

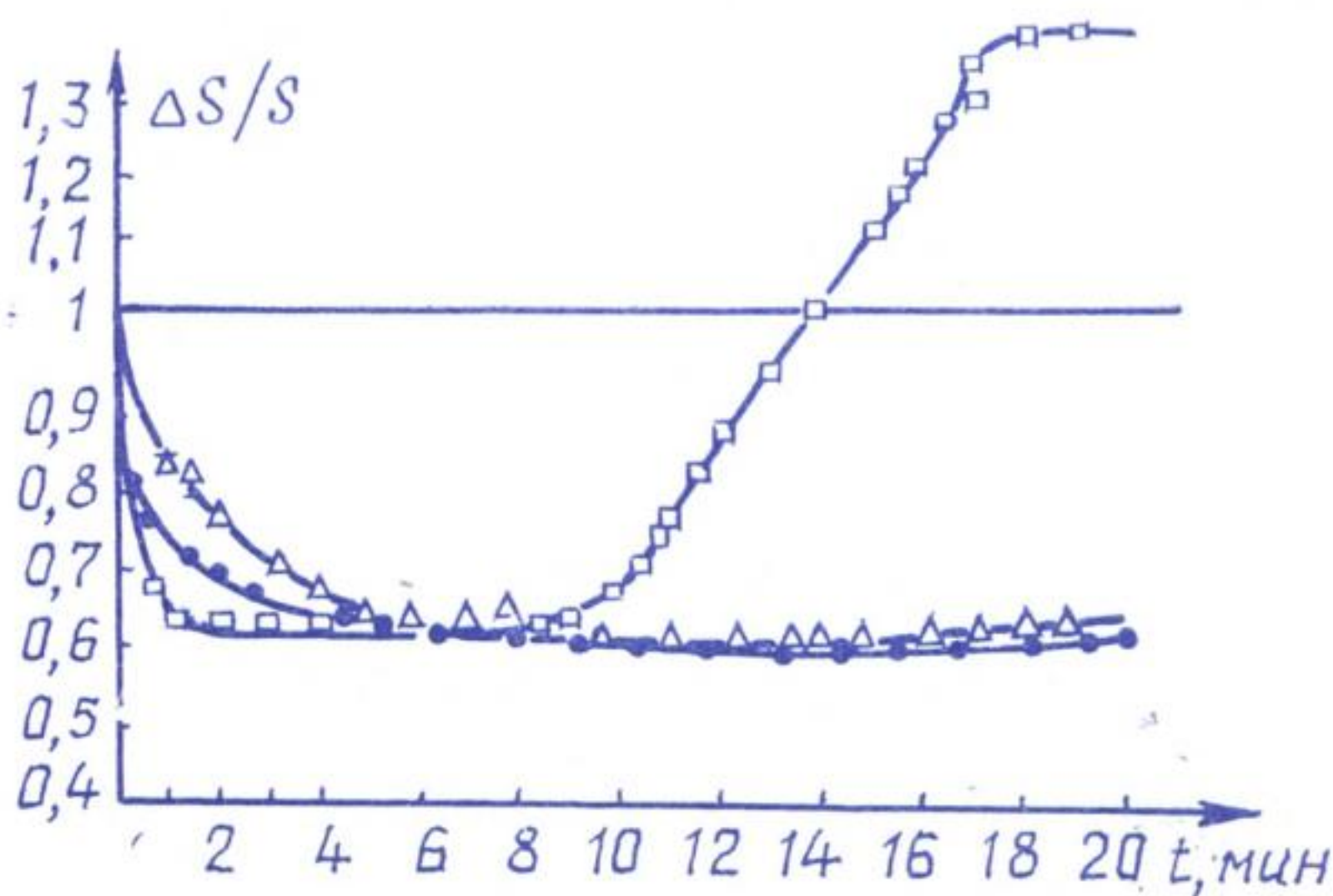
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



БЕЛОУС А.М. Роль регуляторных систем, модулирующих состояние белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии

БОНДАРЕНКО В.А., БОНДАРЕНКО Т.П., РУДЕНКО С.В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток

ГРИЩЕНКО В.И., ОСТАШКО Ф.И., ИСАЧЕНКО В.В., ИСАЧЕНКО Е.Ф., ДАХНО Ф.В., СУШКО А.Б., ПОЛЬЩИКОВ Г.Л. Получение, гипотермическое хранение, витрификация и сверхбыстрое замораживание трофобластических везикул

Главный редактор **В. И. Грищенко**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

С. И. Аксенов (Москва), Г. А. Бабийчук (Харьков), А. М. Белоус (зам. главного редактора, Харьков), М. Е. Бекер (Рига), Ю. П. Благой (Харьков), Л. Вэнг (Канада), А. Н. Гольцев (Харьков), В. М. Гордиенко (Киев), К. Дж. Грин (Великобритания), А. М. Гурин (Минск), Г. Ф. Жегунов (Харьков), В. Де Лекер (Бельгия), В. И. Луговой (Харьков), В. Я. Малеев (Харьков), Г. Маттес (ФРГ), Х. Меримен (США), П. Мнержичка (ЧСФР), Е. Я. Панков (Харьков), Ю. Ф. Пастухов (Санкт-Петербург), Ф. А. Приходько (ответственный секретарь, Харьков), Н. С. Пушкарь (Харьков), А. Роу (США), Б. П. Сандомирский (Харьков), А. С. Снурников (Харьков), С. Сумида (Япония), А. А. Цуцаева (Харьков), С. А. Шалимов (Киев), Э. З. Эмирбеков (Махачкала), Т. Н. Юрченко (Харьков)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. Д. Бугров, В. Я. Волков, В. М. Гордиенко, В. Н. Запорожан, Л. А. Калиман, В. В. Лемешко, В. Д. Мануильский, В. А. Моисеев, А. С. Попов, Н. Г. Соломонов, Ю. С. Суханов, В. В. Шенталь, М. И. Шраго

Editor-in-Chief **V. I. Grishchenko**

EDITORIAL BOARD

S. I. Aksenov (Moscow), G. A. Babiychuk (Kharkov), A. M. Belous (Associated Editor, Kharkov), M. E. Beker (Riga), Yu. P. Blagoj (Kharkov), E. Z. Emirbekov (Makhachkala), A. N. Coltsev (Kharkov), V. M. Cordiyenko (Kiev), C. J. Green (Great Britain), V. M. Gurin (Minsk), W. De. Loecker (Belgium), V. I. Lugovoj (Kharkov), V. Ya. Maleyev (Kharkov), G. Matthes (Germany), P. Mericka (CSFR), H. T. Meryman (USA), E. Ya. Pankov (Kharkov), Yu. F. Pastukhov (Sankt-Petersburg), F. A. Prikhodko (Executive Secretary, Kharkov), N. S. Pushkar (Kharkov), A. W. Rowe (USA), B. P. Sandomirsky (Kharkov), S. A. Shalimov (Kiev), A. S. Snurnikov (Kharkov), S. Sumida (Japan), A. A. Tsutsayeva (Kharkov), T. N. Yurchenko (Kharkov), L. Wang (Canada), G. F. Zhegunov

EDITORIAL COUNCIL

A. D. Bugrov, V. M. Gordiyenko, P. A. Kaliman, V. V. Lemesko, V. D. Manuilsky, V. A. Moiseyev, A. S. Popov, V. V. Shental, M. I. Shrago, N. G. Solomonov, Yu. S. Sukhanov, V. Ya. Volkov, V. N. Zaporozhan

4

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Белоус А. М. Роль регуляторных систем, модулирующих состояние белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии	3
Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Руденко С. В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток	14
Розанов Л. Ф., Смольянинова Е. И. Осмотическое поведение яйцеклеток и эмбрионов мыши: роль цитоскелета	26

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Грищенко В. И., Осташко Ф. И., Исаченко В. В., Исаченко Е. Ф., Дахно Ф. В., Сушко А. Б., Польщиков Г. Л. Получение, гипотермическое хранение, витрификация и сверхбыстрое замораживание трофобластических везикул	32
Высеканцев И. П., Тарасова О. Ф. Криоконсервирование бактерий рода <i>Haemophilus</i>	36
Стрибуль Т. Ф., Тымчук Н. Ф. Влияние низкотемпературных воздействий на всхожесть и продуктивные свойства семян сои	42

КРИОМЕДИЦИНА

Мяделец О. Д. Гистоэнзимологическое исследование иннервации кожи и регионарного лимфоузла при заживлении кожной раны, нанесенной в условиях общей глубокой пролонгированной гипотермии	46
--	----

ХРОНИКА	52
-------------------	----

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

© Институт проблем криобиологии и криомедицины АН Украины,
«Проблемы криобиологии», 1992 г.

This One



6CBG-ZNB-SA46

Матеріал, захищений авторським правом

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

- Belous A. M.* The role of regulatory systems modulating the state of cytoskeleton proteins under the temperature and osmotic effects 3
Bondarenko V. A., Bondarenko Y. P., Rudenko S. V. Dehydration effects in controlling the cold and osmotic sensitivity of cells 14
Rozanov L. F., Smolyaninova E. I. The osmotic behavior of mouse oocytes and embryos: the role of cytoskeleton 26

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

- Grishchenko V. I., Ostashko F. I., Isachenko V. V., Isachenko E. F., Dakhno F. V., Sushko A. B., Polshchikov G. L.* Isolation, hypothermic storage, vitrification and ultrarapid freezing of trophoblast vesicles 32
Vysekantsev I. P., Tarasova O. F. Cryopreservation of microorganisms of *Haemophilus* strain 36
Stribul T. F., Timchuk N. F. The effect of low temperatures on the germination and reproduction of soy-bean seeds 42

CRYOMEDICINE

- Myadelets O. D.* The histoenzymatic study on the skin and regional lymph node innervation on healing of skin wound made under total deep prolonged hypothermia 46

- CHRONICLE 52

DEFENSE OF THESES

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

Научный редактор *В. И. Луговой*
Редактор *Л. А. Рябинина*
Технический редактор *В. Н. Волкова*

Сдано в набор 17.07.92. Подп. в печ. 24.09.92. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Уч.-изд. л. 5,51. Усл. кр.-отт. 5,4. Тираж 540 экз. Зак. № 2-229. Цена 1 р. 20 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, Университетская, 16, Зак. 1472.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 57.043

А. М. Белоус

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ СИСТЕМ, МОДУЛИРУЮЩИХ СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Предпринята попытка оценить изменения некоторых регуляторных систем (ион-транспортёров, вторичных мессенджеров, АТФ и биосенсоров), участвующих в регуляции физико-химического состояния белков цитоскелета в клетке при ее охлаждении до 0 °С и действии осмотически активных соединений. Механизмы участия указанных систем в модуляции функции белков цитоскелета и цитозоля остаются во многом неясными, поэтому ряд положений в статье носит теоретический, постановочный характер.

Белковый цитоскелет, регулирующий форму и объем клетки, а также состояние поверхности мембраны, играет важную роль в сохранении таких важнейших физиологических процессов, как реализация генетической программы развития и роста, динамики структурной интеграции метаболизма, пространственного расположения молекулярных и субклеточных компонентов клетки, цитокинеза, динамики хромосом и биотрансформации энергии АТФ в клетке [18, 19]. В криобиологическом аспекте выяснение роли тех регуляторных систем, которые влияют на физико-химические свойства белкового скелета, имеет большое значение, поскольку позволяет повышать устойчивость живых систем к действию осмотических и температурных факторов в искусственных и природных условиях.

Регуляция структурного состояния белков цитоскелета в клетках находится под контролем различных макромолекулярных комплексов, локализованных в мембранных структурах клеток (например, ионные переносчики, аденилатциклаза, инозитолфосфатидный цикл), а также внутриклеточных системах, влияющих на агрегатное состояние актина и тубулина (например, актинсвязывающие и актинфрагментирующие минорные белки цитозоля). При температурном и/или гиперосмотическом действии на клетку функция указанных выше регуляторных систем, модулирующих структурное состояние белков цитоскелета, изменяется.

Известно [7, 19], что агрегатное и структурное состояния белков цитоскелета влияют на степень их ассоциации с якорными белками мембраны и, таким образом, поддерживают вязко-эластические свойства мембраны и устойчивость клетки к действию экстремальных влияний, в том числе и низких температур [2, 5]. Поэтому изучение особенностей модификации систем, которые влияют на состояние белков цитоскелета и цитозоля, имеет важное значение для разработки теории и практики холодовой адаптации и холодоустойчивости клеток.

Целью данного сообщения является попытка оценить вклад некоторых регуляторных систем (ионтранспортёров, Ca^{2+} и АТФ), участвующих в модуляции физико-химического состояния цитоскелетных белков в клетке при ее охлаждении до 0 °С и действии осмотически активных соединений.

Конкретных исследований по данному вопросу в доступной криобиологической литературе относительно мало, поэтому ряд положений в данной статье носят теоретический, постановочный характер. Вместе с тем эти материалы могут оказаться полезными при постановке и разработке

научных направлений, связанных с изучением температурно-зависимых перестроек белков цитоскелета в клетках человека и других гетеротермных животных.

Как известно [9], при восприятии различных внешних сигналов, в том числе температурных и осмотических, плазматической мембраной клетки происходит включение трех основных систем регуляции: ионотранспортирующих систем, системы метаболизма фосфатидилинозитов, аденилатциклазной системы, изменяющих содержание и соотношение вторичных мессенджеров в клетке. В результате их активации в клетках в ответ на действие экстремальных факторов возникает сложный каскад физико-химических процессов в мембранных системах и клетках в целом.

Прямо или косвенно активированные внешним сигналом указанные выше регуляторные системы влияют на состояние белков цитоскелета в клетке, которая может существенно изменять свою устойчивость к действию низких температур.

Три типа филаментов цитоскелетной системы в клетках различаются как по химическому составу, так и по своей ультраструктуре. Наиболее тонкие нити, представленные актиновыми микрофиламентами, имеющими диаметр примерно 6 нм, состоят из актина — глобулярного G-белка и находятся в цитоплазме в моно- или полимерной форме. Вторым типом — микротрубочки с диаметром 22 нм — состоит из белка тубулина. Микротрубочки содержат специфический димерный белок α и β тубулин с молекулярной массой ~ 50 кДа, а также связывающие и фрагментирующие минорные белки. Сборка микротрубочек из молекул тубулина подобна сборке актиновых филаментов. Сборка тубулина и его полимеризация *in vitro* происходят спонтанно при температуре 37°C и присутствии ГТФ, а также оптимальных концентрациях Ca^{2+} и Mg^{2+} [19, 24]. Микротрубочки, так же как и актиновые микрофиламенты, представляют собой высоколабильные структуры, чувствительные к воздействию низких температур, pH, повышенным концентрациям Ca^{2+} и различным антимитотическим агентам (колхицин, винбластин, цитохалазины, фаллоидины и др.) [25]. Полимерное состояние актина и тубулина зависит также от природы и характера их взаимодействия с минорными цитоплазматическими белками. Например, значительная доля неполимеризованного актина в лимфоцитах и тромбоцитах связана с белком профилином, который формирует легко диссоциирующий комплекс, не способный к самосборке в полимерную цепь. Поэтому в клетке часть актина находится в растворенном состоянии. Третий вид филаментов с диаметром 7—11 нм представлен так называемыми промежуточными филаментами, которые различаются в клетках разных типов. Поскольку сеть микрофиламентов контактирует с плазматической мембраной, она влияет также на свойства клеточной поверхности.

При искусственном охлаждении клеток до 0°C в присутствии осмотически активных веществ (электролитов и неэлектролитов) происходит наложение двух типов воздействий, которые как в индивидуальном, так и комбинированном вариантах способны влиять на структурно-функциональное состояние клетки в целом за счет перестройки структуры белков цитоскелета [2, 4]. Поэтому изменение структурно-функционального состояния клетки при температурно-осмотическом воздействии прежде всего выражается в изменении ее формы и размера, а на уровне мембранных систем — в сжатии или увеличении их площади [3, 6], что прямо указывает на участие в этих процессах белков цитоскелета.

Влияние температуры

Снижение температуры или осмотическое воздействие на клетку сопровождается развитием различных процессов, ведущих к изменению состояния цитоскелетных белков. Само по себе снижение температуры до 0°C (рис. 1) вызывает прежде всего изменение фазово-структурного состояния липидов, которые в клетках с низким содержанием холестерина подвергаются разделению в плоскости бислоя. Это приводит к двум

последствиям: во-первых, формированию трансмембранных дефектов (ТМД) и, во-вторых, изменению функции тех макромолекулярных комплексов, функция которых зависит от физического состояния липидов (например, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -АТФаза) [10]. В результате формирования ТМД происходит нарушение проницаемости мембран внутриклеточных органелл (митохондрии, лизосомы), а также плазматических мембран для катионов (H^+ , K^+ , Na^+) и анионов (Cl^- , OH^-), а также маркерных ферментов [4, 8]. Перераспределение ионов по обе стороны мембраны в определенных типах клеток происходит не только в результате пассивной диффузии, но и при активировании Na^+/H^+ и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменников.

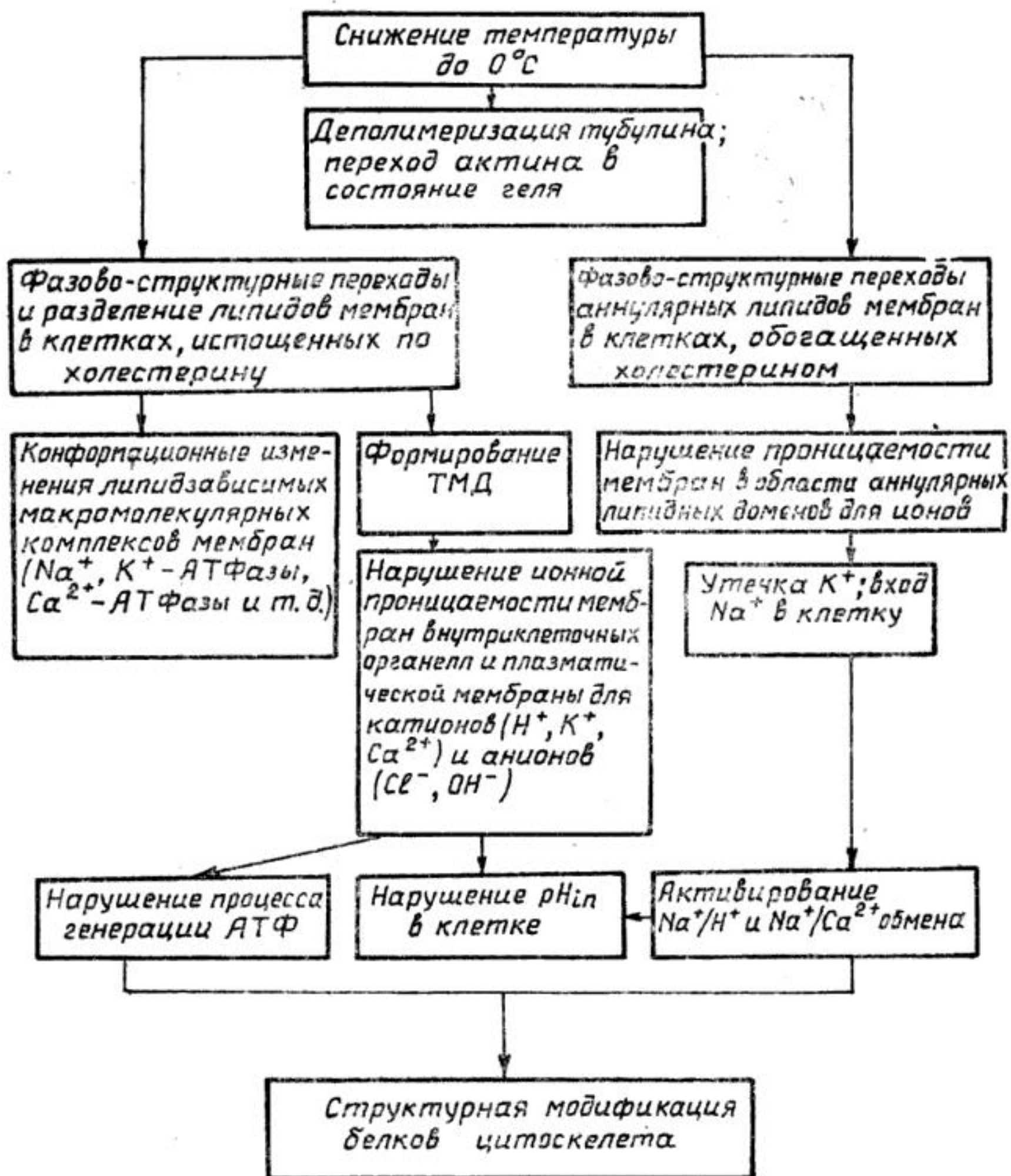


Рис. 1. Структурно-функциональные процессы в клетках при охлаждении до 0°C , вызывающие изменения свойств цитоскелета

Повышение протонной проводимости мембран митохондрий является уже достаточным фактором для разобщения дыхания и окислительного фосфорилирования. Прекращение генерации АТФ является важным фактором, влияющим на агрегатное и структурное состояние белков цитоскелета и цитозоля. Нарушение барьера проницаемости лизосомальных мембран сопровождается выходом кислых гидролаз в цитоплазму, что может вызывать деполимеризацию и гидролиз цитоскелетных белков [2, 3].

В клетках, обогащенных холестерином (например, эритроциты, лимфоциты и др.), фазово-структурные переходы происходят главным об-

разом в доменах липидов, окружающих белки, где могут формироваться каналы элиминации цитоплазматических и входа экзогенных ионов. В частности, утечка K^+ , сопровождающаяся входом в клетку Na^+ , приводит к повышению pH_{in} и активации Na^+/Ca^{2+} обменника, что способствует ходу внутрь клетки. Этот комплекс изменений сопровождается деполимеризацией актиновых филаментов, которые переходят в состояние золя. Под влиянием прямого действия низких температур ($0-4^\circ C$) происходит распад тубулина, в результате чего снижаются его связи с внутриклеточными структурами и плазматической мембраной [6, 19].

Таким образом, снижение температуры до $0^\circ C$ оказывает воздействие на состояние белков цитоскелета опосредовано через следующую систему: фазовое разделение липидов $\rightarrow$ нарушение функции белков-переносчиков $\rightarrow$ повышение барьера проницаемости $\rightarrow$ аномальное перераспределение ионов. Отдельные работы свидетельствуют [21, 23], что при охлаждении до $0^\circ C$ состояние белков цитоскелета в клетке изменяется. В частности, известно, что при охлаждении до $4^\circ C$ димерная форма спектрина *in vitro* диссоциирует на мономерную. Однако неизвестно, как реально изменяется *in situ* состояние белков цитоскелета в составе клеток при их охлаждении в широкой температурной зоне от 37 до $0^\circ C$, а также от 0 до $-25^\circ C$, когда замороженные клетки подвергаются действию «эффектов раствора» или внутриклеточной кристаллизации.

Влияние осмотических факторов

В криобиологических опытах для защиты клеток чаще всего используют гипертонические растворы электролитов и неэлектролитов, которые оказывают осмотическое давление на мембрану клеток, вызывая ее механическое напряжение, а также сжатие клеток до критического уровня. При этом в клетках происходит перераспределение анионов и катионов по обе стороны мембраны [2, 8]. На микроскопическом уровне это означает, что при сжатии клеток формируются спикеры и инвагинации (рис. 2) мембраны, в которых локализованы рецепторные и ионотранспортирующие макромолекулярные комплексы. В связи с этим функция белков, погруженных внутрь свернутой мембраны, блокируется, что отражается на состоянии внутриклеточных органелл и цитоскелета. Наиболее ярко изменение состояния белков цитоскелета при осмотическом сжатии клетки проявляется в случае подавления Na^+ -насоса, функция которого связана также с Na^+/H^+ и Na^+/Ca^{2+} -обменом.

Роль ионотранспортирующих систем

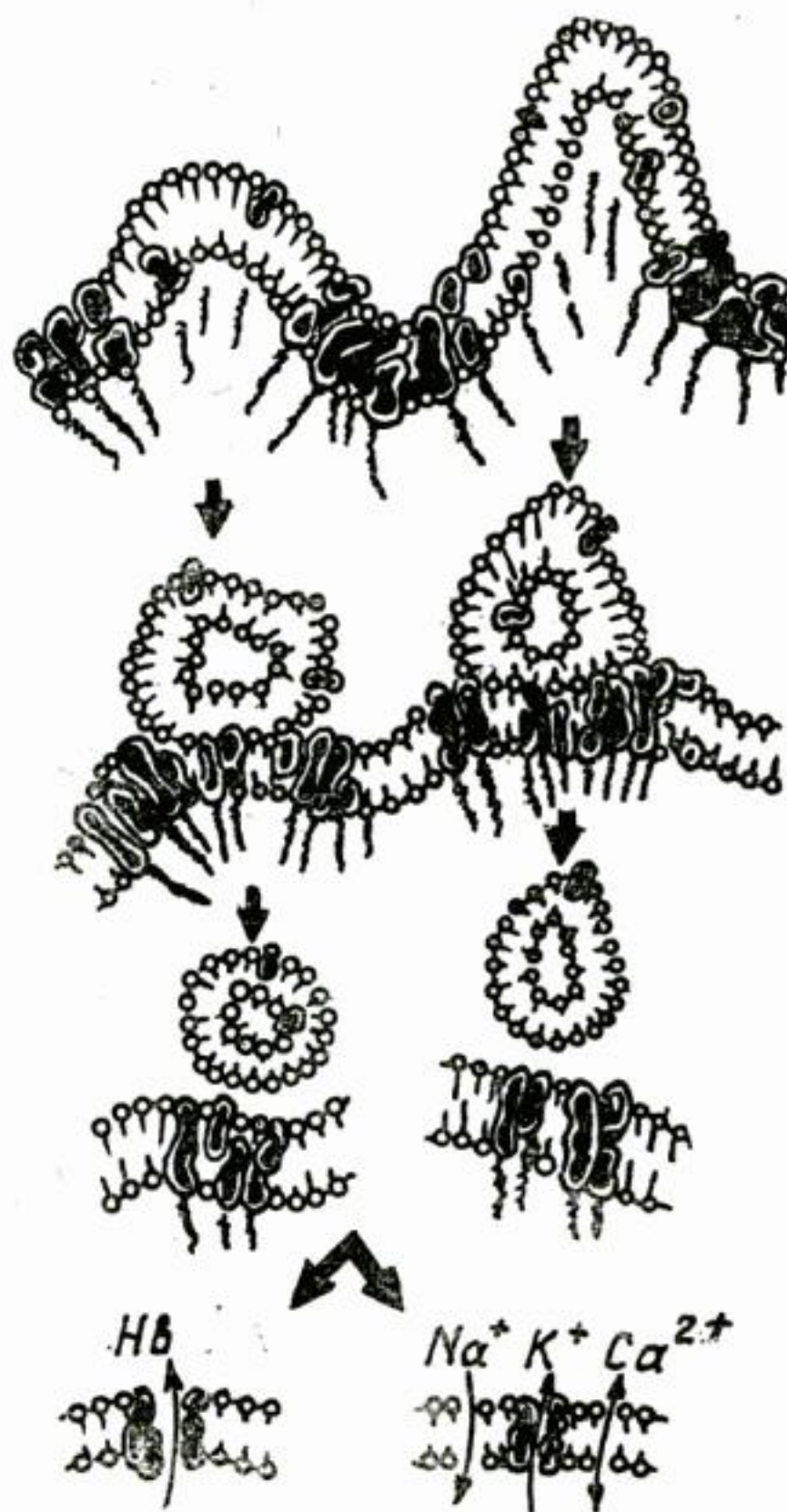
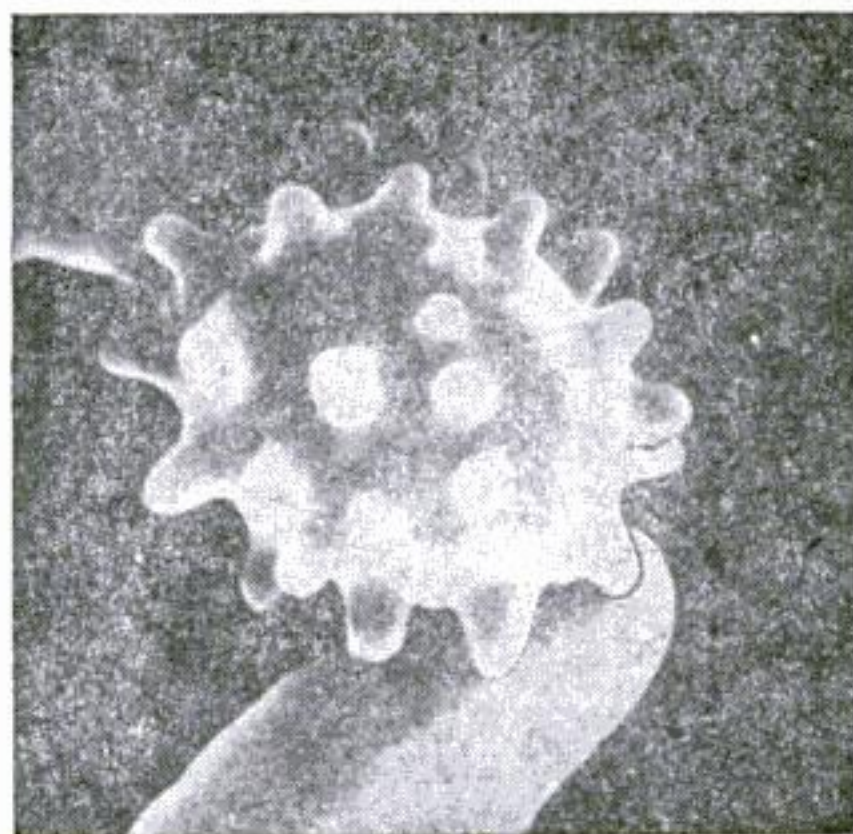
Установлено, что сжатие или увеличение объема клетки связано с изменением функции ионотранспортирующих систем плазматической мембраны, которые регулируют катионный и анионный гомеостаз цитоплазмы [13, 17]. Механизм активации ионных каналов, ведущих к перераспределению катионов и анионов по обе стороны мембраны, до настоящего времени остается неясным. Существует предположение, что очень быстрая реакция ионотранспортирующих систем в ответ на действие осмотического фактора связана с существованием в мембране биосенсоров, регулирующих клеточный объем, которые затем передают информацию на белки-переносчики. Считают [14], что в качестве возможного биосенсора могут выступать полифосфоинозитиды, которые в ответ на сжатие клеток гидролизуются с образованием вторичных мессенджеров [9]. Сейчас имеются доказательства, что при осмотическом сжатии клеток нарушается функция основной системы ионного гомеостаза клетки — Mg^{2+} -зависимой, $Na-K^+$ -стимулируемой АТФазы [1, 4], которая в большинстве клеток животных и человека выполняет роль Na^+ -насоса и является регулятором градиента концентраций одновалентных катионов. Установлено [1], что при инкубации клеток в растворе сахарозы с изменяющейся тоничностью уменьшение объема происходит дискретно и не зависит от активации или инактивации аденилатциклазы, т. е. пула

внутриклеточного цАМФ. Увеличение тоничности среды, вызывающее сжатие клетки, сопровождается торможением активности Na^+ -насоса, и наоборот. Поскольку при сжатии клетки поверхность мембраны уменьшается, количество связанных молекул убаина с мембраной становится меньше, т. е. имеется обратная связь между активностью Na^+ -насоса и количеством функционирующих АТФазных молекул в мембране.

