

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНА МПЗ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ИЗОЛИРОВАННОГО МОЗГА

© Е. В. Дмитриева,¹ Д. А. Мошков,² Э. Н. Гахова¹

¹ Институт биофизики клетки РАН и ² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццино, Московская обл.;

¹ электронный адрес: gakhova@icb.psn.ru

На основании данных электронной микроскопии описано влияние криоконсервации, криопротектора, охлаждения и длительного инкубирования в физиологическом растворе на органеллы цитоплазмы (диктиосомы, комплекс Гольджи, цистерны эндоплазматического ретикулула и митохондрии) нейрона МПЗ малого париетального ганглия изолированного мозга моллюска. Обнаружено, что клетка отвечает на все воздействия сходными изменениями органелл, а именно диссоциацией диктиосом аппарата Гольджи, набуханием цистерн ретикулула и крист митохондрий. Под действием как замораживания—оттаивания, так и диметилсульфоксида (ДМСО) наблюдали увеличение числа лизосом, липосом, ламеллярных структур и появление крупных вакуолей. Криоконсервирование в присутствии 2 М ДМСО не вызвало необратимых изменений в исследуемых клетках.

Ключевые слова: криоконсервация, митохондрии, нейрон, комплекс Гольджи, эндоплазматический ретикулум.

Принятые сокращения: ДМСО — диметилсульфоксид, МП — мембранный потенциал, ПД — потенциал действия, ЭПР — эндоплазматический ретикулум, РНП — рибонуклеопротеиновый материал, ЛС — ламеллярные структуры.

Сохранение жизнеспособных тканей и органов методом криоконсервирования представляет собой современную проблему при создании многих биологических и медицинских технологий. Изучение возможности длительного сохранения в замороженном (–196 °С) состоянии нервных клеток и ткани без потери жизнеспособности представляет в равной степени научно-фундаментальный и прикладной интерес в связи с необходимостью создания криобанка трансплантатов нервной ткани (Фуллер и др., 2003; Brunet et al., 2003).

Нейроны и нервы позвоночных и беспозвоночных животных благодаря свойствам электровозбудимых мембран и хорошо отлаженным способам регистрации электрической активности используются для исследований механизмов действия криопротекторов и низких температур (Чекурова, 1994; Frodl et al., 1994). В ряде работ, выполненных на нейронах и аксонах позвоночных и беспозвоночных животных, показано, что после криоконсервации в присутствии защитных агентов восстанавливаются электрические параметры нейрональных мембран (Decherchi et al., 1997; Gakhova et al., 1997; Гахова, Дмитриева, 2003). Однако сохранение электрических свойств нейрональных мембран после криоконсервирования нейронов не может быть единственным показателем жизнеспособности клеток: необходимо осознать весь спектр изменений, с которыми сталкиваются живые системы, поддерживающиеся в состоянии «временной остановки жизнедеятельности». В то же время закономерности репарации клеточных структур после низко-

температурного воздействия до настоящего времени не выяснены и требуют дальнейших исследований. Поэтому изучение морфофункциональных свойств нейронов на модельных объектах позволит определить области криоповреждений и в значительной степени прогнозировать степень восстановления клеток после оттаивания.

Материал и методика

В качестве объекта исследования использован изолированный мозг большого прудовика *Lymnaea stagnalis* L. (Gastropoda, Pulmonata, Basommatophora).

Криоконсервация. Изолированный мозг моллюска замораживали в парах жидкого азота до –196 °С со скоростью 380—450 °С/мин. В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрации 1.8—2.1 М. Материал сохраняли в жидком азоте от 1 мес до 2 лет. Оттаивание осуществляли на водяной бане при 22—24 °С со скоростью 380—450 °С/мин. Скорость замораживания—оттаивания измеряли при помощи медно-константановых термопар с компьютерной регистрацией данных. Для осмотического уравнивания внутриклеточной среды с наружным раствором добавление и отмывание криопротектора осуществляли постепенно.

Электрофизиологические исследования. Методами микроэлектродного отведения потенциалов были измерены мембранный потенциал (МП) и потенци-

алы действия (ПД) криоконсервированных нейронов через 30 мин, 1, 1.5, 2, 3 и 24 ч после оттаивания и инкубации в солевом растворе (состав в мМ: NaCl — 80, KCl — 1.6, MgCl₂ — 1, CaCl₂ — 2, буфер Нерес, pH ~7.5) при 4—6 °С.

