

ISSN 0233-7673

КРИОБИОЛОГИЯ

2 | 87



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. ГРИЩЕНКО (главный редактор), А. М. БЕЛОУС (зам. гл. редактора)
Ю. П. БЛАГОЙ, Р. Г. БУТЕНКО, Б. Н. ВЕПРИНЦЕВ, В. И. ГОЛЬДАНСКИЙ,
В. И. ЛУГОВОЙ, Ф. И. ОСТАШКО, Е. Я. ПАНКОВ, Л. А. ПИРУЗЯН, Н. С. ПУШ-
КАРЬ, Б. П. САНДОМИРСКИЙ, А. С. СНУРНИКОВ, К. М. СЫТНИК, А. М. УТЕВ-
СКИЙ, А. Г. ФЕДОТЕНКОВ, А. А. ЦУЦАЕВА, В. И. ШУМАКОВ, Т. Н. ЮРЧЕНКО

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

С. И. АКСЕНОВ (Москва), Н. Г. БАКРАДЗЕ (Тбилиси), М. Е. БЕКЕР (Рига),
П. В. БЕЛОШИЦКИЙ (Киев), Д. М. ГРОДЗИНСКИЙ (Киев), В. Н. ЗАПОРОЖАН
(Одесса), Л. В. КАЛАКУЦКИЙ (Пушино, Моск. обл.), А. Д. КУРБАТОВ (Ле-
нинград), В. А. НАЕР (Одесса), В. А. НИКИТИН (Харьков), Г. П. ПИНАЕВ
(Ленинград), Г. Б. СЕРГЕЕВ (Москва), М. А. СОЛОВЬЕВА (Киев), Н. Г. СОЛО-
МОНОВ (Якутск), Н. Н. ТИМОФЕЕВ (Москва), В. М. ЧЕРЕДНИЧЕНКО
(Харьков), В. В. ШЕНТАЛЬ (Москва), Э. З. ЭМИРБЕКОВ (Махачкала).

EDITORIAL BOARD

V. I. GRISHCHENKO (Editor-in-Chief), A. M. BELOUS (Associated Editor),
Yu. P. BLAGOJ, R. G. BUTENKO, B. N. VEPRINTSEV, V. I. GOLDANSKY,
V. I. LUGOVOJ, F. I. OSTASHKO, E. Ya. PANKOV, L. A. PIRUZYAN, N. S. PU-
SHKAR, B. P. SANDOMIRSKY, A. S. SNURNIKOV, K. M. SYTNIK, A. M. UTEVSKY,
A. G. FEDOTENKOV, A. A. TSUTSAYEVA, V. I. SHUMAKOV, T. N. YURCHENKO.

EDITORIAL COUNCIL

S. I. AKSENOV (Moscow), N. G. BAKRADZE (Tbilisi), M. E. BEKER (Riga),
P. V. BELOSHITSKY (Kiev), D. M. GRODZINSKY (Kiev), V. N. ZAPOROZHAN
(Odessa), L. V. KALAKUTSKY (Pushchino, Moscow region), A. D. KURBATOV
(Leningrad), V. A. NAER (Odessa), V. A. NIKITIN (Kharkov), G. P. PINAYEV
(Leningrad), G. B. SERGEYEV (Moscow), M. A. SOLOVIEVA (Kiev), N. G. SOLO-
MONOV (Yakutsk), N. N. TIMOFEYEV (Moscow), V. M. CHEREDNICHENKO
(Kharkov), V. V. SHENTAL (Moscow), E. Z. EMIRBEKOV (Makhachkala).

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ

2 1987

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1987

СОДЕРЖАНИЕ

Белоус А. М., Бондаренко В. А., Гулевский А. К. Молекулярно-клеточная концепция криповреждения клетки: роль трансмембранных дефектов	3
Мануильский В. Д. Проблемы консервации генетических ресурсов растений	11
Голдовский А. М. Ксеробиология и ее отношение к криобиологии	16
Панков Е. Я., Малышкина С. В. Деструктивные и восстановительные процессы в костной и хрящевой тканях при криовоздействии	19
Петренко А. Ю. Изучение репарации мембран митохондрий после замораживания-отогрева	24
Суханов А. Ф., Мяделец О. Д. Изменения активности ферментов энергетического обмена эпидермиса белых крыс разного возраста при общей глубокой гипотермии и в постгипотермическом периоде	29
Говоруха Т. П., Чуйко В. А., Скорняков Б. А. Ультраструктурные особенности тироцитов при различных условиях замораживания щитовидной железы человека	33
Зинченко В. Д., Кнубовец Т. Л., Сибельдина Л. А., Воротилин А. М., Моисеев В. А. Исследование методом ^{31}P -ЯМР метаболизма некоторых фосфатов эритроцитов человека при криоконсервации с 1,2-пропандиолом.	37
Мартыненко А. А., Грищенко Е. А., Тягилева В. П. Криопротекторная активность системы 1,2-пропандиол- H_2O - NaCl при разных режимах замораживания эритроцитов человека до -196°C	42
Линник Т. П., Верховская Л. З. Определение молекулярной массы полиэтиленоксида в моче методом ИК-спектроскопии	45
Милянковский А. И., Гордиенко В. М., Степанковская Г. К., Сенчук А. Я. Криотерапия субэпителиального эндометриоза шейки матки	47

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Ломакин И. И. Влияние краниocereбральной гипотермии на течение депрессивного синдрома	49
ХРОНИКА	50
ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИИ	51

© Издательство «Наукова думка», «Криобиология», 1987

This one



A8DJ-NFH-BPCE

Матеріал, захищений авторським правом

CONTENTS

<i>Belous A. M., Bondarenko V. A., Gulevsky A. K.</i> The molecular-cellular concept of cell cryoinjury: The role of transmembrane defects	3
<i>Manuilsky V. D.</i> Problems of plant genetic resources preservation	11
<i>Goldovsky A. M.</i> Xerobiology and its relation to cryobiology	16
<i>Pankov E. Ya., Malyshkina S. V.</i> Destructive and reparative processes in skeletal tissues after cold application	19
<i>Petrenko A. Yu.</i> Investigation of reparation of mitochondrial membranes subjected to freeze-thawing	24
<i>Sukhanov A. F., Myadelets O. D.</i> The activity of epidermic energy exchange enzymes of white rats of different age during and after profound hypothermia	29
<i>Govorukha T. P., Chuyko V. A., Skornyakov V. A.</i> Ultrastructural features of thyrocytes under different regimens of freezing human thyroid gland	33
<i>Zinchenko V. D., Knubovets T. L., Sibeldina L. A., Vorotilin A. M., Moiseyev V. A.</i> Investigation of metabolism of some human erythrocyte phosphates using ³¹ P-NMR upon cryopreservation with 1,2-propane diol	37
<i>Martynenko A. A., Grishchenkova E. A., Tyagileva V. P.</i> The cryoprotective activity of 1,2-propane diol-H ₂ O-NaCl system for human erythrocytes frozen by different regimens to -196 °C	42
<i>Linnik T. P., Verkhovskaya L. Z.</i> The determination of molecular weight of polyethylene oxide in urine using IR spectroscopy	45
<i>Milyanovsky A. I., Gordiyenko V. M., Stepankovskaya G. K., Senchuk A. Ya.</i> Cryotherapy of cervix uteri subepithelial endometriosis	47

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Lomakin I. I.</i> The effect of craniocerebral hypothermia on depressive syndrome . . .	49
--	----

<i>CHRONICLE</i>	50
<i>DEFENSE OF THESES</i>	51

Адрес редакции:

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

Ответственный секретарь редакции *Ф. А. Приходько*

Научный редактор *В. И. Луговой*

Редактор *Л. А. Рябинина*

Технический редактор *В. Н. Волкова*

Корректор *Н. П. Спичак*

Сдано в набор 16.01.87 Подписано в печ. 24.03.87. БЦ 09136. Формат 70×108/16. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Усл. кр.-отт. 5,6. Уч.-изд. л. 5,5. Тираж 1000 экз. Заказ № 7-11.

Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16.
310003 Харьков, Университетская, 16, Зак. 536.

А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, А. К. Гулевский

МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНАЯ КОНЦЕПЦИЯ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ: РОЛЬ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДЕФЕКТОВ

Плазматические мембраны клеток обладают высокой чувствительностью к действию осмотических и температурных факторов среды [2, 5, 17]. Нарушение их структуры является первичным процессом при криоповреждении, влияющим на физиологическую интеграцию и репаративный потенциал клеток вследствие утечки метаболитов, нарушения ионного баланса и биоэнергетических процессов, снижения уровня синтеза белков и нуклеиновых кислот.

Существующие представления о механизмах криоповреждений [1, 2, 10, 11, 13, 15, 16] придают важное значение таким экзогенным факторам воздействия на клетку, как «эффекты растворов», кристаллизация воды, плотность упаковки клеток в жидких микрофазах и т. д. Однако все они в недостаточной мере учитывают роль собственных изменений структуры плазматической мембраны в инициации и развитии холодовых повреждений клеток.

При всем многообразии физико-химических процессов [2, 5, 6], протекающих в клетке и плазматической мембране при охлаждении-замораживании, очевидно, существует ведущий фактор, оказывающий влияние на интенсивность холодового повреждения и репарацию клеток.

Исследования механизмов температурного шока [1—4, 7, 8] и действия отрицательных температур на клетку [5, 13—17] показывают, что решающим из них, предопределяющим исход замораживания является возникновение, развитие и эволюция трансмембранных дефектов (ТМД), формирующих области, через которые происходит утечка содержимого клетки в наружную среду. При этом необходимо учитывать, что формирование ТМД может осуществляться в донулевых температурах, когда на мембрану воздействуют осмотические факторы (например, при насыщении среды криопротектором). И хотя в реальных условиях криоконсервации состояние плазматической мембраны и клетки в целом зависит от скорости замораживания, вида и концентрации криопротектора, интенсивность повреждения после отогрева в значительной степени будет определяться исходным состоянием мембраны перед замораживанием.

На этой основе может быть предложена для обсуждения молекулярно-клеточная концепция криоповреждения, утверждающая, что основным механизмом повреждения клетки в условиях охлаждения, замораживания и отогрева является нарушение барьерных свойств ее плазматической мембраны, приводящее к утечке компонентов цитоплазмы в наружную среду, реализующееся через формирование ТМД.

Появление и развитие ТМД может протекать в два этапа: в период эквilibрации клеток с осмотически активными соединениями (например, с солями и криопротекторами) и на этапе замораживания—отогрева, когда существенную роль играют процессы, вызывающие увеличение размера и времени жизни ТМД, а также ограничивающие их репарацию. Роль ТМД в развитии температурно-осмотического шока клеток является весьма значительной [3, 5, 6, 8]. При температурах, близких к физиологическим,

обмен воды и анионов в клетке протекает за $\sim 100\text{--}200$ мс и осуществляется через белок полосы 3 [12]. При повышении осмолярности среды вслед за выходом воды клетку покидают ионы Cl^- в обмен на HCO_3^- и OH^- внешней среды (рис. 1), что ведет к защелачиванию цитоплазмы. При этом изме-

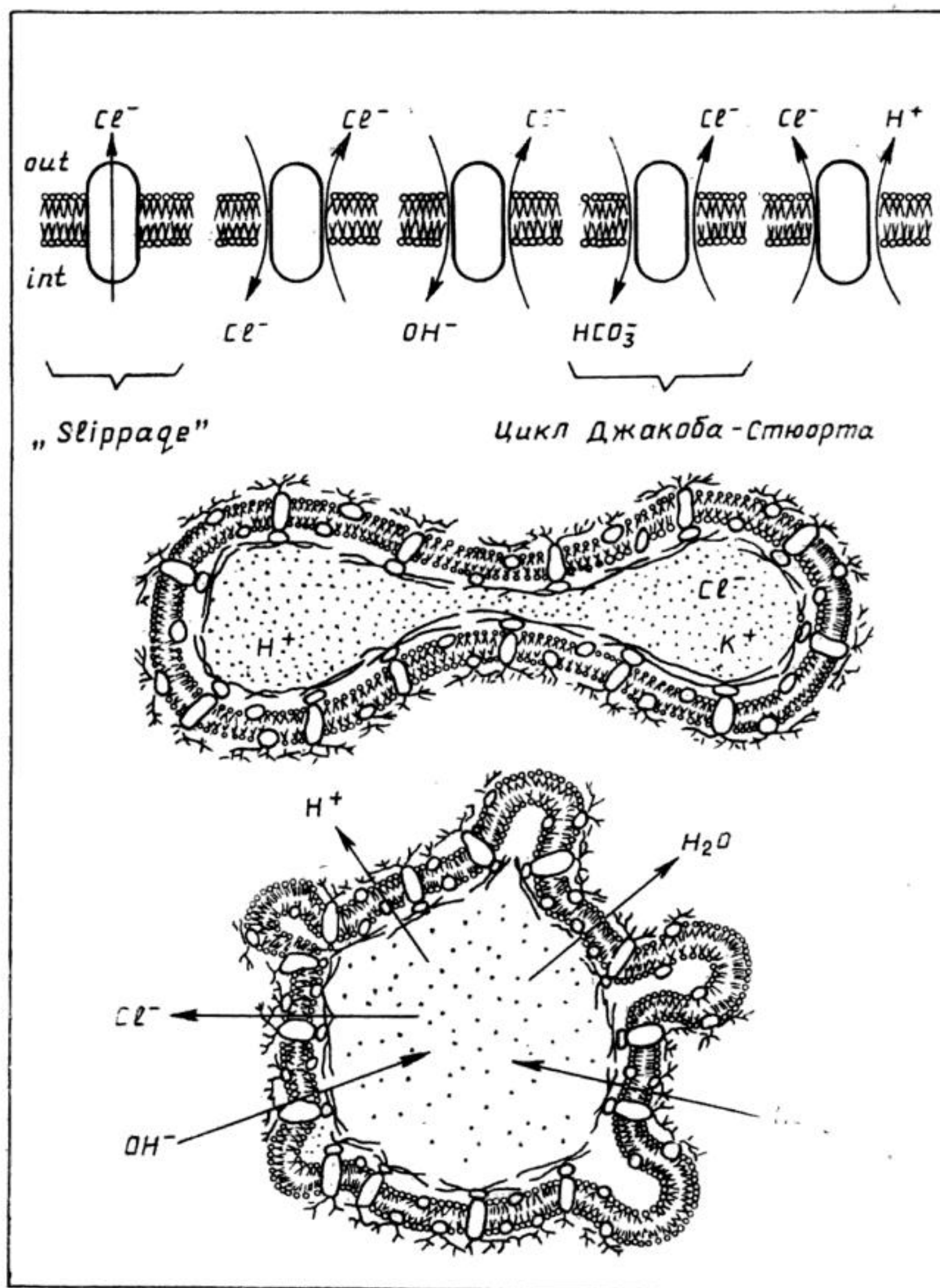


Рис. 1. Принципиальная схема генерализованной реакции клетки на изменение осмотичности среды

няется трансмембранный потенциал, что связано с перераспределением Cl^- и H^+ между внутренней и внешней средой клетки [18]. Он может быть представлен как:

$$\Delta H = \frac{RT}{F} \ln \frac{\text{Cl}_i}{\text{Cl}_o} = \frac{RT}{F} 2 \cdot 303 (\text{pH}_i - \text{pH}_o),$$

где Cl_i^- — концентрация Cl^- внутри клетки, Cl_o^- — то же вне клетки. Увеличение трансмембранного потенциала ведет к возрастанию переноса анио-

нов через белок полосы 3 с переносом заряда, т. е. реализуется феномен *Slippage*-временного конформационного дефекта переносчика, при котором возможно движение ионов в одном направлении [18]. Помимо этого, повышение ионной силы и изменение состава среды внутри клеток (например, незначительное повышение концентрации ионов Ca^{2+}) способно оказывать влияние как на периферическую белковую решетку, поддерживающую непрерывность плазматической мембраны, так и на компоненты, включенные в мембрану [1, 19, 21]. Следовательно, уже на этапах эквilibрации клеток с криопротекторами создаются условия для формирования ТМД.

При осмотическом воздействии на липидные везикулы механизм образования ТМД связан с неустойчивостью липидного бислоя, возникающей при изменении вязкоупругих свойств мембраны [9]. При этом вода, перераспределяющаяся через липидный бислой, может создавать избыточное давление внутри везикул, определяемое величиной растяжения мембраны. Если поток воды внутрь превосходит поток наружу (что часто бывает в реальных условиях), возникает так называемый «пульсирующий» режим функционирования ТМД, при котором циклы набухания сменяются сжатием везикул. Однако при сочетании изменений осмотических и температурных условий среды вероятность возникновения и роста ТМД резко возрастает [3]. Это обусловлено тем, что при низкой температуре возрастает роль процессов, связанных с механическим растяжением мембраны. В частности, причиной роста ТМД при низкой температуре может быть конденсация липидов, что приводит к дефициту площади мембраны, необходимой для поддержания ее непрерывности [8, 14]. Важную роль при этом играет неоднородность самого мембранного матрикса, непрерывность которого обеспечивается оптимальным смешиванием компонентов при физиологических температурах. Охлаждение приводит к ухудшению смешивания, что, в частности, проявляется в разделении липидных фаз и агрегации белков [2, 14].

Существенное значение в инициации, развитии и репарации ТМД имеет характер изменений формы и объема клеток. При температуре 37 °C и повышении концентрации NaCl выше 0,6 М изменение формы и объема эритроцитов развивается в последовательности: кренированные клетки (эхиноциты) → деформированные клетки со складчатой поверхностью → → уплощенные диски [3]. Для каждого из этих типов клеток имеется интервал концентраций соли, в котором наблюдается указанная выше трансформация. Однако при 0 °C характер изменений формы и объема эритроцитов меняется, заметно снижается относительная пропорция чувствительных к охлаждению гладких уплощенных клеток, что коррелирует с низким уровнем гемолиза (рис. 2). При температуре 37 °C на начальных этапах гипертонической инкубации в мембране формируются ТМД [3, 4], что проявляется в освобождении K^+ из эритроцитов. В то же время последний процесс при 0 °C слабо выражен. Между исходным уровнем освобождения K^+ и лизисом клеток при последующем сдвиге температуры и тоничности среды существует выраженная корреляция [3, 13]. Это означает, что лизис

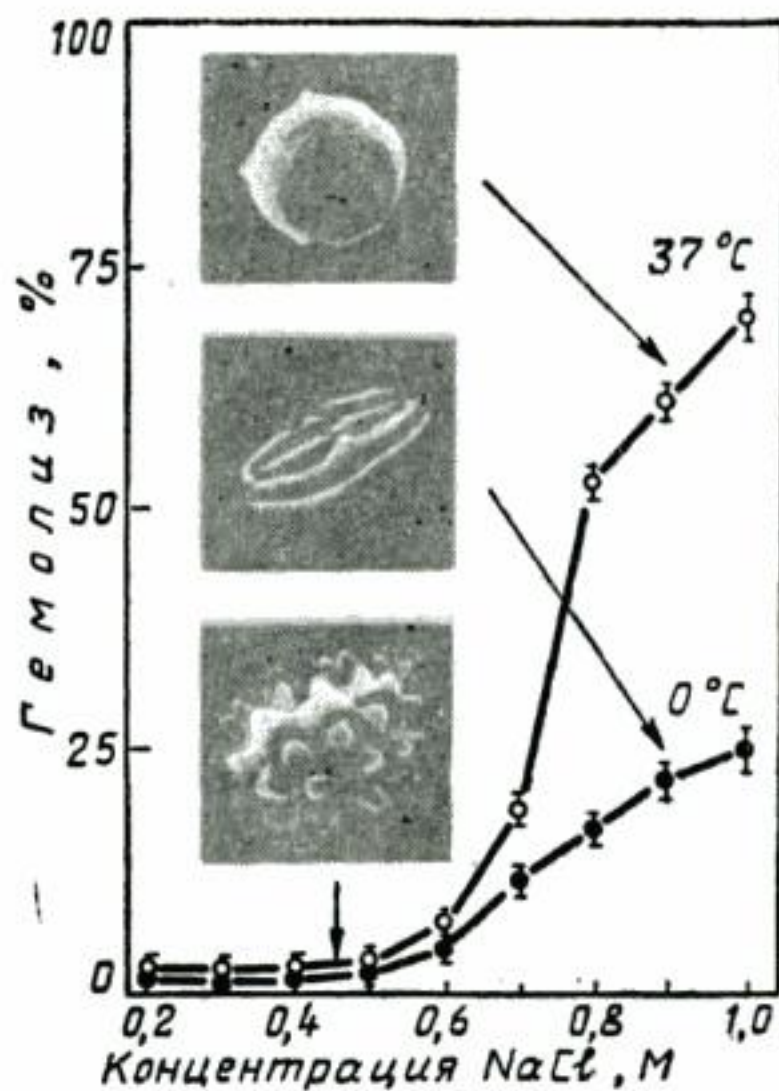


Рис. 2. Изменение формы эритроцитов и уровня гемолиза в зависимости от тоничности среды и температуры инкубации [3]: а — инкубация при 37 °C в диапазоне 0,4 — 0,6 м NaCl (образование сфероцитов с высоким уровнем гемолиза); б и в — инкубация при 0 °C (образование кренированных и уплощенных дисков с низким уровнем гемолиза)

связан с нарушением ионного баланса, контролирующего такие параметры клеток, как мембранный потенциал, pH цитоплазмы и т. д.

Если в качестве начального этапа повреждения клетки рассматривать образование ТМД в плазматической мембране, возникает необходимость четко выделить основные фазы их эволюции: фазу инициации, а также фазы стабилизации, роста и репарации. Фаза инициации отражает нарушение состояния «опорных» компонентов клетки (периферического белкового скелета), а фазы стабилизации и роста — нарушение топологической «подгонки» и смешиваемости липидных и белковых компонентов мембраны. В свою очередь, фаза репарации отражает восстановление до нормы последней группы факторов. Ключевым этапом, обуславливающим повреждение клетки при изменении температуры и осмотических факторов среды, является фаза инициации. Именно поэтому температурный шок клеток наблюдается после инициации ТМД с помощью самых различных факторов — бактериальных токсинов, лизофосфатидов, короткоцепочечных фосфолипидов и т. д. [2]. Анализ осмотических факторов и температуры при их воздействии на клетку показывает [3, 19], что роль первых реализуется на уровне периферической белковой решетки, обеспечивающей пространственную интеграцию компонентов, формирующих клетку. Эта интеграция является не только структурной, но и функциональной, что прежде всего связано с включением в мембранный скелет регуляторного белка кальмодулина, контролирующего работу ионных насосов. Поэтому появление ТМД при структурной модификации скелета может быть следствием нарушения согласованности между звеньями цепи, обеспечивающей устойчивость структуры, функции и регуляции ионных насосов. В классическом случае температурного шока эритроцитов ТМД, формирующиеся на предварительном этапе перед охлаждением, могут быть структурно близкими к Ca^{2+} -активируемым калиевым каналам (каналам Гардоша), модулируемым кальмодулином. Для клеточных систем характеристики формирования, роста, стабилизации ТМД во многом определяются конформационным состоянием белков в мембране, которое зависит от температуры [2, 19]. Медленная обратимость конформационных изменений белков [1, 19] означает, что состояние максимальной (адаптации) или минимальной (сенсibilизации) устойчивости структуры может сохраняться относительно долго, т. е. белки контролируют исходную чувствительность клетки к последующим циклам изменения температуры и тоничности среды.

При учете латентных изменений, развивающихся в мембране клетки при положительных температурах, анализ природы повреждений при замораживании приобретает несколько аспектов. В частности, возникает вопрос, обусловлено ли повреждение клетки при замораживании появлением или накоплением в мембране собственно «низкотемпературных» нарушений или в цикле замораживания-отогрева происходит «проявление» образованных ранее (например, в период эквilibрации с криопротекторами при $0 \div 4^\circ C$) ТМД в плазматической мембране клетки. Для конкретного ответа на поставленный вопрос необходимо четко разграничивать механизмы, лежащие в основе сенсibilизации клетки к лизису и сам механизм лизиса. Последний, по-видимому, является более универсальным и представляет собой коллоидно-осмотический процесс, включающий начальное нарушение ионного равновесия, набухание клетки и разрыв мембраны. Механизмы сенсibilизации, связанные с формированием ТМД, могут быть гораздо более многообразными [2]. Поэтому в цикле замораживания-отогрева пространственная локализация участков повреждения, выраженность этого процесса и температурная зона его проявления будут зависеть от природы сенсibilизирующего фактора и исходной структуры клетки.

В отличие от простого охлаждения в области положительных температур замораживание представляет собой более комплексное воздействие, при котором на клетку одновременно влияют многие факторы [17]. Когда в ледяной матрице сохраняются жидкие микрофазы, мощность действующих на клетку факторов приближается к критической. Однако при низкой тем-

температуре ограничение процессов, развивающихся на этапе инициации ТМД, может рассматриваться как фактор, компенсирующий неблагоприятные изменения осмотических условий среды. Собственно температура при прочих равных условиях (при отсутствии изменений в среде) играет роль фактора, контролирующего: 1) процесс инициации ТМД; 2) пространственную интеграцию компонентов, формирующих ТМД, т. е. процесс, способный вызвать стабилизацию или репарацию ТМД; 3) плотность упаковки липидов и, соответственно, резерв поверхностной площади.

При температурах $-25 \div -30^\circ\text{C}$ в жидких микрофазах структурные, кинетические и диффузионные процессы замедляются. Может ли в этих

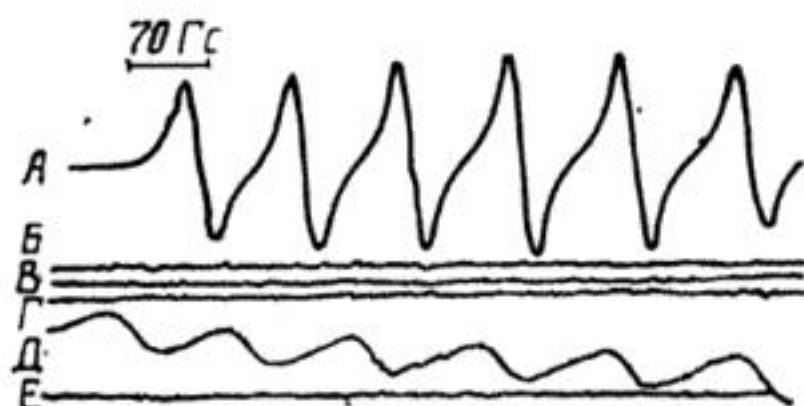


Рис. 3

Рис. 3. Инкорпорирование Mn^{2+} в суспензии эритроцитов, подвергнутых быстрому замораживанию в растворе, содержащем 20%-ный ПЭО с м. м. 1500 [5]. Спектры ЭПР регистрировали: А — в растворе 150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl pH 7,4, содержащем 2 мМ MnCl_2 ; Б — в суспензии эритроцитов после инкубации в растворе А, содержащем 2 мМ MnCl_2 ; В — в суспензии эритроцитов после инкубации в растворе Б, 150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, 2 мМ MnCl_2 , 20%-ный ПЭО с м. м. 1500; Г — в суспензии эритроцитов, подвергнутых замораживанию-оттаиванию в среде Б без MnCl_2 и внесения MnCl_2 до 2 мМ после отогрева; Д — в суспензии эритроцитов, подвергнутых замораживанию-оттаиванию в среде Б; Е — в суспензии белых тей, полученных из эритроцитов, подвергнутых замораживанию-оттаиванию в среде Б

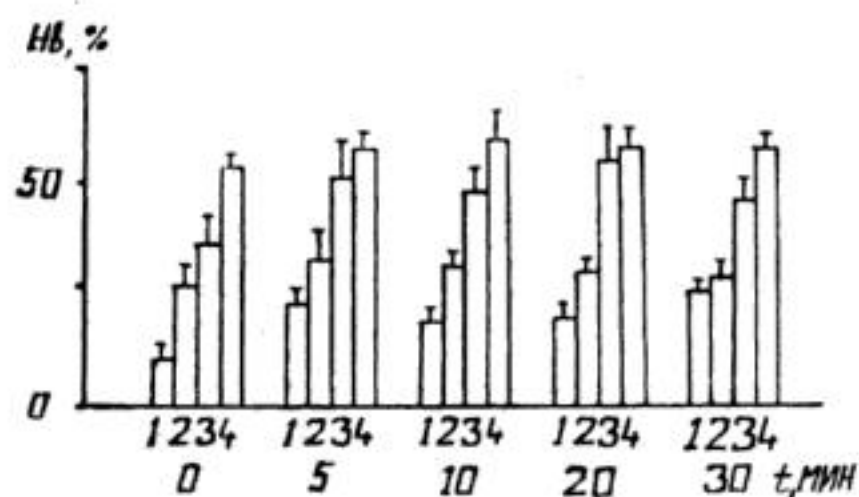


Рис. 4

Рис. 4. Гемолиз эритроцитов, подвергнутых медленному замораживанию со скоростью $1-2^\circ\text{C}/\text{мин}$ до температуры: 1—4, 2—5, 3—6, 4—7 $^\circ\text{C}$; время экспозиции — 0; 5; 10; 20; 30 мин

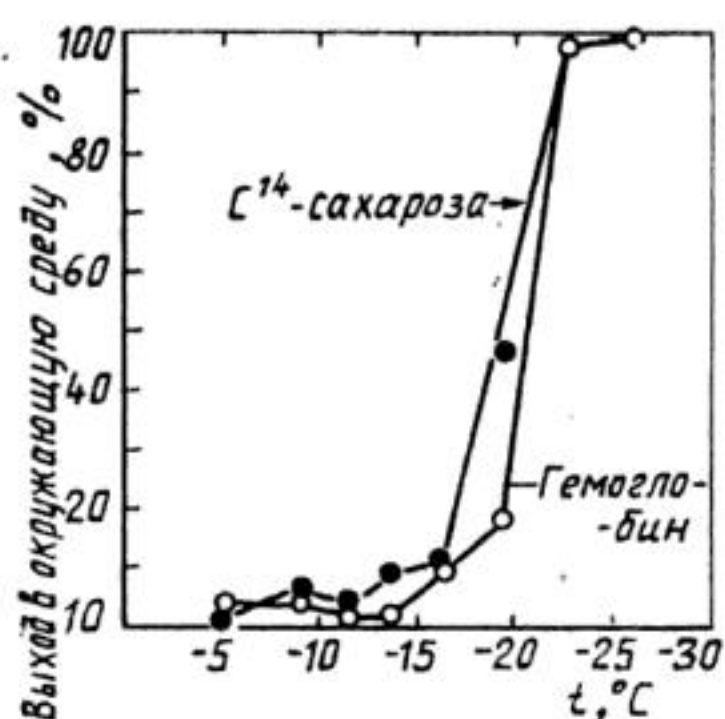


Рис. 5

Рис. 5. Выход ^{14}C -сахарозы и гемоглобина в надосадочную среду из реставрированных тей эритроцитов после медленного ($1-2^\circ\text{C}/\text{мин}$) замораживания до различных температур. Суспензию тей замораживали в K^+ -содержащей среде [5]

условиях происходит переход от фазы инициации ТМД через их стабилизацию в фазу лизиса? При рассмотрении этого вопроса предпочтительней говорить о более высокой вероятности низкотемпературной фиксации предсуществующих ТМД и развитии лизиса на более позднем этапе отогрева. Рассмотрим имеющиеся экспериментальные факты [5, 6].