Na^+ -насос имеет существенное значение в индукции и осуществлении фосфорилирования внутриклеточных и мембранных белков, которые модулируют транспортные, хеморецептивные и возбудимые свойства мембраны, а также состояние белкового цитоскелета. При инактивации Na^+ -насоса в результате сжатия клеток или обработки их убаином внутриклеточная концентрация АТФ и соответственно цАМФ возрастает, что способствует более интенсивному фосфорилированию белков мембраны и цитоскелета, т. е. насос-стимулированное фосфорилирование мембранных и цитозольных белков может явиться одним из механизмов, посредством которого этот ион-транспортирующий белок регулирует конформационное состояние и функциональную активность мембранных, цитоскелетных и цитозольных протеинов.

Вторым важным механизмом, при помощи которого Na^+ -насос может регулировать функциональную активность цитоскелетных белков и клеток, являются вызванные им изменения внутриклеточного ионного гомеостаза.

Рис. 2. Формирование и эволюция спикул и инвагинаций при осмотическом сжатии клеток (электронная растровая микроскопия и схема): транслокация макромолекулярных комплексов в места отрицательной кривизны мембраны и их погружение в липидный бислой; везикуляция мембраны; формирование ТМД (сверху вниз соответственно)



Так, в частности, обнаружено, что имеется тесная корреляционная зависимость между активностью Na^+ -насоса и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменом. Торможение Na^+/K^+ -насоса, вызванное увеличением концентрации Na^+ в цитоплазме или осмотическим сжатием клетки, приводит к активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, который является цАМФ-зависимым процессом. В результате активации этой обменной системы создаются условия для входа в цитоплазму экзогенного Ca^{2+} . Как видно, Na^+ -насос может влиять на внутриклеточное содержание Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен. В этом случае

увеличение концентрации $[Ca^{2+}]_{in}$ активирует внутримембранные фосфолипазы, имеющие отношение к состоянию фосфатидилинозитного цикла. Это также означает, что Na^+ -насос может опосредовано влиять на текучесть липидной фазы мембраны [1].

В эритроцитах крысы амилоридингибируемый Na^+/H^+ обмен можно индуцировать путем осмотического сжатия клеток [15] как за счет уменьшения содержания KCl в цитоплазме (добавление валиномицина), так и за счет повышения осмолярности среды (добавление сахарозы). Активация этого ионообменника происходит также после закисления цитоплазмы ($pH \sim 6,4$), хотя не ясно, каким образом передается сигнал об изменении клеточного объема на систему Na^+/H^+ обмена. Известно, что в эритроцитах крысы скорость Na^+/H^+ обмена интенсифицируется при добавлении активаторов протеинкиназ А и С и не зависит от концентрации $[Ca^{2+}]_{in}$. Хотя механизм активации Na^+/H^+ при сжатии клеток до конца не установлен, однако было выяснено, что гиперосмотическое воздействие на лимфоциты человека сопровождается фосфорилированием белка с молекулярной массой 55 кДа, локализованного на внутренней поверхности плазматической мембраны [12]. Фосфорилирование этого белка отмечается также при активировании протеинкиназ С и А при добавлении к ним стимуляторов β -форболового эфира и дибутрил-цАМФ. Так, при добавлении 1 мМ дибутрил-цАМФ или β -форболового эфира скорость входа ^{22}Na , индуцированного валиномицином, увеличивается на 70—80 % [16]. При этом стимулирующее действие этих активаторов проявляется особенно четко при сжатии клеток. В связи с этим считают, что действие активаторов протеинкиназ на Na^+/H^+ обмен опосредовано фосфорилированием гипотетического митогенного белка, который «запускает» работу Na^+/H^+ обменника. При этом в клетках, содержащих Na^+/Ca^{2+} обменник, в случае повышения $[Na^+]_{in}$ происходит увеличение концентрации внутриклеточного кальция (рис. 3).

Роль фосфорорганических соединений

Одним из активных индукторов физиологических процессов, реализующих свое действие через внешние и внутренние рецепторы, являются АТФ и АДФ. Биологическое и функциональное значение АТФ в аспекте рассматриваемой нами проблемы прежде всего выражается в том, что цитоплазматический пул нуклеотидов принимает непосредственное участие в сборке и деполимеризации белков цитоскелета, т. е. участвует в тех процессах регуляции состояния цитоскелетных и цитозольных белков, которые обеспечивают переходы клеточной цитоплазмы в направлении гель $\rightleftharpoons$ золь.

В опытах *in vitro* установлено, что в физиологическом буферном растворе в присутствии АТФ G-актин полимеризуется, т. е. отдельные момеры белка ассоциируются в длинные цепочки, образующие двойные полярные спирали F-актина — структуры более высокого порядка. Нуклеотид присоединяется к молекуле актина и подвергается гидролизу в момент ее присоединения к растущему биополимеру. Подобного рода эффекты оказывает как $[ATP]_{in}$, так и экзогенный $[ATP]_{out}$. Уровень количественного содержания АТФ в клетке влияет на прочность взаимосвязи белков цитоскелета с мембраной — по мере расходования АТФ на фосфорилирование белков степень локальной прочности ассоциации белков цитоскелета с мембраной возрастает [22], что, очевидно, связано с повышением полимеризации мономеров актина. Посредником в процессах фосфорилирования являются протеинкиназы, которые активируются цАМФ либо Ca^{2+} . Поэтому характер процессов фосфорилирования цитоскелетных и мембранных белков в условиях температурного осмотического воздействия будет зависеть от сохранения свойств и стерического расположения комплекса АТФ $\rightarrow$ фермент $\rightarrow$ структурный белок.

Важно, что АТФ, а также и Mg^{2+} являются необходимыми субстратами для фосфорилирования протеинкиназ, катализирующих перенос фосфатной группы с АТФ на аминокислотные остатки серина или треонина различных белков. В опытах на эритроцитах нами установлено [11], что при осмотическом сжатии и охлаждении эритроцитов человека уровень включения ^{32}P в белки цитоскелета увеличивается, что сопро-

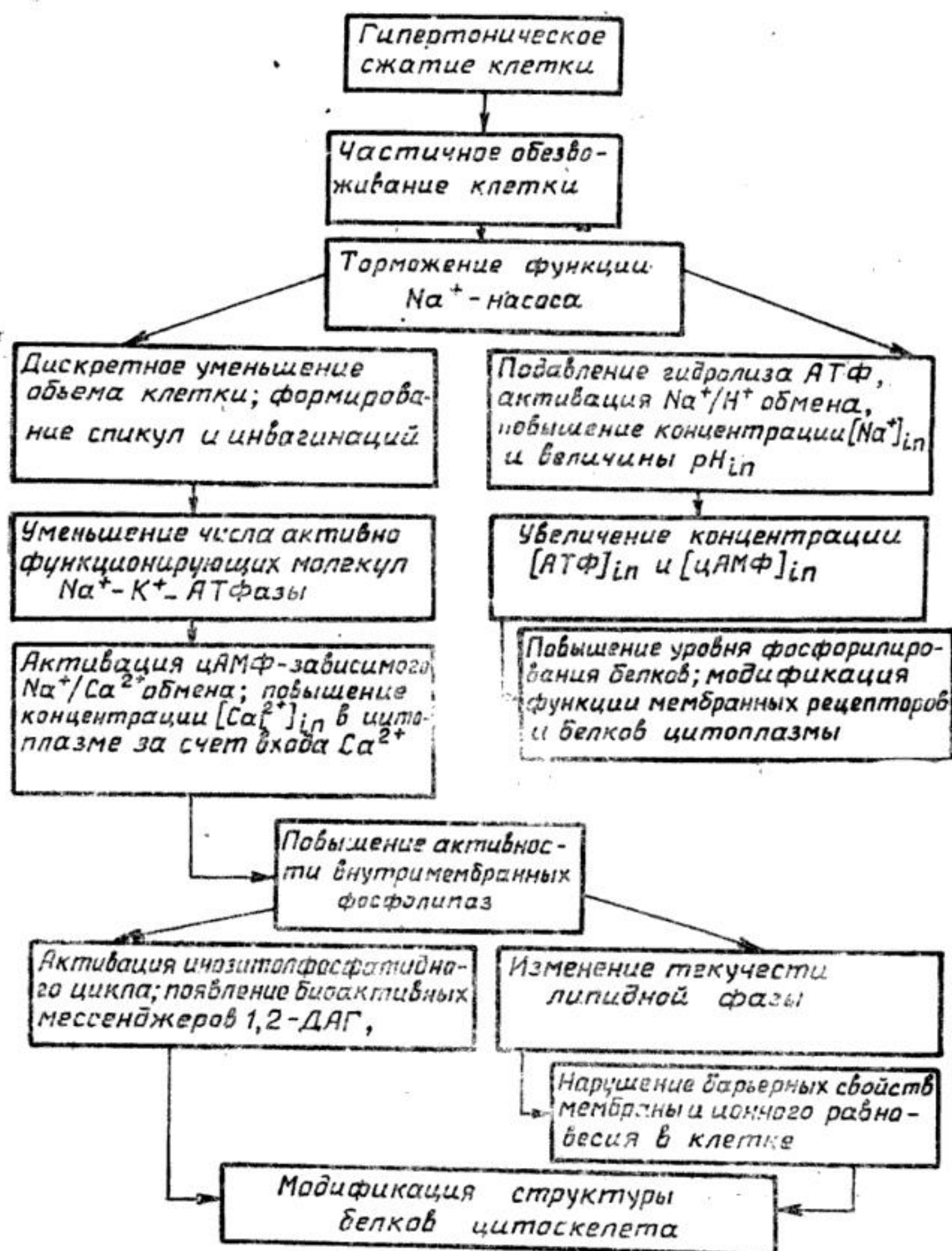


Рис. 3. Структурно-функциональные процессы в клетках при осмотическом сжатии и торможении работы Na^+ -насоса

вождается активацией цАМФ-независимой спектринкиназы. Однако в работах [14, 17] повышение включения ^{32}P в белки полос 4,9; 4,1; 2,1 и другие белки эритроцитов крысы происходило не столько под влиянием сжатия клетки, сколько в результате активации протеинкиназ с помощью β -форболового эфира и бутирил-цАМФ.

Цитоплазматические АТФ и АДФ принимают также участие в фосфорилировании специфических мембранных P_2 -рецепторов, которые сопряжены с функцией аденилатциклазы, а в некоторых клетках с функцией фосфолипазы С, которая принимает участие в гидролизе фосфоинозитидов и мобилизации $[Ca^{2+}]_{in}$, что приводит к усилению Na/H^+ обмена

На степень фосфорилирования цитоскелетных белков существенное влияние оказывает Na^+ -насос. В случае подавления его функции происходит торможение гидролиза АТФ $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазой, что сопровождается увеличением внутриклеточного содержания АТФ и цАМФ. Хорошо известно, что цАМФ принимает участие в регуляции структурного и агрегатного состояний цитозольных и цитоскелетных белков [7, 19]. Инактивация Na^+ -насоса при сжатии клетки, ведущая к увеличению внутриклеточного содержания цАМФ, приводит к модификации процесса связывания лигандов (гормоны, трансмиттеры) с соответствующими мембранными рецепторами.

Таким образом, пул фосфорорганических соединений, играющий большую роль в регуляции структурного состояния белков цитоскелета, может изменять свою функцию в условиях охлаждения и осмотического сжатия клетки.

Роль кальция и системы фосфатидилинозитидов

Внутриклеточный гомеостаз Ca^{2+} играет существенную роль в жизнедеятельности клетки. Ca^{2+} является одним из ключевых регуляторов таких внутриклеточных процессов, как выброс гормонов и медиаторов, сокращение белков цитоскелета, мембранная возбудимость и т. д. [12, 20]. Значение ионов Ca^{2+} заключается в том, что в ионизированном состоянии они влияют на структурно-функциональное состояние белков цитоскелета, цитозоля и ряда белков, интеркалированных в липидный бислой плазматических (фосфолипазы, Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы) и других мембранных структур (митохондрии, лизосомы). Важно то, что переходы цитоскелетных и цитозольных белков гель $\rightleftharpoons$ золь в цитоплазме клеток очень чувствительны к изменению концентрации $[\text{Ca}_i^{2+}]_{\text{in}}$ и ее повышение до $10^{-7} - 10^{-5}$ М ведет к деполимеризации актинового геля и распаду микротрубочек. Обычно в состоянии покоя концентрация Ca^{2+} в цитоплазме клетки составляет $\sim 10^{-8}$ М и ниже, а при ее увеличении от 1 до 1000 мкМ сопровождается повышением проницаемости мембраны для калия в результате открытия кальций-зависимых K^+ -каналов Гардоша. Повышение потока K^+ из цитоплазмы ведет к гиперполяризации мембраны. Поддержание концентрации ионизированной формы $[\text{Ca}_i^{2+}]_{\text{in}}$ обеспечивается кальций-связывающими белками (кальмодулин, саркоплазматический ретикулум (СПР), митохондрии, а также работой Ca^{2+} -АТФазы, которая контролирует уровень ионов в цитоплазме. В случае активации Са-транспортирующих систем или повышения Ca^{2+} под влиянием эндогенных (гормоны) и экзогенных (температура, деполяризация мембраны, ксенобиотики) уровень ионизированного Ca^{2+} повышается за счет выхода Ca^{2+} из депо СПР, кальмодулина и других Са-связывающих белков. Повышение уровня $[\text{Ca}_i^{2+}]_{\text{in}}$ может произойти в результате включения функции Na^+ -насоса, поскольку в этих условиях активируется $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен и $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ входит в цитоплазму. Наконец, важным механизмом, ведущим к повышению концентрации $[\text{Ca}_i^{2+}]_{\text{in}}$ является активация системы фосфатидилинозитидов, локализованных в плазматической мембране клеток.

Принцип реагирования системы фосфатидилинозитидов заключается в том, что в результате активации некоторых типов рецепторов внешним сигналом через ГТФ-связывающий белок информация передается на фосфолипазу С, специфичную для фосфатидилинозитов. В результате гидролиза фосфатидилинозитов образуется два вторичных мессенджера — липофильный 1,2-диацилглицерин (1,2-ДАГ), который локализуется в мембране, и водорастворимый низкомолекулярный инозитотрифосфат, поступающий в цитозоль.

Липофильный 1,2-ДАГ активирует фосфолипазу A_2 и протеинкиназу С, которая является ключевым ферментом, осуществляющим фосфорилирование белков. Инозитолтрифосфат, связываясь с рецепторами на поверхности ЭПР, вызывает освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных

депо. Под действием диацилглицеринкиназы 1,2-ДАГ превращается в фосфатидную кислоту, которую относят к веществам, обладающим Са-ионоформными свойствами. При ее накоплении на мембране поток Ca^{2+} в цитоплазму клетки увеличивается. Видно, что система метаболизма фосфатидилинозитов может регулировать внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} двумя путями: как увеличением потока $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ через плазматическую мембрану, так и за счет выхода $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ из внутриклеточных белковых депо. Важное значение имеет то обстоятельство, что такие Ca^{2+} -связывающие белки, как кальмодулин и белки саркоплазматической мембраны, являющиеся быстрым и эффективным буфером этого катиона, отвечают за эффект повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ при снижении внутриклеточного pH, поскольку Ca^{2+} и H^+ конкурируют за общие места связывания в цитоплазме.

Согласно данным [12], вход Ca^{2+} через мембрану тимоцитов крысы может быть активирован путем прямого увеличения pH_{in}, например с помощью наружного воздействия NH_4Cl или путем повышения концентрации $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$, что происходит в результате активирования Na^+/H^+ -обменника. По данным работы [17], осмотическое сжатие эритроцитов сопровождается усилением включения ^{32}P в три- и дифосфатидилинозиты, причем оно более выражено в эритроцитах крысы, в которых имеется система Na^+/H^+ обмена, активирующаяся при уменьшении объема клетки. В связи с этим можно считать, что фосфатидилинозитный ответ вовлечен в механизм внутриклеточной сигнализации при изменении формы и объема клетки. При этом активация Na^+/H^+ -обмена может привести к двум последствиям: во-первых, к увеличению внутриклеточной концентрации Na^+ и защелачиванию цитоплазмы в результате элиминации протонов из клетки и, во-вторых, к интенсификации входа $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ в клетку. Это важно, так как повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$, так же как и АТФ, оказывает влияние на конформационное состояние и способность к ассоциации различных внутриклеточных фрагментирующих и стабилизирующих минорных белков, принимающих участие в полимеризации белков цитоскелета.

Таким образом, переход мономерной формы G-актина в полимерную (F-актин) зависит от концентрации АТФ и ионного состава среды. Для перехода гель⇌золь необходимо присутствие Mg^{+2} и Ca^{2+} . Ионы кальция, равно как и другие поливалентные катионы, тормозят процесс перехода актина и тубулина из состояния золь в гель. В этих процессах играют существенную роль кальций-депонирующие белки кальмодулин и кальдесмон, в присутствии которых скорость полимеризации актина увеличивается в 10—20 раз [25]. При этом эффективностью обладает комплекс кальмодулин- Ca^{2+} , а кальдесмон *in vitro* индуцирует полимеризацию G-актина лишь в растворах с низкой ионной силой (рис. 4).

В криобиологическом аспекте белки цитоскелета можно рассматривать в качестве материальной основы, регулирующей стабильность (или нестабильность) клеток при искусственном воздействии на них охлаждения (до 0 °C), низких температур (вплоть до —196 °C) и осмотически активных соединений электролитной и неэлектролитной природы. Из приведенного материала следует, что функция и структурное состояние белков цитоскелета находятся под контролем различных регуляторных систем клетки, о значении и последовательности действия которых практически мало известно. Если проанализировать схему ингибирования лишь одного фермента в мембране (Na^+ -насоса), то можно увидеть, к каким сложным последствиям в клетке приводит выключение или активация функции этого переносчика при осмотическом сжатии клетки. Однако многие механизмы, приводящие к изменению функционального и агрегатного состояний белков цитоскелета и цитозоля в условиях охлаждения и осмотического шока, также не изучены в той мере, которая была бы достаточна для определения закономерностей функции регуляторных систем, модулирующих состояние белков цитоскелета в указанных выше экспериментальных условиях.

Система цитоскелетных белков, по всей видимости, принимает активное участие в перестройке метаболизма и структурных параметров клеток пойкилотермных и гибернирующих животных, переход которых в зимнюю спячку сопровождается довольно значительным подавлением обмена веществ и физиологических функций. Известно, что зимняя спячка инициируется различного рода индукторами — триггерами спячки (нейротрансмиттеры и нейропептиды), которые являются пусковыми факторами в этом процессе и обеспечивают как сон, так и, по всей видимости, торможение клеточного метаболизма. Действие этих и, возможно, других белковых триггеров и индукторов скорее всего реализуется через

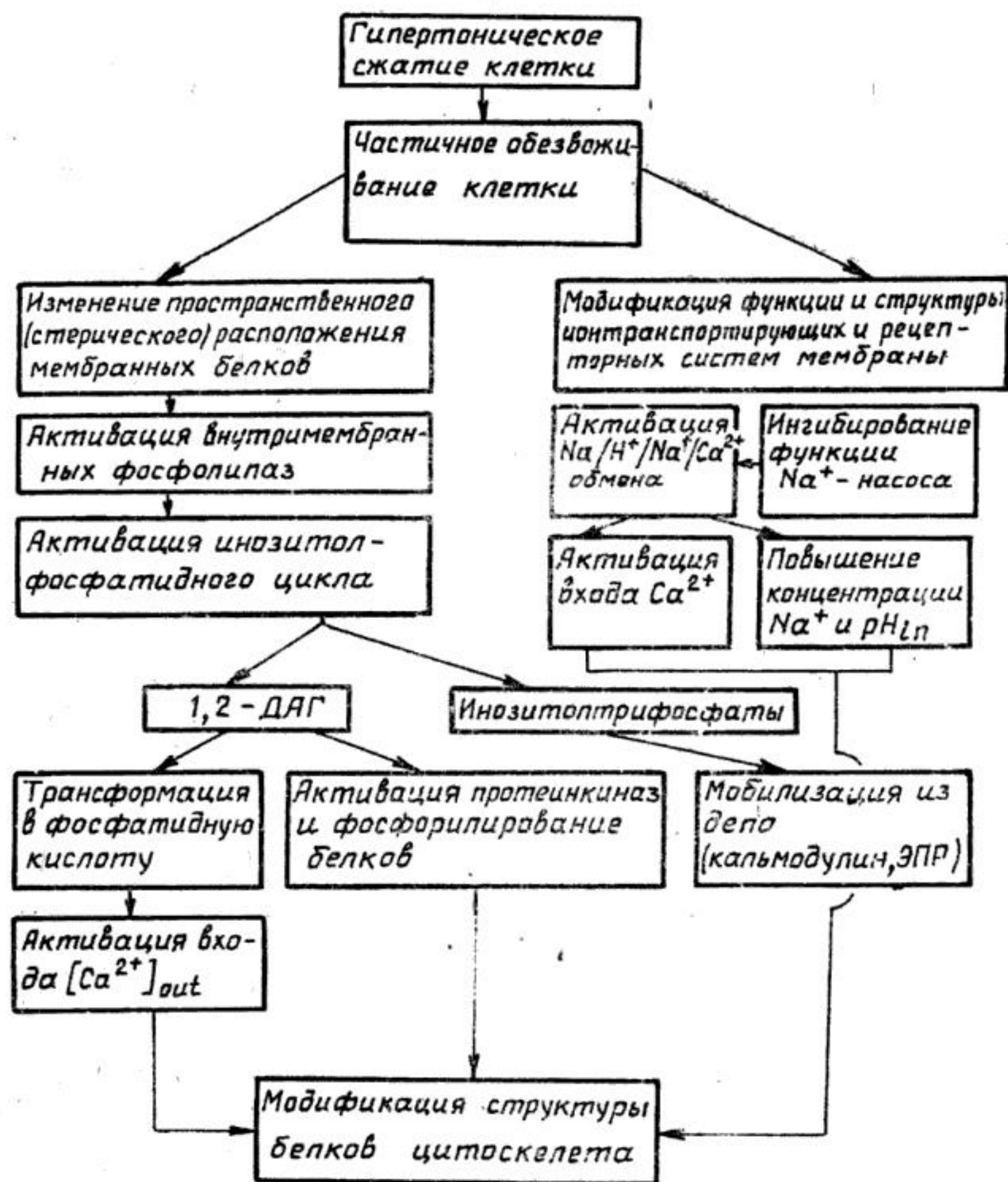


Рис. 4. Роль Ca^{2+} в модификации структуры белков цитоскелета при осмотическом сжатии клеток

сигнальные системы клеток (аденилатциклазу, вторичные «мессенджеры»), которые, очевидно, изменяют уровень метаболизма через механизм перестройки структурного и полимерного состояния белков цитоскелета и цитозоля. Нельзя исключить, что в этих перестройках принимают участие ионотранспортирующие, энергетические и биосинтетические (синтез белков и РНК) процессы, а также минорные белки, способствующие формированию гелеобразной полимеризованной стабильной трехмерной белковой сети, которая в стадии глубокого сна животных сильно тормозит процессы метаболизма. При этом остается неясным, происходит ли при этом синтез минорных белков в клетках животных, регулирующих

полимеризацию актиновых микрофиламентов, или пул этих белков существует в цитоплазме в достаточном количестве для перевода цитоскелетных белков в состояние золь→гель при вхождении животных в состояние спячки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айрапетян С. Н. Новая теория метаболической регуляции функциональной активности мембран // Метаболическая регуляция функций мембран.— Ереван: Изд. АН Армении, 1990.— С. 8—32.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криоповреждений мембран // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Биофизика.— 1978.— 9.— С. 80—114.
3. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка, 1982.— 254 с.
4. Белоус А. М. Кинетические свойства ион-транспортирующих систем после охлаждения и замораживания // Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования.— Киев: Наук. думка.— 1984.— С. 86—102.
5. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Гулевский А. К. Молекулярно-клеточная концепция криоповреждений клетки: роль трансмембранных дефектов // Криобиология.— 1987.— № 2.— С. 3—11.
6. Бондаренко В. А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов / Дис. ... докт. биол. наук.— Харьков, 1988.— 446 с.
7. Вебер К., Осборн М. Молекулы клеточного матрикса // В мире науки (Scientific American).— 1985.— № 12.— С. 62—77.
8. Гулевский А. К. Барьерно-транспортные свойства плазматических мембран в процессе криоконсервирования // Дис. ... докт. биол. наук.— Харьков, 1986.— 374 с.
9. Дорофеев Г. И., Кожемякин А. А., Ивашкин В. Т. Циклические нуклеотиды и адаптация организма.— Л.: Наука, 1978.— 182 с.
10. Жегунов Г. Ф. Влияние замораживания-отогрева и криопротекторов на структурно-функциональное состояние Са-транспортирующего ретикулума // Дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1979.— 145 с.
11. Землянских Н. Г. Структурно-функциональные изменения мембран эритроцитов в процессе криоконсервирования под защитой ПЭО-1500 // Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1991.— 19 с.
12. Ляшенко В. А. Внеклеточные и внутриклеточные сигналы активации лимфоцитов // Внутриклеточная сигнализация. М.: Наука, 1988.— С. 127—139.
13. Орлов С. Н. Транспорт одновалентных катионов через плазматическую мембрану клеток электрически невозбудимых тканей // Успехи современной биологии.— 1985.— 100, № 5.— С. 203—218.
14. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Котельцев Ю. В. Транспорт калия, анионов и активности Na^+ -насоса мембраны эритроцитов: три различных механизма регуляции внутриклеточным кальцием // Биохимия.— 1987.— 52, № 8.— С. 1377—1390.
15. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Рязжский Г. Г. Кинетические характеристики транспорта ^{22}Na в эритроцитах человека и крысы при закислении цитоплазмы и сжатии клеток // Биохимия.— 1988.— 53, № 4.— С. 637—641.
16. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Рязжский Г. Г. и др. Валиномицин индуцирует Na^+/H^+ -обмен в эритроцитах крысы: влияние активаторов протеинкиназа А и С // Биол. мембраны.— 1987.— 4, № 10.— С. 1036—1046.
17. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Котелевцев Ю. В. и др. О механизме индукции ионного транспорта при сжатии эритроцитов // Внутриклеточная сигнализация.— М.: Наука, 1988.— С. 118—126.
18. Поглазов Б. Ф., Бурнашева С. А. Немышечные двигательные системы // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Биологическая химия.— 1989.— 29.— 175 с.
19. Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки.— М.: Мир, 1987.— 117 с.
20. Dustin P. Microtubules // Sci. Amer.— 1980.— 243, № 2.— P. 66—76.
21. Elgaster A., Shotton D. M., Branton D. Intramembrane particle aggregation in erythrocytes ghosts. 2. The influence of spectrin aggregation // Biochem. Biophys. Acta.— 1976.— 426, № 1.— P. 101—122.
22. Kirpatrick F. H. Spectrin: current understanding of its physical, biochemical and functional properties // Life Sci.— 1976.— 19, № 1.— P. 1—4.
23. Marchesi V. T. Spectrin: present status of a putative cytoskeletal protein in the red cell membrane // J. Membrane Biol.— 1979.— 51, № 2.— P. 101—133.
24. Schliva M., Euteneuer U., Bulinski J. C. et al. Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins // Proc. Natl. Sci. USA.— 1981.— 78.— P. 1037—1041.
25. Scholey I. M., Taylor K. A., Kendrick-Jones J. Regulation of nonmuscle myosin assembly by calmodulin-dependent light chain kinase // Nature.— 1980.— 287.— P. 233—235.

A. M. BELOUS

THE ROLE OF REGULATORY SYSTEMS MODULATING THE STATE OF CYTOSKELETON PROTEINS UNDER THE TEMPERATURE AND OSMOTIC EFFECTS

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

An attempt has been made to assess changes in some regulatory systems (ion transporters secondary messengers, ATP and biosensors) participating in the regulation of physico-chemical state of cytoskeleton proteins in the cell upon cooling to 0 °C and under the effect of osmotically active compounds. The mechanisms of participation of the systems in the modulation of the function of cytoskeleton and cytosol proteins remain unclear, so some suggestions are of a discussion character.

A. M. БІЛОУС

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНИХ СИСТЕМ, КОТРИ МОДЕЛЮЮТЬ СТАН БІЛКІВ ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧНОМУ ВПЛИВІ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м. Харків

Зроблено спроби оцінити зміни деяких регуляторних систем (іонотранспортерів, вторинних месенджерів, АТФ та біосенсорів), які беруть участь в регуляції фізико-хімічного стану білків цитоскелета в клітині при її охолодженні до 0 °C та дії осмотично активних сполук. Механізми участі вказаних систем у модуляції функції білків цитоскелета і цитозоля залишаються переважно не з'ясованими, тому ряд положень у статті носить теоретичний, постановчий характер.

УДК 57.043

В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко, С. В. Руденко

ЭФФЕКТЫ ДЕГИДРАТАЦИИ В КОНТРОЛЕ ХОЛОДОВОЙ И ОСМОТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК

Обзорная статья, в которой обсуждается проблема холодовой и осмотической чувствительности клеток, связанная с гелевой природой их цитоскелета. В качестве первичного фактора при холодовом и осмотическом повреждении рассматривается дегидратация. Делается вывод о том, что универсальный подход к обеспечению криоустойчивости клеток заключается в обеспечении условий, при которых клетка обладает максимальной стабильностью при осмотической дегидратации. При этом дегидратация клеток является фактором, управляющим состоянием цитоскелета. Гелевая природа цитоскелета ставит на первый план такие факторы, как осмотическое давление, ионная сила, pH и температура, являющиеся ключевыми для криобиологов. Делается вывод, что углубленный анализ криобиологических явлений требует новых подходов, для которых наиболее перспективными являются представления о живой клетке как системе, структура которой представляет собой гель.