Электронно-микроскопические исследования. Ультроструктурные изменения после криоконсервации описаны по результатам изучения изменений органелл нейрона МПЗ малого париетального ганглия (Дьяконова, Вепринцев, 1970). Экспериментальным воздействиям подвергался изолированный мозг, содержащий нейрон. Для описания ответа клетки на воздействие были выбраны органеллы, занимающие значительную часть цитоплазмы нейрона и играющие значительную роль в жизни клетки (эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи и митохондрии), а также другие структуры, в которых выявляются значительные изменения (складчатость и число пор ядерной оболочки, вакуоли, гранулы, ламеллярные структуры и лизосомы). Воздействия были следующими: 1) криоконсервирование, состоящее из инкубации с ДМСО (20 мин), замораживания в парах жидкого азота, хранения в жидком азоте, оттаивания и отмывания ДМСО в течение 30 мин; 2) воздействие криопротектора ДМСО (без замораживания—оттаивания), состоящее из добавления ДМСО и отмывания изолированного мозга от ДМСО; 3) воздействие охлаждения от 22 до 4—6 °С (солевой раствор объемом 10 мл, содержащий мозг, достигал температуры 4—6 °С за 1.5 ч); 4) влияние солевого раствора в течение 5 и 8 ч (случайно выбранные промежутки времени) после выделения мозга. В качестве контроля использовали нейрон МПЗ мозга, инкубированного в течение 20 и 50 мин (время добавления 20 мин + время отмывания 30 мин ДМСО) в солевом растворе, так как по ультроструктурной организации эти клетки не различались. Замороженно-оттаянный мозг фиксировали для электронно-микроскопических исследований: 1) сразу после замораживания—оттаивания (без отмывания криопротектора); 2) после отмывания криопротектора; 3) после инкубации в физиологическом растворе при 4—6 °С в течение 1 и 4 ч; 4) в течение 5 ч; 5) в течение 8 ч. Для оценки воздействия ДМСО изолированный мозг фиксировали: 1) сразу после инкубации с криопротектором; 2) после отмывания криопротектора; 3) после инкубации при 6 °С в течение 1 и 5 ч; 4) в течение 5 ч; 5) в течение 8 ч. Для электронно-микроскопических исследований мозг фиксировали в течение 16 ч при комнатной температуре смесью альдегидов следующего состава (в мл): глутаральдегид (25 %) — 1.02; ДМСО (100 %) — 0.126; параформ (4 %) на 0.1 М какодилатном буферном растворе — 2.3; 1 М какодилатный буферный раствор — 0.22; H₂O — 0.78; pH 7.2 (Piccard, 1976; Мошков, 1985); затем дополнительно фиксировали 1%-ным раствором OsO₄ на 0.2 М какодилатном буферном растворе при комнатной температуре. Обезжизнение проводили последовательным проведением по спиртам возрастающей концентрации (50, 70 и 96 %, абсолютный спирт, по 15 мин) и дополнительно выдерживали в трех сменах абсолютного ацетона по 10 мин. Пропитывали в смеси Эпон-812—ацетон в соотношении 1 : 1 в течение 1 сут и в этой же смеси в соотношении 3 : 1 в течение еще 1 сут. Полимеризацию проводили в термостате при 37 °С (1 сут) и при 60 °С в течение еще 1 сут. Эпоновые блоки резали на пирамиде ЛКВ на 10-микрометровые срезы. В световом микроскопе определяли срезы с нейроном

МПЗ, эти срезы переклеивали на другие блоки и резали ультратонко на ультратоме LKB Ultratome-3. Срезы контрастировали насыщенным спиртовым (на 70%-ном этаноле) раствором уранил-ацетата (Serva, США) при комнатной температуре в полной темноте 20 мин и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе Tesla BS-500 (Чехословакия). Для качественной оценки структуры участки цитоплазмы фотографировали при увел. 10 000× и 14 000×.

Результаты

Электрофизиологические исследования. Криоконсервированные нейроны сразу после оттаивания и отмывания криопротектора не генерировали ПД и имели очень низкий МП (-20 мВ). Через 1.5—3.0 ч после инкубации оттаянного мозга моллюска при 4—6 °С в физиологическом растворе значения МП и ПД нейронов не отличались от контрольных: -60—-40 и 110—170 мВ соответственно (рис. 1, а, б), т. е. наблюдалось восстановление уровня МП и ПД до контрольных значений в течение первых 1.5—3.0 ч инкубации при пониженной температуре. Высокие значения МП и ПД криоконсервированных нейронов сохранялись в течение всего исследования — до 24 ч после оттаивания при условии сохранения в холодильнике. Результаты электрофизиологических исследований свидетельствуют о сохранении целостности мембраны криоконсервированных нейронов, что согласуется с ранее полученными данными (Gakhova et al., 1997).

