде синдрома РТПХ при пересадке аллогенного костного мозга требует нового понимания патофизиологических основ его развития. Обобщение накопленной информации дает основание считать возможным существование иных, кроме прямой цитотоксической реакции Т-лимфоцитов, механизмов развития РТПХ [12]. Другими словами, активность антиген-реактивных Т-клеток является не единственной ступенью патофизиологического процесса РТПХ.

Феноменология клинического проявления РТПХ дает основание считать важным звеном каскадных событий этой реакции дисбаланс продукции воспалительных цитокинов не только клетками Т-ряда, но и другими фактор-продуцирующими элементами микроокружения реципиента и миелотрансплантата [13]. Причем, как считают некоторые авторы [16], последние могут оказывать влияние на характер и интенсивность формирования функциональных свойств иммунореактивных Т-лимфоцитов. В этой связи повышается роль компонентного состава миелотрансплантата в проявлении его иммунореактивности. Следовательно, изменяя тем или иным путем в костном мозге соотношение цитокин-продуцирующих клеточных популяций, можно ожидать и изменения функциональных свойств как Т-лимфоцитов, так и интегральной иммунореактивности миелотрансплантата. В связи с этим представляются интересными (как альтернативный вариант контроля проявления РТПХ) экспериментальные подходы, направленные не только на элиминацию из миелотрансплантата антиген-реактивных Т-клеток, но и на "инактивацию" их триггерной функции в РТПХ за счет изменения сбалансированного компонентного состава миелотрансплантата. Особое место в этом процессе занимают физико-химические факторы низкотемпературного консервирования. Диапазон степени и характера влияния лимфогемопоетического комплекса достаточно широк от полной гибели или временной потери функциональной активности до их стимуляции [4]. При этом особенности изменения исходных свойств тестируемых клеток определяются выбранными режимами замораживания-отогрева клеточных суспензий [21]. Все это подтверждает идею базисного тезиса криобиологии о том, что степень влияния ведущих физико-химических факторов на биологические объекты определяется условиями выбранных режимов криоконсервирования [3]. Недавно полученные нами данные также говорят о возможности использования различных режимов низкотемпературного консервирования как фактора селекции из костного мозга акцессорных клеток, регулирующих кроветворную функцию КОЕ_с [5]. Регуляторная активность этих клеток в отношении гемопоетических предшественников реализуется при участии костномозговых Thy-1,2^+ лимфоцитов, то есть клеток, принимающих участие в реализации РТПХ [13]. На основании вышеиз-



ложенного в данной работе были изучены особенности развития РТПХ при трансплантации аллогенного костного мозга, подвергнувшегося низкотемпературному воздействию с вариациями некоторых параметров технологического процесса криоконсервирования.

Эксперименты выполнены на мышах линий СВА и (СВАхС57ВL)F₁ массой 22-24 г. Костный мозг был получен из бедренных костей на среде 199 с необходимыми добавками. Адгезию клеток проводили в чашках Петри, инкубируя суспензию костного мозга при 24 °С дважды в течение 40 мин. Фракцию адгезивных клеток снимали с чашек резиновым шпателем.

При сравнительном изучении РТПХ-активности костного мозга летально облученным мышам (СВАхС57ВL)F₁ внутривенно вводили суспензию нативных или криоконсервированных миелокариоцитов мышей СВА без или с измененным компонентным составом (лишенную фракции АК). О развитии и интенсивности “вторичной болезни” судили по таким показателям, как снижение массы тела и выживаемости животных, степени выраженности аплазии лимфатических узлов и тимуса (индексы лимфоузлов и тимуса). Индексы были посчитаны путем деления относительной массы органа (масса органа: масса тела) животных подопытных групп на относительную массу органа мышей контрольной группы:

$$\frac{\text{масса органа}}{\text{масса тела}} (\text{опытн. группа}) : \frac{\text{масса органа}}{\text{масса тела}} (\text{контр. группа}) = \text{индекс}$$

Индексы больше 1,3 и меньше 0,7 были оценены как проявление “вторичной болезни” [10]. В качестве контроля была взята группа облученных мышей с трансплантатом сингенного костного мозга. Криоконсервирование костного мозга осуществляли на установке УОП-6 производства ИПКиК НАНУ, г. Харьков. Были выбраны два режима криоконсервирования. В первом случае под защитой криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрации 10% — режим К-I; во втором — полиэтиленоксида (ПЭО) с молекулярной массой 400 в концентрации 7,5% — режим К-II. Скорость замораживания в обоих случаях составляла 1 °С/мин до -25 °С с последующим погружением проб в жидкий азот. Размораживание суспензии проводили на водяной бане при температуре 39-40 °С в течение 1 мин. Детально процедура криоконсервирования костного мозга описана ранее [7]. Для идентификации в костном мозге и его фракциях клеток, относящихся к Т-ряду, были использованы моноклональные антитела (МАТ) к антигену Thy-1,2; L3T4 и LyT2, с помощью которых в цитотоксическом тесте и прямым пеннинг-методом был определен процент клеток с указанными фенотипическими признаками. МАТ были получены из лаборатории иммунохимии Института канцерогенеза РАМН. Комплементзависимый цитотоксический тест был выполнен, как описано ранее [8], пеннинг-метод в соответствии с указаниями авторов [15]. В экспериментах были использованы пластиковые планшеты (Zinbro) с диаметром ячеек 16 мм, в которые вносили МАТ к Thy-1,2 в разведении 1:300. Неприкрепившиеся МАТ удаляли, после чего в ячейки вносили суспензию костного мозга в концентрации 4×10^6 /мл ядерных клеток в объеме 0,5 мл (предварительно истощенного по адгезивным клеткам); аналогичная манипуляция была проведена с фракцией адгезивных клеток костного мозга (АККМ). Обе суспензии инкубировали при 4 °С в течение 70 мин, после чего неприкрепившиеся на МАТ клетки (Thy-1,2⁻) удаляли мягким пипетированием. Сорбированные клетки (Thy-1,2⁺) снимали с антител жестким пипетированием. По разнице количественного содержания клеток в надосадке (неприкрепившейся фракции) и цельной суспензии (а также снятой жестким отмыванием) подсчитывали процент Thy-1,2⁺ клеток в костном мозге и фракции АККМ.

Облучение животных осуществляли на установке РУМ-17 в дозе 850-870 Р, мощность дозы — 38,6 Р/мин, напряжение — 220 кВ, сила тока — 10 мА, фильтры — IСu+IAl. Через 4 ч после облучения мышам-реципиентам в

объеме 0,2 мл вводили соответствующую поставленной задаче дозу клеток костного мозга. Колониеобразующую активность кроветворных предшественников в суспензии миелоариоцитов оценивали по методу [20], предшественников стромальных элементов (КОЕ_ф) — по методу [11]. Полученные данные обработаны статистически [1].

Представляло интерес определение исходного уровня содержания Т-клеток в костном мозге и его фракциях. Для подтверждения корректности метода идентификации Thy-1,2⁺ клеток в качестве контрольного образца были взяты тимоциты мышей-доноров костного мозга, основная масса которых, как известно [2], экспрессирует Thy-1,2 антиген. Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что в костном мозге мышей СВА/Н содержится около 2% Thy-1,2⁺ клеток. Этот показатель получен при использовании пеннинг-метода, так как порог чувствительности цитотоксического теста значительно выше и не позволяет определить такую малую величину. В силу этих же причин не удалось с помощью цитотоксического теста определить содержание в костном мозге зрелых Т-клеток с фенотипом L3T4 и LyT2, хотя по данным литературы [17] количество этих клеток совпадает с количеством Thy-1,2⁺ и близко полученному нами показателю.

Сравнительная оценка Thy-1,2⁺ клеток в костном мозге и тимусе интактных мышей, выделенных с помощью пеннинг-метода ($n = 12$)

Орган	% сорбированных клеток на МАТ	% мертвых Thy-1,2 ⁺ клеток в цитотоксическом тесте после добавления комплемента		% сохранных клеток после пеннинга
		в планшете	в суспензионной культуре	
Костный мозг	1,8±0,8	5,3±1,0	65,0±2,4	96,3±1,4
АККМ	9,8±5,6	79,6±3,4	86,3±4,2	84,8±1,8
Тимус	61,0±7,3	100,0±1,2	90,2±2,3	87,0±1,2

Обращает на себя внимание тот факт, что не все снятые с антител Thy-1,2⁺ клетки погибали в цитотоксическом тесте с этими же антителами. По-видимому, это обусловлено различной плотностью Thy-1,2 антигена на Thy-1,2⁺ клетках, определяющей литическую активность комплементзависимой цитотоксической реакции [19].

Полученные в этих же экспериментах результаты свидетельствуют о наличии в костном мозге около 15% клеток, обладающих адгезивными свойствами — АККМ, что также находится в соответствии с данными литературы [6]. Морфологическая оценка показала присутствие в этой фракции примерно 20–25% клеток, относящихся к лимфоидным элементам. Среди АККМ методом пеннинга было выявлено от 6 до 8% Thy-1,2⁺ клеток, то есть в несколько раз больше, чем в нефракционированном костном мозге. Как было отмечено нами ранее [4], фракция Thy-1,2⁺ клеток костного мозга помимо клеток Т-ряда содержит малодифференцированные КОЕ_с-12. Тем не менее проверка колониеобразующей активности фракции АККМ *in vivo* показала, что она не обладала выраженной способностью формировать гемопоэтические колонии, следовательно, во фракции АККМ антиген экспрессируют клетки, не относящиеся к кроветворным предшественникам. В целом, полученные результаты согласуются с представлением о способности аллогенного костного мозга грызунов инициировать РТПХ не в острой форме за счет присутствия высокого процента Т-клеток, а в виде “вторичной болезни” [12], что и было подтверждено результатами следующей серии экспериментов.

Как известно, основные симптомы “вторичной болезни” у мышей-реципиентов аллогенного костного мозга начинают проявляться с 4-й недели посттрансплантационного периода и выражаются в постепенном снижении массы тела, атрофии лимфоидной ткани [18] и как следствие — гибели животных. При оценке изменения массы тела реципиентов с трансплантатом интактного нативного (I-я опытная группа), нативного без фракции АККМ (II-я опытная группа) и сингенного (III-я группа, контроль) костного мозга было установлено быстрое снижение массы тела в посттрансплантационном периоде у ре-

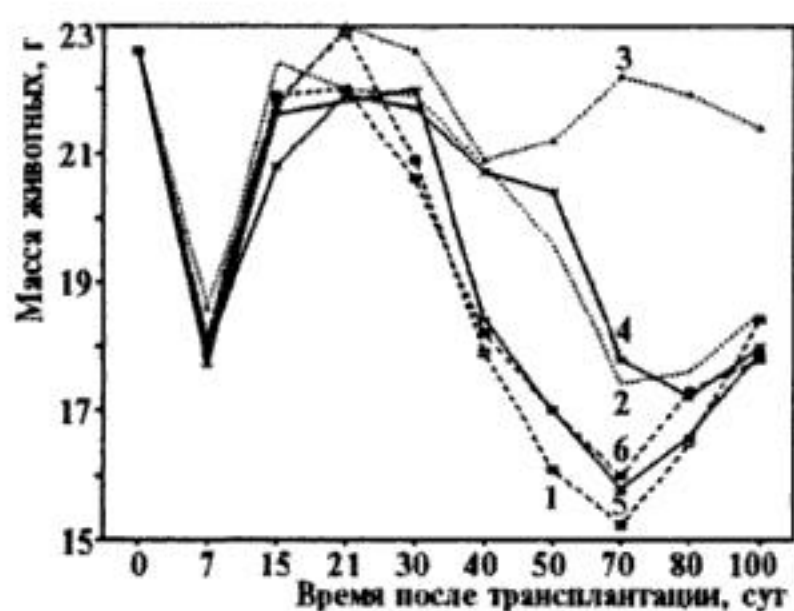


Рис. 1. Динамика изменения массы тела летально облученных мышей после трансплантации костного мозга: 1 – нативного интактного, 2 – нативного без АККМ, 3 – сингенного, 4 – крио-II, 5 – крио-I, 6 – крио-II+ АККМ

ципиентов всех групп на 1-й неделе. К концу 2-й недели данный показатель практически достигал нормы, оставаясь на этом уровне почти до конца 3-й недели. С этого времени прослеживается четкая зависимость изменения массы тела реципиентов от вида трансплантируемого костного мозга (рис. 1). У мышей контрольной группы показатель оставался в пределах нормы на протяжении всего срока наблюдения. В опытных же группах отмечалось постепенное снижение массы тела. В наибольшей степени такие изменения наблюдались в I-й группе мышей с

трансплантатом нативного интактного костного мозга. Предварительная элиминация из костного мозга АК (II-я группа) сопровождалась более поздним началом и менее выраженным снижением массы тела реципиентов. Подобная динамика снижения массы тела была отмечена и у реципиентов с трансплантатом криоконсервированного в режиме К-II костного мозга (IV-я группа). При этом добавление к криоконсервированной в этом режиме суспензии АК в объеме, содержащемся в интактном костном мозге, то есть 15-18%, приводило к более выраженному снижению массы тела мышей (VI-я группа). Необходимо отметить, что в этом случае характер изменения показателя был практически аналогичным тому, который получили в V-й группе животных с трансплантатом криоконсервированного в режиме К-I костного мозга.

Характеризуя динамику изменения данного показателя, нужно отметить также, что независимо от вида алломиелотрансплантата примерно с 70-х сут отмечалось выраженное восстановление массы тела реципиентов, хотя даже к концу срока наблюдения у выживших животных она не достигала контрольных величин. Это свидетельствует о том, что хронически текущая РТПХ вызывает существенные и длительные нарушения гомеостатического постоянства организма реципиентов и требует специальной терапии, включающей и иммуномодулирующий компонент [13].

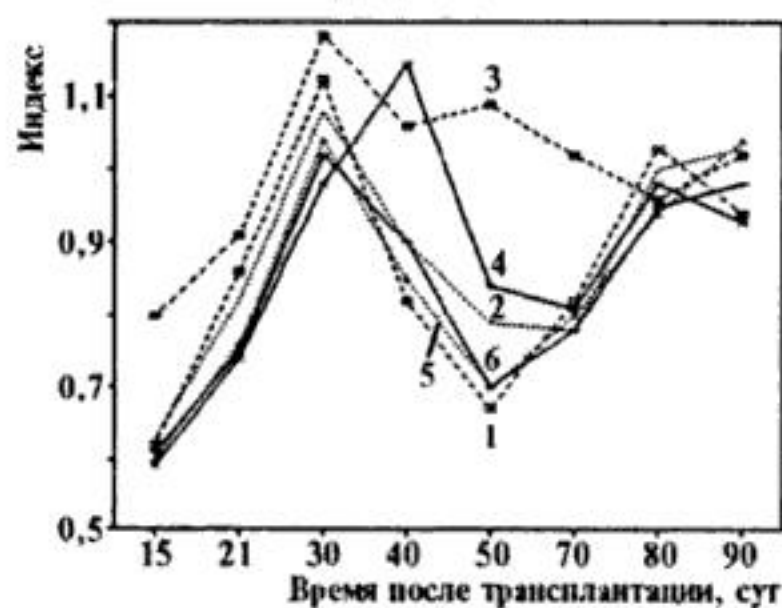


Рис. 2. Индекс лимфоузлов летально облученных мышей после трансплантации костного мозга: 1 – нативного интактного, 2 – нативного без АККМ, 3 – сингенного, 4 – крио-II, 5 – крио-I, 6 – крио-II+ АККМ

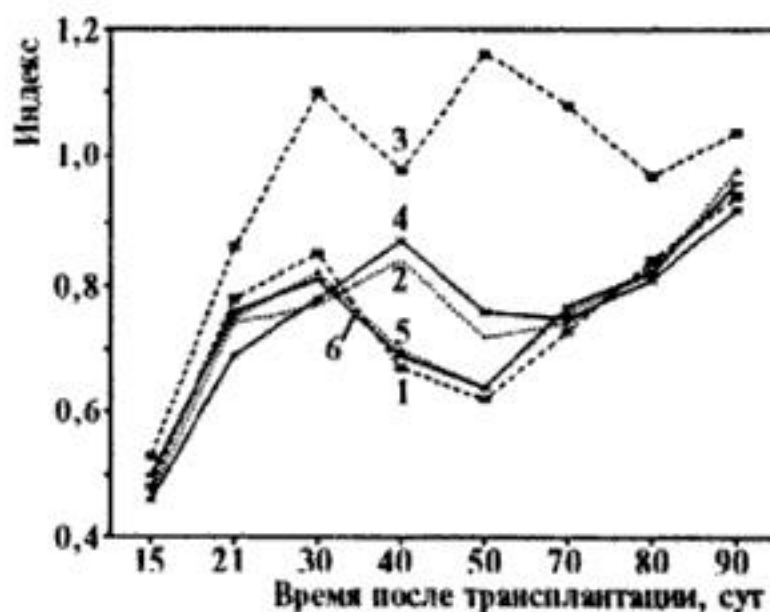


Рис. 3. Индекс тимуса летально облученных мышей после трансплантации костного мозга: 1 – нативного интактного, 2 – нативного без АККМ, 3 – сингенного, 4 – крио-II, 5 – крио-I, 6 – крио-II+ АККМ

Одним из характерных признаков развивающейся “поздней” РТПХ у мышей является аплазия центральных и периферических лимфоидных органов. Подтверждение данного тезиса мы находим и в полученных нами результатах. Действительно, индекс тимуса и лимфоузлов, характеризующий, по крайней мере, количественный показатель состояния органов, четко свидетельствует о развитии “вторичной болезни” у животных всех подопытных

групп (рис. 2, 3). При этом прослеживается та же закономерность интенсивности развития синдрома в зависимости от вида трансплантируемого костного мозга, которая характерна и для изменения массы тела животных (рис. 1). При анализе данной информации обращает на себя внимание следующий факт. Судя по индексу лимфоузлов (рис. 2), в постлучевом периоде состояние органов уже к 30-м сут было близким к контролю. И в период после максимальной выраженности РТПХ этот показатель достоверно не отличался от контроля примерно к 80-м сут. В то же время тимус претерпевал явно более выраженные изменения в течение всего срока наблюдения. Прежде всего в постлучевом периоде регенерация органа, в отличие от лимфоузлов, не достигала его исходных величин (рис. 3). Далее "постиммуноконфликтный" период восстановления состояния органа был пролонгирован как минимум на 10 дней. И наконец, минимальные показатели абсолютных величин индекса тимуса при развитии РТПХ были ниже, чем лимфоузлов. То есть центральный орган иммунитета при трансплантации аллогенного костного мозга является наиболее "чувствительным" как в индикации начала развития синдрома, так и степени его проявления. Помимо имеющих точек зрения относительно аплазии лимфоидных органов при РПТХ [13], указанные различия могут быть объяснены с позиций рассмотрения синдрома как мощного стрессорного фактора. В этой ситуации лимфоидные органы с большим содержанием Т-лимфоцитов, чувствительных к глюкокортикоидам, будут отвечать большей аплазией при повышении их концентрации. В тимусе такие клетки локализуются, как известно, в кортикальной зоне, которая, по данным гистологического анализа, при РТПХ подвергается наибольшему опустошению [18]. Доля Т-зон в лимфоузлах составляет лишь определенную часть органа [8], что, видимо, отражается и на характере проявления выраженности синдрома.

Интегральным показателем, характеризующим степень развития РТПХ, в том числе и после трансплантации аллогенного костного мозга, является гибель (выживаемость) животных. Представленные на рис. 4 данные о выживаемости реципиентов контрольной и опытных групп являются четким подтверждением тех особенностей развития синдрома, которые были отмечены при оценке характера изменения массы тела и индексов тимуса и лимфоузлов животных. В группах с максимальными изменениями этих показателей наблюдается и наиболее выраженная гибель мышей. Обращает на себя внимание и факт, отмеченный при сопоставлении состояния тимуса реципиентов и их выживаемости. Независимо от вида алломиелотрансплантата максимальная аплазия тимуса развивается примерно к 50-м сут, и с этого же времени прослеживается резкое повышение гибели реципиентов костного мозга. То есть выраженная гибель животных с этого времени является, очевидно, "следовой" реакцией развивающихся патологических процессов в организме, в том числе обусловленных и разбалансировкой морфофункционального состояния тимуса, регулятора состояния иммунитета и метаболических процессов в организме [9]. Данный аспект может иметь прикладное значение в плане возможного проведения в определенные сроки посттрансплантационного периода соответствующей терапии, что, однако, требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

На основании полученных данных становится очевидным, что по всем выбранным критериям оценки интенсивность и время начала развития позд-

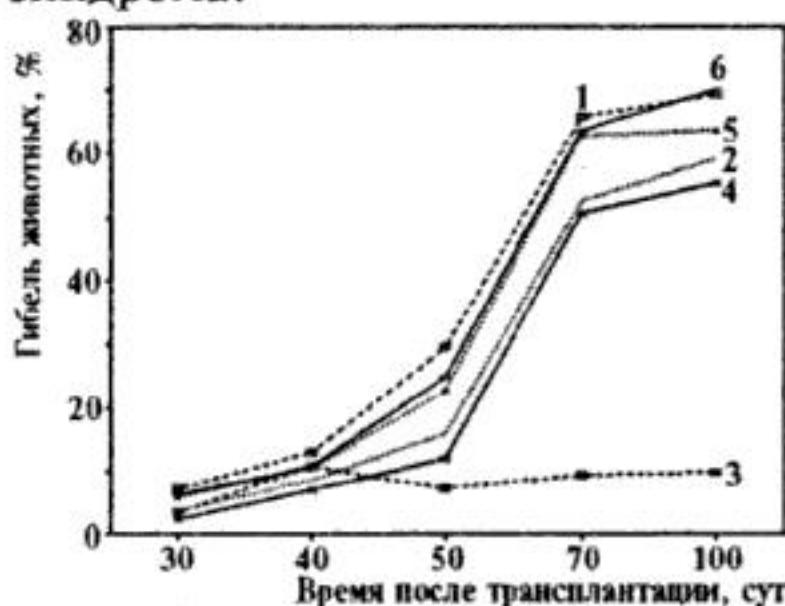


Рис. 4. Гибель летально облученных мышей после трансплантации костного мозга: 1 - нативного интактного, 2 - нативного без АККМ, 3 - сингенного, 4 - крио-II, 5 - крио-I, 6 - крио-II+ АККМ

ней РТПХ (“вторичной болезни”) во многом обусловлены характером трансплантируемого костного мозга, а именно его компонентным составом. В ряде случаев получены близкие результаты при пересадке нативного интактного костного мозга или с измененным компонентным составом и костным мозгом, криоконсервированным в том или ином режиме. Например, РТПХ-активность костного мозга, криоконсервированного в режиме К-I, была близка нативному костному мозгу, а криоконсервированного в режиме К-II — нативному костному мозгу без АК. Как показали ранее полученные нами данные [5], режим К-I в сравнении с режимом К-II обеспечивает более высокую сохранность кроветворных и стромальных предшественников (КОЕ_с и КОЕ_ф). Не удивительно, что и по своей РТПХ-активности такой костный мозг приближается к нативному. Невысокая способность режима К-II обеспечивать выживаемость предшественников стромальных элементов, входящих во фракцию АККМ, сопровождается проявлением феноменологии, подобной трансплантации костного мозга без фракции АК. То есть режим К-II выступает в данном случае как фактор, селективно элиминирующий АККМ из миелотрансплантата. Более того, эти данные демонстрируют значимость компонентного состава костного мозга в проявлении его функциональных свойств, доказывая “трансплантабельность” фракции АККМ. Они дают основание считать ее важным компонентом в обеспечении не только гемопоэтической активности костного мозга в сингенной системе, но и его аллореактивности. Подтверждением являются результаты по усилению РТПХ-активности криоконсервированного костного мозга (в режиме К-II), введенного совместно с фракцией АККМ (VI-я группа). Не исключено, что такое усиление обусловлено, как уже отмечалось выше, содержанием во фракции АККМ определенного процента клеток Т-ряда, причем в более высокой концентрации, чем в интактном костном мозге. Для оценки РТПХ-активности фракции АК в дополнительной серии экспериментов (данные не приведены) АККМ в объеме, аналогичном костному мозгу (5×10^6 /мышь), были введены облученным аллогенным реципиентам самостоятельно. Нам не удалось получить информацию о способности АККМ инициировать “вторичную болезнь”, так как практически вся группа реципиентов погибла в первые две недели посттрансплантационного периода с симптомами аплазии кроветворения, что не удивительно, если учесть неспособность выделенной данным способом фракции АККМ восстанавливать гемопоэз [5]. Тем не менее по ряду показателей фракция АККМ усиливала интенсивность течения острой формы РТПХ при совместном введении со спленоцитами. Неоднократно указывалось на важную роль относящихся к акцессорно-регуляторным элементам цитокинпродуцирующих клеток миелотрансплантата в инициации острой РТПХ [12]. Именно эти клетки обуславливают развитие так называемого “цитокинового шторма” в организме реципиента [13]. Полученные в данной работе результаты являются основанием для заключения об участии АККМ, в состав которых входят факторпродуцирующие элементы, и в развитии хронической РТПХ. Более того, они дают основание считать, что определенные режимы криоконсервирования выступают как фактор элиминации (ингибиции функции) некоторых регуляторно-акцессорных элементов костного мозга и возможности использования таких режимов с целью снижения аллореактивности миелотрансплантата. Отдельно заслуживают внимания отмеченные выше результаты экспериментов, указывающие на отсутствие колониеобразующей активности АККМ. Они находятся в некотором противоречии с данными [14], свидетельствующими о присутствии во фракции АККМ мышей кроветворных предшественников и ее способности восстанавливать гемопоэз, обеспечивающий высокую выживаемость летально облученных животных. Адгезия на пластике, как считают авторы, является прототипом важнейшего свойства стволовых элементов — способности взаимодействовать с кроветворным микроокружением *in vivo*. Однако это свойство обус-

ловлено, очевидно, условиями инкубации костного мозга на пластике. Используемая авторами температура 37 °С является близкой к естественной температуре тела мышей, при которой стволовые клетки экспрессируют рецепторы адгезии. Изменение оптимума температур, то есть выбранных нами условий экспозиции при 23–24 °С, по-видимому, приводит к модификации состояния этих рецепторов, лишая способности стволовые клетки взаимодействовать с пластиком. Из этого следует важный вывод о строго температурозависимом процессе проявления *in vivo* и *in vitro* функциональных свойств рецепторов адгезии кроветворных предшественников, протекающем в узком диапазоне физиологических температур организма. Подтверждением этому, по-видимому, являются результаты выполненных нами ранее экспериментов по хомминг-активности кроветворных предшественников криоконсервированного костного мозга [4], свидетельствующие о выраженном снижении способности КОЕ_с расселяться в кроветворном микроокружении реципиента в ранние сроки посттрансплантационного периода. Следовательно, условия температурной “предобработки” костного мозга существенным образом сказываются на качественном и, очевидно, количественном составе фракции клеток, проявляющих адгезивную способность. Если принять во внимание результаты снижения гемопоэтической активности костного мозга после изменения его компонентного состава (элиминация АККМ, криоконсервирование в режиме К-II и т.д.), становится очевидной необходимость поиска таких режимов обработки аллогенного костного мозга, которые при минимизации его РТПХ-активности обеспечивали бы максимум защитного потенциала. Решению этой задачи посвящены наши дальнейшие исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы микробиологических исследований. – Л.: Медицина, 1972. – 180 с.
2. Белокрылов Г.А. Thy-антиген и его функции // Усп. совр. биологии. – 1986. – 102, № 1. – С. 39–51.
3. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 431 с.
4. Гольцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на иммунобиологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. дис....д-ра мед. наук. – Харьков, 1988. – 35 с.
5. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток (КОЕ_с) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Пробл. кробиологии. – 1993, № 3. – С. 34–40.
6. Дыгай А.Т., Шахов В.П. Роль межклеточных взаимодействий в регуляции гемопоэза. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1989. – 224 с.
7. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А.А.Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
8. Лимфоциты: Методы // Под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990. – 386 с.
9. Санин А.В. Образование селезеночных колоний стволовыми кроветворными клетками, экспрессирующими детерминанты I-S // Иммунология. – 1986. – № 5. – С. 11–14.
10. Семенов В.Ф. Использование РТПХ для специфического подавления гематотрансплантационного иммунитета у взрослых мышей // Бюл. эксп. биол. и мед. – 1970. – № 7. – С. 78–81.
11. Фридрихейн А.Я., Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В. Стволовые стромальные клетки костного мозга // Стволовые клетки и опухолевый рост. – 1985. – Киев: Наук. думка. – С. 80–87.
12. Шевелев А.С. Реакция “трансплантат против хозяина” и трансплантационная болезнь. – М.: Медицина. – 1976. – 237 с.
13. Antin J.H., Ferrara J.L.M. Cytokine dysregulation and acute graftversus-host disease // Blood. – 1992. – 80, № 12. – P. 2964–2968.
14. Gordon M.Y., Bearpark A.D., Clarke D. Hemopoietic stem cell subpopulation in mouse and man: discrimination by differential adherence and marrow-repopulation ability // Bone Marrow Tr. – 5 Suppl. – P. 6–8.
15. Greenberg P., Baker S. Immunologic selection of hemopoietic precursor cells utilising antibody-mediated plate binding (“penning”) // Blood. – 1985. – 65, № 1. – P. 190–197.
16. Harada M., Tanigaki S., Akashi K. Cytokine monitoring after bone marrow transplantation // Exp. Hem. – 1990. – 18, № 6. – 221 p.
17. Hubi R.D., Lanossy G., Lampert I.A. Cyclosporin A prevents *in vivo* development of murine prothymocytes from incommited (Thy-1) precursor cells // Immunology. – 1989. – 68, № 5. – P. 564–569.