Дегидратация как первичный фактор при холодовом и осмотическом воздействии. Многие годы исследователи, работающие в области криобиологии, основные усилия направляли на раскрытие механизмов того, что заключено в понятии «криоповреждение». За этим понятием скрывались представления о специфическом характере криоповреждений, т. е. о их непосредственной связи с процессами, развивающимися при замораживании. Однако в последние годы стало ясно, что специфический характер криоповреждений может являться таковым только в случае, когда повреждение вызывается собственно изменением температуры, а не действием сопутствующих факторов, таких как осмотическая дегидратация, высокая ионная сила, сдвиг pH и т. д. Это с очевидностью вытекает из того, что действие последней группы факторов может быть оценено в «модельных» экспериментах, которые легко осуществить при положительных температурах, когда отсутствует кристаллизация водной фазы [4].

Роль кристаллизации как фактора, способного непосредственно воздействовать на клетки, также могла бы рассматриваться как специфический элемент механизма криоповреждений, однако существующие данные по поводу влияния кристаллов льда на клетки чрезвычайно противоречивы, что не дает возможности однозначно высказаться не только по поводу специфичности, но и по поводу конкретной роли данного фактора. Из всего этого следует, что более адекватным для оценки криобиологических процессов является выяснение роли того или иного фактора по степени его вклада в общий уровень повреждений, а не по степени его специфичности.

Имеющиеся данные показывают, что повреждение клетки является, в первую очередь, следствием ее дегидратации и, во вторую, следствием такого фактора, как температурный сдвиг [1]. В простейшем случае это доказывается универсальностью такого феномена, как изотермический лизис клеток [11]. В то же время повреждение, связанное с температурным сдвигом, т. е. холодовой шок, является процессом, проявляющимся в достаточно узком диапазоне температур и осмолярности среды [1]. И как это ни парадоксально, в большей степени определяющимся тем, насколько клетка устойчива к действию неблагоприятных факторов в исходных условиях перед сдвигом температуры, а не тем, насколько глубоко развиваются в ней изменения при последующем сдвиге температуры. Именно поэтому холодовой шок «снимается» в условиях, когда на предварительном этапе осмотическое воздействие становится более интенсивным. В этом случае развивается изотермический лизис и последующее охлаждение уже не вносит какого-либо дополнительного вклада в общий уровень повреждения клеток [4]. Из всего этого следует один очень важный вывод, заключающийся в том, что универсальный подход к обеспечению криоустойчивости клеток должен заключаться в обеспечении условий, при которых клетка обладает максимальной стабильностью при осмотической дегидратации.

Решение этой задачи непосредственно связано с необходимостью раскрытия механизма повреждения клеток при дегидратации, а также с выявлением исходных условий, обеспечивающих высокую устойчивость клеток к осмотическим воздействиям. При этом под осмотическим воздействием мы должны понимать такие значения осмолярности (тоничности) среды, при которых развивается изотермический лизис клеток («диапазон изотермического лизиса»). Например, в случае эритроцитов человека это соответствует значению тоничности растворов хлористого натрия выше 2,7 М [1]. С учетом этого в качестве условного содержания понятия «исходные условия» мы можем принять значения осмолярности в интервале от физиологических до 2,7 М («диапазон исходных условий»). Подобное деление является условным в том плане, что изотермический лизис клеток зависит не только от осмолярности среды, в которую попадает клетка, но и от таких факторов, как продолжительность пребывания клеток в этой среде, состав среды, температура, рН и т. д. В зависимости от комбинации условий и типа клеток диапазон исходных условий, в пределах которого не развиваются изотермические повреждения, может существенно сужаться и в ряде случаев лишь незначительно отклоняться от физиологических параметров [2]. К этому следует добавить еще один важный момент — изменение осмолярности в пределах исходного диапазона сопровождается дискретными переходами состояния клеток. Это позволяет говорить о том, что клетка в зависимости от исходных условий может последовательно переходить в состояния, которые резко отличаются от физиологической нормы по чувствительности к последующим изменениям параметров окружающей среды в широком диапазоне [1]. Следовательно, можно говорить о возможности направленного контроля и управления холодовой и осмотической чувствительностью клеток.

Влияние дегидратации на клетку. Главным следствием осмотической дегидратации клеток является изменение поверхностно-объемного отно-

шения, т. е. увеличение площади поверхности по отношению к объему клеток. В результате возникает проблема организации избыточной поверхности в новую макроскопическую структуру, которая отличается от исходной как по своей пространственной организации, так и по характеру взаимодействия с цитоскелетом. Например, в гипертонических средах на мембране клеток *Hela* наблюдается образование многочисленных складок, и в этом случае поверхностная площадь при изменении объема на 47—50 % возрастает в 2,59 раза [5]. В умеренно гипертонических средах эритроциты кренируют, а при более высоких значениях тоничности (0,7 М и выше) — трансформируются в плоские уплощенные формы, отличающиеся низкой устойчивостью к сдвиговому воздействию [1]. Важно отметить, что указанная граница тоничности представляет собой критическую область, при переходе через которую эритроциты теряют способности неидеально отвечать на изменения осмолярности среды и ведут себя как идеальные осмометры [13]. Это указывает на наличие в этих клетках «структурного» механизма, регулирующего осмотическое поведение. При переходе через критическую область осмолярности происходит нарушение механизма регуляции, и клетки теряют способность сопротивляться изменениям осмотических условий [13]. В то же время хроматинные гранулы в интервале осмолярности 300—1000 мОсм ведут себя как идеальные осмометры, что указывает на их пассивное поведение в этих условиях по сравнению с такими клетками, как эритроциты [14].

Реакция клеток на обезвоживание зависит от скорости, с которой изменяется осмолярность среды. При быстром изменении осмолярности можно говорить о гиперосмотическом шоке, степень проявления которого зависит от реакции цитоплазматических элементов и, прежде всего, компонентов цитоскелета. При быстром осмотическом сжатии клетки *Hela* не проявляют упругих свойств, и результатом такого воздействия является формирование эндоцитирующих вакуолей [5]. Быстрая скорость оттока воды при осмотическом шоке неизбежно ставит клетку в условия, когда в ней возникает сильное отрицательное давление, которое нельзя сравнить с эффектами гидростатического давления, прикладываемого снаружи, т. е. сильным положительным давлением. При этом важно отметить, что при осмотическом шоке вода удаляется посредством осмоса, а не выдавливается посредством «самокомпрессии» цитоплазмы. Следствием этого является дегидратация цитоплазматического геля, которая способна привести к коллапсу цитоплазмы. Такое состояние характеризуется появлением отчетливых границ в некоторых областях клетки, например в зоне исключения цитоплазмы вокруг микротрубочек или в непосредственной близости к периферии клетки [5].

Последнее позволяет говорить о том, что коллапс связан с фазовым разделением цитоплазматического геля, и этот процесс затрагивает как элементы цитоскелета, так и области, в которых цитоскелет взаимодействует с мембраной. Кренирование эритроцитов также сопровождается частичным откреплением цитоскелета от мембраны [19], поэтому можно говорить, что изменение поверхностно-объемного отношения, которое сопровождается формированием складок и спикул, способно привести к частичному откреплению белкового скелета от мембраны. На роли этого фактора мы остановимся ниже, добавив к сказанному только то, что во всех случаях осмотическая дегидратация приводит к возрастанию концентрации цитоплазматических компонентов в объеме внутриклеточного растворителя, что, в свою очередь, приводит к изменению числа и функциональности связей между ними. Дополнительным следствием таких изменений является изменение ионной силы внутриклеточной среды.

В ядерных клетках изменения, связанные с дегидратацией, наиболее отчетливо проявляются в модификации дисперсного состояния хроматина [5, 10]. При низкой ионной силе происходит частичное ослабление внутринуклеосомных связей, что проявляется в диспергировании хроматина, в то время как при высокой ионной силе наблюдается агре-

гация нуклеосом [10]. В гипертонических растворах наблюдается также резкое возрастание ригидности веретенных нитей в клетках, подвергающихся митозу [5]. В целом для описываемых условий характерно то, что хроматин становится более конденсированным и представлен в виде больших масс, преимущественно локализованных вблизи ядрышек и ядерной мембраны [10].

Более сложными являются процессы, связанные с модификацией цитоскелета. Наиболее впечатляющий пример таких изменений — лиганд-независимый кэппинг лимфоцитов [28]. При инкубации этих клеток в среде, содержащей удвоенную изотоническую концентрацию хлористого натрия, наблюдается образование кэпов из наиболее подвижных поверхностных рецепторов без добавления лигандов [28]. Наиболее интенсивное перераспределение рецепторов происходит в средах с осмолярностью 500—600 мОсм [28]. В основе механизма образования кэпов при инкубации лимфоцитов в гипертонических средах лежат процессы, включающие трансформацию кортикальных цитоплазматических структур. Такая трансформация может быть следствием концентрирования элементов этих структур при дегидратации клеток, а также повышения ионной силы среды [28]. Само лиганд-независимое образование кэпов в гипертонической среде является следствием обратимого взаимодействия между поверхностными рецепторами и активируемой контрактальной системой клеток, включающих актин [28]. Наиболее простое объяснение этого явления может заключаться в устранении ограничений, накладываемых электростатическим отталкиванием между элементами контрактальной системы и поверхностными рецепторами при повышении ионной силы. Однако процесс образования кэпов сопровождается аккумуляцией микровиллей в районе локализации кэпов, что указывает на более сложный механизм, в основе которого могут лежать эффекты исключенного объема [15]. Описанные динамические изменения, развивающиеся в умеренно гипертонических средах, являются обратимыми, что указывает на преимущественную модификацию состояния связей между отдельными компонентами цитоскелета, а также с плазматической мембраной. В этом случае модификация самих элементов цитоскелета отсутствует.

Развитие изотермического лизиса, в свою очередь, связано с нарушением функции мембраны как барьера, отделяющего внутреннюю среду от наружной. Сейчас становится понятным, что первичное звено этого процесса не связано с изменениями собственно мембраны, а отражает изменения упругих элементов цитоскелета, противостоящих осмотической дегидратации. Доказано, что клетки млекопитающих могут обратимо терять до 50 % внутриклеточной воды и сохранять свою жизнеспособность [5]. Именно это количество воды можно считать пределом относительно безвредной («объемной») дегидратации, за которой следует «структурная» дегидратация, охватывающая сложноорганизованные цитоплазматические элементы клеток. Именно «структурная» дегидратация может быть связана с механизмами изотермического лизиса клеток. Глубина такой «структурной» дегидратации может быть весьма значительной. В среде Игла, содержащей 4 М NaCl, клетки *Hela* достигают минимального объема — примерно 25,5 % от исходного, что соответствует примерно 8 % лабильной клеточной воды или 5,6 % общей клеточной массы [5]. В таких условиях резко изменяется соотношение между объемом, занимаемым внутриклеточными компонентами, и объемом внутриклеточной воды. В результате упругие элементы цитоскелета испытывают значительную механическую нагрузку и в них возникают упругие деформации. Именно этот фактор является причиной метастабильности клеток в начальной фазе реакции на сильный осмотический стресс. Ниже мы покажем, что подобное метастабильное состояние важно не само по себе, а как фактор, определяющий направленность последующих изменений состояния цитоскелета.

Реакции на уровне цитоскелета. В макроскопическом плане цито-

скелет — это свободный от липидов нековалентный комплекс, включающий цитоплазматические белки, ведущую роль в котором играет актин [7]. При включении в цитоскелет эффективная концентрация белков резко возрастает, в результате чего в стабилизации скелета ключевую роль приобретают слабые взаимодействия. Особенностью слабых взаимодействий является то, что их сродство друг к другу характеризуется высокой чувствительностью к микроокружению [12]. Помимо этого, компоненты, контактирующие друг с другом в участках с умеренным сродством, способны легко диссоциировать при сдвиговом стрессе [12].

В целом устойчивость цитоскелета обусловлена высокой плотностью связей между основными белками, формирующими его структуру. Из этого следует, что дегидратация клеток является фактором, управляющим состоянием цитоскелета, так как в этом случае изменяется концентрация белков в объеме растворителя и соответственно плотность связей между компонентами скелета. Более сложным является биохимический уровень регуляции, включающий индукцию появления обратимых сшивок между белками. В этом случае уровень межмолекулярных сшивок может контролироваться такими процессами, как фосфорилирование, окисление, метилирование, глутаминирование, трансглутаминирование, а также связывание ионов и метаболитов с каким-либо из компонентов скелета [12]. Понятно, что в зависимости от исходных условий, в которых находится клетка, роль биохимических факторов в контроле цитоскелета может существенно возрастать. Подобные биохимические изменения являются предметом отдельного обсуждения, и в данном случае мы на них останавливаться не будем.

Значение факторов, способных модифицировать состояние белкового скелета, наиболее удобно обсуждать с привлечением данных, полученных на эритроцитах. Цитоскелет эритроцитов — это двумерная сеть, в которой элементы ячейки состоят из спектрина, а точки ветвления сформированы из актина и белка 4.1 [20]. В клетке спектрин, по-видимому, может существовать в виде олигомерных островов с широким распределением по размерам [20]. Полимерный актин может играть определенную роль в связывании островов, но не в формировании их каркаса. В наиболее низком энергетическом состоянии спектриновая сеть, по-видимому, существует в свернутой спиралевидной или какой-нибудь другой форме. Подобное «промежуточное» состояние сети контролируется ее взаимодействием с мембраной, что делает скелет-мембранные взаимодействия одним из ключевых факторов, контролирующих стабильность скелета. Действительно, при устранении контактов скелета с мембраной он сокращается до 1/4 от его исходной площади [23]. Конденсация цитоскелета при его откреплении от мембраны устраняет пространственные ограничения, что делает возможным кооперативное кластерирование молекул спектрина в узлах ветвления за счет других точек. Это означает, что средняя функциональность узла равная 5—6 в этих условиях может резко возрастать.

С учетом этого можно выделить 2 группы факторов, направленность действия которых на характер ассоциации белкового скелета с мембраной в условиях дегидратации является противоположной. Первая группа связана с изменением ионной силы внутриклеточной среды. Действительно, стабильность пространственной структуры периферической белковой решетки эритроцитов контролируется таким фактором, как отталкивание отрицательно заряженных групп молекул спектрина [24]. Соответственно повышение ионной силы внутриклеточного раствора должно привести по крайней мере к двум следствиям: а — уменьшению поверхностной площади белкового скелета; б — усилению взаимодействия скелета с мембраной. При высокой ионной силе, когда возрастает экранировка заряда, усиление взаимодействий скелета с мембраной может рассматриваться как фактор, при котором мембрана оказывает стабилизирующее действие на скелет. Такая стабилизация может быть обусловлена как взаимодействием компонентов скелета с цитоплазматическими сегмента-

ми мембранных белков, так и взаимодействием с фосфолипидами, локализованными у внутренней поверхности мембраны [17]. Таким образом, возрастание ионной силы внутриклеточной среды при дегидратации является фактором, направленным на усиление взаимодействия между элементами цитоскелета и самого скелета с мембраной.

Противоположная направленность характерна для факторов, связанных с объемными изменениями клеток и цитоскелета. Объем изолированного белкового скелета изменяется обратно пропорционально изменению ионной силы, т. е. степени экранировки заряженных групп спектрина [18]. Это означает, что при повышении ионной силы тенденция к уменьшению объема цитоскелета опережает таковую в случае изменения объема самой клетки. Фактором, ограничивающим значительные объемные изменения скелета, является его ассоциация с мембраной. Именно эта особенность лежит в основе такого процесса, как эхиноцитоз в гипертонических средах [21]. Следовательно, можно говорить о структурных ограничениях, связанных с внутренними свойствами скелета, направленных против усиления его взаимодействия с мембраной. Другая группа факторов, направленных против усиления таких взаимодействий, связана с геометрическими ограничениями, в основе которых лежит изменение поверхностно-объемного отношения при дегидратации (точнее поверхностной площади мембраны к площади скелета). В процессе эхиноцитоза, когда поверхностно-объемное отношение возрастает и формируются спиккулы, возникают геометрические ограничения на взаимодействие скелета с мембраной в области спиккул, и скелет частично открепляется от нее [19]. Это позволяет говорить о радикальных различиях между состоянием «гладких» клеток, в которых геометрические ограничения отсутствуют, и кренированных клеток, т. е. клеток со складками и выступами на поверхности, в которых такие ограничения могут играть существенную роль. Нарушения взаимодействий скелета с мембраной в этих областях позволяет говорить о локальных зонах модификации мембраны, в которых могут инициироваться процессы, нарушающие барьерную функцию. Значение геометрических ограничений на взаимодействие скелета с мембраной может возрастать при быстрой дегидратации («объемный сдвиг»), когда исходный объем клеток близок к изотоническому [3]. В этом случае клетки находятся в состоянии временной неустойчивости, что приводит к их лизису.

Дополнительное усложнение, цитоскелет — это гель. При включении в эритроцитарный скелет концентрация спектрина возрастает в 100 раз, и организованная структура скелета контролируется отталкиванием отрицательно заряженных групп молекул спектрина [12]. Из этого следует, что периферический белковый скелет должен вести себя как периодическая коллоидная система. Заряженный белковый слой у поверхности эритроцита имеет тиксотропные и вязкоупругие свойства, характерные для сильно заряженных мономерных коллоидных дисперсий [24]. В противоположность большинству синтетических эластомеров скелетная сеть эритроцитов зависит прежде всего от нековалентных связей, поэтому средняя по времени топология спектриновой сети определяется условиями окружающей среды. Именно гелевая природа цитоскелета ставит на первый план факторы, ключевые для криобиологических систем, такие как осмотическое давление, ионная сила, рН и температура.

В условиях, когда в геле отсутствуют значительные межмолекулярные взаимодействия, упругая свободная энергия геля имеет чисто энтропийную основу и иногда определяется как «резиновая» упругость [24]. По-видимому, нет принципиальных различий в поведении двумерного ионного белкового геля, каковым является скелет эритроцитов, и поведением трехмерных гелей. Терминологически это проявляется в том, что осмотическое поверхностное натяжение ионного двумерного белкового геля аналогично осмотическому давлению трехмерного геля [24]. Соответственно повышение ионной силы или снижение рН в сторону изоэлектрической точки спектрина способно обусловить возрастание отри-

цательного осмотического натяжения геля. В морфологическом плане это проявится в кренировании эритроцитов, а в структурном — в изменении характера ассоциации геля с мембраной. Зависимость состояния геля от перечисленных выше факторов чрезвычайно высока и это проявляется в существовании в гелевых структурах критических явлений и фазовых переходов [27]. Известный пример таких процессов — поведение ионных полиакриламидных гелей [27]. Считается, что фазовый переход и критические явления — внутренние свойства гелей [27]. В процессе модификации плотность распределения геля может изменяться от однородной до неоднородной [24]. При этом важно отметить, что фазовое разделение ионного геля не может иметь место без определенной сдвиговой деформации, обусловленной топологическими ограничениями, накладываемыми на гель [24]. В клетке такие ограничения могут быть связаны прежде всего с плазматической мембраной, а также с внутренним несжимающимся ядром, представленным гемоглобином, хроматином и т. д. В этом случае можно говорить о реализации принципа «молота и наковальни», когда молотом является плазматическая мембрана, оказывающая механическое воздействие на белковый гель, а наковальней — несжимающееся белковое ядро.

В условиях фазового разделения двумерный гель сохраняет свою топологию, но разделяется на две фазы, одна из которых является более плотной и в виде островков распределена более или менее однородно в менее плотной фазе [24]. Это означает, что в отдельных областях мембраны ослабляется поддерживающее действие скелета и эти зоны можно рассматривать как потенциальные зоны нестабильности. Из этих рассуждений следует также, что в условиях «структурной» дегидратации, когда мембрана оказывает механическое воздействие на упругие элементы геля, создаются условия для его сдвиговой деформации, следствием чего может стать фазовое разделение. Последняя фаза процесса зависит от целого ряда факторов, так как напряжение, которое необходимо для того, чтобы изотропно сжать ионный гель, не только зависит от энтропии молекул, формирующих его, но также от таких факторов, как величина внутри- и межмолекулярных взаимодействий геля и степень ионизации его цепей [24, 27]. Следует отметить, что осмотическая дегидратация может являться фактором, накладывающим диффузионные ограничения на реорганизацию компонентов геля.

Факторы, связанные с гелевой природой цитоскелета, влияние осмотического давления, сдвига и температуры. Свойства биологических гелей являются отражением поведения в растворе такого белка, как актин [9, 25]. Филаменты актина являются обычными для периферии мышечных клеток, где они объединены в различные структуры. Цитоскелетная сеть, включающая актин, близка по своим свойствам к другим полимерным системам, для которых характерно наличие определенных механических свойств, связанных с действием на эти системы физических сил. Механические свойства полимерных сетей зависят от длины, концентрации и количества сшивок между молекулами полимера [8]. В ответ на приложенный осмотический стресс полимерные сети могут сокращаться или набухать. Гель меняет свой объем в ответ на разницу осмотического давления между внутренним объемом геля и наружной средой. F-актин неидеально отвечает на приложенный осмотический стресс и его ответ зависит от концентрации и длины филаментов, что, по-видимому, определяется упругими свойствами филаментов [16]. Очищенный филаментный, но не мономерный актин способен проявлять концентрационно-зависимый упругий ответ на приложенные осмотические силы [16]. Для упругого сопротивления характерно наличие критической концентрации и зависимость от осмотического стресса поведения, указывающего на фазовые переходы [16]. Именно это свойство можно считать ключевым при оценке поведения биологических гелей в условиях, когда на них действуют факторы, представляющие интерес для криобиологов — осмотическое давление, сдвиг и изменение температуры.

Осмотический стресс, действующий на отделенную мембраной полимерную систему из *F*-актина, представляет собой термодинамическую движущую силу, которая вызывает поток воды, направленный из внутренней среды в наружную. Подобный процесс можно считать определяющим в фазе «структурной» дегидратации, когда в ответ на приложенный осмотический стресс модифицируется пространственная структура белкового геля. Как показано в [16], скорость объемного потока воды при дегидратации геля возрастает при низких значениях осмотического стресса и снижается при высоких значениях. Эта особенность, по-видимому, отражает увеличение концентрации белка в объеме растворителя, возможно, небольшое, но конечное, когда концентрация белка достигает критической точки [16].

Уменьшение объемного потока при дегидратации обусловлено упругим ответом филаментов на приложенный осмотический стресс [16, 26]. Осмотический стресс деформирует филаменты, образующие гель, тем самым индуцируя упругое давление, противостоящее приложенному осмотическому давлению [16, 26]. При этом совершается осмотическая работа, которая, с одной стороны, удаляет воду через мембрану, а с другой, сжимает филаменты. Таким образом, в описываемых условиях реализуются два процесса: а — дегидратация; б — упругая деформация филаментов. Именно этот двойственный характер влияния осмотического стресса на биологические гели позволяет считать, что фундаментальной основой механизма криоповреждения является сопряжение между упругостью белковых филаментов и приложенным осмотическим стрессом — *осмоупругое сопряжение* [26]. Феномен осмоупругого сопряжения позволяет также подойти к раскрытию механизма метастабильности клеток, в частности, в условиях их сенсibilизации к холодовому шоку.

Действительно, в условиях гипертонической инкубации клеток, когда индуцируется объемный поток воды через мембрану, часть энергии диссипирует вследствие фрикционных взаимодействий между молекулами воды и мембраной, в то время как остающаяся часть хранится в виде свободной энергии деформации филаментов, что в свою очередь продуцирует упругое давление цитоплазматического геля. Упругое давление снижает разницу химического потенциала между внутренней и наружной средой, тем самым уменьшая движущую силу и потенциал для объемного потока [16]. Однако для этих условий характерна одна важная особенность, заключающаяся в том, что упругое давление актинового геля прямо пропорционально приложенному стрессу. Это означает, что при действии осмотического стресса увеличивается химический потенциал филаментов актина. Подобное повышение химического потенциала актиновых филаментов прогрессивно создает все более нестабильную ситуацию, и выше критического уровня стресса система, сформированная из изотропно распределенных филаментов, может разделиться на разбавленную изотропную фазу и концентрированную анизотропную фазу [16, 26]. В последнем случае филаменты меньше окружены растворителем и они формируют пучки из параллельно уложенных филаментов, близких по своей структуре к кристаллам [26]. Таким образом, метастабильность можно определить как состояние, при котором имеет место полная элиминация объемного потока воды при действии осмотического стресса, диффузия филаментов ингибируется и они остаются сжатыми осмотическим стрессом. В этом случае нет диссипации энергии объемного потока, а имеет место резкое возрастание упругого давления геля [16, 26].

Если анализировать ситуацию применительно к холодовому шоку, остается неясным механизм, вызывающий срыв метастабильности. В данном контексте необходимо отметить одну важную особенность, а именно то, что в случае белковых гелей имеет место гораздо более высокая устойчивость к изотропному изменению объема, чем к изменению оси филаментов под влиянием сдвиговых сил [16]. Иными словами, достаточно небольшого изменения ориентации белков относительно плоскости

1

мембраны для того, чтобы их устойчивость к действию осмотического стресса резко изменилась и в системе произошел переход от изотропного к анизотропному распределению. Подобное изменение ориентации может происходить при охлаждении клеток.

То, что осмотическая стабильность актиновых гелей определяется их внутренней структурой, доказывается способностью актин-связывающего белка из макрофагов резко увеличивать осмотическое сопротивление геля [16]. Следует отметить, что свойства биологических гелей позволяют по-новому взглянуть на проблему анабиоза, по крайней мере, в структурном плане. Результаты, полученные на системах, сформированных из *F*-актина, показывают, что актиновая сеть может также характеризоваться как система из взаимонепроникающих стержней [6]. В противоположность гибким цепям стержни проявляют скорее энтальпийный, чем энтропийный ответ как на механический, так и осмотический стресс без значительных изменений объема [16]. С учетом этого в условиях дегидратации, когда возрастает концентрация белка в объеме растворителя, феномен, который обычно определяется как гелеобразование (истинное затвердевание), можно рассматривать как стеклование (жидкость со свойствами твердого тела) или как стеклопереход [6]. Подобный стеклопереход может быть отражением нового устойчивого состояния, обеспечивающего длительное сохранение постоянства структуры. В структурном плане это означает приближение к принципу естественной «витрификации» без включения каких-либо экзогенных факторов, таких как криопротекторы в высоких концентрациях.

Свойства биологических гелей позволяют подойти также к пониманию того, что скрывается за терминами «температурный» или «осмотический» шок. Само понятие «шок» означает зависимость глубины изменения состояния клетки от скорости, с которой изменяются условия, в которых находится клетка. Подобная связь является относительной, так как многие данные указывают на то, что как температурный, так и осмотический шок развиваются при некоторых промежуточных скоростях, соизмеримых со скоростями, с которыми могут реорганизовываться множественные связи в пределах цитоплазматического геля. Механические свойства и стабильность биологических гелей зависят от скорости, с которой на них оказывается воздействие, в частности, от скорости деформации. Это хорошо иллюстрируется данными, полученными на системе, сформированной из актина и актин-сшивающего белка (функционально аналогичному спектрину из эритроцитов), α -актинина из *Acanthamoeba* [22]. Такая система является хорошей моделью скелетного кортекса и при быстрой деформации она проявляет ригидность в 40 раз более высокую, чем в случае медленной деформации [22].

Зависимость от скорости деформации можно объяснить наличием в скелетном кортексе множественных быстро реорганизующих сшивок, которые формируются между филаментами актина и сшивающим белком α -актинин. Кортекс может упруго восстанавливаться после быстрых кратковременных воздействий и деформироваться при длительных воздействиях [22]. Такая же закономерность наблюдается в системе, включающей актин из мышц кролика и α -актинин, в которой динамическая упругость и динамическая вязкость в несколько раз возрастает при быстрой деформации [22].

Таким образом, при повышении скорости деформации гелевые системы ведут себя как твердое тело, а при низкой скорости — как жидкое. Подобное свойство определяется тем, что в равновесии актин-сшивающие белки связываются и диссоциируют с филаментами актина быстро. Быстрота, с которой достигается равновесие при связывании α -актинина с филаментами актина, означает, что сшивки между филаментами могут быстро реорганизовываться при воздействии на гель и с учетом наличия множественных сшивок это объясняет, почему механические

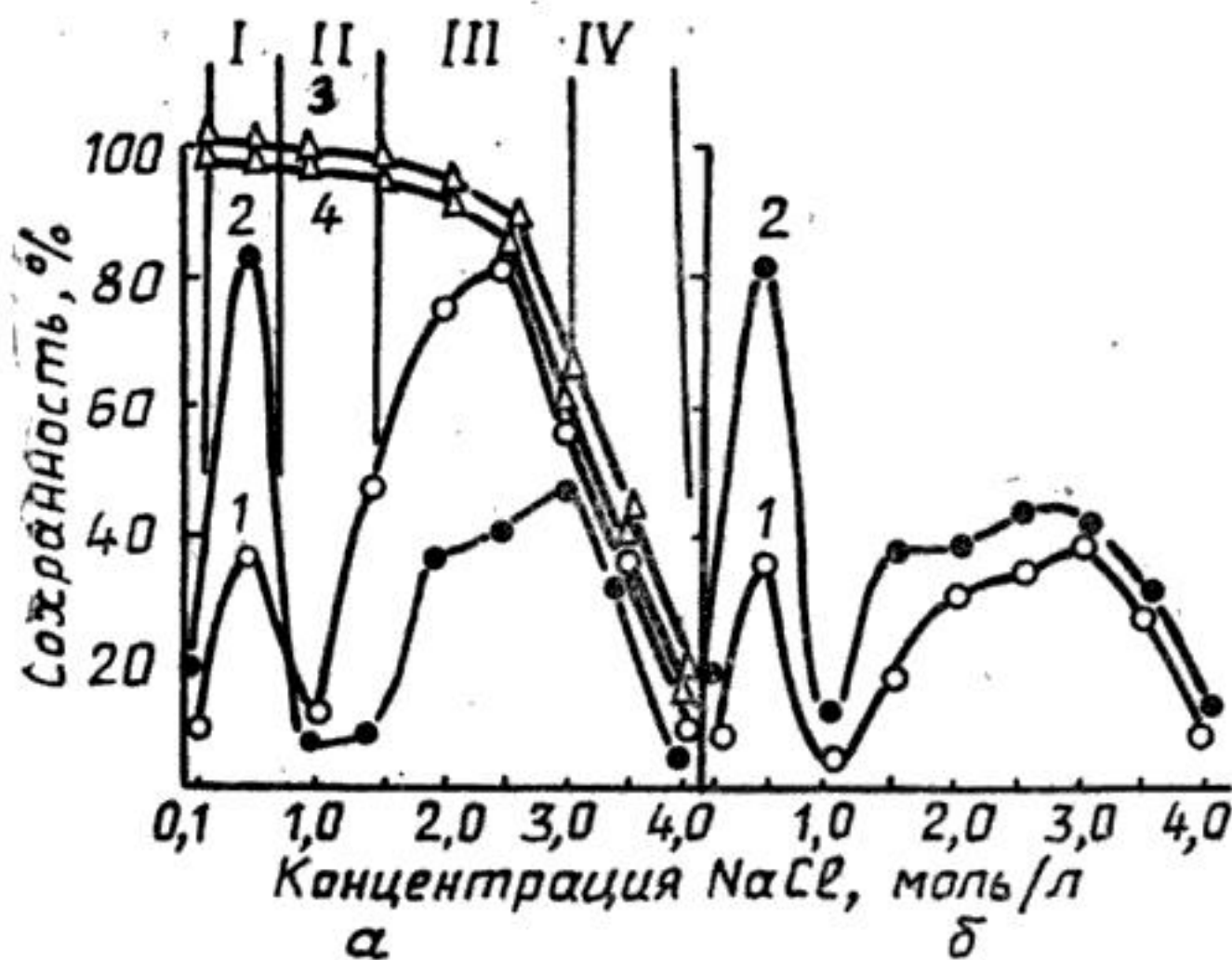
свойства геля зависят от скорости деформации [22]. Подобная закономерность очевидно характерна для любого типа актин-сшивающих белков, например спектрина и белка 4.1 в скелете эритроцитов. Когда силы прикладываются медленно, как показано в [22], сшивки α -актинина реорганизуются быстрее по сравнению со скоростью, с которой филаменты α -актинина смещаются друг относительно друга, т. е. они оказывают очень незначительное сопротивление воздействию или вообще не оказывают его. Когда сила прикладывается быстрее по сравнению со скоростью реорганизации всей популяции сшивок, тогда физическая связь между филаментами сохраняется, что делает белковую сеть ригидной [22].