Электронно-микроскопические исследования. Гранулярный эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Необходимо отметить, что в норме для нейрона МПЗ (например, по сравнению с нейроном МП1 того же ганглия) характерно неравномерное распределение ретикулума в клетке: концентрирование цистерн в приядерной области цитоплазмы, среднее распределение цистерн ЭПР в средней части и присутствие отдельных цистерн на периферии клетки. При любом из экспериментальных воздействий наблюдалось набухание цистерн ретикулума (рис. 2). Комплексные воздейст-

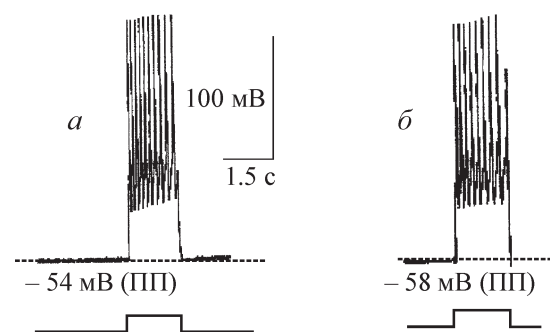


Рис. 1. Пример электрической активности криоконсервированных нейронов через 2 ч после замораживания—оттаивания.

а — контроль, б — криоконсервированный нейрон ($I = 1$ мА продолжительностью 1.5 с). Штриховая линия — базовая (ПП).

Fig. 1. An example of electrical activity of cryopreserved neuron within 2 h after freezing—thawing.

а — control, б — cryopreserved neuron (duration of depolarizing $I = 1$ mA pulse is 1.5 sec). Dotted line — background (ПП).

вия (например, криоконсервирование; рис. 2, в) вызывали более выраженный ответ, заключающийся в наиболее значительном увеличении объема цистерн ЭПР. Также необходимо отметить зональность изменений ЭПР — более выраженную в приядерной области цитоплазмы и практически незаметную на периферии клетки. Зональность изменений ЭПР наиболее сильно проявляется у криоконсервированных нейронов, слабее — у подвергшихся воздействию только ДМСО и практически незаметна у нейронов после охлаждения. При продолжительной инкубации в физиологическом растворе в цитоплазме всех нейронов наблюдалась заметная дегрануляция части ЭПР, сопровождаемая образованием большого числа ламеллярных структур. Полного восстановления организации ЭПР клеток мозга после криоконсервации и 8-часовой инкубации в солевом растворе при 4–6 °С не отмечено: в цитоплазме клетки присутствовали участки как полностью восстановленной сети ЭПР (рис. 2, з), так и фрагментированные участки ЭПР и большое количество ламеллярных структур (рис. 2, д).

Аппарат Гольджи. Добавление ДМСО вызывало усиление аутофагоцитоза, о чем свидетельствуют появление большого количества разнообразных по форме и размеру аутофагосом и образование большого числа мультивезикулярных телец (рис. 3, б). Изменения диктиосом комплекса Гольджи в ответ на охлаждение (в контроле и после воздействия ДМСО) и сразу после замораживания—оттаивания носили одинаковый характер и выражались в образовании комплекса сложных пузырьков (рис. 3, б, в). 8-часовая инкубация в физиологическом растворе при 4–6 °С нивелирует различия в структурной организации диктиосом комплекса Гольджи всех клеток. После 8-часовой инкубации мозга в физиологическом растворе наблюдалась гипертрофия аппарата Гольджи в цитоплазме всех клеток независимо от характера воздействия (рис. 3, д, е).

Митохондрии. Изменение митохондрий в ответ на экспериментальные воздействия носило сходный характер независимо от воздействия и выражалось в набухании или видоизменении крист. Комплексные воздействия, например инкубация с ДМСО и последующее охлаждение или криоконсервация (рис. 4, з, д), вызывали более выраженные изменения крист митохондрий приядерной области по сравнению со средней и периферической частями клетки. Аналогичные изменения митохондрий приядерной области наблюдались при охлаждении нейронов от 22 до 4–6 °С (рис. 4, б, в). В цитоплазме охлажденных нейронов наблюдалось прилегание к митохондриям разнообразных структур, что может говорить о повышенной активности митохондрий. Напротив, в криоконсервированных нейронах сразу после оттаивания такого прилегания цитоплазматических структур к митохондриям не наблюдалось, что, возможно, связано со снижением их функции в этот период. При длительной инкубации в физиологическом растворе при 4–6 °С ультраструктурные различия митохондрий, вызванные охлаждением, ДМСО или криоконсервированием, сглаживались, и через 8 ч ультраструктурная организация крист митохондрий всех клеток (независимо от воздействия) не различалась (рис. 4, е, ж). Длительная инкубация в солевом растворе сама по себе вызывала деформацию митохондрий, поэтому видоизменения такого рода (рис. 4, е) можно отнести к вызванным как условиями инкубации, так и условиями криоконсервации. Следовательно, можно говорить о нормализации структур-