Развитие ТМД в мембранах в зависимости от температуры может быть исследовано различными методами. Так, в частности, изучение барьерных свойств мембраны методом ЭПР-спектроскопии по динамике проникновения ионов Mn^{2+} внутрь клеток показало (рис. 3), что в процессе замораживания-оттаивания в суспензии эритроцитов регистрируется разрешенный спектр этого катиона, т. е. происходит включение Mn^{2+} в клетку через сформированные ТМД [5]. Нарушение ионной асимметрии в нативных клетках, которое проявляется в утечке K^+ , регистрируется уже при замораживании до $-4 \div -6^\circ\text{C}$ (табл.). Поскольку при этом крупные маркеры, например ^{14}C -сахароза и гемоглобин, не выходят из клеток, ТМД, индуцируемые при

—4 ÷ —6 °C в условиях умеренной гипертонии NaCl, характеризуются предпочтительной катионной проницаемостью. При температуре —6 ÷ —8 °C и повышении тоничности среды до 1,2—2,4 М происходит нарушение барьерных свойств мембраны для более крупных молекул, в частности, гемоглобина (рис. 4), что особенно выражено в условиях, когда клетки возвращаются в нормотонические условия [6].

В случае реконструированных мембранных систем (РМС), т. е. «белых» и «красных» теней эритроцитов, нарушение барьерных свойств регистрируется только после замораживания до —16 ÷ —18 °C (рис. 5). В интервале температур (0 ÷ —18 °C) в указанных системах формируются ТМД, проницаемые для K⁺, ¹⁴C-сахарозы и гемоглобина [5]. По мере снижения температуры и увеличения времени экспонирования дефектность мембраны повышается, о чем свидетельствует динамика элиминации ионов из эритроцитов

Т а б л и ц а. Внутриклеточное содержание K⁺ (мМ/л) в отогретых эритроцитах после медленного замораживания до различных температур

Время пребывания образца в замороженном состоянии, мин	Температура, °C					
	2—4	—2	—4	—5	—6	—7
0	126 ± 8,1	118 ± 14,3	109 ± 7,2*	82 ± 12*	51 ± 4,5*	35 ± 5*
5	121 ± 5,1	119 ± 6,7	101 ± 5,2	68 ± 12,4	46 ± 6,3	28 ± 3,6
10	122 ± 5,5	121 ± 12,9	88 ± 13,1*	63 ± 9,4*	45 ± 5,8	29 ± 5,3
20	124 ± 6,4	123 ± 11,9	86 ± 5,4*	64 ± 8,5*	48 ± 6,2	27 ± 3,7
30	122 ± 11,3	124 ± 7,9	69 ± 20,2*	59 ± 10,4*	41 ± 6,9	29 ± 2,7

П р и м е ч а н и е. Среда замораживания: 150 мМ NaCl, 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,4. Данные при нулевом времени пребывания в замороженном состоянии сравнивали с данными образца при 2—4 °C; остальные — с данными образца соответствующей температуры замораживания при нулевом времени пребывания в замороженном состоянии; * — различия статистически достоверны.

(табл.). Из сравнения данных видно (рис. 4,5, табл.), что РМС более устойчивы к действию концентрационных растворов солей при низких температурах, чем эритроциты, и формирование в них ТМД ограничено. В ряду эритроцит → тень → липидная везикула число компонентов, формирующих пространственную структуру, последовательно снижается, что повышает устойчивость более простых систем к изменению температурных и осмотических условий среды. После инициации ТМД их рост при более низких температурах связан с развитием фазовых переходов липидов [8]. Последний процесс может развиваться как при определенном «критическом» уровне охлаждения, так и при сильной дегидратации мембраны [5]. Из рис. 6 видно, что в области температур —17 ÷ —25 °C хорошо выявляется фазовый переход липидов, который по данным ЯМР соответствует температурной зоне, следующей за вымерзанием объемной воды (рис. 7).

Поскольку более низкая температура является фактором, компенсирующим неблагоприятное влияние повышения осмолярности среды на процесс инициации ТМД, в области отрицательных температур трудно ожидать прямой корреляции между уровнем повреждения клетки и величиной изменения осмолярности среды. Подобное отсутствие корреляции, в частности, наблюдается в экспериментах [16]. Факторы, способные иницировать ТМД в области отрицательных температур, могут быть весьма многообразными и некоторые из них, по-видимому, еще недостаточно исследованы.

Таким образом, фактором, способным резко снизить устойчивость клеток к действию положительных (до 0 °C) и отрицательных температур, может явиться начальная реакция клеток на сдвиг температурных и осмотических условий среды уже вблизи границ физиологической нормы, что проявляется в нарушении структуры плазматической мембраны как барьера, разделяющего внутреннюю и наружную среду клетки.

Доменная структура мембраны предполагает наличие в жидком липидном бислое более ригидных участков, состоящих из белков и холестерина, и менее стабильных (жидких), включающих главным образом поля чистых липидов [14]. Считают [1, 14], что в нативных мембранах клеток границы между ригидными и жидкими участками являются неустойчивыми к различным экстремальным воздействиям, например, к сдвигу температуры, изменению тоничности среды, действию химических и физических агентов и т. д. В них могут быть обнаружены микродефекты, транслокации молекул и другие локальные нарушения барьерных свойств, время жизни которых при физиологических температурах, вероятно, очень велико. Однако строгих экспериментальных доказательств значения междоменных границ как зон предпочтительного образования ТМД до настоящего времени не получено. Можно лишь предполагать, что исходная нативная структура плазматической мембраны содержит более ослабленные участки, которые могут при экстремальных воздействиях являться областями локализации больших

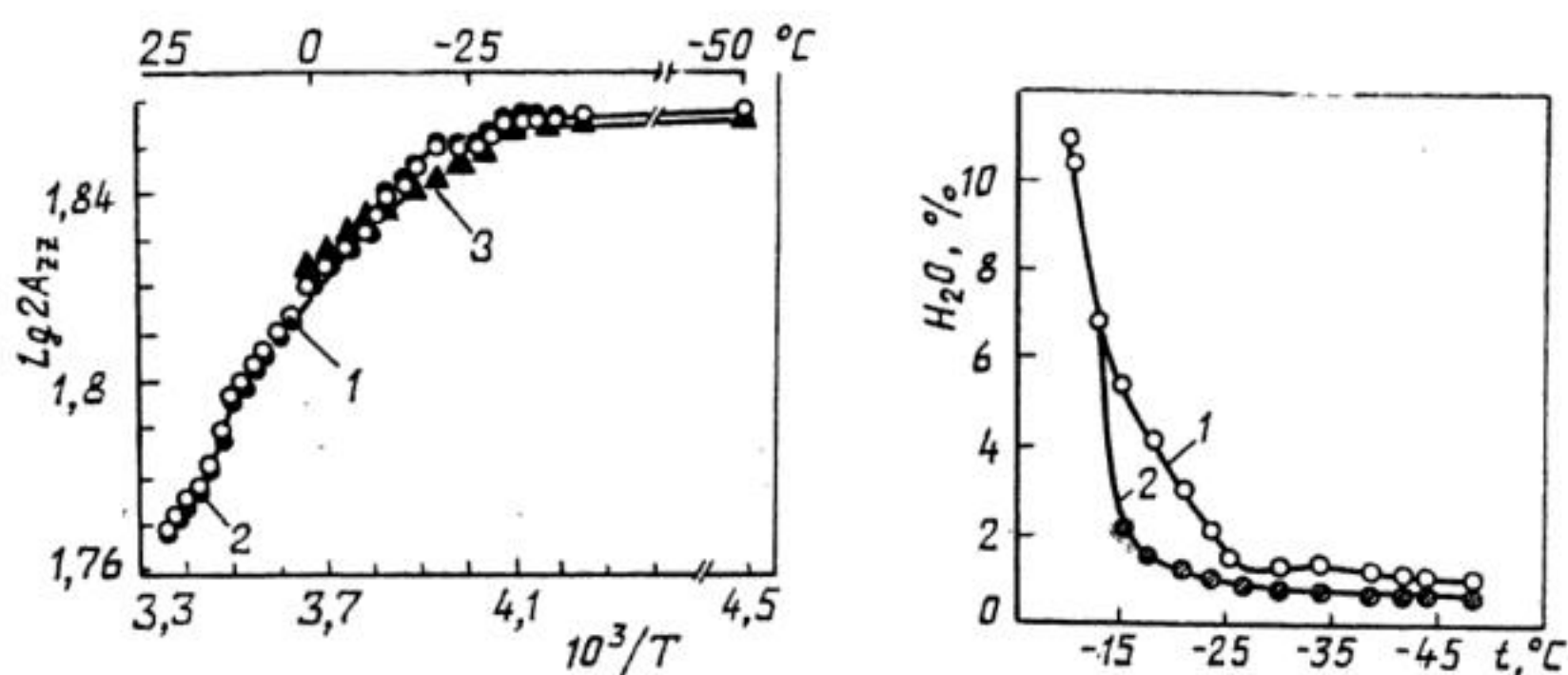


Рис. 6. Зависимость параметра $2A_{zz}$ 5-доксилстеариновой кислоты в мембранах эритроцитов от температуры: 1 — $\circ$ — $\circ$ — охлаждение; 2 — $\bullet$ — $\bullet$ — отогрев; 3 — $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ — охлаждение в 30 %-ном глицерине

Рис. 7. Вымерзание (1) и оттаивание (2) воды в цикле замораживания-отогрева суспензии реставрированных теней эритроцитов [5]. Среда замораживания: 150 мМ KCl, 4 мМ $MgCl_2$, 10 мМ трис-HCl pH 7,4; скорость замораживания 1—2 °C/мин

трансмембранных белков типа полосы 3 в эритроците или белков (пока еще не идентифицированных), формирующих канал Гардоша. В эритроците существенную роль играют такие белковые структуры, формирующие мембранный скелет (актин, белки 4,1 и 4,9, спектрин), а также реологические и механические характеристики ионного геля, формируемого этими белками (и в особенности его тиксотропные свойства). Так как при снижении температуры падает вероятность репарации ТМД, то при критических воздействиях в области низких температур появление ТМД и лизис клеток могут происходить по принципу «все или ничего».

Экспериментальный анализ этапов криоконсервации показывает, что решающее значение для прогноза жизнеспособности клеток имеет сохранение постоянства внутриклеточной среды, контролируемого плазматической мембраной. Поэтому появление ТМД в плазматической мембране можно рассматривать как фундаментальную причину нарушения одного из важнейших условий жизнедеятельности клетки.

Таким образом, учитывая многообразие процессов, протекающих в плазматических мембранах клеток, выдвигаемая концепция утверждает, что ведущим фактором, предопределяющим исходы охлаждения, замораживания и отогрева, является формирование ТМД в наружной (плазматической) мембране, эволюция которых зависит от степени модификации белкового скелета и изменения физико-химических свойств липидов и белков самой мембраны на ранних этапах перед охлаждением.

Получают обоснование механизмы снижения жизнеспособности клеток при низких температурах, а также закономерности, лежащие в основе нарушения способности к восстановлению функции клетки. Вместе с тем необходимо дальнейшее изучение молекулярных механизмов формирования, кинетики и эволюции ТМД в развитии холодовых повреждений других видов клеток.

1. Бабийчук Л. А., Спириг М. М., Белевич Г. В. и др. Исследование влияния изменений тоничности среды на структуру мембраны цельных эритроцитов в интервале температур от 0 до 37 °С с помощью флуоресцентных зондов // Криобиология.— 1986.— № 3.— С. 14—18.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка, 1982.— 255 с.
3. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бабийчук Л. А., Бондаренко Т. П. Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология.— 1985.— № 2.— С. 25—32.
4. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Бабийчук Л. А. Температурозависимые изменения структуры эритроцитов. Сообщение 1. Роль ионов и фазовых переходов липидов в индукции процессов криогемолиза // Криобиология и криомедицина.— 1983.— Вып. 12.— С. 13—24.
5. Гулевский А. К. Барьерно-транспортные свойства плазматической мембраны в процессе ее консервации: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Харьков, 1986.— 42 с.
6. Гулевский А. К., Сахаров Б. В., Волков В. Я. Низкотемпературные нарушения проницаемости плазматических мембран, связанные с дегидратацией // Докл. АН УССР.— 1982.— 263, № 5.— С. 1250—1257.
7. Гордиенко Е. А., Гордиенко О. И. О механизме осмотического лизиса эритроцитов // Криобиология.— 1986.— № 2.— С. 23—26.
8. Дегтярев А. В. Температурная модификация проницаемости липидных везикул в неравновесных осмотических условиях // Криобиология.— 1986.— № 4.— С. 44—45.
9. Козлов М. М., Маркин В. С. Теория осмотического лизиса липидных везикул // Биологические мембраны.— 1984.— 1, № 1.— С. 74—90.
10. Луговой В. И. Механизмы повреждающего действия замораживания на растворимые и мембраносвязанные ферменты: Автореф. дис.... д-ра биол. наук.— Харьков, 1985.— 38 с.
11. Луговой В. И., Мусеев В. А. Влияние низких температур на растворимые ферменты // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. ВИНТИ.— 1978.— 9.— С. 53—79.
12. Dalmark M. Chloride and water distribution in human red cells // J. Physiol.— 1975.— 250, N 1.— P. 65—84.
13. Farrant J., Woolgar A. E. Possible physical relationships between the properties of solution and cell damage during freezing // The Frozen Cell (Wostenholme C. E. F. and O'Connor M. O.).— London, 1970.— P. 97—114.
14. Jain M., White H. III. Long-range order in biomembranes // Adv. Lipid. Res. New York, 1977.— 15.— P. 1—60.
15. Lovelock J. E. The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing // Proc. Roy. Soc.— 1957.— 147, N 4.— P. 427—433.
16. Mazur P., Rall W. F., Rigopoulos N. Relative contribution of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes // Biophys. J.— 1981.— 36, N 3.— P. 653—676.
17. Meryman H. T., Williams R. J., Douglas M. S. J. Freezing injury from solution effect and its prevention by natural or artificial cryoprotection // Cryobiology.— 1977.— 14, N 3.— P. 287—302.
18. Macey R. J., Adorante J. C., Orme F. N. Erythrocyte membrane potentials determined by hydrogen ion distribution // Biochim. et biophys. acta.— 1978.— 512.— P. 284—295.
19. Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A. M. Role of membrane thermotropic properties in hypertonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // J. Cell. Biochem.— 1984.— 25, N 2.— P. 61—72.
20. Solomon A. K., Chasan B., Dix J. A. et al. The aqueous pore in red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water // Biophys. J.— 1982.— 37, N 2.— P. 215.
21. Takahashi T., Moji S., Erbe E. F. et al. Cold shock hemolysis in human erythrocytes studied by spin probe method and freeze-fracture electron microscopy // Biophys. J.— 1986.— 49, N 2.— P. 403—410.

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

Поступила 11.10.86

В. Д. Мануильский

ПРОБЛЕМЫ КОНСЕРВАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ

Идея создания генного банка растений впервые была реализована в 20-х годах нашего столетия выдающимся ученым-растениеводом Н. И. Вавиловым, собравшим коллекцию семян, которая предназначалась для селекции и генетики в качестве исходного материала, а также для изучения сортовых ресурсов растительного мира. Предвидя исключительное значение этого генетического материала, он отмечал, что в настоящее время «встала во весь рост проблема мировых растительных ресурсов» [1]. Изучение материалов коллекции позволили Н. И. Вавилову сформулировать закон гомологических рядов, состоящий в том, что у близких родов и видов могут возникать сходные наследственные признаки, и облегчающий поиск новых исходных форм для селекции растений с заданными свойствами. Помимо этого им были обоснованы эколого-географические принципы селекции и критерии целенаправленного выведения сортов растений.

Созданная во Всесоюзном институте растениеводства ВАСХНИЛ коллекция до настоящего времени определяет генетический уровень нашего растениеводства. Но через 60 лет возникла проблема сохранения генетической стабильности и жизнеспособности коллекционного материала [4], поэтому требуется поиск новых форм консервации генетических ресурсов растений. В нашей стране разработка принципов консервации и создания генного банка для хранения геноплазмы принадлежит Б. Н. Вепринцеву, разработавшему программу исследований, целью которой является создание научных основ предотвращения потери генетической информации видов, подвидов и отдельных популяций флоры и фауны. Исходя из этой программы, консервация генофонда растений может осуществляться в зависимости от поставленных целей несколькими путями. Во-первых, это создание банков генов, которые должны осуществлять длительное поддержание стабильности генетической информации растений. Для этих целей пригодны семена, меристемы, пыльца, эмбриониды и другие растительные объекты, несущие генетическую информацию. Во-вторых, необходимо сохранять растения в природных ценопопуляциях или натурализованных ценозах (в ботанических садах и питомниках), источником материала для которых могут служить генетические банки и естественные популяции. В-третьих, это восстановление численности представителей генофонда редких и исчезающих видов растений в природных биотопах за счет реинтродукции [2, 3].

Единственно возможным в настоящее время приемом, обеспечивающим долговременное сохранение стабильности генома, считается консервация в условиях ультранизких температур. В отличие от традиционных способов хранения консервация при ультранизких температурах имеет существенные преимущества, поскольку позволяет исключить такие процессы, как истощение запасных веществ, накопление токсинов, распад и инактивация ферментных комплексов, самоокисление липидов, деградация функциональных и генетических систем, а также другие еще не исследованные биохимические и биофизические процессы, связанные со старением клетки.

В 1973 г. Наг и Стрит [13] показали, что существуют кариотипическое постоянство и способность к соматическому эмбриогенезу и регенерации растений из культуры клеток моркови, которая была заморожена до -196°C и хранилась не более 100 дней. Затем в США, Англии, Японии и других странах были созданы криобанки, на базе которых изучаются условия и длительность хранения семян более 200 видов растений [18]. О криоконсервации клеточных культур и культур меристем к настоящему времени опубликованы данные примерно о 40—50 видах растений [21]. В нашей стране криобанки меристем и культур клеток существуют в Институте

физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР и НИИ картофельного хозяйства ВАСХНИЛ, а работы по криоконсервации растительных объектов ведутся в Институте почвоведения и фотосинтеза АН СССР, Всесоюзном НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова ВАСХНИЛ и Институте ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР [7]. Система процедур, необходимая для криоконсервации растительных объектов (рис.), удачно сочетает глубокое замораживание культур клеток и тканей *in vitro*, а также растительных объектов, которые могут быть криоконсервированы без культивирования на искусственных средах. К таким объектам относятся семена, пыльца и некоторые трансплантаты, которые в дальнейшем будут именоваться как объекты *in vivo* [21].

При консервации генетических ресурсов растений в условиях ультранизких температур *in vitro* особо остро стоит вопрос выбора объектов. Имеются в виду вегетативно размножающиеся растения, обладающие высокой

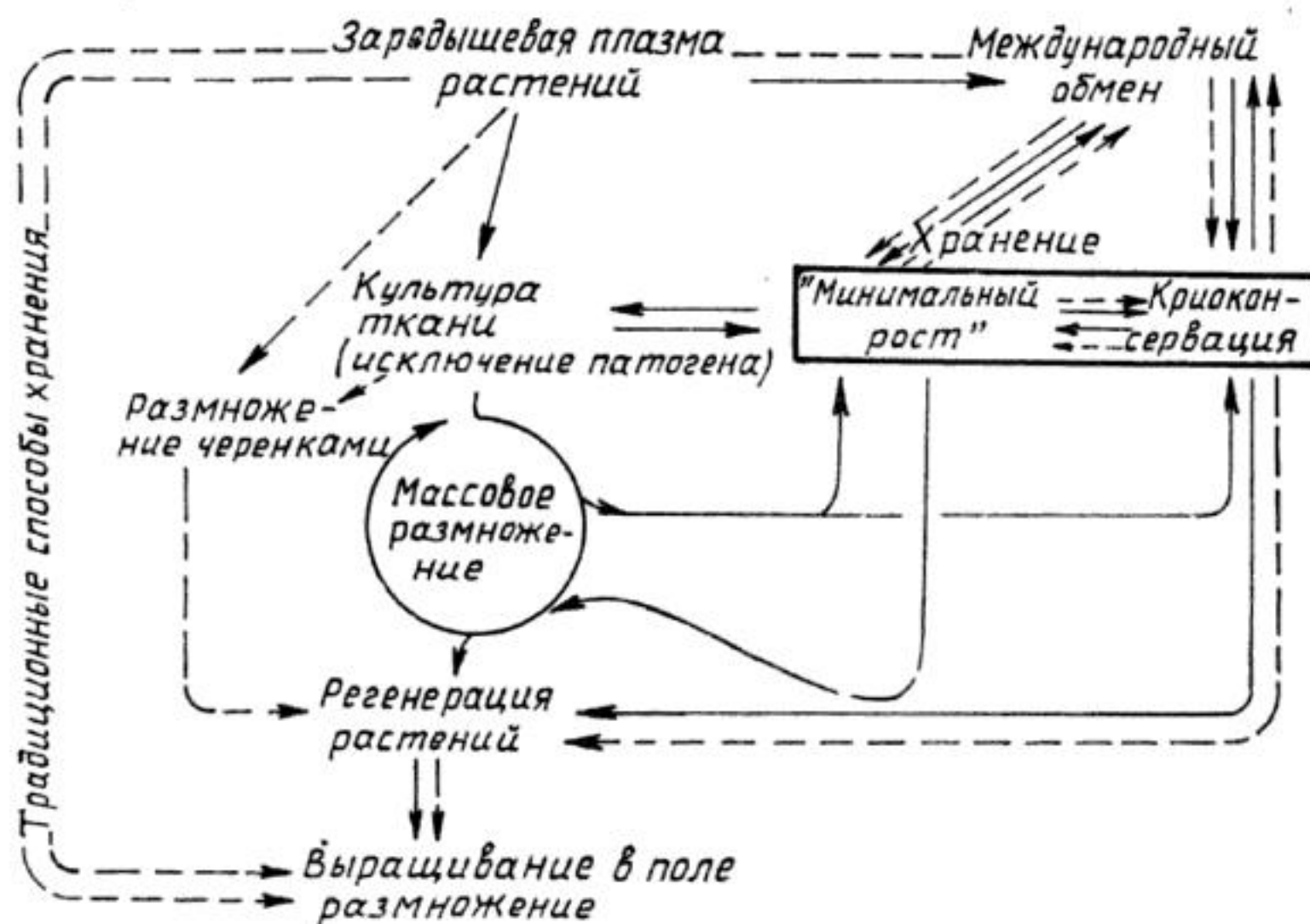


Рис. Схема процедур, необходимых для проведения криоконсервации генетических ресурсов растений [18] (— размножение *in vitro*, ---- размножение *in vivo*)

степенью гетерозиготности и не образующие семена, которые быстро теряют жизнеспособность при хранении их в виде вегетативных органов, клубней и черенков. Наиболее перспективными для криоконсервации среди таких культур являются пищевые культуры: *Dioscorea*, *Ipomoea*, *Manihot*, *Solanum*, *Colocasia*, *Xanthosoma*, *Musa*. Масштаб проблемы может быть продемонстрирован на примере работ, проводимых в национальном центре в Перу, в криобанке которого в настоящее время насчитывается более 12000 образцов генотипов *Solanum*. Имеющиеся в коллекции генотипы представлены формами, которые не образуют семян, есть также триплоиды и пентаплоидные культуры. Другая важная группа растений — это размножающиеся семенами, но вегетативное размножение которых оказалось бы полезным с точки зрения увеличения штаммов ценных гибридов в F_1 . Криоконсервация может быть использована также для ускорения размножения ряда древесных, включая голосеменные и покрытосеменные долгоживущие растения, в связи с тем, что они, как правило, не образуют семена до определенного возраста и должны размножаться вегетативным путем при необходимости увеличения количества родительских форм.

В последнее время большое внимание уделяется культуре меристем в связи с микроклонированием и получением растений, лишенных вирусов. Клонирование с использованием культуры меристем перспективно, поскольку позволяет избежать трудоемких операций черенкования и контроля морфогенеза. В обзоре [12] приводятся примеры размножения с помощью

меристем более 200 видов цветковых, декоративных ландшафтных растений и суккулентов, а также овощных, плодовых и лекарственных культур. Сохранение генетических ресурсов путем криоконсервирования меристем имеет много преимуществ по сравнению с другими способами *in vitro*. Это вызвано тем, что меристемы непосредственно развиваются в растения, что обеспечивает большую генетическую стабильность. Меристемы легче переносят замораживание до ультранизких температур, поскольку имеют мелкие клетки, в которых отсутствуют крупные вакуолярные образования. Помимо этого криоконсервирование меристем может быть использовано для длительного хранения генетических ресурсов рекальцитратных семян (теряющих жизнеспособность при подсушивании), а также тканевых культур пальм видов *Elaeis*, *Phoenix*, *Cocos*, для которых пока еще не существует надежных методов вегетативного размножения. Во всех случаях при выборе материала для криоконсервации генетических ресурсов растений путем культуры *in vitro* следует учитывать факторы, вызывающие изменения генотипов растений. В связи с этим представляют интерес данные Д'Амато [10], который на примере *Saccharum officinarum* показал, что даже одно растение нельзя рассматривать как генетически стабильное, поскольку возможна хромосомная мозаичность. Исключить подобные явления можно путем образования клонов только из тканей апикальной меристемы. При работе с меристемами необходимо учитывать, что при размножении растений с помощью этого приема часто происходит формирование придаточных почек, а в коммерческих программах число стадий размножения ограничено для того, чтобы избежать «почечных мутаций». Кроме того, на деформированных эксплантатах возможны локальные мутации или патология митоза, что может приводить к изменениям генома [21].

Генетическая стабильность культуры *in vitro* сохраняется обычно при однократной инициации ростовых процессов. Если при культивировании по тем или иным причинам происходило торможение ростовой активности, то при повторных инициациях и последующих стимуляциях деления клеток дифференцируемого объекта возможно возникновение генетических изменений. В случаях, когда для инициации культуры используются травматические методы, существенно возрастает вероятность процессов, приводящих к генетическим трансформациям [17].

У клеточных культур еще на этапе их получения возможно спонтанное образование многоядерных протопластов [15]. Имеются данные о том, что у гаплоидных протопластов еще до первого митоза могут наблюдаться явления эндоредупликации [11]. При исследованиях таких протопластов под электронным микроскопом обнаружено, что первое деление клеток может быть абортным или включать неполный цитогенез [21].

Важным фактором, оказывающим влияние на стабильность генотипа суспензионных культур, является продолжительность их культивирования. При длительном культивировании еще до криоконсервации возникают аномалии в результате присущей культурам *in vitro* генетической нестабильности. Они могут быть связаны с изменениями плоидности в результате нарушений веретена или митозов. Нечетная плоидность, по мнению Сандерленда [17], вероятно, вызвана слиянием веретена и ядра и сегрегацией генома при мультиполярных анафазах. Увеличение числа хромосом часто объясняют ядерной фрагментацией, но этот же эффект иногда вызывает сегрегацию гомологических хромосом и их потерю, которая в конечном счете приводит даже к гаплоидности [14].

Беннеси и соавторы [8] на основании работ с *Phaseolus coccineus* при длительном культивировании ее суспензионной культуры особое внимание обращают на возникновение и частоту различных форм анэуплоидии. Они считают, что ядерная фрагментация в пределах гетерогенной популяции ядер может привести к эуплоидным и анэуплоидным продуктам, которые разделяются последующей целлюляризацией.

Существенное влияние на генотип при культивировании клеток на искусственных средах оказывают гормональные препараты. В литературе

есть сведения о том, что индукция генотипических изменений во время инициирования культуры может быть обусловлена добавкой гормонов или изменениями их соотношения в процессах роста [10]. Общеизвестным фактом является то, что 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) стимулирует деление полиплоидных клеток [19]. Альфа-нафтилуксусная кислота и кинетин влияют на плоидность в процессе культивирования и дифференциации [9]. Визерс [20] считает, что особенно тщательный контроль должен проводиться при работе с 2,4-Д, который часто употребляется для воздействия на кинетику клеточного цикла с целью стимулирования образования растений из пыльников.

Наряду с перечисленным возможны также изменения генетического аппарата клетки, которые происходят при замораживании-отогреве в процессе криоконсервации. Имеется в виду действие стрессов, которые в результате селективного действия избирательно повреждают гетерогенные популяции клеток. Проведенные эксперименты на суспензионных культурах *Acer pseudoplatanus* и *Daucus carota* показали, что при медленном замораживании в присутствии 5 % ДМСО в результате дегидратации клеток наряду с вогнутым плазмолизом могут образовываться электронно-прозрачные зоны около ядра [20]. Такие изменения, вероятно, влияют на мембрану ядра, однако их роль в нарушении генома пока не известна. После размораживания часть исследуемых клеток в жизнеспособной культуре восстанавливала свои размеры, а другие оставались плотно сжатыми. В некоторых клетках встречались гипертрофированные каналы эндоплазматического ретикулума и митохондрии. Вероятность сохранения жизнеспособности таких клеток в значительной степени зависела от масштабов развития перечисленных повреждений.

Гетерогенность реакций клеток на цикл замораживания-отогрева наиболее четко выявляется через несколько дней после размораживания. Обычным тестом на выживаемость культуры после криоконсервации является степень репарации возможных повреждений и на основании этого установление ее морфогенного потенциала. Для суспензионной культуры этот период составляет не менее 4 дней, поскольку в дальнейшем не наблюдаются какие-либо изменения, связанные с процедурой замораживания-отогрева.

Важными являются данные о том, что суспензионная культура клеток *Acer pseudoplatanus*, синхронизированная на протяжении 4—5 делений, а затем замороженная и отогретая по описанному выше способу, имела более низкий митотический индекс по сравнению с исходной популяцией. Клетки, выжившие после замораживания, в большем количестве были представлены в G_1 , в то время как у незамороженных они были равномерно распределены между G_1 и G_2 . Эти явления свидетельствуют о возможном уменьшении гетерогенности популяции и представленных в ней генотипов в результате гибели менее устойчивых к криоповреждениям клеток. Среди других факторов, от которых может зависеть выживаемость клеток и их репарация после криоповреждений, важное значение имеет промывка тканевых и клеточных культур. По мнению Визерс [20], при работе с суспензионной культурой, соматическими зародышами и клональными побегами промывки только усугубляют повреждения, возникающие в процессе замораживания-отогрева.

Отмечена тенденция выживаемости суспензионной культуры *Zea mais* в зависимости от повреждения плазматем, которое происходило в основном в центральной части клеточной стенки. Такого рода эффекты могут являться одной из причин, приводящих к обособлению протопластов тканевых культур при криоповреждениях. На репарацию криоповреждений существенное влияние оказывает добавка в культурную среду ионов Ca^{2+} , который, участвуя в процессах стабилизации плазмалеммы, может также регулировать внутриклеточные процессы.