Возникает вопрос, как каждое из описанных состояний согласуется со стабильностью клетки в целом? Ответ на этот вопрос может быть получен, в первую очередь, с учетом представлений об осмоупругом сопряжении при осмотической дегидратации клеток. Действительно, при промежуточном значении дегидратации, когда имеет место «объемная», а не «структурная» дегидратация, формируется стабильный гель (вследствие повышения концентрации белка в объеме растворителя), однако осмотический стресс является недостаточным для появления в нем упругого давления, т. е. упругой деформации его компонентов. В этом случае устойчивость в системе будет повышаться при повышении скорости, с которой на нее оказывается последующее воздействие.

В условиях «структурной» дегидратации система становится метастабильной и при повышении скорости последующего воздействия в ней может иметь место генерализованный ответ, проявляющийся в фазовом разделении, а не в реорганизации множественных сшивок с сохранением изотропного распределения компонентов. Из этого следует, что во всех случаях в основе чувствительности клеток к холодовому или осмотическому шоку лежит исходная метастабильность. Тот факт, что поведение гелей в зависимости от скорости воздействия контролируется реорганизацией сшивок между белками, позволяет сделать вывод о значительном влиянии такого параметра, как температура на свойства и стабильность гелей. Это доказывается тем, что скорость ассоциации и диссоциации в системе, сформированной из актина и α -актинина, является функцией температуры, и скорость реорганизации сшивок с температурой возрастает [22]. Последнее объясняет, почему ригидность смешанного геля при повышении температуры снижается. Следовательно, смесь из F-актина и актин-сшивающих белков может быть как ригидной, так и деформируемой в зависимости от скорости деформации без специфической регуляции этого процесса посредством инактивации сшивок, фрагментации или деполимерации филаментов [22]. При этом дополнительным регулирующим параметром является температура.

Значение комбинирования факторов среды в контроле осмотической и холодовой чувствительности клеток хорошо иллюстрируется данными, представленными на рисунке. Видно, что в интервале исходной осмолярности среды, когда имеет место объемная, а не структурная дегидратация (500—800 мОсм) клетки характеризуются высокой устойчивостью к переносу в сильно гипертонический раствор (4М NaCl) и охлаждению. В условиях, когда имеет место структурная дегидратация (при более высоких значениях осмолярности), наблюдается минимум устойчивости, а также переход в метастабильное состояние, срыв которого происходит при сдвиге температуры. При этом следует отметить, что клетки обладают максимальным холодовой и осмотической устойчивостью в условиях, когда исходная дегидратация (т. е. формирование геля) комбинируется с инкубацией при низкой температуре (рис.). Наличие второго максимума устойчивости при высокой осмолярности среды может объясняться диффузионными ограничениями, накладываемыми на пространственную реорганизацию компонентов геля при действии сильного осмотического стресса.

Таким образом, углубленный анализ криобиологических явлений требует новых подходов, для которых наиболее перспективным является представление о живой клетке как системе, структура которой представляет собой гель. Именно гели являются наиболее чувствительными к изменениям параметров среды, являющихся ключевыми для криобиологи-



Влияние начальных осмотических и температурных условий на устойчивость эритроцитов к переносу в 4,0 М NaCl (а), а также к охлаждению в цикле 37—0 и 0—37—0°С (б); а: 1 — инкубация при 37°С в присутствии 0,15—4,0 М NaCl с последующим доведением тоничности до 4,0 М NaCl, 2 — то же, но при 0°С, 3 — инкубация при 37°С без доведения тоничности среды, 4 — то же, но при 0°С; б: 1 — инкубация при 37°С с последующим доведением тоничности при той же температуре до 4,0 М NaCl и охлаждением до 0°С, 2 — инкубация и доведение тоничности при 0°С с последующим сдвигом температуры в цикле 0—37—0°С. I — зона стабильности, II — зона нестабильности, III — зона метастабильности, IV — зона изотермического лизиса

ческих систем — осмотического давления, ионной силы и температуры. Связь между осмотической дегидратацией геля и индукцией упругой деформации формирующих его компонентов (осмоупругое сопряжение) позволяет более адекватно оценивать феномен метастабильности клеток, а также раскрыть значение эффектов дегидратации в контроле холодной и осмотической чувствительности клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В. А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Дисс. ... д-ра биол. наук, — Харьков, 1989, — 446 с.
2. Песина Н. И., Бондаренко В. А. Осмолярность среды и продолжительность инкубации как два независимых фактора, контролирующих чувствительность эритроцитов к охлаждению в средах, содержащих неэлектролит // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем. — Харьков: Б. И., 1989. — С. 19—26.
3. Поздняков В. В., Бондаренко В. А. Объемный сдвиг как фактор, контролирующий осмотическую устойчивость эритроцитов в растворах низкомолекулярных криопротекторов // Физико-химическое и биологическое действие криопротекторов. — Киев: Наук. думка, 1990. — С. 115—123.
4. Поздняков В. В., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А. Осмолярность среды как принцип устойчивости к замораживанию // Физико-химическое и биологическое действие криопротекторов. — Киев: Наук. думка, 1990. — С. 124—130.
5. Albrecht-Buchler G., Bushnell A. Reversible compression of cytoplasm // Exp. Cell. Res. — 1982. — 140, N 2. — P. 173—189.
6. Buxbaum R. E., Dennerll T., Weiss C. S. F-actin and microtubule suspensions as indeterminate fluids // Science. — 1987. — 235, N 4795. — P. 1571—1574.
7. Carlier W. F. Actin-protein structure and filament dynamics // J. Biol. Chem. — 1991. — 266, N 1. — P. 1—5.
8. Clark A. H., Ross-Murphy S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels // Biopolymers. — 1987. — P. 57—192.

9. Cortese J. D., Schwab B., Frieden C., Elson E. L. Actin polymerization induces a sharp change in actin-containing vesicles // *Proc. Nat. Acad. Sci. Usa.*—1989.— 86, N 15.— P. 5773—5777.
10. Delpire E., Duchene C., Goessens G., Gilles R. Effects of osmotic shock on the ultrastructure of different tissues and cell types // *Exp. Cell. Res.*—1985.—160, N 1.— P. 106—116.
11. Griffith A. Effect of hypertonic stress on mammalian cell lines and its relevance of freeze injury // *Cryobiology.*—1978.— 15, N 5.— P. 517—530.
12. Haest C. W. M. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic membrane domains // *Biochim. Biophys. Acta.*—1982.— N 4.— P. 331—352.
13. Heunbush P., Jung C. Y., Green F. A. The osmotic response of human erythrocytes and the membrane cytoskeleton // *J. Cell. Physiol.*—1985.— 122, N 2.— P. 206—213.
14. Holz R. W. The role of osmotic forces in exocytosis from adrenal chromaffin cells // *Ann. Rev. Physiol.*—1986.—48.— P. 175—189.
15. Horowitz S. B., Daine P. L. Cytoplasmic exclusion as a basis for asymmetric nucleocytoplasmic solute distributions // *Nature.*—1976.— 260, N 5547.— P. 151—153.
16. Ito T., Zaner K. S., Stossel T. P. Nonideality of volume flows and phase transitions of F-actin solutions in response to osmotic stress // *Biophys. J.*—1987.— 37, N 5.— P. 745—755.
17. Lange Y., Gough A., Steck T. E. Role of the bilayer in the shape of the isolated erythrocyte membrane // *J. Membrane Biol.*—1982.— 69, N 2.— P. 113—124.
18. Lange Y., Hadesman R. A., Steck T. E. Role of the reticulus in the stability and shape of the isolated human erythrocyte membrane // *J. Cell. Biol.*—1982.— 92, N 3.— P. 714—722.
19. Line S. C., Derick L. H., Duquette M. A., Palek J. Separation of the lipid bilayer from the membrane skeleton during discocyte transformation of human erythrocyte ghosts // *Eur. J. Cell. Biol.*—1989.— 49, N 2.— P. 358—366.
20. Marchesi V. T. Stabilizing infrastructure of cell membranes // *Ann. Rev. Cell. Biol.*—1985.— 1.— P. 531—559.
21. Marikovsky Y., Khodadad J. K., Weinstein R. S. Influence of red cell shape on surface cell topography // *Exp. Cell. Res.*—1978.— 116, N 1.— P. 191—199.
22. Sato M., Schwarz W. H., Pollard T. D. Dependence of mechanical properties of actin/L-actin gels on deformation rate // *Nature.*—1987.— 325, N 6107.— P. 827—831.
23. Sheetz M. P. Integral membrane protein interaction with triton cytoskeletons of erythrocytes // *Biochem. Biophys. Acta.*—1979.—557, № 1.— P. 122—134.
24. Stokke B. T., Mikkelsen A., Elgsaeter A. The human erythrocyte membrane skeleton maybe an ionic gel. 1. Membrane mechanochemical properties // *Eur. Biophys. J.*—1986.— 13, N 4.— P. 203—219.
25. Suzuki A., Mueda T., Ito T. Formation of liquid crystalline phase of actin filament evolutions and its dependence on filament length as studied by optical birefringence // *Biophys. J.*—1991.— 59, N 1.— P. 25—31.
26. Suzuki A., Yamazaki M., Ito T. Osmoelastic coupling in biological structures: formation of parallel bundle of actin filaments in crystalline-like structures caused by osmotic stress // *Biochemistry.*—1989.— 28, N 15.— P. 6543—6547.
27. Tanaka T., Sun S. T., Hirokawa Y. et. al. Mechanical instability of gels at the phase transition // *Nature.*—1987.— 325, N 6107.— P. 796—798.
28. Yahara Y., Kakimoto S. Analysis of ligand-independent cap formation induced in hypertonic medium // *Exp. Cell. Res.*—1979.— 119, № 2.— P. 267—259.

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

Поступила 06.02.92

V. A. BONDARENKO, Y. P. BONDARENKO, S. V. RUDENKO

DEHYDRATION EFFECTS IN CONTROLLING THE COLD AND OSMOTIC SENSITIVITY OF CELLS

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

A review is presented on the problem of cold and osmotic sensitivity of cells related to the gel nature of their cytoskeleton. Dehydration is considered as a primary factor of cold and osmotic injury. It has been concluded that the universal approach to provide the cold resistance of cells suggests conditions of maximum stability of the cell under osmotic dehydration. Dehydration in this case is a factor controlling the state of cytoskeleton. Taking into account the gel nature of cytoskeleton, such factors as osmotic pressure, ionic strength, pH and temperature are of primary importance. The conception of the living cell as a system whose structure is gel seems to be promising for a more comprehensive analysis of cryobiological phenomena.

В. А. БОНДАРЕНКО, Т. П. БОНДАРЕНКО, С. В. РУДЕНКО

ЭФЕКТЫ ДЕГІДРАТАЦІЇ У КОНТРОЛІ ХОЛОДОВОЇ І ОСМОТИЧНОЇ ЧУТТЕВОСТІ КЛІТИН

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м. Харків

Оглядова стаття, у якій обговорюється проблема холодової і осмотичної чутливості клітин, яка пов'язана з гелевою природою їх цитоскелета. Як первинний фактор при холодовому і осмотичному пошкодженні розглядається дегідратація. Зроблено висновок про те, що універсальний підхід до забезпечення кріостійкості клітин полягає в забезпеченні умов, при яких клітина має максимальну стабільність при осмотичній дегідратації. При цьому дегідратація клітин є фактором, який керує станом цитоскелета. Гелева природа цитоскелета ставить на перший план такі фактори, як осмотичний тиск, іонсила, рН і температура, які є ключовими для кріобіологів. Зроблено висновок про те, що поглиблений аналіз кріобіологічних явищ вимагає нових підходів, для яких найперспективнішими є уявлення про живу клітину як систему, структурою якої є гель.

УДК 57.043:576.33.04

Л. Ф. Розанов, Е. И. Смольянинова

ОСМОТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ЯЙЦЕКЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ МЫШИ: РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТА

С помощью волюметрического метода проведено сравнительное изучение кинетики осмотического поведения яйцеклеток и эмбрионов мыши в растворах проникающих криопротекторов с различным содержанием внеклеточной соли. Особенности осмотического поведения клеток, трудно объяснимые с позиций мембранной теории, находят объяснение с точки зрения современных представлений о значении внутриклеточного матрикса в регуляции клеточного объема.

Анализ кинетики осмотических реакций позволяет кріобіологам получать необходимую для прогнозирования оптимальных условий криоконсервирования информацию о коэффициентах проницаемости клеток для молекул воды и криопротекторов [10, 11]. Особенности кинетики, в частности достигаемый уровень обезвоживания, время нахождения клеток в обезвоженном состоянии до начала набухания и другие параметры дают полезную информацию для изучения механизмов разрушения клеток под действием осмотического фактора — одного из ведущих факторов криоповреждения [6, 12].

В основе анализа кинетики осмотических реакций лежит мембранная теория строения клеток [1], согласно которой поведение цитоплазмы описывается в приближении идеального раствора [10]. Тем не менее существует достаточно обширный экспериментальный материал, свидетельствующий как об отклонении осмотического поведения клеток от идеального [5, 7], так и о наличии у клеток выраженной внутренней структуры — цитоскелета [3, 9].

Исходя из предпосылки, что цитоскелет должен вносить коррекцию в прогнозируемые мембранной теорией осмотические реакции клеток на контакт со средами различного состава, проведены исследования, направленные на выявление особенностей предполагаемой коррекции цитоскелетом изменений объема яйцеклеток и эмбрионов мыши в растворах проникающих криопротекторов с различным содержанием непроникающей внеклеточной добавки (NaCl).

В работе использовались яйцеклетки и 2-клеточные эмбрионы мыши линии СВWа, полученные по стандартной методике [9]. Исследования проводились на интерференционно-поляризационном микроскопе МПИ-5 с криоприставкой [4]. Регистрация изучаемых процессов проводилась с помощью техники покадровой микрокиносъемки. Кинетику изменения клеточного объема в процессе эквilibрации клеток

в растворах оценивали по изменению площади фотографического изображения клетки.

В данной статье обобщены экспериментальные результаты по сравнительному изучению кинетики осмотической реакции яйцеклеток и эмбрионов мыши в растворах, обеспечивающих по отношению к исследуемому биологическому объекту следующие исходные условия:

— гипотония проникающего вещества (2,3 %-й раствор диметилсульфоксида (ДМСО));

— гипертония проникающего вещества (10, 20, 30 %-е водные растворы ДМСО и 1,2-пропандиола);

— гипотония непроникающего вещества (78 мМ водный раствор NaCl);

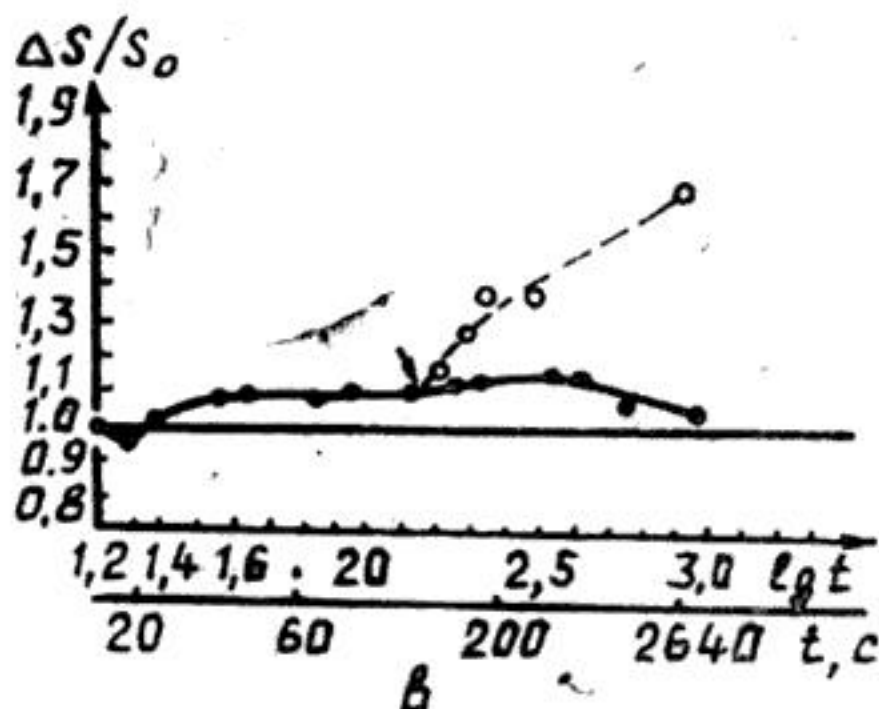
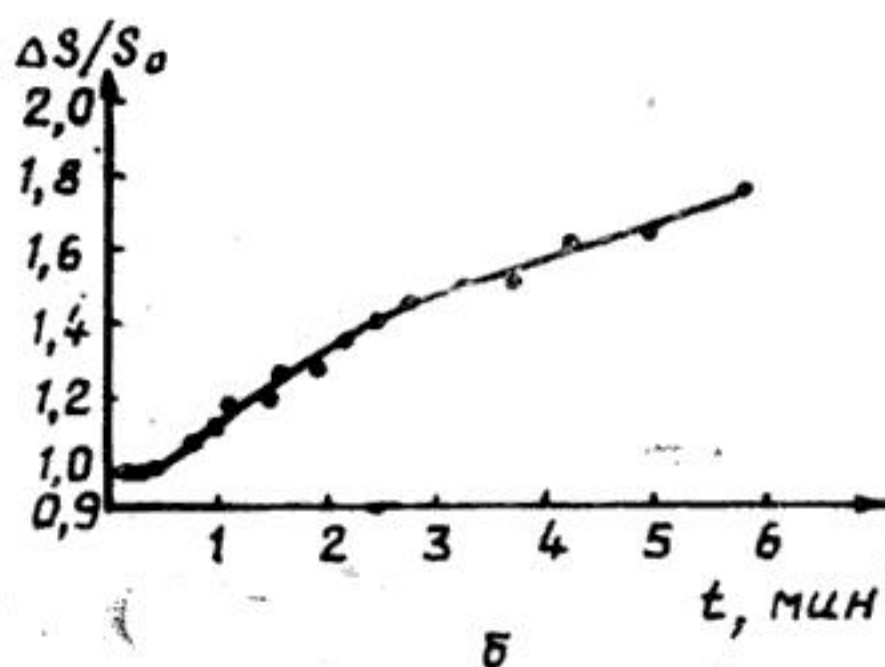
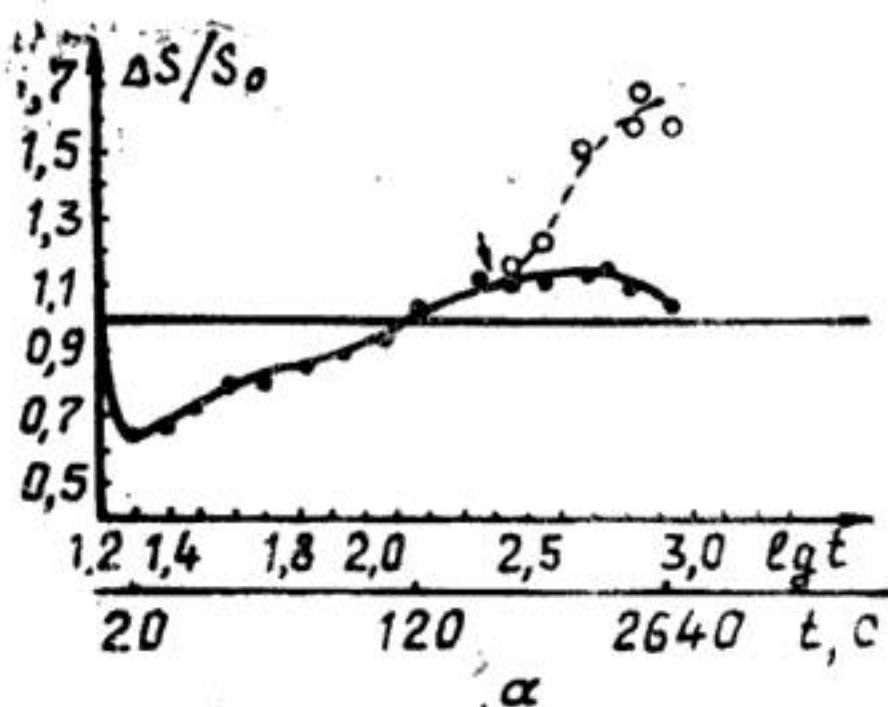


Рис. 1. Изменение относительной площади изображения: а — 2-клеточного эмбриона мыши при эквilibрации в 30 %-м водном растворе ДМСО; б — неоплодотворенной яйцеклетки мыши после контакта с 2,3 %-м водным раствором ДМСО; в — 2-клеточного эмбриона мыши при эквilibрации в 2,3 %-м водном растворе ДМСО; $t = 25^\circ\text{C}$. Стрелками отмечено время появления на поверхности клетки мембранного пузыря (а, в)

— гипертония непроникающего вещества (0,6, 0,8, 1,0 М водные растворы NaCl);

— гипертония проникающего вещества (30 %-й раствор ДМСО, приготовленный на 78 мМ водном растворе NaCl).

Эквilibрация клеток в бессолевых гипертонических растворах проникающих веществ использовалась нами для волюмометрического измерения коэффициентов проницаемости эмбрионов для крипротекторов [2]. Такой расчет предполагает, что в диапазоне изменений объема клетки от минимального до близкого к исходному влияние цитоскелета на скорость осмотических процессов незначительно. В соответствии с мембранной теорией [1] квазистационарное состояние в условиях исходной гипертонии может быть достигнуто только после предварительного обезвоживания клетки.

Скорость последующего набухания должна быть пропорциональна скорости поступления в клетку крипротектора, а время достижения исходного объема при заданных градиенте концентрации крипротектора и площади поверхности мембраны — коэффициенту проницаемости мембраны для данного крипротектора.

На рис. 1, а представлена характерная кривая изменения относительной площади эмбрионов мыши при эквilibрации их в 30 %-м водном

растворе ДМСО при комнатной температуре. Анализ большого количества подобных кривых показывает, что в этом случае набухание клетки как целого до объема больше исходного если и происходит, то не более чем на 20 %. Процесс осмотического набухания продолжает рост мембранных пузырей на поверхности клеток. Образование последних скорее коррелирует с временем экспозиции клеток в растворе, чем с величиной достигнутого объема. В процессе дальнейшей эквilibрации происходили рост и слияние мелких пузырей в более крупные до тех пор, пока растущий пузырь не достигал границ *zona pellucida*. Интересен тот факт, что к 30-й мин экспозиции мембранные пузыри, как правило, разрушались, однако разрушения цитоплазматического матрикса и лизиса клеток не наблюдалось. Хотя некоторая дезагрегация оптически более плотной части цитоплазмы имела место, бластомеры сохраняли четкую форму и границу между ними (рис. 2).

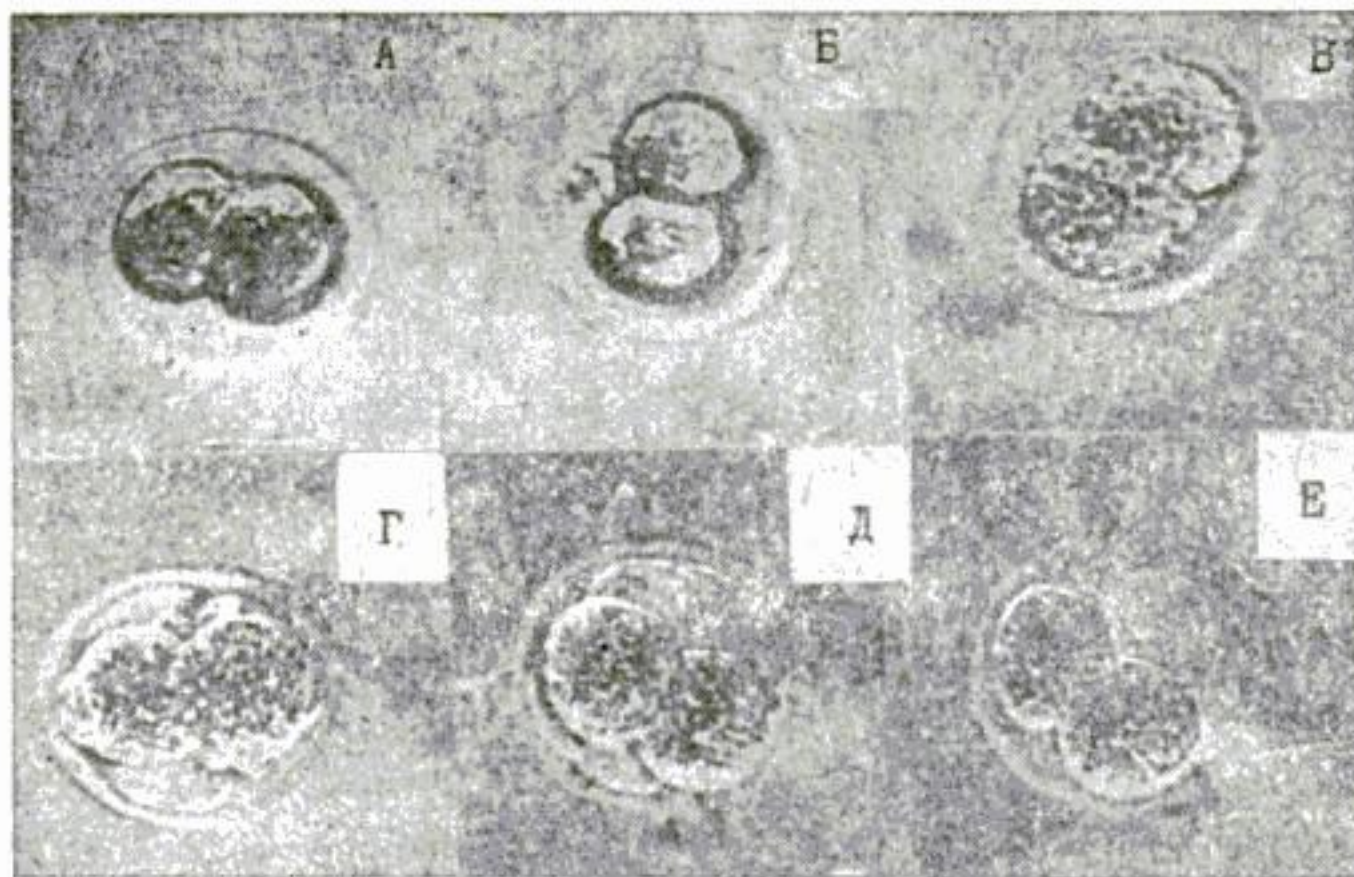


Рис. 2. Динамика осмотической реакции 2-клеточного эмбриона мыши в процессе эквilibрации в 30 %-м водном растворе ДМСО, мин: А — 0, Б — 0,5, В — 2,5, Г — 10, Д — 15, Е — 30

Эксперименты по изучению осмотического поведения яйцеклеток и эмбрионов мыши в 2,3 %-м водном растворе ДМСО проводились с целью выяснить, не является ли предварительное сжатие клеток в случае гипертонического раствора проникающего вещества необходимым условием для последующего образования мембранных пузырей. Мембранная теория описывает исходное состояние клетки, попадающей в подобную среду, как квазистационарное, в котором существует равенство химических потенциалов вне- и внутриклеточной воды, но не равны химические потенциалы вне- и внутриклеточного криопротектора. Стремящийся выровнять химические потенциалы поток криопротектора в клетку будет проникать в сопровождении сопутствующего потока воды, поддерживающего равенство ее химических потенциалов. Предел набухания, согласно мембранной теории, должен определяться главным образом имеющимся запасом мембранной поверхности или способностью мембраны к растяжению без нарушения проницаемости. Увеличение проницаемости для внутриклеточных, не проникающих в норму веществ может стать причиной задержки набухания из-за возникновения направленного наружу потока ионов и, соответственно, потока воды.

Неоплодотворенная яйцеклетка ведет себя в основном в соответствии с прогнозом мембранной теории, демонстрируя увеличение относительной площади изображения клетки в 2—2,5 раза и равномерное распределение оптически плотного содержимого цитоплазмы по всему увеличивающемуся объему (рис. 1, б).