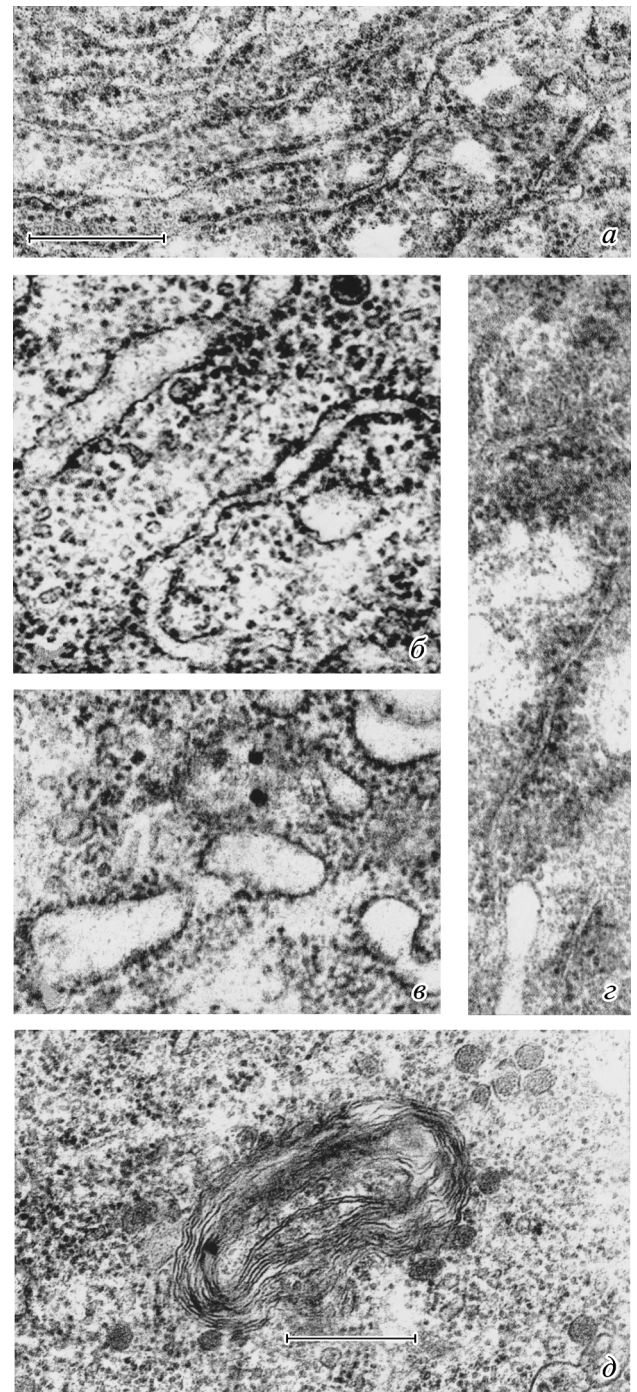


Рис. 2. Ультраструктурные изменения ЭПР.

a — нейрон через 30–50 мин инкубации в физиологическом растворе при 22 °С. *б* — после охлаждения нейронов от 22 до 4–6 °С; аналогичная картина изменений ЭПР наблюдалась после инкубации с ДМСО, а также на периферийных участках криоконсервированных нейронов сразу после оттаивания. *в* — после замораживания—оттаивания, приядерная область клетки. *з, д* — ЭПР криоконсервированного нейрона через 8 ч после оттаивания и удаления криопротектора. Масштабные линейки — 500 нм.

Fig. 2. Ultrastructural changes of endoplasmic reticulum (ER).

a — neuron after 20–50 min incubation in physiological solution at 22 °C. *б* — after cooling of neurons from 22 to 4–6 °C; similar changes of ER were observed immediately after incubation with cryoprotectant and immediately following thawing of cryopreserved cells in peripheral zone of cytoplasm. *в* — immediately following freezing—thawing, near the nuclear zone of cytoplasm. *з, д* — ER of cryopreserved neurons within 8 h after thawing and cryoprotectant removal. Scale bars — 500 nm.