Для сохранения генофонда растений после криоконсервации важна возможность образования каллуса на значительном числе выживших после

глубокого замораживания апексах. Причины этого явления связывают как с нарушениями симпластности в пределах объекта, что приводит к смещению гормональных градиентов или даже деструкции источников эндогенных гормонов, так и с образованием веществ с гормональноподобной активностью в результате цитолиза, что может также привести к неорганизованному росту [16]. В целом проблема неорганизованного роста меристем после отогрева полностью не изучена, но является важной для повышения эффективности приемов криоконсервации.

О существовании межсортовых и межвидовых различий в процедурах криоконсервации меристем *in vitro* свидетельствуют данные, приведенные в работах [5, 6]. Имеющиеся в настоящее время сложности с использованием культуры *in vitro* для криоконсервации растительных объектов связаны прежде всего с тем, что некоторые виды растений еще не удалось ввести в культуру ткани, а для других отсутствуют четкие представления о формировании криорезистентности. В то же время, исходя из опыта работы по криоконсервации растительных клеток, культивируемых на искусственных средах, к наиболее важным морфофункциональным факторам, определяющим криорезистентность, следует отнести объемные изменения клетки, компарментализацию слабо- и прочносвязанной воды, а также реакцию на стрессы, возникающие при замораживании и дегидратации. Сочетание этих параметров с таксономическими показателями позволит разрабатывать более надежные способы криоконсервации.

При реконсервации эксплантатов важным условием сохранения жизнеспособности является удаление части тканей, которые повреждены в цикле замораживания-отогрева. Вопрос, по-видимому, сводится к тому, насколько однородной была исходная популяция клеток. Для групп разнокачественных клеток сложно подобрать адекватные режимы консервации, и поэтому часть их гибнет, что может оказывать негативное влияние на остальные, снижая жизнеспособность неповрежденных клеток.

Анализируя литературу о консервации генетических ресурсов растений, следует отметить, что наименее исследованными являются вопросы репарации криоповреждений и их влияния на генетическую стабильность материала. Такое положение вызвано тем, что традиционные пути изучения криоповреждений клетки, к сожалению, не дают ответа на многие вопросы, связанные с изменениями генетического аппарата клетки. При этом важно соотношение последствий этих повреждений с наследственной информацией клетки.

Подводя итоги рассмотренных в этом обзоре сведений, следует отметить, что накопленный в литературе материал позволяет считать вопрос длительного хранения редких и исчезающих видов растений, образующих ортодоксальные семена, а также пыльцу и трансплантаты, практически осуществимым уже в настоящее время. Криоконсервация этих объектов не требует культивирования на искусственных средах и технически более доступна. Наряду с криоконсервацией семян следует криоконсервировать и меристемы. Но при этом необходимо помнить о биотехнологических проблемах и вопросах генетической стабильности, которые еще недостаточно исследованы [20].

1. Вавилов Н. И. Избранные труды.— М.— Л. : Из-во АН СССР, 1960.— 2.— С. 519.
2. Вепринцев Б. Н., Ротт Н. Н. Консервация генетических ресурсов. Программа исследований.— Пущино: ОНТИ АН СССР, 1984.— С. 23.
3. Вепринцев Б. Н., Ротт Н. Н. Проблема сохранения генофонда.— Пущино : ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1984.— 47 с.
4. Зайцев В. А., Лихачев Б. С. Резервы улучшения технологии длительного хранения семян мировой коллекции ВИР // Научно-техн. бюл. ВИР.— 1985.— № 152.— С. 3—9.
5. Попов А. С. Сохранение семян и меристем высших растений с помощью глубокого замораживания.— Пущино : ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1982.— С. 14.
6. Попов А. С. Значение криобанка клеток и меристем растений для их биотехнологического применения // Биотехнология.— М. : Наука, 1984.— С. 254—260.

7. Тихонова В. Л. Стратегия мобилизации и сохранения генофонда редких и исчезающих видов растений.— Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1985.— С. 34.
8. Bennici C. R., Cionini P. G., D'Amato F. Callus formation from the suspensor of *Phaseolus coccineus* in hormone-free medium: a cytological and DNA cytophotometric study // *Protoplasma*.— 1976.— 89, N 3—4.— P. 251—261.
9. Brossard D. Influence of kinetics on formation and ploidy levels of buds arising from *Nicotiana tabacum* pitch tissues grown *in vitro* // *Z. Pflanzphysiol.*— 1976.— 78, N 4.— P. 232—333.
10. D'Amato F. Chromosome number variation in culture cells and regenerated plants // *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Ed. T. A. Thirpe.— Intern. Assoc. Plant Tissue Cult.— 1978.— P. 287—296.
11. Furner I. J., King J., Cambore O. L. Plant regeneration from protoplasts isolated from a predominantly haploid suspension culture of *Datura innoxia* (Mill.) // *Plant Sci. Lett.*— 1978.— 11.— P. 169—176.
12. Murashige T. The impact of plant tissue culture on agriculture // *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Ed. T. A. Thorpe.— Intern. Assoc. Plant. Tissue Cult.,— 1978.— P. 15—26.
13. Nag K. K., Street H. E. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells // *Nature*.— 1973.— 245, N 5423.— P. 270—272.
14. Novak F. J. The changes of karyotype in callus cultures of *Allium sativum* L. // *Caryologia*.— 1974.— 87, N 1.— P. 45—54.
15. Pearse R. S., Withers L. A., Willison J. H. M. Bodies of wall like material («wall bodies») produced intracellularly by cultured isolated protoplasts and plasmolysed cells of higher plants // *Protoplasma*.— 1974.— 82, N 3.— P. 223—236.
16. Sheldrake A. R., Northcote D. H. The production of auxin by tobacco internode tissues // *New Phytologist*.— 1968.— 67, N 1.— P. 1—13.
17. Sunderland N., Dunwell J. M. Anther and pollen culture // *Plant Tissue and Cell Culture*. Ed. H. E. Street.— Blackwell, Oxford, 1977.— P. 223—266.
18. Stenwood P. C., Bass L. N. Ultracold preservation of seed germplasm // *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*. Ed. P. H. Li, A. Sakai.— N. Y.: Acad. Press, 1978.— P. 361—371.
19. Torrey J. G. Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures // *Physiol. Plant*.— 1967.— 20, N 2.— P. 265—275.
20. Withers L. A. Low temperature storage of plant tissue culture // *Plant Cell Culture*. Ed. A. Fiechter.— Berlin: Acad.—Verlag, 2, 1981.— P. 101—150.
21. Withers L. A. Tissue culture storage for genetic conservation // IBPGR Secretariat.— Rome, 1980.— P. 91.

Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного
АН УССР, г. Киев

Поступила 26.05.86

УДК 57.043:581.14

А. М. Голдовский

КСЕРОБИОЛОГИЯ И ЕЕ ОТНОШЕНИЕ К КРИОБИОЛОГИИ

В природных условиях содержание воды во многих организмах (или их зародышах) может временно уменьшаться и становиться ниже уровня, необходимого для активной жизнедеятельности. При этом сначала могут возникать состояния ограниченной и замедленной жизнедеятельности — гипобиоз (рис.). При более значительной потере воды возникают промежуточные состояния между жизнедеятельностью и анабиозом (мезабиоз) и, наконец, анабиоз. У неприспособленных к анабиозу организмов возможен только переход к гипобиозу и мезабиозу [2].

При переходе к сравнительно неглубокому гипобиозу — зимней спячке — в теле млекопитающих отмечается лишь небольшое снижение содержания воды, например, в некоторых органах краснощекого суслика перед спячкой и в первые ее недели [1]. Значительно уменьшается содержание воды у насекомых. Так, ее количество у колорадского жука при летней и зимней диапаузах составляло 46—51 и 48—54 % по сравнению с 58—68 % при активной жизнедеятельности [8]. Еще более резко выражено падение влагосодержания у растений, входящих в осенне-зимний покой.

При переходе к анабиозу организмы или их зародыши высыхают до воздушно-сухого состояния. Так, содержание воды в покоящихся яйцах

Artemia salina составило 5,67—9,50 % [4, 5]. Возможно также (при образовании спор) и не столь глубокое высыхание, но при этом смещаются соотношения между формами воды в сторону преобладания связанной воды, и (или) локализация остаточной воды изменяется так, что основные ее количества оказываются изолированными.

Представляется необходимым выделить особую область биологических наук, исследующую состояния организмов при пониженных содержаниях в них воды, необходимой впоследствии для активной жизнедеятельности. Эта область науки — ксеробиология (греч. *xeros* — сухой) [3], аналогично уже существующей криобиологии, занимающейся состояниями организмов при температурах ниже необходимых для активной жизнедеятельности. Действие на организм высыхания и охлаждения, рассматриваемое соответственно в ксеро- и криобиологии, имеет сходные черты. Так же, как и высушивание, охлаждение в зависимости от его глубины приводит к состояниям гипобиоза (гипотермия), мезабиоза (промежуточные состояния между

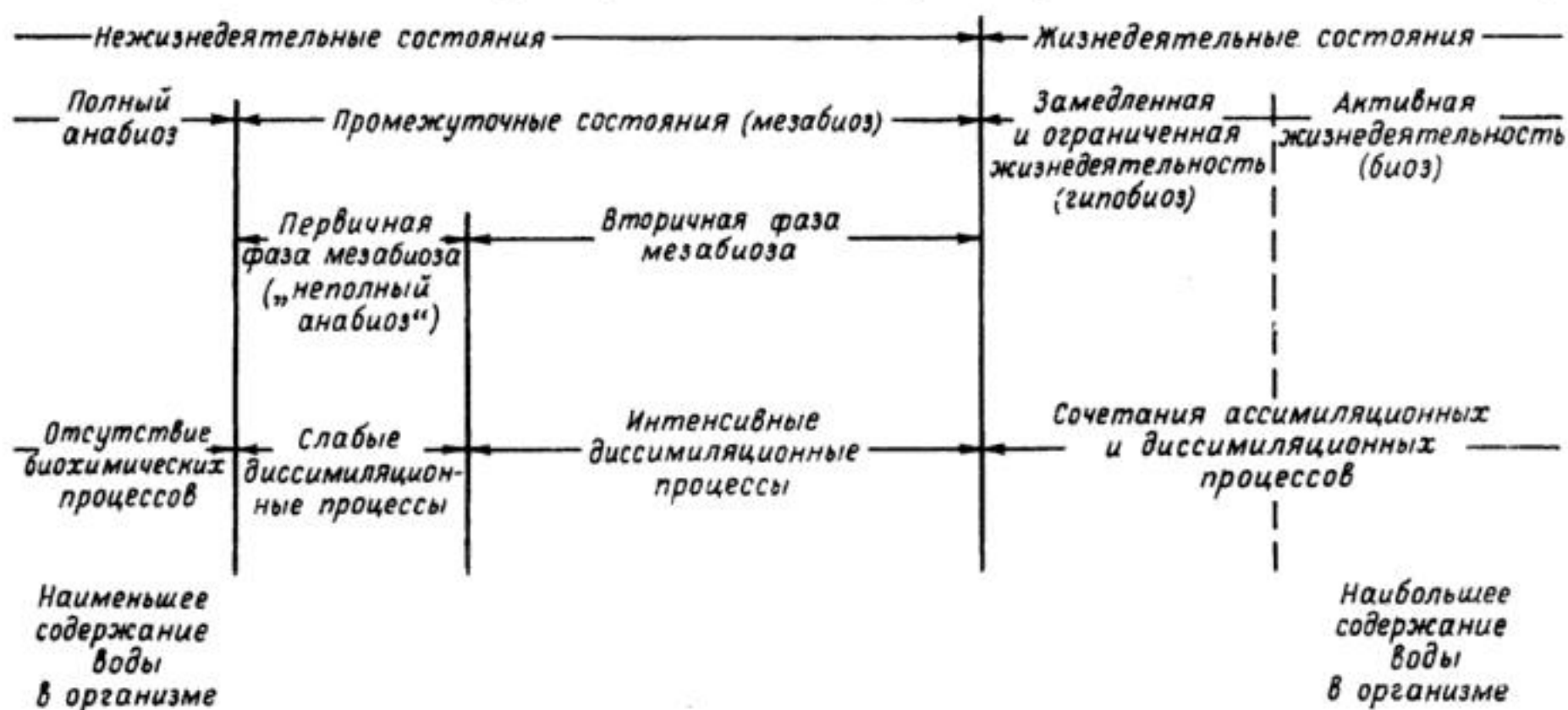


Рис. Схема изменений состояния организмов при снижении содержания свободной воды (или снижении температуры, также связанном со снижением содержания свободной воды). Вертикальные сплошные линии обозначают скачкообразные изменения состояний, пунктирная — постепенные изменения состояний [3]

жизнедеятельностью и анабиозом) и, наконец, анабиоза. Учение о состояниях организмов дает общую теоретическую основу ксеробиологии и криобиологии [2]. Исходным в нем является представление о жизнеспособной структуре, вытекающее из науки о возникновении жизни и эволюционной теории, об общности эволюционного происхождения организмов. По-видимому, в основе клеток современных организмов находится общая для них очень устойчивая жизнеспособная структура, некогда сформировавшаяся еще при возникновении жизни. Эта структура в дальнейшем в процессе эволюции подвергалась изменениям, возникали «надстройки» над ней, создавалось сложное строение клетки. В частности, в результате дифференциации первичной структуры образовывались органеллы*, осуществляющие в возникшей клетке отдельные процессы, входящие в сложный процесс жизнедеятельности. Поэтому «выключение» отдельных органелл в клетке приводит к прекращению жизнедеятельности немедленно или через некоторое время. В дальнейшем термин «жизнеспособная структура» мы будем применять для обозначения клетки (с ее органеллами) в целом в том виде, в каком она сформировалась в ходе длительной эволюции.

В строение жизнеспособной структуры вода не входит или входит в незначительном количестве. Этот вывод сделан на основании ряда исследований различных биологических объектов [2]. Например, длительное

* Выдвинуто предположение о том, что некоторые из органелл в свое время могли быть самыми простыми свободноживущими прокариотами, которые вошли в клетку позже в ходе эволюции [7].

(до 9—11 мес) высушивание семян ряда растений над хлористым кальцием при обычной температуре (при отсутствии тепловых воздействий) приводило к снижению содержания воды в большинстве семян до 0,98—1,34 % без заметного снижения их всхожести [6]. В опытах с применением тепловых воздействий удалось достигнуть остаточного содержания воды в изучавшихся объектах, шедших разными путями эволюционного развития, до 0,2—0,6 % с сохранением жизнеспособности большей части наиболее устойчивых индивидуумов [4].

Основой жизнедеятельности является взаимодействие «безводной» жизнеспособной структуры с водой [2]. Это наглядно иллюстрируется, например, возвращением к движению, к активной жизнедеятельности сухой, неподвижной тихоходки после смачивания ее водой или проращиванием сухих семян после их увлажнения. При этом для полной жизнедеятельности (полного функционирования структур) необходимо большое содержание воды в клетках — порядка 75—85 % их массы. При снижении содержания биологически активной, свободной воды интенсивность и полнота жизнедеятельности снижается вплоть до ее прекращения при анабиозе. Таким образом, изменения жизнедеятельности при высушивании и замораживании имеют общую основу — устранение воды из клеток или ее иммобилизацию — выключение из биологических взаимодействий в клетках.

Работы в области криобиологии стимулировали развитие криобиохимии и, как ее основной части, криоэнзимологии, занимающейся исследованием действия ферментов при низких температурах. При этом криобиохимия имеет прямое отношение к криохимии, предметом которой является изучение химических реакций при низких температурах. Аналогично этому ксеробиология должна дать начало ксеробиохимии и, в ее пределах, ксероэнзимологии, изучающей действие ферментов при низких содержаниях воды в клетках. Здесь намечается связь и с той частью химии, которая изучает химические реакции в твердых средах («твердофазные» реакции), поскольку при глубоком высушивании биологических объектов содержимое клеток оказывается в твердом состоянии.

Изучение ксеробиологических явлений важно при подходе к изучению более сложных криобиологических явлений. Например, представляет интерес сравнительное исследование изменений структуры клеток биологических объектов, которые могут быть переведены в полный анабиоз как при замораживании, так и при высушивании. Таким объектом могут быть сперматозоиды быка, которые не только сохраняются при низких температурах, но, как показали исследования [9], могут успешно высушиваться до очень низкого содержания воды с сохранением жизнеспособности.

Совместное участие ксеробиологии и криобиологии может стать плодотворным в решении ряда проблем общей биологии. В частности, при глубоком высушивании и охлаждении и достижении полного анабиоза создается возможность изучать жизнеспособные структуры в нефункционирующем состоянии.

1. Высочина Т. К. Содержание воды, калия и натрия в некоторых органах краснощекого суслика (*Citellus erythrogenus* Br.) в различные сезоны года и во время зимней спячки // Зимняя спячка и сезонные ритмы физиологических функций. — Новосибирск : Наука, 1971. — С. 205—221.
2. Голдовский А. М. Анабиоз. — Л. : Наука, 1981. — 136 с.
3. Голдовский А. М. Ксеробиология и ее отношение к эволюционной биохимии и физиологии / Журн. эволюц. биохим. и физиол. — 1984. — 20, № 3. — С. 233—238.
4. Голдовский А. М., Барсуков В. И. К познанию свойств жизнеспособных структур клеток // Цитология. — 1981. — 23, № 9. — С. 1088—1090.
5. Голдовский А. М., Иванова Е. В. Действие наркотиков и других органических веществ на выживаемость организмов в состоянии анабиоза и активной жизнедеятельности // Цитология. — 1983. — 25, № 8. — С. 981—984.
6. Голдовский А. М., Смоляк Ж. В. «Безводное» строение жизнеспособных структур клеток семян // Изв. высш. учебн. завед. Сер. Пищевая технология. — 1983. — № 5. — С. 115—116.
7. Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М. : Мир, 1983. — 352 с.

8. Ушатинская Р. С. Эколого-физиологическая приспособленность колорадского жука (*Leptinotera decemlineata* Say) к периодичности абиотических факторов внешней среды // Вопросы экологической физиологии беспозвоночных. — М. : Наука, 1973. — С. 5—44.
9. Larson E. V., Graham E. F. Fertility of freeze-dried bovine spermatozoa // VIIIth Intern. Congr. of Animal Reproduction and Artificial Insemination. — Cracow, — 1976. — P. 822—825.

Ленинградский ин-т
советской торговли
им. Ф. Энгельса

Поступила 31.03.86

УДК 611.018.3:612.592:616.001.19

Е. Я. Панков, С. В. Малышкина

ДЕСТРУКТИВНЫЕ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КОСТНОЙ И ХРЯЩЕВОЙ ТКАНЯХ ПРИ КРИОВОЗДЕЙСТВИИ

В ортопедии низкотемпературное воздействие использовалось прежде всего для получения крионекроза опухолей (гигантоклеточной, остеогенной саркомы) и опухолеподобных образований (фиброзной дисплазии). Возможности более широкого применения низких температур ограничиваются отсутствием данных об особенностях реакции хрящевой и костной тканей на криовоздействие, в частности о состоянии как клеточных элементов, так и компонентов межклеточного вещества.

Результаты проведенных экспериментальных исследований по криовоздействию на тазобедренный и локтевой суставы кролика, а также имеющиеся в доступной литературе сведения по низкотемпературному воздействию на кость и хрящ позволили сделать некоторые выводы, касающиеся особенностей выраженности наблюдаемой реакции в этих тканях. Деструкция костной ткани при низкотемпературном воздействии происходит в результате как механического действия на мембраны клеток образовавшихся кристаллов льда, так и повышения концентрации вне- и внутриклеточных электролитов. Совокупность действия факторов приводит к изменению липопротеиновых комплексов мембранных структур клеток [13]. В связи с этим температурно-временные параметры криовоздействия, в частности уровень используемых температур, оказывают существенное влияние на степень выраженности реакции костной ткани на данное воздействие. Однако по вопросам динамики изменения клеток и минерализованного матрикса кости при действии низких температур среди исследователей нет единого мнения. Так, показано [8], что возникновение некроза костной ткани наблюдалось уже при снижении температуры до 0 °C в течение 5 мин, а в работе [11] получили некроз костной ткани и клеток костного мозга только после 5-минутного воздействия температуры —60 °C. Прямое действие жидкого азота на вертлуг заднего бедра кролика в течение 10 мин (температура на границе зоны замораживания —20 °C) приводило через 4 недели к тяжелым некротическим изменениям в кости и пластинке роста [10]. В то же время действие на костную ткань температуры —196 °C на протяжении 10 мин вызывало образование зоны некроза, однако с течением времени отчетливо наблюдалось замещение участка некроза новообразованной тканью, что подтверждалось рентгенологически и гистологически [9].

Из приведенного видно, что немалую роль в распространенности криодеструктивных изменений в костной ткани играет и временной фактор. Так, показано [1], что при действии температуры около —75 °C в течение 1 мин на опухолевую ткань в кости был получен очаг криодеструкции радиусом 7 мм, а при увеличении времени воздействия до 3 мин зона деструктивных изменений достигала в радиусе 15 мм. Однако необходимо отметить, что независимо от используемой температуры и времени воздействия (даже при нескольких циклах замораживания) полученная после оттаивания зона крио-

некроза имеет четкие границы и всегда меньше зоны замораживания (около 50—60 % всей замораживаемой области) [6]. Изменения в зоне некроза связаны в первую очередь с деструктивными нарушениями в клетках (пикнозом) или фрагментацией ядра, лизисом клеточной и ядерной мембраны, дезорганизацией и вакуолизацией цитоплазмы, разрушением мембранных структур цитоплазмы [7]. Повреждений элементов межклеточного вещества — коллагеновых волокон — не отмечено [1]. Показана более высокая криочувствительность клеток кости по сравнению с элементами межклеточного вещества при использовании довольно широкого диапазона температур (от -50°C до -196°C) [11]. Проведенные нами эксперименты по низкотемпературному воздействию на трубчатую кость также выявили прежде всего выраженные деструктивные изменения в клетках надкостницы и остеocyтах



Рис. 1. Участок суставного хряща кролика после орошения тазобедренного сустава парожидкостной струей азота в течение 8 с (1-е сутки); окраска гематоксилином и эозином ($\times 70$): а) защищенная теплоизоляционной прокладкой зона хряща; б) участок хряща, подвергнутый криовоздействию — неравномерно окрашенный матрикс, резко пикнотичные ядра хондроцитов

компактной кости. Следовательно, деструкция костной ткани независимо от температурного и временного факторов выявляется прежде всего в изменении состояния клеток, а именно — ее мембранных структур. Компоненты минерализованного костного матрикса являются более устойчивыми к воздействию низких температур.

Репаративные процессы в кости начинаются со стороны неповрежденной ткани. Девитализированная кость подвергается остеокластической резорбции и замещается вновь образованной костной тканью, по своей гистоархитектонике не отличающейся от обычной [5]. Стадии репаративной регенерации кости после криовоздействия несколько запаздывают по сравнению с посттравматической регенерацией. Показано также, что как при периостальном, так и при интрамедуллярном замораживании кости явления репаративных изменений четко выражены уже после 4 недель, причем в периосте они начинались с 4-й недели, а в эндосте — с 5-й. В компактной кости процессы репарации проходили более медленно, но отмеченная направленность сохранялась — девитализированная кость замещалась незрелой костной тканью, а затем полностью трансформировалась в компактную кость.

Повреждающее действие холода на хрящевую ткань также связано с механическим действием кристаллов льда, нарушением осмотического соотношения между экстра- и эндоцеллюлярными жидкостями, изменением pH среды и денатурацией липопротеиновых комплексов. Эти явления оказывают деструктивное воздействие в первую очередь на клетки хрящевой ткани. Зона некротических изменений в хряще, как и в кости, всегда четко отграничена (рис. 1), меньше участка замораживания и зависит от температурно-временных параметров. Так, показано [14], что при температурах -50°C и -196°C наблюдался тотальный некроз хрящевых клеток на участке контакта с криозондом, а при температурах от -10°C до -30°C отмечался некроз только группы или даже единиц клеток. При воздействии температуры -196°C гибель клеток наблюдалась через 1 день, а при -50°C — через 20 дней. Деструктивные изменения в клетках при криовоздействии на хрящ обнаруживались уже через несколько часов. Они затрагивали как ядро, так и цитоплазму и были связаны с пикнозом и фрагментацией ядра, разрушением ядерной и цитоплазматической мембраны, вакуолизацией цитоплазмы, повреждением цистерн эндоплазматического ретику-

лума и канальцев аппарата Гольджи. Необходимо отметить, что подобные изменения хрящевых клеток были отмечены и для других типов хряща (волокнистого, эластичного) [12], причем степень деструктивных повреждений в клетках зависела от температуры, времени воздействия, а также от расстояния до источника криовоздействия. В зоне некроза при обработке суставного хряща парами азота лакуны хондроцитов были пустые [3]. Однако рядом с участками, где наблюдались некротические клетки, обнаруживался неизменный хрящ. При электронномикроскопическом исследовании выяснилось, что непосредственный контакт хладагента с биологической тканью, в данном случае суставным хрящом, приводит к полной деструкции клеток и лизису клеточных органоидов, а в участках хряща, расположенных глубже (по отношению к источнику криовоздействия), преимущественными повреждениями были дистрофические, связанные с умеренным пикнозом ядра, частичной конденсацией цитоплазмы и разрушением отдельных органоидов клетки [3]. Различия в деструктивных изменениях связаны с неодинаковой температурой, действовавшей на клетки, поскольку температура у наконечника распылителя была в пределах -196°C , а на границе крионекроза она составила около $-20 \div -21^{\circ}\text{C}$ [14].

Нарушения в межклеточном веществе были отмечены лишь отдельными авторами [8], показавшими уменьшение интенсивности окраски на гликозаминогликаны (ГАГ), а также набухание коллагеновых волокон в зоне криовоздействия. Именно устойчивостью гликопротеинов и коллагеносвязующих полисахаридных молекул объяснялась сохранность коллагенового каркаса после криовоздействия.

Учитывая тот факт, что костная и хрящевая ткани отличаются от других значительным преобладанием сложноорганизованного межклеточного вещества, играющего важную роль в функционировании хряща, целесообразно и перспективно изучение состояния макромолекул хрящевого матрикса. При анализе макромолекулярной организации межклеточного вещества хрящевой ткани информативным является топо-оптический анализ, позволяющий охарактеризовать суммарную рефракцию матрикса, а также проанализировать ориентационную упорядоченность макромолекул (ГАГ, коллагеновых и неколлагеновых белков и гликопротеинов) по степени их рефракции в специальных гистохимических реакциях. Показано [3], что низкотемпературное воздействие изменяет суммарную рефракцию макромолекул межклеточного вещества, причем в зависимости от продолжительности и температуры криовоздействия может изменяться не только молекулярный компонент рефракции, но происходят и глубокие нарушения текстурной составляющей, что выражается в более поздние сроки наблюдения в деструктивных изменениях хрящевого матрикса, отмечаемых в световом микроскопе. Изменение суммарной рефракции межклеточного вещества может быть обусловлено нарушением ориентационной упорядоченности даже отдельных макромолекул матрикса. Необходимо отметить, что степень выраженности этих изменений различна и зависит от продолжительности криовоздействия, температуры и типа макромолекул. Самым значительным изменениям подвержены молекулы ГАГ, причем независимо от температуры и времени воздействия в зоне некроза (1 сутки наблюдения) двулучепреломление ГАГ отсутствовало, что свидетельствовало о полной дезориентации этих макромолекул в структуре протеогликановых комплексов. В участках, отдаленных от источника криовоздействия (зоны некроза), метакромазия была ярко выражена, однако рефракция суммарных ГАГ снижена по сравнению с контролем. Установлено, что нарушение ориентационной упорядоченности хондроитинсульфатов происходит в большей степени и в более ранний период, чем кератансульфатов. В репаративной стадии степень рефракции кератансульфатов по сравнению с хондроитинсульфатами повышалась интенсивнее и достигла более высоких значений, чем в контроле, причем при непревышающих контрольные значения рефракции суммарных ГАГ (рис. 2). Эти данные указывают на то, что при низкотемпературном воздействии происходит перераспределение сульфатированных форм ГАГ

в сторону увеличения содержания кератансульфатов. При этом наблюдается несвойственное норме накопление их в территориальном клеточном матриксе, особенно выраженное при продолжительном криовоздействии. Изменения в состоянии ГАГ и отношении их форм отрицательно сказываются на гидрофильных свойствах хряща и усугубляют развивающиеся деструктивные изменения в нем, приводя к фибрилляции поверхности хряща, появлению трещин и кист. Низкотемпературное воздействие вызывает изменение ориентационной упорядоченности и других макромолекул межклеточного вещества, однако эта перестройка выражена в меньшей степени. Минимальные нарушения ориентационной упорядоченности отмечены у белковых молекул, а среди них — у неколлагеновых белков, причем изменение их степени рефракции отмечалось в более поздние сроки наблюдения, чем ГАГ и гликопротеинов. Проведенные топо-оптические исследования



Рис. 2. Суставной хрящ кролика после орошения парожидкостной струей азота в течение 8 с (360-е сутки). Участок молодой хрящевой ткани (а) среди некротизированного хряща. Окраска гематоксилином и эозином (x70)

позволили установить, что нарушение состояния гликопротеиновых молекул при криовоздействии в большей степени зависит от полисахаридного компонента.