18. Kornbluth M., Yaleri E., Desbarats J. T cell subsets in the thymus of graft-versus-host immunosuppressed mice // Transplantation. – 1991. – 51, № 1. – P. 262–267.
19. Muller-Seiburg C.E., Whitloc C.A., Weissman I.L. Isolation of two early B-lymphocyte progenitors from mouse bone marrow // Cell. – 1986. – 44, № 4. – P. 653–662.
20. Till S.P., McCulloch E.A. A direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Radiat. Res. – 1961. – 14. – P. 213–222.
21. Venkataraman M. Cryopreservation-induced enhancement of interleukin-2 production in human peripheral blood mononuclear cells // Cryobiology. – 1992. – 29, № 2. – P. 165–175.

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

Поступила 10.04.96

А.М.ГОЛЬЦЕВ, О.Д.ЛУЦЕНКО, Л.В.ОСТАНКОВА, Т.Г.ДУБРАВА, О.В.ОПАНАСЕНКО

МОЖЛИВОСТІ КРІОБІОЛОГІЇ У ВИРІШЕННІ ІМУНОКОНФЛІКТНИХ ПРОБЛЕМ ПРИ ПЕРЕСАДЦІ ГІСТОНЕСУМІСНОГО КІСТКОВОГО МОЗКУ

Інститут проблем криобиології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчені особливості розвитку реакції “трансплантат проти господаря” (РТПГ) в залежності від компонентного складу кріоконсервованого мієлотрансплантату. Очевидна необхідність пошуку таких режимів обробки алогенного кісткового мозку, які при мінімізації його РТПГ-активності забезпечували б максимум захисного потенціалу.

A.N.GOLTSEV, E.D.LUTSENKO, L.V.OSTANKOVA, T.G.DUBRAVA, E.V.OPANASENKO

APPLICATION OF CRYOBIOLOGY IN SOLVING IMMUNE-CONFLICT PROBLEMS WHEN GRAFTING A HISTOCOMPATIBLE BONE MARROW

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

The authors investigated peculiar features of a “graft versus host” response (GVHR) depending on the component composition of the cryopreserved myelotransplant. A necessity for the search of such modes of treatment of the allogenic bone marrow, which would provide for the maximum of its protective potential when minimizing its GVHR-activity, was supported.

УДК 577.352.4

А.К.Гулевский, И.И.Щенявский

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ДЛИННОХВОСТЫХ СУСЛИКОВ

Обнаружены сезонные изменения в катионном составе эритроцитов длиннохвостых сусликов *Citellus undulatus*, которые, очевидно, связаны с обнаруженными также изменениями в работе систем обеспечения ионного баланса клетки (Na^+/K^+ -насос и пассивный транспорт). Эти явления, по всей видимости, не зависят от функционального состояния гибернатора — зимняя спячка, искусственное пробуждение, летнее бодрствование.

Как известно, для выживания клеток при понижении температуры критическое значение имеет их способность поддерживать ионный баланс, составляющими которого являются высокое внутриклеточное содержание K^+ и низкое содержание Na^+ и Ca^{2+} . Потеря внутриклеточного K^+ и избыточное поступление в цитоплазму Na^+ и Ca^{2+} ведут к набуханию клеток, утрате клеточных функций и, в конечном счёте, к гемолизу [1, 9].

Показано, что ткани (кора почек, печень, скелетные мышцы, аорта) и клетки (эритроциты, клетки коры почек) гибернаторов (суслик Ричардсона, 13-полосный суслик, длиннохвостый суслик, бурундук, хомячок, ёж, летучая мышь) проявляют большую холодостойкость, чем ткани и клетки негибернаторов (крыса, морская свинка, человек). Это выражается, в частности, в лучшем сохранении ими внутриклеточного содержания K^+ после нескольких дней хранения при температуре 5 °C [8].

Поскольку распределение ионов между клеткой и окружающей средой включает их активное перекачивание и пассивный транспорт, и в результате охлаждения активный транспорт подавляется сильнее, чем пассивный вход [10], понятно, что для поддержания ионного баланса при пониженной температуре (5 °С) активный транспорт должен сохранять скорость, а пассивная проницаемость должна уменьшаться. Именно эти условия и имеют место в случаях гибернации зимнеящих животных и гипотермического хранения их эритроцитов. Известно также, что резистентность к гипотермии клеток гибернаторов существенно зависит от их функционального состояния [2, 3], поэтому представляет чрезвычайный интерес изучение изменений параметров ионного гомеостаза клеток гетеротермных животных в зависимости от функционального состояния (зимняя спячка, искусственное пробуждение зимой и летнее бодрствование).

Объектом исследований служили эритроциты длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*), находящихся в различных функциональных состояниях: во время зимней спячки, после искусственного пробуждения, вызванного путём переноса из охлаждаемого помещения (2–4 °С) в отапливаемое (20 °С), и в состоянии летнего бодрствования. У животных первых двух групп кровь бралась после их декапитации на протяжении зимних месяцев, а у бодрствующих — с марта по сентябрь. В качестве антикоагулирующего раствора для крови животных использовали раствор, содержащий 2% глюкозы и 3% трёхзамещённого цитрата натрия. Содержание K^+ и Na^+ в эритроцитах определяли методом пламенной фотометрии [7] на пламенном фотометре ПАЖ-1. Эритроциты предварительно отмывали от плазмы средой, содержащей 0,15 М холинхлорида и 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4, путём 3-кратного центрифугирования при 1500 g в течение 10 мин. При этом плёнка лейкоцитов, лежащая на поверхности осадка подвергнутых центрифугированию эритроцитов, тщательно удалялась. Затем добавлением $HClO_4$ производили разрушение клеток и осаждение белков, после чего измеряли содержание катионов в перхлорном экстракте. Определение входа $^{86}Rb^+$ в эритроциты проводили по методу [4]. Эритроциты отмывали от плазмы 3-кратным центрифугированием при 1500 g в течение 10 мин средой, содержащей 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$, 5 мМ глюкозы и 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4; 0,5 мл осадка суспендировали в 5,5 мл среды инкубации, которая содержала 120 мМ NaCl, 10 мМ RbCl, 2 мМ глюкозы, 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4 и 1 мккюри/мл $^{86}RbCl$. Пробы инкубировали при температуре 37 °С на водяной бане. Через каждые 30 мин в течение 2 ч из суспензии отбирали 1 мл и трижды отмывали холодной средой инкубации, не содержащей радиоактивности. Осадок лизировали в холодной дистиллированной воде и просчитывали пробы в сцинтиляционном счетчике. Для определения пассивного переноса $^{86}Rb^+$ в часть проб перед началом инкубации добавляли ингибитор активного транспорта — оуабаин. Для определения неспецифической сорбции изотопа в среде с $^{86}Rb^+$ суспензию центрифугировали сразу же после суспендирования и осадок обрабатывали как описано выше.

Полученные результаты показывают, что по мере приближения весенне-летнего сезона наблюдается постепенное увеличение содержания K^+ как в клетках животных, пребывающих во время взятия крови в состоянии спячки, так и в эритроцитах, полученных из крови искусственно пробуждённых животных. Наиболее высоким оно становится к концу марта, когда некоторые животные окончательно прекращают зимнюю спячку и переходят к активному образу жизни. Причём показатели спящих и искусственно пробуждённых животных в это время приближаются к показателям активных сусликов, которые не спали примерно в течение 2 недель даже в условиях холодовой комнаты (2–4 °С). В апреле практически все животные прекращают гибернацию, поэтому в дальнейших исследованиях наблюдали только активных сусликов. Показано, что с марта по май продолжается увеличение содержания K^+ в эритро-

цитах сусликов, которое затем начинает понижаться и к началу сентября достигает уровня, характерного для спящих и искусственно пробуждённых в январе-феврале животных (рис. 1).

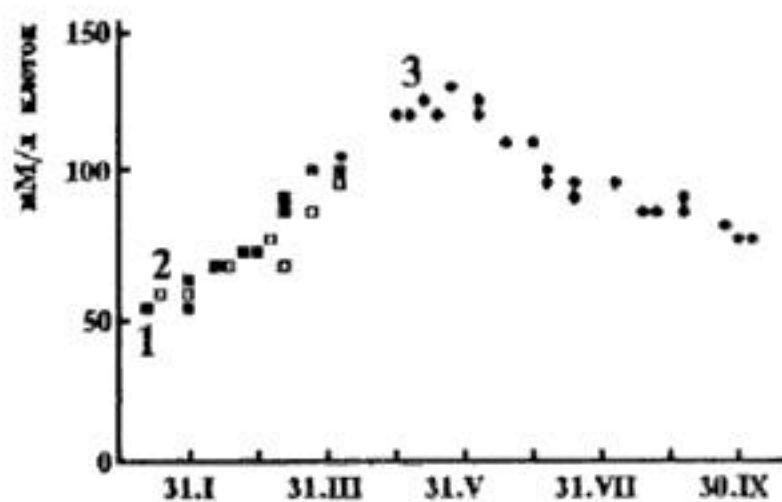


Рис. 1. Сезонные изменения внутреннего содержания K^+ в эритроцитах длиннохвостых сусликов: 1 — спящие животные; 2 — искусственно пробуждённые; 3 — активные

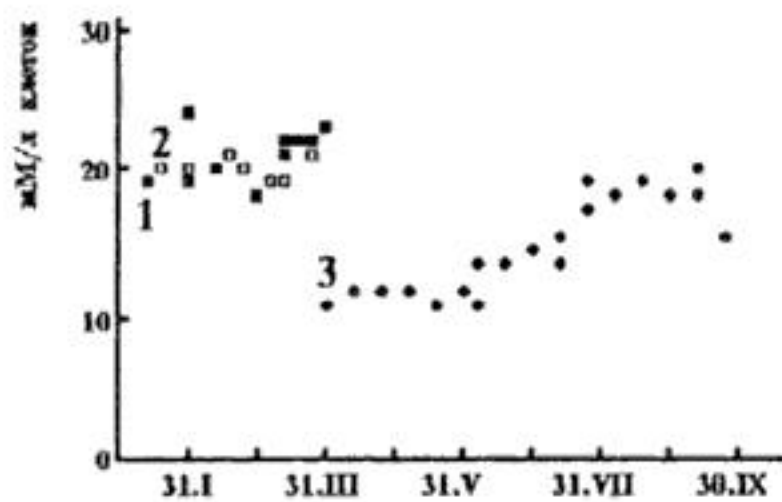


Рис. 2. Сезонные изменения внутреннего содержания Na^+ в эритроцитах длиннохвостых сусликов: 1 — спящие животные; 2 — искусственно пробуждённые; 3 — активные

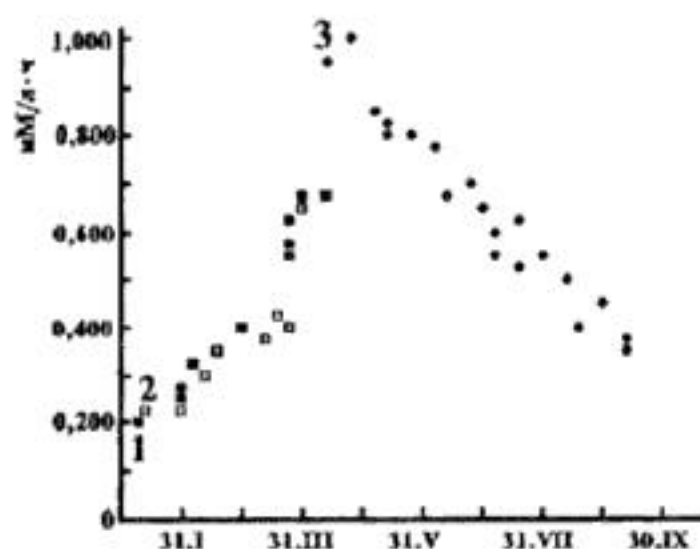


Рис. 3. Сезонные изменения скорости оуабаинзависимого входа $^{86}Rb^+$ в эритроциты длиннохвостых сусликов: 1 — спящие животные; 2 — искусственно пробуждённые; 3 — активные

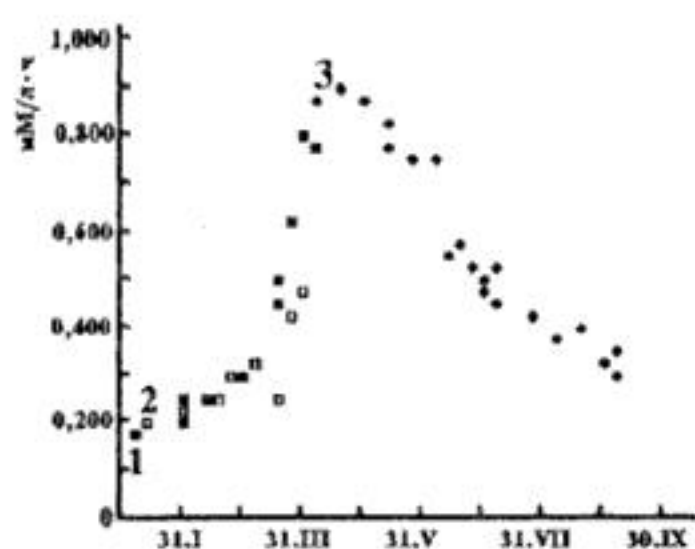


Рис. 4. Сезонные изменения скорости оуабаиннезависимого входа $^{86}Rb^+$ в эритроциты длиннохвостых сусликов: 1 — спящие животные; 2 — искусственно пробуждённые; 3 — активные

Что касается содержания другого одновалентного катиона — Na^+ , то изменений его внутриклеточного состояния на протяжении зимы отмечено не было. Этот показатель заметно снижался только у активных животных с марта по май, а затем он начинал постепенно возрастать и уже к концу сентября, когда животные готовятся к зимней спячке, становился столь же высоким, как у спящих и искусственно пробуждённых в январе-феврале животных (рис. 2). С результатами исследований сезонных изменений внутриклеточного содержания одновалентных катионов в эритроцитах длиннохвостых сусликов хорошо коррелируют данные, полученные при изучении скорости накопления $^{86}Rb^+$ теми же клетками. Показано, что как скорость оуабаинзависимого входа $^{86}Rb^+$, отражающая работу Na^+/K^+ -насоса (рис. 3), так и скорость оуабаиннезависимого входа $^{86}Rb^+$, отражающая пассивную проницаемость эритроцитарной мембраны для иона K^+ (рис. 4), постепенно увеличивались с приближением весны и у спящих, и у активных животных. С приближением же осени у активных животных оба эти показателя параллельно снижались. Если в марте они достигали наиболее высокого уровня, то к началу сентября они опускались до уровня, характерного для зимних месяцев.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии значительных сезонных изменений внутреннего ионного состава эритроцитов длиннохвостых сусликов *Citellus undulatus*, не связанных с функциональным состоянием (спячка, пробуждение или бодрствование) этого гибернатора. Поэтому расхождения в соответствующих данных, полученных разными авторами [5, 6] на эритроцитах гибернирующих животных других видов, могут объясняться тем, что измерения проводились ими в разные месяцы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 256 с.
2. Загнойко В.И., Гулевский А.К., Щенявский И.И. и др. Ионный гомеостаз эритроцитов животных, находящихся в зимней спячке, в условиях гипотермии // Цитология. – 1990. – 32, № 9. – С. 926–927.
3. Загнойко В.И., Гулевский А.К., Щенявский И.И. и др. Особенности структурнофункционального состояния эритроцитов гомойотермных и гетеротермных животных в условиях гипотермического хранения // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1991. – 27, № 14. – С. 432–436.
4. Лишко В.К. Натриевый насос биологических мембран. – Киев: Наук. думка, 1977. – 144 с.
5. Лоевский М.М., Жегунов Г.Ф. Содержание катионов и фосфорорганических метаболитов гликолиза в эритроцитах сусликов в цикле зимней спячки // Механизмы зимней спячки. – Пуццино: Б. и., 1987. – С. 64–66.
6. Edwards B.A., Mundy K.A. Tissue and plasma electrolyte levels in awake state during the year, in summer cold exposure and during arousal from hibernation in the hedgehog (*Erinaceus europaeus*) // Comp. Biochem. Physiol. – 1974. – 49A, № 4. – P. 697–705.
7. Eilam V., Stein W.D. Studies of transport in red blood cell membranes // Methods in Membrane Biology. – New York, London: Plenum Press, 1974. – 2. – P. 283–354.
8. Kimzey S.L., Willis J.S. Resistance of erythrocytes of hibernating mammals to loss of K^+ during hibernation and during cold storage // J. Gen. Physiol. – 1971. – 58. – P. 620–633.
9. Leaf A. Maintenance of concentration gradients and regulation of cell volume // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1959. – 72. – P. 396–404.
10. Wang L.C.H. Life at low temperature: Mammalian hibernation // Cryo-Lett. – 1985. – 6. – P. 254–257.

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

Поступила 17.02.95

О.К.ГУЛЕВСЬКИЙ, І.І.ЩЕНЯВСЬКИЙ

СЕЗОННІ ЗМІНИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ВМІСТУ ОДНОВАЛЕНТНИХ КАТІОНІВ В ЕРИТРОЦИТАХ ДОВГОХВОСТИХ ХОВРАХІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Виявлені сезонні зміни в катіонному складі еритроцитів довгохвостих ховрахів *Citellus undulatus*, котрі, напевне, також пов'язані з виявленими змінами в роботі систем забезпечення іонного балансу клітини (Na^+/K^+ -насос та пасивний транспорт). Ці явища, очевидно, не залежать від функціонального стану гіbernатора — зимова сплячка, штучне пробудження, літнє неспання.

A.K.GULEVSKY, I.I.SHENYAVSKY

SEASONAL CHANGES IN THE INTRACELLULAR CONTENT OF THE MONOVALENT CATIONS IN RBC OF LONG-TAILED GROUND SQUIRRELS

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

The authors reported on the seasonal changes in the cation composition of RBC of the long-tailed ground squirrels *Citellus undulatus*, which relate, apparently, to the observed alterations in the functioning of the systems, providing for the ionic balance of the cell (Na^+/K^+ -pump and passive transport) as well. These events are likely to be independent of the functional state of hibernators (hibernation, artificial arousal, summering).

УДК 57.043

В.В.Рамазанов, В.А.Бондаренко

ДЕЙСТВИЕ ГЕМИНА И ДИДС НА ХОЛОДОВОЙ И ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ШОК ЭРИТРОЦИТОВ

Исследовали чувствительность эритроцитов к холодovому и гипертоническому шоку после воздействия модификаторами цитоскелета. Выявлено, что обработка эритроцитов геминoм приводит к блокированию развития холодovого и осмотической чувствительности, а также к устранению способности диизотиоцианостильбендисульфoната (ДИДС) повышать уровень гипертонического шока модифицированных клеток после инкубации в изоосмотической среде.

Изменение характера ассоциации цитоскелета с липидным бислоем мембраны во многом определяет направленность изменения формы клетки [5]. Данный процесс может контролироваться на участке связей цитоскелет-анкирин-белок полосы 3 [11] и вследствие модификации связей белка полосы 4.1 в цитоскелете [3]. Термотропные структурные преобразования в мембранах эритроцитов, происходящие при температуре 6,5–9,5 °С, связаны с изменениями структурного взаимодействия белка полосы 4.1 в мембране [6]. В то же время трансформация в сфероциты эритроцитов, инкубируемых в гипертонических средах при снижении температуры, также происходит в указанной области температур [13]. Из этого можно предположить, что белок полосы 4.1, включенный в мембранный комплекс цитоскелет-бислой, является одним из сайтов, воздействие на который косвенно или непосредственно приведет к изменениям в развитии холодовой и осмотической чувствительности эритроцитов. С учетом этого в данной работе были использованы специфические модификаторы, которые нарушают взаимодействие белков цитоскелета с мембраной. Одним из таких эффективных модификаторов является гемин, который свободно проникает через липидный бислой мембраны эритроцитов, связывается с белком полосы 4.1 [14]. Результатом такого взаимодействия является нарушение нативной конформации указанного белка и, как следствие, ослабление взаимодействия между компонентами мембраны с последующим разрушением цитоскелета и деструкцией клеток [9, 14, 15]. Обработка эритроцитов данным реагентом позволяет модифицировать цитоскелет без значительного лизиса клеток [14].

Другим модификатором является ДИДС, который необратимо связывается с белком полосы 3 на внешней стороне эритроцитарной мембраны [10, 12]. После связывания происходит его ковалентное взаимодействие с указанным белком [10], в результате чего модифицируются белок-белковые и липид-белковые взаимодействия [7, 8], в том числе, взаимодействия белка полосы 6 и гемоглобина с цитоплазматическим фрагментом белка полосы 3 [4]. Также отмечается изменение взаимодействия холестерина с белком полосы 3 в липидном бислое [8] и увеличение прочности связи цитоскелета с данным белком [7]. Указанные модификации при действии гемина и ДИДС могут являться причиной, способной привести к изменениям в характере развития холодового и гипертонического шока.

В работе использовались эритроциты донорской крови, отмытые раствором, содержащем 150 ммоль/л NaCl и 5 моль/л фосфат (pH 7,4). Эритроциты (20%-й гематокрит) обрабатывали геминем в среде, содержащей: KCl 90, NaCl 45, сахарозу 44, фосфат 10 ммоль/л (pH 7,4). Гемин добавляли в концентрации 300 мкмоль/л и инкубировали 10 мин при 37 °С [14]. После обработки эритроциты отмывали средой инкубации. Холодовой и гипертонический шок исследовали как было описано ранее [1]. ДИДС (4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфонат) добавлялся в среду при проведении опытов. Морфологию эритроцитов исследовали в световом микроскопе.

Полученные результаты показывают, что уровень чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку в интервале времени 2–60 мин после инкубации в среде, содержащей 0,86 моль/л сахарозу, не изменяется и составляет 70–80%. При этом отмечается рост холодовой чувствительности клеток в интервале времени 2–10 мин, и максимальный уровень гемолиза составляет 40–50% (рис. 1). Присутствие в среде инкубации ДИДС приводит к значительному ингибированию холодового и гипертонического шока (кривые 2, 4). В то же время прединкубация до 60 мин приводит к тому, что уровень гемолиза эритроцитов приближается к величине контроля, что указывает на обратимость модификации данным реагентом.

Обработка эритроцитов геминем приводит к подобным изменениям чувствительности эритроцитов к холодовому и гипертоническому шоку (рис. 2).

Можно предположить, что действие данных модификаторов на холодовую и осмотическую чувствительность эритроцитов определяется модификацией одной и той же структуры клетки. Как упоминалось выше, гемин непосредственно связывается с белком полосы 4.1, что приводит к нарушению нормального взаимодействия компонентов цитоскелета [14]. Если ингибирующее действие ДИДС также связано с модификацией структурных взаимодействий белка полосы 4.1 в мембране, то это действие не является прямым, а опосредуется через модификацию взаимодействий белка полосы 3 с белками цитоскелета [7]. Такое предположение подтверждается тем, что, во-первых, модификация связи белка полосы 3 с цитоскелетом при обработке парахлормеркурий-бензоатом (ПХМБ) не приводит к блокированию развития холодового и гипертонического шока эритроцитов, во-вторых, такая модификация устраняет действие ДИДС [2]. Кроме того, действие ДИДС на обработанные гемин эритроциты проявляется в большем блокировании холодовой и осмотической чувствительности (рис. 2, кривые 3, 6).

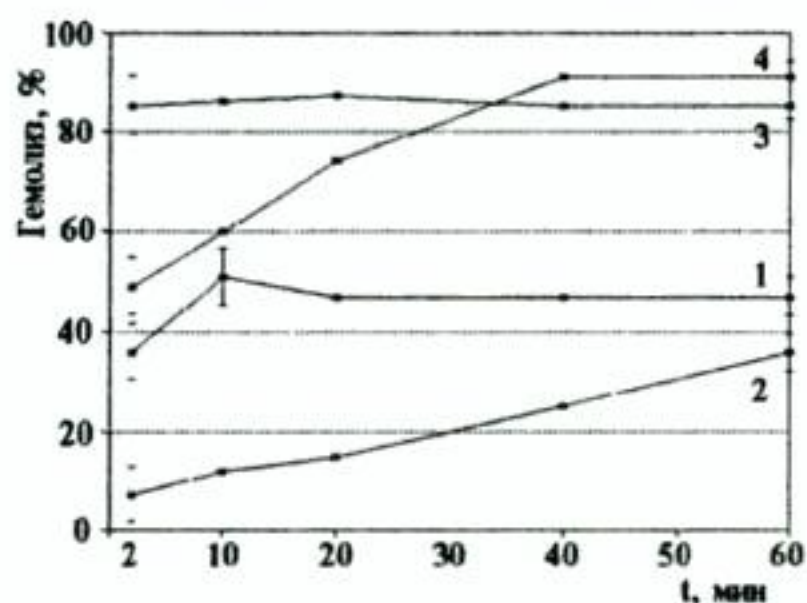


Рис. 1. Развитие чувствительности эритроцитов к охлаждению до 0 °С (1, 2) и гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl (3, 4) после инкубации при 37 °С в растворе, содержащем 0,86 моль/л сахарозу: 1, 3 – контроль; 2, 4 – ДИДС, 30 мкмоль/л

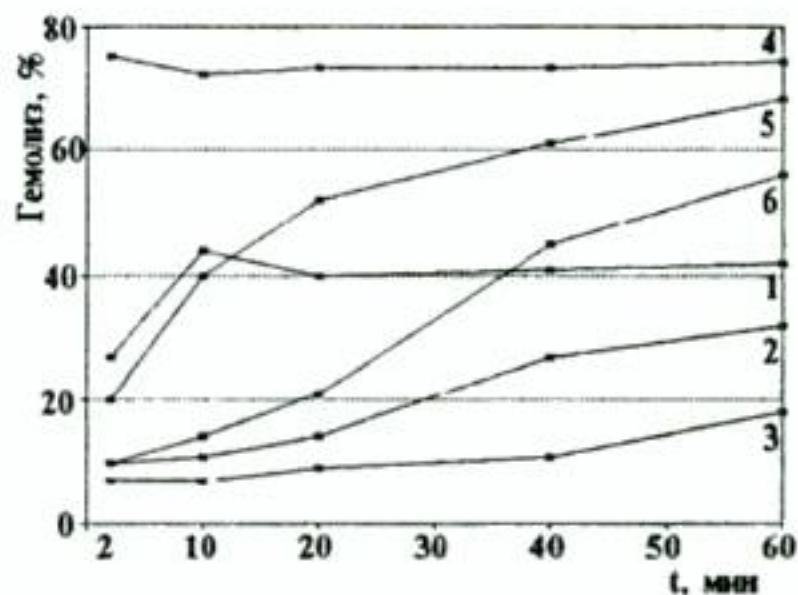


Рис. 2. Влияние обработки гемин (300 мкмоль/л) на чувствительность эритроцитов к охлаждению до 0 °С (1, 2, 3) и гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl (4, 5, 6) после инкубации (37 °С) в растворе, содержащем 0,86 моль/л сахарозу: 1, 4 – контроль; 2, 5 – гемин; 3, 6 – гемин + ДИДС, 30 мкмоль/л

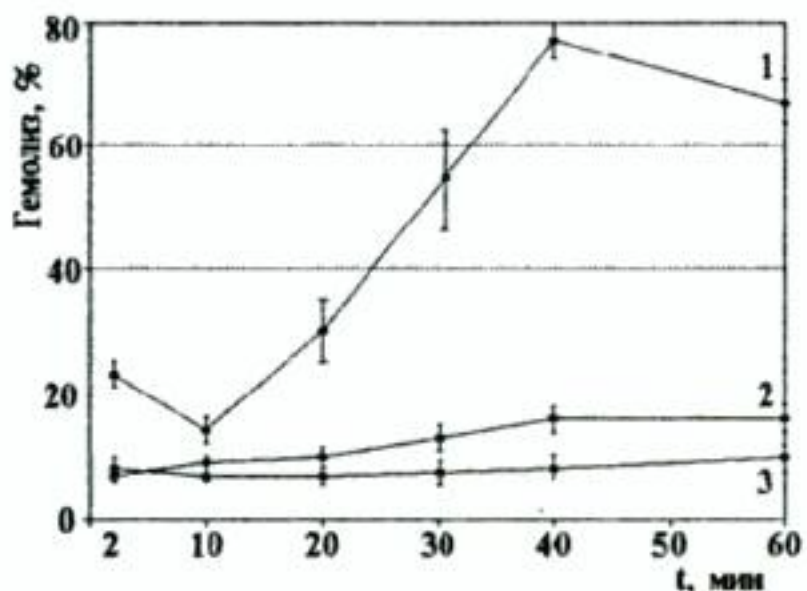


Рис. 3. Влияние ДИДС на чувствительность обработанных гемин эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl после инкубации при 37 °С (2 мин) в растворах, содержащих сахарозу: 1 – контроль; 2 – гемин; 3 – гемин + ДИДС

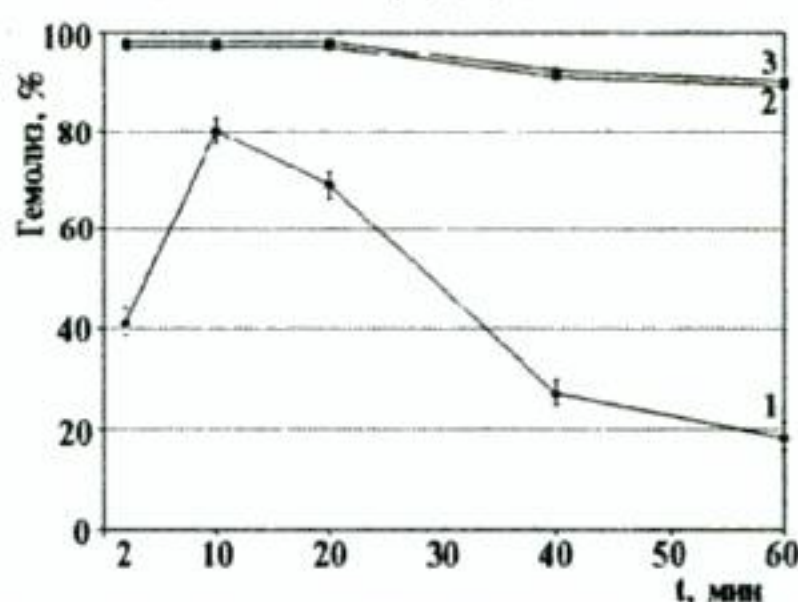


Рис. 4. Влияние обработки гемин на изменение формы эритроцитов при возрастании осмотической среды: 1 – контроль; 2 – гемин; 3 – гемин + ДИДС

Как было показано ранее, в среде прединкубации с изотонической сахарозой действие ДИДС вызывало значительный рост чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку [2]. Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что обработка гемин приводит к значительному снижению уровня гипертонического шока во всем представленном ряду концентраций сахарозы. При этом присутствие ДИДС уже не вызывает возрастания чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку после инкубации клеток в изотонической среде, как это отмечалось для немодифицированных клеток [2]. Данный результат также указывает на то, что действие ДИДС на ги-

пертонический шок обусловлено модификацией не только связи белка полосы 3 с цитоскелетом [2], но и взаимодействием белка полосы 4.1 в мембране.