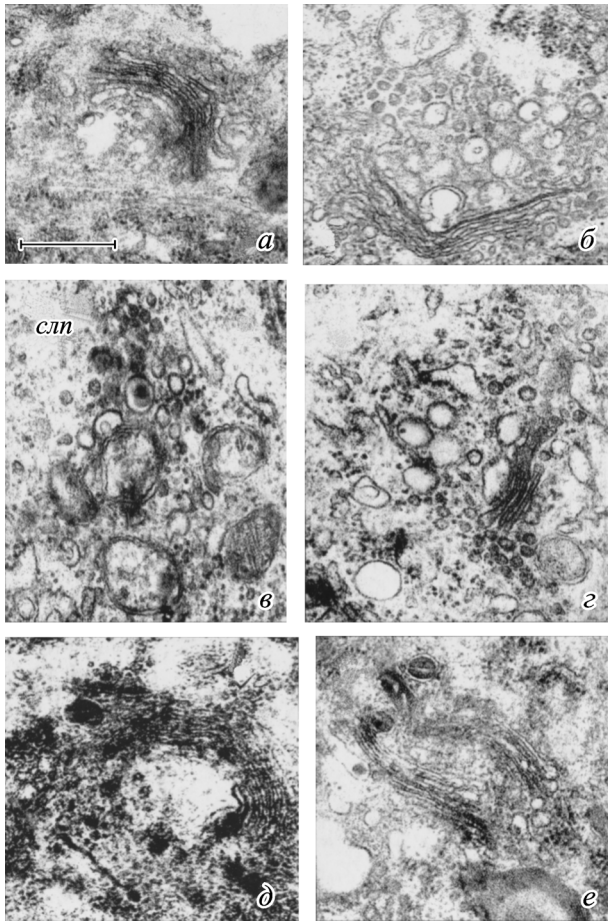


Рис. 3. Изменения ультраструктурной организации диктиосом аппарата Гольджи.

a — контроль (тот же, что и на рис. 2); *б* — после инкубации с ДМСО; *в* — после охлаждения нейронов от 22 до 4–6 °С (*слп* — сложные пузырьки); *з* — сразу после оттаивания; *д* — после 8-часовой инкубации в физиологическом растворе при 4–6 °С; *е* — через 8 ч после замораживания—оттаивания и инкубации при 4–6 °С. Масштабная линейка — 500 нм.

Fig. 3. Ultrastructural changes of dictyosomes of Golgi apparatus.

a — control (the same as in Fig. 2); *б* — immediately after incubation with cryoprotectant Me2SO; *в* — cooling neurons from 22 to 4–6 °С; *з* — immediately following freezing—thawing; *д* — within 8 h after incubation in physiological solution at 4–6 °С; *е* — within 8 h after freezing—thawing, cryoprotectant removal and incubation in physiological solution at 4–6 °С. Scale bar — 500 nm.

но-функциональных характеристик митохондрий криоконсервированных нейронов в процессе низкотемпературной инкубации.

Любое из исследуемых экспериментальных воздействий приводило к увеличению складчатости ядерной мембраны в области аксонного холмика. Заметно увеличивалось количество пор ядерной оболочки 1) после воздействия ДМСО и последующего охлаждения; 2) у криоконсервированных нейронов после оттаивания и отмывания ДМСО; 3) у нейронов после охлаждения. Это говорит о том, что увеличение обмена между ядром и цитоплазмой вызывается охлаждением, а не ДМСО. Происходило не только увеличение числа пор ядерной оболочки, но и их открытие. Если в норме открытые поры наблюдались в редких случаях, то здесь было заметно большее число открытых пор, что свидетельствует об усилении выброса из ядра РНП. Об усилении синтеза и

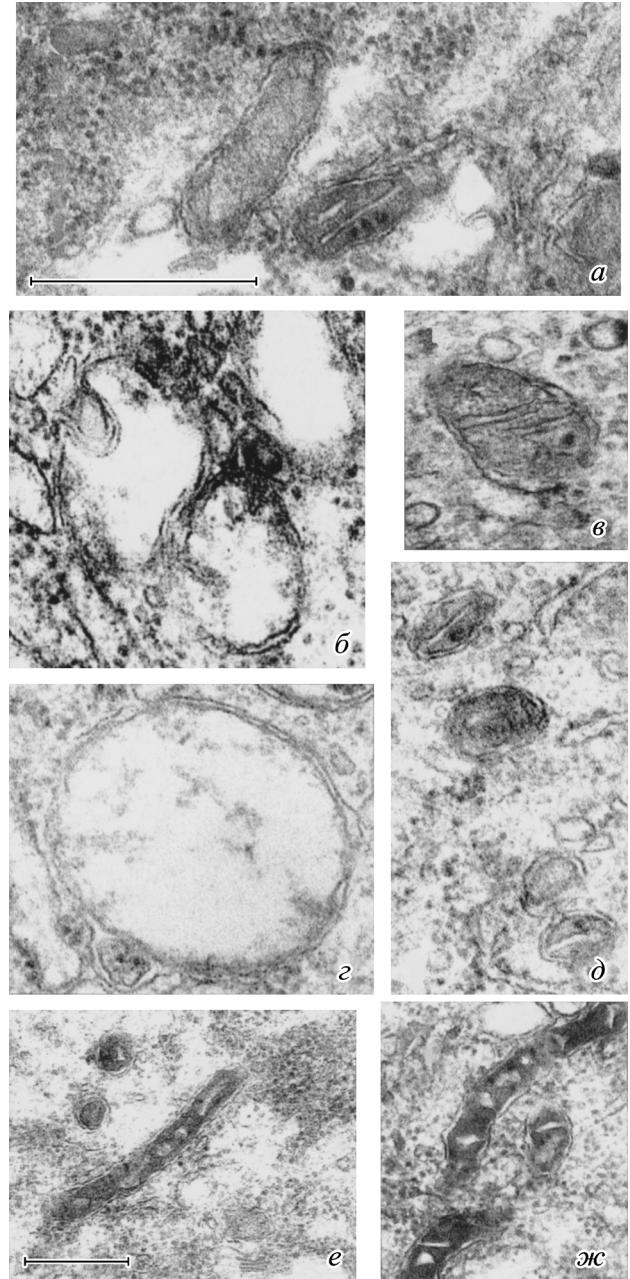


Рис. 4. Ультраструктурные изменения митохондрий.