Следовательно, деструктивно-дистрофические изменения в суставном хряще при криовоздействии связаны с деструктивными нарушениями как в клетках, так и в межклеточном веществе. Сложно организованная система хрящевого матрикса так же, как и клетка, быстро реагирует на низкотемпературное воздействие, отвечая на него в начальном периоде нарушением ориентационной упорядоченности отдельных макромолекул, а затем дезорганизацией протеогликановых комплексов и изменением макромолекулярной структуры межклеточного вещества, что приводит к дестабилизации взаимосвязанной системы «клетка — межклеточное вещество». Более высокая устойчивость к криовоздействию белковых компонентов межклеточного вещества и сохранность части клеток в хряще позволяют ему на определенном этапе развития деструктивно-дистрофического процесса сохранить свои

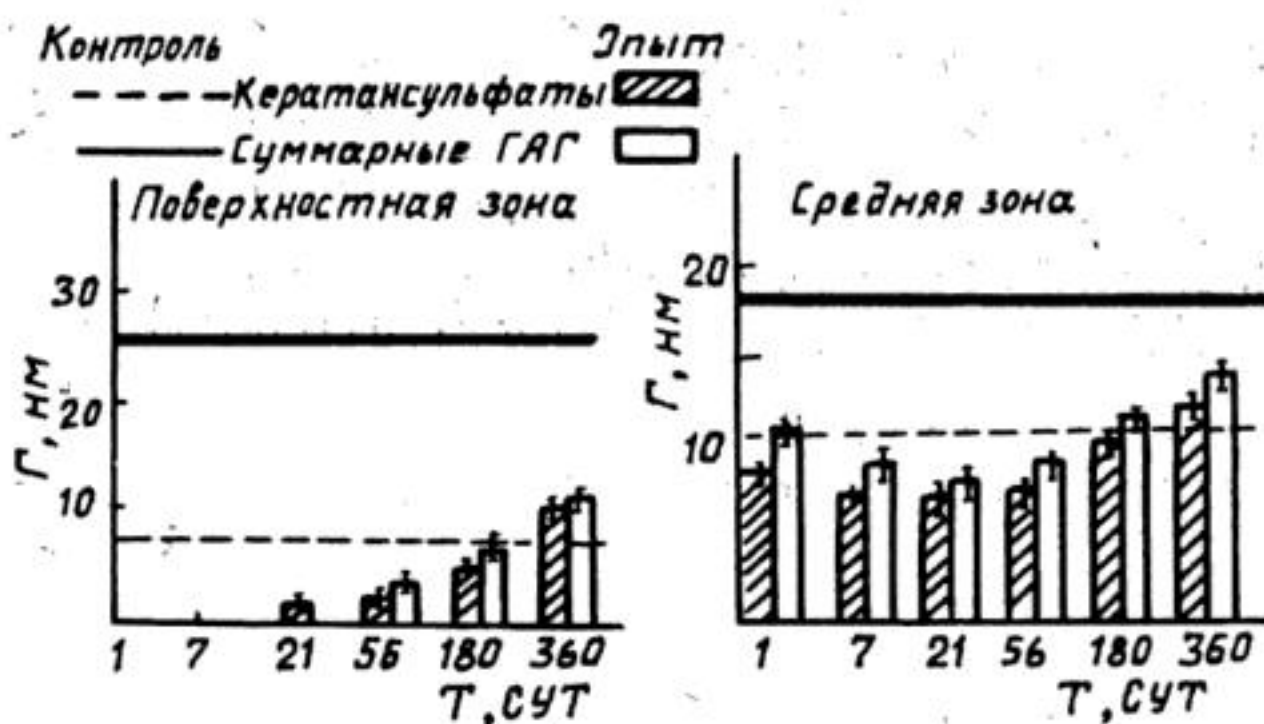
морфо-функциональные характеристики. Существенной особенностью развития деструктивных поражений в хряще является то, что после низкотемпературного воздействия не наблюдалось отторжения суставного хряща от кости, хотя криодеструкция в нем всегда была более выражена, чем в костной ткани.

Репаративный процесс в хряще после криовоздействия развивается с определенными особенностями в зависимости от состояния пограничной костной пластинки. При ее сохранности репаративные изменения в суставном хряще связаны с активацией биосинтетических процессов в хондроцитах, а также с пролиферацией их в изогенные группы. Однако в силу своеобразия морфологического строения гиалинового хряща, а именно — наличия плотного межклеточного вещества, пролиферирующие хондроциты не могут мигрировать, и поэтому в хряще сохраняется нарушение цитоархитектоники (бесклеточные участки). При электронномикроскопическом исследовании места погибших хондроцитов не определяются. Это может быть связано с тем, что макромолекулы межклеточного вещества, вновь синтезируемые сохранившимися хондроцитами, мигрировали в интерцеллюлярный матрикс, где происходило новообразование коллагеновых фибрилл. Самосборка молекул коллагена в фибриллы возможна не только на клеточной поверхности, но и в местах, где есть соответствующий молекулярный состав. Рас

стояние от клетки до места сборки коллагеновых фибрилл не имеет большого значения, по сравнению с количественным составом предсуществующего матрикса и концентрации в нем необходимых молекул [4]. Установленное нами в стадии регенерации повышение степени рефракции ГАГ и гликопротеинов до близких к контрольным величин в более ранние сроки наблюдения, чем для коллагена, свидетельствуют о том, что молекулярный состав интертерриториального матрикса может служить субстратом для самосборки коллагеновых фибрилл.

При нарушении пограничной костной пластинки деструктивный процесс распространяется и на субхондральную кость, приводя к гибели клеток костного мозга, некрозу остецитов костных балочек, прилежащих к зоне криовоздействия. В суставном хряще при этом наблюдаются глубокие нарушения ориентационной упорядоченности макромолекул, что вызывает дезорганизацию протеогликановых комплексов и всей макромолекулярной структуры хрящевого матрикса. При данной направленности деструктивно-дистрофического процесса репарация хряща осуществляется как за счет со-

Рис. 3. Изменение структурной рефракции суммарных ГАГ и кератансульфатов в суставном хряще кролика после орошения сустава парожидкостной струей азота в течение 8 с



хранившихся хондроцитов, так и за счет периваскулярных клеток костных каналов, открывшихся в деструктивно измененный суставной хрящ. Периваскулярные клетки пролиферируют, заполняя участки некротически измененного хряща. Вокруг таких клеток формируется хрящевой матрикс, характеризующийся наличием сульфатированных форм ГАГ. Однако репаративные изменения не компенсируют наблюдаемых деструктивных нарушений в суставном хряще (рис. 3).

Таким образом, при низкотемпературном воздействии на кость и суставной хрящ деструктивные изменения развиваются в локальном участке, четко ограниченном от неповрежденной ткани переходной зоной. Увеличение времени криовоздействия и снижение температуры приводят к расширению участка деструкции, однако зона некроза всегда меньше участка замораживания. Одним из механизмов криодеструкции хрящевой ткани является необратимое изменение ориентационной упорядоченности хондроитинсульфатов, что вызывает дезорганизацию протеогликановых комплексов и всей структуры межклеточного вещества и приводит к нарушению гомеостаза суставного хряща. Минерализованный матрикс кости является более устойчивым к криовоздействию, чем хрящевой. При низкотемпературном воздействии на суставной хрящ полной регенерации не наблюдается. В зависимости от продолжительности и температуры криовоздействия в репаративный процесс вовлекаются как хондроциты, так и периваскулярные клетки костных каналов.

1. Демичев Н. П., Гончарова Л. А., Сабодашевский В. И. Криодеструкция и аллопластика в костной онкологии // Ортопед. и травм. (София). — 1982. — 19, № 1. — С. 3—10.
2. Ли Л. Н. Морфологические изменения межпозвоночных дисков в ранние сроки после криовоздействия // Ортопед., травм., протез., — 1978. — № 8. — С. 61—64.

3. Малышкина С. В. Морфогенез суставного хряща после криовоздействия // Закономерности морфогенеза опорных структур позвоночника и конечностей на различных этапах онтогенеза.— Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 1983.— С. 78—85.
4. Серов В. В., Шехтер Л. Б. Соединительная ткань.— М.: Медицина, 1981.— С. 312.
5. Скляренко Е. Т., Бруско А. Т., Юрченко А. П. Гистологические изменения в кости при криовоздействии // Механизмы криповреждений и криозащиты биологических структур.— Киев: Наук. думка, 1977.— С. 80—81.
6. Cummings C. Experimental observations of canine mandibular regeneration following segmental removal, freezing and reimplantation // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. (Suppl.).— 1978, N 59.— P. 87—91.
7. Ernst F. Pathophysiologische Besonderheiten der Kryochirurgie // Dt. Gesundh. — Wesen.— 1980.— 35, N 16.— S. 624—632.
8. Fisher A., Williams D., Bradley P. The effects of cryosurgery on the strength of bone // Brit. J. Oral. Surg.— 1978.— N 15.— P. 215—220.
9. Gill W. The evolution of cryosurgery // Md. State Med. J.— 1976.— 25, N 12.— P. 64—66.
10. Jacob K., Robert S. Determination of the influence of experimental local freezing on total femoral greater trochanteric apophyseal growth arrest // Cryobiology.— 1979.— 16, N 6.— P. 595—598.
11. Kerschbaumer F., Marcove C. Die Kryochirurgische Behandlung von Knochentumoren.— Stuttgart: Georg Thieme Verlag.— 1981.— S. 326.
12. Lowe C., Smith A. Isolation, freezing and storage of rabbit growth plate chondrocytes // Lab. Pract.— 1975.— 24, N 8.— P. 511—514.
13. Regling G. Cryogenic surgery for orthopedic possibilities of destruction through cold in bone tumors which are difficult to treat // Beitr. Orthop. Traumatol.— 1974.— 21, N 127.— P. 716—726.
14. Simon W., Lam I., Bellz R. Pathogenesis of degenerative joint disease produced by in vivo freezing of rabbit articular cartilage // Clin. Orthop. Relat. Res.— 1981.— 155, N 1.— P. 259—268.

Харьковский НИИ ортопедии
и травматологии имени проф. М. И. Ситенко

Поступила 14.05.86

УДК 57.043:577.352.4

А. Ю. Петренко

ИЗУЧЕНИЕ РЕПАРАЦИИ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТОГРЕВА

После замораживания-отогрева биологические свойства клеток могут частично восстанавливаться [3]. Биомембраны наиболее чувствительны к действию низких температур [1], однако механизм их репарации после отогрева до сих пор остается не выясненным. Установлено [2, 11], что ингибиторы окислительного фосфорилирования (2, 4-динитрофенол (2,4-ДНФ), цианид, азид, олигомицин) замедляют репарацию, что указывает, видимо, на участие митохондрий в реализации репаративных процессов в клетках. Принципиальная возможность восстановления функциональной активности изолированных митохондрий после замораживания до -196°C в среде без криопротекторов была показана Э. Рэкером [10] и В. В. Лемешко [4]. Целью настоящей работы явилось изучение репаративных возможностей изолированных митохондрий печени крыс после замораживания-отогрева.

Объектом исследования служили митохондрии, выделенные стандартным методом дифференциального центрифугирования из печени белых беспородных крыс массой 150—200 г в среде, содержащей 300 мМ сахарозы, 10 мМ трис- HCl (pH 7,4) и 0,5 мМ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА). Скорость дыхания определяли на полярографе LP-7e в 1 мл среды инкубации, содержащей 120 мМ сахарозы, 60 мМ KCl , 5 мМ MgCl_2 , 30 мМ трис- HCl , 10 мМ KH_2PO_4 (pH 7,4).

Быстрое замораживание суспензии митохондрий, хранящейся в среде выделения без ЭДТА на льду, проводили путем погружения полиэтиленовых ампул объемом 1 мл с суспензией в жидкий азот. Начальная скорость

охлаждения составляла 400—500 °С/мин. Отогрев проб осуществляли на водяной бане при 40 °С до 0 °С с начальной скоростью 500 °С/мин. Скорость замораживания и отогрева контролировали с помощью медь-константановой термопары.

Использовались реактивы фирмы «Союзреактив» марки «ХЧ» и «ОСЧ». Сахароза была перекристаллизована в бидистиллированной воде. Ротенон, *трис*-(оксиметил)-аминометан, аденозиндифосфат (АДФ), малат, хлор-метоксикарбонилцианидфенилгидразон (ХКЦФ) — фирмы «Серва» (ФРГ), сукцинат, глутамат — «Реанал» (ВНР).

Ранее было изучено влияние скоростей и сред замораживания-отогрева на эффективность окислительного фосфорилирования митохондрий [5]. Установлено, что наименее повреждающее действие на структурно-функциональное состояние митохондрий оказывает быстрое замораживание-быстрый отогрев, поэтому в настоящем исследовании опыты проводили с использованием этого режима криовоздействия.

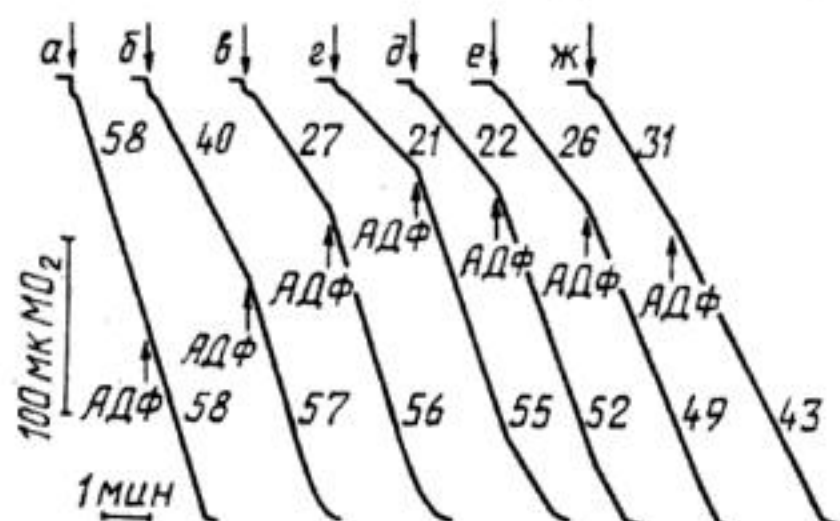


Рис. 1. Изменение скорости дыхания замороженно-отогретых митохондрий в зависимости от времени хранения густой суспензии при 20 °С после отогрева: а — 0, б — 10, в — 20, г — 30, д — 40, е — 50, ж — 60 мин. Субстрат — сукцинат. Стрелками отмечено внесение митохондрий

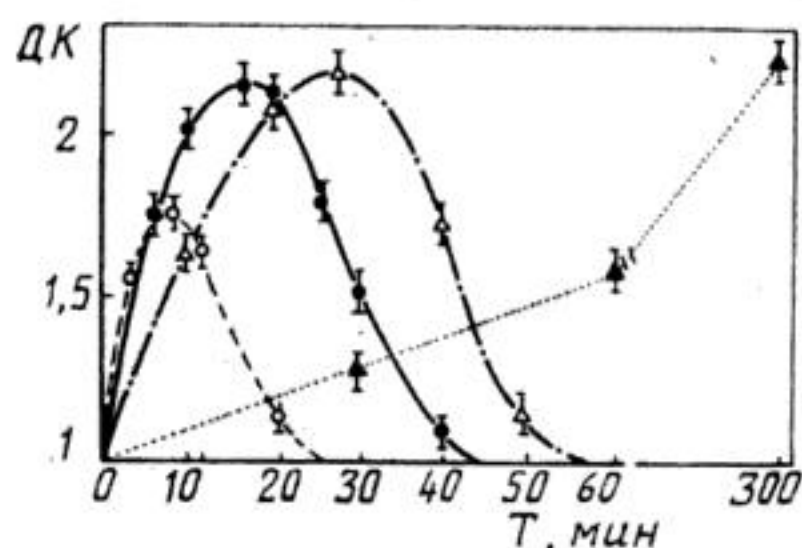


Рис. 2. Изменение величины дыхательного контроля (ДК) в замороженно-отогретых митохондриях в процессе хранения при температурах 0 (▲), 10 (△), 20 (●) и 37 °С (○)

В экспериментах установлено, что в процессе хранения при перемешивании суспензии митохондрий с концентрацией белка 40—50 мг/мл после замораживания-отогрева частично восстанавливается их способность к окислительному фосфорилированию. Из рис. 1 видно, что при перенесении митохондрий в среду инкубации с сукцинатом непосредственно после криовоздействия последующая добавка АДФ не стимулировала дыхание (то же можно сказать и о разобшителе). Однако уже через 5 мин хранения при 20 °С внесение АДФ увеличивало скорость потребления кислорода. В ходе дальнейшего хранения значения основных биоэнергетических показателей возрастали, в частности, величина дыхательного контроля (ДК) через 30 мин достигала 2,5.

Скорость восстановления функциональной активности замороженно-отогретых митохондрий зависит от температуры хранения суспензии после отогрева (рис. 2). Хранение митохондрий при 0 °С позволяет наблюдать максимальное значение величины ДК через 5 ч, а при температуре 20 °С — уже через 30 мин. Однако степень восстановления функциональной активности митохондрий оставалась практически одинаковой в температурном интервале 0—30 °С, хотя при температуре 37 °С максимальное значение ДК было достоверно ниже (рис. 2).

Из рис. 3 видно, что увеличение ДК во время хранения суспензии замороженно-отогретых митохондрий при 20 °С обусловлено снижением скорости дыхания в состоянии 2, что свидетельствует об уменьшении пассивной ионной проницаемости внутренней мембраны [7] и объясняется репарацией барьерных свойств мембран после низкотемпературного воздействия. Значения основных биоэнергетических параметров (ДК, АДФ/0) после достижения максимума быстро снижаются вследствие «вторичной» латентной индук-

ции ионного транспорта, приводящей к увеличению скорости дыхания в состоянии 2 и разобщению митохондрий. В исследовании [6] было установлено, что указанное выше «вторичное» разобщение связано с активацией процессов перекисного окисления и гидролиза мембранных липидов, поскольку присутствие в среде антиоксидантов, ингибиторов фосфолипаз

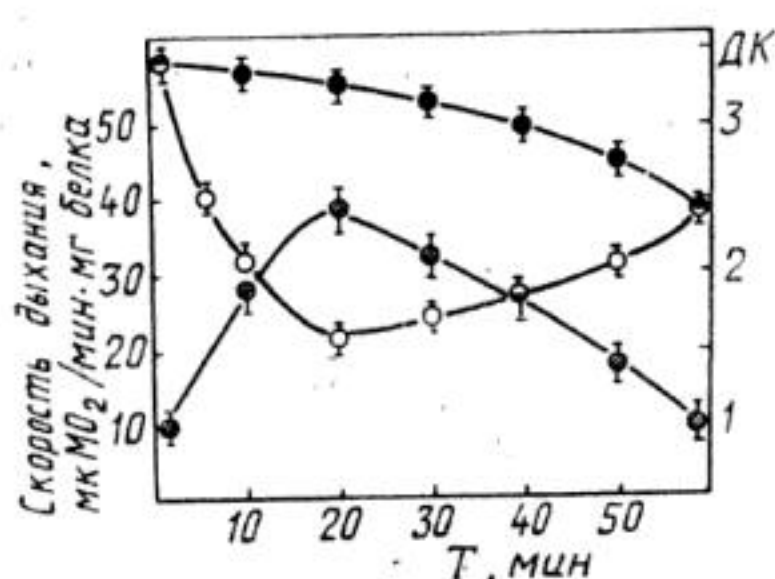


Рис. 3. Изменение скоростей дыхания в состояниях 2 (○) и 3 (●), а также величины дыхательного контроля (заштрихованные кружочки) в замороженно-отогретых митохондриях в зависимости от времени хранения густой суспензии при 20 °С после отогрева

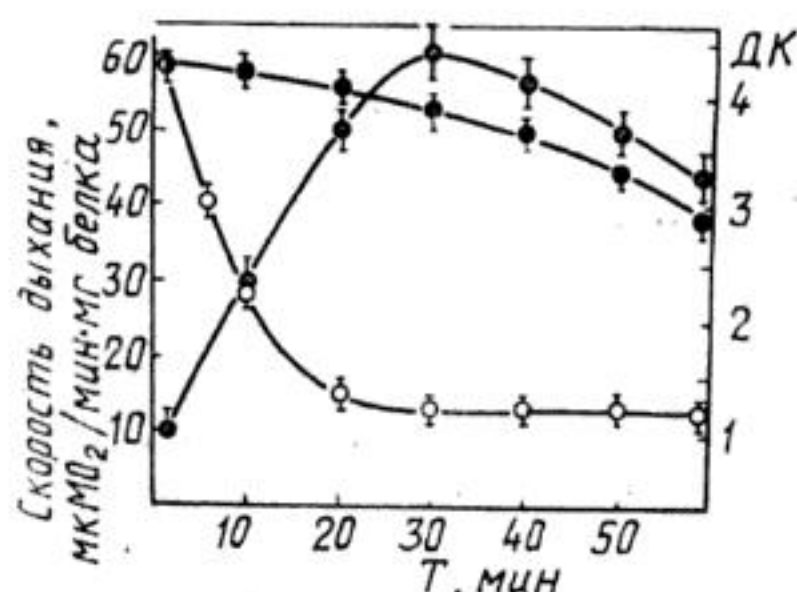


Рис. 4. Изменение величины дыхательного контроля (заштрихованные кружочки), а также скоростей дыхания в состояниях 2 (○) и 3 (●) в процессе хранения замороженно-отогретых митохондрий при 20 °С в присутствии НАД(Ф)-зависимых субстратов (5 мМ малата и 5 мМ глутамата) или 0,5 мМ ЭГТА

(местных анестетиков, комплексонов ионов кальция), НАД(Ф)-зависимых субстратов в равной степени подавляют эти реакции, и тем самым могут способствовать реализации процессов репарации. Действительно, из рис. 4 видно, что в присутствии НАД(Ф)-зависимых субстратов (малата и глутамата) или этиленгликоль-бис-

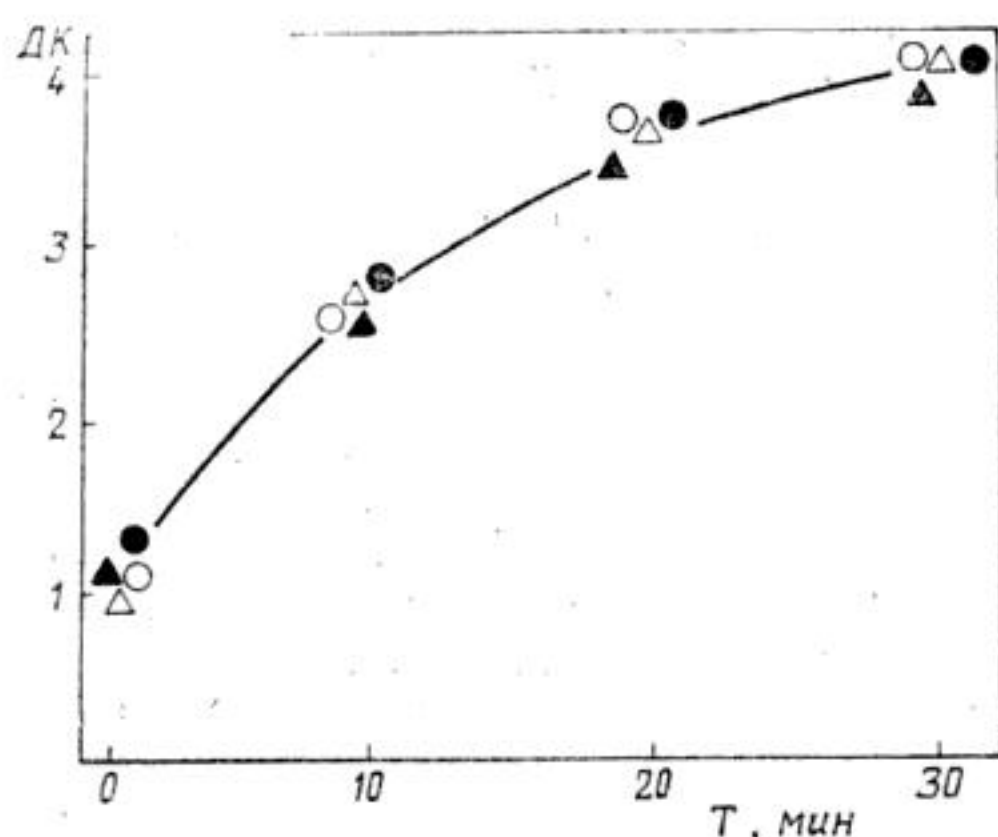


Рис. 5. Изменение величины дыхательного контроля (ДК) при хранении замороженно-отогретых митохондрий в присутствии 5 мМ малата и 5 мМ глутамата (○), 0,5 мМ АТФ (△), в анаэробных условиях (▲) и без воздействия (●). Субстрат — 5 мМ глутамата и 5 мМ малата. Температура хранения 20 °С

тетраацетата (ЭТГА) в среде хранения значение ДК достигает $4,5 \pm 0,2$ и составляет около 70% контрольного уровня. Вместе с тем действие НАД(Ф)-зависимых субстратов в этом случае не связано с работой системы окислительного фосфорилирования, поскольку оно сохраняется в присутствии ингибитора НАДН - дегидрогеназы - ротенона (субстратом дыхания в этом случае служит сукцинат).

Эффективность окислительного фосфорилирования в одинаковой степени возрастает при хранении митохондрий после замораживания-отогрева в присутствии или отсутствии АТФ, субстратов дыхания, кислорода (рис. 5).

Для изучения влияния мембранного потенциала на процесс репарации разведенную суспензию митохондрий (3—5 мг белка/мл) инкубировали в среде с малатом и глутаматом в присутствии или отсутствии разобщителя (2,4-ДНФ) при температуре 25 °С 15 мин при перемешивании и насыщении кислородом. Установлено, что в присутствии 100 мкмоль 2,4-ДНФ дыхание нативных митохондрий полностью разобщено в течение всей инкубации. За

время инкубации (без разобшителя) основные биоэнергетические показатели нативных митохондрий снижались (ДК — на 60 %, АДФ/О — на 42 %), а криповрежденных — увеличивались (табл.). Вместе с тем, после двукратной промывки в среде выделения значения ДК и АДФ/О нативных и замороженно-отогретых митохондрий не зависели от присутствия разобшителя в среде инкубации. При этом эффективность окислительного фосфорилирования репарированных митохондрий мало отличалась от нативных, преинкубированных с 2,4-ДНФ. Достоверное увеличение ДК, наблюдаемое после промывки криповрежденных митохондрий, объясняется, видимо, удалением наиболее поврежденных органелл (табл. 1).

Таблица. Влияние разобшителя на функциональную активность митохондрий, подвергнутых замораживанию-отогреву ($n = 5$)

Условия эксперимента	Контроль		Замораживание-отогрев	
	ДК	АДФ/О	ДК	АДФ/О
До инкубации	$7,12 \pm 0,44$	$2,69 \pm 0,15$	$0,95 \pm 0,20$	—
После инкубации	$4,43 \pm 0,21$	$1,90 \pm 0,09$	$2,61 \pm 0,08$	$1,31 \pm 0,03$
После инкубации и промывки	$4,74 \pm 0,28$	$1,84 \pm 0,09$	$3,68 \pm 0,18$	$1,47 \pm 5,09$
После инкубации с 2,4-ДНФ и промывки	$4,29 \pm 0,26$	$1,47 \pm 0,08$	$3,71 \pm 0,36$	$1,24 \pm 0,08$

При хранении на льду скорость восстановления функциональной активности митохондрий увеличивается в присутствии хлорпромазина (рис. 6). В присутствии 135 мкмоль этого вещества максимальное значение ДК было зарегистрировано через 2 ч, а в его отсутствие — через 5 ч. Однако более высокие концентрации хлорпромазина ингибировали эффективность окислительного фосфорилирования.

В работе показано, что использование быстрого замораживания-быстрого отогрева не позволяет сохранить барьерные свойства внутренней митохондриальной мембраны, и после отогрева она становится аномально проницаемой для ионов, что приводит к разобщению окислительного фосфорилирования. В системе *in vitro* репаративные процессы не могут полностью проявиться вследствие активации реакций липидного обмена. Ранее было показано [6], что активация перекисного окисления и связанного с ним гидролиза мембранных липидов после быстрого замораживания-быстрого отогрева является не прямым следствием действия низких температур, а развивается после отогрева в условиях высокой ионной проницаемости мембран. Это приводит к изменению метаболического равновесия: быстрому исчерпанию восстановительных эквивалентов, в частности, окислению пиридиновых нуклеотидов. Введение в среду хранения НАД(Ф)-зависимых субстратов или ингибиторов мембранных фосфолипаз позволяет до 70 % восстановить функциональную активность митохондрий (рис. 4). Однако в митохондриях отсутствует весь набор ферментов, необходимых для синтеза липидов *de novo*. Поскольку они присутствуют в клетке, то следует полагать,

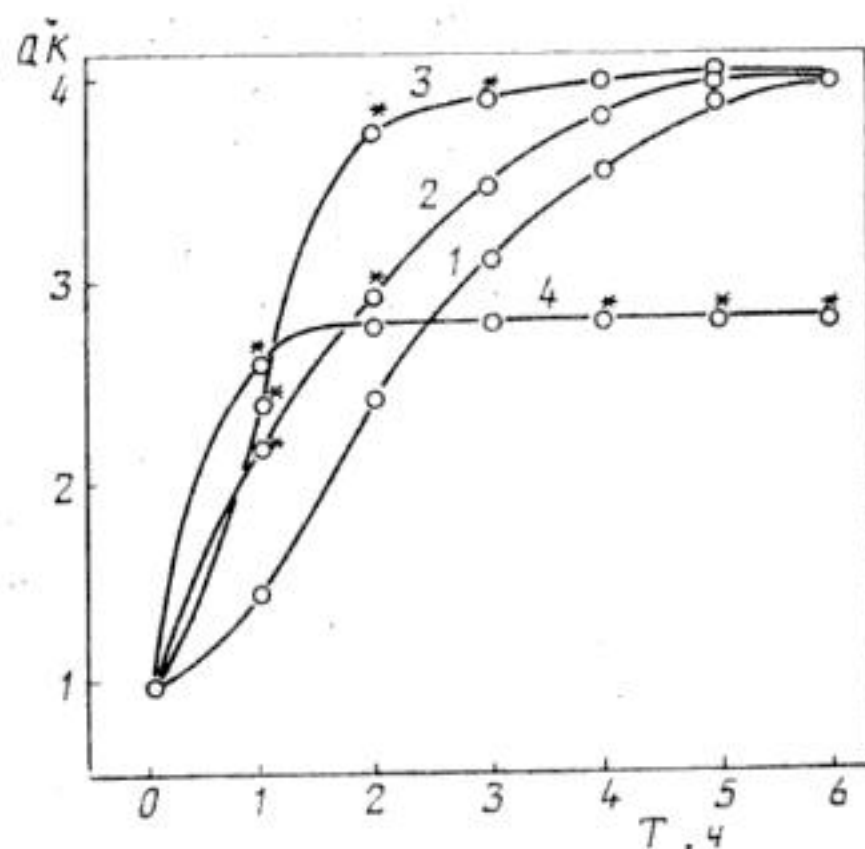


Рис. 6. Изменение величины дыхательного контроля при хранении замороженно-отогретых митохондрий при 0 °С в отсутствие (1) или присутствии 50 (2), 135 (3) или 270 (4) мкмоль хлорпромазина. Субстрат — 5 мМ малата и 5 мМ глутамата; * — различия по отношению к контролю (1) достоверны ($P < 0,05$)

что репаративные процессы в митохондриях *in vivo* могут протекать еще более полно.

При этом имеет существенное значение вопрос о том, является ли репарация мембран метаболически активным процессом, либо она носит «чисто термодинамический характер». Результаты исследований этого вопроса достаточно противоречивы, а их трактовка сложна. Сообщается, что в репарации мембран принимают участие процессы, связанные с синтезом РНК, ДНК и белка [8, 11, 12], однако не ясно, лимитируют ли они восстановление барьерных свойств мембран, поскольку специфические ингибиторы этих процессов (руфамицин, гидроксимочевина, хлорамфеникол, пурамицин) практически не влияют на скорость репарации. Вместе с тем ингибитор синтеза липидов — церуленин — предотвращал репарацию мембран *E. coli* после их охлаждения до -196°C [2]. Полагают, что ликвидация мембранных дефектов после замораживания-отогрева происходит за счет синтеза фосфолипидов, требующего затраты энергии. Видимо, этим объясняется экспериментальный факт быстрой утилизации экзогенного АТФ во время репарации клеток [11].