Обработка эритроцитов геминном приводит к эхиноцитозу и полной утрате способности таких клеток изменять свою форму при повышении осмолярности среды (рис. 4). Не отмечается значительного снижения степени эхиноцитоза при повышении концентрации сахарозы в среде инкубации в исследуемом интервале, тогда как в контроле при этом процент эхиноцитов значительно снижается (рис. 4, кривая 1) и это коррелирует с ростом чувствительности клеток к гипертоническому шоку (рис. 3, кривая 1). Такой результат хорошо согласуется с выводом о том, что рост чувствительности эритроцитов к холодовому и гипертоническому шоку связан со способностью клеток переходить от эхиноцитарных форм к уплощенным [1]. Однако потеря эритроцитами способности изменять форму после обработки ПХМБ не приводит к потере их чувствительности к гипертоническому шоку [2]. Это указывает на то, что осмотическая чувствительность определяется, главным образом, взаимодействием белка полосы 4.1 в мембране. В данном случае присутствие ДИДС в среде инкубации уже не вызывает сдвига изменений формы клеток, как это отмечалось для немодифицированных эритроцитов [2]. Морфологические изменения клеток могут происходить как при осмотической, так и при химической модификации [1]. Так как в данном случае химическая модификация устраняет осмотически-индуцированные изменения формы клеток, вероятно, эти изменения также определяются взаимодействием белка 4.1 в цитоскелете. Таким образом, с учетом ранее полученных данных [2], можно предположить, что развитие чувствительности эритроцитов к холодовому и гипертоническому шоку определяется взаимодействием белка полосы 4.1 с белками цитоскелета, при этом изменения формы клеток включают дополнительно модификацию взаимодействий белка полосы 3 с цитоскелетом. В действие ДИДС на холодовой и гипертонический шок может включаться модификация взаимодействий белка полосы 4.1 в мембранном скелете.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис....д-ра биол. наук. – Харьков, 1988. – 30 с.
2. Рамазанов В.В., Руденко С.В., Бондаренко В.А. Влияние модификаторов цитоскелета на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при повышении осмолярности среды прединкубации // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 2. – С. 11–16.
3. Cohen A.M., Liu S.C., Lawler J., Palek J. Interactions of spectrin and band 4.1 with phosphatidylserine vesicles // J. Cell Biochem. – 1985. – 9B. – P. 14.
4. Eaton J.W., Branda N.F., Hadland C., Dreher K. Anion channel blockade: Effects upon erythrocyte membrane calcium response // Am. J. Hematol. – 1980. – 9. – P. 391–399.
5. Fairbanks G., Patel V.P., Dino J. Biochemistry of ATF-dependent red cell membrane shape change // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1981. – 41. – P. 139–144.
6. Forte T., Leto T.L., Minetti M., Marchesi V.T. Protein 4.1 is involved in structural thermotropic transition of the red blood cell membrane detected by spin-labeled stearic acid // Biochemistry. – 1985. – 24, P. 7876–7880.
7. Hsu L., Morrison M. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components // Arc. Biochem. Biophys. – 1983. – 227, № 1. – P. 31–38.
8. Jackson P., Morgan D.B. The relation between the membrane cholesterol content and anion exchange in the erythrocytes of patients with cholestasis // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – 693, № 1. – P. 99–104.
9. Jarolim P., Lahav M., Liu S.C., Palek J. Effect hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin // Blood. – 1990. – 76, № 10. – P. 2125–2131.
10. Jennings M.L. Structure and function of the red blood cell anion transport protein // Annual Rev. Biochem. Biophys. Chem. – 1989. – 18. – P. 397–420.
11. Jinbu Y., Sato S., Nakao T. et al. The role of ankyrin in shape and deformability change of human erythrocyte ghost // Biochim. Biophys. Acta. – 1984. – 773, № 2. – P. 237–245.
12. Macara I.G., Kuo S., Cantley L.C. Evidence that inhibitors of anion exchange induce a transmembrane conformational change in band 3 // The J. Biol. Chem. – 1983. – 285. – № 3. – P. 1785–1792.

13. Minetti M., Ceccarini M., Stasi A.M.M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // *J. Cell. Biochem.* – 1984. – 25, № 2. – P. 61–72.
14. Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // *Biochem. Internat.* – 1986. – 13, – № 3. – P. 467–477.
15. Solar I., Muller-Eberhard U., Shviro Y., Shaklai N. Long-term intercalation of residual hemin in erythrocyte membranes distorts the cell // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – 1062. – P. 51–58.

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

Поступила 22.02.95

V.V.RAMAZANOV, V.A.BONDARENKO

ДІЯ ГЕМІНА І ДІДС НА ХОЛОДОВИЙ ТА ГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК ЕРИТРОЦИТІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Досліджено чутливість еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку після дії модифікаторів цитоскелета. Виявлено, що обробка еритроцитів геміном призводить до блокування розвитку холодової та осмотичної чутливості, а також до усунення здатності діізотіоціаностильбендісульфонату (ДІДС) підвищувати рівень гіпертонічного шоку модифікованих клітин після інкубації в ізоосмотичному середовищі.

V.V.RAMAZANOV, V.A.BONDARENKO

ACTION OF GEMINE AND DIDS ON COLD AND HYPERTONIC STRESS OF RED BLOOD CELLS

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

A susceptibility of red blood cells (RBC) to cold and hypertonic stress after exposure to the cytoskeleton modifiers was studied. It was found that treatment of RBC with gemine blocks the development of cold and osmotic susceptibility, as well as eliminates the ability of diisothiocyanostilbene disulphonate (DIDS) to increase the level of hypertonic stress of the modified cells following their incubation in the isoosmotic medium.

УДК 57.043.577.152.321

Т.Ф.Стрибуль, С.М.Тымчук, О.Г.Супрун

ИНДУКЦИЯ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ЭНДОСПЕРМЕ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН КУКУРУЗЫ ПОСЛЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ОБРАБОТКИ

Исследовано влияние предпосевного замораживания семян ряда линий кукурузы на активность амилолитических ферментов в эндосперме прорастающих семян. Установлена существенная дифференциация исследуемого материала как по суммарной, так и по α -амилазе. Высокоамилозные линии кукурузы отвечают на криовоздействие ростом активности амилазы на ранних этапах прорастания, в то время как сахарные линии прорастают в более поздние сроки.

Использование низких температур для сохранения генофонда растительных ресурсов предполагает оценку консервируемого материала после размораживания. В [5, 13, 14] приводятся данные, свидетельствующие о достаточно высоких показателях жизнеспособности семян различных видов растений, хранящихся в генных банках, после их деконсервирования. Имеются сведения об улучшении посевных качеств семян (увеличение энергии прорастания и всхожести) после криовоздействия [3, 11]. Однако механизм стимулирующего действия глубокого замораживания семян на процесс их прорастания не изучался.

В предыдущих работах [6–8] нами исследовалось влияние условий криоконсервирования семян на их сохранность после криовоздействия, в результате чего были подобраны режимы замораживания и отогрева, при которых наблюдалась стимуляция прорастания семян. В настоящей работе было исследо-

вано влияние замораживания семян по этим режимам на характер их биохимического обмена при прорастании после отогрева.

Объектом исследования служили семена кукурузы ряда мутантных линий. Биохимический состав варьировал в широком интервале изменчивости. Были представлены семена с преобладанием амилозного компонента в крахмале эндосперма (C-451ae, C-230du) и семена с чисто амилопектиновым крахмалом в составе эндосперма (W-153wx). Группа сахарных линий характеризовалась пониженным содержанием крахмала и повышенным — свободных сахаров и сахарозы (C-181sh₁, C-73sh₂, C-112bt₁, C-107bt₂, Вир-38su₂) или водорастворимых полисахаридов (МС-722su₁). В эндосперме опейковой линии Р-502o₂ отсутствовала роговидная часть без количественной депрессии синтеза крахмала.

Основным запасным веществом семян кукурузы является крахмал. При прорастании семян первыми из ферментов активизируются гидролазы, в частности, амилазы. Уровень активации ферментов углеводного обмена в значительной мере определяет дальнейшее развитие растения. Поэтому было исследовано изменение активности амилазы в эндосперме прорастающих семян после их замораживания и отогрева в режимах, вызывающих стимуляцию их начального роста. Предварительно увлажненные до 13–15% семена замораживали по экспоненциальному режиму [4], характеризуемому скоростью 6,75 °С/мин, до –70 °С, выдерживали при этой температуре 60 мин. Отогревали со скоростью 5 °С/мин. Кроме того, семена линий C-181sh₁ и Вир-38su₂ охлаждали до –20 °С (в морозильной камере холодильника) с экспозицией при этой температуре 3 сут и отогревали на воздухе (медленное замораживание, медленный отогрев), а также замораживали до –196 °С погружением контейнеров с семенами в жидкий азот, выдерживали 60 мин и отогревали в водяной бане при 4 °С (быстрое замораживание, быстрый отогрев). Общую активность амилолитических ферментов определяли в эндосперме непророщенных и прорастающих семян до и после криовоздействия. В прорастающих семенах определяли также активность α - и β -амилазы по стандартной методике [2]. Анализ общей активности амилолитических ферментов в эндосперме семян показал существенную дифференциацию исследуемого материала как по суммарной, так и по α -амилазе (таблица).

В случаях, когда семена не подвергались воздействию низких температур, максимальная активность амилазы в сухих непророщенных семенах выявлена для линий Вир-38su₂, C-112bt₁, C-107bt₂ и Р-502o₂, а минимальная — для линий МС-722su₁ и C-181sh₁ (таблица). Семена указанных линий отличаются принципиально различным углеводным составом эндосперма. В то же время изменения углеводного комплекса не всегда коррелируют с активностью суммарной амилазы. Так, равный уровень амилолитической активности показали семена кукурузы, структура эндосперма которых определяется рецессивами o₂, bt₁ и bt₂, хотя первый отличается высоким содержанием крахмала, а два последующих — очень низким крахмала и повышенным свободных сахаров. Кроме того, линии — носители мутаций sh₁ и sh₂ или su₁ и su₂, вызывающих сходную модификацию углеводного комплекса семян, — резко отличались по исследуемому признаку. Следовательно, для рассмотренных линий кукурузы активность суммарной амилазы на уровне непроросших семян не зависит от основных фракций их углеводного комплекса. После замораживания до –70 °С в непроросших семенах наблюдали в основном ингибирование активности суммарной амилазы. Вместе с тем линия C-73sh₂ не показала достоверных различий между опытным и контрольным вариантами, а у линий C-181sh₁ и МС-722su₁ отмечено даже возрастание активности фермента в опытных вариантах. В процессе прорастания семян кукурузы, не подвергавшихся криовоздействию, для всех вариантов опыта выявлено существенное повышение общей амилолитической активности уже на 3-й день прорастания,

что соответствует данным, приведенным в [1, 9, 10, 12]. По суммарной активности амилазы линии C-230du, C-181sh₁ и особенно C-73sh₂, C-112bt₁, C-107bt₂ уступали другим. Замораживание семян кукурузы линий C-451ae и C-73sh₂ до -70 °C, а Вир-38su₂ до -20 °C привело к повышению амилолитической активности в эндосперме семян на 3-й день их прорастания, а линий MC-722su₁ и C-112bt₂ — к снижению этого показателя после охлаждения до -70 °C. В остальных вариантах суммарная активность исследуемого фермента после криовоздействия не отличалась от контроля.

Активность амилазы в эндосперме семян мутантных линий кукурузы в мг крахмала/г сухого вещества/мин

Линия	Температура охлаждения семян, °C	Непроросшие семена	Прорастающие семена					
			3-й день			7-й день		
			суммарная амилаза	α -амилаза	β -амилаза	суммарная амилаза	α -амилаза	β -амилаза
C-451ae	Без охл.	6,5	257,0	61,8	195,2	261,7	229,3	32,4
	-70	0,3*	291,2*	42,3*	248,9*	93,9*	78,0*	15,9
W-153wx	Без охл.	4,0	275,8	28,4	247,4	377,8	85,6	292,2
	-70	2,2	287,6	29,0	258,6	388,0	80,3	307,7*
C-230du	Без охл.	5,0	171,2	34,2	137,0	309,7	240,0	69,7
	-70	3,8	188,5	26,8*	161,7*	233,2*	92,3*	140,9*
P-502o ₂	Без охл.	8,1	302,9	58,5	244,4	295,1	262,3	32,8
	-70	5,4	290,4	63,3*	227,1	272,1	90,7*	181,4*
C-181sh ₁	Без охл.	0,3	197,7	43,3	150,4	250,3	105,5	144,8
	-20	0,0	213,0	50,4*	162,6	319,4*	242,9	76,5*
	-70	1,2*	175,7	25,4*	150,3	185,6*	115,5	70,1*
	-196	0,0	204,1	47,1	157,0	274,4*	95,0	179,4
C-73sh ₂	Без охл.	5,8	29,4	22,8	6,6	382,5	169,8	212,7
	-70	5,7	67,2*	24,0	43,2*	280,5*	149,4	131,1*
su ₁	Без охл.	1,6	224,9	40,1	184,8	66,4	4,7	61,7
	-70	3,1*	208,7*	27,5*	181,2	365,5*	38,3*	327,2*
Вир-38								
su ₂	Без охл.	11,3	227,3	24,0	203,3	24,2	11,7	12,5
	-20	0,0	242,0*	45,3*	196,7	9,7*	5,3	4,4*
	-70	6,8*	226,0	41,3*	184,7	191,5*	13,3	178,2*
	-196	0,0	234,5	39,2*	195,3	168,8*	25,0*	156,8*
C-112bt ₁	Без охл.	9,5	35,7	14,4	21,3	27,4	10,6	16,8
	-70	5,3	6,3*	4,2*	2,1*	92,9*	75,9*	17,0
C-107bt ₂	Без охл.	7,2	46,8	10,2	36,6	62,3	38,1	24,2
	-70	5,0	43,8	4,5*	39,3*	98,7*	60,5*	38,2*

Примечание. * – различие достоверно по отношению к контролю при $p < 0,05$.

В таблице представлены также результаты изучения компонентного состава амилазы прорастающих семян кукурузы. На 3-й день проращивания семян основная доля амилолитической активности приходилась на β -амилазу, за исключением линии C-73sh₂, у которой доля α -амилазной активности составила 70% от общей активности. Криообработка семян кукурузы исследованных линий вызвала неоднозначную реакцию α - и β -форм амилаз. Так, замораживание семян высокоамилозных линий C-451ae и C-230du привело к снижению активности α -амилазы и повышению β -амилазы на 3-й день их прорастания. У представителя высоколизиновых линий P-502o₂ отмечено увеличение активности α -амилазы у криоконсервированных семян по сравнению с незамораживаемыми. Семена сахарных линий C-181sh₁, MC-722su₁, C-112bt₁ и C-107bt₂, замораживаемые до -70 °C, на 3-й день прорастания характеризовались снижением активности α -амилазы, а линий C-107bt₂ и Вир-38su₂ — уменьшением β -амилолитической активности. Вместе с тем к этому же сроку проращивания в эндосперме семян Вир-38su₂ отмечен рост активности α -амилазы, а семян C-73sh₂ — β -амилазы. Следует отметить, что для линии Вир-38su₂ наблюдаемая картина изменения амилолитической активности по сравнению с контролем сохранялась независимо от конечной температуры охлаждения. Для линии C-181sh₁ замораживание до -20 °C привело к росту активности α -амилазы, охлаждение до -70 °C вызывало снижение активности этой формы амилазы, а температура жидкого азота вообще не изменила пока-

зателей активности α - и β -амилаз по отношению к контролю. Как видно из таблицы, к 7-му дню проращивания зависимость общей и α -амилолитической активности от генотипа исследуемой линии отличалась от аналогичной на 3-й день.

У контрольных вариантов линий С-451ае и Р-502о₂ суммарная активность амилаз на 7-й день проращивания оказалась практически равной активности на 3-й день, при этом примерно в 4 раза возросла активность α -амилазы и более чем в 6 раз снизилась активность β -изоформы фермента. У линии С-230du активность суммарной амилазы увеличилась почти вдвое, на столько же упала активность β -амилазы, но в 20 раз возросла α -амилолитическая активность. У семян кукурузы линий W-153wx и С-73sh₂ обнаружено достоверное увеличение активности всех форм амилаз на 7-й день проращивания по отношению к 3-му. И если активность этих изоформ первой линии выросла в 1,5–3 раза, то второй — более чем на порядок. У семян двух сахарных линий МС-722su₁ и Вир-38su₂, не подвергавшихся криовоздействию, наблюдалось снижение амилолитической активности на 7-й день, примерно в 4 и в 10 раз соответственно по сравнению с 3-м днем проращивания.

После замораживания семян до -70°C на 7-й день проращивания обнаружили снижение активности амилазы в семенах, содержащих большое количество крахмала (С-451ае и С-230du) или сахарозы (С-181sh₁ и С-73sh₂), и, напротив, — повышение активности в семенах сахарных линий: МС-722su₁, Вир-38su₂, С-112bt₁ и С-107bt₂.

Устойчивой к действию низкотемпературного стресса оказалась линия W-153wx, семена которой содержат крахмал, состоящий исключительно из амилопектина. В эндосперме семян этой линии ни на 3-й, ни на 7-й день проращивания суммарная и α -амилолитическая активность в опытных вариантах не отличались от контрольных. Лишь на 7-й день отмечена стимуляция β -амилазной активности.

Исследование влияния различных конечных температур охлаждения (-20 , -70 , -196°C) и различных режимов криовоздействия на семена кукурузы показало, что в большинстве случаев стимулирующим является режим замораживания с конечной температурой -70°C . Вместе с тем в опытном варианте в эндосперме семян С-181sh₁ при замораживании до -20°C на 7-й день проращивания отмечена стимуляция активности суммарной и α -амилазы, а при замораживании до -196°C наблюдалось увеличение общей и β -амилолитической активности, в то время как охлаждение до -70°C оказало угнетающее воздействие на суммарную активность и активность ее β -составляющей. Для линии Вир-38su₂, напротив, действие температуры -20°C снизило активность общей и β -амилазы в семенах на 7-й день их проращивания, а более низкие температуры (-70 и особенно -196°C) вызвали рост рассматриваемых показателей по сравнению с контрольными. Таким образом, исследование активности амилолитического комплекса в эндосперме семян ряда линий кукурузы показало существенную дифференциацию материала по данному признаку как в зависимости от генотипа линии, условий криообработки, так и от сроков проращивания семян.

Семена исходных линий, характеризующиеся крахмалмодифицирующими мутациями генов sh₁, sh₂, bt₁, bt₂, уступали другим семенам по суммарной амилолитической активности. Указанные мутации вызывали депрессию биосинтеза крахмала и преобладание в углеводном комплексе семян редуцирующих сахаров и сахарозы. Последнее может быть связано с эффектом близкого пространственного сцепления генов sh и bt и генов, кодирующих амилазы с низкой активностью. Замораживание семян исследуемого ряда линий по специально подобранным режимам, вызывающим стимуляцию проращивания семян, привело к изменению активности в них амилолитических ферментов. Линии, семена которых содержат высокоамилозный крахмал и (или) сахарозу

(C-451ae, C-230du, Вир-38su₂, C-73sh₂), реагировали на криовоздействие ростом активности амилазы на ранних этапах прорастания. При дальнейшем развитии проростков амилолитическая активность в эндосперме криообработанных семян возвращалась к уровню контроля или падала ниже этого уровня. Активность амилаз в семенах с высоким содержанием водорастворимых олигосахаридов и (или) редуцирующих сахаров, вызванным наличием в геноме рецессивов su₁, bt₁, bt₂, уменьшалась на начальной стадии прорастания замораживаемых семян. Однако в процессе дальнейшего развития проростков в семенах рассматриваемых сахарных линий наблюдалось увеличение активности всех форм амилазы по сравнению с контролем. Восковидная кукуруза, семена которой содержат амилопектиновый крахмал, оказалась устойчивой к замораживанию, сохранив на всех этапах прорастания показатели активности всех форм амилазы на уровне контрольных.

Обращает на себя внимание тот факт, что увеличение β -амилазной активности в результате криовоздействия, особенно проявляющееся на 7-й день прорастания семян, характерно практически для всех исследуемых линий кукурузы за исключением линий рецессивных гомозигот sh₂ и ae. Известно, что высокий уровень активности β -амилазы в эндосперме зерновки способствует ее скорейшему прорастанию [9], так как является причиной накопления продуктов гидролиза крахмала, принимающих непосредственное участие в метаболизме растущих корней и ростков. Результаты измерений морфометрических показателей проростков исследуемого ряда линий кукурузы [8] свидетельствуют о стимуляции начального роста семян практически всех линий за исключением линий W-153wx и C-73sh₂. У первой проростки криообработанных семян по показателям морфометрии не отличались от контрольных, а у второй линии эти показатели в опытном варианте были снижены по сравнению с контрольными.

Таким образом, установлено, что влияние низких температур на изменение амилолитической активности в семенах ряда линий кукурузы существенно зависит от генотипа исследуемой линии, в частности, от генетически детерминированного биохимического состава эндосперма и соответствующего ему ферментативного комплекса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузовлев В.А., Фурсов О.В. Очистка, разделение и некоторые свойства α -амилазы прорастающего зерна кукурузы // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1991. – 23, № 1. – С. 92–96.
2. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И.Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 420 с.
3. Молодкин В.Ю. Методы консервации семян культурных растений при низких и сверхнизких температурах: Автореф. дис....канд. с.-х. наук. – Л., 1987. – 18 с.
4. Новиков А.Н., Ткаченко С.И., Стрибуль Т.Ф., Рындин В.Ф. О возможности использования экспоненциальных режимов охлаждения при криоконсервировании биологических объектов // Биофизика. – 1985. – XXX, № 6. – С.1042–1045.
5. Сташинов С., Джантила О. Устойчивость гидратированных семян салата к повреждающему действию температур при глубоком переохлаждении // Холодостойкость растений. – М.: Колос, 1989. – С. 189–211.
6. Стрибуль Т.Ф. Изменение амилазной и липазной активности семян кукурузы под воздействием низких температур // Пробл. криобиологии. – 1991. – № 4. – С. 54–56.
7. Стрибуль Т.Ф., Бондаренко С.А., Лесив Т.К. и др. Влияние криовоздействий на продуктивные качества семян сельскохозяйственных растений // Зимостойкость сельскохозяйственных растений. – 1991. – С. 132–142.
8. Стрибуль Т.Ф., Тымчук С.М., Мильшина Н.Н. Стимулирующее действие низкотемпературного замораживания семян кукурузы на процесс их прорастания // Пробл. криобиол. – 1995. – № 1. – С. 31–37.
9. Фурсов О.В., Перуанский Ю.В. Изоамилазы эндосперма родительских форм пшеницы и их изменчивость у гибрида в процессе прорастания // Изв. АН Каз. ССР. Сер. биол. – 1975. – № 4. – С. 24–27.
10. Фурсов О.В., Курбаков О.И., Дарканбаев Е.Б. Ферменты гидролиза крахмала зерна кукурузы // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1984. – 16, № 5. – С. 430–437.

11. *Busse W.F.* Effekt of low temperatures on germination of impermeable seeds // *Botanical Gazette.* – 1930. – № 89. – P. 169–179.
12. *Chao S.E., Scandalios J.G.* A proposal for naming isozymes of maize starch-degrading enzymes // *Isozyme Bulletin.* – 1971. – 4. – P. 33.
13. *Pritchard H.W.* Survival of terrestrial orchid seed from liquid nitrogen temperature // *Cryobiology.* – 1983. – 20, № 6. – P. 704–708.
14. *Vertucci C.W.* Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures // *Plant Physiol.* – 1989. – 90, № 4. – P. 1478–1485.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Ин-т растениеводства им. В.Я.Юрьева УААН, г. Харьков
Т.Ф.СТРИБУЛЬ, С.М.ТИМЧУК, О.Г.СУПРУН

Поступила 13.09.95

ІНДУКЦІЯ АМІЛОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ В ЕНДОСПЕРМІ НАСІННЯ КУКУРУДЗИ, ЯКЕ ПРОРОСТАЄ ПІСЛЯ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОЇ ОБРОБКИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН, м. Харків
Інститут рослинництва ім. В.Я.Юр'єва УААН, м. Харків

Досліджено вплив передпосівного заморожування насіння ряду ліній кукурудзи на активність амілолітичних ферментів в ендоспермі насіння, яке проростає. Встановлена істотна диференціація досліджуваного матеріалу як по сумарній, так і по α -амілазі. Високоамілозні лінії кукурудзи відповідають на кріодію ростом активності амілази на ранніх етапах проростання, в той час як цукрові лінії проростають в більш пізні строки.

T.F.STRIBUL, S.M.TIMCHUK, O.G.SUPRUN

INDUCTION OF AMILOLYTIC ENZYMES IN CORN SEED ENDOSPERM GROWING AFTER LOW TEMPERATURE TREATMENT

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

Institute of Plant-Growing named by V.Ya.Yuryev UAAN, Kharkov

Effect of presowing seed freezing of some corn lines on the activity of amylolytic enzymes in growing seed endosperm. Significant differentiation of the material under study is established both on total and α -amylase. Highly amylose corn lines respond to cryoeffect by amylase activity growth at early stages of sprouting, meanwhile sugar lines shoot in later terms.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 612.111:57.086.13

**С.Х.Межидов, И.М.Беляева, А.М.Воротилин,
В.А.Моисеев**

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАНИЯ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА И 1,2-ПРОПАНДИОЛА НА СОХРАННОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ

Изучено влияние сочетания поливинилпирролидона-12600 с 1,2-пропандиолом на сохранность эритроцитов при криоконсервировании. Установлено, что такое сочетание позволяет уменьшить концентрацию 1,2-пропандиола и увеличить скорость замораживания.

В настоящее время для криоконсервирования эритроцитов широко применяются низкомолекулярные криопротекторы — глицерин и 1,2-пропандиол (1,2-ПД) [1, 2]. Так как эти вещества, в концентрациях, используемых для криоконсервирования (30–40%), достаточно токсичны, то их приходится отмывать 2–3 раза, поскольку при однократной отмывке в суспензии эритроцитов остается достаточно большое количество криопротектора, что накладыва-

ет ограничения на объем переливаемой крови. Поэтому одной из важных задач в криоконсервировании биологических объектов является уменьшение концентрации используемых или замена комбинированием малотоксичных криопротекторов. Эта цель может быть достигнута при сочетании высоко- и низкомолекулярных криопротекторов. Для изучения такой возможности нами проведены исследования по влиянию сочетания поливинилпирролидона-12600±2700 (ПВП-12600) с 1,2-ПД на сохранность эритроцитов при криоконсервировании.