Оплодотворенные яйцеклетки и эмбрионы, цитоскелет которых более развит, начинают набухать лишь после непродолжительной (0,5—1 мин)

задержки. Как целое клетка набухает увеличивая площадь исходного микроскопического изображения не более чем на 20—40 % (рис. 1, в). После прекращения набухания клетки как целого процесс осмотической реакции не прекращается, о чем свидетельствует рост возникающих на ее поверхности мембранных пузырей. [5]. Рост пузырей может сопровождаться деформацией (рис. 3) и последующим разрушением бласто-



Рис. 3. Кинетика осмотической реакции 2-клеточного эмбриона мыши в процессе эквilibрации в 2,3 %-м водном растворе ДМСО, мин: А — 0, В — 0,25, С — 2,5, Д — 5, Е — 10, Е — 25

меров с распределением содержимого цитоплазматического матрикса в объеме пузыря. Размеры *zona pellucida* заметно не увеличивались, однако следующие явления свидетельствовали об образовании в ней дефекта. К 30-й мин экспозиции наблюдалось «прорастание» мембранного пузыря, содержащего цитоплазматический материал; через *zona pellucida* (рис. 4). Можно предположить, что процессы деформации бла-

стомеров и прорастание пузыря через *zona pellucida* являются следствием действия развивающегося в объеме пузыря гидростатического давления. Роль этого фактора в разрушении цитоматрикса менее очевидна. Вопрос о

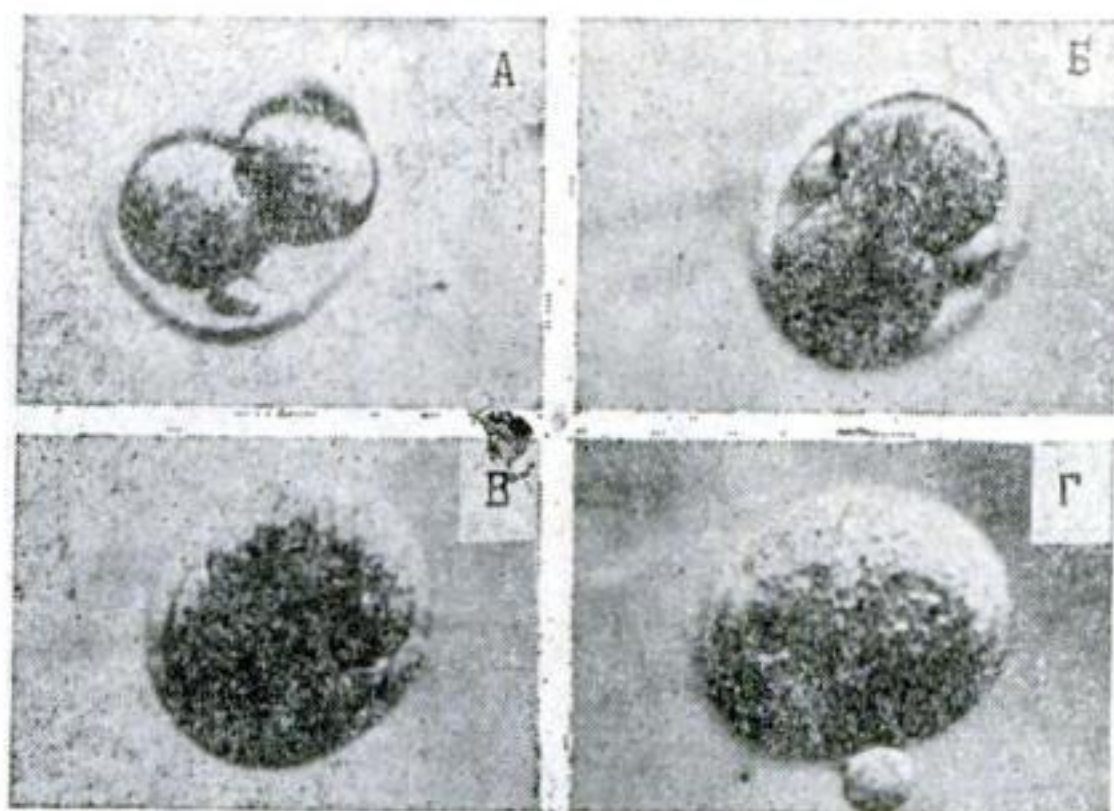


Рис. 4. Кинетика осмотической реакции 2-клеточного эмбриона мыши в 2,3 %-м водном растворе ДМСО, мин: А — 0, В — 3, С — 15, Д — 30; $t = 25^{\circ}\text{C}$

связи процесса разрушения бластомеров с действием повышенного гидростатического давления или дестабилизирующим действием изменения состава среды требует специального изучения. Не исключена возможность стабилизирующего действия на бластомеры высоких концентраций криопротекторов в случае использования гипертонических сред.

В условиях гипотонии непроникающего вещества (78 мМ водный раствор NaCl) мембранная теория предсказывает набухание клетки со скоростью, пропорциональной коэффициенту проницаемости мембраны для воды, площади поверхности клетки и разности химических потенциалов воды на мембране. В условиях, когда концентрация внеклеточной соли меньше изотонической в 2 раза, объем внутриклеточной воды должен удвоиться, а объем клетки с учетом объема сухого остатка увеличиться приблизительно на 80 %. Фактически, как в первой серии опы-

тсв, превышение исходного объема при набухании клетки как целого до образования мембранных пузырей составляло не более чем 30—60 %. При отсутствии образования мембранных пузырей набухание могло быть более выраженным (рис. 5, а).

Условия слабой гипотонии позволили выявить еще один, по нашему мнению, значимый эффект. Образование пузырей в данной серии опытов начиналось с задержкой по времени, что можно объяснить необходимостью преодоления определенного энергетического барьера для разрыва связи мембраны с цитоматриксом. Независимо от того, образовывались пузыри или нет, после фазы стабилизации размеров цитоплазматического матрикса отмечалась фаза его сжатия. Подобный эффект

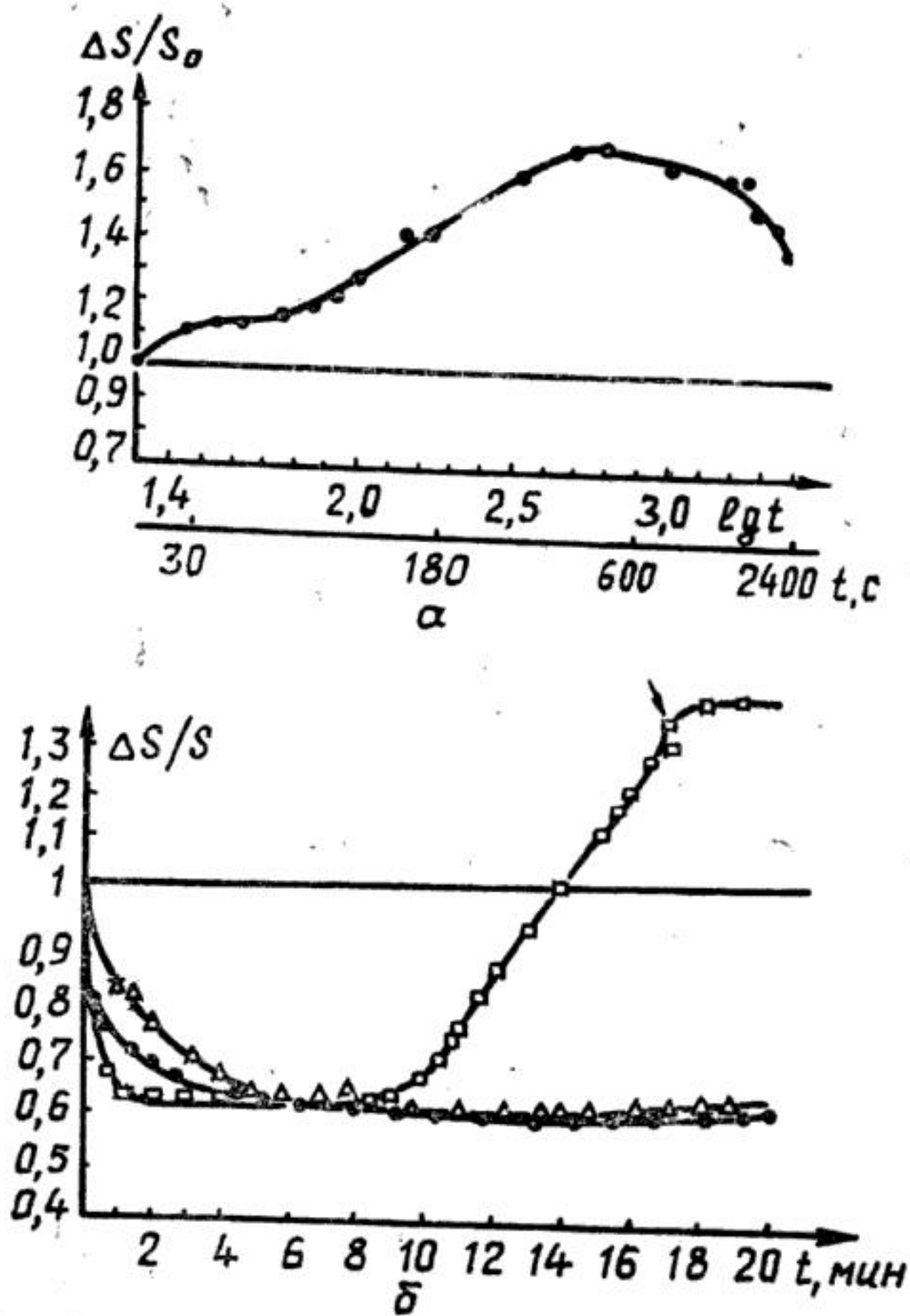


Рис. 5. Изменение относительной площади изображения 2-клеточного эмбриона мыши при эквilibрации клеток в растворах NaCl, мм: а — 78, б — Δ —0,6, $\bullet$ —0,8, $\square$ —1,0. Стрелкой отмечено время появления на поверхности клетки мембранного пузыря

наблюдался и для других типов клеток [7]. Не исключено, что эта фаза связана со свойствами цитоплазматического геля. Однако существует и более простое объяснение фазы сжатия цитоматрикса — выход из клетки ионов в результате нарушения проницаемости ее мембраны.

При изучении поведения эмбрионов мыши в гипертонических растворах NaCl в концентрациях 0,6; 0,8; 1,0 М, как и ожидается в соответствии с мембранной теорией, клетки обезвоживаются и сохраняют обезвоженное состояние до момента нарушения избирательной проницаемости мембраны для внеклеточной соли (рис. 5, б).

Скорость набухания клетки, согласно мембранной теории, должна определяться степенью нарушения избирательной проницаемости, а достигаемый при набухании объем, как и в первых двух сериях опытов, зависеть главным образом от наличия свободной мембранной поверхности. Фактически, однако, как и в предыдущих опытах, площадь клетки при

набухании как целого до образования пузырей увеличивается не более чем на 40 % (по объему — на 65 %).

При помещении клеток в 30 %-й раствор ДМСО, приготовленный на гипотоническом (78 мМ) водном растворе NaCl, в соответствии с мембранной теорией можно ожидать, что после дегидратации клеток установится квазистационарное состояние, а последующее поступление криопротектора в клетку будет происходить со скоростью, пропорциональной коэффициенту проницаемости мембраны для криопротектора, концентрационному градиенту на мембране и площади поверхности мембраны до уровня, ограничиваемого концентрацией соли. В условиях экспериментов, однако, отклонение объема бластомеров от прогнозируемого начинается при набухании до уровня, который мог быть даже ниже уровня исходного объема. За фазой набухания цитоплазматического матрикса практически во всех случаях следовала фаза его сжатия.

Приведенное сравнение прогнозируемой в соответствии с мембранной теорией строения клеток и фактической кинетики осмотических реакций яйцеклеток и эмбрионов мыши показало, что степень развитости цитоскелета влияет на эту кинетику главным образом в диапазоне изменений объема клеток выше исходного. В этом диапазоне сопротивление цитоплазматического матрикса растяжению приводит к разрыву связей мембраны с цитоматриksom и продолжению осмотической реакции путем образования и роста на поверхности клетки мембранных пузырей. Оценка энергетического барьера отслоения мембраны от матрикса и, возможно, сопротивления цитоплазматического геля растяжению может стать основой приложения мембранной теории к системам с развитым цитоскелетом не только в диапазоне изменений клеточного объема от минимального до исходного, но и выше исходного, если за расчет объема клетки принимать объем мембранных пузырей.

Таким образом, роль цитоскелета в осмотической реакции может быть объяснена поведением хорошо сжимаемого, но плохо растяжимого внутриклеточного геля, образующего цитоскелет, связанного с плазматической мембраной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордиенко Е. А. Анализ и численное моделирование трансмембранного переноса молекул воды, криопротектора и перераспределения мембранных компонентов вдоль бислоев при низкотемпературном консервировании клеточных суспензий: Автореф. дис. ... докт. биол. наук.— Харьков, 1990.— 24 с.
2. Гордиенко Е. А., Смольянинова Е. И. Коэффициенты проницаемости яйцеклетки мыши для диметилсульфоксида в области температур 25 — -16 °C // Биофизика.— 1990.— 35, вып. 3.— С. 533.
3. Кузьмин Г. В., Кузьмина Р. И., Новошинский Г. Г. Биофизический уровень гомеостаза в анабиотических системах // Биофизические и биотехнические аспекты гомеостаза.— Красноярск: ИФ СО АН СССР.— 1989.— С. 67—74.
4. Розанов Л. Ф. Криомикроскопическое изучение процессов замораживания и отогрева клеточных суспензий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1977.— 23 с.
5. Розанов Л. Ф., Гордиенко Е. А., Кулешова Л. Г. Неспецифические реакции клеток на физико-химические факторы криоконсервирования // Биохимические аспекты криоповреждения и криозщиты клеточных систем.— Харьков: Б. И., 1989.— С. 48—52.
6. Розанов Л. Ф., Кулешова Л. Г., Лобасенко Н. П. Микроскопическое изучение кинетики изменения объема клеток в гипертонических средах // Проблемы гематологии и переливания крови.— 1980.— № 4.— С. 32—35.
7. Смирнова Е. А., Казачкина Н. Н., Гребеницкая В. В., Чепцов Ю. А. Устойчивость разных типов клеток к действию гипотонии // Цитология.— 1987.— XXIX, № 1.— С. 47—53.
8. Biggers J. D., Whitten W. R., Whittingham D. G. The culture of mouse embryos in vitro // Methods in mammalian embryology.— San Francisco: Freeman and Company.— 1971.— P. 86—116.
9. Cloude Lechene. Cellular volume and cytoplasmic gel // J. Biol. Cell.— 1985.— 55.— P. 177—180.
10. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing // Gen. Physiol.— 1963.— 47, 2.— P. 347—365.
11. Mazur P., Miller R. Permeability of the human erythrocytes to glycerol in 1 and 2 M solutions at 0 or 20 °C // Cryobiology.— 1976.— 13, № 5.— P. 507—522.

12. *Meryman H. T.* Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes // *Nature*.— 1968.— 218, N 5139.— P. 333—336
13. *Toner M., Gravalho E. G., Karel M., Armant D. R.* Cryomicroscopic analysis of intracellular ice formation during freezing of mouse oocytes without cryoadditives // *Cryobiology*.— 1991.— 28, № 1.— P. 55—71.

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

Поступила 20.09.91

L. F. ROZANOV, E. I. SMOLYANINOVA

THE OSMOTIC BEHAVIOR OF MOUSE OOCYTES AND EMBRYOS: THE ROLE OF CYTOSKELETON

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

Comparative studies were carried out on the kinetics of osmotic behavior of mouse oocytes and embryos in solutions of permeable cryoprotectants with different contents of extracellular salt. The features of osmotic behavior of cells which are difficult to be explained in terms of the membrane theory may be interpreted from the point of view of current concepts of the significance of intracellular matrix in the regulation of cell volume.

Л. Ф. РОЗАНОВ, Е. І. СМОЛЬЯНІНОВА

ОСМОТИЧНА ПОВЕДІНКА ЯЙЦЕКЛІТИН І ЕМБРІОНІВ МИШІ ТА РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТА

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України,
м. Харків

За допомогою волюметричного методу проведено порівняльне вивчення кінетики осмотичної поведінки яйцеклітин і ембріонів миші в розчинах проникних криопротекторів з різним змістом позаклітинної солі. Особливості осмотичної поведінки клітин, які важко пояснюються з позицій мембранної теорії, знаходять пояснення з точки зору сучасних уявлень про значення внутріклітинного матрикса в регуляції клітинного обсягу.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 611.013.15

В. И. Грищенко, Ф. И. Осташко, В. В. Исаченко, Е. Ф. Исаченко,
Ф. В. Дахно, А. Б. Сушко, Г. Л. Польщиков

ПОЛУЧЕНИЕ, ГИПОТЕРМИЧЕСКОЕ ХРАНЕНИЕ, ВИТРИФИКАЦИЯ И СВЕРХБЫСТРОЕ ЗАМОРАЖИВАНИЕ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ

Эмбрионы получали от суперовулировавших коров на 13-й и 17-й дни их полового цикла, разрезали на частицы и замораживали прямым погружением в жидкий азот. Трофобласт и частицы эмбриона после гипотермического хранения помещали во влажную камеру термостата для культивирования. Везикулы, которые развивались из частиц трофобласта, подвергали витрификации. Наблюдалось хорошее развитие частиц трофобласта, подвергнутых гипотермии и витрификации, которое практически не отличалось от развития «свежих» частиц трофобласта.

Известно, что после оплодотворения яйцеклетки и образования зиготы последняя начинает выделять комплекс протеинов, оказывающих на эндометрий матки и на весь организм в целом действие, способствующее последующей имплантации эмбриона и нормальному протеканию беременности. По мере превращения зиготы в эмбрион и его развития количество таких выделяемых белков увеличивается, после дифференциации эмбриона на эмбриобласт и трофобласт именно последнему в большей степени присуща функция секреции белков, поддерживающих беременность.

После исследования секреторной способности интактных 12—14 дневных эмбрионов лошади и трофобластических везикул, полученных из этих эмбрионов [1], установили, что секретируемые пептиды имеют молекулярную массу 14500—120000Д. При этом трофобластические везикулы выделяли белки с большей молекулярной массой (44000—100000Д), чем интактные эмбрионы (14500—42000Д).

В широком комплексе воздействий, которые оказывают вышеупомянутые белки на эндометрий матки, в настоящее время точно установлено лишь их антилютеолитическое действие, выражающееся в ингибировании выработки простагландинов группы *F* [2].

Впервые была подробно описана методика извлечения, разделения доимплантационного трофобласта крупного рогатого скота на части, культивирования таких частиц до образования трофобластических везикул в [3]. Позже с использованием аналогичных методик продемонстрировали хорошую способность культивируемых частичек трофобласта развиваться в везикулы со скоростью увеличения диаметра 0,25 мм в день козы и свиньи [5, 13].

Установлено, что не только частицы трофобласта, но и трофобластические везикулы довольно хорошо развиваются после криоконсервации с использованием «медленного» (Виттингемовского) режима замораживания, доля везикул, продолжающих развитие после оттаивания колеблется в пределах 80—90 % [4, 12].

Данные, полученные в [4], свидетельствуют о целесообразности широкого применения пересадок эмбрионов вместе с трофобластическими везикулами, выделяющими вещества, поддерживающие беременность. Пептидсекреторная особенность трофобластических везикул проявляется также и в улучшении результативности совместного с ними культивирования эмбрионов, полученных в результате оплодотворения *in vitro*, от ранних до поздних стадий, в том числе в преодолении эмбрионом на стадии 4—8 бластомеров блока развития [5, 9].

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о недостаточной изученности ряда вопросов, касающихся таких имеющих научный интерес и представляющих перспективу широкого применения в практике образований, каковыми являются трофобластические везикулы.

Так, в доступной литературе отсутствуют данные о способности развиваться в трофобластические везикулы частиц трофобласта, полученных из сохраняемого при субнулевых температурах предимплантационного эмбриона разного возраста (от 12 до 17 сут). Не изучена способность трофобластических везикул и частиц трофобласта переносить сверхбыстрое замораживание [6, 11] и витрификацию [7, 8, 10]. Решению этих вопросов и были посвящены наши исследования.

Для получения предимплантационных эмбрионов восемь коров молочных пород были обработаны на суперовуляцию по существующей схеме введением питуитрального гонадотропина (Фолликулотропин, ЧСФР) с последующей обработкой простагландином $F_{2\alpha}$ (Эстрофан, ЧСФР). Сто два эмбриона были извлечены нехирургическим путем на 13-й (от 2 коров — 45 эмбрионов) и 17-й (от 6 коров — 57 эмбрионов) дни полового цикла и помещены в фосфатно-солевой буфер Дюльбекко (ФСБ, СССР) с 20 % сыворотки новорожденного теленка (СНТ, Серва). Часть из полученных эмбрионов (40 шт.) в чашке Петри помещены на 48 ч в холодильник при 3—6 °С. Все эмбрионы (хранившиеся при субнулевых температурах — через 48 ч и нативные — непосредственно после обнаружения) с помощью лезвия, зажатого в пинцет, были разрезаны на частицы длиной 0,3—0,5 мм. Частицы эмбриона, содержащие эмбриобласт, были удалены из опыта. Из 102 эмбрионов было получено около 2000 частиц трофобласта, разделенных на 4 группы. Частицы I-й группы (500 шт.) были подвергнуты сверхбыстрому замораживанию с 10-минутной эквивалентной в 10 %-м растворе глицерина (Серва), последующим переносом в раствор, состоящий из 50 % 2М раствора сахарозы (Серва), 30 % раствора глицерина и 20 % СНТ, выдержкой в этом растворе 1,5 мин [11].

помещением в пайету и немедленным погружением в жидкий азот. Частицы трофобласта II-й группы (500 шт.) были витрифицированы по А. Мессип путем 10-минутной эквilibрации в 10 % растворе глицерина и 20 % растворе 1,2-пропандиола (Сигма) на ФСБ с 20 % СНТ (I-й эквilibрирующий раствор) [8] помещением в пайету с 25 % раствором глицерина и 25 % раствором 1,2-пропандиола (II-й витрифицирующий раствор) и немедленным погружением в жидкий азот [8]. Часть из 500 витрифицированных частиц (150 шт.) была помещена в пайету и перенесена в жидкий азот в I-м эквilibрирующем растворе. Оттаивание замороженных частиц было проведено в водяной бане при 37 °С, выведение криопротектора — одноступенчатое — в 0,75М растворе сахарозы в течение 10 мин. После этого частицы были 5 раз отмыты в 20 % СНТ на ФСБ и помещены для культивирования в такую же среду с добавлением 100 мкг/мл канамицина. Оттаивание витрифицированных частиц трофобласта проводилось в водяной бане при 20 °С, выведение криопротектора — одноступенчатое в 1 М растворе сахарозы в течение 10 мин. Последующие манипуляции такие же, как с замороженными сверхбыстрым методом эмбрионами.

Трофобластические частицы III-й группы (500 шт.) были поставлены на культивирование в термостатированной влажной камере при 39 °С. Частицы IV-й группы (500 шт.) были помещены в холодильник при 3—6 °С на срок 48 ч. В первой серии опытов критерием развития «свежих» частиц трофобласта, частиц трофобласта после оттаивания, частиц трофобласта, хранившихся при субнулевых температурах, частиц, полученных из эмбрионов, хранившихся при субнулевых температурах, была их способность развиваться в трофобластические везикулы.

Во второй серии опытов развившиеся трофобластические везикулы диаметром 0,5—2,0 мм в количестве 600 шт. были разделены на 2 группы. Везикулы I-й группы (500 шт.) были витрифицированы и девитрифицированы по описанной выше методике витрификации частиц трофобласта; II-й группы — заморожены в I-м эквilibрирующем растворе. Во второй серии опытов критерием развития трофобластических везикул было восстановление их формы после криоконсервации с последующим увеличением диаметра.

Результаты, полученные в первой серии опытов (на частицах трофобласта), представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Выживаемость частиц трофобласта, подвергшихся сверхбыстрому замораживанию, витрификации и гипотермии

Группа	Воздействие	n, шт.	Выживаемость частиц	
			$\bar{M}$, шт.	$M \pm m$, %
I	Сверхбыстрое замораживание	500	55	$11,0 \pm 1,4^1$
II	Витрификация	350	336	$96,0 \pm 1,0^2$
III	Замораживание в I-м эквilibрирующем растворе частиц трофобласта, подвергшихся гипотермии	150	63	$42,0 \pm 4,0^3$
IV	Частицы трофобласта, полученные из эмбрионов, подвергшихся гипотермии	200	196	$98,0 \pm 0,9$
V	Контроль (свежие)	500	490	$98,0 \pm 0,6$

Примечание. $P_{1-2, 2-3, 1-3} < 0,001$.

Отмечено также отсутствие каких-либо различий в развитии свежих, подвергавшихся гипотермии витрифицированных частичек трофобласта, полученных из эмбрионов в зависимости от возраста последних (13 и 17 сут). При увеличении диаметра трофобластической везикулы прозрачность ее стенок уменьшается, что объясняется их утолщением, т. е. увеличением количества клеточных слоев.

В табл. 2 представлены результаты витрификации развившихся в везикулы частичек трофобласта.

Таблица 2

Выживаемость трофобластических пузырьков, подвергшихся витрификации

Воздействие	п, шт.	Выживаемость	
		М, шт.	М±m, %
Витрификация	500	50	10,0±1,3
Замораживание в 1-м эквilibрирующем растворе	100	0	0
Контроль (свежие)	500	450	98,0±0,6

Наблюдение за развитием трофобластической везикулы из частички трофобласта позволило установить, что везикула развивается из клеток трофобласта, которые располагаются не на периферии, а в глубине ткани.

При криоконсервации трофобластических везикул наблюдается четко выраженная осмотическая реакция: при насыщении криопротектором, как и при переносе везикулы в раствор сахарозы, ее стенки спадаются, пузырек «сжывается» или приобретает вид, напоминающий эритроцит. При помещении везикул после выведения криопротектора в питательную среду практически не обнаружены везикулы, восстановившие свою первоначальную форму полностью. Дальнейшее развитие отмечалось лишь у немногих образований, характер развития указывал на то, что новая трофобластическая везикула развивается из отдельного участка (неповрежденных тканей) старого.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о целесообразности применения гипотермии, витрификации для сохранения частиц трофобласта и дальнейшего их использования при ОИВ и пересадках эмбрионов. Результаты также косвенно указывают на возможность использования таких доступных образований, как частицы трофобласта или трофобластические везикулы в исследовательской работе по криоконсервации клеток и тканей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Altschul M., Ignatz G., Gurrit W., Ball B. Synthesis and release of peptides produced by equine trophoblastic vesicles in vitro // *Theriogenology*.—1990.— № 33.— P. 187.
2. Helmer S., Gross T., Newton G. et al. Bovine trophoblast — protein — 1 complex alters endometrial protein and prostaglandin secretion and induces an intracellular inhibitor of prostaglandin synthesis in vitro // *J. Reprod. Fert.*—1987.— № 87.— P. 421—430.
3. Heyman Y., Camouss S., Terve J. et al. Maintenance of the corpus luteum after uterine transfer of trophoblastic vesicles to cyclic cows and ewes // *J. Reprod. Fert.* 1984.— № 70.— P. 533—540.
4. Heyman Y., Chezsne P., Ghupin P., Menezo Y. Improvement of survival rate of frozen cattle blastocysts after transfer with trophoblastic vesicles // *Theriogenology*.— 1987.— Ц 27.— P. 477—487.
5. Heyman Y., Menezo Y., Ghesne P. et al. In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co — culture with trophoblastic vesicles // *Theriogenology*.— 1987.— № 27.— P. 59—65.
6. Kassai M., Komi J., Takakamoto A. et al. A simple method for mouse embryo-cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability // *J. Reprod. Fert.*—1990.— № 89.— P. 91—97.
7. Kobayashi K., Nagashima H., Yamakawa H. et al. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method // *Theriogenology*.— 1990.— № 33.— P. 777—788.
8. Massip A., Van Zwalm P., Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification // *Gryo — Letters*.— 1986.— № 7.— P. 270—273.
9. Nakao H., Nahatsuji N. Effect of co-culture medium components and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro fertilised bovine embryos // *Theriogenology*.— 1990.— № 33.— P. 591—600

10. Rall W., Wood M., Kirby C. In vivo development of mouse embryos cryopreservation by vitrification // Cryobiology. — 1985. — № 22. — P. 603.
11. Riha V., Landa V. Postury vitrifikace embryi skotu a jejich prezivani po kultivaci in vitro // Zivoc. vyroba. — 1989. — 34. — P. 1057—1962.
12. Rorie R., Pendleton R., Pool S. et al. Cryopreservation of bovine trophoblastic vesicles // Theriogenology — 1987. — 27. — P. 272.
13. Selgzath J., Wright R. Jr. In vitro culture and maintenance of trophoblastic vesicles: observations on the development of contractile structures with concurrent vessel development // Theriogenology. — 1987. — 29. — P. 873—881.

Ин-т проблем криобиологии и
криомедицины АН Украины,
Научно-производственная ассоциация
«Эмбрион» Украинской академии аграрных наук, г. Харьков

Поступила 03.06.91

V. I. GRISHCHENKO, F. I. OSTASHKO, V. V. ISACHENKO, E. F. ISACHENKO,
F. V. DAKHNO, A. B. SUSHKO, G. L. POLSHCHIKOV

ISOLATION, HYPOTHERMIC STORAGE, VITRIFICATION AND ULTRARAPID FREEZING OF TROPHOBLAST VESICLES

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian
Academy of Sciences, Kharkov
Scientific and Production Association EMBRYON of the Ukrainian Academy
of Agrarian Sciences

Embryos were obtained from superovulated cows on the 13th and 17th days of their sexual cycle, cut into pieces and frozen by direct plunging into liquid nitrogen. Trophoblast and embryo pieces after hypothermic storage were placed to a humid chamber of thermostat for cultivation. Vesicles developed from the trophoblast particles were subject to vitrification. The development of trophoblast pieces subject to hypothermia and vitrification was virtually as good as that of fresh trophoblast pieces.

В. І. ГРИЩЕНКО, Ф. І. ОСТАШКО, В. В. ІСАЧЕНКО, Є. Ф. ІСАЧЕНКО,
Ф. В. ДАХНО, О. В. СУШКО, Г. Л. ПОЛЬЩИКОВ

ОДЕРЖАННЯ, ГІПОТЕРМІЧНЕ ЗБЕРІГАННЯ, ВІТРИФІКАЦІЯ І ПОНАДШВИДКЕ ЗАМОРОЖУВАННЯ ТРОФОБЛАСТИЧНИХ ВЕЗИКУЛ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України,
Науково-виробнича асоціація «Ембріон» Української академії
аграрних наук, м. Харків

Ембріони одержували від корів, що суперовулювали на 13-й і 17 дні їх статевого циклу, розрізали на частинки і заморожували прямим занурюванням у рідкий азот. Трофобласт і частинки ембріона після гіпотермічного зберігання вміщали у вологу камеру термостата для культивування. Везикули, які розвивалися із частинок трофобласта, піддавали вітрифікації. Спостерігався нормальний розвиток частинок трофобласта, які піддані гіпотермії і вітрифікації, він практично не відрізнявся від розвитку «свіжих» частинок трофобласта.