Процесс репарации митохондрий не зависит от степени восстановленности ферментов дыхательной цепи, не требует АТФ и кислорода (рис. 5). В то же время не исключено, что для реализации репаративных процессов достаточно небольших значений мембранного потенциала, которые могут сохраняться при отсутствии экзогенных субстратов и кислорода. Опыты с разобщителем показали, что процесс репарации реализуется в полной мере при деэнергизации системы (табл.).

Проведенные исследования позволяют сделать вывод, что репарация мембран митохондрий после замораживания-отогрева не является энергозависимым процессом и, очевидно, обусловлена спонтанным «замыканием» трансмембранных дефектов, образующихся в ходе криовоздействия. В пользу этого заключения свидетельствуют данные об ускорении репарации в присутствии хлорпромазина, одним из механизмов действия которого является увеличение текучести липидного бислоя, способствующее, в частности, «замыканию» теней эритроцитов после действия низких температур [9].

Роль показанного в работе спонтанного восстановления функции митохондрии в клетке может быть достаточно значительной. В условиях разобщенного дыхания, наблюдаемого в начальный момент времени после отогрева, АТФ, необходимый для репарации клетки, может быть получен в процессе гликолиза. Так, например, установлено, что ингибирование гликолиза тормозит репарацию клеток [2]. В то же время гликолиз не в состоянии обеспечить клетку энергией в течение длительного времени. Можно предположить, что по мере восстановления функциональной активности митохондрий, их вклад в общую энергопродукцию клетки увеличивается. В пользу этого предположения свидетельствуют различия во времени репарации митохондрий и клеток млекопитающих. Если максимальное восстановление функции митохондрий в условиях, близких к физиологическим, наблюдается через 10—15 мин, то репарация фибробластов продолжается в течение 3 ч [8].

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев : Наук. думка, 1982. — 255 с.
2. Игнатъев С. Г., Андреева О. В., Евдокимова О. А. и др. Изучение репарации повреждений мембранного аппарата, вызванных низкотемпературным замораживанием клеток *E. coli* // Биохимия. — 1982. — 47, № 10. — С. 1621—1628.
3. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под общ. ред. А. А. Цуцаевой. — Киев : Наук. думка, 1983. — 240 с.
4. Лемешко В. В. Влияние различных режимов замораживания и криопротекторов (ПЭО-400 и глицерина) на митохондрии печени крыс : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1973. — 25 с.
5. Петренко А. Ю., Белоус А. М., Лемешко В. В. Влияние скорости замораживания и отогрева на функциональное состояние и ионную проницаемость митохондрий печени крыс // Биохимия. — 1982. — 47, № 4, С. 626—632.

6. Петренко А. Ю., Белоус А. М., Моршанский В. Н. и др. Роль липолиза и перекисного окисления липидов в индукции ионного транспорта митохондрий после замораживания-оттаивания // Укр. биохим. журн.— 1984.— 56,— С. 656—660.
7. Groen A. K., Wanders R. J. A., Westerhoff H. V. Quantification on the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration // J. Biol. Chem.— 1982.— 257, N 6.— P. 2754—2757.
8. Law P., Lepock J. R., Kruuv J. Effect of temperature and protein synthesis inhibitors on repair of sublethal freeze-thaw damage in mammalian cells // CRYO-Lett.— 1980.— 1, N 10.— P. 324—336.
9. Lieber E. M. R., Speck T. L. Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts // J. Biol. Chem.— 1982.— 257, N 19.— P. 11660—11679.
10. Racker E., Hostman L. L. Mechanism and control of oxidative phosphorylation // Energy metabolism and the regulation of metabolic processes in mitochondria (Ed. M. A. Mehلمان, R. W. Hanson).— New. York, London: Academic Press, 1972.— P. 1—26.
11. Ray B., Speck M. L. Metabolic process during the repair of freeze-injury in *Escherichia coli* // Applied Microbiol.— 1973.— 24, N 4.— P. 585—590.
12. Tomlins R. I., Ordae Z. J. Requirements of *Salmonella typhimurium* for recovery from thermal injury // J. Bacteriol.— 1971.— 105, N 2.— P. 512—518.

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

Поступила 22.01.86

УДК 616—089.583.29—015.1 : 616.591 : 577.3] : 599.323.4

А. Ф. Суханов, О. Д. Мяделец

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ЭПИДЕРМИСА БЕЛЫХ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ОБЩЕЙ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ И В ПОСТГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ

Кожа является пограничным органом и первой испытывает на себе влияние экстремальных факторов внешней среды. Одним из раздражителей, с которыми организму животных приходилось встречаться с древних времен и вырабатывать против него защитные механизмы, является холодовый фактор. Несмотря на это, влияние низких температур на кожу изучено недостаточно и продолжает интересовать исследователей [2, 4, 6]. В этих работах изучалось либо влияние на кожу местного холодового воздействия [2, 4], либо исследованию подвергалась кожа животных, длительно адаптированных к низкой температуре внешней среды [6]. О влиянии на гистохимию эпидермиса общей глубокой гипотермии сведения в литературе отсутствуют. Целью настоящего исследования явилось изучение изменений активности некоторых ферментов энергетического обмена эпидермиса белых крыс разного возраста в условиях воздействия на организм общей глубокой гипотермии и в разные сроки после нее.

Были выполнены три серии экспериментов на 190 белых крысах обоего пола: возраст животных первой серии — 16 сут (неполовозрелые), второй серии — 120 сут (половозрелые), третьей — 2 года (старые). Состояние общей глубокой гипотермии вызывали по методу В. А. Борисова и Б. С. Базеко [1]. После наркотизации эфиром крыс охлаждали в ванночке со смесью вода-лед до ректальной температуры 18 °С со скоростью 1 °С за 3—5 мин, а затем согревали с той же скоростью до температуры тела 37 °С. Животных первой и второй серии экспериментов декапитировали на глубине охлаждения организма, сразу после согревания, через 6, 24 ч, 3, 7, 30 и 60 сут после эксперимента, животных третьей серии — на глубине охлаждения, через 6, 24 ч, 3, 7, 30 сут после эксперимента. Контролем являлись интактные крысы, причем для первой серии опытов использовали несколько групп контрольных животных, которых забивали в том же возрасте, что и экспериментальных. Кожу межлопаточной области замораживали в жидком азоте и готовили криостатные срезы. Общепринятыми методами выявляли активность следующих ферментов эпидермиса: кислой фосфомоноэстеразы (КФ), НАДН- и НАДФН-тетразолийредуктаз (ТР), сукцинат- и лактатдегидрогеназ (СДГ, ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6Ф-ДГ) и альфанафтилацетатэстеразы (α-НАЭ). Активность НАДФН-ТР и Г6Ф-ДГ оценивали отдельно в ростковом и зернистом слоях в связи с тем, что она представлена в обоих этих слоях, причем в неодинаковой степени [5]. Активность остальных ферментов оценивали только

в ростковом слое. В каждом случае изучали по 100 клеток, содержание ферментов в которых выражали в баллах по общепринятой пятибалльной системе, а затем выводили 1 средний цифровой показатель на одну клетку. Полученные цифровые данные подвергали статистической обработке методом непараметрической статистики (критерий *U* Вилконсона-Манна-Уитни). Достоверность изменений активности ферментов в каждой серии опытов определяли как по отношению к контролю, так и по отношению к предыдущему сроку.

В табл. 1 представлена динамика активности изученных ферментов эпидермиса при гипотермии и в постгипотермическом периоде у неполовозрелых крыс. Из таблицы видно, что холодовое воздействие на активность ферментов существенно не влияло. На глубине охлаждения достоверно изменялось лишь содержание Г6Ф-ДГ (снижение в ростковом и зернистом слоях), КФ и α -НАЭ (увеличение). В постгипотермическом периоде активность Г6Ф-ДГ быстро (в течение 24 ч) восстанавливалась, а затем достоверно возрастала на 3-и — 7-е сут постгипотермического периода. Содержание КФ было увеличено в течение 6 ч после эксперимента, а затем достоверно от контроля не отличалось. Увеличение активности α -НАЭ сохранялось дольше — в течение 7 сут после гипотермии и на 30-е сут. В постгипотермическом периоде увеличивалась также активность СДГ и ЛДГ. Для ЛДГ это увеличение сохранялось в течение 1 сут после гипотермии, а содержание СДГ, кроме того, увеличивалось через 7 сут после нее. Активность редуктаз при гипотермии в постгипотермическом периоде не претерпевала заметных изменений.

Таблица 1. Влияние общей глубокой гипотермии на активность ферментов эпидермиса неполовозрелых крыс, условные единицы

Показатели		Гипотермия и постгипотермический период														
		Конт. 16 сут	18 °С	37 °С	6 ч	24 ч	Конт. 19 сут	3 сут	Конт. 23 сут	7 сут	Конт. 31 сут	15 сут	Конт. 46 сут	30 сут	Конт. 76 сут	60 сут
НАДН-ТР		3,1	3,2	3,5	3,3	3,4	3,4	3,3	3,4	3,5	3,3	3,0	3,6	3,5	3,3	3,4
	Ростко- вый слой	2,3	2,4	2,4	2,2	2,4	2,6	2,8	2,6	3,0	2,3	2,5	2,5	2,8	2,7	2,9
НАДФН-ТР	Зерни- стый слой	2,8	2,8	2,8	2,9	3,0	3,0	3,1	3,0	3,2	3,1	3,0	3,0	3,2	3,1	3,1
	Ростковый слой	2,0	1,5 ^x	1,4 ^x	1,8	2,0	2,0	2,4	1,8	2,1	1,9	2,0	2,3	2,3	1,9	1,9
Г6Ф-ДГ	Зернистый слой	2,8	1,9 ^x	1,9 ^x	2,0 ^x	2,4	2,2	2,8 ^x	2,0	2,8 ^x	2,5	2,3	3,2	2,9	2,5	2,4
ЛДГ		1,2	1,4	2,2 ^x	2,2 ^x	2,5 ^x	1,4	1,6	1,9	2,1	2,0	2,1	1,9	1,9	1,4	1,5
СДГ		0,3	0,5	0,8 ^x	0,7 ^x	1,2 ^x	0,4	0,7	1,5	2,1	1,3	1,3	1,2	1,4	1,7	1,8
КФ		0,2	0,6 ^x	1,1 ^x	0,8 ^x	0,5	0,7	0,9	1,3	1,1	0,7	0,6	1,5	1,9	1,8	1,9
α-НАЭ		0,2	0,3 ^x	0,8 ^x	0,9 ^x	1,1 ^x	0,5	1,1 ^x	1,2	1,6 ^x	1,2	1,1	1,0	1,7 ^x	1,3	1,6

Примечание: ^x — достоверно по отношению к соответствующему контролю, $P < 0,05$; ^{*} — достоверно по отношению к предыдущему сроку, $P < 0,05$.

Таким образом, у неполовозрелых животных общая глубокая гипотермия не вызвала выраженных изменений активности изученных ферментов эпидермиса. В связи с этим следует привести данные Н. Н. Сиротинина [9], из которых следует, что неполовозрелые животные гораздо легче, чем половозрелые, переносят общую глубокую гипотермию. У них наблюдается своеобразная гипореактивность по отношению к холоду наряду с более высокой резистентностью к нему. Возможно, этим объясняется отсутствие выраженного снижения активности изученных ферментов эпидермиса на глубине охлаждения. Увеличение активности КФ и α -НАЭ при этом может свидетельствовать о происходящих перестройках метаболизма эпидермоцитов.

Каждый достаточно сильный экстремальный фактор вызывает в организме формирование так называемого системного структурного следа адаптации [7] — увеличение мощности систем, ответственных за адаптацию к этому фактору. При этом также активизируются различные ферментные системы, что способствует увеличению интенсивности функционирования структур (ИФС) [7]. Известно также, что степень выраженности ответной реакции на раздражитель пропорциональна величине его возмущающего действия [3]. В связи с незначительными изменениями на глубине охлаждения системный структурный след у половозрелых крыс выражен нерезко. Мы не нашли также у этих животных заметного увеличения митотической активности [8] — стереотипной реакции на различные экстремальные воздействия [5]. Однако определенный объем адаптивных перестроек в эпидермисе половозрелых крыс имеется и выражается в увеличении в постгипотермическом периоде активности Г6Ф-ДГ, КФ, α -НАЭ. Как известно, эти ферменты играют в эпидермисе важную роль, участвуя в процессах кератинизации, которые можно рассматривать как проявление специфической функции эпидермоцитов, направленной на увеличение защитных свойств кожи [5]. Кроме того, увеличивается активность ЛДГ и СДГ, поставляющих для процессов кератинизации энергию.

У половозрелых крыс изменения активности изученных ферментов были более выраженными (табл. 2). Так, на глубине охлаждения достоверно снижалась активность НАДФН-ТР, Г6Ф-ДГ, ЛДГ, КФ и α -НАЭ. Содержание СДГ и НАДН-ТР при этом не изменялось, однако через 6 и 24 ч активность НАДН-ТР также достоверно снижалась. В постгипотермическом периоде у этих животных изменения были также более значительными: активность большинства изученных ферментов в различные его сроки повышалась. Обращали на себя внимание 30-е сут после охлаждения, когда активность всех ферментов превышала контрольные значения. В это время, а также через 6 ч и 7 сут после гипотермии нами [8] обнаружено увеличение митотической активности базальных эпидермоцитов. Особо следует отметить, что активность Г6Ф-ДГ, НАДФН-ТР, КФ и α -НАЭ, ферментов, участвующих в процессах кератинизации, повышалась поочередно: содержание Г6Ф-ДГ было увеличено сразу после согревания, через 3 и 30 сут, НАДФН-ТР — через 3 и 30 сут, КФ — через 7 и 15 сут, α -НАЭ — через 15 и 30 сут после экспериментального воздействия. Это может быть связано с тем, что у половозрелых крыс значение указанных ферментов в процессах ороговения в различные периоды адаптационного процесса неодинаково.

У старых животных изменения активности изученных ферментов эпидермиса при гипотермии и в постгипотермическом периоде были во многом схожими с таковыми у половозрелых крыс (табл. 3): на глубине охлаждения активность большинства ферментов снижалась, а в постгипотермическом периоде наблюдалось увеличение ее, т. е. формировался системный структурный след адаптации [7]. Однако были выявлены и различия. Так, у старых крыс активность Г6Ф-ДГ в ростковом слое была угнетена на протяжении всего наблюдения, в зернистом — в течение трех суток после гипотермии, в то время как у половозрелых животных она снижалась только на глубине охлаждения. Наряду с угнетением активности Г6Ф-ДГ активность двух других ферментов (КФ и α -НАЭ), также принимающих участие в процессах кератинизации, при охлаждении и сразу после него не претерпевала изменений, а в более поздние сроки постгипотермического периода становилась выше контрольного значения, что рассматривается нами как компенсаторное явление. Наконец, последнее отличие заключается в том, что активность ЛДГ в эпидермисе старых животных на протяжении всего постгипотермического периода была увеличена, что свидетельствует об активации гликолиза, за счет которого, очевидно, удовлетворяется значительная часть энергетических затрат эпидермоцитов. В эпидермисе старых крыс нами ранее обнаружено увеличение митотической активности с 1-х по 30-е сутки постгипотермического периода [8].

Таблица 2. Влияние общей глубокой гипотермии на активность ферментов эпидермиса половозрелых крыс, условные единицы

Показатели		Гипотермия и постгипотермический период									
		Конт - роль	18 °С	37 °С	6 ч	24 ч	3 сут	7 сут	15 сут	30 сут	60 сут
НАДН-ТР		2,5	2,3	2,4	1,9 ^x	2,0 ^x	2,6 [·]	2,6	2,5	2,9 ^x	2,7
НАДФН-ТР	Ростковый слой	1,7	1,1 ^x	1,6 [·]	1,5	1,8	1,9 ^x	1,9	1,5	2,0 ^x	1,8
	Зернистый слой	2,5	2,0	2,0	2,2	2,0	3,0	2,4	1,9	3,0	2,3
Г6Ф-ДГ	Ростковый слой	1,8	1,6 ^x	2,2 ^{x·}	1,8 [·]	2,0	2,4 ^{x·}	2,0	1,9	2,2 ^{x·}	2,1
	Зернистый слой	2,5	2,1 ^x	2,8 [·]	2,3	2,6	3,2 ^{x·}	2,6 [·]	2,6	2,8 ^x	2,7
ЛДГ		1,9	1,7 ^x	1,9	2,1 ^x	2,0	2,0	2,4 ^{x·}	2,0	2,3 ^{x·}	2,0
СДГ		2,0	1,8	2,2 ^{x·}	2,0	2,0	2,0	2,1	2,0	2,2 ^x	1,7
КФ		2,4	1,9 ^x	2,3 [·]	2,3	1,4 ^x	1,3 ^x	2,5 [·]	2,9 ^x	1,9 [·]	2,0
α-НАЭ		1,9	1,2 ^x	1,5 ^x	1,2 ^x	1,1 ^x	1,8	1,4 ^{x·}	2,1	2,2	2,0

Примечание: x — достоверно по отношению к контролю, $P < 0,05$; · — достоверно по отношению к предыдущему сроку, $P < 0,05$.

Таблица 3. Влияние общей глубокой гипотермии на активность ферментов эпидермиса старых крыс, условные единицы

Показатели		Гипотермия и постгипотермический период						
		Конт-роль	18 °С	6 ч	24 ч	3 сут	7 сут	30 сут
НАДН-ТР		2,4	2,1	2,4	2,3	2,6	3,0 ^{x·}	3,0 ^x
НАДФН-ТР	Ростковый слой	1,7	1,2 ^x	1,0 ^x	1,1 ^x	1,3	1,9 [·]	2,3 ^x
	Зернистый слой	2,2	1,6 ^x	1,6	1,9	2,2	2,5	2,9 ^x
Г6Ф-ДГ	Ростковый слой	2,5	1,9 ^x	1,6 ^{x·}	1,7 ^x	1,5 ^x	1,9 ^{x·}	2,0 ^x
	Зернистый слой	2,8	2,5	2,4 ^x	2,1 ^{x·}	2,1 ^x	3,0 [·]	2,5 [·]
ЛДГ		0,9	0,5 ^x	1,9 ^{x·}	1,9 ^x	2,0 ^x	1,8 ^x	2,1 ^x
СДГ		1,6	1,4 ^x	1,6	2,4 ^{x·}	1,5 [·]	1,9 ^{x·}	2,2 ^x
КФ		1,2	1,2	1,5	1,2	1,0	1,9 ^{x·}	1,9 ^x
α-НАЭ		0,5	0,4	0,3	1,5 ^{x·}	1,9 ^{x·}	1,8 ^x	1,4 ^{x·}

Примечание. x — достоверно по отношению к контролю, $P < 0,05$; · — достоверно по отношению к предыдущему сроку, $P < 0,05$.

Таким образом, в реакции ферментных систем эпидермиса на общую глубокую гипотермию имеются выраженные возрастные различия. У половозрелых животных процесс охлаждения не приводит к существенным изменениям. Поэтому системный структурный след адаптации у них выражен нерезко и существует непродолжительное время. У половозрелых и старых крыс изменения при охлаждении более выражены, у них адаптивные перестройки в форме увеличения активности изученных ферментов эпидермиса носят более выраженный характер и сохраняются длительное время. Старение снижает адаптивные возможности, что проявляется на примере Г6Ф-ДГ, фермента пентозофосфатного пути, играющего важную роль в метаболизме эпидермиса. В этих условиях энергетические потребности удовлетворяются за счет менее энергоемкого гликолиза. Кроме того, на основании наших исследований можно косвенно утверждать, что энергообеспечение процессов кератинизации в эпидермисе в разные возрастные периоды различное.

1. Борисов В. А., Базеко Б. С. Возможность оживления животных после достижения критической температуры // Материалы 27 научн. сессии и 27 студ. конф. Витебск. мед. ин-та. — Витебск, 1969. — С. 287—289.
2. Волина В. В., Панков Е. Я. Изменение активности ряда окислительно-восстановительных ферментов в коже крыс при различных температурных воздействиях // Криобиология и криомедицина. — 1980. — Вып. 7. — С. 21—27.
3. Гомеостаз / Под ред. П. Д. Горизонтова. — М. : Медицина, 1981. — 576 с.
4. Задорожный Б. А. Криотерапия в дерматологии. — Киев : Здоров'я, 1975. — 72 с.
5. Кожа / Под ред. А. М. Чернуха, Е. П. Фролова. — М. : Медицина, 1982. — 336 с.
6. Колодезникова Е. Д. Реакция тучных клеток на длительное охлаждение // Медико-биологические аспекты процессов адаптации. — Новосибирск : Наука, 1975. — С. 160—162.
7. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс, профилактика. — М. : Наука, 1981. — 278 с.
8. Мяделец О. Д. Морфо-функциональные изменения в коже при искусственной глубокой гипотермии в возрастном аспекте // Механизмы криоповреждения и криозащиты биологич. объектов : Тез. докл. II Всесоюзн. конф. (Харьков, октябрь, 1984 г.). — Харьков : Б. и., 1984. — 2. — С. 166.
9. Сиротинин Н. Н. Эволюция резистентности и реактивности. — М. : Медицина, 1981. — 236 с.

Витебский медицинский ин-т

Поступила 25.10.85

УДК 57.043:611.441.361.041:537.533.35

Т. П. Говоруха, В. А. Чуйко, Б. А. Скорняков

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТИРОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Одним из актуальных вопросов современной эндокринологии и трансплантологии является пересадка криоконсервированных органов для лечения эндокринной недостаточности [3]. Биохимические исследования показали, что после низкотемпературного воздействия функциональная активность щитовидной железы может сохраняться [8], хотя при этом обнаруживаются определенные нарушения в ее структуре [1, 4]. Целью настоящего исследования явилось изучение ультраструктурных особенностей фолликулярных тироцитов щитовидной железы после инкубации ее с криопротектором димексидом и криоконсервации.

Исследовали щитовидные железы, удаленные у 12 больных диффузным токсическим зобом. Контролем в экспериментах служили образцы ткани в исходном состоянии, фиксированные сразу после забора. В качестве криопротектора использовали 12 %-ный раствор димексида. Ткань замораживали по двухэтапной программе: на первом этапе — со скоростью 1 °С/мин до —70 °С, затем — со скоростью 100 °С/мин до —196 °С. Пробы отогревали на водяной бане при 40 °С. Проведено четыре серии экспериментов: в первой — кусочки щитовидной железы размером 5 × 8 мм инкубировали в растворе Хенкса с 12 %-ным димексидом при 0 °С в течение 30 мин; во второй — кусочки щитовидной железы такого же размера замораживали путем быстрого погружения в жидкий азот без димексида; в третьей — замораживание проводили по указанной выше программе без димексида; в четвертом — замораживание проводили по программе с 12 %-ным димексидом.

Для электронно-микроскопических исследований кусочки щитовидной железы размером до 1 мм³ фиксировали в растворе 5 %-ного глутарового альдегида — 2 ч, постфиксировали в растворе 2 %-ного OsO₄ — 1 ч, обезвоживали в растворах этилового спирта восходящей концентрации и заключали в эпон-аралдитовую смесь. Полимеризацию проводили при 60 °С. Срезы, полученные на ультрамикротоме УМ ТП-3М, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу [7]. Срезы просматривали на микроскопе ЭВМ-100А при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Морфометрическую оценку производили на основе анализа 75 фотографий устройством МАГИ [6], с помощью которого определяли площадь ядра ($S_{я}$), общую площадь митохондрий ($S_{мит}$), площадь гетерохроматина ядра ($S_{гет}$), площадь эндоплазматической сети ($S_{эпс}$), а также отношение площади гетерохроматина к площади ядра ($S_{гет}/S_{я}$), отношение площади митохондрии к площади эндоплазматической сети ($S_{мит}/S_{эпс}$). Результаты представлены в таблице.

Таблица. Морфометрические показатели тироцитов в условиях действия факторов низкотемпературного консервирования, $мм^2$

№ п/п	Серия эксперимента	Компоненты клетки						
		n	$S_{я}$	$S_{гет}$	$S_{мит}$	$S_{эпс}$	$S_{гет}/S_{я}$	$S_{мит}/S_{эпс}$
1	Контроль-исходное состояние	15	2553 ± 271	678 ± 23	833 ± 63	2152 ± 181	$0,24 \pm 0,08$	$0,38 \pm 0,07$
2	После инкубации с 12%-ным димексидом	15	2513 ± 216	1595 ± 105	546 ± 57	1680 ± 173	$0,63 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,05$
3	После замораживания погружением в жидкий азот	15	4452 ± 308	1799 ± 163	186 ± 43	917 ± 193	$0,41 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,05$
4	После замораживания по программе без димексида	15	4581 ± 214	1529 ± 172	132 ± 21	960 ± 103	$0,33 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,02$
5	После замораживания по программе с 12%-ным димексидом	15	3043 ± 203	1060 ± 189	522 ± 18	1020 ± 101	$0,34 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,08$
Уровень достоверности разностей контроля (1) и опытов (2, 3, 4, 5)			$P_{1,2} > 0,05$ $P_{1,3} < 0,05$ $P_{1,4} < 0,05$ $P_{1,5} < 0,05$	$P_{1,2} < 0,05$ $P_{1,3} < 0,05$ $P_{1,4} < 0,05$ $P_{1,5} < 0,05$	$P_{1,2} < 0,05$ $P_{1,3} < 0,05$ $P_{1,4} < 0,05$ $P_{1,5} < 0,05$	$P_{1,2} < 0,05$ $P_{1,3} < 0,01$ $P_{1,4} < 0,01$ $P_{1,5} < 0,05$	$P_{1,2} < 0,01$ $P_{1,3} < 0,05$ $P_{1,4} > 0,05$ $P_{1,5} > 0,05$	$P_{1,2} > 0,05$ $P_{1,3} > 0,05$ $P_{1,4} < 0,05$ $P_{1,5} > 0,05$

Электронно-микроскопический анализ нативных препаратов щитовидной железы, полученных после операции, показал, что тироциты представлены главным образом клетками, ядра которых имели округлую форму с узким, равномерным перинуклеарным пространством (рис. 1). Хроматин конденсирован на внутренней поверхности ядерной мембраны узкой полосой, а в средней части ядра располагался относительно диффузно. Цитоплазма характеризовалась мелкодисперсной уплотненной гиалоплазмой, в которой довольно плотно располагались органеллы. Митохондрии имели округлую или несколько овальную форму, в большей части их сохранялись остатки крист. Канальцы шероховатого эндоплазматического ретикулума представлены более крупными полостями, заполненными гомогенным мелкозернистым материалом. Комплекс Гольджи располагался в апикальной части клетки и состоял из уплощенных цистерн и пузырьков. В цитоплазме отмечалось небольшое количество секреторных гранул, что свидетельствовало о хорошей сохранности клеток.

Как следует из данных таблицы, гетерохроматин ядер занимает примерно четвертую часть поверхности среза, что может быть отражением повы-

шенной функциональной активности ядра. Кроме того, на высокий уровень биосинтетических процессов в клетках указывает также большое значение отношения площади митохондрий к площади эндоплазматической сети — 0,38.

После экспозиции кусочков железы с 12 %-ным димексидом (рис. 2) во всех клетках обнаруживались однотипные изменения: ядро сохраняло свою форму, но хроматин характеризовался большей степенью конденсации, а перинуклеарное пространство практически не определялось. Гиалоплазма приобретала мелкохлопьевидную структуру. Большая часть митохондрий увеличивалась в объеме с нарушением ориентации крист и их фрагментацией среди неравномерно просветленного матрикса. В эндоплазматической сети определялось расширение цистерноподобных каналов, на наружной поверхности которых определялись неравномерные скопления рибосом. Кроме этого обнаруживалось значительное количество мелких, округлых и овальных лизосом и капель липидов. По морфометрическим данным, тироциты после инкубации с 12 %-ным димексидом характеризовались увеличением доли гетерохроматина ядра почти вдвое, при уменьшении площади митохондрий на 53 %, площади эндоплазматической сети на 22%. Следовательно, морфометрические данные подтвердили данные качественного анализа о преимущественной лабильности митохондрий среди других органелл клетки.

При замораживании щитовидных желез до -196°C погружением в азот без криопротектора ультраструктура тироцитов характеризовалась

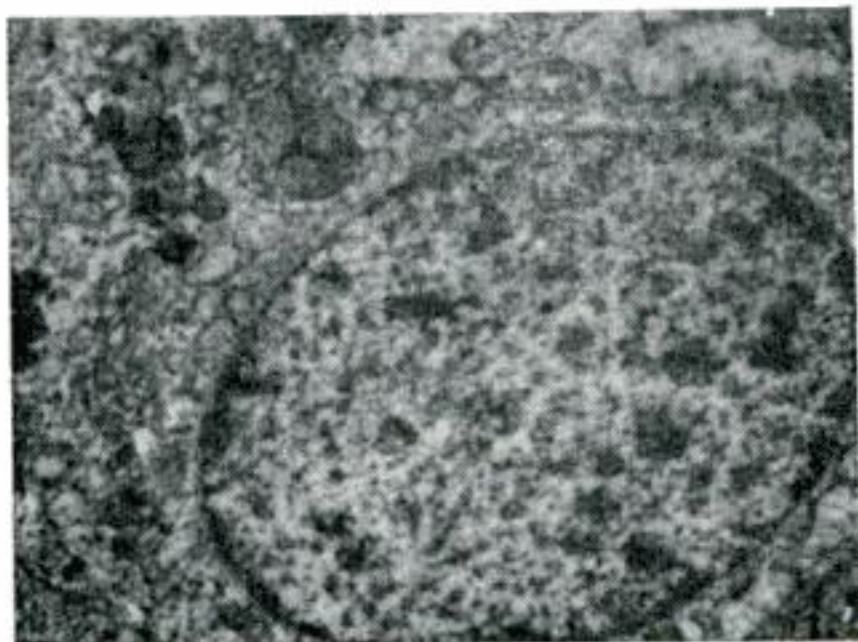


Рис. 1. Тироцит в исходном состоянии ($\times 23000$)

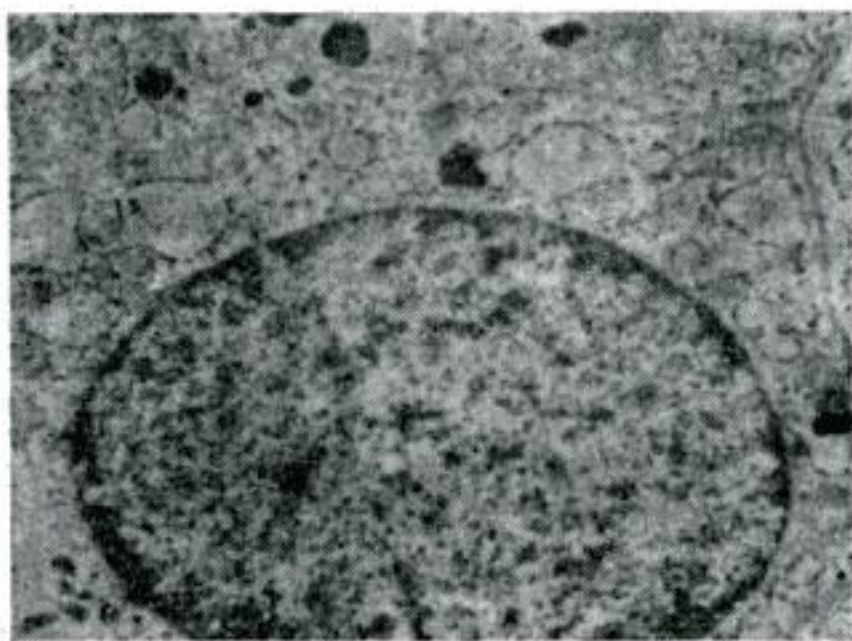


Рис. 2. Тироцит после экспозиции с 12 %-ным димексидом ($\times 23000$)



Рис. 3. Тироцит после замораживания до -196°C погружением в азот без димексида ($\times 23000$)

выраженными изменениями (рис. 3). Они заключались в том, что ядро деформировалось, уменьшалось в размерах и содержало многочисленные впячивания и выпячивания нуклеолеммы. Хроматин ядра конденсировался в плотные, почти непрерывные скопления вдоль ядерной оболочки. Центральные участки ядра содержали плотные конгломераты хроматина. Перинуклеарное пространство приобретало неодинаковую ширину, наблюдалось расслоение мембран карิโอтеки, а на отдельных ее участках обнаруживалась дезинтеграция структуры. Гиалоплазма в основном становилась разреженной, с глыбками неравномерной величины. Митохондрии приобретали неправильные формы, содержали различной величины фрагменты

крист и вакуоли в матриксе. Эндоплазматическая сеть состояла из цистерн с локальными вакуолеобразными вздутиями. Большая часть эндоплазматического ретикулума не содержала рибосом на поверхности. Обнаруживались мультивезикулярная и ламеллярные структуры, как результат агрегации разрушенных мембран. Одиночные сетчатые аппараты состояли из сильно сжатых мембранных комплексов. По морфометрическим данным, после замораживания погружением в жидкий азот без димексида тироциты характеризовались увеличением площади ядра почти вдвое и абсолютным увеличением доли гетерохроматина при одновременном уменьшении площади митохондрий и эндоплазматической сети, что отражает выраженные деструктивные изменения клеток.