При проведении исследований использовали препараты марки ХЧ и ЧДА. Эксперименты проводили на эритроцитах донорской крови человека 3-5 сут хранения при (4±2) °С. Перед экспериментом эритроциты отмывали 3 раза физиологическим раствором хлорида натрия, приготовленным на натрий-фосфатном буфере (рН=7,2) в соотношении 1:1 и центрифугировали их при 3000 об/мин в течение 15 мин. После удаления надосадка эритромаасса смешивалась с растворами 1:1 и разливалась в стеклянные пробирки диаметром (9,3±0,3) мм и толщиной стенки (1,2±0,15) мм. Объем замораживаемой крови составлял 2 мл. Пробирки с образцами крови помещали в камеру программного замораживателя УОП-8 и замораживали до температуры -14÷-18 °С со скоростью 0,5-1 °С/мин. После выдержки при этой температуре 20-30 мин эритроциты замораживали со скоростью 33±3 °С/мин (температура определена по термограммам замораживания) до -150 °С и переносили образцы в жидкий азот. Через 30 мин образцы отогревали до (-100±10) °С со скоростью 10 °С/мин, переносили в водяную баню с температурой 41-45 °С и оттаивали (50±5) с. Затем образцы центрифугировали и определяли гемолиз по известному методу [3].

Для корректного проведения исследований необходимо было избавиться от влияния переохлаждения на сохранность эритроцитов. Для этого были определены диапазоны температур, при которых происходила кристаллизация образцов при охлаждении их со скоростью 0,5-1 °С/мин. После достижения температуры кристаллизации (-14÷-18 °С) образцы выдерживали при этой температуре 20-30 мин и замораживали со скоростью, указанной выше. Изучение повреждения эритроцитов в результате выдержки при самой низкой температуре зарождения кристаллов в образцах (-18 °С) в течение 1 ч показало, что разрушения эритроцитов не происходило.

В табл. 1 представлены данные о зависимости гемолиза эритроцитов от концентрации 1,2-ПД. Концентрации ПВП-12600 и натрия хлорида во всех растворах были 10 и 0,5% соответственно. Из табл. 1 видно, что гемолиз эритроцитов при концентрации 1,2-ПД выше 26 и ниже 20% возрастает. Это, по-видимому, связано с тем, что при концентрации 1,2-ПД выше 26% эритроциты разрушаются из-за образования внутриклеточного льда, а при концентрации ниже 20% — от дегидратации, что согласуется с гипотезой Мейзура [4] об оптимальной скорости.

Изучение зависимости гемолиза эритроцитов от концентрации ПВП-12600 (табл. 2) при постоянной концентрации 1,2-ПД и натрия хлорида 20 и 0,5% соответственно показало, что сохранность эритроцитов в диапазоне концентраций ПВП-12600 6-14% составляет 95-98%. При концентрации ПВП-

Т а б л и ц а 1
Зависимость гемолиза эритроцитов от концентрации 1,2-ПД

Концентрация 1,2-ПД, мас. %	Гемолиз, отн. %
18	8,5±3,5
20	3,1±0,7
22	3,1±0,7
24	2,3±0,2
26	2,5±0,2
28	4,7±0,7

Примечание. Концентрация ПВП-12600 — 10%, натрия хлорида — 0,5%.

Т а б л и ц а 2
Зависимость гемолиза эритроцитов от концентрации ПВП-12600

Концентрация ПВП, мас. %	Гемолиз, отн. %
2	23,6±5,8
4	11,5±2,5
6	4,3±0,7
8	2,8±0,2
10	2,6±0,3
12	2,4±0,3
14	1,2±0,2

12600 выше 14% происходила агломерация эритроцитов, однако это не сказывалось на результатах криоконсервирования.

Т а б л и ц а 3

Зависимость гемолиза эритроцитов от концентрации 1,2-ПД

Концентрация 1,2-ПД, мас. %	Гемолиз, отн. %
4	53,6±1,3
8	35,7±1,5
12	29,4±2,0
16	6,3±0,2
20	3,0±0,6
24	1,6±0,2

Примечание. Концентрация ПВП-12600 — 20%, натрия хлорида — 0,5%.

Для изучения возможности дальнейшего снижения концентрации 1,2-ПД проведены эксперименты по изучению зависимости гемолиза эритроцитов от его концентрации (табл. 3). Концентрации натрия хлорида и ПВП-12600 были 0,5 и 20% соответственно. Из табл. 3 видно, что уменьшение концентрации 1,2-ПД ниже 20% в 2 раза увеличивает гемолиз эритроцитов. Причиной такого увеличения гемолиза эритроцитов является, по-видимому, дегидратация эритроцитов, которая связана с достаточно низкой скоростью замораживания при этих концентрациях 1,2-ПД.

Изучение зависимости гемолиза эритроцитов от концентрации натрия хлорида в диапазоне 0,3–0,9% при концентрации 1,2-ПД — 20, а ПВП-12600 — 10% не дало достоверных различий по сравнению с данными для натрия хлорида 0,5%. Изучение зависимости гемолиза эритроцитов от скорости замораживания при концентрации 1,2-ПД — 20, ПВП-12600 — 10 и натрия хлорида — 0,5% показало (табл. 4), что в диапазоне скоростей 10–120 °С/мин сохранность эритроцитов составляет 95–97%.

Т а б л и ц а 4

Зависимость гемолиза эритроцитов от скорости замораживания

Скорость замораживания, °С/мин	Гемолиз, отн. %
5	7,7±2,0
10	2,5±0,2
20	2,4±0,3
34	1,5±0,2
42	1,4±0,2
61	2,3±0,4
87	2,4±0,3
100	2,8±0,4
123	3,0±0,2
Погружение в азот	17,7±3,6

Примечание. Концентрация 1,2-ПД — 20, ПВП-12600 — 10, натрия хлорида — 0,5%.

Концентрацию остаточного 1,2-ПД в суспензии эритроцитов определяли методом ¹H-ЯМР после отмывки и переноса эритроцитов в ресуспендирующую среду 8^b. При использовании для криоконсервирования эритроцитов концентраций 1,2-ПД 20–26% (в исходном растворе) концентрация остаточного 1,2-ПД была 0,6–0,8% (ошибка ±10%), в то время как после криоконсервирования с “Пропандиосахаролем” — (1,2±0,2)%. Через 24 ч гемолиз эритроцитов в ресуспендирующей среде не превышал 0,8–0,9%, эритроциты имели нормальную форму и образовывали монетные столбики при переносе в плазму. Таким образом, сочетание ПВП-12600 с 1,2-ПД позволяет успешно криоконсервировать эритроциты при достаточно низких концентрациях 1,2-ПД в

широком диапазоне скоростей замораживания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилов О.К., Аграненко В.А. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузии. — Метод. рекомендации. — М.: МЗ СССР, 1980. — 35 с.
2. Грищенко В.И., Воротилин А.М., Гучок В.М. и др. Криоконсервирование эритроцитов под защитой криоконсерванта «Пропандиосахароль». — Метод. рекомендации. — Харьков, МЗ СССР 1990. — 12 с.
3. Рождественская М.А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови // Актуальные вопросы переливания крови. — М: Медгиз, 1955, С. 55–58.
4. Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // Exp. Cell. Res. — 1972. — 71, № 2. — P. 345–355.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Поступила 30.11.94

С.Х.МЕЖИДОВ, І.М.БІЛЯЄВА, О.М.ВОРОТИЛІН, В.О.МОЙСЕЄВ

ВПЛИВ СПОЛУЧЕННЯ ПОЛІВІНІЛПІРОЛІДОНУ ТА 1,2-ПРОПАНДІОЛУ НА ЦІЛІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Вивчено вплив сполучення полівінілпіролідону-12600 з 1,2-пропандіолом на цілість еритроцитів при кріоконсервуванні. Установлено, що таке сполучення дозволяє зменшити концентрацію 1,2-пропандіолу та збільшити швидкість заморожування.

S.KH.MEZHDIV, I.M.BELIAEVA, A.M.VOROTILIN, V.A.MOISEYEV

EFFECT OF A COMBINATION OF POLYVINYL PYRROLIDONE AND 1,2-PROPANEDIOL ON THE SURVIVAL OF RBC DURING CRYOPRESERVATION

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

The effect of a combination of polyvinyl pyrrolidone-12600 with 1,2-propanediol on the survival of RBC during cryopreservation was studied. Such a combination was found to reduce the concentration of 1,2-propanediol and to accelerate the rate of freezing.

УДК 57.043

Г.С.Лобынцева, И.А.Вотякова

ДЕЙСТВИЕ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

Исследовано влияние возрастающих концентраций ДМСО (0,13; 0,4; 0,7; 1,0; 1,4 М) на пролиферативные свойства эмбриональных кроветворных клеток человека. Установлен эффект стимулирующего и угнетающего действия криопротектора в зависимости от исходного состояния клеток: при высокой колониеобразующей активности нативного материала наблюдается угнетение пролиферации, при низкой — стимуляция. Обсуждаются возможные механизмы данного явления.

Особенности взаимодействия диметилсульфоксида (ДМСО) с биомолекулами и биологическими мембранами определяется химическими характеристиками этого вещества: ДМСО является дипольным апротическим соединением, которое в отличие от воды и спиртов может скорее принимать, чем отдавать протоны [6, 11], образуя стабильные растворы путем диполь-дипольных взаимодействий или ассоциаций раствор-растворитель путем гидрофобных связей. Предполагается, что водородные связи, существующие между водой и ДМСО, сильнее, чем водородные связи между молекулами воды [31].

Широкое применение ДМСО в медицине основано на его способности очень быстро и в больших концентрациях проникать через барьер дермы без видимого повреждения ткани. Как предполагают авторы, это является результатом обратимого изменения концентрации белков вследствие замещения молекул воды [28]. Наибольшие изменения конформации белка отмечали при концентрациях ДМСО равных 60-70% [42], однако эти изменения обратимы, что неоднократно продемонстрировано многими авторами [7, 42]. Большинство биологических объектов состоят на 80% из воды. Нативные формы таких биополимеров, как белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, окружены упорядоченно построенными молекулами воды, гидрофобной оболочкой [42]. Замещение или удаление гидрофобной оболочки макромолекул приводит к изменению их конформации, что способствует образованию достаточно гибких областей в мембранах для прохождения этого растворителя [29]. Проникая через мембраны, ДМСО оказывает существенное влияние на метаболизм клеток, вступая во взаимодействие с биомолекулами. Это взаимодействие приводит к существенным перестройкам структурной организации белков, липидов, нуклеиновых кислот и углеводов [45] за счет образования водо-

родных связей с полярными группами белковых молекул и их гидрофобных участков. ДМСО меняет также и химические свойства воды.

Модифицируя структурные компоненты мембран, ДМСО способствует изменению активности мембранных ферментов, рецепторов, белков-переносчиков. Так, было установлено, что имеется концентрационная зависимость в снижении активности K^+ и Na^+ -АТФ-азы путем ингибирования систем переноса K^+ , Na^+ и HCO_3^- внутрь клеток за счет изменения конформационного состояния фермента в результате образования более сильных Н-связей между полярными группами белка, чем образованные водой [14, 29, 44].

ДМСО взаимодействует с липидами мембран, формирующих бислой в целом, а также входящих в микроокружение белков, что приводит к изменению белок-липидных и липид-липидных взаимодействий, ослаблению стабилизирующего влияния липидов на функциональные белки. В результате этого взаимодействия нарушается конформация и функциональные свойства (проницаемость мембран, активный транспорт, латеральная диффузия белков и липидов, подвижность внутримембранных частиц). ДМСО облегчает протекание уже существующих процессов или обуславливает возникновение новых, которые в силу определенных метаболических условий в данный момент в клетке не происходят [19, 25, 33, 39].

Особый интерес представляют работы, в которых изучено действие ДМСО на клеточные ядра, генетический аппарат и процессы транскрипции. Было установлено индуцирующее влияние ДМСО на дифференцировку некоторых линий злокачественных кроветворных клеток [13]. При индукции дифференцировки клеточных линий миелолейкоза происходит созревание лейкозных клеток и они приобретают способность образовывать С и F розетки. Клетки лейкоза Фрейда могут быть индуцированы к дифференцировке проэритробластов в ортохромные эритробласты [46]. Возможна и индукция дифференцировки клеток миелоидного ряда. Несмотря на лейкозное происхождение и аномальный кариотип, клетки после взаимодействия с ДМСО проявляют функции нормальных гранулоцитов [46], однако существуют нечувствительные к действию ДМСО клоны лейкозных клеток [34]. Авторы предполагают, что генетическая информация, кодирующая терминальную дифференцировку, сохраняется в лейкозных клетках, и под действием ДМСО в ряде случаев может проявиться фенотипически.

Токсичность ДМСО для кроветворных клеток эмбриональной печени была изучена Т.М.Макарцевой [3]. Установлено, что наличие 1 % ДМСО в культуральной среде избирательно поражает кроветворные клетки в эксплантах. Цитохимическое выявление активности пероксидазы на мазках-отпечатках культур продемонстрировало поражение как эритроидного, так и миелоидного кроветворения. Отмывание ДМСО не приводило к восстановлению кроветворения в культуре. Высказано предположение о том, что этот эффект связан либо с избирательной токсичностью ДМСО, либо с его влиянием на строму эмбриональной печени, в результате которого она утрачивает способность поддерживать кроветворение в культуре. Однако воздействие ДМСО изменяет адгезивные свойства, но не затрагивает обменных процессов в стромальных клетках так, чтобы препятствовать их пролиферации [3, 4].

Исследование механизма действия ДМСО на этапы синтеза РНК и РНК-полимеразной системы на изолированных ядрах, выделенных из клеток печени крыс, показало повышение активности нуклеоплазматической формы фермента, определяемой в составе изолированных ядер, на 25% и очищенной РНК-полимеразы-2 — на 20% после 15 мин инкубации с 1М концентрацией ДМСО. Активность ядрышковой формы фермента как в составе ядер, так и в очищенной РНК-полимеразе-1 снижалась на 10 и 6 % соответственно. Автор предполагает, что в изолированной системе фермент — депротеинизированная ДНК ДМСО приводит к изменению образования инициационного комплекса

РНК-полимеразы, трифосфатов и ДНК в результате взаимодействия с молекулами адсорбционной воды, стабилизирующей макромолекулы, что, в свою очередь, приводит к изменению физико-химических свойств среды и системы, регулирующей процессы транскрипции [5].

ДМСО влияет также на процессы биосинтеза белков и нуклеиновых кислот, об уровне которых судили по включению C^{14} -аминокислот в суммарные белки и ^3H -тимидина — в ДНК пролиферирующих клеток, повышая биосинтез белков [40, 43]. ДМСО вступает во взаимодействие с белками, нуклеиновыми кислотами, липидами, углеводами, водой, ионами и другими соединениями, вызывая изменение структурных и функциональных свойств клеточных элементов и модифицируя биохимические процессы и физиологические функции [15–18, 22, 41]. Таким образом, из обзора литературных данных, в котором мы привели только отдельные ключевые моменты действия ДМСО, видно, что это соединение обладает широким диапазоном влияния на молекулярном, субклеточном, клеточном и тканевом уровне. Конечно, не все эффекты, проявляющиеся на разных уровнях организации клетки, будут влиять на исход низкотемпературного консервирования. Однако многие из них будут видны в условиях подготовки гемопоэтических клеток эмбриональной печени к замораживанию, особенно те, которые связаны с влиянием ДМСО на биосинтез нуклеиновых кислот, белков, фосфолипидов или ферментов. Проследить за ними можно путем культивирования клеток в полутвердой агаровой среде.

В данном исследовании были изучены эффекты действия различных концентраций ДМСО (0,13; 0,4; 0,7; 1,0; 1,4 М) на пролиферативные свойства гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека. Методы получения клеток, культивирования и обработки полученных результатов описаны в монографии [1]. Криопротектор разводили раствором Хенкса и добавляли к клеткам в соотношении 1:1 до получения нужной концентрации вещества в суспензии. Длительность пребывания клеток в растворе составляла 30 мин, после чего производили разведение питательной средой в 100–300 раз для получения необходимой для эксплантации в агар численности клеток (100000 клеток в 1 мл агаровой среды).

Т а б л и ц а 1

Влияние различных концентраций ДМСО на пролиферацию КОЕ-ГМ эмбриональной печени человека (сводные данные)

№ п/п	Концентрация ДМСО, моль/л	n	Количество колоний и кластеров на 10 ⁵ клеток			Соотношение колоний и кластеров, %			КОЕ _к / КЛОЕ
			КОЕ _к	КЛОЕ	Сумма КОЕ-ГМ	КОЕ _к	КЛОЕ	Сумма КОЕ-ГМ	
1	Нативные клетки	39	40,6±5,0	32,3±3,8	72,9±8,0	55,7	44,3	100	1,26
2	0,13	6	50,5±4,8	41,5±4,4	92,5±6,5	54,6	45,4	126,9	1,20
3	0,40	9	43,8±14,3	43,8±5,4	87,6±18,0	50,0	50,0	120,2	1,00
4	0,70	25	42,1±5,1	32,6±2,1	74,5±5,9	56,5	43,5	102,2	1,30
5	1,00	8	61,6±8,9	46,0±5,3	107,6±13,3	57,2	42,8	141,8	1,33
6	1,40	31	39,9±4,3	24,1±2,3	64,0±5,8	60,9	39,1	87,8	1,56

Примечание. Различия достоверно ($p<0,01$) отличаются между вариантами: 3:6; 2:6; 5:6.

Результаты клонирования клеток-предшественников грануломоноцитопоза (КОЕ-ГМ), приведенные в табл. 1, показывают, что после 30 мин контакта клеток с 0,13; 0,7; 1,0 моль/л растворами криопротектора происходит незначительное увеличение количества колоний (КОЕ_к) и кластеров (КЛОЕ), образованных гемопоэтическими клетками-предшественниками. Процентное соотношение колоний и кластеров остается таким же, как и в нативном материале, и только после взаимодействия клеток с 1,4 моль/л концентрацией криопротектора, наблюдали достоверное снижение колоний и кластеров по сравнению с 1,0 моль/л ДМСО. В данном случае мы можем говорить о дестабилизирующем действии ДМСО на мембраны клеток. Этот эффект, по-видимому, вызван не присутствием вещества в клетке, а последствием его, так как перед эксплантацией в агар происходило разведение исходной концентра-

ции ДМСО средой для культивирования в 100–300 раз. При анализе полученных результатов видно, что в одних случаях мы наблюдаем увеличение количества колоний и кластеров, в других — уменьшение по отношению к клеткам, не контактировавшим с криопротектором.

Эффект стимулирующего и угнетающего действия ДМСО нивелировался при объединении всех результатов экспериментов, однако при анализе исходного состояния материала обнаружено, что опыты можно разделить в зависимости от исходной активности клеток. Количество колоний и кластеров в исходном материале принимали за 100%, отклонение в сторону увеличения считали стимуляцией пролиферации, а в сторону уменьшения — эффектом угнетения ее. В количественном отношении популяция клеток, образующая более 75 колоний и кластеров, считалась активной, менее — неактивной. Установлено, если колониеобразующая активность клеток в нативном материале была низкой, добавление криопротектора вызывало стимуляцию КОЕ и КлОЕ (табл. 2), при высокой — угнетение. Различия во всех случаях достоверны, кроме стимуляции с 1,4 моль/л ДМСО. Стимуляция и угнетение проявлялись равномерно для колоний и кластеров, и результаты не выходили за пределы максимальной величины (например, угнетение до уровня неактивного исходного материала и стимуляция до уровня активных нативных клеток). Соотношение между колониями и кластерами колебалось в пределах 10%, однако по отношению к нативным клеткам стимулирующий и ингибирующий эффект составлял примерно 70%, например, 0,4 моль/л концентрация ДМСО увеличивала активность пролиферации на 172%. Соотношение колоний и кластеров составляло 1:1. Растворы с 0,7 и 1,0 моль/л концентрацией ДМСО повышали эффективность клонирования до 155–158%, а при активном росте нативных клеток ($161,0 \pm 19,0$ КОЕ-ГМ) — действие 0,7 моль/л ДМСО вызывало угнетение роста как колоний, так и кластеров до 33,4% (53,8 КОЕ-ГМ). Эти данные интересны тем, что обычно при исследовании действия ДМСО на отдельные биохимические процессы отмечается концентрационная зависимость дестабилизирующего эффекта, будь то увеличение или уменьшение активности исследуемой реакции. Мы не получили линейной зависимости концентрации криопротектора — эффект действия. В данном случае можем сказать, что реакция клеток определяется исходным состоянием клеток и имеется определенный предел в реализации возможности системы, за который она не может выйти (стимуляция до уровня активных клеток и угнетение до уровня неактивных).

Т а б л и ц а 2

Влияние различных концентраций ДМСО на пролиферацию КОЕ-ГМ эмбриональной печени человека

Концентрация ДМСО моль/л, эффект	n	Количество колоний и кластеров на 10^5 клеток			Соотношение колоний и кластеров, %		% КОЕ-ГМ по отношению к нативным клеткам	КОЕ _к /КлОЕ
		КОЕ _к	КлОЕ	Сумма КОЕ-ГМ	КОЕ _к	КлОЕ		
0,13	3/	45,5±7,5/	30,5±11,5/	76,0±11,5/	59,2/	40,8/	121,0	1,23/
	6	50,5±4,8	41,5±4,4	92,0±6,5	54,9	45,1		1,21
0,4	9/	27,6±4,3/	27,8±2,8*/	55,3±6,3*/	49,9/	50,1/	172,8	0,99/
	9	49,1±14,9	47,5±4,4	95,6±17,7	51,3	48,7		1,05
0,7	3/	27,5±4,7/	24,8±1,5*/	52,3±5,5*/	52,6/	47,3/	155,0	1,11/
	6	46,2±6,4	34,9±2,4	81,1±7,2	56,9	43,1		1,32
0,1	10/	41,3±7,2/	26,5±2,3/	67,8±7,5*/	50,9/	49,1/	158,0	1,03/
	10	61,6±8,9	46,0±5,3	107,6±13,3	57,2	42,8		1,33
1,4	13/	37,9±7,0/	22,5±2,2/	50,4±3,0/	62,7/	37,3/	125,8	1,68/
	14	46,6±8,6	29,4±4,0	76,0±10,6	61,3	38,7		1,58
0,7	5/	93,0±8,6*/	68,0±18,2/	161,0±19,0*/	57,8/	42,2/	33,4	1,37/
	6	28,3±1,8	25,5±3,4	53,8±2,9	52,6	47,4		1,11
1,4	16/	68,5±6,9/	53,1±6,7*/	121,6±11,7*/	53,6/	43,7/	47,4	1,28/
	16	35,6±2,6	22,1±2,3	57,7±4,1	61,7	38,3		1,61

Примечание. В числителе даны значения нативных клеток, в знаменателе — после действия ДМСО; * — различия по отношению к нативным клеткам достоверны.

В данном случае мы исследовали способность к репопуляции коммитированных клеток-предшественников, т.е. популяции унипотентных клеток, начавших дифференцировку в направлении гранулоцитарного и макрофагального ростков. Они представляют собой ряд потомков стволовой кроветворной клетки, проделавших определенное количество делений, и чем больше митозов проделала клетка, тем больше ее связь с морфологически распознаваемыми клетками. Только определенное количество этих клеток, содержащихся в 100000 эксплантированных в агар клеток, могут образовывать колонии и кластеры в стимулированной колониестимулирующим фактором (КСФ) культуре. Под влиянием КСФ клетки-предшественники грануломоноцитопоза начинают синтезировать ДНК, причем КСФ не только осуществляет запуск механизма пролиферации, но и необходим для последующего роста и созревания клеток колоний. Перенос развивающейся колонии на среду без КСФ приводит к гибели всех клеток [2, 11, 32, 36].

При наличии стимулирующего фактора коммитированные клетки-предшественники активно пролиферируют и образуют эозинофильные, нейтрофильные, макрофагальные и смешанные колонии. В результате наблюдения за развитием отдельных колониобразующих клеток было доказано, что такие колонии возникают из одной клетки, следовательно, гранулоциты и макрофаги имеют одного предшественника. КСФ оказывает влияние не только на клетки-предшественники, но и на зрелые полиморфноядерные лейкоциты и макрофаги, вызывая в них синтез ДНК и стимуляцию синтеза белка в популяции неделящихся клеток [35].

Рассматривая с этой точки зрения полученные нами результаты, можно предположить, что при низкой пролиферативной активности нативных клеток, по-видимому, фидерный слой имеет малое количество КСФ (в качестве КСФ мы использовали лейкоциты периферической крови доноров) или по каким-то причинам он не проникал через мембраны клеток. Исходя из уникальной способности ДМСО увеличивать проницаемость клеточных мембран и его свойства вещества-проводника биомакромолекул [26], можно предположить, что он способствует связи клеточных рецепторов, ответственных за включение механизма пролиферации, с колониестимулирующим фактором.

В работах многих авторов было показано, что в фидере, наряду с веществами, стимулирующими рост колоний, присутствуют и ингибиторы пролиферации. Они вырабатываются зрелыми гранулоцитами и имеют липопротеиновую природу [10, 20, 29, 37]. Установлено, что ингибиторы не только тормозят развитие колоний, но и изменяют их морфологию, образуя в основном макрофагальные очаги [20, 33, 34]. Эти оба фактора действуют по типу обратной связи [30], и в тех случаях, когда в фидере имеется высокий уровень КСФ, в культуре преимущественно дифференцируются гранулоциты, увеличение числа зрелых нейтрофилов способствует накоплению ингибитора, который под действием ДМСО быстро проникает в клетки и тормозит пролиферацию. Такой эффект разнонаправленного действия возрастающих концентраций ДМСО был обнаружен впервые, и предстоит еще найти аргументы, объясняющие данное явление.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А. и др. Гемопозитические клетки эмбриональной печени человека (эмбриогенез, трансплантация, криоконсервирование). – Киев: Наук. думка. – 1988. – 190 с.
2. Декстер Т.М. Гемопозитические ростовые факторы: биологические эффекты и перспективы клинического применения // Онтогенез. – 1991. – 22, № 4. – С. 341–364.
3. Макрцева Т.М. Кроветворение в длительной органотипической культуре: Автореф. дис....канд. мед. наук. – Киев, 1982. – 20 с.
4. Макарцева Т.М. Избирательная токсичность ДМСО для кроветворных клеток эмбриональной печени человека // Цитол. и генет. – 1982. – № 1. – С. 10–14.

5. Митряев А.Б. Некоторые особенности синтеза РНК в печени крыс под влиянием диметилсульфоксида // Вопросы криоконсервирования биологических объектов. – Киев: Наук. думка, 1978. – С. 71–75.
6. Agami C. Le dimethylsulfoxide en chimie organique // Bull.soc. chim. France. – 1965. – Fasc. 1021. – P. 387–412.
7. Barner H.B. The vascular lesion of freezing as modified by dimethylsulfoxide // Criobiology. – 1965. – 2, № 1. – P. 55–57.
8. Bishop W.H., Ryan R.J. Solvent exposure of aromatic groups in human luteinizing hormone and its subunits measurment by solvent perturbation difference spectroscopy // Biocemistry. – 1975. – 14, № 18. – P. 4083–4087.
9. Baker F.L., Galbraith P.R. Mechanism of action of serum factors that regulate granulopoiesis *in vitro*, possible physiologic role of serum inhibiting activity // Blood. – 1979. – 53, № 2. – P. 304–312.
10. Breeck C., Kovacs P., Ruber E., Fliedner T.M. Studies on the inhibitory effect of granulocytes on human granulocytopoiesis in agar cultures // Exp. Hemat. – 1978. – № 6. – P. 337–345.
11. Brown B.L., Nagle S.C.J. Preservation of mammalian cells in a chemically defiend medium and dimethylsulfoxide // Science. – 1965. – 149, № 3680. – P.1266.
12. Broxmeyer H.E., Moore M.A.S., Ralph P. Cell-free granulocyte colony inhibiting activity dirived from human polymorphonuclear neutrophila // Exp. Hemat. – 1977. – 5, № 2. – P. 87–102.
13. Colling S.J., Francis W., Ruscetti R.S. et al. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells iduced by DMSO and other pololar companuds // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1978 – 75, № 5. – P. 2458–2462.
14. Foster D., Ahmed R. Na-dependent phosphorylation of the rat brain (Nf, K) ATPase possible non-equivalent activation sites for Na // Biochim. Biophys. Acta. – 1976. – 429, № 1. – P. 258– 273.
15. Freind C., Freedman H.A. Effects and possible mechanism of action of dimethylsulphoxide on friend cell differentiation // Biochem. Pharmacol., – 1978. – 27, № 9. – P. 1309–1313.
16. Fujita Y., Izumiguchi S., Noda Y. Effect of dimethylsulfoxide and its homologues on the thermal denaturation of lysozyme as measured by differential scanning calorimetry // Int. J. Peptide and Protein Res. – 1982. – 19, № 1. – P. 25–31.
17. Fukui Y., Katsu-Mazu H.I. Nuclear action beendless in amoeba Dictyostelium and human Hela cells iduced by dimethylsulphoxide // Exp. Cell. Res. – 1979. – 120, № 2. – P. 451–455.
18. Gerhards E., Gibian H. The metabolism of dimethylsulphoxide and its metabolic effects in man and animals // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1967. – 141, № 1. – P. 65–75.
19. Gordon L.M., Sauerheber R.D., Esgate J.A. at al. The increase in bilayer fluidite of rat liver plasma membranes achieved by the local anaesthetic benzyl alcohol effects on the activity of intrinsic membrane enzymes // J. Biol. Chem. – 1980. 255 № 10. – P. 4519–4527.
20. Grastrom M. Conditions influencing inhibitors of the colonistimulating factor CSF // Exp. cell., Res. – 1974. – 87, № 2. – P. 304–312.
21. Heit W., Kern P., Kubaneck B., Heimpel H. Some factors influencing granulocytic colony formation *in vitro* by human white blood cells // Blood. – 1974. – 44, № 4. – P. 511–514.
22. Henderson T.R., Henderson R.F., York J. Effects of dimethylsulphoxide on subunit proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1975. – 243, № 1 – P. 38–53.
23. Herschler R.J., Jacob S.W. DMSO — a new drug from ligning // TAPPY. – 1965. – 48, N1. – P. 43–46.
24. Horland A.A., Wolman S.P., Europa D.L. Preparation and lightmicroscopic examination of fixed hematopoietic cells in soft agar // Amer. Clin. phatol. – 1978. – 70. – P. 760–765.
25. Hunt W.A. Effects of aliphatic alcohols on biophysical and biochemical correlates of membrane function // Biochemical pharmacology of ethanol. – N. Y.: Plenum press, 1975. – P. 195–210.
26. Jacob S.W., Herschler R.J., Bischel M.D. DMSO effect on permeability of biological membranes // Therap. Res. Clin. Exptl. – 1964. – 6, № 2. – P. 193–198.
27. Jacob S.W., Bischel M., Herschler R.J. DMSO — a new concept in pharmacotherapy // Carr. Ther. – 1964. – 6, № 2. – P. 134–135.
28. Jacob S.W., Herschler R. Pharmacology of DMSO // Criobiology. – 1986. – 23, № 1. – P. 14–27.
29. Kanike K., Erdmonn E., Schoner W. Study on the differential modifications of (Na⁺, K⁺) ATPase and partial reactions by dimethylsulphoxide // Biochim. Biophys. Acta. – 1974. – 352, № 3. – P. 275–286.
30. Lord B.J., Moris J., Wringht E.G., Lajatha L.G. Proliferation regulators in haemopoietic cell populations // Blood cells. – 1977. – 3, № 3. – P. 451–459.
31. McGregor W.S. The chemical and physical properties of DMSO // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1967. – 141, № 1. – P. 3–12.
32. Metcalf D., Foster R. Behavior on transfer of serum stimulated bone marrow colonies // Proc. Soc. Exp. Biol. – 1967. – 127. – P. 758–762.
33. Metcalf D., Moore M.A.S. Haemopoietic cells. – Amsterdam: North – Holland, 1971. – 550 p.
34. Metcalf D. Formation in agar of fibroblastlike colonies by cells from the mouse plural cavity and other sources // J. Cell Physiol. – 1972. – 80, № 3. – P. 409–420.
35. Moore M.A.S., Williams N. Analysis of 35 proliferation and differentiation of foetal granulocyte — macrophage progenitor cells in haemopoietic tissue // Cell. Tiss. Kinet. – 1973. – 6. – P. 461–476.

