Ком. 109 (оборот)

2

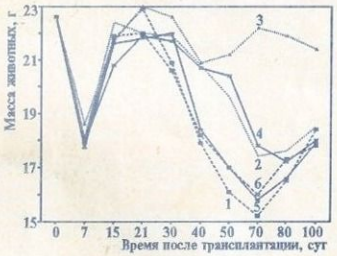
ISSN 0233-7673

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.Моисеев*



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

Грищенкова 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

[illegible] 54

Угаров Г.С. Холод и растения высоких широт 55

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины,
"Проблемы криобиологии", 1996

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. – Пущино: 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 K5+ 0during 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. Sct. – 1959. – 72. – P. 396–404.
10. *Wang L.C.H.* Leif 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.Й.ЩЕНЯВСЬКИЙ

СЕЗОННІ ЗМІНИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ВМІСТУ ОДНОВАЛЕНТНИХ КАТІОНІВ В ЕРИТРОЦИТАХ ДОВГОХВОСТИХ ХОВРАХІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини 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 гібернатора — 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 холодовому и гипертоническому шоку после воздействия модификаторами цитоскелета. Выявлено, что обработка эритроцитов гемином приводит к блокированию развития холодовой и осмотической чувствительности, а также к устранению способности диизотиоцианостильбендисульфоната (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 гемином 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 гемином 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 парахлормеркурийбензоатом (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 гемином эритроциты проявляется в большем блокировании холодовой и осмотической чувствительности (рис. 2, кривые *3, 6*).

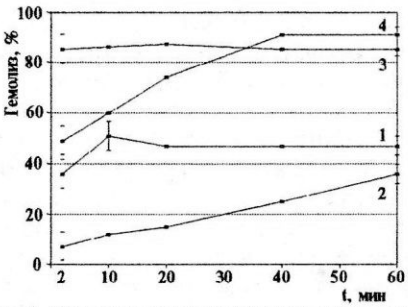


Рис. 1. Развитие чувствительности эритроцитов к охлаждению до 0 °С (*1, 2*) и гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl (*3, 4*) после инкубации при 37 °С в растворе, содержащем 0,86 моль/л сахарозу: *1, 3* – контроль; *2, 4* – ДИДС, 30 мкмоль/л

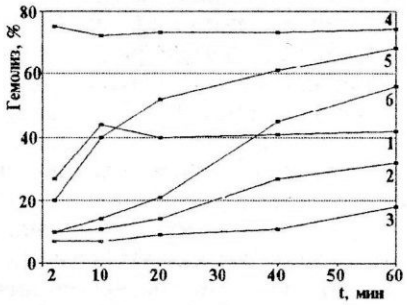


Рис. 2. Влияние обработки гемином (300 мкмоль/л) на чувствительность эритроцитов к охлаждению до 0 °С (*1, 2, 3*) и гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl (*4, 5, 6*) после инкубации (37 °С) в растворе, содержащем 0,86 моль/л сахарозу: *1, 4* – контроль; *2, 5* – гемин; *3, 6* – гемин + ДИДС,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

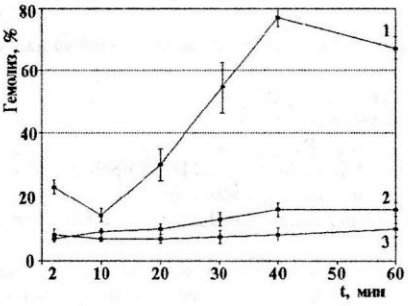


Рис. 3. Влияние ДИДС на чувствительность обработанных гемином эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl после инкубации при 37 °С (2 мин) в растворах, содержащих сахарозу: *1* – контроль; *2* – гемин; *3* – гемин + ДИДС

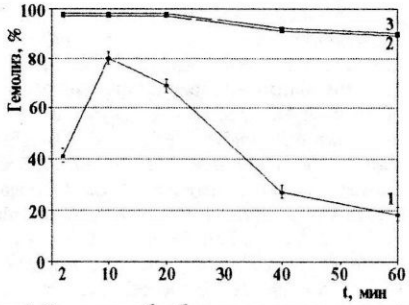


Рис.4. Влияние обработки гемином на изменение формы эритроцитов при возрастании осмолярности среды: *1* – контроль; *2* – гемин; *3* – гемин + ДИДС

Как было показано ранее, в среде прединкубации с изоосмотической сахарозой действие ДИДС вызывало значительный рост чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку [2]. Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что обработка гемином приводит к значительному снижению уровня гипертонического шока во всем представленном ряду концентраций сахарозы. При этом присутствие ДИДС уже не вызывает возрастание чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку после инкубации клеток в изоосмотической 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 гемином 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 responce // 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 erithrocytes 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 exhange 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

В.В.РАМАЗАНОВ, В.А.БОНДАРЕНКО

ДІЯ ГЕМІНА І ДІДС НА ХОЛОДОВИЙ ТА ГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК ЕРИТРОЦИТІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини 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 cld and hypertonic stress after exposute to the cytoskeleton modificators 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-