Ультраструктура тироцитов (рис. 4) при замораживании по двухэтапной программе без криопротектора характеризовалась изменениями, близкими к изменениям, отмеченным в предыдущей серии экспериментов, которые выражались в уменьшении размеров ядер и формировании интенсивной

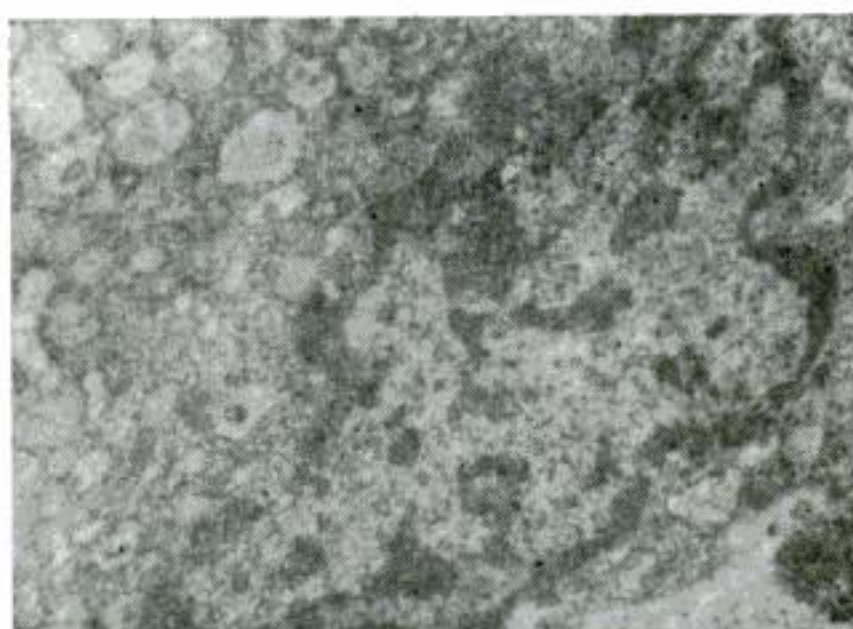
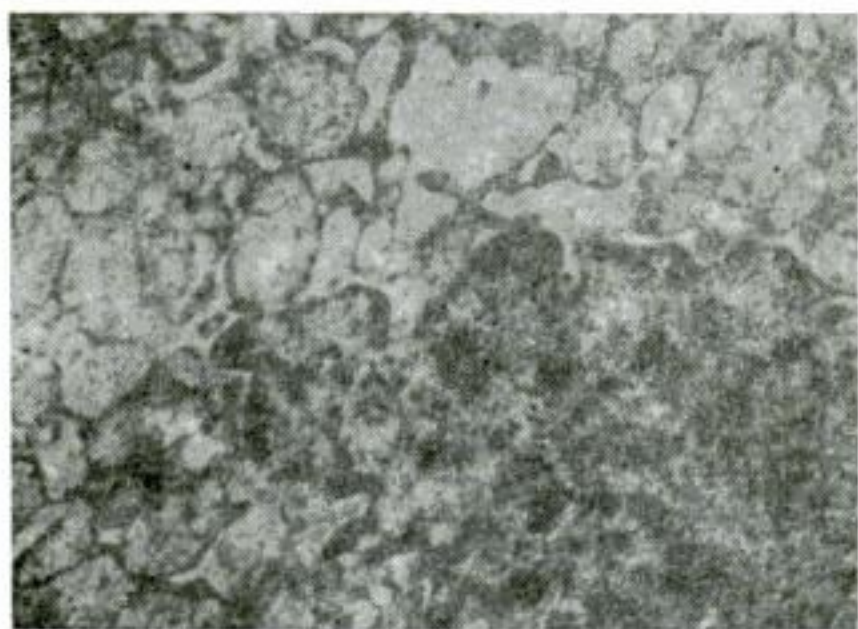


Рис. 4. Тироцит после замораживания по двухэтапной программе без димексида (x23000)

Рис. 5. Тироцит после замораживания по двухэтапной программе с 12 %-ным димексидом (x23000)

фестончатости контуров. Мелкодисперсный плотный гетерохроматин относительно узкой полоской располагался вдоль внутренней поверхности ядерной оболочки, а такого же характера крупные и мелкие конгломераты хроматина определялись на всем протяжении ядра. Перинуклеарное пространство неравномерно расширялось с образованием вакуолей неправильной формы. Гиалоплазма в виде мелко- и грубодисперсной массы располагалась среди органелл. Митохондрии увеличивались в объеме, местами теряли четкость структуры мембран. Одновременно значительно уменьшалась плотность матрикса, среди которого определялись различной величины фрагменты крист. Большинство каналов эндоплазматического ретикулума вакуолеобразно расширялись, содержали резко разреженный хлопьевидный материал. Местами обнаруживались свободно расположенные скопления рибосом. Остатки пластинчатых комплексов с трудом определялись среди цистерн эндоплазматического ретикулума. Программное замораживание ткани без димексида также существенно изменяло морфометрические показатели тироцитов: сохранялось возрастание площади сечения ядра при увеличении доли гетерохроматина и уменьшении площади митохондрий и эндоплазматической сети, что отражает достаточно выраженные деструктивные изменения.

При замораживании щитовидной железы по двухэтапной программе с 12 %-ным димексидом (рис. 5) ядра тироцитов, сохраняя свою величину, изменяли форму и содержали значительное количество крупных выпячиваний и впячиваний нуклеолеммы. Гетерохроматин в виде более и менее плотных участков располагался в основном по внутренней поверхности ядерной оболочки и относительно равномерно — по всему объему ядра. Перинуклеарное пространство несколько расширялось лишь в единичных местах. Гиалоплазма, располагаясь в виде мелкодисперсной массы среди

органелл, содержала скопления свободных рибосом. Однако большая их часть была прикреплена к вакуолеобразно вздутым цистернам эндоплазматического ретикулума. Митохондрии большей частью сохраняли двухслойную мембрану. Однако только часть крист органелл связана с внутренней мембраной, а большинство в виде фрагментов свободно располагались в разреженном матриксе. Каналы и цистерны сетчатого аппарата неравномерно расширялись. Согласно морфометрическим данным, при замораживании по данной программе тироциты характеризовались умеренным увеличением размеров ядра и увеличением доли гетерохроматина при значительной сохранности митохондрий и эндоплазматической сети.

Таким образом, результаты исследования показывают, что нарушение ультраструктуры тироцитов происходит при всех вариантах замораживания. Однако выраженность этих изменений была различна. Так, инкубация с димексидом приводила к значимым, но небольшим по величине изменениям состояния хроматина, митохондрий, эндоплазматической сети. Это объясняется тем, что димексид обладает дегидратирующим эффектом, что ведет к нарушениям мембран только части органелл. Наиболее выраженные изменения определялись в серии эксперимента, когда замораживание проводилось погружением в жидкий азот и без димексида или только без димексида. В этих случаях на клетки тиреоидной паренхимы действовала вся совокупность факторов низкотемпературного консервирования [2], что приводило к существенному нарушению прежде всего мембранных структур клеток. Использование программы и димексида обеспечило наименьшие повреждения мембранных структур клеток, что позволяет рекомендовать способ подготовки тиреоидной паренхимы для использования в клинической практике [5].

1. Говоруха Т. П., Скорняков Б. А., Петренко А. Ю. Ультраструктурная характеристика щитовидной железы после эквilibрации с диметилсульфоксидом (ДМСО) // Криобиология и криомедицина.— 1984.— Вып. 14.— С. 80—83.
2. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Актуальные проблемы криобиологии.— Киев : Наук. думка, 1981.— 605 с.
3. Пушкарь Н. С., Чуйко В. А., Утевский А. М. и др. Консервация и трансплантация эндокринных органов и тканей. Харьков, 1981.— 36 с.— (Препринт / АН УССР, ИПКиК).
4. Пушкарь Н. С., Цариковская Н. Г., Чуйко В. А. Низкотемпературное консервирование и аутоимплантация щитовидной железы человека // Актуальные проблемы криобиологии.— Киев : Наук. думка, 1981.— С. 390—407.
5. Пушкарь Н. С., Македонская В. А., Утевский А. М. и др. Аутоимплантация криоконсервированной (—196 °С) щитовидной железы как метод лечения гипотериоза // Проблемы эндокринологии.— 1984, № 5.— С. 42—46.
6. Слободской Р. Б., Самойленко Ю. Б., Киданов Ю. А. Методические указания по применению комплекса обработки графической информации для студентов всех специальностей.— Харьков, ХИРЭ, 1983.— 19 с.
7. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих.— М. : Мир, 1975.— С. 96—105.
8. Чуйко В. А., Утевский А. М. Биохимия криоконсервированной щитовидной железы.— Киев : Наук. думка, 1985.— 213 с.

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

Поступила 26.05.86

УДК 577.122.22

**В. Д. Зинченко, Т. Л. Кнубовец, Л. А. Сибельдина, А. М. Воротилин,
В. А. Моисеев**

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ³¹P-ЯМР МЕТАБОЛИЗМА НЕКОТОРЫХ ФОСФАТОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ С 1,2-ПРОПАНОДИОЛОМ

В настоящее время интенсивные исследования направлены на усовершенствование способов низкотемпературного консервирования эритроцитов и повышение эффективности их последующей трансфузии [1, 2]. Понимание

механизмов возникновения нарушений в эритроцитах при замораживании-отогреве необходимо для разработки оптимальных режимов криоконсервирования. Использование традиционных биохимических методов анализа неизбежно связано с разрушением клеток, что может вносить непрогнозируемую ошибку в получаемые результаты. Спектроскопия ЯМР — неинвазивный метод исследования, позволяющий наблюдать за кинетикой целого ряда метаболических процессов в клетках [6]. Именно возможность изучения интактных клеток делает ЯМР перспективным методом оценки изменений метаболизма в эритроцитах при их криоконсервировании.

Спектры ^{31}P -ЯМР нативных эритроцитов содержат сигналы 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), аденозинтрифосфата (АТФ), аденозиндифосфата (АДФ). При инкубации эритроцитов в отсутствие глюкозы происходит быстрое снижение уровня АТФ, затем 2,3-ДФГ и нарастание концентрации неорганического фосфата (P_i) [7].

Цель работы — сравнение исходного содержания и кинетики распада 2,3-ДФГ и накопления P_i в клетках на разных этапах криоконсервирования и подготовки эритроцитарной массы к трансфузии. Такой подход к исследованию изменений, происходящих в эритроцитах в процессе криоконсервации, может быть перспективным, так как концентрация 2,3-ДФГ является параметром, характеризующим как энергетическое состояние эритроцитов, так и их способность к переносу кислорода [5].

Эксперименты проводили на свежей донорской крови, стабилизированной гепарином. Для получения эритроцитарной массы кровь центрифугировали при $800g$ в течение 10 мин и удаляли плазму. Растворы для криозащиты и отмывания эритроцитов готовили по методу, описанному ранее [3]. В каждом эксперименте для приготовления образцов использовали кровь одного и того же донора. При проведении кинетических измерений уровня 2,3-ДФГ эритроциты инкубировали при 37°C в течение времени, указанного ниже на рисунках. Инкубацию начинали одновременно для контрольных образцов и для образцов на различных стадиях криоконсервации: 1) после смешения с криоконсервантом; 2) после размораживания от температуры жидкого азота; 3) после двухэтапной отмывки размороженных клеток от консервирующего раствора; 4) после перенесения клеток в трансфузионную среду ЦНИИГПК 8в. После завершения исследований методом ЯМР определяли уровень гемолиза всех образцов. В работе приведены результаты только тех экспериментов, в ходе которых гемолиз практически не обнаруживался.

Спектры регистрировали на ЯМР-Фурье спектрометре Bruker WH-360 при рабочей частоте на ядрах фосфора 145,78 МГц. Регистрацию спектров проводили без вращения образца и при отсутствии широкополосного подавления спин-спинового взаимодействия с протонами. Каждый спектр получен в результате 500 накоплений. Условия накопления спектров: 60-градусный импульс при времени задержки 0,3 с. Накопление проводили на участке памяти 8К при разрешении 2,3 Гц/точку. Значения химических сдвигов в м. д. приведены относительно сигнала 85 % H_3PO_4 . В качестве внешнего эталона использована натриевая соль этилендиаминтетрафосфоновой кислоты. На рис. 1 приведены спектры ^{31}P -ЯМР эритроцитов в процессе их инкубации в среде без глюкозы. Как видно из приведенных данных, непосредственно после оттаивания эритроциты содержат 2,3-ДФГ в высокой концентрации. Однако сопоставление спектров в случаях А и Б показывает, что после криоконсервации уровень 2,3-ДФГ падает быстрее, чем в исходной эритроцитарной массе, хотя в работе [2] указывается, что уровень 2,3-ДФГ в размороженных клетках, хранящихся с 1,2-ПД при 4°C , на третий день не уменьшается, а в течение 10 дней убывает до 84 % от исходного значения. При двухэтапной отмывке от криозащитного раствора происходит быстрое нарастание интенсивности сигнала P_i и падение уровня 2,3-ДФГ (рис. 1, В). Однако наиболее неблагоприятные условия для сохранения уровня 2,3-ДФГ в эритроцитах создаются при перенесении их в среду ЦНИИГПК 8в (рис. 1, Г). Следовательно, основываясь на таком показателе, как сохранение уровня 2,3-ДФГ в эритроцитах, можно утверждать, что для-

тельное хранение эритроцитов в среде ЦНИИГПК 8в является нецелесообразным.

Для того, чтобы выявить роль криоконсервации в сохранении уровня 2,3-ДФГ в эритроцитах, нами были проделаны те же операции, но без замораживания клеток в жидком азоте. Как видно из рис. 2, указанные выше закономерности, но менее выраженные, сохраняются и в этом случае:

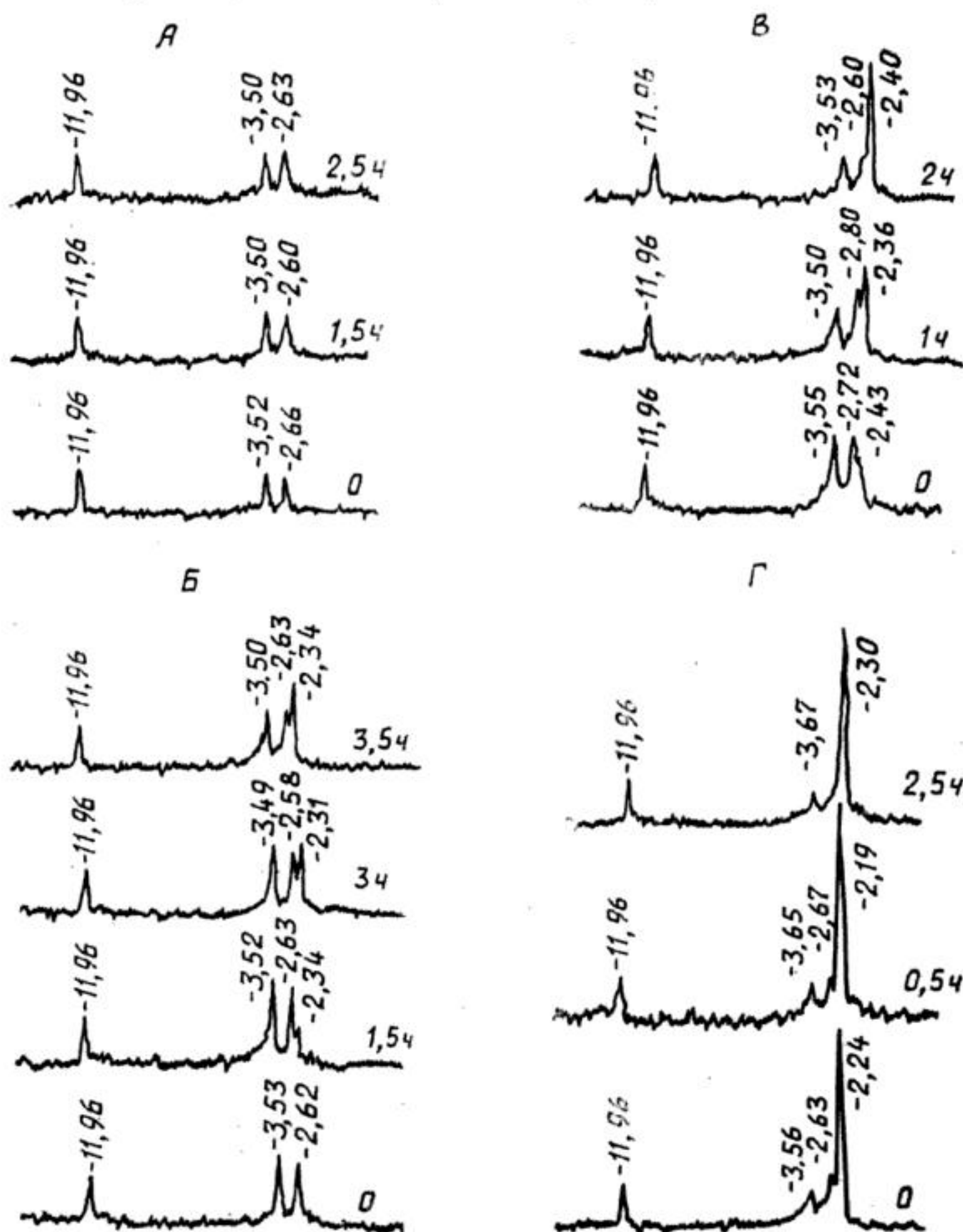


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР (при 145, 78 МГц) в процессе инкубации без глюкозы при 37 °С эритроцитарной массы: А — исходной, Б — после криоконсервации и оттаивания, В — после последующей двухстадийной отмывки от криоконсервирующего раствора, Г — после перенесения в среду ЦНИИГПК 8в. Отнесение сигналов в спектре: на примере спектра Б через 3,5 ч после начала консервации; сигнал при -11696 м. д. соответствует эталону (диэтилендиаминтетрафосфоновой кислоты натриевая соль), сигналы при $-3,50$ и $-2,63$ м. д. принадлежат 3 — Ф и 2 — Ф группам 2,3 -ДФГ соответственно, сигнал при $-2,34$ м. д. — Ф_н. Химические сдвиги в м. д. даны относительно сигнала 85 % H_3PO_4 . Время, прошедшее от начала инкубации при 37 °С до получения спектра, указано на рисунке

максимальное содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах после добавления криозащитного раствора на основе 1,2-ПД, падение устойчивости клеток инкубации без глюкозы в случае двухэтапной отмывки и особенно после перенесения в среду ЦНИИГПК 8в. Таким образом, наблюдаемые изменения в энергетике эритроцитов обусловлены не столько собственно процессом замораживания до -196 °С и последующего оттаивания, сколько влиянием

криозащитных добавок, отмывочных растворов и взвешивающих сред. Однако при сравнении спектров на рис. 2 и 3 видно, что криозащитный раствор на основе 1,2-ПД оказывает сравнительно небольшое влияние на уровень 2,3-ДФГ в эритроцитах. Это подтверждает и тот факт, что в эритроцитах, не подвергавшихся замораживанию-оттаиванию, концентрация Φ_n в присутствии криозащитного раствора с 1,2-ПД без глюкозы столь мала, что сигнал Φ_n не регистрируется в спектре ^{31}P -ЯМР. Вероятно, различная устойчивость эритроцитов к инкубации без глюкозы в среде с криоконсервантом на основе 1,2-ПД в двух рассмотренных выше случаях, а именно, без замораживания и после замораживания, объясняется эффектом охлаждения до температуры жидкого азота и последующего оттаивания. Тем не менее и сама криозащитная среда воздействует на метаболизм эритроцитов (рис. 3). Как видно из сравнения результатов инкубации при 4 °С нативной эритро-массы и эритро-массы с добавкой криозащитного раствора на основе 1,2-ПД, падение уровня 2,3-ДФГ и нарастание концентрации Φ_n в последнем случае

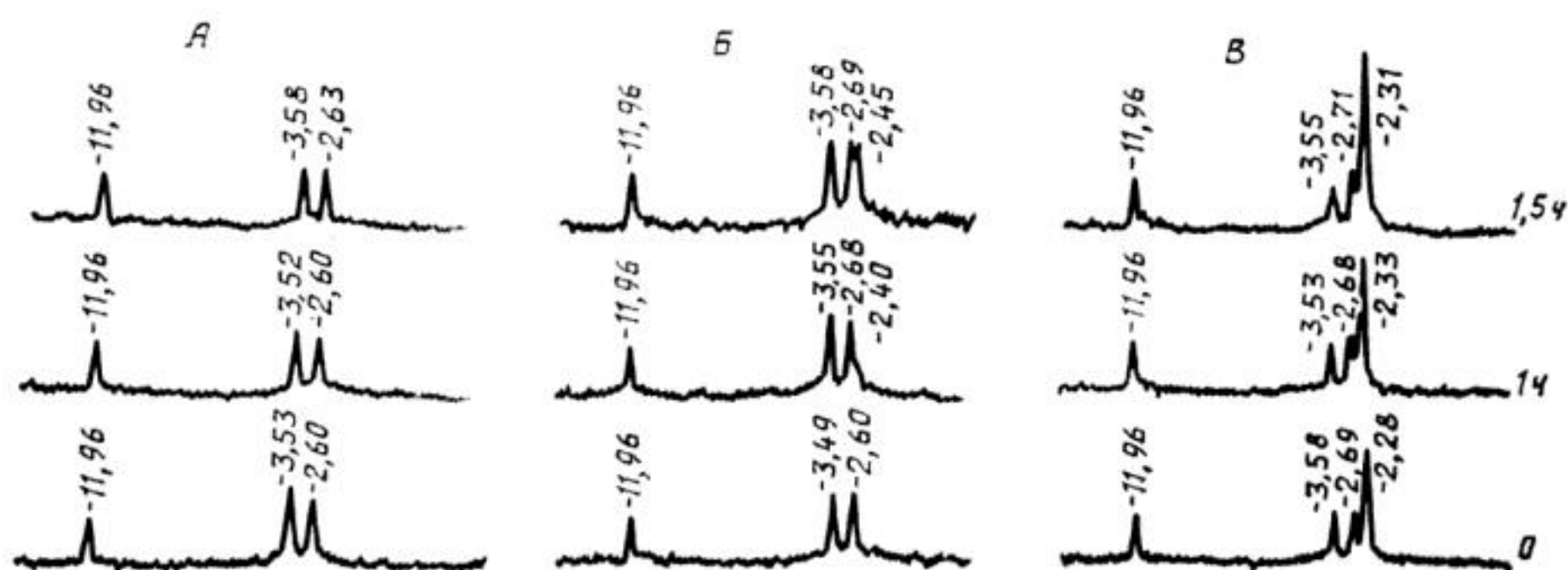


Рис. 2. Спектры ^{31}P -ЯМР (при 145,78 МГц) в процессе инкубации без глюкозы при 37 °С эритро-массы: А — исходной с добавлением криоконсерванта, Б — после последующей двухстадийной отмывки от криоконсерванта, В — после перенесения в среду ЦНИИГПК 8в. Отнесение сигналов такое же, как на рис. 1

свидетельствует о меньшей стабильности эритроцитов в присутствии крио-протектора. Механизм подобного воздействия криозащитного раствора на метаболизм эритроцитов требует дополнительного исследования.

Известно, что 1,2-ПД относится к классу проникающих криопротекто-ров [3]. Он являлся основным компонентом используемого нами криоконсер-ванта, в состав которого входит также и сахароза, не проникающая через мембраны эритроцитов. Концентрация сахарозы в криоконсерванте невели-ка (3 масс.%). В процессе отмывания от криоконсерванта концентрация сахарозы в отмывочных растворах повышается. Наиболее высока ее кон-центрация в среде ЦНИИГПК 8в (7 масс.%). Полученные результаты пока-зывают, что с повышением концентрации сахарозы возрастает влияние пере-численных отмывочных и взвешивающих растворов на скорость падения уровня 2,3-ДФГ в эритроцитах. Вероятно, снижение уровня 2,3-ДФГ нельзя объяснить только простым проникновением криоконсервантов через мембраны эритроцитов внутрь клеток. Так, при использовании непрони-кающего криопротектора ПЭГ-400 [4] наблюдается более выраженное паде-ние уровня 2,3-ДФГ и нарастание концентрации Φ_n , чем в случае проника-ющего глицерина [1] (рис. 4). Нарушение исходного доннановского равно-весия в случае непроникающих соединений [4] может, вероятно, оказывать сильное воздействие на метаболизм эритроцитов.

Таким образом, из приведенных результатов видно, что консервация эритроцитов по описанному способу позволяет получать после разморажи-вания клетки с высоким содержанием 2,3-ДФГ. Однако эти клетки облада-ют более низкой устойчивостью к истощению по глюкозе, чем интактные эритроциты, и, следовательно, сроки хранения размороженных эритроци-тов перед трансфузией должны быть ограниченными.