УДК 57.043:579

И. П. Высеканцев, О. Ф. Тарасова

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *Haemophilus*

Повреждение и гибель гемофильных бактерий при замораживании может происходить в результате воздействия температурного шока, осмотического шока, повышенных концентраций солей и изменений pH суспензионной среды. При замораживании гемофильных бактерий, суспендированных в 0,14 М растворе NaCl, на их сохранность оказывает влияние исходная концентрация бактериальных клеток. Наиболее эффективным режимом криоконсервирования гемофильных бактерий является одноэтапное охлаждение со скоростью 400 °C/мин до температуры —196 °C с использованием в качестве среды консервирования мясо-пептонного бульона.

Для консервирования коллекционных культур гемофильных бактерий в настоящее время наиболее широко используют лиофилизацию. Однако как на этапах лиофилизации, так и в процессе хранения лиофилизированных образцов происходит значительная гибель бактерий, что приводит к необходимости в повторных пересевах с последующей лиофилизацией. Кроме того, при лиофилизации могут возникать одонитовые разрывы ДНК, что, в свою очередь, может привести к образованию индуцированных мутаций [9].

Сообщения о криоконсервировании гемофильных бактерий в литературе отсутствуют. В связи с этим нами были проведены исследования по изучению влияния различных режимов охлаждения, защитных сред и исходной концентрации клеток на выживаемость гемофильных бактерий при замораживании до -196°C , а также их чувствительности к физико-химическим факторам, вызывающим повреждения биологических объектов при замораживании-отогреве [1].

Исследования проводили с бактериями *Haemophilus influenzae* Type C NCTC 8469, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus aegyptius*, полученными из Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов (ВНИИгенетика, Москва). Выращивали бактерии в течение 2 сут на скошенном шоколадном агаре [6] при 37°C в атмосфере с повышенным содержанием углекислого газа. Клеточные суспензии готовили путем смыва бактерий со скошенного агара.

Замораживали бактерии в металлических контейнерах объемом 1 мл на программном замораживателе биообъектов УОП-6 (СКТБсОП ИПКиК АН Украины, Харьков). Отогревали образцы на водяной бане. В качестве сред консервирования использовали мясо-пептонный бульон (МПБ) [4] и водные растворы глицерина (ч. д. а.), сахарозы (х. ч.), полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 (х. ч., ПЭО-400), димексида (ДМСО, Львовский химико-фармацевтический завод). Чувствительность бактерий к температурному шоку, осмотическому шоку, гиперконцентрации солей, изменению pH суспензионной среды определяли по методикам, описанным в [2, 3].

Жизнеспособность бактерий оценивали методом Коха [7] по количеству макроколоний, сформировавшихся на агаризованной среде.

Чувствительность бактерий рода *Haemophilus* к температурному шоку

Условия эксперимента	Количество жизнеспособных бактерий в 1 мл ($\times 10^6$)		
	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>
	$\bar{x} \pm Sx$	$\bar{x} \pm Sx$	$\bar{x} \pm Sx$
Исходное количество жизнеспособных бактерий	$6,2166 \pm 0,2186$	$1,0033 \pm 0,202$	$2,97 \pm 0,1729$
Медленное охлаждение от 41 до 1°C	$6,184 \pm 0,2577$ $P_1 > 0,05$	$1,1033 \pm 0,2258$ $P_1 > 0,05$	$2,96 \pm 0,2468$ $P_1 > 0,05$
Быстрое охлаждение от 41 до 1°C	$6,2011 \pm 0,2335$ $P_1 > 0,05$	$1,0952 \pm 0,2112$ $P_1 > 0,05$	$2,376 \pm 0,2396$ $P_1 > 0,05$
Медленное охлаждение от 41 до 1°C , замораживание со скоростью $400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ от 1 до -196°C	$3,8333 \pm 0,2216$ $P_1 < 0,05$	$0,8066 \pm 0,2214$ $P_1 < 0,05$	$0,6214 \pm 0,2263$ $P_1 < 0,05$
Быстрое охлаждение от 41 до 1°C , замораживание со скоростью $400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ от 1 до -196°C	$2,2833 \pm 0,2107$ $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	$0,8 \pm 0,2283$ $P_1 < 0,05$ $P_2 > 0,05$	$0,304 \pm 0,1952$ $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$

Примечание. $\bar{x}$ — среднее значение; $\pm \bar{x}$ — среднее квадратическое отклонение; P_1 — уровень доверительной вероятности различий между значениями $\bar{x}$ в контроле и в опыте; P_2 — уровень доверительной вероятности различий между значениями $\bar{x}$ в образцах, подвергавшихся замораживанию до -196°C после медленного и быстрого охлаждения от 41 до 1°C .

Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым методам [5]. Достоверность расчетов 95 %.

При изучении чувствительности бактерий к физико-химическим факторам, сопровождающим процесс замораживания-отогрева, было установлено, что из трех использованных в экспериментах видов гемофильных бактерий два вида были чувствительны к температурному шоку. Бактерии *Haemophilus influenzae* Type C NCTC 8169 и *Haemophilus aegyptius* после быстрого охлаждения в зоне положительных температур становились более чувствительными к последующему замораживанию до -196°C (табл. 1). Кроме того, бактерии *Haemophilus aegyptius* погибали и в результате непосредственного воздействия температурного шока. На бактерии *Haemophilus parainfluenzae* температурный шок воздействия не оказывал.

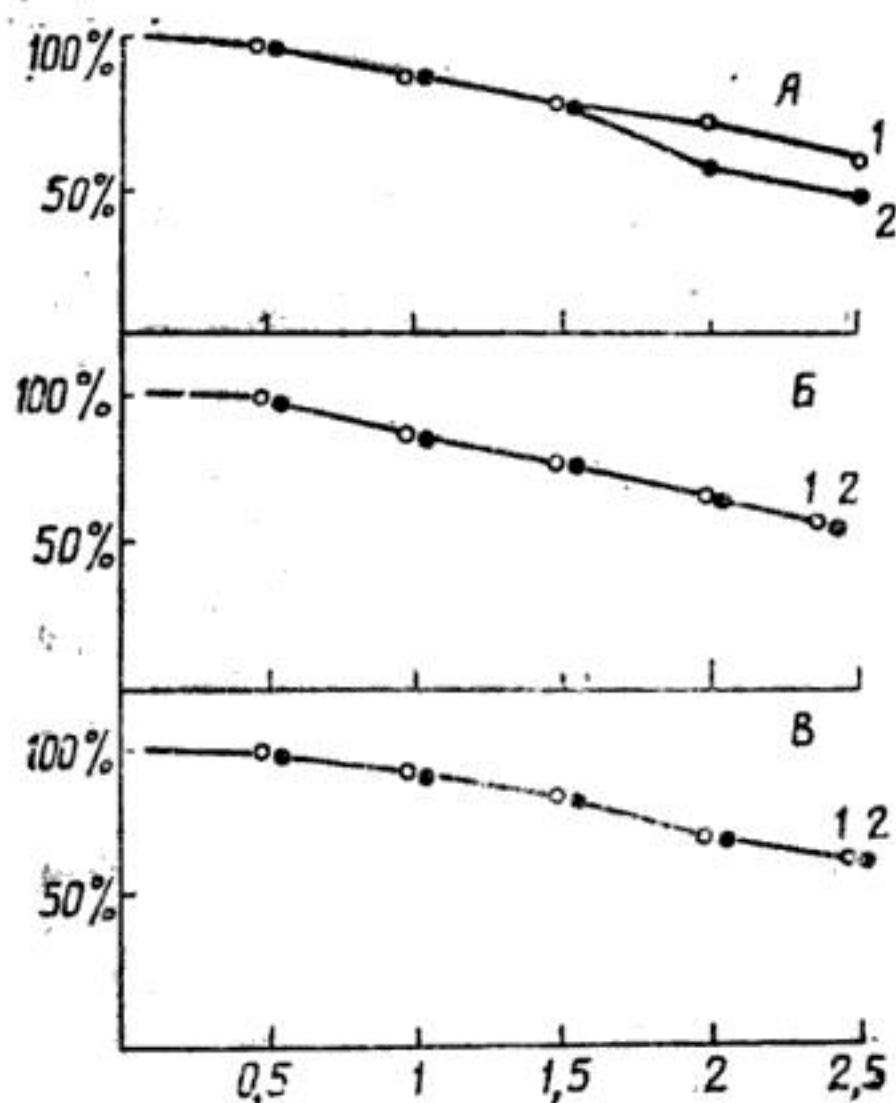
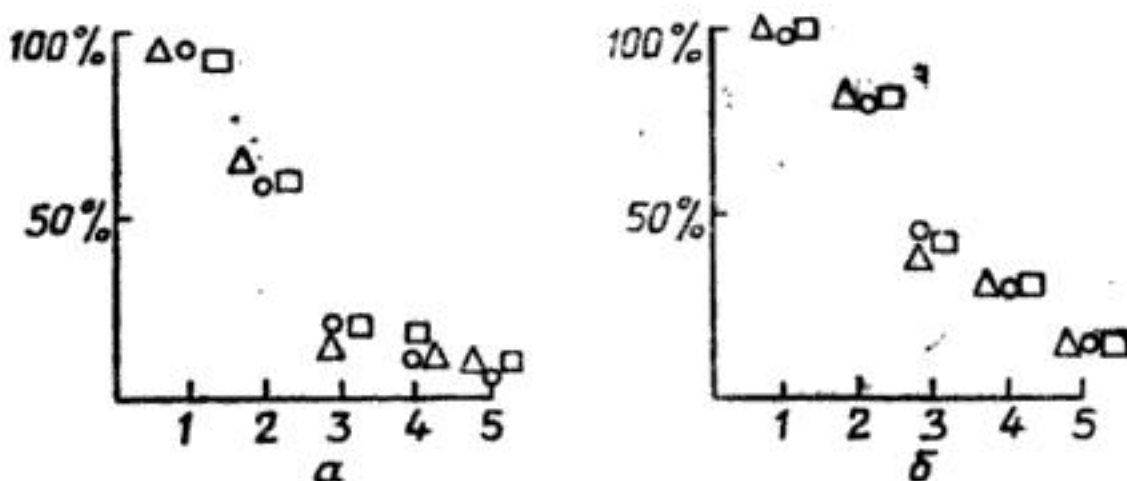


Рис. 1. Количество жизнеспособных бактерий *Haem. influenzae* (А), *Haem. parainfluenzae* (Б), *Haem. egyptius* (В) после экспозиции в растворах NaCl в течение 5 мин (1) и 30 мин (2). По оси абсцисс — концентрация NaCl, М; по оси ординат — количество жизнеспособных бактерий, % от исходного числа

вании в качестве суспензионной среды МПБ (рис. 3). С уменьшением скорости охлаждения выживаемость бактерий снижалась, достигая минимума при охлаждении со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. При всех изучавшихся режимах охлаждения выживаемость бактерий, суспендированных в МПБ, была выше выживаемости бактерий, суспендированных в 0,14 М растворе NaCl. Режим отогрева на сохранность гемофильных бактерий влияния не оказывал — при всех скоростях охлаждения количество жизнеспособных бактерий из образцов, отогретых при 1,5 и 37°C , достоверно не отличалось.

Рис. 2. Количество жизнеспособных бактерий *Haem. influenzae* (○), *Haem. parainfluenzae* (Δ) и *Haem. aegyptius* (□) после гипотонического (а) и гипертонического (б) шока в растворах NaCl. По оси абсцисс — концентрация NaCl, М; по оси ординат — количество жизнеспособных бактерий, % от исходного числа



При изучении возможности применения криопротективных веществ для криоконсервирования гемофильных бактерий было исследовано прежде всего токсическое действие на них глицерина, сахарозы, ДМСО и ПЭО-400. Для этого определяли количество жизнеспособных клеток до и после эквilibрации в течение 30 мин при температуре 37°C с ра-

створами перечисленных выше веществ в концентрации 0,1; 0,5; 1 М. Глицерин, ДМСО, ПЭО-400 оказывали токсическое действие на гемофильные бактерии. Количество погибших бактерий возрастало с увеличением концентрации этих веществ и времени эквilibрации. Сахароза в исследованных концентрациях при температуре 37 °С токсического действия на гемофильные бактерии не оказывала.

В последующих экспериментах изучали сохранность гемофильных бактерий, замороженных до -196 °С в растворах сахарозы и в МПБ. Бактерии, суспендированные в МПБ и в водных растворах сахарозы в концентрациях 0,1; 0,5; 1 М, замораживали со скоростью охлаждения 400 °С/мин и отогревали на водяной бане при 37 °С. Эти эксперименты показали, что сахароза не оказывала криопротективного действия при замораживании гемофильных бактерий, а наоборот, приводила к дополнительной гибели клеток. Проявляющееся при замораживании токсическое действие сахарозы на гемофильные бактерии усиливалось с возрастанием ее концентрации (рис. 4).

В заключительных экспериментах изучали сохранность гемофильных бактерий после замораживания образцов с различной исходной концентрацией клеток. В качестве суспензионных сред использовали МПБ и 0,14 М раствор NaCl. Замораживание производили со скоростью 400 °С/мин. Концентрация бактерий в образцах изменялась от 10⁴ до 10¹² клеток/мл. Было установлено, что изменение концентрации бактерий, суспендированных в МПБ, от 10⁴ до 10¹² клеток/мл не влияло на их сохранность при замораживании. Выживаемость бактерий, суспендированных в 0,14 М растворе NaCl, при концентрациях 10⁴—10¹⁰ клеток/мл достоверно не изменялась и оставалась ниже выживаемости клеток,

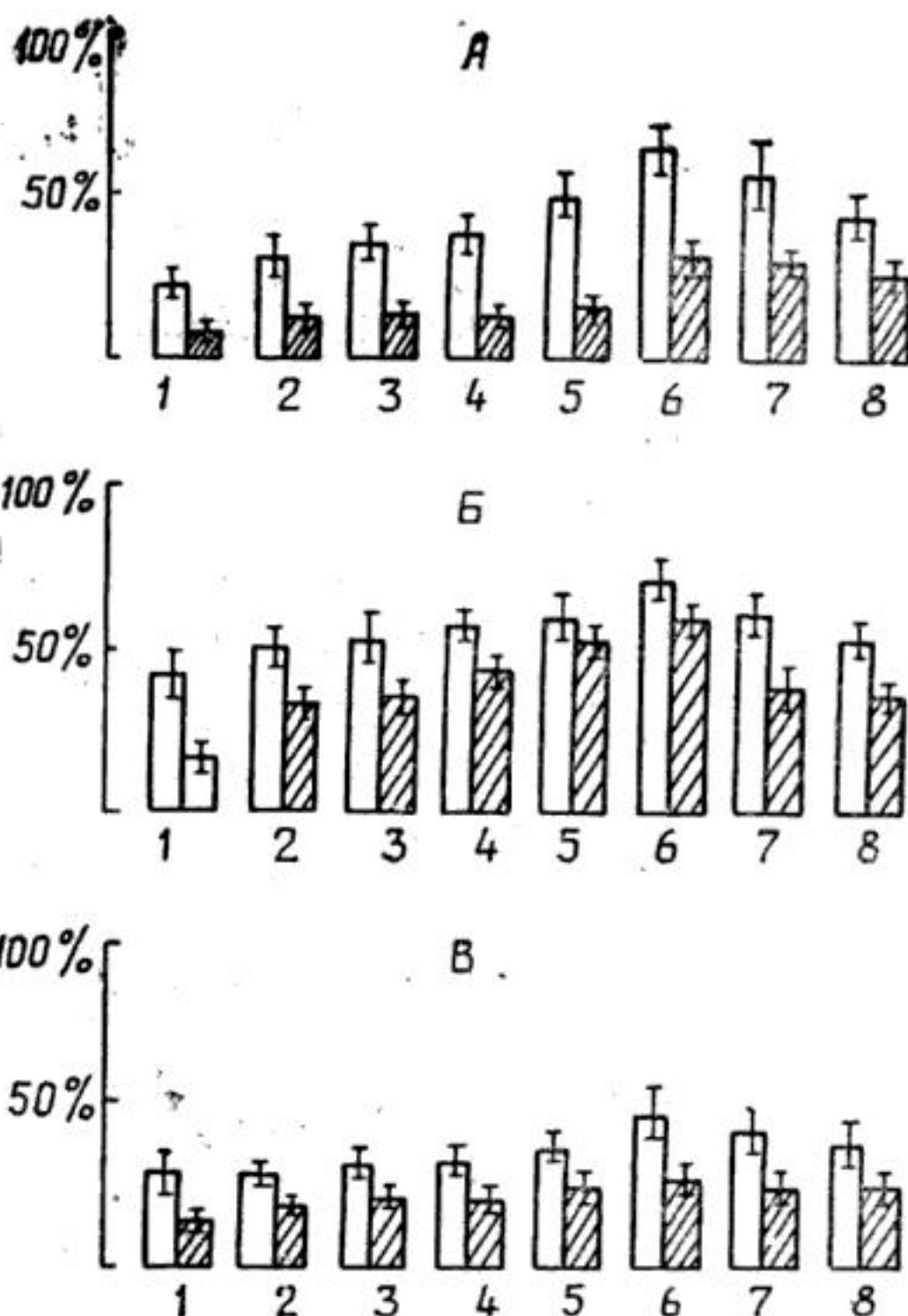


Рис. 3. Выживаемость бактерий *Haem. influenzae* (А), *Haem. parainfluenzae* (Б), *Haem. aegyptius* (В) после замораживания до -196 °С по различным режимам в МПБ (□) и 0,14 М растворах NaCl (заштрихованные столбики), 1, 2, 3, 4, 5, 6 — одноэтапное охлаждение со скоростью соответственно 2, 10, 20, 30, 40, 400 °С/мин; 7, — двухэтапное охлаждение со скоростью 0,1 °С/мин от 20 до -10 °С и 5 °С/мин от -10 до -196 °С; 8 — 2-этапное охлажд. со скоростью 0,1 °С/мин. от 20 до -10 °С и 400 °С/мин от -10 до -196 °С.

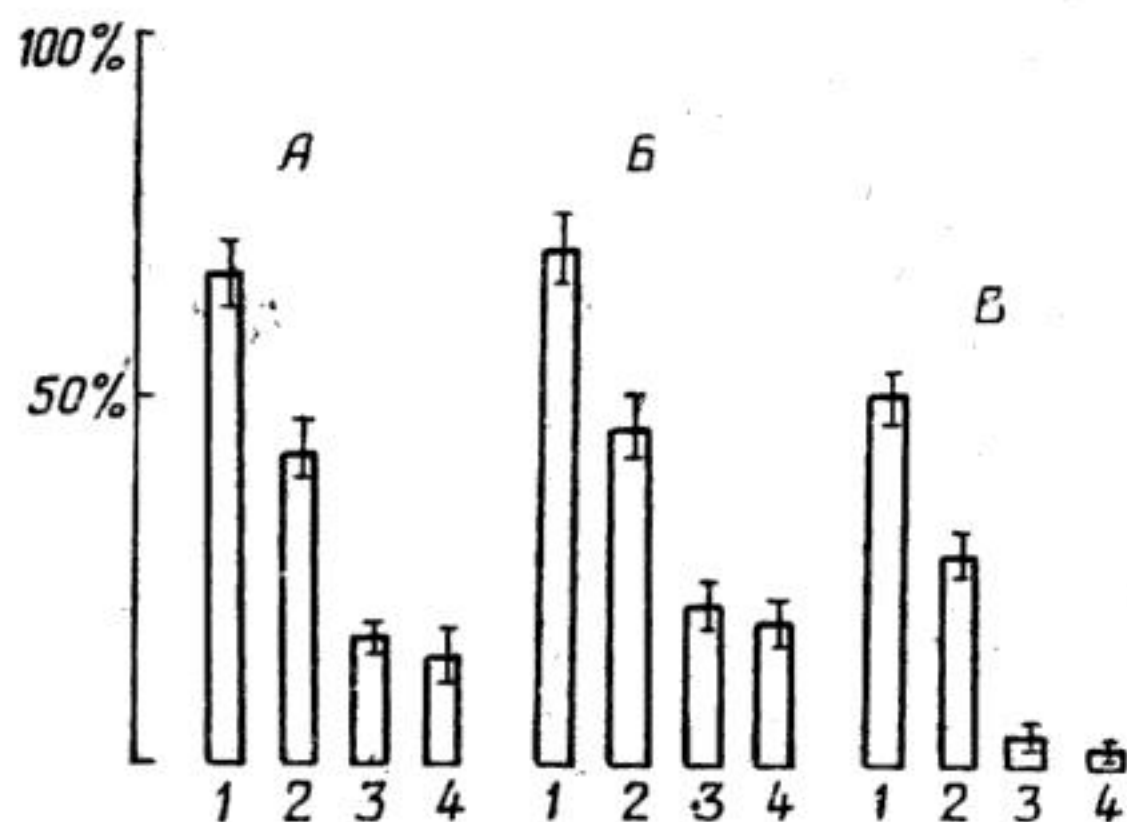


Рис. 4. Количество жизнеспособных бактерий *Haem. influenzae* (А), *Haem. parainfluenzae* (Б), *Haem. aegyptius* (В) после замораживания в МПБ (1) и 0,1; 0,5; 1 М (соответственно 2, 3, 4) растворах сахарозы

суспендированных в МПБ. С увеличением концентрации бактерий, суспендированных в 0,14 М растворе NaCl, до 10^{11} — 10^{12} клеток/мл выживаемость их повышалась, достигая значений, полученных при замораживании бактерий, суспендированных в МПБ (рис. 5).

Представленные результаты свидетельствуют о том, что на сохранность гемофильных бактерий при замораживании оказывают значительное влияние физико-химические факторы, появление которых обуслов-

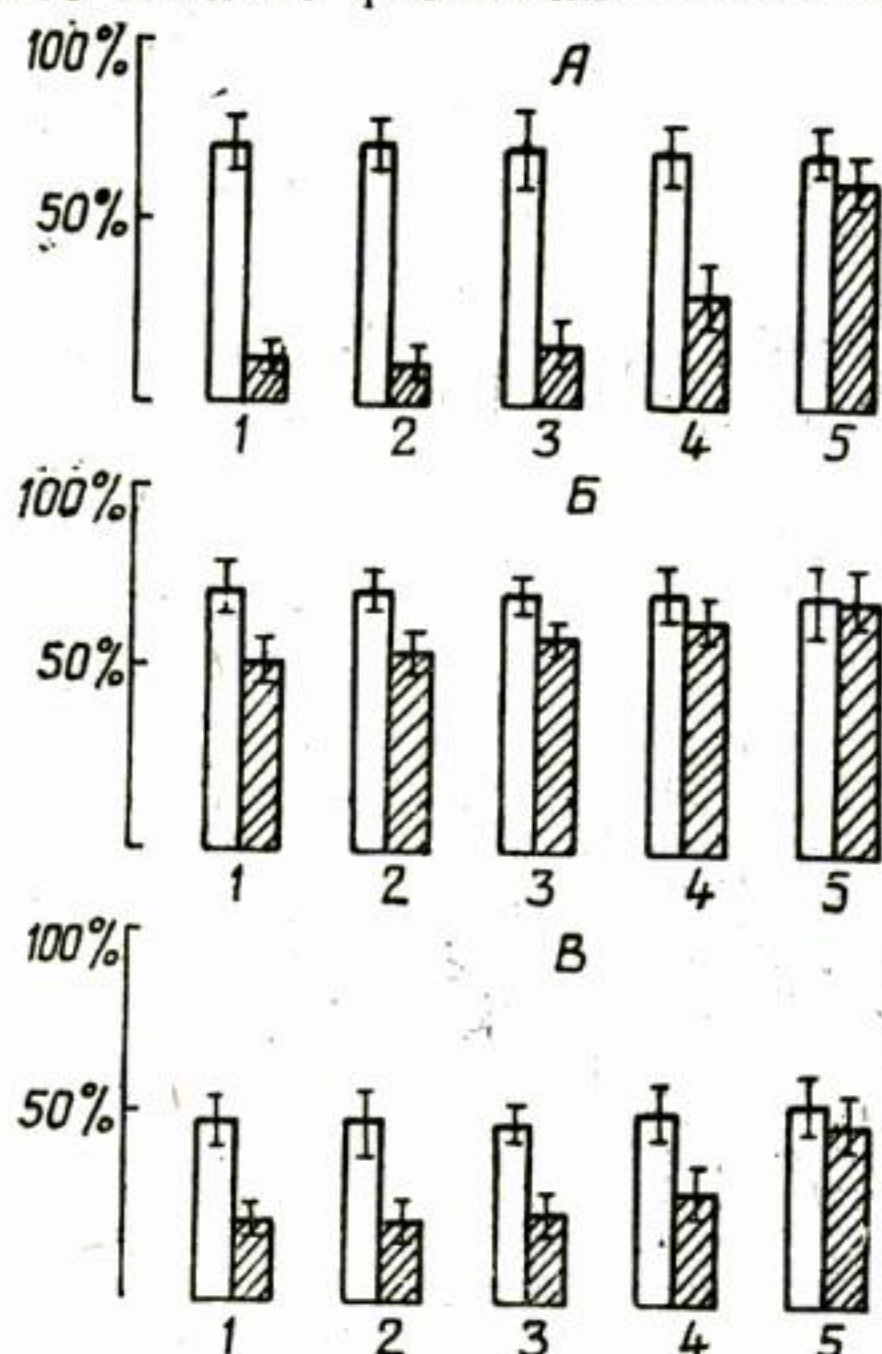


Рис. 5. Сохранность бактерий *Haem. influenzae* (А), *Haem. parainfluenzae* (Б), *Haem. aegyptius* (В), суспендированных в МПБ (□) и 0,14 М растворе NaCl (заштрихованные столбики) после замораживания до -196°C с различной исходной концентрацией клеток в замораживаемых образцах; 1, 2, 3, 4, 5 — концентрация клеток/мл соответственно 10^4 , 10^6 , 10^8 , 10^{10} , 10^{12}

температур, так как оказывают на них токсическое действие. Выраженный защитный эффект при замораживании гемофильных бактерий оказывает МПБ. Из-за сложности состава МПБ [4] трудно предположить полный механизм его криопротективного действия на бактерии. Скорее всего, пептон и другие компоненты МПБ стабилизируют клеточную мембрану гемофильных бактерий, как это было показано с капсидом вирусных частиц [11]. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты изучения сохранности бактерий после замораживания образцов с различной концентрацией клеток. Полученные данные о том, что выживаемость бактерий, суспендированных в МПБ, не зависит от концентрации клеток в замораживаемом образце, можно объяснить тем, что пептон и другие компоненты МПБ стабилизируют до определенной степени клеточную мембрану криолабильных клеток. При замораживании бактерий в 0,14 М растворе NaCl, в образцах, содержащих до 10^{10} клеток/мл, криолабильные клетки погибают. С увеличением концентрации выше 10^{10} клеток/мл срабатывают один или оба из предполагаемых механизмов — выход из клеток в процессе охлаждения веществ, оказывающих криопротективное действие [10], или изменение при высоких концентрациях клеток в замораживаемой суспензии процессов кристаллиза-

чено фазовым переходом воды, — повышение концентрации солей, изменение pH окружающей среды, осмотический шок. Как известно, эти факторы наиболее выражены при образовании крупных кристаллов льда, что имеет место при медленных скоростях охлаждения [1, 8]. Следовательно, по чувствительности бактериальных клеток к физико-химическим факторам, сопровождающим процесс криоконсервирования, можно прогнозировать как чувствительность к различным режимам охлаждения, так и общую чувствительность к низким температурам.

Результаты изучения чувствительности бактерий к температурному шоку показывают, что уже межвидовые различия бактерий в строении клеток влияют на чувствительность бактерий к повреждающим факторам при охлаждении.

Широко применяющиеся при криоконсервировании микроорганизмов в качестве криопротекторов глицерин, сахароза, ДМСО, ПЭО-400 не пригодны для защиты гемофильных бактерий от повреждающего действия низких

ції і рекристалізації [8], внаслідок чого виживаемість бактерій при одній і тій же швидкості охолодження підвищується.

Результати проведених досліджень дозволяють запропонувати наступний режим криоконсервування гемофільних бактерій: одноетапне охолодження зі швидкістю 400 °С/хв з використанням в якості середовища консервування МПБ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Актуальні проблеми криобіології / Під ред. Н. С. Пушкаря, А. М. Белоуса — Київ: Наук. думка, 1981. — 607 с.
2. Андерсон Т., Раппопорт І., Мускатин Н. Структура і осмотичні властивості частини фага / Онтогенез вірусів. — М.: Изд. нв. лит., 1956. — С. 40.
3. Висеканцев І. П. Біологічні властивості криоконсервованих бактеріофагів *Escherichia coli*: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Харків, 1983. — 23 с.
4. Лабінська А. С. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень. — М.: Медицина, 1978. — 392 с.
5. Лакін Г. Ф., Біометрія. — М.: Вища школа, 1980. — 293 с.
6. Методичні рекомендації по виділенню і ідентифікації мікробів роду *Haemophilus*. — М.: МЗ СРСР, 1979. — 18 с.
7. Практикум по мікробіології / Під ред. Егорова Н. С. — М.: Изд. Моск. гос. ун-та, 1976. — С. 61.
8. Пушкар Н. С., Белоус А. М., Іткін Ю. А. і др. Низькотемпературна кристалізація в біологічних системах. — Київ: Наук. думка, 1977. — 243 с.
9. Aschwood-Smith M. J. Mutation induction in bacteria produced by freeze-drying and dessication // Cryobiology. — 1979. — 16, N 16. — P. 590—597.
10. MacLeod R. A., Calcott P. H. Cold shock and freezing damage to microbes. 26th symp. soc. gen. microbiol. Univ., Cambridge, 1976. — P. 81—109.
11. Steel P. R. M., Davies J. D., Greaves R. I. N. Some factors affecting the viability of freeze-thawed T4 bacteriophage // J. Hyg. Camb. — 1969. — 67, N 1. — P. 107—114.