36. Moore M.A.S., Williams N. Metcalf D. *In vitro* colony formation by normal and leucemic human hematopoietic cells: characterization of the colony-forming cells // J. Nat. Cancer. Inst. – 1973. – 50, № 3. – P. 603–623.
37. Mortensen B.T., Knudtzon S., Schultz H. Serum lipoprotein inhibitors of granulopoiesis in human bone marrow cultures // 1979. – 7, № 1. – P. 1–10.
38. Nicolson G.L., Smith J.R., Roste G. Effect of local anesthetics on cell morphology and associated cytoskeletal organization in BALB/3T3 cells // J. Cell Biol. – 1976. – 68, № 2. – P. 395–402.
39. Orlic D., Porcellini A., Rizzoli V. Electron microscopy of human fetal erythroid cells before and after cryopreservation // Exp. Hematol. – 1982. – 20, № 7. – P. 628–636.
40. Pennickx, Cheng N., Kerremans R. et al. The effects of different concentrations of glycerol and dimethylsulfoxide on the metabolic activities of kidney slices // Cryobiology. – 1983. – 20, № 1. – P. 51–60.
41. Presler H.D., Rustum Y.M. Differing effects of molecules of differentiation on the ribonucleotide pool of Friend leukemia cells // Life Sci. – 1976. – 17. – P. 1287–1296.
42. Rammler D.H., Zaffaroni A. Biological implication of DMSO based on a review of its chemical properties. Biological action of dimethylsulphoxide // Ann. N. Y. Sci. – 1967. – 141, № 1. – P. 13–23.
43. Richmond J.E. Low concentration of dimethylsulphoxide accelerate conjugation and incorporation of glucine and glucosamine in Tetrahumena // Protoplasma. – 1982. – 110, № 1. – P. 34–38.
44. Robinson J. Specific modifications of the Na, K - dependent adenosine triphosphatase by dimethylsulphoxide // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1975. – 243, № 1. – P. 60–72.
45. Szmant H.H. Physical properties of dimethylsulphoxide and its function in biological systems // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1975. – 243, № 1. – P. 20–23.
46. Zinkernagel R.M., Doherty P.C. Immunological surveillance against altered self components by sensitized T-lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis // Nature. – 1974. – 251. – P. 547.

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

Поступила 17.04.95

Г.С.ЛОБИНЦЕВА, І.А.ВОТЯКОВА

ДІЯ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДУ НА ГЕМОПОЕТИЧНІ КЛІТИНИ ЕМБРІОНАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Досліджено вплив зростаючих концентрацій ДМСО (0,13; 0,4; 0,7; 1,0; 1,4 М) на проліферативні властивості ембріональних кровотворних клітин людини. Встановлено ефект стимулюючої і пригнічуючої дії кріопротектора в залежності від вихідного стану клітин: при високій колонієутворюючій активності нативного матеріалу спостерігали пригнічення проліферації, при низькій — стимуляцію. Обговорюються можливі механізми даного явища.

G.S.LOBYNTSEVA, I.A.VOTYAKOVA

ACTION OF DIMETHYLSULFOXIDE ON HEMOPOIETIC CELLS OF HUMAN EMBRYONIC LIVER

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

The authors investigated the effect of the increasing concentrations of DMSO (0.13, 0.4, 0.7, 1.0, 1.4 M) on the proliferative properties of the embryonic human hemopoietic cells. This cryoprotectant was found to exercise a stimulating and inhibiting effects upon the cells depending on their original state: when a colony-forming activity of the native material was high – proliferation was inhibited, low – stimulated. Possible mechanisms of this event are discussed.

УДК 577.95;575;592/599

**Е.А.Грищенко, В.В.Рязанцев, А.К.Гулевский,
Е.В.Чаплай**

СОЗДАНИЕ КРИБАНКА СЕМЯН РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ УКРАИНЫ

В связи с созданием криобанка редких и исчезающих видов лекарственных растений Украины исследован ряд морфологических и биохимических параметров семян в процессе длительного хранения (1 год) при температуре жидкого азота (–196 °С). Показано, что лабораторная всхожесть, общий белок, аминный азот и содержание сахаров в семенах после хранения не отличаются

от контроля. Обсуждается ряд технических вопросов, относящихся к организации банка семян: выбор экологически чистого района для сбора семян, тестирование семенного материала, наличие герметичных контейнеров для криоконсервирования.

В настоящее время не вызывает сомнений необходимость создания низкотемпературных банков для долговременного хранения генофонда растений. Целью создания подобных банков является сохранение генетической нормы и исходного материала для восстановления численности вида. Особую актуальность данная проблема приобретает на территории Украины, где в результате техногенной деятельности человека сложилась угрожающая обстановка для многих видов растений. Уже на сегодняшний день в Красную Книгу Украины внесено более 200 видов редких и исчезающих растений, среди которых 10 видов являются лекарственными. Их сохранение важно не только для поддержания многообразия жизненных форм, но и для обеспечения в будущем сырьевыми ресурсами фармацевтической промышленности при разработке и производстве лекарственных препаратов естественного происхождения.

В процессе создания низкотемпературного банка возникает ряд проблем: 1) выбор районов для сбора семян сохраняемых видов растений; 2) оформление паспортов для каждого вида; 3) тестирование семенного материала перед закладкой на долговременное хранение; 4) наличие технических условий криоконсервирования (герметичные контейнеры, низкотемпературное хранилище). Поскольку целью создания банка семян является сохранение генофонда исчезающих растений, сбор семян необходимо было проводить в экологически чистых районах. С учетом этих требований нами были выбраны территории заповедников в Закарпатской области и Крыму. Национальная лаборатория по хранению семян в США установила минимальный объем образца семян редких и исчезающих видов, предназначенных для долговременного хранения в генных банках, в 5 и 10 тыс. штук [4], Национальное хранилище СССР — 12 тыс. штук; в рекомендациях генного банка семян дикорастущих видов для ботанических садов величина образца составляет 7 тыс. штук. Нами был выбран минимальный объем образца 7 тыс. штук, но для некоторых видов (арника горная, красавка обыкновенная) величина образца превышает 12 тыс. штук. Сбор большого числа семян производился в том случае, когда это не могло отрицательно сказаться на популяции данного вида.

Т а б л и ц а 1

Морфологические показатели семян

Вид растения, местонахождение популяции	Год сбора	Размеры семян, мм (n=30)		Масса 100 шт., мг (n=5)	Влаж- ность, %	
		длина	ширина			
Арника горная: г. Бубен	1992	6,03±0,38	0,78±0,03	140,0±8,6	8,7	
	г. Бубен	1993	6,33±0,12	0,97±0,02	140,7±1,7	12,0
	г. Менчул	1993	6,63±0,35	0,95±0,02	183,7±9,5	5,2
Красавка обыкновенная: г. Плишка	1992	1,98±0,31	1,91±0,39	111,4±2,7	9,1	
	г. Плишка	1993	1,98±0,03	1,41±0,03	92,1±8,7	9,1
Горечавка желтая: пол. Рогнеска	1992	3,29±0,37	2,69±0,41	123,8±5,3	8,7	
Горечавка точечная: г. Брецул	1992	2,70±0,31	2,22±0,30	56,2±1,3	7,3	
Родиола розовая: г. Брецул	1993	2,07±0,25	0,60±0,08	21,0±1,8	7,6	
Прострел крымский	1993	5,93±0,42	1,11±0,11	427,7±39,2*	8,6	

Примечание. * — определялась масса 100 шт. семян с перистыми столбиками.

За сезоны 1992–1993 гг. были собраны семена следующих видов: арника горная, горечавка точечная, родиола розовая, красавка обыкновенная, прострел крымский. Во время сбора семян оформлялись паспорта образцов, которые содержат характеристику места произрастания вида (рельеф, тип растительности, ассоциация, фитоценоз), а также краткую характеристику популяции (площадь, численность, характер размещения экземпляров, жизненная форма и доминирующий способ размножения) и оценку хозяйственной деятельности в месте произрастания вида и ее последствий. У собранных образцов семян были проведены измерения морфобиологических показателей:

влажности, размеров, массы 100 штук семян (табл. 1). Важно отметить, что семена большинства видов имели несколько повышенный уровень влажности (на 20–30 %) в сравнении с тем, что рекомендуется для криоконсервирования. В табл. 1 представлены показатели влажности семян после 2 мес хранения в комнатных условиях.

Т а б л и ц а 2

Лабораторная всхожесть семян перед криоконсервированием в жидком азоте

Вид семян, место их произрастания	Год сбора	Сроки проращивания	Стратификация, мес., °С	Всхожесть, % (n=3)
Арника горная: г. Бубен	1992	05.10.92–02.11.92	–	55,6±2,5
г. Бубен	1993	17.09.93–21.10.93	–	56,7±8,0
г. Менчул	1993	24.09.93–21.10.93	–	87,3±5,5
Красавка обыкновенная	1992	25.01.93–02.08.93	3 при 4–6	26,7±3,5
Горечавка желтая: пол. Рогнеска	1992	25.01.93–15.02.93	3 при 4–6	45,7±5,1
пол. Рогнеска	1992	28.09.92–11.04.93	1,5 при 4–6*	68,7±3,5
Горечавка точечная: г. Брецул	1992	28.09.92–19.04.93	1,5 при 4–6*	27,3±1,5
Родиола розовая: г. Брецул	1992	25.01.93–17.07.93	3 при 4–6	52**
Прострел крымский	1993	18.08.93–18.09.93	3 при 4–6	8,0±1,0

Примечание. * – семена перед стратификацией (1,5 мес при 4–6 °С) в течение 2 мес содержались в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при комнатной температуре; ** – результаты одного эксперимента.

Перед закладкой семян необходимо оценить их качество, важным критерием которого является всхожесть. Однако в ряде случаев всхожесть определить довольно трудно, в первую очередь это касается семян с глубоким физиологическим покоем. Из перечня видов, выбранных нами для криоконсервирования, таким видом покоя не обладают лишь арника горная и прострел крымский [2]. Семена всех остальных видов нуждались в стратификации при низких положительных температурах (табл. 2). На примере арники горной можно видеть (табл. 3), что всхожесть при хранении семян в жидком азоте в течение 1 года достоверно не изменилась в двух образцах. В одном образце, собранном в 1993 г., этот показатель снизился, что связано, по-видимому, с увеличенным процентом влажности семян (12 %), заложенных на хранение.

Т а б л и ц а 3

Лабораторная всхожесть арники горной после 1 года хранения в жидком азоте

Популяция	Год сбора	Всхожесть, % (n)	
		исходная	через 1 год хранения
г. Бубен	1992	55,6±2,5	51,0±1,5
г. Бубен	1993	56,7±8,0	43,3±2,4
г. Менчул	1993	87,3±5,5	79,7±3,7

Из имеющихся данных о длительном хранении семян известно, что по мере их старения запасы питательных веществ истощаются, снижается активность ферментов, нарушается проницаемость мембран и генетическая целостность [3]. Однако эти данные в основном относились к семенам культурных видов, к тому же хранившимся либо при комнатной температуре, либо при низких положительных температурах. Данными по изменению показателей обмена веществ при длительном хранении в семенах дикорастущих лекарственных растений мы не располагали. Для проведения биохимического контроля нами были выбраны следующие показатели: содержание общего белка, аминного азота, общих и редуцирующих сахаров [1]. Из табл. 4 видно, что исследуемые показатели через 1 год хранения образцов в условиях криобанка достоверно не изменились.

Одной из важнейших проблем при создании криобанка являются емкости для хранения образцов. Они должны быть изготовлены из химически неактивных материалов и обеспечивать герметичность в условиях хранения при сверхнизких температурах. Контейнеры для семян изготавливались из материала “Ламистер”, имеющего трехслойную структуру: алюминиевая фольга, полипропилен, пищевой лак. После заполнения семенами контейнеры заваривались и опускались в хранилища с жидким азотом. В процессе хранения часть из них извлекалась по мере надобности (проверка биохимических пока-

зателей, лабораторной всхожести), а также для выборочной проверки герметичности. Установлено, что в данных условиях контейнеры отвечают необходимым требованиям.

Т а б л и ц а 4

Биохимические показатели семян, хранившихся в течение 1 года в криобанке при -196 °С

Вид растения, место произ- растания	Белок, мг/100 мг семян (n=4)		Аминный азот, мг/100 мг семян (n=4)		Сахара, мг/100 мг семян			
					общие		редуцирующие	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Арника горная:								
г.Бубен	6,9±1,8	6,0±2,2	0,48±0,12	0,43±0,09	7,8±1,5	7,9±1,9	5,0±0,8	5,1±0,9
г.Менчул	9,0±2,0	8,2±1,9	0,29±0,06	0,26±0,05	5,7±0,5	6,1±0,9	4,6±0,7	4,6±1,1
Безвременник осенний:								
с.Заброды	4,5±1,0	4,75±1,1	0,16±0,06	0,16±0,06	16,2±1,3	15,9±1,7	13,5±0,6	13,7±0,9
с.Ставное	5,0±1,7	4,1±1,3	0,35±0,20	0,30±0,13	11,8±1,2	11,0±0,7	10,8±1,2	10,2±2,4
с.Минеральное	4,9±1,0	4,9±1,2	0,23±0,08	0,24±0,07	12,9±1,4	13,1±1,8	10,8±1,0	10,6±1,2
Красавка обыкновенная:								
г.Плишка	6,6±1,5	6,0±0,4	0,19±0,07	0,17±0,03	6,0±0,2	6,2±0,9	5,4±0,5	5,2±0,3
Родиола розо- вая: скалы	21,3±2,6	20,0±1,9	0,47±0,15	0,41±0,09	8,1±0,5	7,2±1,2	7,2±0,1	6,5±0,5
Близнецы								
Прострел крымский	7,6±2,5	7,7±1,7	0,25±0,1	0,27±0,08	7,6±1,0	7,4±1,5	7,2±0,9	7,0±1,2

Примечание. 1 – биохимические показатели семян сбора 1993 г. перед закладкой в криобанк; 2 – биохимические показатели семян, хранившихся в течение года в жидком азоте.

Таким образом, к настоящему времени на базе Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины созданы основы криобанка семян редких и исчезающих видов лекарственных растений Украины, в котором на долговременное хранение заложены образцы 6 видов семян. Предусмотрена закладка на длительное хранение еще 4 видов исчезающих лекарственных растений: скополии карниолийской, аконита молдавского, адониса весеннего и безвременника осеннего.

Работа финансировалась по программе “Охрана окружающей природной среды” Государственным комитетом Украины по вопросам науки и техники.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методы биохимических исследований растений / Под ред. А.И.Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 310 с.
2. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 100 с.
3. Стенвуд Р.С., Бесс Л.Н. Сохранение зародышей плазмы путем глубокого охлаждения семян // Холодостойкость растений. – М.: Колос, 1983. – С. 280–287.
4. Тихонова В.Л. Долговременное хранение семян дикорастущих видов растений. Банки: сбор материала, документация, методики, режимы. – Пущино: Б. и., 1992. – 20 с.

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

Поступила 30.10.95

О.О.ГРИЩЕНКОВА, В.В.РЯЗАНЦЕВ, О.К.ГУЛЕВСЬКИЙ, О.В.ЧАПЛАЙ

СТВОРЕННЯ КРІОБАНКУ НАСІННЯ РІДКИХ ТА ЗНИКАЮЧИХ ВИДІВ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН УКРАЇНИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Подані дані щодо створення криобанку насіння рідких та зникаючих видів лікарських рослин України. Досліджені морфологічні і біохімічні параметри насіння на протязі тривалого зберігання зразків (1 рік) при температурі рідкого азоту (-196 °С). Показано, що лабораторна схожість, загальний білок, амінний азот та вміст сахарів у насінні не відрізняються від контролю. Обговорюються деякі технічні питання відносно організації банку насіння: вибір екологічно чистого району для збирання насіння, тестування насінневого матеріалу, наявність герметичних контейнерів для криоконсервування.

A CRYOBANK OF THE SEEDS OF RARE AND EXTINCT SPECIES OF HERBAL PLANTS OF THE UKRAINE

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

The work presents the data on the organization of the cryobank of rare and extinct species of the herbal plants of the Ukraine. The authors studied some morphological and biochemical parameters of seeds in the process of long-term (1 year) storage at the temperature of liquid nitrogen (-196°C). It was shown that laboratory sprouting, total protein, amine nitrogen and the content of sugars in the seeds after storage do not differ from control values. Some technical points are also discussed, pertaining to the organization of the bank of seeds: selection of the ecologically safe region for harvesting of seeds, testing of the collected material, availability of the sealed-up containers for cryopreservation.

УДК 57.043:591.463

Т.П.Линник, А.В.Терещенко, А.Б.Артеменко

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВЫХ ДОБАВОК К КРИОЗАЩИТНОЙ СРЕДЕ НА СОХРАННОСТЬ СПЕРМИЕВ ПЕТУХА ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ

Изучено влияние добавок яичного альбумина, сывороточного альбумина человека и овомукоида к криозащитной среде в диапазоне концентраций 0,5–2% на сохранность спермиев петуха в процессе криоконсервирования. Показано, что белковые добавки к криозащитной среде снижают токсическое действие криопротекторов на сперматозоиды как на этапе эквilibрации, так и после криоконсервирования. Установлено, что оплодотворяющая способность криоконсервированных спермиев петуха зависит от концентрации белка в криозащитной среде.

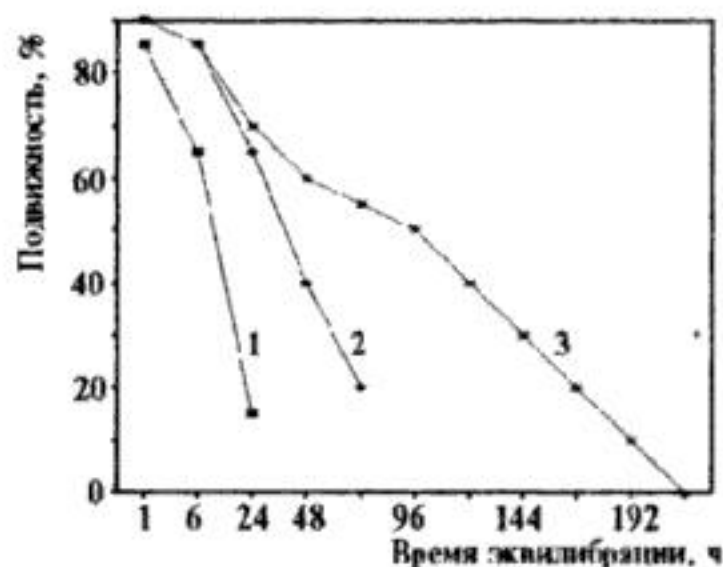
Основным технологическим приемом при современных методах криоконсервирования спермы является использование криозащитных сред. Именно состав и свойства защитной среды в основном определяют эффективность криоконсервирования. Однако разбавление эякулированной спермы искусственной криозащитной средой перед замораживанием часто приводит к нежелательным последствиям: от агглютинации до преждевременной акросомной реакции. Одна из возможных причин этого — потеря белковой “оболочки” вокруг спермиев, которая, по мнению ряда авторов [1, 5], выполняет определенную защитную функцию, а именно предотвращает спермий от преждевременной активации. В литературе имеются сообщения [4, 8] о положительной роли длительной инкубации спермиев на этапе предподготовки к замораживанию. Так, Кононов В.М. и соавт. [4] утверждают, что причиной этого является адсорбция положительно заряженных катионных белков на поверхности клеток из плазмы спермы, и на основании этого предлагают использовать экзогенные белковые препараты в качестве криопротекторов. В связи с этим в настоящей работе было изучено влияние белковых добавок к криозащитной среде на сохранность спермиев петуха до и после замораживания-оттаивания.

В опытах использовали сперму петухов коллекционных пород из коллекции Украинского научно-исследовательского института птицеводства. Для оценки сохранности половых клеток до и после замораживания определяли подвижность спермиев, целостность мембран головок и состояние акросом [6]. Состав основного криозащитного раствора (в г/100 мл) следующий: глутамат натрия — 1,7; фруктоза — 0,6; поливинилпирролидон (ПВП) — 0,2; протамин сульфат — 0,024; ацетат калия — 0,33. Осмотичность среды 340–370 мОсм, pH 6,7–7,0. В качестве криопротекторов применяли N,N-диметилформамид (ДМФА), предварительно очищенный двукратной вакуумной перегонкой, и N-метилацетамид (МАЦ), синтезированный ацилированием соответствующего амина [2].

Разбавление спермы средами проводили при 20°C в соотношении 1:1, добавление криопротектора — при 4°C ; время эквilibрации с криопротектором

до замораживания 15 мин. Замораживание производили в пластиковых соломинках объемом 0,25 мл по следующему режиму: время плато кристаллизации 1,0–1,5 мин, скорость охлаждения от 0 до -8°C — $3-5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; от -8 до -20 — $20-25$; от -20 до -80 — $60-65$; от -80 до -196 — $40-45$. В качестве белковых добавок использовали препараты отечественного производства: сывороточный альбумин человека (САЧ), яичный альбумин (ЯА) и овомукоид (ОМ) из яичного белка Марки В в диапазоне концентраций 0,5–2,0%. Статистическую обработку полученных данных проводили по критериям Стьюдента-Фишера [3].

В первой серии опытов было изучено влияние белковых добавок к основной криозащитной среде на переживаемость спермиев петуха при температуре 4°C в присутствии или в отсутствие криопротектора ДМФА. В табл. 1 представлены полученные результаты, из которых видно, что переживаемость сперматозоидов петуха в средах, содержащих 2% ЯА или САЧ, достоверно выше по сравнению с контролем (в качестве контроля служила основная среда). Через 72 ч хранения при температуре 4°C остаются подвижными до 20% спермиев. Установлено также, что присутствие белков в криозащитной среде снижает токсическое действие криопротектора ДМФА на сперматозоиды. Так, в защитной среде с ДМФА через 24 ч хранения подвижными остаются около 15% спермиев, через 30 ч хранения наблюдается уже полная гибель клеток. Если среда содержит белок (ЯА или САЧ), повреждающее действие ДМФА значительно уменьшается, даже через 72 ч хранения при 4°C остается 15–20% подвижных спермиев. По-видимому, присутствие белка в среде существенно влияет на распределение ДМФА между клеткой и внеклеточной средой. Концентрация ДМФА внутри сперматозоидов не достигает тех значений, при которых начинает проявляться его цитотоксичность по отношению к спермиям. Вероятно, белок препятствует проникновению ДМФА в клетки либо взаимодействуя с ДМФА в среде, либо создавая защитную оболочку вокруг спермиев и тем самым предотвращает их преждевременную гибель. Но, учитывая данные [7] о влиянии альбуминов на распределение воды и веществ между клеткой и средой, уменьшение цитотоксичности ДМФА в присутствии исследуемых белков может быть обусловлено другой причиной. Ранее показано [7], что экзогенные добавки альбумина вызывают существенное обезвоживание клеток (в 2%-й концентрации — до 10% от объема клетки), при этом растворяющая способность цитоплазмы для поступающих извне веществ снижается, диффузионное равновесие между внутри- и внеклеточной средой устанавливается при меньшей концентрации вещества, поглощаемого клеткой из раствора. Возможно, уменьшение повреждающего действия ДМФА по отношению к спермиям в присутствии альбуминов, особенно ЯА (по водоотнимающей способности ЯА [7] превосходит другие), может быть обусловлено именно этим.



Зависимость сохранности спермиев петуха от состава криозащитной среды при температуре 4°C : 1 — основная среда+ДМФА (7%), 2 — основная среда+ДМФА (7%)+ЯА (0,5%), 3 — основная среда+ЯА (0,5%). Осмотичность среды 370 мОсоль/кг, pH 7,0

На рисунке представлены результаты определения сохранности спермиев петуха, хранившихся при температуре 4°C в средах с добавлением (и без) 0,5% ЯА. Как видно из полученных данных, снижение концентрации белка с 2 до 0,5% привело к достоверному повышению переживаемости спермиев — через 196 ч хранения остается 15–20% подвижных клеток (с 2%-м содержанием ЯА всего 72 ч). В присутствии ДМФА в среде результаты не отличаются от предыдущих (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Зависимость сохранности спермиев петуха от состава криозащитной среды на этапе эквilibрации при температуре 4 °С (n=4)

Состав среды (основная среда+ добавки)	Время эквilibрации, ч				
	0,5		24		72
	Подвижность спермы, %	Спермии с целы- ми головками, %	Подвижность спермы, %	Спермии с целы- ми головками, %	Подвижность спермы, %
Контроль	90±5	96±4	60±5	95±6	0
ДМФА	85±3	92±5	15±4	75±5	0
ЯА	80±4	94±2	50±6	90±4	20±5
САЧ	85±4	95±4	65±5	90±5	15±5
ОМ	80±5	94±5	25±5	—	0
ДМФА+САЧ	85±4	94±2	75±5	85±6	15±5
ДМФА+ЯА	85±3	92±3	65±5	90±4	20±5
ДМФА+ОМ	70±4	90±5	60±5	85±5	10±5

Примечание. Концентрация белка в среде – 2%, ДМФА – 7%, рН среды 7,0; осмотичность среды 340 мОсм.

Таким образом, экзогенные белковые добавки действительно оказывают защитное действие на спермии, их переживаемость в среде повышается в 2–3 раза по сравнению с контролем. Выявлено также, что эффективность влияния белка на переживаемость спермиев четко зависит от его содержания в среде: оптимальная концентрация не должна превышать 0,5%. Возможно, столь длительная переживаемость спермы, наблюдаемая в данном эксперименте (196 ч, см. рисунок), в присутствии 0,5%-го ЯА объясняется его адсорбцией на поверхности сперматозоида, повышающей его защитные функции. По-видимому, предположение о криопротекторном действии экзогенных белковых добавок на сперму, изложенное в работе [4], имеет под собой основу. Криозащитный эффект альбумина и глутамата натрия был обнаружен также при замораживании ряда ферментов до –20 °С [9]. Среда с добавлением одного альбумина, а также в сочетании с глутаматом натрия эффективно предотвращали холодовую денатурацию энзимов общего метаболизма, а именно: лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы, глюкозы-6-фосфогидрогеназы и пируват киназы.