Уровень 2,3-ДФГ в эритроцитах, подвергавшихся замораживанию с криоконсервантом на основе 1,2-ПД, более медленно снижается в том случае, когда после оттаивания они хранятся в криоконсерванте без отмыва-

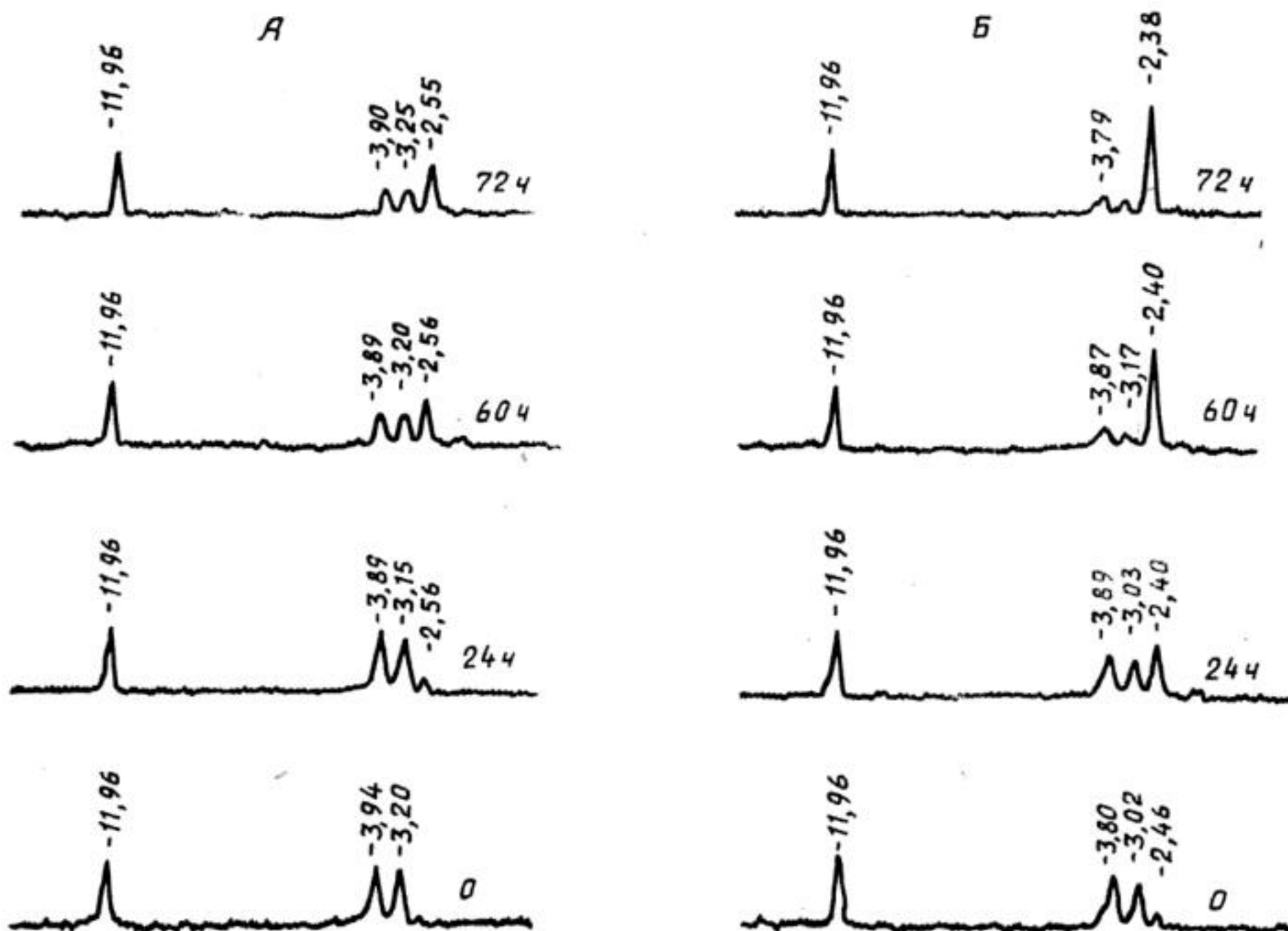


Рис. 3. Спектры ^{31}P -ЯМР (при 145,78 МГц) в процессе инкубации без глюкозы при 4 °С эритроцитарной массы: А — исходной, Б — с добавлением криоконсерванта. Отнесение сигналов такое же, как на рис. 1

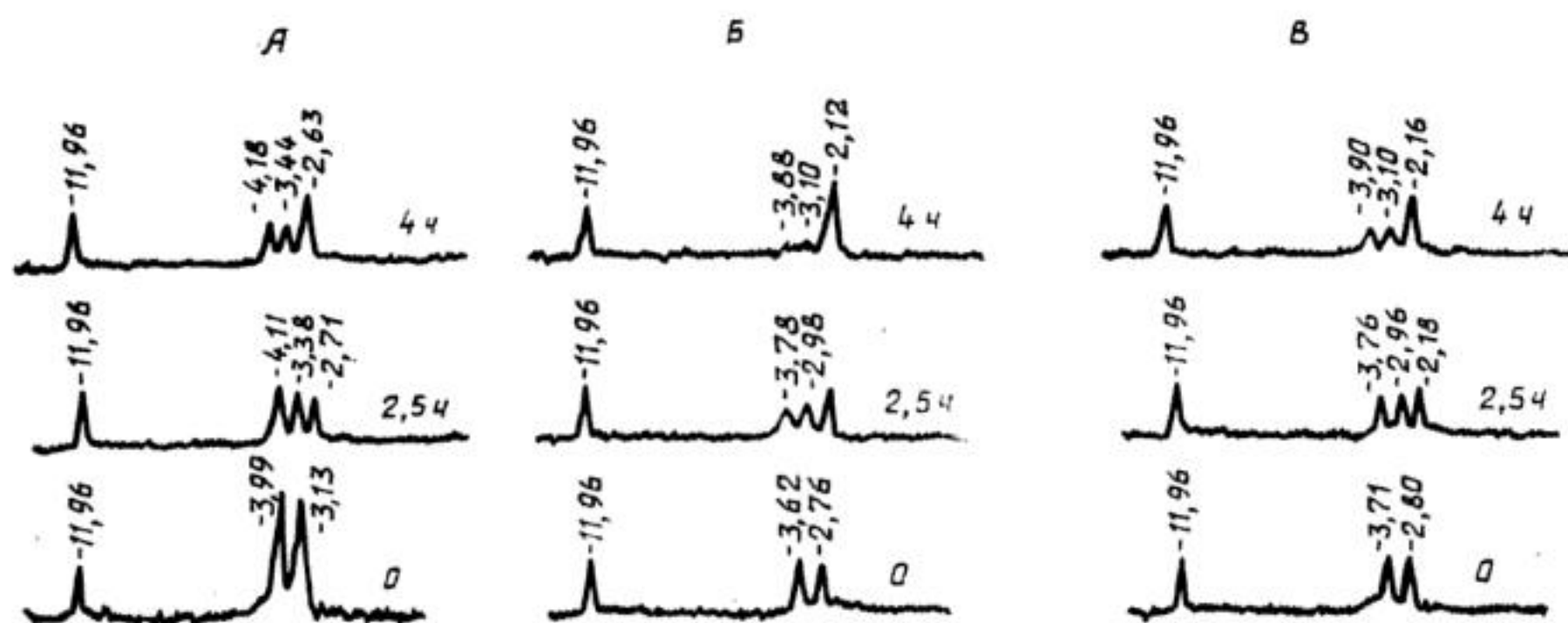


Рис. 4. Спектры ^{31}P -ЯМР (при 145,78 МГц) в процессе инкубации при 37 °С без глюкозы эритроцитарной массы: А — исходной, Б — с добавлением 15 об. % ПЭГ-400, В — с добавлением 15 об. % глицерина. Отнесение сигналов такое же, как на рис. 1

ния. Собственно замораживание-оттаивание приводит к снижению устойчивости клеток в среде без глюкозы, не оказывая существенного влияния на уровень 2,3-ДФГ.

1. Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И., Семенова Н. В. Эффективные растворы для взвешивания размороженных эритроцитов // Пробл. гематологии и переливания крови. — 1978. — 23, № 8. — С. 16—21.
2. Воротилин А. М. Замораживание клеток крови до —196 °С под защитой низкомолекулярных гликолей и глицерина. Повышение эффективности криоконсервации // Криобиология. — 1985. — № 3. — С. 15—20.

3. Воротилин А. М., Гучок М. М., Гучок В. М., Лоевский М. М. Сравнительное изучение эффективности криоконсервации эритроцитов под защитой 1,2-пропандиола (α -пропиленгликоля) и глицерина // Пробл. гематологии и переливания крови.— 1982.— 27, № 12.— С. 15—19.
4. Кнубовец Т. Л., Зинченко В. Д., Сибельдина Л. А. Исследование проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов гомологического ряда полиэтиленгликолей методом ^{31}P -ЯМР-спектроскопии высокого разрешения // Биол. мембраны.— 1985.— 2, № 7.— С. 747—754.
5. Страйер Л. Биохимия.— М.: Мир, 1984, 1. С. 73—81.
6. Gadian D. G. NMR and its application to living systems. Oxford: Clarendon Press, 1982.— 197 p.
7. Tehrani A. Y., Lam Y. E., Lin A. K., Dosch S. F., Ho C. Nuclear magnetic resonance studies of human red blood cells // Blood Cells.— 1982.— 8, N 2.— P. 245—261.

Ин-т химической физики АН СССР,
г. Москва,
Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 11.06.86

УДК 57.043:612.111:547.422:546.131

А. А. Мартыненко, Е. А. Грищенко, В. П. Тягилева

КРИОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ 1,2-ПРОПАНДИОЛ- H_2O - NaCl ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ДО -196°C

Достижения в области низкотемпературной консервации репродуктивных и соматических клеток [1, 3, 6] создают предпосылки для развития системных исследований факторов криопротекции. Условия криопротекции определяются, как известно, действием на биообъект определенных концентраций веществ, входящих в состав криоконсервирующих сред (криоконсервантов) и температурного режима замораживания-отогрева.

Криопротекторы оказывают сильно модифицирующее влияние на интегральные структуры клеток. Наиболее активные из них — диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, 1,2-пропандиол (1,2-ПД), этиленгликоль — в смеси с водой разрушают клеточные мембраны. Поэтому криоконсерванты представляют собой сложные растворы веществ, которые в большинстве случаев готовятся на основе смешанных растворителей и в состав которых входят вещества—криопротекторы и вещества—стабилизаторы структурной целостности клеток.

Свойства воды и ряда криопротекторов изучены довольно обстоятельно, смешанные же растворители исследованы лишь отчасти, физико-химические свойства криоконсервантов не изучены. Действие криоконсервантов на биообъекты исследуют с позиций сравнительной оценки криопротекторной активности ряда веществ и модификации клеточных структур [1, 2, 7]. Остаются, однако, не изученными эффекты действия составляющих криопротекторных сред с учетом их стабилизирующего влияния на структурно-функциональную организацию клеток.

Методология исследований химических факторов криопротекции подчиняется трем основным целям: нахождению зависимости структурно-функциональной сохранности биообъектов от состава и концентрационных уровней компонентов криоконсервантов, выявлению роли отдельных компонентов криопротекторных сред в процессах криоконсервации, выявлению механизмов криопротекции и структурной стабилизации клеток. При системном подходе исходными, по-видимому, являются экспериментальные исследования по установлению интервалов сочетающихся концентраций компонентов криопротекторных сред, обеспечивающих максимальную степень сохранности клеток в оптимальных режимах замораживания-отогрева. Для нахождения интервалов сочетающихся концентраций этих компонентов

нами исследована простейшая криопротекторная система 1,2-пропандиол- H_2O - NaCl . Опыты проводились по плану латинского квадрата [4] в соответствии со схемой, представленной в табл. 1.

Таблица 1. Зависимость гемолиза эритроцитов от концентраций 1,2-пропандиола и NaCl в системе 1,2-ПД- H_2O - NaCl при 25 °С и после замораживания до -196 °С

NaCl , М	t , °С	Гемолиз эритроцитов, %				
		1	2	3	4	5
0,07	25	90±20,3	72±13,4	56±36,6	88±6,9	89±4,7
	-196	91±21,9	74±14,6	61±18,1	85±5,5	92±7,3
0,08	25	28±30,9	17±15,9	18±14,2	33±19,7	72±22,5
	-196	83±17,9	51±18,1	47±30,8	48±10,6	87±7,2
0,1	25	2,7±3,0	2,8±1,5	1,1±0,4	1,7±0,5	3,9±1,6
	-196	78±16,9	21±5,0	16±4,5	10±3,4	66±21,6
0,15	25	0,6±0,2	0,7±0,2	0,9±0,2	1,2±0,3	1,8±0,4
	-196	82±13,5	26±3,8	23±4,9	8,0±3,2	9,2±2,8
0,2	25	0,5±0,2	0,7±0,2	1,0±0,1	1,3±0,3	9,5±0,4
	-196	84±13,7	41±4,0	33±19,7	12±3,0	13±4,2
0,3	25	0,5±0,2	0,7±0,2	1,0±0,1	1,4±0,4	1,8±0,3
	-196	82±10,9	58±9,6	39±9,4	14±3,6	73±8,6
0,4	25	0,6±0,1	0,8±0,3	1,1±0,1	1,6±0,7	2,7±0,2
	-196	80±11,1	57±9,2	45±14,8	24±3,0	83±7,7
1,2-ПД, М		1	2	3	4	5

Концентрация 1,2-ПД изменялась в диапазоне 1—5 М с интервалом в 1 М, а концентрация NaCl — в диапазоне 70—400 мМ с переменным интервалом 10—100 мМ. Сочетания концентраций этих веществ подобраны таким образом, чтобы проявлялись эффекты гипо-, гипер- и оптимальных их уровней на процессы стабилизации и криопротекции клеток.

Методическая схема исследований структурно-функциональных свойств эритроцитов основывалась на принципе двухэтапного тестирования. На первом этапе использовался наиболее общий показатель дестабилизации эритроцитов, каким является степень гемолиза. По этому показателю находили оптимальные интервалы сочетающихся концентраций 1,2-ПД и NaCl , при которых наблюдалась максимальная стабильность клеток при 25 °С и после замораживания-оттаивания. На втором этапе использовалась криопротекторная композиция, включающая средний уровень 1,2-ПД и минимальный уровень NaCl в пределах оптимальных интервалов сочетающихся концентраций этих веществ. В ходе расширенного тестирования определяли содержание в эритроцитах K^+ , аденозинтрифосфата (АТФ), 2-3-дифосфоглицерофосфата (2-3-ДФГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [5, 8, 9]. При исходном тестировании эритроцитов использовали 35 сред. В 2 мл каждой среды вносили 0,1 мл эритроцитов из донорской крови человека. Из этого объема отбирали 1 мл, помещали в стеклянные пробирки (из стекла «Пирекс») с внутренним диаметром 6 мм и замораживали в металлической емкости (низкотемпературной бане), расположенной на поверхности жидкого азота, со скоростью 14—18 °С/мин до -150 ÷ -170 °С. Пробирки погружали в жидкий азот на 10—30 мин и размораживали в воде при 45 °С со скоростью 300—400 °С/мин. Незамороженные (25 °С) и размороженные после низкотемпературного воздействия (-196 °С) образцы центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин. В надосадках определяли гемоглобин на спектрофотометре при 418 нм после соответствующего разбавления водой. Контролем служили полностью гемолизированные образцы эритроцитов после смешивания их с 0,4 % NH_4OH в соотношении 1 : 100.

При расширенном тестировании эритроциты обрабатывали криопротекторной средой 3 М 1,2-ПД-Н₂O-0,1 М NaCl дважды при соотношении объемов 1 : 4. Суспензию клеток замораживали, как отмечено выше. Объемы размороженных суспензий объединяли и после центрифугирования получали 1,5—2 мл осадка клеток, в которых исследовали перечисленные выше показатели. Контролем служила необработанная средой исходная эритромаасса. Приведенные в работе данные являются статистически обработанными средними величинами, полученными в 5—6 опытах.

Исследования показали, что после кратковременной (10—30 мин) экспозиции при 25 °С в 1—5 М растворах 1,2-ПД минимальный гемолиз (0,5—4 %) эритроцитов наблюдается при наличии 0,1—0,4 М NaCl. Концентрация соли 0,07—0,08 М оказывается недостаточной для стабилизации клеток, а концентрация 0,1 М — близкой к пороговой (табл. 1). При замораживании суспензий эритроцитов до —196 °С и отогреве до 10—20 °С происходит их частичный гемолиз. В условиях низкотемпературного воздействия одномолярная концентрация 1,2-пропандиола оказывается недостаточной, а двухмолярная — близкой к пороговой. Максимальная сохранность эритроцитов при замораживании проявляется в 2—5 М раствора пропандиола. При этом гемолизируется 8—26 % клеток, если сочетаются 2—3 М 1,2-ПД и 0,1—0,15 М NaCl; 4 М 1,2-ПД и 0,1—0,4 М NaCl; 5 М 1,2-ПД и 0,15—0,2 М NaCl. Сохранность эритроцитов в данных условиях варьируется в относительно широком интервале (74—92 %) и, очевидно, зависит от индивидуальных особенностей клеток разных доноров. С повышением концентрации криопротектора от 2 до 5 М сохранность эритроцитов в процессе низкотемпературной консервации повышается. Однако при сочетании относительно высоких концентраций 1,2-ПД (5 М) и NaCl (0,3—0,4 М), а также в случае сочетания высокой концентрации криопротектора и минимальной стабилизации концентрации соли (0,1 М) эффект криопротекции утрачивается. При кратковременной экспозиции в криопротекторной системе 3 М 1,2-ПД-Н₂O—0,1 М NaCl при 25 °С эритроциты сохраняют уровни К⁺, АТФ, 2,3-ДФГ и ЛДГ, присущие контрольным клеткам, не подвергавшимся действию криопротекторной среды (табл. 2). После замораживания до —196 °С и отогрева до 10—20 °С в эритроцитах уменьшается содержание К⁺ на 16 % и 2,3-ДФГ на 17 %, тогда как для АТФ и ЛДГ достоверных изменений не установлено. Уменьшение содержания К⁺ и 2,3-ДФГ, вероятно, свидетельствует о повышении проницаемости клеточных мембран и определенной дестабилизации эритроцитов в процессе замораживания-отогрева.

Таблица 2. Влияние среды (3 М 1,2-пропандиол-Н₂O-0,1 М NaCl) и разных температур на содержание К⁺, АТФ, 2,3-ДФГ и активность ЛДГ эритроцитов

t, °С	К ⁺ , мэкв/г Нб	АТФ, мкг/г Нб	2,3-ДФГ, мкг/г Нб	ЛДГ, IE/г Нб
—196	1,14 ± 0,01	3,27 ± 0,29	4,32 ± 0,58	93,5 ± 12,7
25	1,39 ± 0,02	3,79 ± 0,19	4,89 ± 0,61	96,7 ± 6,1
Контроль	1,36 ± 0,03	3,71 ± 0,49	5,31 ± 0,37	92,9 ± 11,4

Выполненные исследования позволили выявить интервалы сочетающихся концентраций 1,2-пропандиола и NaCl в простейшей криопротекторной системе 1,2-ПД-Н₂O-NaCl для достижения максимальной активности в отношении эритроцитов при оптимальных режимах замораживания-отогрева.

Таким образом, приведенные методические подходы позволяют исследовать концентрационные зависимости компонентов в криопротекторных системах и определять интервалы оптимально сочетающихся концентраций веществ, что представляет интерес с позиций сравнительной оценки криопротекторной эффективности химических факторов криопротекции.

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. Н. С. Пушкаря, А. М. Белоуса. — Киев : Наук. думка, 1981. — 606 с.

2. Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С. Криоконсерванты.— Киев : Наук. думка, 1979.— 158 с.
3. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А. А. Цуцаевой.— Киев: Наук. думка, 1983.— 240 с.
4. Лисенков А. Н. Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов.— М. : Медицина, 1979.— 342 с.
5. Мешкова Н. П., Алексахина Н. В. Определение фосфоглицериновой кислоты // Успехи биологической химии.— 1954.— Вып. 2.— С. 285—287.
6. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию.— Киев : Наук. думка, 1975.— 341 с.
7. Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. Криопротекторы.— Киев : Наук. думка, 1978.— 204 с.
8. Beutler E. Red cell metabolism // A Manual of Biochemical Methods.— N.—Y.— San Francisco—London, 1975.— P. 63—64, 104—106.
9. Eilam Y., Stein W. D. Kinetic studies of transport across red blood cell membranes // Methods in Membrane Biology.— N. Y.— London : Plenum Press, 1974.— 2.— P. 283—354.

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

Поступила 29.04.84

УДК 547.422:612.46.08

Т. П. Линник, Л. З. Верховская

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА В МОЧЕ МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ

Полиэтиленоксиды (ПЭО) находят широкое применение в качестве криопротекторов, не требующих удаления из размороженного трансфузионного биологического материала, они перспективны в качестве противоотечных средств [1, 2]. В связи с этим возникает необходимость изучения фармакокинетики, а также возможности биотрансформации ПЭО, что имеет существенное значение для объяснения поведения криопротекторов в организме. Для проведения соответствующих исследований возникает необходимость в определении молекулярной массы выводимого из организма ПЭО. Однако в литературе не удалось обнаружить метода определения молекулярной массы ПЭО в моче. Для разработки соответствующего метода был использован способ определения молекулярной массы ПЭО при помощи ИК-спектроскопии [5]. Но данный метод не предусмотрен для водных растворов. Успешное использование ИК-спектроскопии для определения молекулярной массы ПЭО возможно только в случаях применения сухого анализируемого образца, так как полоса поглощения группы воды внесет существенную ошибку в результаты определения. Считается допустимым присутствие воды не более 0,1 %. Кроме того, предложенный авторами растворитель хлороформ имеет значительный недостаток — коммерческий реактив стабилизирован присутствием 1 % спирта и требует тщательной очистки. Очистка хлороформа достаточно трудоемка, а хранение нестабилизированного хлороформа сложно, поэтому применение его в рутинных исследованиях представляется нам нецелесообразным. На основе данного метода нами разработан способ определения молекулярной массы ПЭО в моче с применением в качестве растворителя четыреххлористого углерода.

Способ определения молекулярной массы ПЭО основан на предварительном обезвоживании пробы мочи методом термической сушки, экстракции ПЭО четыреххлористым углеродом из сухого остатка и спектрофотометрическом определении отношения интенсивностей полос поглощения валентных колебаний ОН и СН₂ групп экстрагированного ПЭО.

Использовались реактивы и оборудование: четыреххлористый углерод марки ХЧ, предварительно обезвоженный по известной методике [3]; цеолит марки NaX, прокаленный при 300 °С; силикагель фирмы «Карл Цейсс Йена» (ГДР); ИК-спектрофотометр «Спекорд—75—ИР»; термостат Т-3.

Анализируемую пробу мочи объемом 1—2 мл с содержанием ПЭО в диапазоне 0,01—0,1 г в бюксе помещали в термостат, в котором находятся осушающие агенты: силикагель или безводный хлористый кальций. Пробу

мочи выдерживали в термостате при 100 °С до полного обезвоживания, т. е. до постоянного веса сухого остатка. После охлаждения к сухому остатку пробы прибавляли 2—5 мл четыреххлористого углерода и выдерживали ее в течение 24 ч. Затем отбирали необходимое количество для заполнения кюветы. Спектр снимали в диапазоне 4000—1200 см⁻¹ в кюветах из CaF₂. Толщина кювет варьировалась в зависимости от концентрации содержащегося в пробе ПЭО от 0,08 до 10,14 мм. Для определения отношения интенсивностей рассчитывали оптическую плотность в максимуме полосы поглощения ОН группы при 3470 см⁻¹. Как известно [4], данная полоса поглощения относится к колебаниям внутри- и межмолекулярной водородной связи концевых ОН групп с эфирным кислородом цепи ПЭО. При уменьшении концентрации ПЭО в пробе полоса 3470 см⁻¹ смещается в сторону больших частот, но это не вносит существенной ошибки в определение молекулярной массы. Оптическую плотность полосы поглощения симметричного валентного колебания СН₂ групп рассчитывали в максимуме при 2860 см⁻¹. Оптические

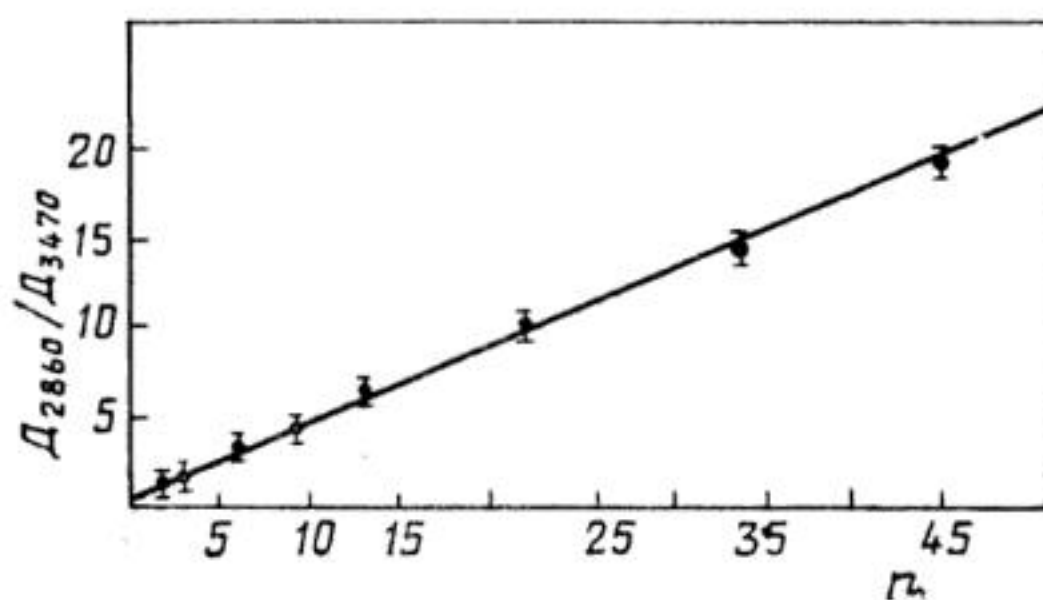


Рис. Зависимость отношения D_{2860}/D_{3470} от числа оксиэтильных звеньев

плотности указанных полос измеряли относительно базисной линии, проведенной через точку на кривой поглощения при 3800 см⁻¹ параллельно оси волновых чисел. Молекулярную массу ПЭО в пробе находили по калибровочному графику зависимости отношения D_{2860}/D_{3470} от n , где n — число оксиэтильных групп. Для построения калибровочного графика были использованы 2 %-ные растворы ПЭО в четыреххло-

ристом углероде различной молекулярной массы (106—2000), рис.

Для оценки возможного влияния термической сушки на изменение молекулярной массы проведено ее сравнительное определение у ПЭО-400, обезвоженного разными способами: в тонком слое в вакууме (м. м. равна $450 \pm 22,5$), молекулярным ситом 4А (м. м. — $445 \pm 22,2$), термической сушкой 15 %-ного водного раствора ПЭО (м. м. — $460 \pm 23,0$), термической сушкой стандартной пробы мочи с содержанием 15 % ПЭО (м. м. в этом случае равнялась $470 \pm 23,5$). Молекулярная масса ПЭО во всех случаях совпадала в пределах ошибки эксперимента.

Предлагаемый метод определения молекулярной массы ПЭО в моче хорошо воспроизводится, достаточно чувствителен, прост в исполнении, позволяет определять молекулярную массу до 2000. Ошибка определения 5—7 %. Определение молекулярной массы выводимого из организма ПЭО позволит изучить взаимодействие попадающего с трансфузионным материалом криопротектора с организмом, что имеет существенное значение для токсикологической и фармакокинетической характеристики веществ.

1. *Актуальные проблемы криобиологии.* / Под ред. Н. С. Пушкаря и А. М. Белоуса— Киев : Наук. думка, 1981.— 608 с.
2. *Бездетко П. А.* Экспериментальное исследование влияния ПЭО-1500 на внутриглазное давление // *Криобиология и криомедицина.*— 1981.— Вып. 8.— С. 75—79.
3. *Болдескул И. Е., Поволоцкий М. И., Рыльцев Е. В.* ИК-спектроскопическое исследование адсорбции воды цеолитами из растворов CCl₄ // *Журн. прикладн. спектроскопии.*— 1970.— 13.— С. 512—514.
4. *Новикова Т. И., Бакало Л. А., Липатова Т. Э.* Спектральное исследование водородных связей индивидуальных оксиэтиленгликолей // *Физико-химические свойства и структура полимеров.*— Киев : Наук. думка, 1977.— С. 71—77.
5. *Taleb-Bendiab S. A.* Determination of mean molecular weight of polyethylene glycols by several physical methods // *J. Appl. Polym. Sci.*— 1980.— 25, N 3.— P. 499—510.

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

Поступила 21.11.83

*А. И. Миляновский, В. М. Гордиенко, Г. К. Степанковская,
А. Я. Сенчук*

КРИОТЕРАПИЯ СУБЭПИТЕЛИАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА ШЕЙКИ МАТКИ

Субэпителиальный эндометриоз шейки матки нередко возникает после предшествовавшей ее травмы или диатермокоагуляции (33,7 %) и является причиной бесплодия (от 40 до 80 % больных эндометриозом бесплодны) [1, 3, 5]. Консервативные методы лечения не дают достаточного эффекта даже после полного курса гормональной терапии в течение 12—18 месяцев, эндометриозные гетеротопии полностью не исчезают, хотя и наблюдается тенденция к клиническому улучшению состояния.

Целью настоящей работы явилось изучение эффективности применения криотерапии в лечении субэпителиального эндометриоза шейки матки, поскольку в литературе есть лишь единичные сообщения о применении данного метода [4].

Под наблюдением находились 102 больных в возрасте от 21 до 54 лет (от 21 до 30 — 29, от 31 до 39 — 50, от 40 до 49 — 18 и от 50 до 54 лет — 5 больных). Причиной эндометриоза влагалищной части шейки матки у 53 больных явилась диатермокоагуляция по поводу эрозии (1 группа) и у 49 больных воспалительные заболевания матки и придатков либо травматические повреждения шейки (2 группа). У большинства обследованных женщин генеративная функция не была нарушена. Менструации протекали по типу гиперполименореи и, как правило, сопровождались болевыми ощущениями. Иногда боли внизу живота носили постоянный характер, усиливаясь в период менструации. Все больные до криотерапии лечились консервативно общепринятыми методами, и у 58 (из 102) наступило улучшение клинического течения заболевания (уменьшились боли, нормализовался менструальный цикл, у 6 наступила беременность, которая закончилась нормальными родами). У 44 больных клинического эффекта от консервативного лечения почти не наблюдалось. Во всех случаях изменения, характерные для субэпителиального эндометриоза, полному обратному развитию не подверглись, в связи с чем был применен метод криотерапии.

До лечения всем больным проводилось обследование в объеме кольпоскопии, кольпоцервикоскопии со взятием мазков для цитологического анализа. Мазки фиксировали по Май-Грюнвальду и окрашивали по Романовскому-Гимза. Для криотерапии использовали установку «Криоэлектроника-4», в которой в качестве хладагента применялся жидкий азот [2]. При обширных поражениях экзоцервикса применяли конусовидный аппликатор, при наличии одиночных эндометриоидных образований воздействие осуществляли при помощи аппликатора в виде пуговчатого зонда. Температура аппликаторов снижалась до $-125 \div -150^\circ\text{C}$ со скоростью охлаждения рабочей части 75—100 град/мин. Замораживание продолжали до расширения фронта льда примерно на 3 мм за пределы поражения, что соответствует температуре около -20°C на границе пораженной области. Отогрев происходил самопроизвольно. Все криохирургические воздействия осуществлены амбулаторно без обезболивания. Больных предупреждали о необходимости воздержания от половых контактов в течение 4 недель и возможности водянистых выделений из влагалища на протяжении 2—3 недель. Повторные цитологические и кольпоскопические исследования производились через 4—8 недель, а также через 6 и 12 месяцев после лечения.

Кольпоцервикоскопическая картина шейки матки зависела от фазы менструального цикла. В первой фазе определялись темно-красные точки, полосы, пятна, во второй фазе цикла они приобретали синюшный цвет и несколько возвышались над окружающим здоровым эпителием. В лютеиновую фазу менструального цикла целость их поверхности нарушалась, что сопровождалось темными выделениями из очага эндометриоза перед мен-

струацией. У 41 (40 %) больной отмечена эндоцервикальная локализация эндометрионидных гетеротопий, а у 61 (61 %) — только в области экзоцервикса. При цитологическом исследовании мазков определялись большие пласты поверхностного и промежуточного слоев, группы парабазальных клеток, нередко скопления лейкоцитов.

Через 4 недели после криовоздействия цитологическое исследование показало, что у большинства больных 1-й и 2-й групп наступила эпителизация очага поражения, наиболее отчетливо выраженная по периферии его. Лишь в центре обращала на себя внимание розовая блестящая «пленка» с просвечивающими тонкими извитыми сосудами. При цитологическом исследовании мазка-отпечатка определялись небольшие пласты преимущественно эпителиальных клеток промежуточного слоя, единичные парабазальные клетки и небольшое количество лейкоцитов. Через 8 недель шейка матки бледно-розовая, блестящая, поверхность ровная, место криодеструкции не определяется. При цитологическом исследовании мазков-отпечатков выявляются небольшие скопления клеток эпителия и единичные клетки промежуточного слоя, а также отдельные и группами лейкоциты. Через 6 и 12 месяцев у большинства больных 1-й и 2-й групп наблюдалась полная нормализация макроскопической картины шейки матки и цитологического состава мазка. Однако в 3 % случаев наблюдался рецидив. У больных появлялись мажущиеся выделения до и после менструации, при кольпоскопии на влажной части шейки матки определялись очаги эндометриоза, имеющие различную характеристику в зависимости от фазы менструального цикла. Цитологически определялись пласты поверхностного и промежуточного слоев эпителия. Отмечалось увеличение размеров ядер клеток промежуточного слоя. В мазках определялись скопления сегментоядерных нейтрофилов. В случаях отмеченных нами рецидивов произведено повторное криовоздействие, которое привело к полному исчезновению признаков патологии.

Таким образом, в результате криотерапии субэпителиального эндометриоза шейки матки полный клинический эффект достигнут при первичном воздействии в 97 % случаев. При сравнении метода криотерапии с ранее применявшимися консервативными методами лечения, а также с диатермокоагуляцией, криотерапия имеет явные преимущества. Полный эффект при этом методе наступает уже через 4 недели после криовоздействия, у всех пролеченных нами больных восстанавливается менструальный цикл (в детородном периоде) и нормализуется генеративная функция. Отдаленные результаты, прослеженные нами на протяжении от 1 до 3 лет, показывают эффективность криотерапии при субэпителиальном эндометриозе шейки матки, которая не исключает, однако, сочетания с консервативной терапией. В связи с вышеизложенным она может в настоящее время являться методом выбора.