Ін-т проблем криобіології і криомедицини
АН України, г. Харків

Поступила 03.06.91

I. P. VYSEKANTSEV, O. F. TARASOVA

CRYOPRESERVATION OF MICROORGANISMS OF *HAEMOPHILUS* STRAIN

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

Damage and death of haemophilus microorganisms by freezing may occur due to thermal shock, osmotic shock, high salt concentration and change in pH of the suspension medium. The initial concentration of bacterial cells affects the maintenance of haemophilus microorganisms suspended in 0.14 M NaCl solution. Single-step cooling at a rate of 400 °C/min to —196 °C using a meat-pepton broth as cryopreservation medium appeared to be the most effective method of cryopreservation of haemophilus microorganisms.

І. П. ВИСЕКАНЦЕВ, О. Ф. ТАРАСОВА

КРИОКОНСЕРВУВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *HAEMOPHILUS*

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України,
м. Харків

Пошкодження і загибель гемофільних бактерій при заморожуванні може відбуватися внаслідок дії температурного шоку, осмотичного шоку, підвищених концентрацій солей і змін pH суспензійного середовища. При заморожуванні гемофільних бактерій, суспендованих в 0,14 М розчині NaCl, на їх збереження впливає первісна концентрація бактерійних клітин. Найефективнішим режимом криоконсервування гемофільних бактерій є одноетапне охолодження зі швидкістю 400 °С/хв до температури —196 °С з використанням для середовища консервування м'ясо-пептонного бульйону.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ВСХОЖЕСТЬ И ПРОДУКТИВНЫЕ СВОЙСТВА СЕМЯН СОИ

Приведены экспериментальные данные о жизнеспособности семян сои после низкотемпературного стресса. Исследованы различные режимы охлаждения и отогрева. Показано, что влияние криовоздействий на семена зависит от режимов криообработки, условий получения семян и их размеров.

В связи с расширением ареала сои за счет северных зон возделывания возникает необходимость обеспечения потребителей высококачественным посевным материалом. Однако известно, что семена сои быстро теряют посевные кондиции в процессе хранения и отличаются низкой экологической устойчивостью при прорастании [2, 4]. Селекционно-генетическое улучшение сохраняемости и холодостойкости семян сои до настоящего времени еще не достигнуто. Поэтому очевиден практический интерес к технологическим приемам, с помощью которых можно было бы повысить указанные признаки. Одним из наиболее эффективных приемов следует признать низкотемпературную обработку семян перед посевом. Показано, что предпосевное промораживание семян сои не снижает их всхожести и энергии прорастания и не оказывает достоверного влияния на химический состав товарного зерна [1]. Другие авторы [3, 5] не исключают даже возможности холодной активации ключевых ферментов сои на ранних этапах прорастания. Однако эти данные еще не дают основания для рекомендаций по использованию низкотемпературных воздействий в семеноводстве сои, поскольку не указывают на взаимосвязь между холодовым воздействием и продуктивностью. Поэтому задачей наших исследований 1987—1988 гг. было изучение влияния криовоздействия на всхожесть, интенсивность начального роста и продуктивные свойства семян сои.

Объектом исследований служили семена сои сорта Белоснежка двухлетней репродукции, расфракционированные на сите с диаметром ячейки 5 мм на мелкую и крупную фракции. Необходимость фракционирования семян сои по крупности была вызвана принципиально различным характером их прорастания [6]. Криовоздействие проводили на программном замораживателе УОП—600 000 в нескольких режимах охлаждения и отогрева семян (табл. 1).

Таблица 1

Режимы криообработки семян сои

Условия обработки	Скорость охлаждения, °С/мин	Скорость отогрева, °С/мин	Конечная температура охлаждения, °С
Кк — контроль, крупная фракция семян			
Км — контроль, мелкая фракция семян			
1к — режим № 1, крупная фракция	1,0	5,0	—196
1м — режим № 1, мелкая фракция	1,0	5,0	—196
2к — реж. № 2, крупн. фракц.	10,0	5,0	—196
2м — реж. № 2, мелк. фракц.	10,0	5,0	—196
3к — реж. № 3, крупн. фракц.	200,0	5,0	—196
3м — реж. № 3, мелк. фракц.	200,0	5,0	—196
4к — реж. № 4, крупн. фракц.	0,5	20,0	—70
4м — реж. № 4, мелк. фракц.	0,5	20,0	—70

Контрольные и подверженные криовоздействию семена проращивали в лабораторных и полевых условиях, а получение растений осуществляли в условиях естественного и искусственного климата согласно стан-

дартным методикам. В ходе опытов определяли лабораторную и полевую всхожесть, биометрические показатели ростков и корней, а также семенную продуктивность и элементы структуры урожая. Повторность всех опытов 10-кратная. Статистическую обработку результатов исследований осуществляли методом дисперсионного анализа.

В первом эксперименте были использованы семена сои урожая 1986 г. Кривообработка проведена в апреле 1987 г., посев в поле — в мае 1987 г. Биометрические показатели растений и элементы структуры урожая приведены в табл. 2. Результаты опыта свидетельствуют о сниже-

Таблица 2

Биометрические показатели растений сои и элементы структуры урожая в зависимости от крупности семян и режима кривообработки

Условия обработки	Полевая всхожесть, %	Высота растений, см	Количество бобов на 1 растении	Масса бобов с 1 растения, г	Масса 1000 семян, г
Кк	83±4	70±7	36±20	12,5±6,5	347,2±22,0
1к	75±9	71±6	28±15	9,5±2,8	339,3±17,0
2к	64±6	66±6	22±9	5,7±2,6	259,1±18,0
3к	50±10	65±9	29±13	9,6±4,3	331,0±20,0
Км	76±4	62±5	17±4	4,7±1,6	276,5±17,0
1м	80±5	61±5	17±5	4,2±1,2	252,9±19,0
2м	63±4	56±8	25±10	6,1±2,9	244,0±17,0
3м	40±3	61±5	39±14	12,1±4,6	310,3±15,0

нии полевой всхожести семян в зависимости от увеличения скорости их охлаждения. Семена различной крупности по-разному реагировали на низкотемпературное воздействие. Так, высота растений сои, выращенных из мелких семян, не изменяется после холодового воздействия, а у растений, выращенных из крупных семян, этот показатель имеет тенденцию к снижению при больших скоростях охлаждения. Количество и масса бобов на растениях, выращенных из мелких семян, достоверно увеличены при $V_{охл}=200$ °C/мин (режим № 3) и имеют тенденцию к увеличению при $V_{охл}=10$ °C/мин (режим № 2). Для крупных семян такой закономерности не наблюдается, скорее наоборот: криводействие вызывает некоторое снижение количества бобов на растении. Масса семян в вариантах с использованием мелкосемянной фракции при повышении скорости охлаждения от 1 °C/мин до 10 °C/мин снижалась, но при $V_{охл}=200$ °C/мин существенно возрастала. При использовании крупносемянной фракции такой закономерности не наблюдалось, однако следует отметить, что и в этом случае варианты с крайними режимами кривообработки не уступали контрольным.

Результаты эксперимента можно расценить следующим образом: понижение полевой всхожести привело к увеличению площади питания для растений данного варианта и снижение всхожести под воздействием низкотемпературного стресса вполне компенсировалось увеличением индивидуальной семенной продуктивности.

Следующий эксперимент был посвящен изучению сохраняемости кривообработанных семян и их жизнеспособности после хранения. С этой целью часть семян контрольных вариантов и опытных, подвергавшихся различным режимам криводействий, из первого эксперимента была оставлена на хранение в течение 1 года при температуре —20 °C. Затем, в мае 1988 г., семена проращивали в лабораторных условиях и в поле (табл. 3). При этом было обнаружено снижение лабораторной всхожести сои крупной и, особенно, мелкой фракций после наиболее жестких режимов криводействий (режимы № 2 и № 3). Влияние режимов охлаждения на полевую всхожесть крупных семян практически не прослеживалось за исключением варианта 1к. А вариант 2к даже несколько стимулировал этот показатель. У мелких семян имела место прогрессив-

Биометрические показатели проростков сои, полученных из криообработанных семян и подвергнутых хранению

Условия обработки	Лабораторная всхожесть, %	Полевая всхожесть, %	Длина ростка, см	Масса 1-го ростка, г	Масса 1-го корня, г
Кк	82±6	43±5	17,5±2,8	1,11±0,12	1,07±0,08
1к	70±7	36±1	16,2±1,7	1,09±0,02	1,04±0,12
2к	50±7	45±2	14,9±2,0	0,97±0,06	0,93±0,07
3к	34±2	42±3	13,8±2,2	0,99±0,12	0,97±0,06
Км	72±1	42±1	15,3±2,0	0,88±0,06	0,78±0,07
1м	74±5	39±4	14,3±1,4	0,82±0,08	0,72±0,07
2м	46±2	34±5	12,1±1,1	0,78±0,06	0,75±0,06
3м	27±2	12±4	10,7±3,2	0,56±0,06	0,79±0,06

ная обратная зависимость между скоростью охлаждения и полевой всхожестью. Обращает на себя внимание и тот факт, что уровень полевой всхожести у подвергавшихся криовоздействию семян был гораздо ближе к уровню лабораторной всхожести, чем у контрольных вариантов. Таким образом есть основания предполагать, что семена сои, подвергнутые низкотемпературной обработке наиболее жестких режимов, могут быть более устойчивы к действию патогенной почвенной микрофлоры и других факторов, угнетающих прорастание семян в полевых условиях. Что касается биометрических показателей проростков в лабораторном опыте, то длина ростков имеет тенденцию к снижению при возрастании скорости охлаждения как для крупных, так и для мелких семян. При этом крупные семена во всех вариантах формируют более развитые ростки. Однако масса проростков не изменялась после криовоздействия, за исключением варианта 3м. Таким образом, нельзя сделать вывода об угнетающем воздействии низкотемпературного стресса на характер накопления органического вещества проростками. Следует также отметить, что температура -20°C является недостаточно низкой для хранения, поскольку она не препятствует снижению полевой всхожести как в контрольных, так и в опытных вариантах. Очевидно, для сои следует выбирать иной температурный режим длительного хранения.

В третьем опыте были использованы семена 1987 г. репродукции. Их подвергали криовоздействию 10.01.88, а 15.01.88 высевали на фитотроне и выращивали до получения семян нового поколения. Результаты эксперимента представлены в табл. 4. Из них следует, что всхожесть семян сои, подвергнутых низкотемпературному стрессу, не отличалась от контрольной. Только в варианте № 3 всхожесть мелкосемянной фракции была достоверно выше контроля. Масса проростков (корней и рост-

Таблица 4

Биометрические показатели проростков сои, выращенных на фитотроне после различных режимов криообработки

Условия обработки	Всхожесть, %	Масса 1-го ростка, г	Масса 1-го корня, г	Кол-во бобов с 1-го растения шт.	Масса 1-го растения, г
Кк	96±4	1,38±0,02	0,46±0,07	12±1	4,8±1,0
1к	96±3	1,32±0,04	0,40±0,06	12±2	5,1±1,1
2к	84±3	1,03±0,03	0,30±0,02	11±1	4,2±1,4
3к	90±4	1,23±0,04	0,33±0,04		
4к	94±2	1,04±0,01	0,32±0,01		
Км	90±2	1,04±0,03	0,27±0,05	10±2	3,3±0,6
1м	86±3	1,23±0,04	0,27±0,03	17±3	6,2±1,0
2м	88±4	1,14±0,04	0,20±0,04	7±1	2,2±0,3
3м	99±1	1,33±0,05	0,37±0,05		
4м	88±3	1,20±0,03	0,18±0,03		

ков) у крупносемянной фракции во всех вариантах криообработки уступала контролю. У мелких семян наблюдалась стимуляция роста проростков, особенно в варианте № 3. Это свидетельствует о большей интенсивности начального роста мелких семян сои в сравнении с крупными. По количеству и массе бобов, полученных с одного растения, у крупных семян различий между вариантами не обнаружено. Для мелкосемянной фракции наблюдается снижение количества и массы бобов в варианте № 2, а в варианте № 1, наоборот, — достоверное увеличение этих показателей по отношению к контролю.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии строгой корреляции показателей первого и третьего экспериментов, т. е. можно предположить, что они существенным образом зависят от года репродукции семян. Однако во всех опытах отмечена более активная реакция мелких семян в ответ на низкие температуры по сравнению с крупными.

Таким образом, проведенные исследования влияния криовоздействий на семена сои свидетельствуют, что результат этого влияния зависит, как минимум, от трех факторов: режима охлаждения, размеров семян и условий их получения. Путем подбора оптимальной комбинации указанных факторов угнетение показателей жизнеспособности семян сои и их продуктивных свойств может быть сведено к минимуму, а в ряде случаев — возможно их повышение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мельник Б. Е., Кострова Е. М., Семина Н. А., Султанович Ю. А. Влияние промораживания на некоторые физиолого-биохимические и физические свойства высоковлажных семян сои / Всес. заочн. ин-т пищ. пром-сти. — М., 1985. — 10 с. — Деп. в ЦНИИТЭИ 20.08.85, № 606-зг.
2. Duke J. A. Handbook of legumes of world economic importance. — New York—London: Plenum Press, 1981. — 345 p.
3. Okuda Shin-Icki, Kaneko Jun, Ogawa Toshiya et. al. Increase in enzyme activities in embryonic axes of soybean seeds during germination // Adv. and Biol Chem. — 1987. — 51, № 1. — P. 109—113.
4. Roberts E., Ellis R. Seed physiology and seed quality in soybeans // Advances in legume science. — Richmond, 1980. — P. 297—311.
5. Singh Anju. Enhancement in the activities of certain enzymes during chilling treatment of imbibed seeds of certain legumes // J. Indian Bot. Soc. — 1984. — 63, № 1. — P. 83—90.
6. Tajra H., Tajra H., Saito M. Effect of size of seed variety and crop year on the chemical composition of soybean seeds // Proc. Crop Sci. — Japan. — 1974. — 43, N 4. P. 482—492.

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

Поступила 28.03.91

T. F. STRIBUI, N. F. TIMCHUK

THE EFFECT OF LOW TEMPERATURES ON THE GERMINATION AND REPRODUCTION OF SOY-BEN SEEDS

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

The data on viability of soy-bean seeds subject to low temperature stress are presented. Different regimes of freeze-thawing were studied. The effect of low temperatures on the seeds has been demonstrated to depend on the method of cooling, conditions of obtaining seeds and their size.

Т. Ф. СТРИБУЛЬ, Н. Ф. ТИМЧУК

РЕЗУЛЬТАТИ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНИХ ВПЛИВІВ НА СХОЖІСТЬ І ПРОДУКТИВНІ ЯКОСТІ НАСІННЯ СОІ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України,
м. Харків

Приведені експериментальні дані про життєздатність насіння сої після низькотемпературного стресу. Досліджені різноманітні режими охолодження і відігріву. Показано, що результати кріовпливів на насіння залежить від режимів кріообробки, умов одержання насіння і його розмірів.

ГИСТОЭНЗИМОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИННЕРВАЦИИ КОЖИ И РЕГИОНАРНОГО ЛИМФОУЗЛА ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ КОЖНОЙ РАНЫ, НАНЕСЕННОЙ В УСЛОВИЯХ ОБЩЕЙ ГЛУБОКОЙ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ГИПОТЕРМИИ

Изучены изменения нервного аппарата кожи и регионарного лимфоузла при заживлении кожной раны, нанесенной в условиях нормо- и гипотермии. Нервный аппарат выявляли при помощи гистохимических реакций на ацетилхолинэстеразу и моноаминооксидазу. Показан различный характер изменений холинэргических и адренергических нервных волокон кожи и лимфоузла в динамике раневого процесса. Холодовое воздействие усиливало эти различия.

Проблема заживления ран является одной из основных в хирургии [10]. Особенно важно изучение регуляторных механизмов раневого процесса, в том числе нервных и иммунных. Поскольку раневой процесс часто протекает в условиях воздействия на организм неблагоприятных факторов внешней среды, существенно изменяющих его проявления и исход, целый ряд исследований посвящен изучению влияния этих факторов на проявления регенерации [3, 4, 6, 10, 13 и др.]. Однако в литературе имеются лишь единичные работы, посвященные изучению особенностей раневого процесса в коже при действии на организм холода, в том числе пролонгированной глубокой гипотермии.

Настоящее исследование посвящено изучению гистоэнзимологическими методами холинэргической и адренергической иннервации кожи и регионарного лимфоузла при заживлении кожной раны, нанесенной в условиях глубокой пролонгированной (6-часовой) гипотермии.

Эксперименты выполнены на 95 белых половозрелых крысах. Животных 1-й группы (45 крыс) после предварительной наркотизации нембуталом в дозе 40 мг/кг массы внутрибрюшинно охлаждали до ректальной температуры 20—18 °С и наносили им в межлопаточной области стандартные полнослойные раны диаметром 15 мм. У этих животных поддерживали гипотермическое состояние при указанной температуре в течение 6 ч, после чего их согревали. Продолжительность эксперимента от начала охлаждения до окончания согревания составляла около 10 ч. Методика гипотермии описана ранее [2]. Контрольным крысам (2-я группа, 45 крыс) стандартные раны под нембуталовым наркозом наносили в состоянии нормотермии, эти животные затем содержались в обычных условиях, ректальная температура соответствовала 37 °С. В обеих сериях опытов определяли скорость контракции краев раны путем ежедневной планиметрии [10] и интенсивность внераневого вставочного роста методом тушевых меток [5]. Животных обеих групп декапитировали в одно и то же время через 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 и 30 сут после нанесения раны. Кожный регенерат с окружающей интактной кожей и регионарный лимфоузел замораживали в жидком азоте и готовили криостатные срезы. Изучен также материал от 5 интактных животных. Холинэргический и адренергический компоненты нервного аппарата кожи и лимфоузла выявляли при помощи реакций на ацетилхолинэстеразу (АХЭ) по Рутс-Карновскому и моноаминооксидазу (МАО) по Гленнеру [9]. Плотность нервных волокон в регенерате, коже вокруг раны и лимфоузле определяли по Стропусу методом точечного счета [12] с использованием морфометрической сетки Автандилова [1], показатель выражали в процентах. Активность АХЭ и МАО в нервных волокнах, эпидермисе, тканевых базофилах (ТБ) и макрофагах (МФ) оценивали полуколичественно. Для статистической обработки полученных цифровых данных использовали критерий *U* Вилкоксона-Манна-Уитни.

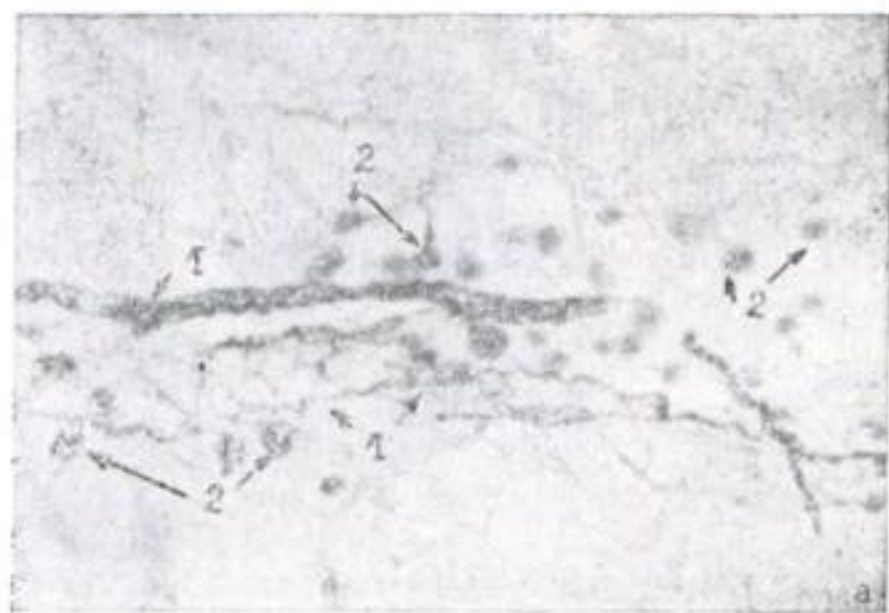
Выявлены существенные различия в течении раневого процесса в двух сериях опытов. У подвергнутых гипотермическому воздействию крыс наблюдалась достоверная задержка контракции краев раны и эпителизации, выраженная в первые 10 сут раневого процесса. Полное заживление раны у этих животных происходило за 11,6 сут, у нормотермических крыс — за 9,5 сут (различия достоверны, $P < 0,05$). Отмечалось также снижение интенсивности вне раневого вставочного роста — увеличение расстояния между тушевыми метками у крыс 1-й группы было достоверно ниже. К концу наблюдения (30 сут) у подвергавшихся гипотермии крыс на месте раны отмечалось полное восстановление волосяного покрова с отсутствием соединительнотканного рубца, тогда как у нормотермических животных рост волос в области регенерата был скудным, а рубец хорошо выраженным.



Рис. 1. АХЭ-позитивные нервные волокна в коже intactных крыс: 1 — эпидермис, 2 — волосяной фолликул, 3 — нервные волокна, 4 — контакт нервного волокна с эпидермисом. Реакция на ацетилхолинэстеразу по методу Рутс-Карновского. X 200

Обнаружены существенные различия в состоянии нервного аппарата в регенерате, коже вокруг раны и регионарном лимфоузле. В коже intactных крыс АХЭ-позитивные нервные волокна идут к эпидермису из глубины дермы и заканчиваются в ее сосочковом слое, а также подходят к эпидермису и волосяным фолликулам (рис. 1). Кроме нервных волокон, АХЭ выявляется в эпидермисе, эпителии волосяных фолликулов, сальных желез, ТБ и МФ. В лимфатическом узле АХЭ-позитивные нервные структуры в основном

связаны с кровеносными сосудами мозгового вещества, где образуют сплетения в адвентициальной оболочке артерий и вен (рис. 2). От этих сплетений отходят нервные волокна паренхимы мозгового и коркового вещества. Положительную реакцию на АХЭ дают также ТБ, МФ, лимфоциты, особенно куполов лимфатических узелков, эндотелий посткапиллярных венул.



а

б

Рис. 2. АХЭ-позитивные нервные волокна в мозговом веществе лимфоузла через 5 сут после нанесения раны (а — животные 1-й группы, б — животные 2-й группы: 1 — околососудистые сплетения нервных волокон, 2 — АХЭ-позитивные макрофаги. Реакция на ацетилхолинэстеразу по методу Рутс-Карновского. X 200.

Повреждение кожного покрова сопровождалось существенным изменением холинергической иннервации кожи и регионарного лимфоузла, характер изменений различался у животных двух групп. В обеих сериях опытов на основании распределения активности АХЭ в коже можно выделить 3 зоны: 1 — зона повреждения, 2 — зона, непосредственно прилегающая к ране и 3 — зона, удаленная от раны. В 1-й зоне в обеих груп-

пах — с 1-х по 5-е сут раневого процесса активность АХЭ отсутствовала. У нормотермических крыс через 7 сут после нанесения раны из ее глубины происходил рост нервных волокон, число которых возрастало к 15-м сут, когда плотность их была максимальной. Через 20 и 30 сут данный показатель несколько снижался. У животных, подвергнутых гипотермическому воздействию, нервные волокна в регенерате отчетливо выявлялись лишь через 15 сут после повреждения. Однако в дальнейшем их численность резко нарастала: через 20 сут плотность нервных волокон составляла 6,3 % (1,7 % во 2-й группе), а через 30 сут — 5,4 % (1,4 % во 2-й группе, различия в обоих случаях достоверны, $P < 0,01$). Нервные волокна часто располагались вблизи эпидермиса, покрывающего регенерат, чего не наблюдалось во второй серии опытов.

Во 2-й и 3-й зонах в обеих сериях экспериментов наблюдалось резкое снижение плотности нервных волокон, уменьшение в них, а также в эпидермисе и ТБ активности АХЭ. Одновременно резко снижалось число ТБ. Во 2-й зоне эти изменения были выражены гораздо сильнее. Подобная картина сохранялась в течение 3 сут после нанесения раны, а затем наблюдалось постепенное возрастание указанных показателей, причем этот процесс начинался с 3-й зоны постепенно с отставанием в 2—4 сут, переходя на 2-ю зону. У животных, подвергнутых гипотермии, нервные волокна во 2-й и 3-й зонах выявлялись значительно реже, чем у нормотермических крыс, через 1, 5, 10 и 15 сут, а активность в них АХЭ была достоверно снижена через 5, 7 и 15 сут после нанесения раны. Через 30 сут активность фермента наряду с плотностью нервных волокон, напротив, становилась выше у крыс 1-й группы. В эпидермисе подвергавшихся гипотермии крыс активность АХЭ была достоверно ниже по сравнению с крысами 2-й группы через 1, 3 и 5 сут, а через 3, 5 и 15 сут после нанесения раны у этих животных резко снижалось число АХЭ-позитивных ТБ. Суммарные изменения плотности нервных волокон в коже, прилегающей к ране, представлены в таблице. В регионарном лимфоузле через 1 сут после нанесения раны плотность нервных волокон у подвергнутых гипотермии крыс была достоверно выше, чем во 2-й группе (табл.). Через 3 сут различия между группами были недостоверными, а через 5 сут показатели плотности нервных волокон и активности в них АХЭ у подвергшихся холодовому воздействию крыс резко снижались по отношению ко 2-й группе, причем особенно резко в адвентициальном сплетении сосудов, которые в силу этого прослеживались не на всем протяжении (рис. 2, а). Через 20 и 30 сут указанные показатели вновь достоверно превышали значения во 2-й группе. Численность АХЭ-позитивных макрофагов у гипотермированных крыс была достоверно снижена по сравнению с нормотермическими животными через 5 сут после нанесения раны, через 10 сут они полностью отсутствовали, а через 20 сут их численность достоверно превышала показатели 2-й группы, причем макрофаги часто располагались в тесном контакте с нервными волокнами. Через 3, 5, 7, 10 и 15 сут у подвергнутых охлаждению животных по сравнению со 2-й группой наблюдалось отчетливое увеличение активности АХЭ в лимфоцитах куполов лимфатических узелков.

МАО-позитивные нервные волокна в коже имеют такое же направление, как и холинергические. Они направляются к эпидермису (однако отчетливо в нем не выявляются), а также к эпителию волосяных фолликулов и сальных желез. В эпидермисе выявляется умеренная активность МАО, причем в базальном и шиповатом слоях она выше, чем в зернистом слое. В лимфоузле распределение нервных волокон с положительной реакцией на МАО сходно с таковым для холинергических нервных волокон, но плотность их ниже. Нервные волокна располагаются вокруг сосудов мозгового вещества в виде сплетений, отдающих веточки в паренхиму органа. Положительной реакцией на МАО обладают также макрофаги синусов лимфоузла.

Повреждение кожи приводило к изменениям характера распределения МАО-позитивных нервных волокон в коже и регионарном лимфоузле

Изменения плотности нервных волокон в коже, окружающей рану, и в регионарном лимфоузле у нормотермических и подвергнутых охлаждению крыс

Время после нанесения раны, сут.; серия опытов		Кожа		Лимфоузел	
		Холинергические нервные волокна	Адренергические нервные волокна	Холинергические нервные волокна	Адренергические нервные волокна
Контроль, интактные		5,1	2,7	2,6	0,4
1	1	0,5 ^{0, x} ↓	3,9	1,1 ^{0, x} ↑	0,2 ^{0, x} ↓
	2	1,0 ^x ↓	3,0	0,3 ^x ↑	1,2 ^x ↓
3	1	0,3 ^x	0,6 ^{0, x} ↓	1,0 ^x	0,2 ⁰ ↓
	2	0,7 ^x	2,1 ↓	1,1 ^x	0,5 ↓
5	1	2,1 ^{0, x} ↓	2,2 ⁰ ↑	1,0 ^{0, x} ↓	1,2 ^{0, x} ↑
	2	3,5 ↓	0,3 ^x ↑	3,3 ^x ↓	0,5 ↑
7	1	2,6	1,6 ⁰ ↑	0,9 ^x	0,7
	2	3,2	0 ^x ↑	1,0	0,6
10	1	2,7 ^{0, x} ↓	3,4 ^{0, x} ↑	0,4 ^x	0,3
	2	4,3 ↓	1,2 ^x ↑	0,5 ^x	0,2
15	1	3,5 ⁰ ↓	4,2 ⁰ ↑	1,1 ^x	0,1 ^{0, x} ↓
	2	5,5 ↓	1,3 ^x ↑	1,5 ^x	0,4 ↓
20	1	4,3	3,5	3,3 ⁰ ↑	0,2
	2	4,5	3,0	1,9 ^x ↑	0,5
30	1	3,1 ⁰ ↑	1,2 ^{0, x} ↓	3,5 ⁰ ↑	0,5
	2	2,2 ^x	3,0	2,2	0,6

Примечание. ^x — достоверно по отношению к уровню интактных животных; ⁰ — достоверно по отношению к 2-й серии опытов. Стрелками показано направление достоверных изменений показателей 1-й серии опытов по отношению ко 2-й серии: ↑ — повышение, ↓ — снижение.

(табл.). В коже вокруг раны достоверные различия между сериями опытов проявлялись впервые через 3 сут после нанесения раны, когда плотность нервных волокон у подвергнутых охлаждению крыс резко снижалась, в то время как у нормотермических крыс она оставалась на уровне интактных животных. Через 5, 7, 10 и 15 сут, напротив, плотность нервных волокон у охлажденных крыс в коже вокруг раны становилась значительно выше, чем во второй серии опытов. Через 30 сут этот показатель у крыс 1-й группы вновь существенно и достоверно снижался. В самом регенерате в обеих группах МАО-позитивные нервные волокна отчетливо не выявлялись на протяжении всего наблюдения. Активность МАО в эпидермисе у животных обеих групп была достоверно снижена по сравнению с интактными крысами, но через 5, 7 и 10 сут у крыс 2-й группы снижение было более выраженным, чем у крыс 1-й группы.

В лимфоузле плотность МАО-позитивных нервных волокон у охлажденных крыс достоверно снижалась по сравнению со 2-й группой через 1 и 3 сут после нанесения повреждения. Через 5 сут показатель достоверно превышал значения 2-й группы. Его повторное снижение происходило через 15 сут после нанесения раны, а в последующие сроки достоверные различия между двумя сериями опытов отсутствовали (табл.). Различий в активности МАО в нервных волокнах у крыс двух групп не было, за исключением ее снижения в 1-й группе через 15 сут после нанесения раны. Численность МАО-позитивных макрофагов существенно различалась в двух группах через 5 сут (полное их отсутствие у крыс

2-й группы, и, напротив, резкое увеличение числа в 1-й группе с возрастом в макрофагах активности МАО), 15 и 20 сут, когда число клеток существенно снижалось у животных 1-й группы.