Т а б л и ц а 2

Зависимость сохранности спермиев петуха от состава криозащитной среды на этапах криоконсервирования (n=4)

Состав сре- ды (основ- ная среда+ добавки)	Концент- рация белка в среде, %	Подвижность спермиев до заморажива- ния, %	Сохранность спермиев после замораживания-оттаивания				
			Подвижность спермы, %, через, ч			Спермии с целыми го- ловками, %	Спермии с целыми акро- сомами, %
			0,5	24	48		
ДМФА	0	80±5	40±5	0	—	76±2	32±7
ДМФА+СА	1	85±5	45±3	25±5*	15±5*	61±2*	38±5
ДМФА+СА	2	80±5	45±4	20±5*	15±5*	63±3*	35±5
МАЦ+СА	1	90±4	45±5	20±5*	10±5*	54±2*	40±4
ДМФА+ЯА	1	90±3	55±3*	20±5*	15±5*	73±2	42±5
ДМФА+ЯА	2	85±4	50±5	25±5*	10±5*	85±2*	36±5
ДМФА+ОМ	1	80±5	45±3	20±5*	10±5*	62±2*	37±5
ДМФА+ОМ	2	85±4	45±5	25±5*	15±5*	64±3*	36±4
МАЦ+ОМ	1	85±4	50±3	20±5*	10±5*	72±2	41±6
МАЦ+ОМ	2	90±5	55±5*	20±5*	15±5*	74±2	40±5

Примечание. * – достоверно по отношению к контролю при $p < 0,05$; концентрация криопротекторов ДМФА и МАЦ в средах – 7%; осмотичность среды – 340 мОсмоль/кг, рН 7,0.

Во второй серии опытов изучено влияние белковых добавок в защитные среды на результат криоконсервирования спермы петуха. В табл. 2 представлены данные о сохранности спермиев петухов на этапах криоконсервирования в присутствии исследуемых белков. Целостность мембран головок и состояние акросом деконсервированных спермиев определяли сразу после оттаивания. Анализ полученных результатов показывает, что в первые полчаса после оттаивания отсутствуют достоверные отличия сохранности спермиев в зависи-

мости от исследуемых вариантов состава криозащитной среды. Результаты не зависят ни от концентрации белка в среде в изучаемом диапазоне, ни от вида белка. Наблюдается лишь тенденция положительного влияния белковых добавок на морфологическую сохранность спермы после криоконсервирования по сравнению с контролем. Но переживаемость спермиев петуха, криоконсервированных в присутствии белков, достоверно отличается от контроля. Как видно из табл. 2, криоконсервированные с ДМФА спермии без белка в защитной среде через 24 ч хранения при 4 °С погибали, подвижные клетки обнаружить не удалось. Применение белковых добавок позволило увеличить переживаемость спермы после замораживания-оттаивания почти в 2 раза, через 48 ч хранения при температуре 4 °С остаются подвижными до 15% клеток. Возможно, что наблюдаемое положительное влияние белковых добавок на результаты криоконсервирования спермы обусловлено, в основном, уменьшением токсического действия криопротектора в их присутствии, а не собственным криопротекторным эффектом, как считают авторы [4, 7, 8].

При искусственном осеменении кур спермой, криоконсервированной под защитой сред с добавками овомукоида в концентрации 0,5 и 1%, оплодотворенность яиц составляла 64,3 и 0% соответственно. Полученный результат согласуется с литературными данными [4], где установлено, что оплодотворяющая способность спермиев, криоконсервированных в средах с белковыми добавками, находится в обратно пропорциональной зависимости от концентрации белка в криозащитной среде — оплодотворенность яиц остается на высоком уровне, если концентрация белка в среде не превышает 0,5%.

Таким образом, в итоге проведенных экспериментов выявлено, что белковые добавки к криозащитной среде оказывают положительное влияние на результат криоконсервирования спермиев петуха — снижают токсическое действие криопротекторов на сперматозоиды как на этапе эквilibрации, так и после замораживания-оттаивания, обеспечивают удовлетворительную оплодотворяющую способность деконсервированных спермиев без удаления криопротектора. Установлено, что эффективность действия белковых добавок зависит от их концентрации. Для получения высоких результатов концентрация белка в криозащитной среде не должна превышать 0,5%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Данилова Л.В., Габер Е.С. Транспорт и созревание сперматозоидов в половых путях самца и самки // Сперматогенез и его регуляция. — М.: Наука, 1983. — С. 65–94.
2. Вейганд-Хильгетех З. Методы эксперимента в органической химии. — М.: Химия, 1968. — 1450 с.
3. Закс Л. Статистическое оценивание. — М.: Статистика, 1976. — 598 с.
4. Кононов В.П., Семенова В.А., Ерохин А.С. Факторы плазмы спермы, повышающие устойчивость спермы при замораживании // С.-х. биология. — 1968. — № 10. — С. 98–101.
5. Мушамбаров Н.Н. Биохимия сперматогенеза // Усп. совр. биол. — 1983. — 96. Вып. 1 (4). — С. 101–116.
6. Терещенко А.В., Сахацкий Н.И., Артеменко А.Б. Экспресс-метод оценки оплодотворяющей способности замороженно-оттаянной спермы сельскохозяйственной птицы // С.-х. биология. — 1987. — № 12. — С. 77–80.
7. Трошин А.С. Распределение веществ между клеткой и средой. — Л.: Наука, 1985. — 189 с.
8. Blesbois E., Mauger I. Effect of ovalbumin on the motility and fertilising ability of fowl spermatozoa stored for 24h at 4 °C // Brit. Poultry Sc. — 1987. — 28, № 3. — P. 483–491.
9. Tamiya T., Okahashi N., Sakuma R. et al. Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives // Cryobiology. — 1985. — 22, № 5. — P. 446–456.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Украинский НИИ птицеводства, п. Борки, Харьков. обл.

Поступила 06.06.95

Т.П.ЛИННИК, О.В.ТЕРЕЩЕНКО, А.Б.АРТЕМЕНКО

ВПЛИВ БІЛКОВИХ ДОБАВОК ДО КРІОЗАХИСНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЗБЕРЕЖЕННЯ СПЕРМІЇВ ПІВНЯ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків
Український НДІ птахівництва, с. Борки, Харківська обл.

Вивчено вплив добавок яєчного альбуміну, сироваточного альбуміну людини та овомукоїда до кріозахисного середовища в діапазоні концентрацій 0,5–2% на збереження спермій півня в процесі кріоконсервування. Показано, що білкові добавки до кріозахисного середовища знижують токсичну дію кріопротекторів як на етапі еквілібрації, так і після кріоконсервування. Виявлено, що запліднююча здатність кріоконсервованих спермій півня також залежить від концентрації білка в кріозахисному середовищі.

T.P.LINNIK, A.V.TERESCHENKO, A.B.ARTEMENKO

EFFECT OF PROTEIN ADDITIVES IN CRYOPROTECTIVE MEDIUM ON THE INTEGRITY OF ROOSTER SPERMATOZOA AT CRYOPRESERVATION

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov
Ukrainian Research Institute of poultryfarming, Borki, Kharkov region

The effect of additives of egg albumin, human serum albumin and ovomucoid to cryoprotective medium within the range of concentrations 0,5–2% on the integrity of rooster sperm in the process of cryopreservation are studied. It has been shown that protein additives to cryoprotective medium decrease the cryoprotectant toxic effect on spermatozoa both at the stage of equilibration and after freeze-thawing. It has been established that fertilizing ability of rooster's cryopreserved spermatozoa depends on the protein concentration of cryoprotective medium.

УДК 57.043:636

Н.Д.Безуглый, Н.А.Гордиенко

ОСМОТИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ЯЙЦЕКЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В РАСТВОРАХ КРИОПРОТЕКТОРОВ.

II. Оптимизация методик применения защитных веществ

Статья посвящена анализу и оптимизации методик применения криопротектора при замораживании эмбрионов млекопитающих. Предложен алгоритм расчета параметров ступенчатых методов применения криопротекторов с целью оптимального уравнивания клетки с окружающей средой. Обоснован одноступенчатый способ выведения криопротектора в гипертоническом растворе непроникающих веществ. Показана эффективность использования разработанных методик на практике.

В работе [1] нами дано общее описание осмотической реакции яйцеклеток и эмбрионов в растворах криопротекторов. Предложенное количественное описание поведения клеток при любых изменениях объема в любой момент времени показывает зависимость длительности уравнивания клетки со средой от начальной и конечной концентрации проникающих и непроникающих веществ. В данной части исследования полученные результаты будут использоваться для анализа и оптимизации способов применения криопротекторов. При этом применяются те же общие принципы построения физико-математической модели и материалы исследования, что и в работе [1].

Анализ существующих методик насыщения и выведения криопротекторов. Чтобы избежать повреждения зародышей осмотическим шоком, в практике используют эмпирически подобранные ступенчатые методы применения криопротекторов. В классической методике применения 1,5 М диметилсульфоксида (ДМСО) используется трехступенчатое насыщение и шестиступенчатое выведение защитного вещества [12, 13]. Первый процесс при изотонической концентрации непроникающих веществ характеризуется переносом эмбриона в растворы с равномерно повышающейся концентрацией ДМСО: фосфатно-солевой буфер (ФБС) → 0,5М ДМСО → 1,0М ДМСО → 1,5М ДМСО

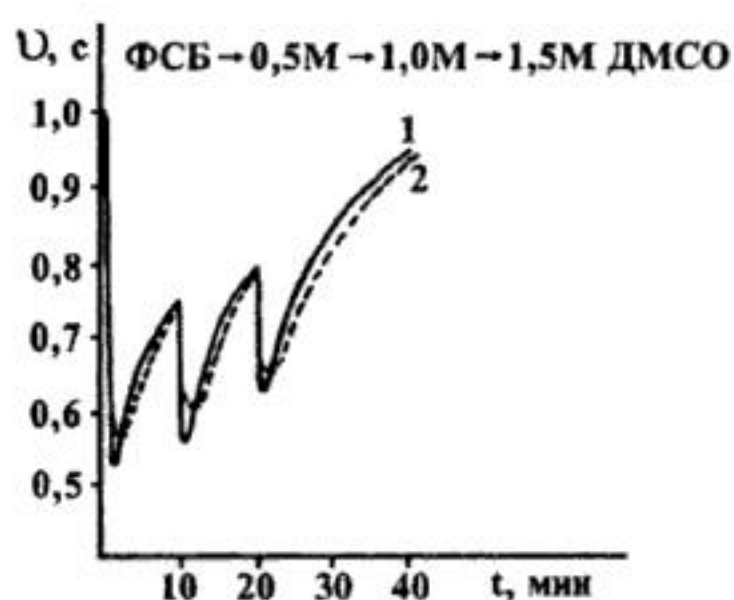


Рис. 1. Изменение относительного объема одноклеточного эмбриона при трехступенчатом насыщении 1,5М ДМСО: 1 — расчетные значения, 2 — экспериментальные значения

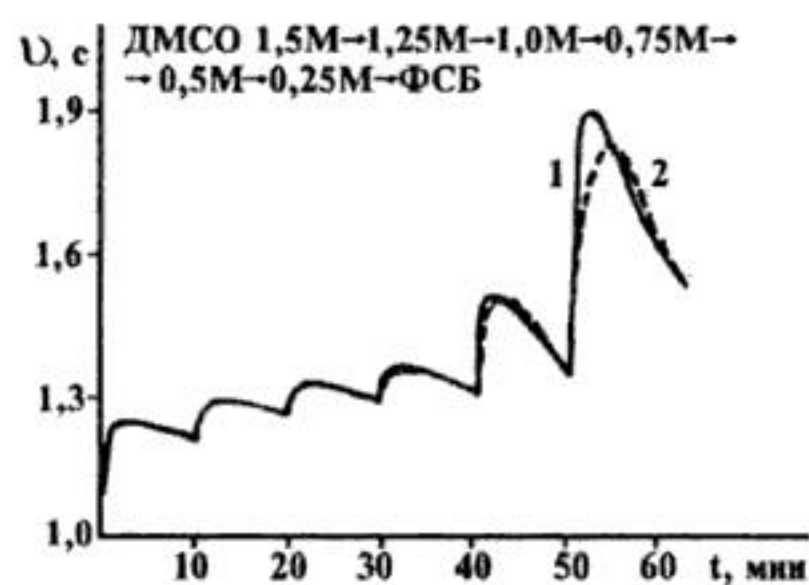


Рис. 2. Изменение относительного объема одноклеточного эмбриона мыши при шестиступенчатом выведении 1,5 М ДМСО: 1 — расчетные значения, 2 — экспериментальные значения

с выдержкой по 10 мин на первых двух ступенях и 20 мин — на третьей. Как видно из рис. 1, изменение объема на каждой ступени происходит неравномерно, наиболее резко изменяется объем на I-й ступени, длительность последней явно недостаточна для полного насыщения криопротектором. При выведении зародыши переносят в растворы равномерно понижающейся концентрации ДМСО с шагом 0,25М и длительностью каждой ступени 10 мин. Как показывают волюмометрические исследования, на первых 4 ступенях изменения объема практически не происходит (рис. 2); максимальное изменение объема наблюдается на последней ступени как в результате недостаточной длительности предыдущих ступеней, так и наибольшего относительного перепада внутриклеточных концентраций ДМСО на ней. Кроме того, криопротектор полностью удаляется из клетки. Аналогичным образом большинство исследователей используют и глицерин — криопротектор, также нашедший широкое применение при криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих. Так, насыщение и выведение 1,0–1,4М глицерина при замораживании эмбрионов овец и крупного рогатого скота проводят в 4 ступени с одинаковыми концентрационными шагами и длительностью каждой ступени [2]. Как и в вышеописанном случае применения ДМСО, изменение клеточного объема на различных ступенях происходит неравномерно, а длительность ступеней не является оптимальной [9]. Таким образом, хотя данные методики и позволяют сохранить клетки в течение криоконсервации [3], но они не являются оптимальными.

Оптимизация ступенчатых методик применения криопротекторов. Основными требованиями, предъявляемыми к ступенчатым методикам, являются: одинаковое изменение клеточного объема на всех ступенях и оптимальная длительность каждой ступени, в течение которой должно установиться равновесие между клеточным содержимым и внутриклеточной средой. В соответствии с (1) в работе [1] относительный объем клетки v_c определяется как:

$$v_c = v_b + (1 - v_b) v + v_p + v_i, \quad (1)$$

где v_b — относительный объем осмотически неактивных (b) веществ, v — относительный объем воды, v_p и v_i — относительные объемы проникающих (p) и непроникающих (i) веществ в клетке соответственно. Нетрудно показать, что относительный объем веществ $v_{i,p} = v_{i,p} C_{i,p}$, где v — молярный объем вещества, при применяемых концентрациях $C \sim 1$ М не превышает 10% клеточного объема и им можно пренебречь. Максимальное изменение относительного количества воды v^* на k -й ступени произойдет при выравнивании вне- и внутриклеточного давления и, следовательно, определится соотношением суммарных концентраций проникающих и непроникающих веществ внутри и вне клетки перед k -й ступенью:

$$v_k^* = \frac{C_i^i + (C_p^i)_k}{C_i^e + (C_p^i)_k + (\Delta C_p)_k}, \quad (2)$$

где суперскрипты i и e относятся к внутри- и внеклеточным концентрациям соответственно, $(C_p^i)_k$ — концентрация криопротектора в клетке перед k -й ступенью, $\Delta(C_p)_k$ — перепад концентрации криопротектора (концентрационный шаг) на k -й ступени. Очевидно, что при ступенчатой методике применения криопротектора его концентрация в клетке составит на k -й ступени насыщения:

$$(C_p^i)_k = \sum_{j=1}^{k-1} (\Delta C_p)_j \quad (3)$$

и на 1-й ступени выведения:

$$(C_p^i)_l = C_p^\infty - \sum_{m=1}^{l-1} (\Delta C_p)_m, \quad (4)$$

где C_p^∞ — конечная концентрация криопротектора в клетке:

$$C_p^\infty = \sum_{k=1}^{N_a} (\Delta C_p)_k = \sum_{l=1}^{N_r} (\Delta C_p)_l, \quad (5)$$

где $N_{a,r}$ — количество ступеней насыщения (a) и выведения (r) соответственно. Если критерием выбора величины концентрационных шагов считать одинаковое изменение объема клетки на всех ступенях, то из системы (1) — (4) методом математической индукции найдем, что концентрационный шаг на k -й ступени насыщения задается рекуррентной формулой:

$$(\Delta C_p)_k = \left[C_i^i + (\Delta C_p)_1 \right]^{k-1} (\Delta C_p)_1. \quad (6)$$

Аналогично для l -й ступени выведения:

$$(\Delta C_p)_l = \left[C_i^i + (\Delta C_p)_{N_r} \right]^{N_k-l} (\Delta C_p)_{N_r}. \quad (7)$$

Первый концентрационный шаг $(\Delta C_p)_1$ при насыщении и последний $(\Delta C_p)_{N_r}$ при выведении определяются из системы уравнений (6) — (7) совместно с (5):

$$(\Delta C_p)_1 = \left(C_i^i + C_p^\infty \right)^{1/N_a} C_i^{iso}, \quad (8)$$

$$(\Delta C_p)_{N_r} = \left(C_i^i + C_p^\infty \right)^{1/N_r} C_i^{iso}, \quad (9)$$

Полученные решения (6) — (9) позволяют рассчитать оптимальный порядок изменения концентрации криопротектора во внеклеточной среде при насыщении клетки защитным веществом в N_a ступеней и его выведение в N_r ступеней. Выражения (6) и (7) показывают, что для одинакового изменения клеточного объема на всех ступенях концентрационный шаг должен возрастать с каждой ступенью при насыщении клетки криопротектором и уменьшаться при выведении.

Количество ступеней, необходимое для оптимального уравнивания клетки с окружающей средой, определяется из условия, что ни на одной из ступеней клеточный объем не должен достигать критического значения v_c^{cr} . В таком случае использование уравнений (8) и (9) совместно с уравнениями (1) и (2) позволяет определить, что:

$$N_{a,r} > \frac{\ln \left[\left(C_i^{iso} + C_p^\infty \right) / C_i^{iso} \right]}{\ln \left[\left(v_c^{cr} + v_p \right) / \left(1 - v_b \right) \right]}. \quad (10)$$

Как показали многочисленные исследования [7, 8 и др.], яйцеклетки и эмбрионы мыши, кролика, крупного рогатого скота не повреждаются при переносе из физиологического раствора в растворы глицерина и ДМСО в концентрациях до 2М. Так как в криоконсервации обычно используют криопротекторы в концентрациях 1–1,5М, то насыщение яйцеклеток и эмбрионов защитным веществом можно производить одноступенчато или выбирать количество сту-

пеней независимо от осмотических свойств клетки. В силу обсуждавшегося ранее механизма повреждения клеток при оводнении [1] более актуально правильное определение числа ступеней при выведении криопротектора.

Анализ временных характеристик многоступенчатых методик применения криопротекторов возможен на основе (9)–(10) в работе [1]. Но поскольку полное уравнивание клетки с окружающей средой теоретически происходит бесконечно, длительность эквипирации следует рассчитывать исходя из некоторого конечного, например 95% выравнивания внутри- и внеклеточной концентраций. В таком случае длительность k -й ступени определяется выражением:

$$\left(\frac{t}{\tau}\right)_k = \frac{0,95 \left[C_i^i + (C_p^i)_k \right]}{\mu_p C_i^e} + \frac{2,05 \left[C_i^e + (C_p^i)_k + (\Delta C_p)_k \right] C_i^i}{\mu_p (C_i^e)^2}, \quad (11)$$

где:

$$\tau_p = \frac{1}{P (S/V\omega)^{iso}} \quad (12)$$

характерное время осмотической реакции клетки с поверхностно-объемным соотношением $(S/V\omega)^{iso}$ в растворе криопротектора с удельной проницаемостью P . Так как время уравнивания пропорционально начальной концентрации криопротектора к клетке, длительность ступени должна возрастать при насыщении и уменьшаться при выведении криопротектора с каждой ступенью. В результате применения одинаковых временных интервалов на всех ступенях возможно неполное уравнивание клетки с окружающей средой, что значительно увеличит перепад концентраций на последней ступени и удлинит весь процесс эквипирации.

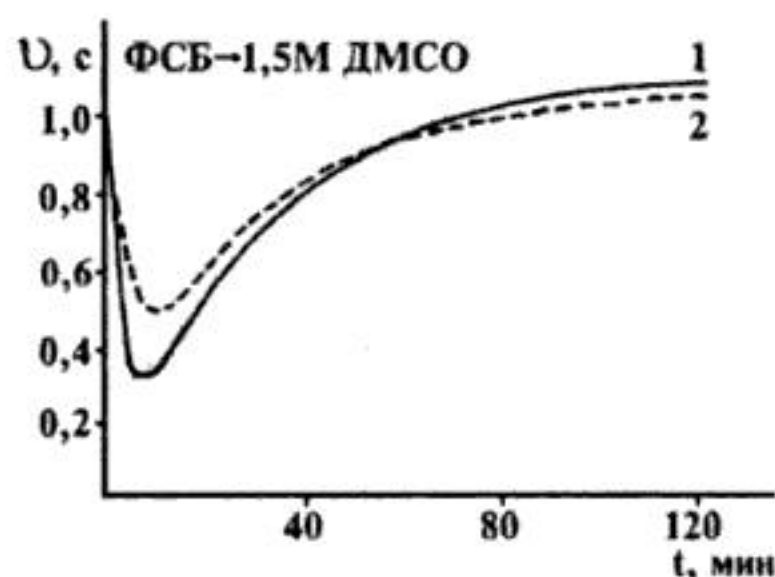


Рис. 3. Изменение относительного объема одноклеточного эмбриона мыши при оптимизированном ступенчатом насыщении 1,5 М ДМСО: 1 — расчетные значения, 2 — экспериментальные значения

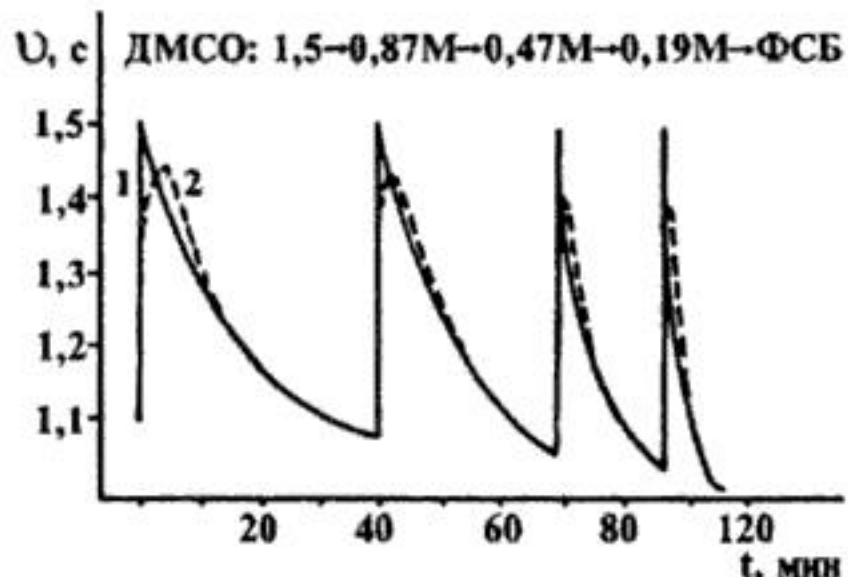


Рис. 4. Изменение относительного объема одноклеточного эмбриона мыши при оптимизированном выведении 1,5 М ДМСО: 1 — расчетные значения, 2 — экспериментальные значения

Таким образом, система уравнений (6)–(12) полностью описывает метод ступенчатого насыщения (выведения) криопротектора. Зная критический объем клетки, количество осмотически неактивного вещества, поверхностно-объемное соотношение и удельную проницаемость к криопротектору, можно определить количество ступеней, величину концентрационного шага и длительность каждой ступени. В качестве примера оптимизации ступенчатых методик показано применение 1,5М ДМСО для зиготы мыши (рис. 3, 4). Как видно из рисунков, оптимизированные методы значительно отличаются от предложенных ранее способов с одинаковыми концентрационными и временными шагами. Но именно такой порядок изменения концентрации криопротектора и длительности ступеней обеспечивает оптимальные условия уравнивания клетки с окружающей средой.

Предложенная модель описывает осмотическую реакцию не только яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих, но и может быть применена к любым клеточным суспензиям. Особо полезным могло бы быть ее использование

для расчета методов применения криопротекторов при замораживании биологических объектов путем витрификации, когда высокие концентрации защитных веществ (3–4) делают осмотические проблемы особенно актуальными [5, 10].

Применение непроникающих веществ (НПВ) для выведения криопротектора. Нетехнологичность ступенчатых методик применения криопротекторов, которые включают большое количество манипуляций с эмбрионами и средами и имеют значительную длительность (1–2 ч), потребовала нового подхода исследователей к решению этого вопроса. Независимо три группы исследователей [4, 6, 11] показали возможность одноступенчатого выведения глицерина с использованием гипертонической концентрации сахарозы при криоконсервации зародышей мыши и крупного рогатого скота.

При разработке нами данного метода были использованы основные выводы аналитической модели осмотической реакции клетки. Как следует из (2), максимальное изменение относительного количества воды в клетке обратно пропорционально внеклеточной концентрации НПВ. Таким образом, падение осмотического давления вследствие уменьшения концентрации криопротектора в окружающей среде можно компенсировать увеличением осмолярности НПВ (в качестве таковых в вышеуказанных исследованиях использовали сахарозу). В таком случае, если это увеличение будет полностью компенсировать уменьшение концентраций криопротектора, оводнение клетки вообще не произойдет. Дальнейшее удаление криопротектора из клетки приведет к ее сжатию. Таким образом, роль сахарозы как дополнительного к изотоническому количеству непроникающего вещества сводится к созданию избыточного осмотического давления во внеклеточной среде, предотвращающего увеличение клеточного объема. Чтобы максимальное изменение объема клетки не превысило критического значения, из (1)–(2) найдем, что концентрация непроникающих веществ в среде должна превышать изотоническую на:

$$\Delta C_i^e > \frac{(C_p^\infty + C_i^{iso})(1 - v_b)}{v_c^{cr} - v_b} - C_i^{iso} . \quad (13)$$

Кроме регулирования максимального изменения объема клетки, как следует из (11), изменение концентрации НПВ в окружающей среде позволяет управлять длительностью процесса выведения криопротектора из клетки. Расчет времени выхода криопротектора показывает, что 95%-е уравнивание с окружающей средой (11), содержащей НПВ осмолярностью ΔC_i^e (13), наступит через время:

$$t_p^{0,95} = \frac{v_c^{cr} - v_b}{1 - v_b} \left(0,95 + \frac{2,05 C_p^{iso}}{C_i^{iso} + C_p^\infty} \right) . \quad (14)$$

Сравнивая длительность оптимизированной ступенчатой процедуры с одноступенчатым выведением для эмбриона мыши, можно видеть, что последняя короче первой примерно в 7 раз. Следовательно, кроме большей технологичности, применение сахарозы значительно укорачивает процесс выведения криопротектора. Этот вывод особенно важен при практическом использовании криоконсервации эмбрионов млекопитающих. Так, классическая процедура выведения ДМСО из эмбрионов крупного рогатого скота длится 1 ч, тогда как одноступенчатое выведение криопротектора в растворе сахарозы происходит за 5 мин.

Предлагаемый нами способ использования глицерина при криоконсервации зародышей имеет следующие параметры: насыщение — в 1,2М растворе глицерина в ФСБ с 20% фетальной сыворотки в течение 7 мин, выведение — в 0,75М растворе сахарозы в ФСБ с 20% фетальной сыворотки в течение 5 мин. Эти параметры предотвращают лизис клетки и соответствуют оптимальному уравниванию клетки со средой (рис. 5). Данным методом было замороже-

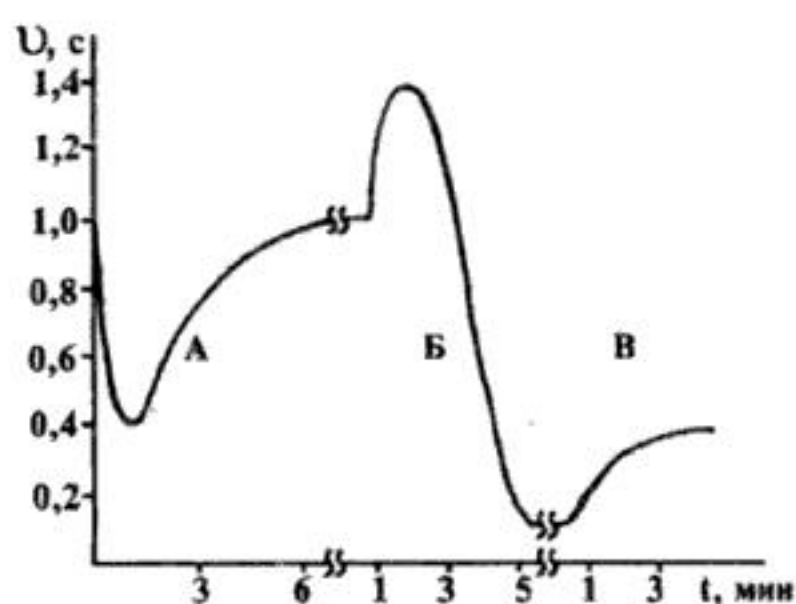


Рис. 5. Изменение относительного объема поздней морулы крупного рогатого скота при одноступенчатом насыщении 1,2 М глицерина на ФСБ (А), одноступенчатом выведении в 0,75 М сахарозы на ФСБ (Б) и после перенесения в ФСБ (В): 1 — расчетные значения, 2 — экспериментальные значения ($M \pm m$, $n=14$)

получить достаточно высокую сохранность эмбрионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безуглый Н.Д., Гордиенко Н.А. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих в растворах криопротекторов. I. Общее описание изменений клеточного объема // Пробл. криобиологии. — 1995, № 3. — С. 40–46.
2. Сергеев Н.И., Мазепкин С.А. Криоконсервация эмбрионов крупного рогатого скота и овец. Метод. рекомендации. — М.: Агропромиздат, 1989. — 5 с.
3. Сергеев Н.И., Шухов В.Н. Криоконсервация крупного рогатого скота // Животноводство. — 1979. — № 7. — С. 37–41.
4. Bezugly N.D. The Report at the joint meeting of the Academy of Science of the Ukrainian SSR, 1983.
5. Bezugly N.D., Ostashko F.I., Volkova E.G. Teoretical prerequisites for the freezing of cattle and mouse embryos by plunging in liquid nitrogen // 11 th International Congress on animal reproduction and artificial insemination, Dublin, Ireland. — 1988 — P. 144–146.
6. Leibo S.P. Osmotic responses of bovine embryos in solutions of sucrose, glycerol or glycerol-sucrose // Theriogenologie — 1984. — 21, № 6. — P. 711.
7. Lenh-Jensen H. Bovine egg transplantation. Preservation of embryos // Nord. Vet. Med. — 1980 — 32. — P. 523–532.
8. Ostashko F.I., Bezugly N.D., Pesotsky V.V. et al. The Kharkov technology of cattle embryo cryoconservation. — 25 of cattle embryo cryoconservation // 25th Annual Meeting, Aachen, W.-Germany, 1988, p.170
9. Ostashko F.I., Gordienko N.A., Bezugly N.D. Glycerol transport to mammalian ova and embryos during cryoconservation // 11th international congress on animal reproduction and artificial insemination, Dublin, Ireland — 1988. — P. 181–183.
10. Rall U.F., Fahy C.H. Cryopreservation of mouse embryos by vitrification // Nature — 1985. — 13. — P. 573.
11. Renard J., Ozil J., Heyman Y. Capsule for mammalian embryos conservation // International Clain. — 1983. № 83/02386.
12. Willadsen S.M. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing // The Freezing of Mammalian Embryos, Ciba Foundation Symposium 52, Amsterdam: Elsevier, 1977. — P. 175–187.
13. Wilmut J. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing // Life Sci. — 1972. — II, part 2. — P. 1071–1079.