1. Гиговский Е. Е., Малышева З. В. О ретроцервикальных и цервикальных эндометриозах после диатермокоагуляции эрозий шейки матки // *Акушерство и гинекология*. — 1974, № 4. — С. 72—73.
2. Гордиенко В. М., Жарков Я. В., Миляновский А. И., Муськин Ю. Н., Сенчук А. Я. Применение криохирургической установки «Криозлектроника-4» в гинекологии // *Электронная промышленность*. — 1984. — Вып. 10. — С. 73—74.
3. Железнов Б. И., Прохорова Л. М. Эндометриоз шейки матки // *Акушерство и гинекология*. — 1971, № 9. — С. 55—59.
4. Кравчук Т. А., Хамитова Ф. М. Эффективность криохирургического метода лечения патологических состояний шейки матки в комплексной терапии больных внутренним эндометриозом // *Генитальный эндометриоз*. — Горький : 1980. — С. 106—110.
5. Стрижаков А. Н., Адамян Л. В. Современные принципы диагностики и лечения генитального эндометриоза // *Акушерство и гинекология*. — 1980, № 1. — С. 57—60.

Киевский медицинский ин-т
им. акад. А. А. Семашко

Поступила 12.07.85

И. И. Ломакин

ВЛИЯНИЕ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА ТЕЧЕНИЕ ДЕПРЕССИВНОГО СИНДРОМА

В настоящее время при лечении депрессивных состояний особое внимание уделяется разработке таких методов, которые бы оказывали патогенетически ориентированное воздействие на данное психопатологическое состояние.

Метод краниocereбральной гипотермии (КЦГ), разработанный в Ин-те проблем криобиологии и криомедицины АН УССР и Харьковском НИИ неврологии и психиатрии, успешно применяется для лечения больных психозами [2]. Активное влияние КЦГ на гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему позволило применить данный метод для лечения психопатологических состояний, обусловленных функциональной нестабильностью указанной системы.

Методом КЦГ проведено лечение 30 больных с депрессивным синдромом. 1-я группа состояла из 10 больных с маниакально-депрессивным синдромом, 2-я — из 20 больных с депрессивным синдромом вследствие органического поражения центральной нервной системы (последствия закрытых черепно-мозговых травм). Оценка состояния больных основывалась на данных электроэнцефалографии (ЭЭГ), динамики психопатологических симптомов, исследовании вегетативной нервной системы по методике, предложенной Вейном А. М. и соавт. [1].

КЦГ проводилась в условиях медикаментозного сна, достигавшегося внутривенным введением седуксена и оксибутирата натрия, температура головного мозга снижалась до $30 \div 32^\circ\text{C}$ в течение 2,5—3 ч. После проведенной КЦГ у больных обеих групп отмечался полный регресс психопатологической симптоматики (исчезновение чувства тоски, тревоги, страха, замкнутости, эмоциональной и двигательной заторможенности), появились интерес к жизни, желание трудиться.

При ЭЭГ-исследовании были выявлены отличия, характеризующиеся патогенетическими особенностями указанных групп больных. У больных первой группы доминировала низкоамплитудная асинхронная активность, а у больных второй группы преобладала локальная или гомолатеральная активность. После проведения КЦГ у больных обеих групп отмечалась тенденция к нормализации ЭЭГ-показателей, однако у второй группы больных локальная активность практически сохранялась.

При исследовании вегетативной нервной системы у больных первой группы выявленная симпатикотония после КЦГ сменялась нормотонией или незначительным сдвигом в сторону парасимпатикотонии, который выявлялся только при проведении функциональных проб. Регресс депрессивной симптоматики наступал быстро и не требовал дополнительной терапии. У больных этой же группы с невыраженной парасимпатикотонией после проведения КЦГ тенденция к нормотонии выражена слабее, выход из депрессии продолжителен, однако отмечается значительное снижение терапевтической резистентности к медикаментозным препаратам.

У второй группы больных до проведения КЦГ была выявлена склонность к симпатикотонии, которая оставалась и после КЦГ. Появление у них парасимпатикотонии отмечалось лишь при нормализации температуры после КЦГ, носило преходящий характер и было обусловлено функциональным поражением стволовых структур.

Таким образом, КЦГ способствует регрессу депрессивной симптоматики. Проведенное исследование выявило возможные критерии оценки эффективности КЦГ по динамике функциональной активности вегетативной нервной системы.

1. Вейн А. М., Соловьева А. Д., Колосова О. А. Вегето-сосудистая дистония. — М. : Медицина, 1981. — 320 с.
2. Таранская А. Д., Бабийчук Г. А., Ломакин С. Г., Бачериков А. Н. Влияние различных режимов краниocereбральной гипотермии на больных шизофренией : Тез. докл. II Всесоюз. конф. «Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов», (Харьков, октябрь 1984 г.) — Харьков, Б. и. — 1984, —2, — С. 173.

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

Поступило 02.04.85

ВСЕСОЮЗНЫЙ СИМПОЗИУМ «МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И РЕГУЛЯЦИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА»

В г. Пущино на базе Института биологической физики АН СССР в июне 1986 г. проведен Всесоюзный симпозиум «Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена», организованный Научным центром биологических исследований АН СССР. В нем приняли участие представители научных учреждений и лабораторий из 32 городов страны. Подробно рассмотрены результаты исследований механизмов функционирования и регуляции основных энергопреобразующих систем в митохондриях и хлоропластах, изменения в энергетическом обмене при внешних воздействиях на изолированные митохондрии, ткани и организмы. Широко были представлены и обсуждены методические аспекты рассматриваемых проблем и вопросы временной организации энергетического обмена, а также математического моделирования периодических процессов в системах преобразования энергии.

С докладом о новых аспектах и перспективах развития биоэнергетики выступил В. П. Скулачев (МГУ). Современным представлениям о структуре и механизме цепи транспорта электронов в митохондриях посвятил свой доклад А. А. Константинов (Москва). Л. А. Блюменфельд (Москва) ознакомил участников симпозиума с физическим механизмом синтеза АТФ в биомембранах. Сообщение А. Д. Виноградова (Москва) было о молекулярных механизмах и регуляции работы H^+ -АТФазы. Транспорту ионов в клетках посвящены доклады Л. С. Ягужинского (Москва), В. П. Зинченко (Пущино) и др. О метаболических состояниях митохондрий рассказала М. Н. Кондрашова (Пущино), о функции дыхательной цепи при кислородной недостаточности — Л. Д. Лукьянова (Москва), о митохондриальных системах транспорта калия в термогенезе теплокровных — Г. Д. Миронова (Москва). С точки зрения криобиологии интересен раздел об изменении энергетического состояния митохондрий при действии различных повреждающих факторов на клетки и организмы. Представленные сообщения иллюстрировали изменения структурного состояния и функциональной активности в энергопродуцирующих системах клетки (лимфоцитах, тимоцитах, эритроцитах, гепатоцитах) при внешних воздействиях и определяли митохондрии как чувствительный индикатор жизнеспособности клеток и тканей. Изменению энергетического состояния митохондрий и клеток под влиянием низких температур, а также вопросам криопротекции органелл посвящали свои сообщения сотрудники Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР (Харьков), а также Харьковского госуниверситета. На симпозиуме рассмотрены особенности продукции АТФ в разные возрастные периоды (эмбриогенез и постэмбриональное развитие) животных. Подчеркнуты не только теоретические аспекты рассматриваемой проблемы, но и значение нарушений молекулярных механизмов и регуляции энергетического обмена в практическом здравоохранении для диагностики различных патологических состояний.

Н. П. Суббота

III. ВСЕСОЮЗНЫЙ СИМПОЗИУМ «СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ЛИЗОСОМ»

17—21 ноября в г. Тбилиси проходил III Всесоюзный симпозиум «Структура и функции лизосом», организованный Научным советом по проблеме биохимии животных и человека АН СССР, МЗ ГССР, АМН СССР. В его работе принимали участие ученые из ПНР, НРБ, ГДР, Японии, Великобритании.

Тематика представленных докладов была посвящена вопросам изучения структурных характеристик и специфических свойств лизосомальных протеиназ (Азарян А. В., Островска Г. — ПНР, Киршке Г. — ГДР); участия ферментных систем лизосом в реализации клеточного питания и обновления химического состава организма (Тутельян В. А., Гаппаров М. М., Яшида А. — Япония); состояния лизосомального аппарата клеток при различных экспериментальных и патологических процессах (Коровкин Б. Ф., Маянский Д. Н., Полякова-Крыстева О., Крыстев Л. — НРБ,

Ди н Р. — Великобритания); гормональной регуляции ферментов лизосом (Маянская Н. Н., Панин Л. Е.); биохимических эффектов различных лизосомотропных соединений (Антони Ф., Храбак А. — ВНР, Короленко Т. А., Булычев А. Г.) и др.

Результаты экспериментальных исследований изменений активности лизосомальных ферментов и уровня циклических нуклеотидов в клетке при патологическом состоянии позволили установить роль последних в регуляции структурной и функциональной организации лизосом (Коровкин Б. Ф., Полякова Э. Д., Стволинская Н. С. — Москва) и вести дальнейший поиск новых подходов и средств, способных стабилизировать лизосомальные мембраны и корректировать сдвиги в активности кислых гидролаз при экстремальных состояниях.

Новые данные о генезе лизосом представлены доктором Дамяновым (НРБ). При исследовании больных с хроническим гепатитом, собак с лигатурой общего желчного протока на фоне увеличения количества лизосом были выявлены не только все фазы отпочкования новых лизосом от цитоллизосом, но также и деление этих структур. Автор считает, что в условиях экспериментальной и клинической патологии почкование лизосом-матери является проявлением компенсаторного детоксикационного механизма клеток.

Сообщения Лугового В. И., Кравченко Л. П., Каревой Л. В., Коптелова В. А., Белоусовой Е. В. (Харьков) были посвящены вопросам изучения стабильности лизосом печени крыс, щитовидной железы быка в условиях низкотемпературного воздействия, Нардиды О. А., Загнойко В. И. — значению криповреждения лизосом в процессах угнетения белоксинтезирующего аппарата клеток.

Л. П. Кравченко

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР в 1986 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени доктора биологических наук Г. А. Бабийчуком на тему: «Механизмы нейрохимических и патофизиологических процессов в организме животных при краниocereбральной гипотермии». В ней дана детальная характеристика механизмов действия КЦГ на центральную нервную и сердечно-сосудистую системы, связи медиаторных, биоэлектрических и метаболических проявлений в реализации эффектов КЦГ; оценена роль сверхмедленных и биоэлектрических колебаний секундного диапазона в ЦНС, в центральных механизмах терморегуляции; изучены структурно-функциональные перестройки в системе гипофиз-надпочечник-миокард, а также значение изменений гемодинамических и нейрогуморальных показателей сердечно-сосудистой системы в реакциях адаптации организма.

Защищены диссертационные работы на соискание ученой степени кандидата биологических наук. В работе Г. С. Ишкова «Криомикроскопическое исследование процесса замораживания клеточных суспензий в градиенте температуры» рассматриваются зависимости критических скоростей движения и захвата в лед модельных частиц, эритроцитов человека, дрожжевых клеток и микроорганизмов от концентрации криопротекторов. Разработана аппаратура для криомикроскопических исследований взаимодействия клеток и модельных частиц с межфазной границей раздела при замораживании в градиенте температуры.

В исследовании Е. П. Жуликовой «Структурно-функциональное состояние клеток печени при охлаждении различной степени» изучена динамика некоторых структурно-функциональных показателей клеток печени при ее охлаждении до 20; 4; —5 °C и хранении в течение 3; 6; 15 и 24 часов.

На соискание ученой степени кандидата медицинских наук защищена диссертационная работа «Особенности послеоперационного периода и его коррекция при криохирургии шейки матки» В. Н. Низовым. Разработаны способы криохирургического лечения, способ сочетанного применения низких температур и переменного магнитного поля, а также аппаратуры для лечения патологии шейки матки.

УДК 57.043

Молекулярно-клеточная концепция криповреждения клетки: роль трансмембранных дефектов / Белоус А. М., Бондаренко В. А., Гулевский А. К. // Криобиология. — 1987. — № 2. — С. 3—10.

На основании анализа экспериментальных данных предложена молекулярно-клеточная концепция криповреждения клетки, утверждающая, что начальным этапом криповреждения является нарушение структуры плазматической мембраны, отделяющей внутреннюю среду клетки от наружной. Выделяются четыре фазы развития трансмембранных дефектов (ТМД) при нарушении структуры мембраны: инициация, стабилизация, увеличение размера и репарация ТМД. Указывается, что вероятность инициации ТМД зависит от исходных температурных и осмотических условий, в которых находится клетка. Ил. 7. Библиогр.: 21 назв.

УДК 577.95 : 575 : 592/599

Проблемы консервации генетических ресурсов растений / Мануильский В. Д. // Криобиология. — 1987. — № 2. — С. 11—16.

Рассматриваются проблемы консервации генетических ресурсов растений при ультранизких температурах, а также вопросы, связанные с созданием криобанка растительных объектов. Проанализированы существующие в литературе сведения о криоконсервации культуры ткани, трансплантатов, а также других тканевых объектов растительного происхождения. На основании литературных и собственных данных делается вывод о необходимости изучения процессов репарации криповреждений и их влияния на генетическую стабильность материала. Ил. 1. Библиогр.: 21 назв.

УДК 57.043 : 581.14

Ксеробиология и ее отношение к криобиологии / Голдовский А. М. // Криобиология. — 1987. — № 2. — С. 16—19.

Обосновывается необходимость выделения и развития особой области биологической науки — ксеробиологии, изучающей состояния организмов при содержании в них воды ниже пределов, обеспечивающих активную жизнедеятельность. Рассмотрена возможность использования результатов ксеробиологических исследований в криобиологии. Ил. 1. Библиогр.: 9 назв.

УДК 611.018.3 : 612.592 : 616.001.19

Деструктивные и восстановительные процессы в костной и хрящевой тканях при криовоздействии / Панков Е. Я., Малышкина С. В. // Криобиология. — 1987. — № 2. — С. 19—24.

Представлены данные литературы и исследований структурно-метаболических изменений суставного хряща головки бедренной кости и костной ткани после локального криовоздействия. Отмечено, что низкие температуры оказывают деструктивное воздействие как на клетки, так и на компоненты хрящевого матрикса — коллаген, гликозаминогликаны, гликопротеины и неколлагеновые белки. Изменения связаны с нарушением их ориентационной упорядоченности и дезорганизацией протеогликановых комплексов. Рассматриваются вопросы регенерации кости и хряща после криовоздействия. Ил. 3. Библиогр.: 14 назв.

УДК 57.043 : 577.352.4

Изучение репарации мембран митохондрий после замораживания-отогрева / Петренко А. Ю. // Криобиология. — 1987. — № 2. — С. 24—29.

Выявлены репаративные процессы в мембранах митохондрий, подвергнутых замораживанию-отогреву в среде без криопротектора. Температурозависимая репарация мембран сопровождается восстановлением эффективности окислительного фосфорилирования, не зависит от присутствия субстратов, АТФ, кислорода и разобщителя в среде хранения. Обсуждается роль спонтанной репарации мембран митохондрий в восстановлении функциональной активности клеток после действия низких температур. Ил. 6. Табл. 1. Библиогр.: 12 назв.

УДК 616—089.583.29—015.1 : 616.591 : 577.3] : 599.323.4

Изменения активности ферментов энергетического обмена эпидермиса белых крыс разного возраста при общей глубокой гипотермии и в постгипотермическом периоде / Суханов А. Ф., Мяделец О. Д. // Криобиология.— 1987.— № 2.— С. 29—33.

В экспериментах на 190 белых крысах разного возраста изучали влияние общей глубокой гипотермии на активность ферментов энергетического обмена эпидермиса. Под эфирным наркозом животных охлаждали до 18 °С со скоростью 1 °С за 4—5 мин. Активность ферментов эпидермиса изучали на глубине охлаждения, после согревания и в разные сроки постгипотермического периода. Установлено, что на глубине охлаждения наименее выраженные изменения активности ферментов наблюдались у половозрелых крыс. В постгипотермическом периоде происходило компенсаторное увеличение активности ферментов, наиболее выраженное у половозрелых и старых крыс. Табл. 3. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043 : 611.441.361.041 : 537.533.35

Ультраструктурные особенности тироцитов при различных условиях замораживания щитовидной железы человека / Говоруха Т. П., Чуйко В. А., Скорняков Б. А. // Криобиология.— 1987.— № 2.— С. 33—37.

С помощью электронно-микроскопического метода изучен характер повреждений мембранных структур тироцитов щитовидной железы после инкубации ее с криопротектором димексидом и криоконсервации. Установлено, что наибольшие повреждения обнаруживались при замораживании погружением в жидкий азот без димексида, а наименьшие — при использовании двухэтапной программы с 12 %-ным димексидом. Ил. 5. Табл. 1. Библиогр.: 8 назв.

УДК 577.122.22

Исследование методом ^{31}P -ЯМР метаболизма некоторых фосфатов эритроцитов человека при криоконсервации с 1,2-пропандиолом / Зинченко В. Д., Кнубовец Т. Л., Сибельдина Л. А., Воротилин А. М., Моисеев В. А. // Криобиология.— 1987.— № 2.— С. 37—42.

Методом ^{31}P -ЯМР изучалась кинетика распада 2,3-дифосфоглицерата (2,3—ДФГ) и накопления неорганического фосфата ($\text{P}_\text{н}$) в эритроцитах человека в процессе инкубации их без глюкозы при 37 °С после различных этапов криоконсервации с 1,2-пропандиолом. Показано, что после замораживания до —196 °С и оттаивания эритроциты содержат 2,3-ДФГ в высокой концентрации, однако в процессе инкубации без глюкозы при 37 °С уровень 2,3-ДФГ в них снижается быстрее, чем в интактных эритроцитах. При последующем отмывании от криоконсерванта скорость нарастания концентрации $\text{P}_\text{н}$ и снижения уровня 2,3-ДФГ увеличивается. Ил. 4. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043 : 612.111 : 547.422 : 546.131

Криопротекторная активность системы 1,2-пропандиол- H_2O -NaCl при разных режимах замораживания эритроцитов человека до —196 °С / Мартыненко А. А., Грищенкова Е. А., Тягилева В. П. // Криобиология.— 1987.— № 2.— С. 42—45.

С применением эритроцитов человека исследована модельная криопротекторная система 1,2-пропандиол- H_2O -NaCl в условиях замораживания от 20 до —196 °С со скоростью 1—2 °С/мин, 10—20 °С/мин и 100—200 °С/мин с последующим размораживанием при 45 °С со скоростью 250—300 °С/мин. Определены наиболее эффективные криозащитные сочетания концентраций 1,2-пропандиола-хлорида натрия и выявлено влияние соли на криопротекцию клеток. Табл. 2. Библиогр.: 9 назв.

УДК 547.422 : 612.46.08

Определение молекулярной массы полиэтиленоксида в моче методом ИК-спектроскопии / Линник Т. П., Верховская Л. З. // Криобиология.— 1987.— № 2.— С. 45—46.

Разработан метод определения молекулярной массы полиэтиленоксида (ПЭО) в моче. Способ основан на предварительном обезвоживании пробы мочи методом термической сушки, экстракции ПЭО четыреххлористым углеродом из сухого остатка и спектрофотометрическом определении интенсивностей полос поглощения валентных колебаний ОН и CH_2 групп при 3470 и 2860 cm^{-1} соответственно. Ил. 1. Библиогр.: 5 назв.

Криотерапия субэпителиального эндометриоза шейки матки / Милян-ский А. И., Гордиенко В. М., Степанковская Г. К., Сенчук А. Я. // Криобиология.— 1987.— № 2.— С. 47—48.

У 102 больных с субэпителиальным эндометриозом шейки матки применено лечение криовоздействием с использованием установки «Крио-электроника-4», осуществляемое при помощи конусовидного аппликатора, температура которого снижалась до $-125 \div -150$ °С со скоростью охлаждения рабочей части аппликатора 75—100 град/мин. Метод криотерапии субэпителиального эндометриоза шейки матки может считаться методом выбора. Библиогр.: 5 назв.

UDC 57.043

The molecular-cellular concept of cell cryoinjury : The role of transmembrane defects / Belous A. M., Bondarenko V. A., Gulevsky A. K. // Kriobiologiya.— 1987.— N 2.— P. 3—10.

Basing on the analysis of experimental results a molecular-cellular concept of cell cryoinjury has been proposed which suggests that structural changes in plasma membrane separating the cell interior from the exterior are the initial step of cryoinjury. Four phases in the development of transmembrane defects (TMD) during structural changes are outlined: initiation, stabilization, increasing the size of TMD and TMD reparation. The possibility of TMD initiation appeared to be independent of the initial temperature and osmotic conditions of the cell environment. 7. figs. Refs.: 21 titles

UDC 577.95 : 575:592/599

Problems of plant genetic resources preservation / Manuilsky V. D. // Kriobiologiya.— 1987.— N 2.— P. 11—16.

Problems of plant genetic resources preservation at ultralow temperatures as well as those associated with creation of low temperature banks of plants are considered. Literature data on cryopreservation of tissue cultures, transplantants and other tissues of plant origin have been analysed. Basing on the literature data and own experimental results a conclusion has been made about necessity of further studies on reparative processes after cryoinjury and their influence on the genetic stability. 1. fig. Refs.: 21 titles

UDC 57.043:581.14

Xerobiology and its relation to cryobiology / Goldovsky A. M. // Kriobiologiya.— 1987.— N 2.— P. 16—19.

The necessity is substantiated of isolation and development of a special scientific branch, namely xerobiology, in which the state of organisms maintaining water content is lower than that providing vital activity. The possibility of using the results of xerobiologic studies in cryobiology is considered. 1. fig. Refs.: 9 titles

UDC 611.018.3 : 612.592.616.001.19

Destructive and reparative processes in skeletal tissues after cold application / Pankov E. Ya., Malyshkina S. V. // Kriobiologiya.— 1987.— N 2.— P. 19—24.

Literature data and experimental results of studies on structural and metabolic alterations in femoral head articular cartilage after local cryoapplication are presented. Low temperatures have been demonstrated to induce destructive changes in cells and such cartilage components as collagen, GAG, glycoprotein and noncollagen proteins. The changes were found to be due to orientation disordering and disorganization of proteoglycan complexes. Problems of bone and cartilage regeneration after cryoapplication are considered. 3 figs. Refs. : 14 titles

UDC 57.043:577.352.4

Investigation of reparation of mitochondrial membranes subjected to freeze-thawing / Petrenko A. Yu. // Kriobiologiya.— 1987.— N 2.— P. 24—29.

Reparative processes have been found in mitochondrial membranes subjected to freeze-thawing without cryoprotectants. The temperature dependent reparation of membranes was accompanied with reconstitution of oxidative phosphorylation and appeared to be independent of the presence of substrates, ATP, oxygen and decouplers in the preservation medium. The role of spontaneous reparation in mitochondrial membranes in the recovery of cellular function after low temperature application is discussed. 6 figs. 1 table. Refs.: 12 titles

UDC 616—089.583.29—015.1 : 616.591 : 577.3 : 599.323.4

The activity of epidermic energy exchange enzymes of white rats of different age during and after profound hypothermia / Sukhanov A. F., Myadlets O. D. // Kriobiologiya.—1987.—N 2.—P. 29—33.

The effect of total profound hypothermia on the activity of epidermic energy exchange enzymes was studied in 190 rats of different age. Animals narcotized with ether were cooled to 18 °C at a rate of 1 °C per 4 to 5 min. The activity of epidermic enzymes was measured at the depth of cooling, after warming and in different periods after hypothermia. Minimum changes in the enzyme activity were observed in young rats at the depth of cooling. Compensating increase in the enzyme activity appeared to occur in adults and aged rats after hypothermia. 3 tables. Refs.: 9 titles

UDC 57.043:611.441.361.041:537.533.35

Ultrastructural features of thyrocytes under different regimens of freezing human thyroid gland / Govorukha T. P., Chuyko V. A., Skorniyakov B. A. // Kriobiologiya.—1987.—N 2.—P. 33—37.

Cryoinjury of thyrocyte membranes after incubation with cryoprotectant dimexide and freezing has been studied using electron microscopy. The most pronounced damage was found after freezing without dimexide by plunging the samples into liquid nitrogen. A two-step freezing program with 12 % dimexide appeared to be the most effective regimen. 5 figs. 1 table. Refs.: 8 titles

UDC 577.122.22

Investigation of metabolism of some human erythrocyte phosphates using ³¹P-NMR upon cryopreservation with 1,2-propane diol / Zinchenko V. D., Knubovets T. L., Sibeldina L. A., Vorotilin A. M., Moiseyev V. A. // Kriobiologiya.—1987.—N 2.—P. 37—42.

The kinetics of breakdown of 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) and accumulation of inorganic phosphate (P_i) has been studied in human erythrocytes during incubation without glucose at 37 °C after different steps of cryopreservation with 1,2-propane diol. The content of 2,3-DPG in erythrocytes was shown to increase after freezing to -196 °C and thawing, and to decrease during incubation without glucose at 37 °C faster than in intact cells. Removal of cryoprotectants increased the rate of growing the concentration of P_i and decreasing the level of 2,3-DPG. 4 figs. Refs.: 7 titles

UDC 57.043:612.111.547.422:546.131

The cryoprotective efficiency of 1,2-propane diol-H₂O-NaCl system for human erythrocytes frozen by different regimens to -196 °C / Martynenko A. A., Grishchenkova E. A., Tyagileva V. P. // Kriobiologiya.—1987.—N 2.—P. 42—45.

A model cryoprotective system 1,2-propane diol-H₂O-NaCl for human erythrocytes has been studied at rates of 1—2 °C/min, 10—20 °C/min and 100—200 °C/min from 20 to -196 °C and subsequent thawing at 45 °C at a rate of 250—300 °C/min. The most effective concentrations of 1,2-propane diol-NaCl have been determined as well as the effect of salt on cell cryoprotection. 2 tables. Refs.: 9 titles

DUC 547.422:612.46.08

The determination of molecular weight of polyethylene oxide in urine using IR spectroscopy / Linnik T. P., Verkhovskaya L. Z. // Kriobiologiya.—1987.—N. 2.—P. 45—46.

A method of determination of molecular weight of polyethylene oxide (PEO) in urine has been developed. The method includes preliminary dehydration of urine by thermal drying, extraction of PEO from dry residues by carbon tetrachloride, and spectrophotometric measurements of intensities of absorption bands of valent fluctuations in OH and CH₂ groups at 3470 and 2860 cm⁻¹, respectively. 1 fig. Refs.: 5 titles

UDC 618.146—002.446:615.832.97

Cryotherapy of cervix uteri subepithelial endometriosis / Milyanovsky A. I.,—Gordiyenko V. M., Stepankovskaya G. K., Senchuk A. Ya. // Kriobiologiya. 1987.—N 2.—P. 47—48.

Cervix uteri subepithelial endometriosis was treated in 102 patients using a Krioelektronika-4 unit by a conus-like cryoapplicator whose temperature was decreased in a range of -125 to -150 °C at a rate of 75 to 100 °C/min. The proposed technique can be used as a method of choice for treating cervix uteri subepithelial endometriosis. Refs.: 5 titles

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ ЖУРНАЛА «КРИОБИОЛОГИЯ»

Статья представляется в 2 экз. с сопроводительным письмом, актом экспертизы (2 экз.) и авторской справкой. Объем оригинальной статьи — не более 10, обзорной — 12 стр. машинописного текста, включая список литературы, таблицы, иллюстрации и подписи под рисунками. Объем краткого сообщения — 3 стр. Оба экземпляра статьи подписываются авторами с указанием учреждения, фамилии, имени и отчества, домашнего адреса, номера телефона, даты.

Статья печатается на машинке черной лентой через 2 интервала на белой бумаге форматом A_4 (210×297 мм). На странице не более 30 строк, в строке не более 60—62 знаков. Абзацный отступ равен 5 знакам. Левое поле страницы — не менее 25, правое — 10, верхнее — 20, нижнее — 20 мм.

В левом верхнем углу проставляется УДК, затем инициалы и фамилия автора (авторов), название статьи. Название учреждения указывается под списком литературы, слева.

В тексте ссылки на номера статей по списку литературы даются в квадратных скобках.

Иностранные фамилии и названия фирм даются в русской транскрипции.

Таблицы печатают на отдельных страницах, помещают в рукописи вслед за страницей, содержащей первую ссылку на эту таблицу. На полях проставляют номера таблиц и рисунков против тех же мест текста, где они должны быть заверстаны.

Формулы и буквенные обозначения должны быть выполнены четко, крупно, черными чернилами. Прописные и строчные буквы в формулах, одинаковые по начертанию и отличающиеся только размером, подчеркиваются: прописные буквы — двумя черточками снизу, строчные — двумя черточками сверху. Следует особенно четко вписывать сходные по написанию буквы: e и l , I и J , h и n .

Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые буквы, а также нуль, $\sin$, $\cos$, $\exp$ и т. д. размечаются на прямой набор знаком —. Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках). Разметка формул производится синей или фиолетовой пастой, греческие буквы подчеркиваются или обводятся красным карандашом, готические — синим. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) выписываются на поле (один раз) с указанием их значения.

Рисунки в количестве не более 5 выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге (или в виде фотографий). На них наносятся только необходимые условные обозначения. Расшифровка их дается в тексте или в подписи к рисунку. На обороте рисунка указывается его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и журнала.

Список литературы печатается на отдельной странице через 2 интервала и составляется в алфавитном порядке авторов, русский, затем латинский алфавит. В списке необходимо привести следующие сведения: фамилия и инициалы автора в оригинальной транскрипции, название статьи, журнала или книги и далее: для периодических изданий 1) год издания, 2) том, 3) номер, 4) номера страниц; для монографий — место издания, название издательства, год издания, общее количество страниц.

Названия периодических и продолжающихся изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНТИ.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Объем списка литературы не должен превышать 5 % общего объема рукописи.

Реферат к статье подается на русском и английском языках объемом до 0,3 стр.

Материалы направлять по адресу: 310015, Харьков-15, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, редакции журнала «Криобиология».

Продолжается подписка на 1987 год на всесоюзный научно-теоретический журнал «Криобиология». В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

Периодичность — 4 номера в год. Подписная цена: на 3 мес. — 65 к., на 6 мес. — 1 р. 30 к., на 12 мес. — 2 р. 60 к.

Выписывайте журнал «Криобиология»!

Подписка принимается в агентствах и отделениях «Союзпечать», отделениях связи и общественными распространителями печати.

Издательство «НАУКОВА ДУМКА»

Управление «СОЮЗПЕЧАТЬ» Министерства связи СССР

Наукова думка

Криобиология. — 1987. № 2. — С. 1—56