a — контроль (тот же, что и на рис. 2); *б, в* — охлаждение от 22 до 4–6 °С: приядерная (*б*) и периферийная (*в*) области; *з, д* — сразу после замораживания—оттаивания: приядерная (*з*) и периферийная (*д*) области; *е* — через 8 ч инкубации в физиологическом растворе при 4–6 °С; *ж* — через 8 ч после замораживания—оттаивания, удаления криопротектора и инкубации при 4–6 °С. Масштабные линейки — 500 нм.

Fig. 4. Ultrastructural changes of mitochondria.

a — control (the same as in Fig. 2); *б, в* — cooling neurons from 22 to 4–6 °С: near the nuclear zone (*б*), peripheral zone (*в*); *з, д* — immediately following freezing—thawing: near the nuclear zone (*з*), peripheral zone (*д*); *е* — within 8 h after incubation in physiological solution at 4–6 °С; *ж* — within 8 h after freezing—thawing, cryoprotectant removal and incubation in physiological solution at 4–6 °С. Scale bars — 500 nm.

выброса из ядра РНП свидетельствуют и ультраструктурная организация ядрышка (большое содержание гранулярного материала и наличие пустот в ядрышках) в этот период, и скопление рибосом в приядерной области клетки, не наблюдаемое ранее.

Во всех нейронах независимо от характера воздействия после длительной инкубации наблюдались сходные изменения ЭПР, митохондрий (удлинение и уплощение), диктиосом аппарата Гольджи (разрастание), увеличение содержания электронно-плотных гранул, лизосом, ламеллярных структур, крупных вакуолей. Во всех клетках на периферии цитоплазмы присутствовали очаги дегенерации.

Обсуждение

На примере гигантского нейрона МПЗ моллюска нами изучены ультраструктурные изменения клеток, вызванные криоконсервированием, а также сделано заключение о возможности восстановления клеточных структур после оттаивания. Выбор гигантских нейронов малого париеального ганглия моллюска в качестве модели объясняется легкостью идентификации клеток на поверхности ганглия, крупными размерами (180—250 мкм), сравнительной изученностью структурной организации и электрофизиологических характеристик нейронов в норме (Дьяконова, Вепринцев, 1970; Vocharova et al., 1976; Pogorelaya et al., 1977; Frolkis et al., 1995).

Результаты этой работы свидетельствуют о том, что ДМСО, замораживание—оттаивание, охлаждение и последующая длительная инкубация в физиологическом растворе вызывают сходные ультраструктурные изменения органелл всех клеток. Воздействие ДМСО (без замораживания) вызывает гиперактивацию комплекса Гольджи, накопление мультивезикулярных телец и электронно-плотных гранул в цитоплазме клетки. Следовательно, те же изменения (а именно накопление гранул, мультивезикулярных телец и лизосом) в прошедших криоконсервации клетках можно отнести к вызванному в какой-то мере воздействием ДМСО. В этом случае значительные (по сравнению с другими воздействиями) изменения органелл цитоплазмы криоконсервированных нейронов (набухание ретикулума, сопровождающееся вакуолизацией диктиосом комплекса Гольджи и деструкцией крист митохондрий) вызваны комплексом воздействий, причем влияние криопротектора при этом играет не последнюю роль. Охлаждение само по себе вызывает деструктивные изменения в организации крист митохондрий и набухание цистерн ретикулума (Arber et al., 1986), вакуолизацию диктиосом аппарата Гольджи, увеличение складчатости ядерной мембраны и числа пор ядерной оболочки (ультраструктурная организация ядрышка в этот период свидетельствует об активации синтетических процессов в ядре). Вся картина ультраструктурных изменений под воздействием охлаждения говорит об увеличении функциональной активности клетки. При последующем охлаждении в цитоплазме замороженно-оттаянных клеток продолжались процессы восстановления: увеличение содержания гранулярного компонента в ядрышке сопровождалось увеличением числа пор ядерной оболочки, продолжалась сборка диктиосом аппарата Гольджи, происходила нормализация структуры митохондрий. Уменьшение объема цистерн ретикулума, сборка их в единую сеть, инволюция ядрышка, ведущая к снижению его активности, наблюдались сразу после отмывания криопротектора и продолжались при дальнейшей инкубации.