Ин-т животноводства УААН, г. Харьков, п/о Кулинич

Поступила 23.01.95

М.Д.БЕЗУГЛИЙ, Н.О.ГОРДИЄНКО

ОСМОТИЧНА РЕАКЦІЯ ЯЙЦЕКЛІТИН ТА ЗАРОДКІВ ССАВЦІВ У РОЗЧИНАХ КРІОПРОТЕКТОРІВ. II. ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИК ЗАСТОСУВАННЯ ЗАХИСНИХ РЕЧОВИН

Інститут тваринництва УААН, м. Харків, п/в Куліничі

Стаття присвячена аналізу та оптимізації методик застосування криопротектора при заморожуванні зародків ссавців. Запропоновано алгоритм розрахунку параметрів ступінчатих методів застосування криопротекторів з метою оптимального урівноваження клітини з навколишнім середовищем. Обґрунтовано одноступінчатий спосіб виведення криопротектора в гіпертонічному розчині

непроникающих речовин. Показана ефективність використання розроблених методик на практиці.

N.D.BEZUGLY, N.A.GORDIENKO

OSMOTIC RESPONSE OF MAMMALIAN OOCYTES AND EMBRYOS IN CRYOPROTECTIVE SOLUTIONS. II. OPTIMIZATION OF THE METHODS OF APPLYING CRYOPROTECTIVE SUBSTANCES

Institute of Animal Husbandry, Ukrainian Agrarian Academy, Kharkov, P.B.Kulinichi

The report deals with the analysis and optimization of the methods of applying cryoprotectants during freezing of mammalian embryos. The authors propose an algorithm of calculating the parameters of the stepwise methods of applying cryoprotectants with the aim of the optimal equilibration of the cell with the environment. A single-step method of elimination of the cryoprotectant in the hypertonic solution of the nonpenetrating substances is considered. Practical implementation of the developed methods supported their efficiency.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 57.043:615.832.9:591.112.2:57.084.1

С.М.Романец

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ МЕМБРАНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СЕРДЕЧНЫЙ ЦИКЛ В УСЛОВИЯХ ОБЩЕЙ ГИПОТЕРМИИ

Изучено влияние мембранотропных лекарственных веществ на электрофизиологические показатели миокарда крыс в условиях нормотермии и общего охлаждения до ректальной температуры (РТ) 20 °С. Показаны отличия в действии разных концентраций изоптина и обзидана на скорость охлаждения, длительность систолических и диастолических параметров миокарда при общей гипотермии.

Гипотермия как метод лечения находит все более широкое применение в медицине. Она оказывает защитное действие на организм при гипоксии, ишемии, асфиксии новорожденных, шоке различной этиологии, при операциях на сердце и крупных магистральных сосудах [4]. Однако приведение организма теплокровных животных в состояние умеренной, а тем более глубокой гипотермии неизбежно вызывает в нем развитие патофизиологических изменений различной степени выраженности. Наибольшую опасность представляют нарушения жизненно важных систем организма, в том числе сердечно-сосудистой системы. В литературе [1] имеются данные о функционировании сердца собак, кошек и кроликов в условиях гипотермии, однако сведений о комплексных исследованиях деятельности сердца крыс недостаточно. Другим, не менее важным аспектом изучения работы сердца при охлаждении является исследование влияния кардиотропных лекарственных веществ в этих условиях. Такой интерес продиктован тем, что многие заболевания, при лечении которых используют гипотермию, протекают на фоне сердечно-сосудистых расстройств. Исследований влияния кардиотропных лекарственных веществ на электрофизиологические показатели сердца крыс при охлаждении не проводилось. В связи с этим целью нашей работы являлось изучение температурной зависимости изменений электрофизиологических показателей сердца крыс при общей гипотермии, а также исследование особенностей действия мембранотропных препаратов в этих условиях.

Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 200–300 г. Общую гипотермию осуществляли путем погружения животного в холодную воду (0–2 °С) до достижения РТ 20 °С. В ходе эксперимента измеряли температуру тела крысы в прямой кишке при помощи медь-константановой термопары. Для блокирования рефлекторных терморегуляторных реакций организма животных наркотизировали смесью тиопентала натрия и оксибути-

рата натрия из расчета 30 и 100 мг/кг массы крысы соответственно. За 5 мин до охлаждения животному внутрибрюшинно вводили растворы изоптина и обзидана в дозах 10 и 20 мг/кг. Электрокардиограмму (ЭКГ) регистрировали во II-м стандартном отведении при гипотермии через каждый градус изменения температуры тела. Анализируя ЭКГ, рассчитывали длительность электрофизиологических параметров [2, 5].

Полученные результаты позволили сравнить влияние мембранотропных лекарственных препаратов на сердце крыс при нормо- и гипотермии. Так, введение изоптина и обзидана в дозах 20 мг/кг массы тела животных уже через 20 мин вызывало снижение частоты сердечных сокращений (ЧСС) примерно в 1,5 раза, и в последующие 1,5 ч изменений не наблюдалось. В то же время введение этих препаратов в дозе 10 мг/кг массы тела вызывало снижение ЧСС на 15–20% уже через 5 мин после инъекции, а через 40–50 мин ЧСС нормализовывалась. Действие изучаемых препаратов на длительность систолических параметров миокарда (время проведения возбуждения от предсердия до желудочков, время деполяризации и реполяризации миоцитов желудочков, длительность электрической систолы желудочков (рис. 1)) значительно зависит от дозы. Введение 10 мг/кг изоптина практически не влияло на изучаемые параметры, в то время как обзидан в той же дозе вызывал их незначительное увеличение. Увеличение дозировки кардиотропных веществ до 20 мг/кг вызывало одинаковое по характеру возрастание систолических показателей миокарда. Направленность изменений диастолических параметров сердца крыс (электрическая диастола предсердий (рис. 2) и желудочков и время общей диастолы миокарда) при введении изучаемых лекарственных препаратов такая же как и систолических.

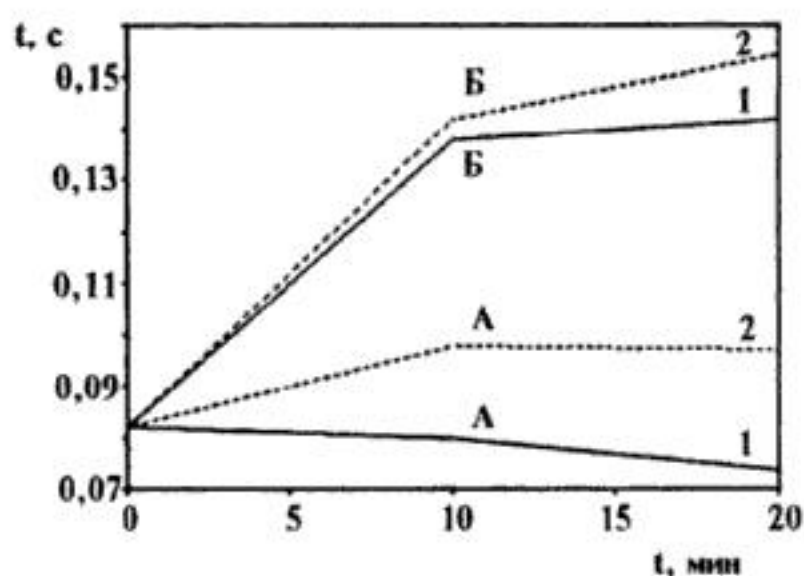


Рис. 1. Изменение электрической систолы желудочков при нормотермии и введении изоптина (1) и обзидана (2): А – 10 мг/кг, Б – 20 мг/кг

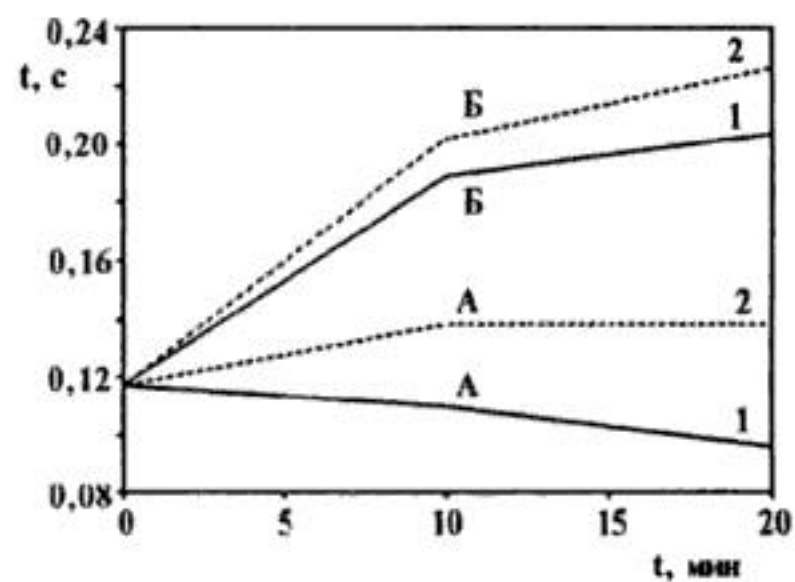


Рис. 2. Изменение электрической диастолы предсердий при нормотермии и введении изоптина (1) и обзидана (2): А – 10 мг/кг, Б – 20 мг/кг

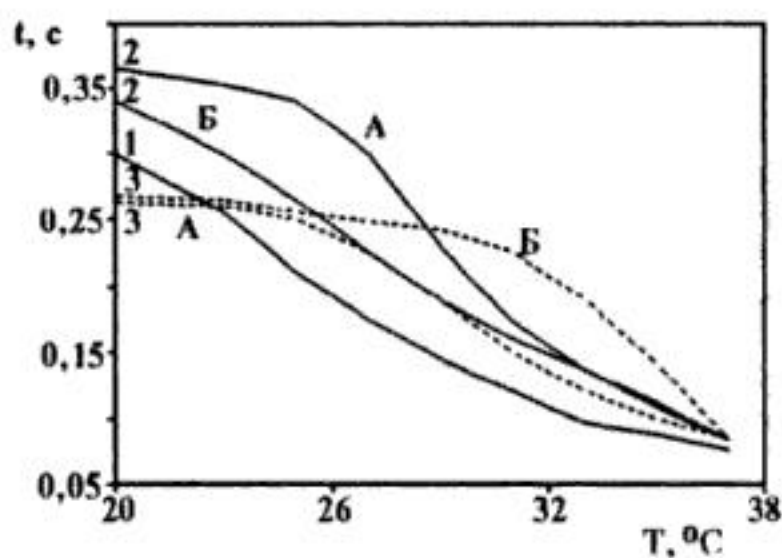


Рис. 3. Динамика электрической систолы желудочков при общей гипотермии (1), при введении изоптина (2) и обзидана (3): А – 10 мг/кг, Б – 20 мг/кг

При общем охлаждении животного ЧСС равномерно снижалась и при достижении РТ 20 °С составляла в среднем 30 ударов/мин. При гипотермии с премедикацией изоптином и обзиданом рассматриваемый показатель изменялся равномерно, однако при увеличении дозы препаратов до 20 мг/кг значения ЧСС при температуре тела 20 °С оказались вдвое больше.

В работе [3] было показано, что при общем охлаждении крыс происходит равномерное увеличение длительности систолических показателей миокарда, в то время как диастолические параметры возрастают неравномерно: до температуры тела 26–27 °С незначительно, а при дальнейшем снижении температуры — резко. Охлаждение животных с предварительным введением изо-

карда, в то время как диастолические параметры возрастают неравномерно: до температуры тела 26–27 °С незначительно, а при дальнейшем снижении температуры — резко. Охлаждение животных с предварительным введением изо-

птина показало, что при дозе 20 мг/кг характер изменения длительности электрической систолы желудочков такой же, как и при общей гипотермии (рис. 3). В то же время доза 10 мг/кг приводит к неравномерному изменению данного параметра: до 31 °С он незначительно увеличивается, затем до 27 °С быстро возрастает и при последующем охлаждении практически не меняется. Охлаждение на фоне внутривенного введения обзидана из расчета 10 мг/кг массы тела вызывает неравномерное изменение длительности электрической систолы желудочков, характер которого полностью совпадает с описанным для изоптина в той же концентрации. С другой стороны, при введении 20 мг/кг и охлаждении до 33 °С наблюдается резкое увеличение изучаемого параметра, а при дальнейшем снижении температуры тела он остается неизменным.

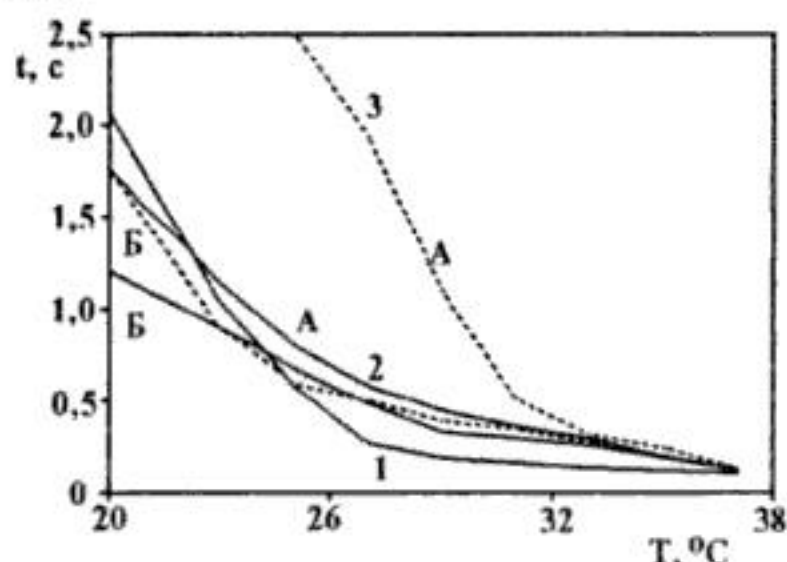


Рис. 4. Динамика электрической диастолы предсердий при общей гипотермии (1), при введении изоптина (2) и обзидана (3): А – 10 мг/кг, Б – 20 мг/кг

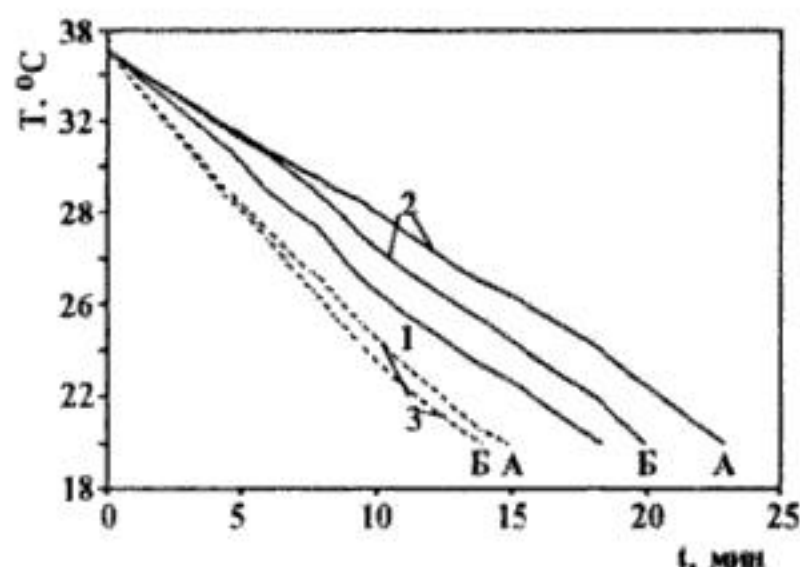


Рис. 5. Динамика изменения температуры тела крысы во время охлаждения (1), при введении изоптина (2) и обзидана (3): А – 10 мг/кг, Б – 20 мг/кг

На рис. 4 изображена зависимость изменения диастолических показателей миокарда крыс от глубины гипотермии. Так, можно отметить, что увеличение длительности электрической диастолы предсердий при общей гипотермии и при охлаждении с премедикацией мембранотропными лекарственными препаратами имеет одинаковую направленность: незначительное увеличение на первых этапах охлаждения и резкое увеличение к концу гипотермии. Однако степень увеличения и температура тела, при которой происходит резкий скачок в значениях исследуемого параметра, различны для изучаемых препаратов и зависят от их концентрации. При охлаждении с введением 10 и 20 мг изоптина/кг массы точка перегиба на графике находится в районе 27–28 °С, как и при общей гипотермии (рис. 4, 1, 4, 2). При этом сам перегиб графика менее выражен, и значения показателей при температуре 20 °С оказываются более низкими. Гипотермия на фоне премедикации обзиданом приводит к сдвигам точки перегиба графика при обеих концентрациях введенного вещества (рис. 4, 3). Причем при дозе обзидана 10 мг/кг перегиб сдвигается в область более высоких температур (30–31 °С) и становится ярко выраженным, а при введении 20 мг/кг скачок значений происходит в области более низких температур (24–25 °С) и менее выражен. Исследования показали, что введение перед гипотермией изучаемых препаратов по-разному влияет на скорость охлаждения животных (рис. 5). Премедикация изоптином увеличивает время охлаждения крыс, в то время как при введении обзидана охлаждение происходит быстрее. Возможно, это связано с различными механизмами действия данных препаратов.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что направленность изменений всех исследуемых параметров при гипотермии с премедикацией и без нее одинакова. Показано, что при нормальных условиях большие дозы исследуемых веществ вызывают значительные изменения электрофизиологических параметров. При гипотермии меньшая доза изоптина оказывает большее влияние на скорость охлаждения животного и исследуе-

мые параметры сердечного цикла, а обзидана — только на диастолические показатели.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Покровский В.М., Шейх-Заде Ю.Р., Воверейдт В.В. Сердце при гипотермии. — Л.: Наука, 1984. — 144 с.
2. Рашмер Р. Динамика сердечно-сосудистой системы. — М.: Медицина, 1981. — 600 с.
3. Романец С.М., Жегунов Г.Ф., Бабийчук Г.А. Сравнительное изучение электрофизиологических показателей сердца крыс при общей и краниocereбральной гипотермии // Вестн. пробл. совр. медицины. — Вып. 9. — 1994. — С. 65–69.
4. Сумбатов Л.А. Искусственная гипотермия. — М.: Медицина, 1985. — 85 с.
5. Цукерман Б.М., Титомир Л.И. Электрокардиография // Руководство по физиологии. — Л.: Наука, 1980. — С. 288–317.

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

Поступила 04.04.95

С.М.РОМАНЕЦЬ

ОСОБЛИВОСТІ ДІЇ МЕМБРАНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ НА СЕРЦЕ-ВІЙ ЦИКЛ В УМОВАХ ЗАГАЛЬНОЇ ГІПОТЕРМІЇ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчено вплив мембранотропних лікарських речовин на електрофізіологічні показники міокарда щурів в умовах нормотермії і загального охолодження до ректальної температури (РТ) 20 °С. Засвідчена різниця в дії різних концентрацій ізоптіну та обзидану на швидкість охолодження, тривалість систолічних і діастолічних параметрів міокарда при загальній гіпотермії.

S.M.ROMANETS

PARTICULAR FEATURES OF THE ACTION OF THE MEMBRANE-TROPIC PREPARATIONS ON THE HEART CYCLE DURING TOTAL HYPOTHERMIC TREATMENT

Institute for problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

The effect of the membrane-tropic drugs on the electrophysiological parameters of the rat myocardium was studied under normothermic conditions and during total cooling down to the rectal temperature of 20 °C. The authors demonstrated the difference in the action of various concentrations of isoptine and obsidane on the rate of cooling, duration of the systolic and diastolic parameters of the myocardium during total hypothermic treatment.

УДК 57. 043

А.А.Ковалев

ПОВТОРНЫЕ И МНОЖЕСТВЕННЫЕ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ КУЛЬТУР КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ОСТРОВКОВЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕННЫМ ИНСУЛИНЗАВИСИМЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Изучена эффективность повторных и множественных ксенотрансплантаций культур островковых клеток поджелудочной железы и определены оптимальные сроки их выполнения при лечении больных осложненным инсулинзависимым сахарным диабетом. Представлены показания к хирургическому лечению, описана техника хирургических вмешательств, детально проанализированы результаты лечения, а также выделены четыре варианта течения посттрансплантационного периода. Сделан вывод о целесообразности повторных трансплантаций при различных вариантах течения заболевания.

Для лечения хронических осложнений инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД), таких как почечно-ретикулярный синдром, синдром диабетической нейропатии, нейрогликопенический синдром, синдром “диабетической

стопы”, в последние годы активно разрабатываются хирургические методы, из которых наиболее доступным является свободная алло- или ксенотрансплантация культур островковых клеток поджелудочной железы (ТОКлПЖ) [1, 2]. В то же время наш клинический опыт показывает [3–5], что, обладая достаточно выраженным антигликемическим эффектом, этот метод имеет и некоторые недостатки — в первую очередь ограниченный срок функционирования трансплантата. Это делает актуальным дальнейшее изучение эффективности повторных и множественных ксенотрансплантаций и определение оптимальных сроков их выполнения.

За период с 1989 по 1995 г. было выполнено 115 ксенотрансплантаций культуры ОКлПЖ у 92 больных ИЗСД (51 мужчина и 41 женщина в возрасте от 15 до 62 лет). Уровень гликемии зависел от стадии компенсации (оценивалось по критериям экспертов ВОЗ) и составлял 10,0–20,0 ммоль/л; доза инсулина в начале наблюдения составляла в среднем $(67,6 \pm 22,7)$ ед/сут. У 75 больных ТОКлПЖ выполнена однократно, у 12 реципиентов выполнена повторная, у 5 — множественная (3–4) ТОКлПЖ.

Показанием к хирургическому лечению считали тяжелое или средне-тяжелое течение заболевания с прогрессирующими хроническими осложнениями: диабетическая ретинопатия, нефропатия, полинейропатия, микроангиопатия нижних конечностей, синдром “диабетической стопы”, лабильный диабет с признаками нейрогликопенического синдрома и диабетической энцефалопатией, хронический кетоз, а также высокая потребность и невозможность подбора адекватной дозы инсулина.

Для трансплантации была использована культура островковых клеток поджелудочной железы однодневных поросят, приготовленная в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков). После эксплантации поджелудочной железы ткань последней подвергали микродиссекции до микрофрагментов 1–2 мм и помещали в культуральную среду (Хенкса или 199) на 7–10 сут, а затем замораживали по разработанной программе и помещали в герметичные стерильные контейнеры, которые хранились в жидком азоте при -196°C . Каждый контейнер содержал материал, полученный из 7–8 поджелудочных желез, которые предназначались для трансплантации одному больному. Перед трансплантацией контейнеры размораживали при 37°C , культуру ОКлПЖ отмывали от димексида и среды Хенкса и в виде взвеси в 20 мл изотонического раствора NaCl имплантировали реципиенту тем или иным способом (внутримышечно, внутripеченочно, в большой сальник, в круглую связку печени). В послеоперационном периоде проводили изучение показателей углеводного и жирового обменов, клеточного и гуморального иммунитета, исследовали функцию зрения, почек, состояние микроциркуляции нижних конечностей. Исследование культуры ОКлПЖ *in vitro* проводилось морфологически, содержание инсулина в культуре островковых клеток до и после криоконсервации изучали радиоиммунным методом [3].

Хорошими считали результаты, когда у больных полностью исчезали (или значительно уменьшались) субъективные жалобы, происходило обратное развитие основных хронических диабетических осложнений, наблюдалась нормализация показателей углеводного и жирового обменов. Эффект считался удовлетворительным, если жалобы уменьшались, но при этом не происходило объективного улучшения показателей углеводного, жирового обменов, улучшения состояния сетчатки, почек, нервной системы, микроциркуляции.

Наблюдение за 92 больными показало, что с момента окончания функционирования трансплантата (по прошествии 8–12 мес после первой ТОКлПЖ) течение диабета отличалось неоднородностью, что позволило выделить четыре варианта посттрансплантационного периода и определить показания к повторным трансплантациям.

Первый вариант посттрансплантационного периода. У 13 больных (14,3%) несмотря на длительный период, прошедший после ТОКлПЖ, состояние оставалось стабильно хорошим, без признаков декомпенсации диабета. Оно сопровождалось снижением потребности в экзогенном инсулине по сравнению с дооперационной на $(22,8 \pm 14,5)$ ЕД/сут ($p < 0,01$) и отсутствием признаков прогрессирования диабетических осложнений.

Второй вариант посттрансплантационного периода. У 29 больных (31,5%) через 1–1,5 г. после ТОКлПЖ состояние в целом оставалось удовлетворительным, больные чувствовали себя лучше, чем до операции, однако у них имелись симптомы ослабления эффекта ксенотрансплантации, которые проявлялись в нарастании гипергликемии до значений субкомпенсации, увеличении суточной дозы инсулина, появлении эпизодов гипогликемий и рецидиве симптомов дистальной полинейропатии.

Третий вариант посттрансплантационного периода. У 18 больных (19,6%) после утраты функции ксенотрансплантата наступило ухудшение состояния, обусловленное декомпенсацией диабета, прогрессированием хронических осложнений, однако это ухудшение было ликвидировано медикаментозно.

Четвертый вариант посттрансплантационного периода. У 12 больных ИЗСД (13,0%) через 12–14 мес после ТОКлПЖ зарегистрировано резкое ухудшение состояния, потребовавшее госпитализации в эндокринологический стационар и плохо поддающееся медикаментозной коррекции. У 4 из 12 больных с этим вариантом течения посттрансплантационного периода после утраты функции ксенотрансплантата наблюдали быстрое прогрессирование диабетической нефропатии и нарастание симптомов хронической почечной недостаточности. Это потребовало применения программного гемодиализа и включения больных в лист ожидания на трансплантацию почки. У 7 (7,6%) больных, согласно принятым в клинике критериям эффективности операции, результаты первой трансплантации были признаны неудовлетворительными; 13 больных (9,4% от общего числа оперированных больных) после ТОКлПЖ в клинику не обращались и их судьба неизвестна. На основании анализа вариантов клинического течения диабета и скорости прогрессирования его хронических осложнений после утраты функции ксенотрансплантата были разработаны показания и оптимальные сроки выполнения повторных и множественных ТОКлПЖ.

Так, при 1-м варианте клинического течения позднего посттрансплантационного периода необходимость в повторных трансплантациях у больных отсутствовала. Эта группа больных нуждалась в периодических контрольных наблюдениях в среднем 1 раз в 6 мес. Показания к повторным трансплантациям ОКлПЖ при 2-м варианте течения посттрансплантационного периода были относительными, этим больным более целесообразным было проведение курса превентивной терапии или санаторно-курортное лечение. Выполнение повторных трансплантаций наиболее показано при 3-м и 4-м вариантах течения посттрансплантационного периода, однако это решение всегда принималось строго индивидуально, с учетом причин, приведших к декомпенсации и изменивших характер течения диабета.

Повторные трансплантации ОКлПЖ были выполнены у 7 больных с 3-м, у 4 больных с 4-м вариантом течения посттрансплантационного периода и у 2 больных с неудовлетворительным результатом первой трансплантации ОКлПЖ. Наиболее частыми показаниями к повторной трансплантации являлись рецидив таких диабетических осложнений, как энтеропатия, почечно-ретикулярный синдром и синдром “диабетической стопы”. Повторные трансплантации ОКлПЖ были выполнены в сроки от 5 до 23 мес, при этом у 5 больных — через 5–8 мес после предыдущей операции, у 10 больных — в промежутке между 10 и 17 мес, у 2 больных — через 22 и 23 мес после первой транс-

плантации. Анализ показал, что клинический эффект повторных ксенотрансплантаций был полностью идентичен эффекту первой как по силе, так и по длительности антидиабетического воздействия. Хорошие результаты после повторной ТОКлПЖ получены у 14 больных (82,3%), удовлетворительные — у 1 больного (5,9%), неудовлетворительные — у 2 (11,8%), при этом они полностью совпадали с предыдущими результатами у этих же больных. Анализ клинических результатов повторных трансплантаций представлен в таблице.

Множественные (3 и более) трансплантации ОКлПЖ были выполнены у 5 больных (3 мужчины и 2 женщины) с лабильным течением диабета, выраженными признаками нейроглюкопенической энцефалопатии и энтеропатии, пролиферативной ретинопатией, преретинальными кровоизлияниями, нефропатией 1–2 стадии и трофическими нарушениями мягких тканей стопы. Каждая повторная трансплантация выполнялась через 9–15 мес после предыдущей ($12,9 \pm 2,8$). У всех пациентов данный метод способствовал длительной (4–5 лет) стабилизации диабета, нормализации показателей углеводного обмена, снижению потребности в инсулине, исчезновению субъективных жалоб и повышению качества жизни.

Результаты повторных трансплантаций ОКлПЖ (n=17)

Исследуемые показатели	До ТОКлПЖ	ТОКлПЖ 1	ТОКлПЖ 2
Среднесуточная гликемия, ммоль/л	14,6±4,8	9,2±2,6	9,8±3,1
Доза инсулина, ЕД/сут	66,8±24,1	38,8±22,5	41,9±20,2
Динамика осложнений:			
ретинопатия (n=12)		9 (75,0%)*	8 (66,7%)*
нефропатия (n=5)		3 (60,0%)*	3 (60,0%)*
нейропатия дист. (n=14)		12 (85,7%)*	11 (78,6%)*
нейропатия висц. (n=4)		4 (100,0%)*	4 (100,0%)*
"диабетич. стопа" (n=5)		5 (100,0%)*	5 (100,0%)*
Результаты:			14 (82,3%)
хорошие		14 (82,3%)	1 (5,9%)
довлетворительные		1 (5,9%)	2 (11,8%)
неудовлетворительные		2 (11,8%)	

Примечание. * — улучшение течения осложнений.

На основании проведенного анализа был сделан вывод, что выполнение повторных и множественных ксенотрансплантаций показано при 3-м и 4-м вариантах течения посттрансплантационного периода, т.е. у тех больных, у которых после утраты функции ксенотрансплантата наступало резкое ухудшение состояния, декомпенсация диабета и появлялась угроза быстрого прогрессирования хронических инвалидизирующих осложнений — особенно ретинопатии и нефропатии. Повторная трансплантация не показана при благоприятном (1-й и 2-й варианты) течении заболевания и абсолютно противопоказана тем больным, у которых после утраты функции ксенотрансплантата развивалась и быстро прогрессировала хроническая почечная недостаточность, азотемия, требовавшая применения более радикального хирургического лечения (аллотрансплантации почки и поджелудочной железы).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блюмкин В.Н., Шумаков В.И. Лечение больных инсулинзависимым сахарным диабетом с помощью свободной трансплантации островковых клеток поджелудочной железы // Трансплантация органов: Тез.докл. XI Всесоюз.науч.конф. по транспл. сердца, печени, почки, поджелудоч. железы и др. органов (Львов, окт. 1990). — Львов, 1990. — С. 38–40.
2. Комиссаренко В.П., Турчин И.С., Комиссаренко И.В. и др. Трансплантация культуры островковых клеток поджелудочной железы плодов человека и животных как метод лечения сахарного диабета // Врачебн. дело. — 1983. — 4. — С. 52–57.
3. Никоненко А.С., Сандомирский Б.П., Ковалев А.А. и др. Хирургическое лечение осложнений инсулинзависимого (1 тип) сахарного диабета // Клин. хирургия. — 1991. — 12. — С. 22–24.
4. Никоненко А.С., Ковалев А.А., Завгородний С.Н. и др. Создание низкотемпературного банка островковой ткани поджелудочной железы для лечения больных инсулинзависимым сахарным диабетом // II Междунар. конф. "Успехи современной криобиологии". — 1992. — С. 129–130.

5. Никоненко А.С., Сандомирский Б.П., Ковалев А.А. и др. Ксенотрансплантация криоконсервированных культур островковых клеток поджелудочной железы при инсулинзависимом сахарном диабете и его хронических осложнениях // Метод. рекомендации. – Запорожье, 1995. – 18 с.

Запорожский мед. ун-т

Поступила 19.12.95

О.О.КОВАЛЕВ

ПОВТОРНІ ТА МНОЖИННІ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦІЇ КУЛЬТУР КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ОСТРОВКОВИХ КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В ЛІКУВАННІ ХВОРИХ УСКЛАДНЕНИМ ІНСУЛІНЗАЛЕЖНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Запорізький медичний університет

Вивчена ефективність повторних та множинних ксенотрансплантацій культур островкових клітин підшлункової залози та визначені оптимальні строки їх виконання при лікуванні хворих ускладненим інсулінзалежним цукровим діабетом. Представлені свідчення до хірургічного лікування, описана техніка хірургічних втручань, детально проаналізовані результати лікування, а також виділені 4 варіанти перебігу посттрансплантаційного періоду. Зроблено висновок про доцільність повторних трансплантацій при різних варіантах перебігу захворювання.

A.A.KOVALEV

REPEATED AND MULTIPLE XENOTRANSPLANTATIONS OF THE CULTURES OF CRYOPRESERVED INSULAR CELLS OF THE PANCREATIC GLAND WHEN TREATING THE PATIENTS WITH COMPLICATED INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS

Zaporozhje Medical Institute, Ukraine

The author studied the efficiency of the repeated and multiple xenotransplantations of the cultures of the insular cells of the pancreatic gland and determined the optimal terms of their realization when treating the patients with complicated insulin-dependent diabetes mellitus. The work presents the data on the indications to surgical intervention, describes their technique, gives a detailed analysis of the yield of treatment, and speculates on four variants of the posttransplantation period. It is concluded on the expediency of conducting repeated transplantations under various modes of the disease occurrence.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043

В.В.Рамазанов, В.А.Бондаренко

ЭФФЕКТ ИОННОЙ СИЛЫ НА ДЕЙСТВИЕ ГЕМИНА ПРИ ГИПЕРТОНИЧЕСКОМ ШОКЕ ЭРИТРОЦИТОВ

Исследование кинетики развития гипертонического шока после инкубации эритроцитов в растворах NaCl показало, что после инкубации эритроцитов в растворах NaCl по сравнению с сахарозными растворами чувствительность клеток к переносу в 3 моль/л NaCl практически не изменяется во времени. При этом замена электролитной среды на неэлектролитную приводила к изменению направленности действия ДИДС (диизотиоцианостильбендисульфонат), что указывает на существенную роль ионной силы среды инкубации на развитие процесса повреждения эритроцитов при гипертоническом шоке в случае действия модификаторов мембраны [2]. В связи с этим вызывают интерес действия модификаторов, которые непосредственно связываются с белками цитоскелета. В работе использовались эритроциты донорской крови, отмытые раствором, содержащем 150 ммоль/л NaCl и 5 моль/л фосфат (pH 7,4). Клетки (20% гематокрит) обрабатывали гемом (300 мкмоль/л, 10 мин при 37 °C [3]) в среде, содержащей: KCl 90 (ммоль/л); NaCl 45; сахарозу 44; фосфат 10 (pH 7,4). После обработки эритроциты отмывали средой инкубации. Гипертонический шок исследовали как было описано ранее [1]. Полученные результаты показали, что обработка эритроцитов гемом приводит к обратимому ингибированию гипертонического шока, когда среды прединкубации содержат сахарозу (рис. 1). Если в среде прединкубации содержится NaCl, то ингибирование чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку под влиянием указанной модификации является слабо обратимым в исследуемом интервале времени (рис. 2). Подобные различия, обусловленные ионной силой, были отмечены и в случае холодового шока [2]. Таким образом, модификация взаимодействий белков цитоскелета при обработке эритроцитов гемом приводит к тому, что возрастающая ионная сила среды прединкубации является

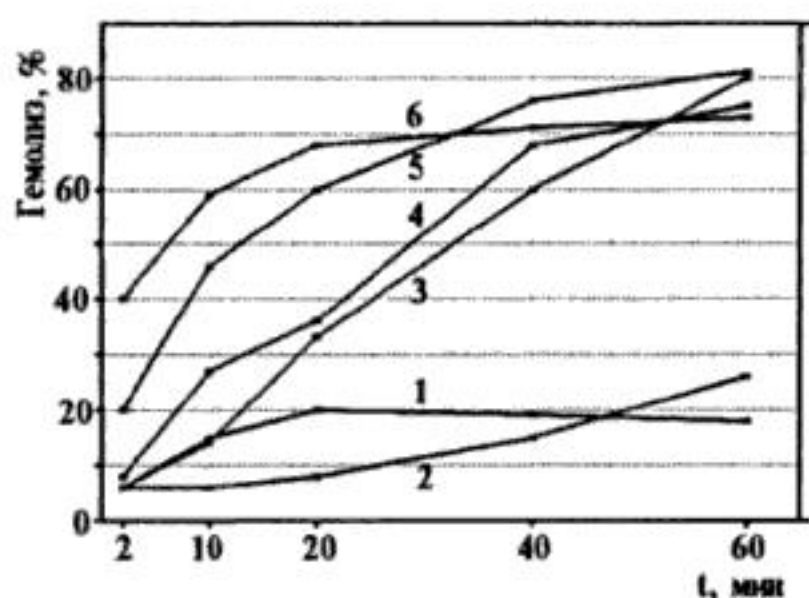


Рис. 1. Влияние обработки геминем на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку после инкубации (37 °C) в растворах, содержащих сахарозу, моль/л: 1 – 0,27; 2 – 0,50; 3 – 0,70; 4 – 0,80; 5 – 0,86; 6 – 1,10

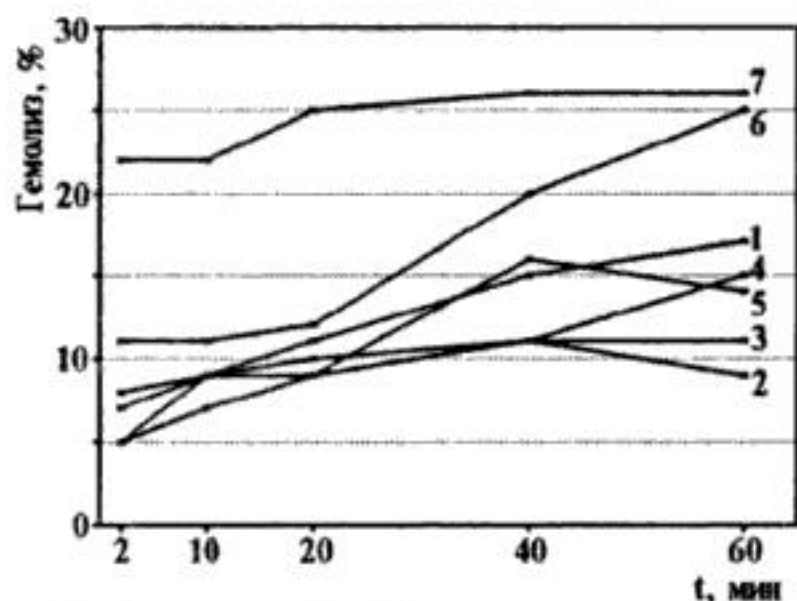


Рис. 2. Влияние обработки геминем на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку после инкубации (37 °C) в растворах, содержащих NaCl, моль/л: 1 – 0,15; 2 – 0,30; 3 – 0,45; 4 – 0,55; 5 – 0,65; 6 – 0,90; 7 – 1,20

фактором, который приводит к блокированию развития гипертонического шока. В то же время для немодифицированных клеток замена неэлектролитной среды на электролитную приводила к тому, что чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку проявляла свой максимум в первые минуты [2].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поздняков В.В., Бондаренко В.А. Объемный сдвиг как фактор, контролирующий осмотическую устойчивость эритроцитов в растворах низкомолекулярных криопротекторов // Физико-химическое и биологическое действие криопротекторов. – Киев: Наук. думка. – 1990. – С. 115–123.
2. Рамазанов В.В. Вплив осмотичного стресу та модифікаторів цитоскелета на розвиток холодового та гіпертонічного шоку еритроцитів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків. – 1994. – 14 с.
3. Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // Biochem. Internat. – 1986. – 13, № 3. – P. 467–477.

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

Поступило 11.04.95

УДК 57.043

В.В.Чижевский, В.И.Луговой, В.К.Мазалов

ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭЭГ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ОБЩЕГО ОСТРОГО ОХЛАЖДЕНИЯ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ПЭО-400

В литературе, посвященной действию низких температур на организм гомойотермов, практически отсутствуют исследования влияния общего острого охлаждения и криопротекторных веществ на биоэлектрическую активность головного мозга. Эксперименты проведены на половозрелых крысах линии Вистар. Животных охлаждали в водяной бане при температуре воды 3 °C в течение 5 мин. Регистрацию ЭЭГ осуществляли на электроэнцефалографе BST-1 (ГДР), последующий спектрально-корреляционный анализ проводили на IBM P/C AT-286 с помощью специального пакета программ и ЭВМ СМ-4 при помощи программы KOSPA, созданной в ИПКиК НАН Украины. Показано, что при общем остром охлаждении до ректальной температуры 20–21 °C в спектре БЭА головного мозга крыс происходят существенные перестройки. Увеличивается мощность медленноволновой части ЭЭГ, так, амплитуда Δ -ритма возрастает в 5–10 раз, при этом происходит депрессия остальных ритмов. Подобная тенденция сохранялась в течение нескольких часов после охлаждения, окончательно приходя к норме лишь на вторые сутки. Такие изменения должны неизбежно приводить к нарушению межцентральных взаимоотношений ЦНС [1]. Так, в частности, более чем в 3 раза возрастает связь между терморегуляторными центрами отделов переднего и заднего гипоталамуса. Коэффициент кросскорреляции (КК) ЭЭГ приближается к своему максимально возможному значению. Такого рода процессы могут приводить к нарушению пластичности нейрональных ансамблей, система переходит в режим функционирования с преобладанием жестких связей. Нарушается баланс прямых и обратных связей между термочувствительными компонентами ПГТ и системой интегративных нейронов заднего гипоталамуса, обеспечивающих теплопродукцию. Возможно, именно эти нарушения внутригипоталамических взаимодействий привели к ослаблению корково-подкорковых связей (КК — 0,2–0,3), что, в свою очередь, сказалось и на межцентральной интеграции, КК между различными участками неокортекса

составил 0,3–0,4. Подобные изменения в ЭЭГ, по данным литературы [3], отрицательно влияют на адаптационные возможности организма при общей гипотермии. В целом, паттерн БЭА при общем остром охлаждении характеризуется отсутствием нормальной физиологической динамики. Снижается пространственная синхронизация ЭЭГ, нарушаются электрофизиологические механизмы терморегуляции, что, в свою очередь, приводит к медленному восстановлению температуры тела. Влияние ПЭО–400 на электрогенез ЭЭГ по изученным показателям во многом противоположен действию острого охлаждения, поэтому представлялось целесообразным применить данный криопротектор на фоне гипотермии. В результате экспериментов было показано, что спектр мощности всех ритмов ЭЭГ через ряд переходных процессов быстрее возвращался к норме за счет снижения удельного веса Δ - и Θ -ритмов и увеличения α и β . Коэффициенты кросскорреляции, фазно изменяясь, возвращались к нормальным значениям, при этом соотношение между параметрами пространственной синхронизации ЭЭГ БЭА гипоталамуса практически соответствовало норме. Таким образом, ПЭО–400 стимулирует динамические характеристики электрогенеза гипоталамических центров терморегуляции, что находит отражение на уровне организма: температура тела экспериментальных животных при этом на начальных этапах отогрева на 1–2 °C выше и возвращается к нормальным величинам быстрее, чем при охлаждении без криопротектора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ливанов М.Н., Русинов В.С., Симонов П.В. и др. Диагностика и прогнозирование функционального состояния мозга человека. – М.: Наука, 1988. – 206 с.
2. Мазалов В.К. Механизм действия криопротекторов ряда полиэтиленоксидов при холодовом и механическом воздействии на головной мозг: Автореф. дис....канд. биол. наук. – Харьков, 1986. – 17 с.
3. Черноситов А.В. Проблемы нейрокибернетики. – Ростов-на-Дону: РГУ, 1989. – 134 с.

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

Поступило 27.03.96

УДК 615.361.36.014.413:577.117:57.043

Л.Н. Тыныныка

УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ФРАГМЕНТОВ ТКАНИ ПЕЧЕНИ НОВОРОЖДЕННЫХ И ПОЛОВОЗРЕЛЫХ СВИНЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) является одним из важнейших тестов на степень повреждения клеток и тканей. Особенно, если ткань, в данном случае фрагменты ткани печени новорожденных поросят и половозрелых свиней, предназначена для использования в клинике при экстракорпоральной очистке крови в составе биологически активных фильтров, позволяющих существенно расширить арсенал средств лечения токсических состояний различного происхождения. Целью данного исследования является определение уровня ПОЛ в фрагментах ткани печени новорожденных поросят и половозрелых свиней в зависимости от применяемых скоростей охлаждения и защитных растворов (криопротекторов). Поиск оптимальных режимов криоконсервирования необходим для получения относительной сохранности деконсервированных фрагментов печени. Следует отметить, что в литературе практически отсутствуют работы по изучению влияния криоконсервирования на сохранность фрагментов печени, в частности их функциональной активности, но большое количество работ посвящено изучению морфологической сохранности ткани печени после применения различных видов охлаждения, а также всестороннему исследованию изолированных клеток печени — гепатоцитов [1, 3]. Выделение гепатоцитов — довольно сложный и трудоемкий процесс, помимо этого большое количество клеток гибнет при выделении, нарушаются целостность клеточной мембраны, ее барьерные функции. Особенно трудно выделить большое количество клеток для клинических целей из крупного органа, например печени свиньи. Вместе с тем возникают определенные трудности, связанные с получением стерильного материала, пригодного для использования в клинической практике. Эти трудности могут быть преодолены, если использовать при криоконсервировании фрагменты печени, которые можно получить без применения ферментов, а стерильный материал — из печени новорожденных поросят и, возможно, половозрелых свиней. В связи с этим для исследования были взяты фрагменты ткани печени новорожденных поросят и половозрелых свиней. Объектом исследования в данной работе служат фрагменты ткани печени новорожденных поросят и половозрелых свиней. Забор ткани печени половозрелых свиней осуществлялся на Харьковском мясокомбинате, а новорожденных поросят — в операционной ИПКиК НАН Украины. В работе были использованы следующие криопротекторы: полиэтиленоксид с M_r 400 (ПЭО–400), полиэтиленоксид с M_r 1500 (ПЭО–1500), диметилсульфоксид (ДМСО) в конечных концентрациях 20 и 10%. Замораживание проводили с помощью программного замораживания или устройства для замораживания биоло-

гических объектов [2]. Уровень ПОЛ в пробах определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА), который оценивают по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [4]. ТБК-окрашенные продукты спектрофотометрически определяют по максимальному поглощению на длине волн 532–535 нм. Расчет количества МДА производится по пересчету на массу ткани печени в нмоль/г ткани. Общий уровень ПОЛ в фрагментах ткани печени новорожденных поросят несколько выше уровня ПОЛ в фрагментах ткани печени половозрелых свиней. Можно предположить, что система ПОЛ взрослых животных более адаптирована к различным повреждающим факторам внешней среды, чем система ПОЛ новорожденных животных. Уровень ПОЛ заметно понижается при использовании сверхбыстрых скоростей замораживания и полиэтиленоксидов в качестве криопротекторов. При использовании в качестве криопротектора ДМСО минимум активации ПОЛ наблюдается при скоростях охлаждения порядка 100 °С/мин. Такая же тенденция наблюдается и при замораживании без криопротектора. По сравнению с уровнем ПОЛ нативных фрагментов ткани печени новорожденных поросят ($4,62 \pm 1,05$) нмоль/г ткани при малых скоростях охлаждения наиболее эффективно применение таких криопротекторов, как ПЭО-1500 и ДМСО в концентрациях 10 и 20%, при использовании которых активация ПОЛ минимальна. При сверхбыстрых скоростях охлаждения наиболее эффективным является применение ПЭО-400 и ПЭО-1500 в концентрациях 10 и 20%. Сравнивая с уровнем ПОЛ нативной ткани фрагментов печени половозрелых свиней, которая составляет ($4,31 \pm 1,29$) нмоль/г ткани, минимум активации ПОЛ наблюдается при скоростях охлаждения 1000, 8000 и 80000 °С/мин с применением ПЭО-400 и ПЭО-1500 в концентрациях 10 и 20%. Таким образом, при сравнении уровней ПОЛ фрагментов ткани печени новорожденных поросят и половозрелых свиней, в зависимости от скоростей охлаждения и применяемых криопротекторов, выявлено понижение уровня ПОЛ при малых скоростях охлаждения с ПЭО-1500 и ДМСО и при сверхбыстрых скоростях охлаждения с ПЭО-400 и ПЭО-1500. Вместе с тем уровень ПОЛ отражает только один аспект повреждения и защиты клеток и тканей при криоконсервировании. Поэтому для разработки технологии криоконсервирования указанных выше биообъектов необходимы дальнейшие исследования с привлечением как специфических, так и интегральных методик оценки жизнеспособности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. – М.: Медицина, 1989. – 460 с.
2. Гальченко С.Е. Особенности криоконсервирования биологических объектов с применением больших скоростей охлаждения: Автореф. дис....канд. биол. наук. – М., 1990. – 16 с.
3. Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор // Новосибирск: Наука, 1988. – 192 с.
4. Whiteley G.S., Fuller B.J., Hobbs K.E. Lipid peroxidation on liver tissue specimens stored at subzero temperatures // Crio-Letters. – 1992. – 13, № 2. – P. 83.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины г. Харьков

Поступило 05.06.95

УДК 57.043

Г.С.Угаров

ХОЛОД И РАСТЕНИЯ ВЫСОКИХ ШИРОТ

Для жизнедеятельности растений важное значение имеют низкие положительные и отрицательные температуры. На огромных территориях Азии, Европы и Америки в зимний, весенне-осенний периоды температура опускается значительно ниже 0 °С, а низкие положительные температуры сохраняются длительное время и в летний период. Большая площадь земной суши расположена в зоне многолетней мерзлоты. Температурные условия обитания растений на высоких широтах можно рассмотреть на примере Якутии, расположенной на северо-востоке Евразийского континента. В Якутии зима длится 7 мес, и в районе Оймякона, где температура может опускаться до $-70 \div -71$ °С, расположен Полюс холода Северного полушария. Ночные понижения температуры, заморозки здесь возможны даже в разгаре лета, и обитающие в этих регионах растения и животные организмы значительную часть своей жизни подвергаются действию холода [5]. Холодом, по нашим представлениям, считается температура ниже 4 °С, или биологического нуля [6]. Ниже этой температуры ход физиолого-биохимических процессов качественно и количественно меняется — теплолюбивые растения погибают, а холодоустойчивые переходят в состояние вынужденного покоя, который в естественных условиях может сочетаться с эндогенным, что обусловлено замерзанием воды в тканях растений при этих температурах. Таким образом, температура 4 °С лежит на границе теплого и холодного периода года. В окрестностях г. Якутска, расположенного в Центральной Якутии, средняя дата перехода средней суточной температуры воздуха через биологический нуль (4 °С) осенью приходится на 19 сентября, а весной — на 14 мая, т. е. холодный период года здесь составляет в среднем 8 мес. Из холодного можно выделить морозный период, с

температурой воздуха ниже 0 °С, что составляет для данного региона 207–214 дней [1]. В это время растения находятся в замерзшем состоянии, и обменные процессы сведены к минимуму. Большинство деревьев сбрасывают листья. В хвое ели и сосны изменяется пигментный состав, надземная часть многолетних трав погибает. Анатомия, физиология и биохимия растений в зимний период изучены очень слабо. С экологической точки зрения большой интерес представляет для растений весенне-осенний период с температурой воздуха от 4 до 0 °С. Этот период для окрестностей г. Якутска длится недолго — примерно 20–25 дней. Но именно в это время в растениях протекают очень важные процессы: стратификация семян, яровизация, холодное закаливание, покой, без которых невозможно как нормальное развитие растений, так и развитие устойчивости к низким отрицательным температурам, достигающим до –70 °С. Стрессовыми также являются ночные температуры (ниже 4 °С) в летнее время, когда растения находятся в состоянии активной вегетации. В результате изменений структуры воды (резкое льдообразование) в этих условиях происходит так называемая криозасуха — растение испытывает острый недостаток воды при полном насыщении тканей и органов влагой. Кратковременные и редкие криозасухи могут стимулировать ростовые процессы, однако длительная криозасуха приводит к криошоку, что может отразиться в дальнейшем на росте и развитии растения, а для сельскохозяйственных культур — на урожайности. В условиях многолетней мерзлоты воздействию пониженных температур подвергается и вся корневая система растений. В районе г. Якутска многолетняя мерзлота оттаивает лишь до глубины 2,5–2,7 м, температура почвы в зоне оттаивания равна 0 °С, а на глубине 20 м колеблется от –5÷–6 до 0÷–2 °С [7]. Таким образом, градиент температур может составлять от 0 до 20–25 °С. Холодная почва не только обладает физиологической сухостью, но и является физиологически бедной, в связи с чем для сельскохозяйственных культур были предложены так называемые увеличенные “северные дозы” минеральных удобрений — N₈₀P₈₀K₈₀ вместо N₄₀P₄₀K₄₀, применяемых в обычных условиях [3]. В условиях физиологической сухости и бедности почв зоны многолетней мерзлоты корни растений, особенно древесных [2], расположены поверхностно. Распространение теневыносливых растений в зоне многолетней мерзлоты приводит к увеличению мощности слоя и глубины оттаивания почвы, что стало причиной естественного отбора на светолюбивость, поэтому растения Якутии исключительно светолюбивы, и все фитоценозы имеют низкое проективное покрытие и низкую сомкнутость древостоя. Неблагоприятные температурные условия почвы препятствуют раннему прорастанию семян. Поздно проросшие семена (в конце июля, августа) к концу вегетационного периода дают неокрепшие побеги, которые не выдерживают условий суровой зимы; и хотя растения криолитозоны полностью проходят весь цикл развития и дают нормальные плоды и семена, их размножение в естественных фитоценозах происходит преимущественно вегетативным путем. Небольшая жизненная емкость холодной почвы многолетней мерзлоты, холодный воздух замедляют рост растений, но в то же время ускоряют их развитие. Благодаря этому растения на Севере успевают за очень короткий теплый вегетационный период пройти весь цикл развития, однако не все однолетние растения здесь могут дать плоды и семена. Поэтому в процессе эволюции и естественного отбора сохранились в основном многолетние растения. Из найденных на территории Якутии высших сосудистых растений (около 1700 видов), без учета заносных и некоторых местных (пастушья сумка, щетинник зеленый, ярутка полевая, дискурайния софия, клоповник, горец птичий, крупки, донтостемон гребенчатый, горец вьюнковый и др.), основную массу составляют многолетние растения [4]. Флора Якутии богата кустарничковыми растениями с вечнозелеными листьями (багульник, кассандра, андромеда, толокнянка, брусника, мхи и др.), дающими им возможность удлинить вегетационный период за счет начала ранней фотосинтетической деятельности листьев. При низких положительных и небольших отрицательных температурах происходит закаливание растений, которое позволяет им перенести суровые морозы, достигающие –71 °С. В естественных условиях охлаждения идут также процессы стратификации и яровизации. К сожалению, многие стороны действия холода на растения изучены недостаточно. Эту проблему можно отнести к области фундаментальных и выделить в раздел экологии растений под названием “Криоэкология растений”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Агроклиматические ресурсы Якутской АССР* / Под ред. А.К.Мозолевской. — Л.: Гидрометеопиздат, 1973. — 112 с.
2. *Дохунаев В.Н.* Корневая система растений в мерзлотных почвах. — Якутск: Изд-вр ЯФ СО АН СССР, 1988. — 175 с.
3. *Коровин А.И.* Растения и экстремальные температуры. — Л.: Гидрометеопиздат, 1984. — 271 с.
4. *Определитель высших растений Якутии.* — Новосибирск: Наука, Сибир. отд., 1974. — 543 с.
5. *Угаров Г.С.* Растительность Оймяконского района // Оймякон — полюс холода. — Якутск: Кн. изд-во, 1982. — С. 60–67.
6. *Угаров Г.С.* Эколого физиологические аспекты адаптации организмов к низким положительным температурам. — Якутск: Кн. изд.-во, 1988. — 205 с.
7. *Фельдман Г.М., Тетельбаум А.С., Шнейдер Н.И., Гаврильев Р.И.* Пособие по прогнозу температурного режима грунтов Якутии. — Якутск: Б. и., 1988. — 240 с.

Якутский гос. ун-т

Поступило 12.04.95

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

2¹⁹⁹⁶

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 фундаментальные и прикладные работы по проблемам охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, их сублимационному высушиванию и созданию криогенной техники. Освещаются вопросы гибернации, холодостойкости животных и растений.

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

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

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

ИНДЕКС 70474

ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1996. №2. 1-56