Таким образом, выявлены существенные различия в течении и исходе позитивные нервные волокна в коже преобладают над АХЭ-позитивных нервных волокон, а также в активности МАО и АХЭ в иммунокомпетентных клетках кожи и лимфоузла при заживлении кожной раны в условиях нормотермии и после воздействия на организм гипотермии. Как видно из таблицы (показано стрелками), изменения плотности двух типов нервных волокон, за некоторым исключением, носили разнонаправленный характер. Наиболее отчетливо это проявлялось в коже вокруг раны. Это обстоятельство позволяет думать о различиях в функции АХЭ- и МАО-позитивных нервных волокон в органе. Несмотря на то, что в их распределении в нормальной коже имеются некоторые сходные черты, существуют и значительные различия: по плотности распределения, выявляемости их терминалей в эпидермисе и др. Так, по данным [11], МАО-позитивные нервные волокна в коже преобладают над АХЭ-позитивными, их терминали чаще выявляются в эпидермисе. Авторы определяют МАО-позитивные нервные волокна в эпидермисе как вегетативные адренергические, считая их вместе с АХЭ-позитивными нервными волокнами чувствительными по функции. Детальное обсуждение функциональных различий этих двух гистохимических типов нервных волокон в имеющейся литературе отсутствует. Однако различный характер их реакции на травму кожи в разных условиях температурного гомеостаза позволяет думать об их антагонистических отношениях в коже и может быть использован в качестве одного из объяснений различий в течении и исходе раневого процесса у животных двух серий опытов. Как известно, среди многих других важнейшими компонентами регенераторного процесса являются деление и дифференцировка клеток [7]. Различные нейромедиаторы по-разному влияют на эти процессы. Показано, что катехоламины усиливают дифференцировку клеток при возрастании в них уровня цАМФ, тогда как ацетилхолин стимулирует пролиферацию, повышая в клетках уровень цГМФ [7]. Как указывает Е. М. Крохина [8], «поскольку количества АХЭ и ацетилхолина в холинергических нервных волокнах эквивалентны, то снижение активности АХЭ сопровождается снижением в нервных структурах ацетилхолина». Очевидно, это утверждение может быть справедливо и для системы «катехоламины — МАО». Применяв эти рассуждения для трактовки результатов данного исследования, можно предположить, что угнетение АХЭ, а следовательно, снижение уровня ацетилхолина в коже в течение 15 сут после ранения у подвергнутых охлаждению крыс должно привести к подавлению в ней процессов размножения и замедлению таких компонентов регенерации, как внераневого вставочный рост и эпителизация, что и наблюдалось в данном эксперименте. Напротив, быстрый рост АХЭ-позитивных нервных волокон в регенерате начиная с 15-х сут раневого процесса мог создать у этих животных условия для активации митозов и восстановления волосяного покрова. В то же время у подвергнутых охлаждению крыс активация МАО в нервном аппарате кожи вокруг раны наступала позже, чем у нормотермических крыс (на 5-е и 3-и сут соответственно). Это могло приводить к запаздыванию у охлажденных животных процессов дифференцировки, что также должно создавать условия для органотипической, с восстановлением волосяного покрова, регенерации кожи.

Различия в распределении нервных волокон двух типов в лимфоузле могут свидетельствовать о различном состоянии процессов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток органа у животных двух групп. Изложение характера этих процессов выходит за рамки данной статьи и будет сделано в последующих публикациях. Здесь следует лишь ограничиться упоминанием о том, что иммунная система наряду с нервной принимает важное участие в регуляции регенераторных процессов [10]. Не вызывает сомнения и то, что причины различ-

ного течения и исхода раневого процесса у животных двух серий опытов гораздо разнообразнее, и это диктует необходимость дальнейшего исследования обнаруженного явления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г. Г. Морфометрия в патологии.— М.: Медицина, 1973.— 248 с.
2. Борисов В. А., Мяделец О. Д., Бринкевич В. Н. Методика искусственной гипотермии на мелких лабораторных животных // Криобиология.— 1989.— № 4.— С. 49.
3. Волина В. В., Панков Е. Я., Сандомирский Б. П. Состояние микроциркуляторного русла в нормальной и измененной ожогом коже крыс при действии низких температур // Морфология.— 1982.— Вып. 8.— С. 94—97.
4. Гаибов А. Г. Морфология кожной раны, заживающей в условиях жаркого климата // Здравоохранение Таджикистана.— 1971.— № 4.— С. 48—49.
5. Ефимов Е. А. Посттравматическая регенерация кожи.— М.: Медицина, 1975.— 168 с.
6. Калашников Р. Н., Смирнова М. Г., Турко Б. А. Влияние длительного охлаждения на морфологические и биохимические процессы при заживлении ран // Механизмы адаптации в экстремальных условиях.— Л.: Б. и., 1985.— С. 42—45.
7. Карлсон Б. М. Регенерация.— М.: Наука, 1986.— 296 с.
8. Крохина Е. М. Функциональная морфология и гистохимия вегетативной иннервации сердца.— М.: Медицина, 1973.— 231 с.
9. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов.— М.: Мир, 1982.— 270 с.
10. Раны и раневая инфекция / Под ред. М. И. Кузина, Б. М. Костюченко. Изд. 2.— М.: Медицина, 1990.— 591 с.
11. Соколов В. Е., Шабадаш С. А., Зеликина Т. И. Гистохимия чувствительной иннервации неоволосенной кожи млекопитающих // Изв. АН СССР. Сер. биол.— 1981.— № 5.— С. 709—720.
12. Стронус Р. А. Возрастные изменения холинергических и адренергических нервных элементов сердца человека и их состояние при сердечно-сосудистой патологии // Арх. пат.— 1979.— 41, № 11.— С. 44—51.
13. Шамрай П. Ф. Морфология раневого процесса в условиях воздействия пестицидов в эксперименте: Автореф. дис. ... докт. мед. наук.— Киев, 1979.— 35 с.

Витебский мед. ин-т

Поступила 11.06.91

O. D. MYADELETS

THE HISTOENZYMATIC STUDY ON THE SKIN AND REGIONAL LYMPH NODE INNERVATION ON HEALING OF SKIN WOUND MADE UNDER TOTAL DEEP PROLONGED HYPOTHERMIA

Medical Institute of Vitebsk

Changes in skin and regional lymph node innervation on healing of skin wound made under total deep hypothermia and normothermia were studied. The nervous apparatus was exposed using histochemical reactions on acetylcholinesterase and monoaminooxidase. Different changes in cholinergic and nervous fibers of skin and lymph node have been found in the dynamics of wound process. The difference increased under the effect of cold.

О. Д. МЯДЕЛЕЦЬ

ГІСТОЕНЗИМОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ІННЕРВАЦІЇ ШКІРИ І РЕГІОНАРНОГО ЛІМФОВУЗЛА ПРИ ЗАГОЮВАННІ ШКІРНОЇ РАНИ, НАНЕСЕНОЇ В УМОВАХ ЗАГАЛЬНОЇ ГЛИБОКОЇ ПРОЛОНГОВАНОЇ ГІПОТЕРМІЇ

Вітебський медичний інститут,
м. Вітебськ

Вивчені зміни нервового апарату шкіри і регіонарного лімфовузла при загоюванні шкірної рани, нанесеної в умовах нормо- і гіпотермії. Нервовий апарат виявляли за допомогою гістохімічних реакцій на ацетилхолінестеразу і моноаміноксидазу. Показаний різноманітний характер змін холінергічних і адренергічних нервових волокон шкіри і лімфовузла в динаміці ранового процесу. Холодовий вплив посилював ці відмінності.

II МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ КРИОБИОЛОГИИ»

С 21 по 25 апреля 1992 г. в г. Харькове проведена II Международная конференция «Успехи современной криобиологии» (организатор — Институт проблем криобиологии и криомедицины АН Украины). Конференция проходила под эгидой Академии наук Украины, ЮНЕСКО и Международного института холода. В работе конференции приняли участие 214 ученых из Армении, Дагестана, Молдовы, России (12 городов), Татарстана, Узбекистана, Украины (6 городов), а также из Великобритании, Германии, Канады, Китая, США, ЧСФР и Японии. Участники выступили со 137 научными докладами, представили 50 стендовых докладов, посетили выставку оборудования и препаратов, используемых в современной криобиологии.

Основными научными направлениями, рассмотренными на конференции, были:

- механизмы криоповреждений и криозащиты биологических систем различного уровня;

- проблемы адаптации человека и животных к охлаждению;

- криоконсервирование биологических объектов.

Первый пленарный доклад, посвященный новому подходу в реализации криозащиты спермиев и эмбрионов, от группы авторов представила Н. А. Лучко (Харьков), подчеркнув, что выбранное направление в развитии криобиологии репродуктивных клеток позволило разработать способы сверхбыстрого охлаждения спермиев и эмбрионов, которые запатентованы во многих ведущих странах мира.

О влиянии противокислительных лекарственных препаратов на криоконсервацию клеток и тканей доложил Г. Маттес (Берлин). Он отметил, что соединения с антиокислительными свойствами (соли селена, аминокислоты, токоферол и т. п.) имеют преимущественный эффект при замораживании эритроцитов, тромбоцитов, костного мозга, сердечной мышцы, роговицы или целых сердец.

Доклад А. М. Белоуса (Харьков) привлек внимание исследователей к роли белков цитоскелета в регуляции устойчивости клеток при действии экстремальных температур и других воздействиях.

Возможности длительного хранения эритроцитов при 4 °С посвятил свой доклад американский ученый Г. Т. Мэриман (Роквилль). Он показал, что относительно короткое время хранения эритроцитов (6 недель) может рассматриваться как неблагоприятные условия для процесса гликолиза и поддержания в клетке устойчивого pH. В то же время хорошо забуференные растворы могут увеличивать срок хранения эритроцитов при 4 °С до 3 мес. при показателях, приемлемых для трансфузии.

А. А. Цуцаева (Харьков) подробно остановилась на проблемах глубокого холодового анабиоза биообъектов, подчеркнув при этом, что криоконсервирование является наиболее эффективным способом перевода клеток и тканей в состояние глубокого холодового анабиоза.

На секции «Низкотемпературная биофизика» заслушан доклад Ц. А. Такахашин (Саппоро), в котором отмечено, что наиболее эффективными препаратами для повышения устойчивости полиморфоядерных лейкоцитов к осмотическому стрессу были теофиллин, ФГЕ и гидрокортизон, общим свойством которых является повышение количества внутриклеточного цАМФ.

Роль цитоскелета в осмотических реакциях клеток на примере яйцеклеток и эмбрионов мыши посвятил выступление Л. Ф. Розанов (Харьков). О. А. Нардид (Харьков) привел результаты исследований по влиянию замораживания до —196 °С и последующего отогрева на параметры спектров собственной флуоресценции периферических и интегральных белков в растворе и в составе искусственных и природных мембран. Об исследованиях метаболизма макроэргических соединений в криоконсервированных эритроцитах методом ³¹P-ЯМР доложил В. Д. Зинченко (Харьков). Об эффекте увеличения интенсивности люминесценции чумных бактерий после замораживания-отогрева доложил А. Н. Терентьев (Ростов-на-Дону). Т. Ф. Морозова (Харьков) показала, что к изменению термотропных перестроек кооперативной водно-белковой матрицы может приводить ионизация нескольких определенных аминокислотных остатков миозина. Низкотемпературная структурная динамика цитохрома С, исследованная методом эффекта Мессбауэра, обсуждалась в докладе М. А. Миришли (Черноголовка). О модифици-

рующем действии ряда криопротекторов на структуру лецитиновых липосом и протес-липосом, исследованном с применением флуоресцентных зондов, доложила Т. С. Дюбко (Харьков). В. Я. Волков (Оболеск) привел результаты исследования методом ЯМР процесса медленного замораживания эритроцитов, их теней, некоторых видов дрожжей и бактерий.

С. Сумида (Фукуока) представил интересный доклад, в котором привел данные по криоконсервированию клеток крови и их длительному (более 22 лет) хранению. Подчеркнуто, что благодаря «замораживанию» стало возможным аутологическое использование крови и клеток костного мозга.

С докладом о роли гипоталамуса при адаптации охлажденного мозга выступил Г. А. Бабийчук (Харьков). Выявлено, что важную роль в механизмах адаптации организма к гипотермии играют синхронизация биоэлектрической активности отделов гипоталамуса и коры головного мозга, а также состояние гематоэнцефалического барьера.

О низкотемпературном консервировании щитовидной железы и ее трансплантации как методе лечения гипотериоза доложил Н. С. Пушкар (Харьков). Отмечено, что разработанные методы обеспечивают быструю компенсацию эндокринной функции, нормализацию нейроэндокринной системы в целом, способствуют восстановлению регуляции вегетативных функций и метаболизма.

Технологию получения и применения криоконсервированных ксеногепатоцитов для лечения хирургических заболеваний представил участникам конференции от группы разработчиков Б. П. Сандомирский (Харьков).

Американский ученый Д. Г. Бауст (Бингемптон) представил данные по изучению толерантности насекомых к замораживанию.

В историческом аспекте осветил вопрос сохранения эритроцитов для дальнейшего переливания А. Р. Роу (Нью-Йорк).

Интерес участников конференции вызвал доклад В. А. Моисеева (Харьков) о физических явлениях в твердофазной матрице и их возможной роли при криоконсервировании. Авторы настаивают на том, что электрические явления должны приниматься в расчет при анализе криоповреждающего действия замораживания.

На совместном заседании Европейского общества криобиологов и ученого совета ИПКиК АН Украины с докладом «Итоги научно-организационной деятельности Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины к его 20-летию» выступил директор института академик АН Украины В. И. Грищенко (Харьков). Английский ученый К. Грин (Хэрроу) рассказал о последних достижениях в области консервирования органов, предназначенных для трансплантации. Совместное заседание закончилось демонстрацией 30-минутного кинофильма «Институт проблем криобиологии и криомедицины АН Украины».

На заседании секции «Молекулярные механизмы действия низких температур на биологические объекты» о видовой неспецифичности в развитии криоповреждений ксено- и аллогепатоцитов доложила Н. П. Суббота (Харьков). Развитию и предупреждению температурного шока клеток посвящено выступление В. А. Бондаренко (Харьков). Установлено, что факторами, контролирующими чувствительность клеток к холодному шоку, являются их исходный объем и разница осмотического давления между внутриклеточной и наружной средой. О количественных измерениях транспортных характеристик мембран яйцеклеток и эмбрионов мыши в зависимости от pH и осмотического давления внеклеточной среды доложил Е. А. Гордиенко (Харьков). Г. К. Дорошенко (Благовещенск) остановился на активации перекисного окисления липидов в микросомах из печени крыс при длительном холодном воздействии. В. В. Лемешко (Харьков) с соавторами на основании анализа характера криоповреждения пришли к выводу об активации неселективной белковой поры внутренней мембраны митохондрий, как ключевом механизме криоразобщения окислительного фосфорилирования и последующей инактивации поры — как основном репаративном процессе. Изучив структурно-функциональные изменения цитохромоксидазы при действии низких температур, Е. Д. Розанова (Харьков) предположила, что основным повреждающим фактором фермента при замораживании-отогревании является концентрирование солевых растворов при вымерзании воды. О проблемах регидратации при криоконсервировании клетки шла речь в докладе С. В. Руденко (Харьков). О. И. Гордиенко (Харьков) представила результаты влияния ряда криопротекторов на проницаемость мембран эритроцитов для воды и ионов. Явление низкотемпературной ассоциации молекул криопротекторов и связанные с ним механизмы повреждения охлаждаемых систем явились предметом до-

клада А. И. Осецкого. О некоторых кинетических особенностях химических реакций биополимеров в замороженных водных растворах сообщил В. И. Лозинский (Москва). Т. П. Бондаренко (Харьков) рассказала о барьерных свойствах эритроцитов в условиях охлаждения и замораживания в присутствии непроникающих криопротекторов. О физическом состоянии митохондриальных мембран в связи с холодовой акклиматизацией растений озимой пшеницы и действием картолина доложила И. Р. Абдрахимова (Казань). Влияние замораживания-отогревания на систему метаболизма вторичных мессенджеров было темой сообщения В. А. Коптелова (Харьков). М. В. Воинова (Харьков) посвятила доклад влиянию хлорпромазина на устойчивость и деформацию мембран эритроцитов в условиях температурного и осмотического стресса. Наибольшим эффектом из лекарственных средств в сохранении изолированных гепатоцитов в условиях длительной гипотермии обладал силибор, о чем доложила Л. П. Кравченко (Харьков). Проведенные С. В. Корниловой и соавторами (Харьков) исследования показали, что криопротекторы приводят к гиперхромизму спектра поглощения ДНК. Доклад Г. Д. Гоффа (Гельф) был посвящен роли защитных механизмов полисахаридов в обеспечении низкотемпературной стабильности пищевых продуктов. Красноярский ученый Ю. А. Куденко рассказал о методе витрификации водных растворов глюкозы и желатина. О результатах исследования низкотемпературных изменений в ДНК и криопротекторах с помощью фосфоресцентного зонда доложил Ю. В. Рубин. Л. П. Хохлова (Казань) привела результаты исследования активности Ca^{2+} -транспортирующих систем и физических свойств мембран при адаптации растений к низким температурам. О влиянии процессов транскрипции, трансляции и дыхания на жизнеспособность бактерий после криоконсервирования рассказал И. П. Высеканцев (Харьков). Г. Ю. Дейкус (Пушино) провел анализ колебательных структур в низкотемпературных спектрах люминесценции белков с одним остатком триптофана. М. В. Воинова (Харьков) доложила о роли латерального натяжения в кинетике фазовых превращений замкнутых мембран. Об исследованиях состояния компонентов мембран криоконсервированных эритроцитов после их размораживания рассказал от группы авторов П. А. Казарян (Ереван). Темой доклада Г. А. Авхадиевой (Казань) был полипептидный состав мембран митохондрий озимой пшеницы при холодовой адаптации и криострессе. Полученные данные свидетельствуют о криодеструкции белков, входящих в состав мембран митохондрий. О модификации плазматической мембраны и устойчивости эритроцитов к холодовому шоку доложила Н. М. Шпакова (Харьков).

Заседание секции «Проблемы гипотермии» открылось докладом Г. Ф. Жегунова (Харьков) об эволюционно-генетическом подходе в изучении адаптации. По заключению автора, данный подход является новой методологией изучения молекулярных механизмов адаптации животных. На некоторых молекулярных и клеточных механизмах холодовых адаптаций остановился А. К. Гулевский (Харьков). С докладом о фактах и перспективах пролонгируемой краниocereбральной гипотермии выступил С. И. Логинов (Петропавловск).

Ультраструктуру гепатоцитов и клеток зимоспящих сусликов в различных физиологических состояниях после длительного (60 дней) гипотермического хранения при 4 °C представил Н. В. Репин (Харьков). Полученные данные свидетельствуют о нарастании структурных изменений с увеличением сроков хранения.

Е. Я. Панков (Харьков) выступил с докладом «Ультраструктура миокарда при глубокой гипотермии изолированных сердец. Замедление процессов развития ишемических повреждений». Установлено, что независимо от температуры хранения изолированных сердец (0—37 °C) развиваются три последовательные стадии тотальной ишемии миокарда. О структурных перестройках в эритроцитах зимоспящих сусликов доложила С. В. Репина (Харьков). Результаты влияния фракции (1—10) кД мозга якутской лошади на пассивный и активный АТФ-зависимый транспорт в везикулах сарколеммы кардиомиоцитов представил О. С. Терещенко (Харьков). И. В. Чижевская (Харьков) при исследовании нейрoхимических характеристик состояния адренергического синапса ЦНС показала, что гипотермия обладает моделирующим действием на латеральное и трансмембранное перемещение белков. В. К. Мазалов (Харьков) доложил о физиологических показателях системы кровообращения при охлаждении теплокровного организма. Вопросу сохранности тканей человека в условиях вечной мерзлоты посвящено сообщение Е. Ф. Беланова (Кольцово). Проведенное исследование показало, что структура коллагеновых волокон в дерме кожи не претерпевает заметных изменений в процессе пребывания в условиях вечной мерзлоты более 100 лет. О некоторых особенностях

липидного обмена головного мозга белых крыс, адаптированных к глубокому переохлаждению, доложила Э. Г. Серебренникова (Махачкала). Ядерный аппарат клеток в период реабилитации после охлаждения явился предметом исследования В. И. Строны (Харьков). О положительном гипотермическом и лазерном воздействии в лечении осложненных форм острых хирургических заболеваний доложил В. Ю. Васильевский (Харьков). В. М. Савво (Харьков) показал высокую эффективность применения ректальной гипотермии в комплексном лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и хронического гастродуоденита у детей.

На заседании секции «Применение холода в медицине» о функциональной активности гемопоэтических предшественников криоконсервированного костного мозга в организме реципиентов с аплазией кроветворения доложил А. Н. Гольцев (Харьков). Клеточным и тканевым аспектам криодеструкции печени был посвящен доклад А. С. Карпельянца (Харьков). А. Я. Синельников (Харьков) остановился на применении низких температур в лечении хронических диффузионных заболеваний печени. Экспериментально-клиническое обоснование трансклеральной криоретинопексии в лечении гемофтальма привел Е. А. Шкиль (Харьков). Ш. Н. Каримов (Ташкент) показал, что сочетанное использование для экстракорпоральной детоксикации криогепатоцитов и ксеноселезенки способствует раннему снятию интоксикационного синдрома и приводит к благоприятному клиническому течению при ожоговой болезни. Он же доложил о противоишемической защите донорской печени криоперфузией. О структурных изменениях после криовоздействия на поджелудочную железу шла речь в докладе А. А. Литвиненко (Киев). С положительными результатами сорбционной детоксикации с использованием криоконсервированных гепатоцитов в оптимизации путей лечения больных острым гнойным холангитом и механической желтухой доброкачественного генеза ознакомил участников конференции В. В. Сачко (Харьков). Приведенными результатами исследований А. А. Ковалев (Запорожье) подтвердил целесообразность создания низкотемпературного банка островковой ткани поджелудочной железы для клинического применения при лечении больных инсулинзависимым сахарным диабетом.

Из результатов исследований, доложенных В. И. Лупальцевым (Харьков), следует, что локальное дозированное охлаждение в лечении гнойных и гнойно-некротических поражений мягких тканей является перспективным методом терапии, эффективно влияющим на процессы заживления. На некоторых аспектах регенерации пептических язв двенадцатиперстной кишки при криолазерном воздействии остановился А. М. Проценко (Харьков). Клинико-экспериментальное обоснование способа теплового рассечения тканей под защитой сверхнизкого холода представил В. И. Голуб (Санкт-Петербург). О модификации криоультразвукового прибора «Мороз», применяемого в лор-практике, рассказал Г. И. Гарюк (Харьков). Об использовании локальной СВЧ-гипотермии в качестве модификатора криогенных и криоультразвуковых воздействий доложил А. Б. Рикберг (Киев). В. И. Сипитый (Харьков) представил участникам конференции методику криохирургического удаления внутримозговых опухолей полушарий большого мозга с использованием криохирургической установки КМ-4. Использование низких температур, по заключению Е. Д. Хворостова (Харьков), в сочетании с высокоэнергетическими лазерными установками в хирургическом лечении больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки способствует снижению количества осложнений во время операции и в раннем послеоперационном периоде, создает возможность проведения полной ваготомии и улучшения отдаленных результатов лечения. В. А. Чуйко (Харьков) представил методы консервации и долгосрочного хранения некоторых клеток и тканей эндокринных органов, трансплантация которых выявила положительный клинический эффект. О предконсервационной ресусцитации донорской роговицы как методе фармакологической защиты трансплантата шла речь в докладе С. А. Борзенко (Москва).

На симпозиуме «Криоконсервирование генетических ресурсов» Л. Ф. Максимовский (Новосибирск) рассказал о том, что в виварии Института цитологии и генетики СО РАН создан криобанк нескольких линий мышей, а также крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией. Опытом витрификации и сверхбыстрого замораживания эмбрионов коров поделился В. В. Исаченко (Харьков). Ф. И. Осташко (Харьков) подробно изложил Харьковскую технологию асептического взятия, криоконсервации, микрохирургии и трансплантации эмбрионов. Изучению HLA-типирования плодовых тканей и созданию банка гемопоэтических стволовых

клеток был посвящен доклад Ма Ен-Пу (Бейджинг). Л. И. Луцкая (Харьков) доложила об успешном использовании нативных и криоконсервированных репродуктивных клеток и эмбрионов во вспомогательной репродукции человека. О жидких долгохранящихся средах для криоконсервации спермы быка рассказал М. П. Павленко (Харьков). «Низкотемпературный генетический банк как средство спасения редких и исчезающих видов животных и растений» — тема доклада Н. Н. Ротт (Пушино). В докладе, в частности, было отмечено, что в ряде учреждений ведутся работы по созданию коллекции глубокозамороженной спермы редких и исчезающих видов млекопитающих (зубра, гепарда, джейрана), птиц (журавлей), насекомых (бабочек), а также семян и меристем дикорастущих растений (в коллекции насчитывается уже более 300 видов). С. И. Очкур (Харьков) представил результаты влияния криоконсервирования на параметры энергетического обмена и подвижности спермиев петухов. О разработанном методе гипотермического хранения спермиев, пригодных для инсеминации и ОНВ в течение 48 ч, доложила Г. Г. Юрченко (Харьков). Изучив влияние экзогенных липидов на подвижность спермы карпа после криоконсервации, С. И. Дрокин и соавторы (Харьков) пришли к выводу, что экзогенный холестерин для спермы карпа, а возможно и для других видов рыб, является нежелательным компонентом яичного желтка при его использовании в средах для криоконсервации. Темой доклада Н. Н. Чуб (Харьков) было влияние гипотермического хранения на ооциты и эмбрионы человека. О применении метода интерференционной микроскопии для изучения криоконсервированной спермы быков рассказал В. С. Васильев (Харьков).

На симпозиуме «Криоконсервирование биологических объектов» выступила Г. С. Лобынцева (Харьков), она рассказала об особенности процесса криоконсервирования эмбриональных гемопоэтических клеток человека. А. В. Николенко (Харьков) показала преимущество экспоненциальных режимов замораживания тромбоцитов со снятием переохлаждения при использовании глицерина, 1, 2-ПД и 1-ММЭГ. А. Н. Гольцев (Харьков) дал оценку рецепторного аппарата кроветворных клеток после криоконсервирования костного мозга. Т. М. Сидякина (Пушино) показала преимущество криоконсервации над лиофилизацией для хранения клубеньковых бактерий. Об использовании алкиловых эфиров полиэтиленгликоля в низкотемпературном консервировании эритроцитов человека доложила от группы авторов О. С. Прокопюк (Харьков). Оценка метода замораживания тромбоцитов под защитой нового криопротектора (А-378) дал Е. П. Сведенцов (Киров). О роли моноцитарно-макрофагальных клеток в процессах пролиферации и дифференцировки КОЕс доложила О. В. Кудокоцева (Харьков). Показана возможность регулирования колониеобразующей активности кроветворных клеток, свойства которых после криоконсервирования изменяются. На термомеханических аспектах криоповреждения биологических объектов остановился В. М. Куракса (Харьков). Л. А. Бабичук (Харьков) рассказала о разработанном безотмывочном способе криоконсервирования эритроцитов под защитой ПЭО-1500, который позволяет сохранить показатели клеток на достаточно высоком уровне. Проблеме температурных различий при замораживании больших объемов был посвящен доклад П. Мнержички (Градец Кралове). О криобанке клеточных культур ВНИИ гриппа доложила Л. Ф. Литвинчук (Санкт-Петербург). В настоящее время банк содержит около 100 различных линий и сублиний, используемых в исследованиях по гриппу и гриппоподобным заболеваниям, в том числе и для производства РС- и аденовирусных диагностикумов. В выступлении А. М. Воротилина (Харьков) был рекламирован новый препарат пропандиосахароль — эффективный криоконсервант эритроцитов. О результатах изучения криозащитной эффективности ряда алкиэтоксилпроизводных полиолов и амидов на сперме человека доложил Ю. В. Калугин (Харьков). Одному из подходов к поиску новых криопротекторов (изучению связи структура — физико-химические свойства — криозащитная активность химических соединений) был посвящен доклад Л. А. Ханиной (Харьков). О ходе работы по стабилизации биологических свойств клеточных структур и тканей рассказал Б. Т. Стегний (Харьков). В заключение симпозиума М. И. Грошевой (Харьков) представил участникам конференции ряд разработок аппаратуры для криоконсервации эмбрионов млекопитающих.

В соответствии с программой конференции под председательством профессора А. С. Капрельянца состоялся круглый стол на тему «Криогенные методы в электронной микроскопии». На нем были обсуждены вопросы использования низких температур в электронной микроскопии.

На заключительном пленарном заседании были подведены итоги и принято решение II Международной конференции «Успехи современной криобиологии», в котором подтверждена целесообразность создания на базе ИПКиК АН Украины под эгидой ЮНЕСКО Международного центра по подготовке высококвалифицированных кадров в области криобиологии.

В. И. Гарбуз

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИИ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины в 1992 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук В. И. Мусатовым «Исследование метаболизма некоторых фосфатов эритроцитов в условиях криоконсервирования». Изучены динамика изменения основных фосфорсодержащих соединений (АТФ, АДФ, 2, 3-ДФГ) крови, вне- и внутриклеточного pH , а также накопление неорганического фосфата в эритроцитах непрерывно, неразрушающим способом, непосредственно в процессе подготовки объектов к криоконсервации и деконсервации с различными криопротекторами. С помощью искусственного зонда получена динамика изменения объема эритроцитов на фоне изменения концентрации 2,3-ДФГ в средах с проникающими и непроникающими криопротекторами. Показано, что метаболизм макроэргических соединений существенно различен в нативных эритроцитах и их гемолизате. Установлен факт чувствительности сигналов 2,3-ДФГ к проникновению криопротектора внутрь эритроцитов. Для объяснения полученных экспериментальных результатов использовалась модель, основанная на донановской теории мембранного равновесия.

Редакция журнала «ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ» принимает к публикации рекламные объявления о научно-технической продукции в области криобиологии и криомедицины.

Цена публикации по договоренности.

Оплату перечислять: г. Харьков 000609226 Ленинское АКБ соцразвития Укрсоцбанка МФО 351339.

Наш адрес: 310015, г. Харьков, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН Украины, редакция журнала «Проблемы криобиологии», телефон для справок 72-10-39.

1р. 20к.

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

4¹⁹⁹²

ИНДЕКС 70474

Проводится подписка на всесоюзный научно-теоретический журнал "Проблемы криобиологии". 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. — 10 р., на 6 мес. — 20 р., на 12 мес. — 40 р.

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

ISSN 0233-7673. ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1992. №4. 1-56