Известно, что на мембранах ЭПР осуществляется биосинтез различных белков и липидов, а мембранные

системы комплекса Гольджи участвуют в сегрегации и накоплении, созревании продуктов, синтезированных в ретикулуме, а также в транспортировке их за пределы клетки. Фрагментация и дегрануляция ретикулума, сопровождаемые накоплением ламеллярных структур (ЛС), лизосом, являются обычным ответом клеток на воздействия разного характера (Fowler et al., 1983; Arber et al., 1986; Woods, Fowler, 1986). Формирование большого количества ЛС может свидетельствовать о нарушении липидной синтеза (Hook et al., 1986; Kanai, 1989; Carvalho et al., 1998). Присутствие ЛС в цитоплазме нейронов моллюска в норме известно давно (Боровягин, Сахаров, 1968), также известно и об увеличении их количества с возрастом (Frolkis et al., 1995). Таким образом, формирование в цитоплазме клеток ЛС, лизосом и остаточных телец после изучаемых экспериментальных воздействий не говорит о гибели клетки, а скорее свидетельствует о процессах нормализации внутриклеточного метаболизма. Длительная инкубация при пониженной температуре вызывает уплотнение матрикса митохондрий и их заметное удлинение (рис. 4, *е, ж*) у всех изученных клеток. Сходные видоизменения митохондрий наблюдали на растительных клетках при изучении ответа и адаптации растительных клеток к условиям анаэробного стресса (Vartapetian et al., 2003). Этими же авторами изменения крист митохондрий, сходные с наблюдаемыми нами в клетках после криоконсервирования, были признаны обратимыми. Следовательно, криосохранение в присутствии 2 М ДМСО не вызывает необратимых изменений в ультраструктурной организации митохондрий.

Описанные изменения органелл клеток после криосохранения не отличались от вызванных, например, воздействием теплового шока (Welch, Suhan, 1985). Это говорит о неспецифическом характере ответа нейронов на криосохранение в присутствии 2 М ДМСО. Необходимость длительной инкубации оттаянного материала для повышения его жизнеспособности подчеркивается другими авторами при исследовании культуры клеток (Foreman et al., 1993). При обогащении среды инкубации экзогенной глюкозой длительность сохранения клеток в жизнеспособном состоянии (т. е. без изменений, трактуемых как необратимые) значительно увеличивается (Vartapetian et al., 2003). Ультраструктурная организация ядер нейронов после 8-часового сохранения в простом солевом растворе при пониженной температуре свидетельствовала об истощении нейронов (ячеистые структуры в ядре, описанные при длительной стимуляции; Мошков, Масюк, 1981).

На основании проведенных исследований нами было сделано заключение о том, что криоконсервирование в присутствии ДМСО является неспецифическим воздействием для нейронов моллюска и не вызывает летальных изменений в структурно-функциональной организации клеток после оттаивания. Криоконсервированные клетки после оттаивания нуждаются в инкубации не менее 2—3 ч при 4—6 °С в физиологическом растворе для восстановления электрофизиологических характеристик (МП и ПД) и 5—8 ч для нормализации ультраструктурной организации органелл.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 00-04-49366-а и 01-04-06625-МАС).

Список литературы

- Боровягин В. Л., Сахаров Д. А. 1968. Ультроструктура гигантских нейронов тритонии. Атлас. М.: Наука. 75 с.
- Гахова Э. Н., Дмитриева Е. В. 2003. Криоконсервация нервной ткани. Биофизика живой клетки. 7 : 65—68.
- Дьяконова Т. Л., Вепринцев Б. Н. 1970. Особенности структурной и функциональной организации и метаболической активности нейронов прудовика. Деп. в ВИНТИ. М. 819 : 26 с.
- Мошков Д. А. 1985. Адаптация и ультроструктура нейрона. М.: Наука. 200 с.
- Мошков Д. А., Масюк Л. Н. 1981. Аккомодационные изменения синаптических контактов при длительной адаптации нейрона к экстремальной стимуляции. Цитология. 23 (4) : 360—367.
- Фуллер Б., Грин К., Грищенко В. И. 2003. Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия. Проблемы криобиологии. 2 : 62—83.
- Чекурова Н. Р. 1994. Использование электрофизиологического метода для изучения механизмов криоповреждений и способов криозащиты. Биофизика живой клетки. 6 : 121—126.
- Arber S. L., Neilly J. P., Lin J. C., Kriho V. 1986. The effect of 2450 MHz microwave radiation on the ultrastructure of snail neurons. Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR. 18 : 243—249.
- Bocharova L. S., Kostenko M. A., Vepintsev B. N., Allachverdov B. L. 1976. Completely isolated molluscan neurons. An ultrastructural study. Brain Res. 101 : 185—198.
- Brunet J.-F., Pellerin L., Magostretti P., Villemure J.-G. 2003. Cryopreservation of human brain tissue allowing timely production of viable human brain cells for autologous transplantation. Cryobiology. 47 : 179—183.
- Carvalho F., Sousa M., Oliveira E., Carvalheiro J., Baldaia L. 1998. Ultrastructure of oogenesis in *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda). I. Previtellogenic oocytes. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 30 : 409—416.
- Decherchi P., Lammari-Barreault A., Cochard Ph., Carin M., Rega P., Pio J., Pellissier J.-F., Ladaïque P., Novakonitch G., Gauthier P. 1997. CNS axonal regeneration within peripheral nerve grafts cryopreserved by vitrification: cytological and functional aspects. Cryobiology. 34 : 214—239.
- Foreman J., Moriya H., Taylor M. J. 1993. Effect of cooling rate and its interaction with pre-freeze and post-thaw tissue culture on *in vitro* and *in vivo* function of cryopreserved pancreatic islets. Transpl. Int. 6 : 191—200.
- Fowler B. A., Kardish R. M., Woods J. S. 1983. Alteration of hepatic microsomal structure and function by indium chloride. Ultrastructural, morphometric, and biochemical studies. Lab. Invest. 48 : 471—478.
- Frodl E., Duan W. M., Sauer H., Kupsch A., Brundin P. 1994. Human embryonic dopamine neurons xenografted to the rat: effects of cryopreservation and varying regional source of donor cells on transplant, morphology and function. Brain Res. 647 : 286—298.
- Frolkis V. V., Kvitnitskaya-Ryzhova T. Yu., Martynenko O. A. 1995. Aging of neurons in the mollusk *Lymnaea stagnalis* small parietal ganglion: a morpho-functional comparison in the same neuron. Exp. Gerontology. 30 : 533—544.
- Gakhova E. N., Kislov A. N., Chekurova N. R. 1997. Study of membrane properties of mollusk neuron after freeze-storage at liquid nitrogen temperature for 8 years. Infusionstherapie Transfusionsmedizin. 24 : 378—379.
- Hook G. E., Gilmore L. B., Talley F. A. 1986. Dissolution and reassembly of tubular myelin-like multilamellar structures from the lungs of patients with pulmonary alveolar proteinosis. Lab. Invest. 55 : 194—208.
- Kanai M. 1989. Ultrastructure and biochemical studies of lipolysis by lipolysomes in chick hepatocytes. Cell Tissue Res. 255 : 559—565.
- Piccard J. J. 1976. Ultrastructure of the cement gland of a *Xenopus laevis*. J. Morphol. 148 : 192—207.
- Pogorelaya N. K., Elekes K., Kiss I. 1977. Electron microscopic investigation of a giant neuron identified in the right parietal ganglion of *Lymnaea stagnalis* L. Acta biol. Acad. Sci. hung. 28 : 451—460.
- Vartapetian Boris B., Andreeva Irina N., Generozova Inna P., Polyakova Lyli I., Maslova Inna P., Dolgikh Yulia I., Stepanova Anna Yu. 2003. Functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress. Ann. Bot. 91 : 155—172.
- Welch W. J., Suhan J. P. 1985. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. J. Cell Biol. 101 : 1198—1211.
- Woods J. S., Fowler B. A. 1986. Alteration of hepatocellular structure and function by thallium chloride: ultrastructural, morphometric, and biochemical studies. Toxicol. Appl. Pharmacol. 83 : 218—219.

Поступила 12 IX 2005

ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF ENDOPLASMIC RETICULUM,
GOLGI APPARATUS MEMBRANES AND MITOCHONDRIA IN THE IDENTIFIED NEURON
OF MOLLUSC AFTER CRYOPRESERVATION

E. V. Dmitrieva,¹ D. A. Moshkov,² E. N. Gakhova¹

¹ Institute of Cell Biophysics RAS and

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region;

¹ e-mail: edmitrieva3@yandex.ru

Investigation of a possibility of long-term storage of frozen (–196 °C) viable neurons and nervous tissue is one of the central present day problems. In this study ultrastructural changes in neurons of frozen—thawed snail brain were examined as a function of time. We studied the influence of cryopreservation, cryoprotectant (Me₂SO), cooling to 4—6 °C, and a prolonged incubation in physiological solution at 4—6 °C on dictyosomes of Golgi apparatus, endoplasmic reticulum (ER) cisternae and mitochondria. It has been found that responses of these intracellular structures of cryopreserved neurons to the above influences are similar: dissociation of Golgi dictyosomes, swelling of endoplasmic reticulum cisternae and mitochondrial cristae. Both freezing—thawing and cryoprotectant were seen to cause an increase in the number of lysosomes, liposomes, myelin-like structures, and to form large vacuoles. The structural changes in molluscan neurons caused by cryopreservation with Me₂SO (2 M) were reversible.

Key words: cryopreservation, mitochondria, neuron, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum.