

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

Репин Николай Васильевич

УДК: 57.043:611.018.5.36.018.1.086.3:591.543.42

СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ ПРИ
ГИПОТЕРМИИ, ЕСТЕСТВЕННОМ ГИПОБИОЗЕ И ЗАМОРАЖИВАНИИ

диссертация на соискание научной степени доктора биологических наук

03.00.19 – криобиология

Харьков

2013 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	6 стр.
Введение. Актуальность проблемы.....	7 стр.
Глава 1. Обзор литературы. Роль гипотермии и гипобииоза в сохранении морфо-функционального статуса клеток и тканей.....	17 стр.
1.1 Процессы и структурные перестройки в клетках и их мембранах при гипотермии.	17 стр.
1.2. Среды для гипотермического хранения биологических объектов...	30 стр.
1.3. Влияние условий хранения эритроцитов на морфологию и структурные перестройки мембран.....	32 стр.
1.4. Особенности структурного состояния клеток гибернирующих млекопитающих.....	42 стр.
1.4.1 Морфофункциональное состояние некоторых систем организма зимоспящих сусликов в фазе спячки.....	44 стр.
Глава 2. Материал и методы исследования.....	51 стр.
2.1 Материал исследования.....	51 стр.
2.2 Методы исследования.....	53 стр.
2.2.1 Трансмиссионная электронная микроскопия.....	53 стр.
2.2.2 Метод замораживания скалывания.....	55 стр.
2.2.3 Растровая электронная микроскопия.....	60 стр.
2.2.4 Метод гистологических срезов.....	61 стр.
2.2.5 Метод ЭПР спиновых зондов.....	61 стр.
2.2.6 Определение водной диффузионной проницаемости мембраны эритроцитов методом ЯМР.....	62 стр.
2.2.7 Определение величины гемолиза.....	63 стр.
2.2.8. Метод проточной цитофлуориметрии.....	63 стр.
2.2.9 Определение осмотической устойчивости эритроцитов.....	63 стр.
2.2.10. Метод электрофореза в ПААГе.....	64 стр.
2.2.11. Метод собственной белковой флуоресценции	64 стр.
2.2.12. Определение уровня внеклеточного калия.....	64 стр.

2.2.13. Метод кислотных эритрограмм.....	64 стр.
Глава 3. Изучение морфологии эритроцитов и ультраструктуры их мембран при действии температуры.....	66 стр.
3.1 Обоснование применения метода замораживания-скалывания в криобиологии.....	66 стр.
3.2. Сравнительное исследование влияния температуры на эритроциты крысы, кордовой и донорской крови человека.....	75 стр.
Глава 4. Роль факторов среды и длительности экспозиции при 4°C в сохранении морфологии эритроцитов и их мембраны.....	93 стр.
4.1 Характер трансформации эритроцитов в зависимости от ионной силы и pH среды экспозиции.....	93 стр.
4.2 Значение факторов среды хранения в обеспечении устойчивости эритроцитов к длительной гипотермии.....	104 стр.
4.3 Структурные перестройки в цитоскелет-мембранном комплексе при сфероэритроцитарной трансформации. Механизм везикулообразования...119 стр.	
Глава 5. Реакция эритроцитов гетеро- и гомойотермных организмов на температурное воздействие.	140 стр.
5.1 Температурозависимые изменения ультраструктуры мембран эритроцитов гетеротермов при различных физиологических состояниях животного.....	144 стр.
5.2 Структурные перестройки в мембранах эритроцитов зимоспящих сусликов при длительном гипотермическом хранении	158 стр.
5.3 Особенности устойчивости эритроцитов гибернирующих млекопитающих к кислотному гемолизу	164 стр.
5.4. Реакция мембран эритроцитов новорожденных (5-7 дней) крысят на температурное воздействие <i>in vivo</i>	170 стр.
Глава 6. Водная проницаемость мембран эритроцитов гетеро- и гомойотермных организмов при гипотермии и отрицательных температурах.....	176 стр.

6.1 Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов зимоспящих сусликов <i>Citellus undulatus</i>	179 стр.
6.2 Влияние «триггера спячки» пептида (1-10 кДа) на водный диффузионный обмен эритроцитов человека	187 стр.
6.3 Оценка водной проницаемости мембран эритроцитов человека и гибернирующего суслика методом быстрого двухступенчатого замораживания.....	191 стр.
6.3.1. Рекристаллизация льда и обезвоживание клеток на этапе изотермического выдерживания.....	194 стр.
Глава 7. Характер изменения ультраструктуры клеток и их мембран при длительном гипотермическом хранении.....	211 стр.
7.1. Динамика ультраструктурных изменений выделенных гепатоцитов и клеток фрагментов печени крысы при различных условиях их гипотермического хранения.....	214 стр.
7.2. Морфологическое состояние нативной и криоконсервированной плаценты человека в норме и после гипотермического хранения.....	228 стр.
7.2.1. Ультраструктура плаценты в исходном состоянии.....	229 стр.
7.2.2. Характер изменения морфологического состояния плаценты при гипотермическом хранении.....	234 стр.
7.2.3. Ультраструктура плаценты после криоконсервирования.....	241 стр.
Глава 8. Ультраструктура и морфо-функциональное состояние клеток печени зимоспящих сусликов (<i>Citellus undulatus</i>) в различных фазах естественного гипобиоза и при длительном гипотермическом хранении ее фрагментов.....	245 стр.
8.1. Морфо-функциональное состояние клеток печени зимоспящего суслика, находящегося в трех физиологических состояниях: спячки, пробуждения и бодрствования.....	245 стр.
8.1.1. Морфологическое состояние печени и ультраструктура гепатоцитов сусликов в активной фазе периода зимней спячки	246 стр.

8.1.2. Морфологическое состояние печени и ультраструктура гепатоцитов сусликов в фазе спячки	249 стр.
8.1.3. Морфологическое состояние печени и ультраструктура гепатоцитов сусликов в фазе пробуждения	254 стр.
8.2. Динамика морфологических изменений при гипотермическом хранении фрагментов печени сусликов в активном, спящем и пробуждающемся состояниях.....	263 стр.
Глава 9. Морфологическое состояние изолированной печени крысы после гипотермического хранения в средах различного состава и рН и нормотермической реперфузии. Признаки повреждения и сохранности печени.....	280 стр.
9.1. Морфологические и биохимические признаки повреждения печени при гипотермическом хранении в сахарозо-содержащей среде.....	284 стр.
9.2. Морфологическое состояние изолированной печени крыс после нормотермической реперфузии и гипотермического хранения в UW- и маннитол-содержащей средах при различных значениях рН.....	294 стр.
Заключение.....	304 стр.
Выводы.....	307 стр.
Список литературы.....	312 стр.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
- ВМЧ – внутримембранные частицы
- ВДП – водная диффузионная проницаемость
- ГА – глутаровый альдегид
- ГХ – гипотермическое хранение
- ЕМ – электронная микроскопия
- ИАА – иодацетамид
- М – мелиттин
- ПХМБ – *p*-хлормеркурийбензоат
- ПЯ – пчелиный яд
- SDS – додецилсульфат натрия
- ФА₂ – фосфолипаза А₂
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
- ГЭР – гладкий эндоплазматический ретикулум
- ШЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум
- ЭПР – электронно парамагнитный резонанс
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- РF – поверхность скола мембраны, прилежащая к цитоплазме
- ЕF – поверхность скола мембраны, прилежащая к внеклеточной среде
- α–ГФДГ – α–глицерофосфатдегидрогеназа
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- НАД.Н₂–ДГ – НАД.Н₂ – дегидрогеназа
- НАДФ.Н₂–ДГ – НАДФ.Н⁺ – дегидрогеназа
- ОВФ – окислительно–восстановительные ферменты
- РТ – ректальная температура
- СДГ– сукцинатдегидрогеназа

Актуальность темы.

Современный этап развития биологии характеризуется значительными достижениями в изучении закономерностей организации и функционирования клетки. Одним из наиболее значимых направлений исследований является выяснение роли клеточных и молекулярных механизмов в адаптации систем различного уровня организации к изменяющимся внешним условиям, в том числе и к охлаждению.

Несмотря на многочисленные исследования в области криобиологии, механизм действия охлаждения и сопряженных с ним факторов на биологические объекты остается не раскрытым. Это связано, главным образом, с отсутствием адекватной информации о динамике и характере развития морфологических и ультраструктурных изменений в клетках, подвергнутых температурному воздействию, хотя анализу функциональных характеристик клеток в условиях охлаждения уделяется достаточно большее внимание [1–3].

Накопленные в последние три десятилетия сведения о температурозависимых перестройках в клетках и их мембранах с достаточной уверенностью позволяют лишь сказать, что состояние большинства клеток при их охлаждении от физиологических температур до 15–20°C является обратимым и не сопровождается существенным изменением их функций. Однако такие воздействия на клетки в области положительных температур, как быстрое снижение температуры (температурный шок) или длительное нахождение биообъектов при околонулевых температурах (гипотермическое хранение), следует рассматривать как один из важных факторов повреждения.

Уникальным примером развития температурной адаптации организма является способность гетеротермных животных погружаться в состояние гипобיוза, сопровождающееся естественным снижением температуры тела [4–6]. Этот механизм выработался в ходе эволюции и свидетельствует о больших компенсаторных возможностях биологических систем. Это

определило интерес к естественному гипобию с точки зрения использования результатов его исследования в условиях искусственной гипотермии и в медицины.

Методы гипотермии широко используются в различных областях биологии и медицины. Известно, что понижение температуры приводит не только к снижению общего метаболизма, но и повышению устойчивости различных биологических объектов к действию многих неблагоприятных факторов и, прежде всего, к тканевой и клеточной гипоксии и процессам аутолиза [2, 6]. Гипотермию следует рассматривать не только как способ краткосрочного сохранения биообъектов различного уровня организации, но и как важнейший этап адаптации таких сложно организованных систем, как орган, к низкотемпературному консервированию и его последующей реабилитации после размораживания.

Значительное число работ, посвященных выяснению механизма адаптации пойкило- и гетеротермных организмов, касаются изучения качественного и количественного состава липидов, функционирования мембраносвязанных ферментов и белковых комплексов, «триггеров спячки», обеспечивающих сохранение функциональной активности клеток при пониженных температурах [7–9]. Морфологические исследования касаются, в основном, краткого описания состояния ультраструктуры клеток и тканей в цикле гибернации. Сравнительное изучение температурозависимых изменений ультраструктуры клеток гетеротермов в разных фазах спячки и гомойотермов, а также при длительном гипотермическом воздействии *in vitro*, не проводилось. В литературе отсутствуют данные о водном обмене в клетках зимоспящих. Однако известно, что во время спячки в организме животного практически сохраняется ионный баланс, продолжается утилизация продуктов жизнедеятельности, т.е. на фоне значительного снижения основного метаболизма происходят процессы, требующие поддержания определенного уровня водного обмена. В этой связи вопрос о роли проницаемости мембраны для воды в обеспечении быстрого включения

всех систем клетки и организма в целом при переходе из спячки в активное состояние имеет огромное значение.

Важным аспектом изучения процессов холодовой адаптации клеток является исследование плазматических мембран как одного из наиболее криолабильных компонентов клетки [10]. В процессе охлаждения или криоконсервирования при действии многочисленных физико-химических факторов, плазматические мембраны испытывают структурные перестройки, что предполагает их участие в приспособительных реакциях.

Изучение структурных перестроек в эритроцитах и ядродержащих клетках в условиях температурного воздействия показало, что наблюдаемые изменение формы и деформация плазматической мембраны, перестройки во внутриклеточном объеме указывают на участие в этих процессах не только липидного бислоя и интегральных белков мембраны, но и ионного состава, цитоскелетной сети, состояние которой посредством белок-белковых взаимодействий контролирует форму и объем клеток [11–15]. Результаты исследований последних лет свидетельствуют об участии в мембранных перестройках цитозольных и цитоскелетных структур, электростатически взаимодействующих с интегральными компонентами мембраны [16]. Это указывает на возможную роль слабых связей в формировании реакций клеток на экстремальные воздействия [17].

Таким образом, из данных литературы следует, что основная масса исследований направлена на выяснение различных аспектов функционального статуса биологических объектов на этапах снижения температуры и гипотермического хранения, тогда как их морфологические и особенно ультраструктурные характеристики в условиях изменяющейся функции практически не изучались. Анализ данных литературы позволяет выделить температурный и ионно-осмотический факторы воздействия на биологические объекты, приводящие к структурным перестройкам в клетках и их мембранах. Повреждающее действие этих факторов связано

непосредственно с рядом ключевых проблем криобиологии, что и явилось предметом наших исследований.

Связь работы с научными программами, планами, темами:

Диссертационная работа выполнена в рамках плановых тем НИР ИПКиК НАН Украины в отделе криоморфологии по темам: «Вивчити морфологічні аспекти реакції біологічних об'єктів різних рівнів організації, а також модельних систем на штучний і природний гіпобіоз» (№ госрегистрации 01944005299, 1991–1995 гг.); «Дослідження механізмів холодової толерантності при природній і штучній адаптації клітин» (№ госрегистрации 0100U004237; 1996–2000 гг.); «Дослідити структурно-метаболический і функціональний стан клітин фетоплацентарного комплексу після кріоконсервування і гіпотермічного зберігання» (№ госрегистрации 0206U002786; 2001–2005 гг.); «Вивчити механізм регенераційних процесів шляхом дослідження структурних і деяких метаболических показників організму експериментальних тварин після трансплантації плаценти в умовах атеросклерозу» (№ госрегистрации 0106U002170; 2006–2010 гг.)

Цель исследования: установить закономерности и особенности структурных перестроек в биологических объектах различного уровня организации в условиях гипотермии, естественного гипобิโอ́за и действия низких температур.

Задачи исследования.

1. Определить морфологическое состояние эритроцитов человека, их осмотическую устойчивость и степень повреждения в зависимости от ионной силы и pH среды эквilibрации, а также длительности гипотермического хранения.

2. На основе проведенных исследований структурных перестроек в мембране эритроцитов проанализировать процесс и предложить механизм везикулообразования.

3. Изучить реакцию мембран эритроцитов гетеро- и гомойотермных организмов на температурное воздействие (4–37°C), а также выяснить общность и различия структурных изменений в клетках и их мембранах.

4. Методом ЯМР-спинового эха исследовать водную диффузионную проницаемость мембран эритроцитов гетеротермных животных и человека, характер ее температурной зависимости и величину энергии активации, а также влияние на них «триггера спячки» – пептида м.м. 1–10 кДа.

5. Разработать методический подход для оценки значения коэффициента проницаемости мембраны клеток для воды при отрицательных температурах на основе исследования процессов внутриклеточной кристаллизации и обезвоживания эритроцитов на этапе температурной остановки ($-20 \div -30^{\circ}\text{C}$) при двухступенчатом режиме замораживания.

6. Оценить уровень морфологической сохранности клеток печени крыс и гибернирующих животных при гипотермическом хранении ее фрагментов в жидкой среде и во влажной камере.

7. Выяснить последовательность и закономерности изменения ультраструктуры внутриклеточных органелл при длительном гипотермическом хранении изолированных и в составе фрагментов печени гепатоцитов.

8. Исследовать влияние краткосрочного (1 час) и длительного (24 часа) гипотермического хранения изолированной печени крыс в средах с разными значениями pH, содержащих сахарозу или маннит, стандартной среде UW, а также после нормотермической реперфузии на состояние ее клеток.

9. Обосновать преимущества применения слабозлектролитных сред с пониженным pH для гипотермического хранения тканей и органов.

Объект исследования: Молекулярно-клеточные закономерности и механизмы структурной адаптации биологических объектов при гипотермии и естественном гипобиозе.

Предмет исследования: структурно-функциональные перестройки в биообъектах различного уровня организации при варьировании температуры и состава среды экспозиции в условиях гипотермии, естественном гипобиозе и замораживании.

Методы исследования: Трансмиссионная (ТЭМ) и растровая (РЭМ) электронная микроскопия, электронно-микроскопический метод замораживания–скалывания, оптическая микроскопия, ЭПР спиновых зондов, ЯМР–спинового эха, морфометрический анализ, проточная цитофлуориметрия и спектрофотометрия.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование влияния сред различного состава, ионной силы и значений pH на структурно-функциональное состояние биологических объектов разного уровня организации (клетка – орган). Показано, что слабозлектролитные среды с пониженным значением pH обеспечивают высокий уровень сохранности ультраструктуры и макроэргов клеток.

В работе впервые показано, что определяющая роль в механизме спикулообразования принадлежит сокращению и уплотнению цитоскелета эритроцита. Новыми являются данные о механизме спикуло- и везикулообразования при сферо-эхиноцитарной трансформации эритроцитов, позволившие объяснить причины устойчивости этих форм к гипотонии.

Впервые обнаружено явление разрыхления структуры примембранного слоя – гликокаликса, и его отслоение от мембраны эритроцитов, между 10 и 14-ми сутками гипотермического хранения (ГХ) в средах с нейтральным значением pH и после 7 суток – со щелочным.

С использованием электронно-микроскопического метода замораживания–скалывания впервые проведены сравнительные исследования и получены новые данные о процессе обезвоживания эритроцитов человека и гетеротермов на этапе температурной остановки ($-20 \div -30^{\circ}\text{C}$) и оценено значение коэффициента проницаемости мембраны для воды при этих температурах.

Установлено, что эритроциты гетеротермов в отличие от гомойотермов имеют более высокую проницаемость мембраны для воды и меньшую энергию активации этого процесса, а время водного диффузионного обмена мембраны эритроцитов спящего животного на порядок (в 7–8 раз) меньше, чем у эритроцитов человека в интервале температур 6–38°C. Впервые выявлено влияние «триггера спячки» – пептида (мол. массой 1–10 кДа), на параметры проницаемости мембраны эритроцитов человека для воды.

Впервые проведено сравнительное исследование морфофункционального и ультраструктурного состояния клеток печени в составе цельного изолированного и перфузированного органа, хранившегося различные сроки при 4°C в средах низкой ионной силы на основе сахарозы и маннита при нейтральных и кислых значениях pH, среде UW, а также после этапа нормотермической реперфузии. Выявлен высокий (аналогичный среде UW – общепризнанный стандарт) уровень сохранности морфологических и биохимических характеристик органа, свидетельствующий о перспективности слабоэлектролитных сред с пониженным значением pH для гипотермического хранения органов.

В результате исследования определена последовательность повреждения и деградации органелл клеток печени в процессе длительного гипотермического хранения. Впервые показано, что в отличие от гомойотермных организмов, у которых выраженные изменения клеток наблюдались уже при 18–24 часах хранения, клетки фрагментов печени, взятой у гетеротермных животных в состояниях активности и пробуждения, сохраняют относительно устойчивую ультраструктуру до 24–48 часов ГХ, а животных в состоянии спячки – до 4-х суток ГХ.

Практическая значимость полученных результатов.

Экспериментально установленный высокий уровень сохранности морфологических и биохимических характеристик изолированной печени позволил обосновать целесообразность применения растворов низкой ионной силы с пониженным значением pH на основе маннита для гипотермической

перфузии и хранения органов, а также в качестве сред для хранения клеток и их подготовки для низкотемпературного консервирования. Полученные в ходе экспериментальных исследований численные значения диаметра спикул, размеров отпочковавшихся везикул, а также изменения площади поверхности в ходе сферо-эхиноцитарной трансформации эритроцитов могут быть использованы для построения теоретических моделей данного процесса. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы при разработке новых и усовершенствования существующих способов низкотемпературного консервирования биологических объектов различного уровня организации.

Личный вклад соискателя. Диссертация является самостоятельным законченным исследованием. Автору диссертационной работы принадлежит выбор темы, определение цели и задач исследования, методологических основ ее выполнения. Соискателем лично получены экспериментальные данные во всех разделах исследований, проведена их статистическая обработка. Автором работы самостоятельно проанализированы полученные результаты и сформулированы выводы. В совместных научных работах и публикациях личный вклад соискателя заключается в следующем: определении цели и задач проведения экспериментов, непосредственном проведении электронно-микроскопических исследований и анализе результатов, формулировании выводов (работы, указанные в автореферате [1–6, 8, 10–14, 33]), в разработке методического подхода и технического обеспечения метода замораживания-скалывания (работы [9, 32]), проведении электронно-микроскопических экспериментов, обобщении результатов и формулировании механизма спикулообразования (работы [18, 23, 30]), в формулировании идеи и методологии постановки экспериментов, непосредственном проведении микроскопических исследований, обработке и обобщении данных (работы [7, 15–17, 19–22, 24–29, 31])

Автору работы непосредственно принадлежит ряд разработок, технических новшеств и внедрений, позволивших адаптировать классические

электронно-микроскопические методы для решения задач криобиологии: разработана и изготовлена установка для низкотемпературного метода замораживания-скалывания [А.с. (СССР) № 1157597]; система измерения и регулирования температуры (до -196°C) на основе высокоточного кварцевого двухчастотного автогенераторного преобразователя температуры ДАП ТЦ-05 [Репин Н.В., 2001].

Внедрены совместно с АО "Selmi" система съема и анализа изображения САИ - 01А (для электронного микроскопа ПЭМ-125-К); совместно с ПКФ «SEO Image Lab» (г. Сумы) – сертифицированная система цифрового вывода изображения на монитор компьютера и программа обработки изображения (для РЭММА-101А).

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на конференциях «Криогенные методы в электронной микроскопии», (Пушино, Россия, 1985, 86; доклад); Международной конференции "Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины" (Харьков, 1988; доклад); Всесоюзной конференции "Структурная динамика биологических мембран и ее роль в регуляции фотобиологических и рецепторных процессах" (Минск, Белоруссия, 1988); IV Республиканской конференции по электронной микроскопии «Электронная микроскопия и современная технология». (Кишинев, Молдавия, 1990); VII Международном симпозиуме "Проблемы низкотемпературного консервирования клеток, тканей и органов" (Берлин, Германия, 1991); II Международной конференции "Успехи современной криобиологии" (Харьков, 1992; доклад); XIV конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, Россия, 1992); конференции "Новые приложения морфометрии и математического моделирования в медико-биологических исследованиях" (Харьков, 1990); I съезде Украинского общества криобиологии и криомедицины (Харьков, 1995; доклад); VI Международной конференции по тканевым банкам (Эдинбург, Англия, 1997); 28, 30, 31, 33, 36 – Международных совещаниях по криобиологии

«Cryo» (Leuven, Бельгия 1991; Атланта, США, 1993 (доклад); Киото, Япония, 1994; Индианаполис, США, 1996; Марсель, Франция, 1999; Эдинбург, Великобритания, 2001); 3 съезде Белорусского общества фотобиологов и биофизиков «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, Беларусь, 1998); II Національному конгресі АГЕТ України «Актуальні питання морфології» (Луганск, 1998); 3-м Всероссийском симпозиуме (с международным участием) «Физиологические механизмы природных адаптаций» (Иваново, Россия, 1999); I-IV съездах «Украинского биофизического товарищества» (Киев, 1994; Харьков, 1998; Львов, 2002; Донецк, 2006); 15th-17th Meetings of the European Association for Red Cell Research (Murten, Швейцария, 2005; Oxford, Англия, 2007; Milan, Италия, 2009); Научно-технической конференции «Актуальные вопросы теоретической и прикладной физики и биофизики» (Севастополь, 2006); научной конференции «Гіпобіоз – фундаментальні та прикладні аспекти» (Київ, 2007, доклад); научной конференции «Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия» (Пушино, Россия, 2008, доклад); научной конференции «Новые криотехнологии для решения фундаментальных и прикладных задач медицины» (Харьков, 2008, доклад); XXI съезде Физиологического Общества имени И.П. Павлова (Москва–Калуга, Россия, 2010); Международной научной конференции «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины» (Харьков, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 32 статьи, в том числе, в ведущих отечественных (22) и зарубежных (5) журналах, 5 – в тематических сборниках и 30 тезисов докладов на конференциях. Результаты диссертации опубликованы в главах 2-х коллективных монографий.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы «Материал и методы исследования»; 7 глав собственных исследований (267 стр.), заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 355 страницах и содержит 103 фото- и 41 графический рисунок, 7 таблиц, 4 схемы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Роль гипотермии и гипобיוза в сохранении морфо-функционального статуса клеток и тканей.

1.1 Процессы и структурные перестройки в клетках и их мембранах при гипотермии.

Известно, что внутренние защитные механизмы клетки способны обеспечить ее сохранность при кратковременном, негативном воздействии [19], в то же время при длительном воздействии даже незначительные изменения в структуре клетки, суммируясь во времени, способны привести к качественной и количественной трансформации ее состояния.

Наиболее простым способом замедления биохимических процессов в живой системе является снижение ее температуры до околонулевых значений [20]. В этих условиях экспоненциальная зависимость кинетики ферментативных реакций при снижении температуры явилась основным принципом использования гипотермии для хранения различных биологических объектов [21, 22]. Такой способ сохранения клеток и тканей (глубокая гипотермия) относится к классическим методам и известен достаточно давно [23, 24]. Однако, при гипотермии помимо снижения температуры существенным фактором, оказывающим влияние на состояние биологических объектов, является и длительность экспозиции в условиях, отличающихся от физиологической нормы.

Особенность гипотермического хранения заключается в том, что оно не предотвращает полностью энергообмен, а метаболические изменения и структурные перестройки в исследуемом образце продолжают развиваться и при таком снижении температуры, формируя в ткани предпосылки для аутолитических процессов. То есть наличие жидкой фазы обеспечивает сохранение условий для протекания в клетках комплекса процессов, в том числе и неблагоприятных, затрагивающих перераспределение ионов, метаболитов и оказывающих влияние на состояние клеточного гомеостаза. В

то же время гипотермия, вызывая замедление метаболических процессов, замедляет и процессы аутолиза в клетках [25–27].

Основным и пусковым фактором, вызывающим аутолитические изменения в клетках, является прекращение или ограничение доставки кислорода в ткани, что приводит к нарушению непрерывно протекающих окислительно-восстановительных процессов [21, 25, 28]. Последовательность событий, происходящих при удалении биологического объекта из естественного кровоснабжения, сопровождается быстрым снижением концентрации кислорода в тканях до нулевого уровня, развитием гипоксии клеток и, как следствие, переходом к гликолизу – анаэробному пути получения энергии [29–31]. Предполагается также, что именно недостаток кислорода может вызывать активацию гидролитических процессов, которые в обычных условиях существования биосистемы выражены слабо, поскольку дыхательное фосфорилирование обеспечивает достаточно высокий уровень содержания АТФ [32, 33].

Одним из наиболее ранних проявлений негативного действия гипотермии является нарушение регуляции осмотического давления в клетке. Связано это с нарушением работы транспортных систем, обеспечивающих физиологический уровень асимметрии электролитов между клеткой и внешней средой, в условиях ишемии и пониженной температуры. Происходящее в этих условиях неизбежное ингибирование активности ионных транспортных систем (K^+/Na^+ АТФ-азы и других) на фоне менее выраженной температурной зависимости диффузионных процессов (нами показано на эритроцитах зимоспящего суслика и донора для такого функционального параметра, как водная диффузионная проницаемость [34, 35]) может приводить к неспособности мембраны клеток обеспечивать ионную асимметрию и, как следствие, выравниванию мембранного потенциала клеток для ионов K^+ , Na^+ и др. [36–39].

Подтверждением этому явились данные работы, в которой инкубация печени в нормальном растворе Krebs-Ringer вызывала в клетках

существенное увеличение концентрации натрия и уменьшение калия в отличие от инкубации в других растворах. Авторы отмечают, что концентрация натрия, калия и хлора в клетках практически следует за концентрацией этих элементов в растворах хранения, свидетельствуя, что их внутриклеточная концентрация в течение хранения полностью зависит от диффузионных процессов, тогда как концентрация кальция не зависела от вида используемого раствора [40].

Проблема обеспечения работоспособности энергозависимых АТФ-аз при гипотермии уже более двух десятков лет обсуждается в литературе, и далее констатации этапов возможного развития событий она не решена. Хотя еще в работе D. Pegg с соавторами в 1981 было отмечено, что наиболее ранним изменением, происходящим при гипотермическом хранении клеток, является их набухание, связываемое с нарушением функции их мембраны, регулирующей ионно-водный баланс [41]. По мнению авторов, вначале происходят внутриклеточное накопление воды и электролиз, обусловленные нарушением функции энергозависимой K^+ - Na^+ -АТФазы в клеточной мембране.

Такое перераспределение K^+ и Na^+ при гипотермии приводит к увеличению объема клеток, связываемое с развитием внутриклеточного отёка [21, 42] и [43]. Следует отметить, что набухание клетки, вызванное перераспределением потоков ионов K^+ , Na^+ и воды, является ранним и обратимым результатом повреждения клетки [44–47]. Вполне естественно, что аналогичные изменения во внутриклеточных концентрациях будут происходить и для других электролитов, таких как Cl^- , Ca^{2+} и Mg^{2+} , поскольку их концентрации также поддерживаются активностью энергозависимых процессов в клеточной мембране [48].

В ряде работ отмечается существование корреляции между возрастанием объема клеток и сохранением их жизнеспособности при гипотермии [49]. В частности, 24-часовое хранение гепатоцитов в растворе UW вызывало увеличение их объема на 30-40% и потерю клетками до 60%

фермента ЛДГ. Нарушение проницаемости клеток для одновалентных ионов является основной причиной их ранних повреждений при гипотермическом хранении. Изменения концентрации электролитов могут привести к хаотически меняющейся электрической активности и ингибированию ферментов. Увеличение объема клетки, вызванное притоком ионов натрия и воды [43], сопровождается также набуханием ее цитоплазматических органелл, что в значительной степени может влиять и влияет на сохранение клеткой жизнеспособности.

Рассмотрим более подробно структурные проявления набухания клеток и их органелл. Значительное внимание в литературе уделяется функциональному состоянию митохондрий как структур, играющих важнейшую роль в обеспечении энергетического состояния клетки [1, 2, 21, 50–52].

В настоящее время установлено, что основная функция митохондрий связана с сопряжением синтеза АТФ и аэробного окисления ряда метаболитов – окисление веществ в цикле Кребса, перенос электронов и окислительное фосфорилирование. Митохондриальное набухание, которое является общим признаком повреждений при неблагоприятных воздействиях различных типов, вызывает физическое разобщение окислительного фосфорилирования [28].

Вполне естественно, что, занимая определенное пространственное расположение в структуре митохондрий, ферментные системы, в свою очередь, связаны с определенными участками их мембран [44]. Считается, что сохранность структуры крист является структурной предпосылкой функционирования ферментов цикла Кребса, а сохранность трех слоев мембраны – одно из условий выполнения функции сопряжения. В частности, ферменты процессов переноса электронов и окислительного фосфорилирования связаны с внутренней мембраной, а ферменты, участвующие в обмене аминокислот, связаны с матриксом митохондрий.

Митохондрии, являясь одной из наиболее чувствительных к внешним воздействиям органелл клетки, рассматриваются обычно как индикаторы ее функционального состояния [31, 52]. Набухание митохондрий характерно для всех типов клеток и в той или иной мере наблюдается в миокарде при сердечной недостаточности [53], а также при многих инфекционных [54], гипоксических [55, 56], токсических и других патологических состояниях [53]. Как правило, набухание митохондрий возникает в результате увеличения проницаемости внутренней мембраны и сопровождается проникновением воды во внутренний объем органеллы. Следствием этого является разглаживание и фрагментация крист. В пользу этого свидетельствуют данные работы [57], в которой показано, что падение уровня внутриклеточного АТФ, выход цитохрома С и образование пор проницаемости связаны с повреждением дыхательной цепи митохондрий при гипотермическом хранении (ГХ) и последующей нормотермической реперфузии (НТРП) печени крыс.

При отсутствии функционирующей дыхательной цепи острая гипоксия вызывает переключение работы митохондрий с продукции АТФ на его потребление, которое осуществляется H^+ -АТФазой, и направлено на поддержание протонного градиента на внутренней мембране митохондрий [58–60].

Одним из наиболее ранних изменений в структуре митохондрий является увеличение числа плотных гранул митохондриального матрикса. Существует несколько мнений о структуре гранул. Предполагалось, что в норме гранулы, имеющие размер до 30–40 нм, являются местом аккумуляции дивалентных катионов. Однако электронно-микроскопическим методом негативного контрастирования было установлено сходство их структуры со структурой мембраны, что позволило предположить наличие в их структуре кроме кальция, магния, фосфора еще и липопротеидов [44].

Раннее исчезновение гранул матрикса митохондрий, связываемое и с истощением запасов АТФ, является отображением угнетения и прекращения

окислительного фосфорилирования. Гипертрофия этих гранул, выявляемая при ишемии миокарда, а также в гепатоцитах при различных интоксикациях, свидетельствует о перенасыщении клеток ионами кальция.

Изменение структуры крист митохондрий отражается, как правило, на их форме, размерах и количестве: изменение формы и уменьшение их числа – признак снижения функциональной активности клетки, тогда как увеличение числа крист – свидетельство ее возрастания [61].

Хотя митохондрии и относятся к достаточно стабильным структурам, в клетках происходит их постоянное обновление. Одним из первых признаков необратимого изменения клетки, ее аутолиза (гибели) является вакуолизация митохондрий.

Эндоплазматический ретикулум, его объемная доля зависит от функционального статуса клетки. Гепатоцит обладает хорошо развитой системой ЭПР в отличие от клеток Купфера, в которых он практически отсутствует. Обладая биосинтетической и транспортно–распределительной функцией, ЭПР является информативным тестом на протекание в клетке различных патологических процессов [51]. При набухании эндоплазматического ретикулума, в первую очередь происходит отделение рибосом, что является свидетельством нарушения важнейшего параметра клеточного обмена – синтеза белка. В этих условиях рибосомы часто образуют хорошо очерченные «геометрические» фигуры, имеющие вид спирали и характерные для клеток, находящихся в условиях гипотермии, кислородного голодания и дефицита белка в организме. Следующим за набуханием является этап фрагментации и везикуляции «канальцев» ЭПР, приводящий к нарушению взаимосвязи между цитоплазматической мембраной и ядром, митохондриями, комплексом Гольджи. Нарушение взаимодействия эндоплазматической сети с пластинчатым комплексом Гольджи сопровождается редукцией (уменьшением) вакуолей и потерей секреторных гранул, что свидетельствует о снижении его функциональной активности.

Вязкость цитозоля (в морфологической трактовке – плотность цитоплазмы) отражает количество содержащихся в ней филаментов. Уменьшение плотности цитозоля в процессе ишемии является одним из критериев снижения или прекращения белкового синтеза, а также проникновения в цитоплазму воды из внеклеточного пространства.

Характерной реакцией ядра клеток, ее первичным проявлением на различные воздействия, в том числе и на гипотермию, является конденсация и уплотнение структуры хроматина (гетерохроматин) в примембранной области ядра в виде узкой, различной ширины полосы [19, 62– 64].

Наш опыт, а также данные многих авторов указывают на более высокую, устойчивость к ишемии мембран лизосом. Во многом это связано с тем, что лизосомальные ферменты включаются в процессы клеточного повреждения на стадии необратимых изменений, на этапе начала гибели клетки [21, 32, 40]. Справедливость этого утверждения вытекает из данных о том, что оптимум активности ферментов – фосфолипаз, приходится на значения pH 5,0–3,5 в кислотной области и больших 8,0 в щелочной, что реализуется при крайне длительных сроках ишемии или в случае гибели клеток и органа. В частности, нарушение мембраны лизосом может вызвать выход их ферментов в цитоплазму и, как следствие, повреждение жизненно важных органелл и внутриклеточных молекул. Хотя однозначности в этом вопросе нет, не исключается участие лизосом при НТРП и после этого этапа в восстановлении обратимо поврежденных клеток.

Необходимо также учитывать влияние на функциональное состояние клеток фазовых переходов липидов и их латеральное разделение при околонулевых температурах, температурно-зависимой агрегации белков, приводящих к образованию дефектов в мембране и, как следствие, нарушению проницаемости липидного бислоя [10]. Эти факты обусловлены изменением физико-химических свойств липидов бислоя и являются причиной усиления при ишемии и реперфузии проницаемости мембран для воды, ионов.

Таким образом, отмеченные выше структурные перестройки, протекающие в биологических объектах при гипотермии и ряде других воздействий, являются морфологическими маркерами процессов, происходящих в клетках и приводящих к нарушению в них структурно-функциональных взаимосвязей.

В литературе широко обсуждаются процессы, происходящие в клетках при ГХ. В абсолютном большинстве работ о состоянии ткани, клеток при хранении судят по таким функциональным, интегральным показателям как окислительное фосфорилирование, дыхательный контроль, уровень АТФ и соотношение АТФ/АДФ, активность ферментов и т.п. [28, 65].

Происходящее в процессе ГХ прогрессирующее ухудшение метаболических свойств клеток неизбежно должно отражаться на состоянии их ультраструктуры. Однако, несравнимо меньшее количество работ, выполненных на ультраструктурном уровне, противоречивость получаемых данных часто приводит к несогласованности результатов с данными биохимических исследований, что в некоторых случаях не дает возможности создать цельного представления о структурно-функциональных перестройках, развивающихся в клетках и тканях в процессе ГХ. Вполне естественно, что результаты работ, выполненных с использованием биохимических методов [1, 2, 26, 66–72], нуждаются в их более тщательном анализе с привлечением ультраструктурных данных [64, 73]. Во многом это связано с более распространенным применением методов гистологии в морфологических исследованиях, фиксирующих более поздние, проявляющиеся на тканевом уровне, нарушения, что приводит к упрощенному описанию внутриклеточных структурных изменений, имеющих место при гипоксии.

Известно, что структурный гомеостаз печени обеспечивают в основном: паренхиматозные клетки – гепатоциты и непаренхиматозные – клетки Купфера, эндотелия печёночного синусоида и др. Вполне естественно, что все эти клетки принимают непосредственное участие в

развитии ишемически–реперфузионных повреждений органа, однако, их вклад зависит как от типа клеток, так и от ряда факторов, например, от их локализации в органе, сроков ГХ и последующей реоксигенации.

При анализе состояния клеток ткани печени необходимо учитывать т.н. явление зональности ее структуры. Гепатоциты из околопортальных (афферентных) и околососудистых (эфферентных) зон печеночных долей отличаются метаболическими свойствами и ультраструктурой. Это связано с системой кровотока и наличием градиента кислорода в направлении от околопортальной к околососудистой части ткани и неодинаковым снабжением субстратами. Благодаря этому в околопортальной зоне локализованы гепатоциты с более выраженным аэробным окислительным метаболизмом. Для них характерны: окисление жирных кислот, катаболизм аминокислот, глюконеогенез. В околососудистой области в гепатоцитах преобладают гликолиз, липогенез и биотрансформация эндогенных и чужеродных соединений. Таким образом, зональная гетерогенность гепатоцитов – явление динамичное. Она может модифицироваться в зависимости от функционального состояния клетки.

В ряде работ было показано, что клетки эндотелия обладают большей чувствительностью к холодовой ишемии, чем паренхиматозные [74, 75]. В силу своих морфологических особенностей они в первую очередь подвергаются отслаиванию от стенок сосудов, что может быть причиной нарушения микроциркуляции во время ГХ и при НТРП [76, 77]. Это, по мнению авторов, позволяет рассматривать эндотелиальные клетки в качестве основной мишени и при последующей реперфузии. Как считают авторы работы [78], уже на первых минутах НТРП происходит почти полное отслаивание эндотелиальных клеток в процессе «тепловой» реперфузии и их гибель [76, 79]. Эндотелиальным и гладкомышечным клеткам сосудов отводится также существенная роль в продуцировании АФК в результате активации НАДН- и НАДФН-зависимых оксидаз, способных продуцировать супероксид анион ($O_2^{\cdot-}$) [80].

Существенные изменения в морфологии эндотелиальных клеток в виде клеточной культуры, подвергнутой охлаждению и 30 часовому хранению, отмечены в работе [73]. В их ультраструктуре при гипотермии/нагреве наблюдались отслоение мембраны и появление пузырей (blebbing), уплотнение хроматина и всего ядра. Подобные изменения отмечены и у выделенных гепатоцитов при аналогичных условиях воздействия. Возникновение и степень этих изменений зависели от продолжительности холодового инкубационного периода.

Важную роль в развитии ишемически-реперфузионных повреждений играют макрофаги печени – клетки Купфера. Активированные гипоксией клетки Купфера становятся источником АФК в процессе реперфузии [80]. Продуцируемые ими радикалы кислорода и цитокины имеют прямое цитотоксическое действие на эндотелиальные клетки и гепатоциты.

Для паренхиматозных клеток важными последствиями действия гипотермии являются, как уже отмечалось, нарушение баланса активного и переход на диффузионный транспорт ионов, определяемый барьерной функцией мембран для катионов и анионов. Происходящее при этом нарушение ионного гомеостаза является причиной дестабилизации лизосомально-протеазных комплексов, непосредственно связано с величиной внутриклеточного pH, но и оказывает влияние на форму и объем клеток, изменяет, угнетает синтетические процессы в них [81].

Известно, что большинство внутриклеточных процессов протекает за счет универсального источника энергии – АТФ, который может образовываться в реакциях субстратного фосфорилирования в цитоплазме и при окислительном фосфорилировании в митохондриях. Понятно, что наличие этого макроэрга в клетках органа является необходимым условием сохранения ими жизнеспособности. Исследование ишемически–реперфузионных повреждений показало, что одной из основных причин нарушения функции органа является нарушение клеточного энергетического

метаболизма, сопровождаемого снижением пула внутриклеточных макроэргов и дисфункцией митохондрий [55, 82–86].

Несмотря на то, что высокий уровень АТФ в органе после хранения коррелирует с его способностью к функциональному восстановлению, тем не менее, исчерпание пула АТФ ещё не служит абсолютным критерием потери жизнеспособности [84]. Как известно, низкая концентрация АТФ в клетках органа тесно связана с низкой выживаемостью реципиентов после трансплантации. В любом случае, вопрос энергетического метаболизма органа в процессе ГХ и НТРП требует пристального внимания и детального изучения.

По интенсивности протекающих процессов, по степени влияния на структуру биологических объектов следует разделять гипоксию «высокотемпературную», когда клетки и ткани длительное время находятся при околофизиологических температурах (нарушение кровоснабжения тканей органа при ишемии, в составе трупа, и т.п.) и «гипотермическую» гипоксию выделенных клеток и тканей, находящихся при 4⁰С.

Наиболее подробно морфологические и ультраструктурные аспекты действия гипоксии при околофизиологических температурах (36–20⁰С) изложены в ряде монографий [21, 25, 51, 62] и статей [78]. Общая закономерность, отмечаемая многими авторами, свидетельствует, что в этих условиях кратковременное (15 мин.) прекращение дыхания и кровообращения органа вызывает ультраструктурные перестройки в клетках, степень выраженности и обратимости которых зависит от конкретных условий. В частности, уже через 15 мин после декапитации животного в печени, находящейся в составе трупа, у значительной части клеток печеночных синусоидов происходит изменение поверхности клеток, проявляющееся в исчезновении мембранных выростов и складок, уменьшении пиноцитозных пузырьков [51]. Видимые изменения затрагивают также структуру матрикса ядра и митохондрий, цистерны и каналы ЭПР и комплекса Гольджи.

При холодовой ишемии и недостатке кислорода для нормальной работы дыхательной цепи митохондрий происходит нарушение переноса электронов, смещение окислительно-восстановительного равновесия в сторону восстановленных соединений, а также блокируется работа цикла трикарбоновых кислот и нарушается процесс окислительного фосфорилирования [84, 86]. В этих условиях в цитоплазме накапливается НАДН и увеличивается в несколько раз соотношение НАДН/НАД⁺ [86, 87]. Как уже упоминалось ранее, в условиях гипоксии в клетках активируется анаэробный гликолиз, за счёт которого некоторое время поддерживается уровень АТФ. Накопление его конечного продукта – лактата, вызывающего снижение внутриклеточного рН, а также истощение в процессе холодового хранения основного субстрата – гликогена, приводят к ингибированию гликолиза. Изменение в условиях гипоксии клеточного метаболизма при переходе от аэробного гликолиза к анаэробному приводит к нарушению метаболической функции клеток. Образующийся при распаде углеводов пируват в условиях отсутствия кислорода превращается в молочную кислоту, которая дальше уже не распадается [88]. Результатом такой перестройки является возрастание объемной доли молочной кислоты, вызывающей понижение внутриклеточного рН, стимулирующего конденсацию хроматина в ядре и изменение нативной структуры мембраны, которое в случае нарушения мембраны лизосом может вызвать выход их ферментов в цитоплазму и, как следствие, повреждение жизненно важных органелл и внутриклеточных молекул.

Считается, что метаболический ацидоз, происходящий при гипотермическом хранении, приводит к увеличению проницаемости мембраны для ионов Н⁺, выход которых из клетки ведет к закислению внеклеточной среды. На этапе реперфузии происходит более быстрое восстановление до нормального уровня величины рН, чем количества АТФ. Этот дисбаланс называемый «рН-парадоксом» вызывает рН-зависимое открытие пор высокой проводимости во внутренней мембране митохондрий

и как следствие ее деполяризацию, разобщение окислительного фосфорилирования и набухание органелл, что приводит к ускорению летальных повреждений клеток [89, 90]. Показано, что митохондриальный ацидоз подавляет открытие таких каналов. Этот "рН парадокс" доказывает, что закисление внутриклеточной среды в процессе истощения запасов АТФ является адаптивным механизмом, препятствующим развитию некротических изменений клетки. Этим можно объяснить цитопротективный эффект ацидоза. Возможно, это связано с ингибированием ферментов деградации (фосфолипазы, кальпаины и др.), оптимум рН которых находится в нейтральной среде. Фиалуридин оказывает гепатотоксический эффект через связывание с митохондриальной ДНК гепатоцитов [91].

В заключение кратко остановимся на таком явлении клеточного повреждения и гибели как апоптоз. В последние годы апоптозу отводят ключевую роль в гибели клеток при ишемии/реперфузии [92–94]. Показано, что ГХ печени инициирует апоптоз 40–60 % гепатоцитов и 50–70 % эндотелиальных клеток печёночного синусоида [93]. Возрастание числа гепатоцитов, подвергшихся апоптозу, отмечается на этапе реперфузии и при трансплантации органа. Ведущая роль в апоптотической смерти клеток принадлежит митохондриям.

Установлено, что холодовая ишемия и последующая реперфузия вызывают повреждение дыхательной цепи митохондрий, увеличение проницаемости внутренней мембраны митохондрий, вызванное реоксигенацией, падение мембранного потенциала и их набухание [90]. Снижение уровня внутриклеточного АТФ, образование пор проницаемости, выход цитохрома *c* и активация каспаз, инициирующих каскад реакций, приводящих к апоптозу клеток [95], – примерная последовательность событий, развивающихся в клетке.

Таким образом, большинство патологических процессов в изолированных клетках и в ткани, вызванных гипоксией и длительной гипотермией, наряду с изменениями ультраструктуры сопровождаются

нарушениями нормального функционирования митохондрий и потерей ими ряда функций, таких как способность поддерживать электрохимический градиент ионов водорода на внутренней мембране и окислительное фосфорилирование. Ультраструктурные изменения затрагивают практически все органеллы клетки, включая цитоплазматическую мембрану, а также ее компоненты, ответственные за межклеточное взаимодействие.

1.2. Среды для гипотермического хранения биологических объектов.

Состав сред для гипотермического хранения и перфузии по своим свойствам должен приближаться к межклеточной жидкости, чтобы обеспечить максимальное сохранение метаболических свойств органа, присущих ему *in vivo*. Они должны обладать достаточным онкотическим давлением, необходимым ионным набором, обеспечить поддержание физиологических значений pH, оксигенации и т.п.

Многочисленные работы подтверждают, что такие среды, как раствор Хенкса, Рингера, Кребс-Хенселейта, Тироде и другие, могут быть взяты за основу при выборе состава перфузата.

Наиболее адекватными являются бикарбонатные буферы, которые, однако, эффективны лишь при насыщении 5 % CO₂. Постоянство pCO₂ среды выделения (или инкубации) существенно для процессов глюконеогенеза при использовании лактата, синтеза мочевины и для некоторых других функций гепатоцита. Смеси NaHCO₃ и NaCO₃ обладают способностью поддерживать стационарный уровень pCO₂ растворов и поэтому входят в состав многих буферов.

В настоящее время общепризнанным консервирующим раствором является среда Университета Висконсин (UW) [24, 40, 96]. Её использование позволило увеличить сроки безопасного хранения печени в клинической практике до 16-20 часов, что привело к снижению посттрансплантационных осложнений. На сегодняшний день этот раствор признан «золотым

стандартом» и широко применяется в клинике при трансплантации различных органов и тканей [40, 97, 98], хотя ведутся работы по усовершенствованию состава раствора UW. Эта среда оказалась эффективной как для хранения целых органов (сердце, печень, почка, поджелудочная железа) так и изолированных клеток (гепатоциты) [99]. Она содержит в своём составе непроникающие осмотически активные компоненты, предотвращающие набухание клеток в период холодового хранения [100], а также метаболически активные вещества, участвующие в сохранении нормального метаболизма органа.

В ИПКиК НАНУ достаточно много внимания уделялось разработке растворов, сред для хранения клеточных суспензий и органов на основе сахарозы [1, 2, 101]. Сотрудниками нашего института выполнен цикл работ, в которых исследовалась эффективность нескольких типов сред для хранения гепатоцитов при 4°C: натрий-содержащие среды, раствор Кребса-Рингера, среда 199; калий-содержащие среды – раствор Коллинза (115 мМ K⁺) и среда, содержащая 145 мМ K⁺; сахарозосодержащие среды – изотонический раствор сахарозы и среда, содержащая 0,125 М сахарозы и 0,075 М хлористого натрия [1, 66, 68, 102].

Было установлено, что натрий- и калий-содержащие растворы неэффективны для длительного хранения гепатоцитов при 4°C. Среда, содержащая сахарозу, были более благоприятными для хранения клеток печени в этих условиях [66, 67]. Наиболее эффективной средой оказалась среда, содержащая 0,25 М сахарозы. Различия выявлялись через 2 суток хранения и резко нарастали на 3-и и 4-е сутки хранения. К концу 4-х суток хранения в среде, содержащей 0,125 М сахарозы и 0,075 М хлористого натрия, клетки теряли жизнеспособность, в то время как хранение клеток в изотонической сахарозной среде сохраняло жизнеспособными до 50% гепатоцитов.

Был разработан и апробирован консервирующий сахарозо-содержащий раствор (ССР) [1, 102]. Исследования энергетического состояния печени при

ГХ в ССР и UW позволили сделать вывод о том, что ССР по своей эффективности не уступает раствору UW [68, 103]. Это свидетельствует, по мнению авторов, о перспективности применения данной среды для перфузии органов. Вместе с тем, отмеченное ограничение сроков хранения органа требует усовершенствования растворов для ГХ печени и остаётся актуальной проблемой.

Подтверждением сказанному являются данные о том, что высокие концентрации сахарозы (более 0,25 М) вызывают патологическое набухание внешней мембраны митохондрий аналогично тому, как это имеет место в изолированных митохондриях.

Изучение методами световой и электронной микроскопии свидетельствовали о хорошей сохранности гепатоцитов после 8- и 12- часового хранения в растворе UW и его модификациях, с использованием Krebs-Ringer и Euro-collins, однако в нормальном растворе Krebs-Ringer наблюдалось умеренное повреждение митохондрий и набухание ЭПР [40]. Кроме того, повреждение клеток синусоидального эндотелия наблюдалось после 4 часов в нормальном растворе Krebs- Ringer и после 8 до 12 часов в других растворах.

Таким образом, проблема предупреждения повреждений, вызванных холодовой ишемией и нормотермической реперфузией органов, и продление сроков их длительного хранения, далека от своего разрешения. Существующие сегодня методы не обеспечивают достаточной сохранности и функционального восстановления органа, что определяет необходимость разработки новых комплексных подходов к продлению сроков хранения и снижению ишемически-реперфузионных повреждений печени.

1.3. Влияние условий хранения эритроцитов на морфологию и структурные перестройки в мембране.

При заготовке крови используют гемоконсерванты, которые являются первыми средами для хранения. Полноценность консервированной крови

определяется уровнем макроэргических фосфатов в ней. При разработке гемоконсервантов обращается внимание на их способность поддерживать уровни АТФ и 2,3-ДФГ, поскольку они отвечают за поддержание жизнеспособности эритроцитов и сохранение кислород-транспортной функции гемоглобина соответственно.

При заготовке крови обычно используются следующие гемоконсерванты:

Глюкозоцитратный раствор глюглицир – (ЦОЛИПК-76 без левомицетина). Состав: цитрат натрия – 2г; безводная глюкоза – 3г; бидистиллированная вода до 100 мл; pH=5,0

Гемоконсервант Л-6. Состав: цитрат натрия кислый – 2,5 г глюкоза – 3 г; сульфацил натрия – 0,5 г; трипафлавин нейтральный – 0,025г; бидистиллированная вода до 100 мл; pH= 4,9

Раствор цитроглюкозофосфата. Состав: лимонная кислота – 1 г; глюкоза безводная – 3 г; трехзамещенный фосфат натрия – 0,754%; раствор NaOH; бидистиллированная вода до 100 мл; pH = 5,7.

При заготовке крови для экстракорпорального кровообращения в последние годы с успехом применяют гемоконсервант *ЦОЛИПК-12а*. Состав: лимонная кислота – 1,5 г; глюкоза – 6 г; фосфат натрия трехзамещенный – 0,2 г; 4% раствор NaOH; вода бидистиллированная до 100 мл; pH=6,3

Следует обратить внимание на следующий факт: подавляющее большинство растворов имеет низкое, нефизиологическое значение pH от 4.9 до 6.3, и, тем не менее, практический опыт свидетельствует, что клетки при контакте с раствором, имеющим пониженное значение pH, сохраняют высокий морфо-функциональный статус.

Как только кровь покинула сосудистое русло донора и была стабилизирована и консервирована, начинаются необратимые процессы "старения" крови. Постепенно происходит снижение физиологической полноценности эритроцитов, в первую очередь страдает их кислородно-

транспортная функция, укорачивается полупериод жизни. С середины третьей недели хранения начинается спонтанный гемолиз эритроцитов. Известно, что при околонулевых температурах возрастает плотность внутриклеточного содержимого, определяемая уменьшением концентрации K^+ и незначительным увеличением Na^+ на грамм внутриклеточного гемоглобина. Это проявляется в уменьшении клеточных размеров и объема воды при постоянном содержании гемоглобина, что имеет место и в процессе физиологического старения эритроцитов [104].

В течение ГХ происходит прогрессирующее ухудшение клеточной и мембранной морфологии, метаболических свойств эритроцитов, что проявляется в трансформации клеток – набухании, их гемолизе, нарушении асимметрии ионного состава, потере мембранного материала и как следствие этого процесса – его деформируемости.

В качестве важных индикаторов повреждения эритроцитов считаются три основных процесса: экспонирование на внешней поверхности фосфатидилсерина (ФС), потеря экспрессии CD47, микровезикуляция мембраны, а также длительность восстановления и выживание клеток *in vivo* [105].

Ингибирование Na-K АТФазы вызывает перераспределение ионов Na и K. Уменьшение в процессе хранения концентрации таких метаболитов, как глюкоза, 2,3-ДФГ и АТФ, приводит к накоплению лактата и как следствие, к снижению внутриклеточного pH с 7 до 6 в течение 6 недель хранения [104]. Изменение соотношения белков 4.1a / 4.1b, являющихся частью цитоскелета мембраны эритроцита, коррелирует со сроком жизни клетки, что позволяет рассматривать это соотношение как параметр для характеристики возраста эритроцитов донора. Таким образом, во время хранения, в условиях повышенного клеточного стресса белки мембраны и цитоскелета эритроцитов подвергаются постепенным патологическим изменениям [106]. Однако, окислительный статус эритроцитарного цитоскелета, состояние гемоглобина (Hb) в зависимости от срока хранения остаются неясными.

Показано, в частности, что доля связанного с мембраной гемоглобина нелинейно зависит от длительности ГХ [107]. Так, в течение 1-9-х суток наблюдается увеличение сродства гемоглобина с мембраной (к 9-м суткам содержание мембраносвязанного гемоглобина увеличивается в 6 раз); на 12-е сутки – содержание гемоглобина резко падает, а на 15-е – снова возрастает, вероятно, из-за событий, связанных с везикуляцией. Авторы [107] связывают изменение количества мембраносвязанного гемоглобина при ГХ с событиями в мембране, а не с окислением самого гемоглобина, поскольку они не наблюдали образования метгемоглобина вплоть до 20 суток хранения.

В то же время было обнаружено повышение окислительного индекса белков цитоскелета, свидетельствующее об окислительных модификациях спектрина и других белков цитоскелета [108].

Измерения белкового профиля мембран эритроцитов, хранившихся в атмосфере кислорода, с помощью двумерного гель-электрофореза и масс-спектрометрии показали, что уже во время первых 7 суток хранения появляются низкомолекулярные 7–15 кДа фрагменты [109]. Некоторые из изменений в белках были, по мнению авторов, связаны со сдвигом в изоэлектрической точке, из-за химического окисления в результате действия реактивных форм кислорода. Идентификация белков обнаружила, что большинство модифицированных белков локализованы в цитоскелете. В частности, во время первых 7 дней хранения окислительная деградация наблюдалась преимущественно в белке полосы 4.2, в меньшей степени в белках полос 4.1 и 3, а также в спектрине. После 14 дней обнаруживались новые фрагменты в бета-актине, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе, глицеральдегид-3-фосфате, полосе 4.9 и анкирине. Продукты белок-белковых сшивок, в том числе и включающие альфа и бета спектрин, также обнаруживались при хранении. Деградация белков существенно снижалась при замене в среде хранения кислорода на гелий.

Считается, что везикуляция эритроцитов – часть повреждений, связанных с хранением [109–112]. Однако, несмотря на пристальное

внимание к этой проблеме, качественный и количественный белковый состав везикул, образующихся в течение хранения эритроцитов в банках крови, изучен недостаточно. Наиболее подробно состав везикул исследован в работе [110]. Показано, что общее содержание белка во фракции везикул и размер везикул увеличивались, но их структурная целостность снижалась во времени. Окислительный индекс везикул, высвобожденных к 21-му дню хранения, был большим, чем для теней соответствующих интактных эритроцитов, взятых в качестве контроля. Везикулы содержали агрегированный гемоглобин, белок полосы 3 и белки липидных рафтов, в том числе флотиллины. Они также содержали прокаспазы 3 и 8, каспазы 8 и 3, продукты расщепления (после 10-го дня), CD47 (после 17-го дня) и иммуноглобулин G.

Таким образом, эти данные указывают, что везикулы, высвобожденные в течение хранения эритроцитов, содержат белки липидных рафтов, окисленные или реактивные сигнальные компоненты, обычно связанные со стареющими клетками. В этой связи процессы везикуляции в течение хранения эритроцитов, возможно, предоставляют возможность им для освобождения от поврежденного или вредоносного материала [110], что, с нашей точки зрения, безусловно, является положительным моментом и может рассматриваться и как некий адаптационный процесс.

Исследование конформационного состояния гликокаликса мембран интактных и измененных эритроцитов методом спектроскопии двойного лучепреломления показало, что структура гликокаликса и анизотропия мембраны изменяются во время старения эритроцитов как *in vivo*, так и *in vitro* [113].

В настоящее время много внимания уделяется данным протеомного анализа о динамике и последовательности деградации белков мембраны эритроцитов в процессе хранения крови.

Сравнительное исследование биохимических профилей и восстановления *in vivo* клеток, хранившихся в аэробных и анаэробных

условиях, показало, что клетки, лишенные кислорода в среде хранения, имели повышенный уровень АТФ, низкий уровень свободного гемоглобина и продуктов везикуляции после 9-недельного хранения (сравнимые с контролем). В среднем более 75% посттрансфузионного выживания наблюдалось через 9 недель анаэробного хранения с менее чем 0.43% гемолиза. Этот эффект не усиливался изменением рН среды на щелочной в отличие от отмеченного ранее [114]

Неизбежной составляющей процесса старения эритроцитов *in vivo* и *in vitro* является образование маленьких (менее 1 мкм) фосфолипидных везикул, высвобождаемых в кровяное русло и вовлеченных в некоторые биологические процессы. С использованием проточной цитометрии и протеомики было показано 20-кратное увеличение их количества с 5 по 50-й день хранения при 4°C (от 3 тыс. до 65 тыс. в одном микролитре). [115]. На поверхности везикул обнаружены антигены Rh группы крови.

Одним из способов длительного хранения эритроцитов является их низкотемпературное хранение. Важным условием для конечной сохранности клеток является их исходное состояние, а также длительность их хранения до и после замораживания. В работе [105] показано, что низкотемпературное хранение само по себе не вызвало значительных изменений в экспонировании ФС, экспрессии CD47 и микровезикуляции мембраны. Однако увеличение сроков хранения после размораживания приводило к значительному увеличению в экспонировании ФС и микровезикуляции уже после суток гипотермического хранения (1-6°C) размороженных эритроцитов. Никаких значительных изменений в экспрессии CD47 не было обнаружено.

Одним из решений проблемы повышения сохранности эритроцитов при гипотермическом хранении является использование так называемых дополнительных растворов (ДР), призванных улучшить некоторые параметры клеток на определенном этапе хранения. Большинство из известных дополнительных растворов для эритроцитов не обеспечивает

поддержание постоянства уровня критических метаболитов, таких как АТФ и 2,3-ДФГ, а также рН и ионного состава во время гипотермического хранения. Известно, что внутриклеточный рН является важным определителем метаболизма эритроцитов. Авторами предложен новый, щелочной ДР для хранения эритроцитов на основе фосфат-аденин-гуанозин-глюкоза-глюконат-манитола [116, 117]. Ресуспендирование эритроцитов в этом ДР обеспечивало хорошее качество эритроцитов по таким параметрам, как внутриклеточный рН, 2,3-ДФГ, АТФ и уровень гемолиза, при хранении до 35 дней.

Однако в ряде работ отмечается, что 9-недельное хранение эритроцитов при анаэробных условиях в щелочных средах является предельным [114]. Более длительное хранение эритроцитов было достигнуто в анаэробных условиях, совмещенных с кислым и нейтральным рН дополнительных растворов и использования процедуры метаболического «омолаживания» во время хранения [114]. В частности анаэробное хранение эритроцитов в ДР с рН 6.5, после процедуры «омолаживания» на 7-й неделе хранения, приводило к восстановлению 77.3 ± 12.5 процентов клеток после 10-недельного хранения. После второй процедуры метаболического «омолаживания» на 11-й неделе восстановление отмечено у 75.9 ± 7.3 процента на 12-й неделе хранения.

Таким образом, метаболическая подпитка эритроцитов во время холодового, анаэробного хранения вызывала увеличение уровней АТФ и 2,3-ДФГ и, что важно, реэкспонирование ФС во внутренний монослой.

Анализ состава среды и условий хранения эритроцитов позволяет заключить, что анаэробные условия в большей степени способствуют сохранению АТФ и 2,3-ДФГ по сравнению с аэробными. Кислотные или нейтральные ДР лучше сохраняли АТФ, в то время, как при нейтральных и щелочных рН на более высоком уровне в течение более длительного периода сохранялся 2,3-ДФГ. Отмечается слабое влияние рН на экспонирование ФС.

Ключевая роль белка полосы 3 в поддержании структуры и функции эритроцитов хорошо исследована. Существуют ряд гипотез и представлений [118], в которых анионный обменник – белок полосы 3 играет центральную роль в поддержании эритроцитарной формы, поскольку обладает рядом свойств, необходимых для выполнения этих функций. Выяснение механизма его модификации в процессе хранения, может привести к новым подходам для поддержания клеточной целостности и концентрации АТФ [111, 112].

Рассмотрим кратко основные представления о существующих гипотезах и механизмах изменения формы эритроцитов.

Предполагается, что трансформация эритроцитов при изменении физико-химических факторов среды экспозиции связана с изменением внутриклеточного pH, величины трансмембранного потенциала, количества внутриклеточной воды, протеинизацией спектрина и изменением его изоэлектрической точки, а также изменением конформации трансмембранных белков [104].

Основные механизмы изменения эритроцитарной формы, предполагаемые [12], следующие:

1. связь внутренней поверхности липидного бислоя происходит через мембранный скелет, который состоит из комплекса протофиламентов белка полосы 4,1, связанных с тетрамерами спектрина.
2. цитоскелет связан с липидным бислоем через гликофорин С, который привязан к белку полосы 4.1, и комплекса гликофорина А и белка полосы 3 (БПЗ), который через анкирин взаимодействует со спектрином.
3. мембранный скелет – гибкая структура, которая определяет различные формы эритроцитов.

Предполагается, что сокращение и расслабление спектриновой сети обратимы и определяют форму эритроцитов через связь с белком полосы 3. Вход и выход анионов определяются, в основном, белком полосы 3, который полностью контролирует сокращение или расслабление спектрина.

Белок полосы 3 образует два домена: цитоплазматический – через анкирин и другие белки гибко связанный со спектрином, и трансмембранный – ответственный за транспорт анионов. Изменение конформации трансмембранного домена белка полосы 3 при перемещении анионов внутрь или наружу сопровождается изменением конформации и цитоплазматического домена белка полосы 3, который сокращает или расслабляет спектрин, соответственно

При воздействии различных факторов (ионной силы, pH, внедрении различных амфифильных соединений и т.д.) на мембрану происходит изменение конформации белка полосы 3, а именно, изменяется соотношение его цитоплазматического и трансмембранного домена, что непосредственно приводит к расслаблению или сокращению спектрина и в свою очередь обеспечивает высокую подвижность спектрин-актиновой сети. Предполагается, что нарушение геометрии анионного обменника также может влиять и на соотношение площадей липидных монослоев.

По мнению [14], существуют три основные гипотезы, объясняющие роль интегральных белков в стабильности мембраны:

1. Их способность связывать мембранный скелет с липидным бислоем. Предполагается, что как БПЗ, так и гликофорин служат основными якорями между белковым скелетом и липидным бислоем, следовательно свойства скелета согласуются с несжимаемым фосфолипидным бислоем. Таким образом, в этой модели периодические мостики между липидным бислоем и мембранным скелетом не только определяют морфологию эритроцитов, но и их стабильность по отношению к какому-либо воздействию. Попытки определить в этих гипотезах более детально роль модификации мембранного скелета и липид-связывающие взаимодействия БПЗ позволили оценить вклад этих модификаций в эритроцитарную морфологию, деформируемость и стабильность мембраны

2. Их способность связывать и стабилизировать мембранные липиды, а также влиять и регулировать локально мембранную кривизну.

Вторая гипотеза объясняет роль интегральных белков и их вклад главным образом в морфологию мембраны и в способность регулировать ее кривизну. Связь между интегральными белками и спектрином цитоскелета играет важную роль в этой модели, поскольку предотвращает агрегацию мембранных белков и последующую везикуляцию.

3. В третьей гипотезе мембранные белки представлены как липидные якоря, которые связывают и стабилизируют окружающие липиды и, следовательно, предотвращают их спонтанную везикуляцию.

Помещение эритроцитов в различные среды и с разными значениями pH приводит к изменению их формы. Существующие данные литературы показывают, что при pH ниже 6,0 образуются стоматоциты, а при pH выше 8 – эхиноциты [119]. Изменение формы имеет общие черты: оно происходит при физиологической температуре в течение секунд, и эти изменения обратимы при восстановлении физиологических условий среды. М. М. Gedde с соавторами показали, что при изменении клеточного pH наблюдается корреляция между концентрацией внутриклеточного хлорида и изменением формы [119].

Модель бислойного сопряжения базируется на представлении о различии в площадях липидных монослоев при избирательном встраивании амфифильных веществ в конкретный монослой мембраны. Возникающая разность площадей монослоев приводит к образованию соответствующей формы эритроцита. Механизм изменения формы, в настоящее время, может быть достаточно хорошо объяснен при внедрении экзогенных компонентов в липидный бислой и изменении его нативного распределение. Однако множество изменений форм при различных условиях не могут быть объяснены в пределах существующих моделей. К примеру, в электрическом поле эритроциты становятся эхиноцитами вблизи катода и стоматоцитами вблизи анода, что коррелирует с изменением формы эритроцитов при помещении их в растворы с высоким и низким значением pH. Изменение формы, связанное с pH, происходит за секунды [46].

Таким образом, множество изменений форм эритроцитов при действии различных физико-химических факторов не могут быть объяснены в рамках какой-либо одной из существующих моделей.

1.4. Особенности структурного состояния клеток гибернирующих млекопитающих.

Более века способность некоторых видов млекопитающих к гибернации (зимней спячке) вызывает неослабевающий интерес у широкого класса исследователей – от молекулярных биологов и генетиков до физиологов и медиков, и особенно криобиологов и криомедиков.

Зимняя спячка млекопитающих является ярким примером толерантной стратегии адаптации организма к длительному переживанию сниженной практически до нуля температуры окружающей среды и соответственно отсутствия доступа к пище за счет впадения в состояние контролируемого гипометаболизма [4, 5, 29]. Гибернация мелких млекопитающих, длящаяся 5-8 месяцев, включает два основных компонента: продолжительные оцепенения (от нескольких дней до 2-3 недель), со значительным снижением метаболизма и температуры тела, и относительно короткие периоды гомойотермного состояния. В сезон гибернации животное периодически изменяет температуру тела от околонулевой в состоянии торпора до 37⁰С при эутермии. При глубоком оцепенении общий уровень метаболизма снижается до 2-4% от нормального, при этом большинство физиологических функций прерывается, другие осуществляются, но с существенно сниженными скоростями.[5, 120] Поскольку гибернаторы в течение всего сезона гибернации периодически пробуждаются от оцепенения, у них должна постоянно поддерживаться способность функционирования при эутермических температурах. Температура тела, уровень метаболизма, сердечный ритм и другие параметры снижаются во время оцепенения до уровня, который может быть летальным для гомойотермного организма. При

этом биохимические процессы, работа органов и систем организма гибернатора перестраиваются так, что даже при очень низкой температуре тела поддерживается определенный гомеостаз [120].

Очевидно, что длительная гипотермия, гипометаболизм, гипоксия и ацидоз, резкие сдвиги физиологической и метаболической активности могут быть стрессовыми и даже летальными для клеток из-за воздействия на структурно-функциональное состояние и стабильность белков, мембран, цитоскелета, активность ключевых ферментов и пр. Поэтому гибернирующие млекопитающие вызывают возрастающий интерес и в качестве ценной природной модели развития эндогенных защитных механизмов против природно-индуцируемого стресса. Интерес к феномену гибернации определяется главным образом способностью гибернирующих млекопитающих длительно переживать сниженную температуру тела и адаптироваться к резким и значительным по амплитуде температурным и метаболическим сдвигам при периодических пробуждениях и входах в баут. Но наиболее интригующим является отмечаемая в литературе устойчивость организма спящего животного к целому ряду неблагоприятных факторов. Животное в состоянии торпора переносит без вреда для организма гипоксию, действие различных ядов, инфицирование смертельными болезнями, летальные дозы радиации [121]. Показана также устойчивость изолированных клеток и органов гибернаторов к длительному ГХ [122, 123].

Для понимания общего физиологического ответа на гипометаболическое состояние необходимы исследования реакций клеток на глубокие изменения, происходящие в организме.

Исследованию эритроцитов гибернаторов посвящены в основном ранние работы. Так, W. A. Spurrer и A. R. Dawe [124] выявили очень интересные особенности эритроцитов 13-полосного суслика. В частности, показано, что при гибернации эритроциты характеризуются повышенной осмотической устойчивостью, 40-50% клеток при 5°C имеют дискоидную «перекрученную форму» (типа кофейного зерна). Они раскручиваются при

нагреве до 37°C в плазме крови суслика, но не человека. При последующем охлаждении повторно не перекручиваются. Т.е. процесс «скручивания-раскручивания» определяется температурой и биохимическими особенностями плазмы крови гибернирующего животного. Авторы связывают наличие «перекрученных» эритроцитов с их необходимостью циркулировать в «жестких» кровеносных сосудах при очень низких температурах тела гибернатора. Кроме того, эритроциты спящего суслика при 5°C не собираются в стопки и не агглютинируют. Напротив, эритроциты человека подвержены этому, но не в случае нахождения их в плазме крови гибернирующего животного [124].

Показано также, что эритроциты хомяков и сусликов теряют внутриклеточный K^+ гораздо медленнее, чем эритроциты морской свинки при ГХ *in vitro* в течение 10 суток. В эритроцитах сусликов скорость утечки K^+ при хранении была такой же, как *in vivo* при гибернации, и такой же, как в хранившихся клетках, взятых у спящего животного [125]. Позже было установлено, что утечка K^+ через Ca^{2+} -чувствительный K^+ -й канал минимальна в эритроцитах гибернаторов благодаря эффективной регуляции уровня цитоплазматического Ca^{2+} в процессе ГХ [126].

1.4.1 Морфофункциональное состояние некоторых систем организма зимоспящих сусликов в фазе спячки.

Изучению морфологических и ультраструктурных изменений, сопровождающих физиологические перестройки организма в сезоне гибернации, посвящены немногочисленные работы. Исследование эпителиальных клеток кишечника 13-полосного суслика с помощью иммуногистохимического и гель-электрофоретического анализа выявило физиологическую индукцию моэзина – белка, связывающего цитоскелет с мембраной щеточной каемки кишечника у торпидного животного [127]. Моэзин – белок т.н. FERM-семейства, к которому принадлежит белок полосы

4.1 [128], связывающий спектрин с интегральными компонентами мембраны эритроцита и определяющий ее динамическую стабильность. Это подтверждает наши представления о важной роли цитоскелет-мембранных взаимодействий в клеточных механизмах гибернации [129, 130].

При впадении в зимнюю спячку у животных происходит подавление уровня основного метаболизма с преимущественным ингибированием АТФ потребляющих процессов, хотя активность ряда биохимических реакций сохраняется на достаточно высоком уровне. Особенностью гибернирующих млекопитающих является наличие тканевой биохимической адаптации к действию низких температур и лабильность структурных перестроек. В литературе в большей мере освещены физиологические и биохимические особенности зимоспящих животных [5, 131–134]. Структурные и гистохимические перестройки клеток, тканей и органов в системе организма изучены в меньшей степени.

Приведем краткое изложение анализа состояния органов зимоспящего суслика.

В сердце сусликов отмечаются явления дегидратации и общей физиологической атрофии миокарда, проявляющиеся в уменьшении объема и уплотнении тканей. Сократительные кардиомиоциты хромофильны, имеют, как правило, вытянутые тонкие "нитевидные" ядра, интенсивно окрашивающиеся гематоксилином. Цитоплазма содержит умеренное количество гликопротеинов и липидов. В атипичных миоцитах присутствует значительное количество гликогена. Уменьшение кровотока и спадание капилляров вызывает редукцию гемомикроциркуляторного русла и, как следствие, уплотнение ткани. Крупные кровеносные сосуды сердца кровенаполнены [5, 135, 136]. По данным гистохимии, интенсивная окраска реактивом Шиффа базальных мембран кардиомиоцитов и сосудов, а также цитоплазмы фибробластов, свидетельствует об их активном функциональном состоянии [135].

Морфологии легких в состоянии спячки практически не уделяется внимание. Во время баутов у сусликов отмечены уменьшение дыхательной поверхности легких и физиологическая редукция малого круга кровообращения. В легких отмечается гиперплазия гладкомышечных клеток сосудов. Утолщение интимы и медиа имеет место как в артериях мышечного типа терминальных и респираторных бронхиол I и II порядков, так и в стенке эластомышечных артерий, а также в междольковых и внутридольковых венах. Сосуды кровенаполнены. Строма легких богата нейтральным жиром и полисахаридными соединениями, а также макрофагальными элементами [135]. Отмечается складчатость слизистой оболочки бронхов и гипофункция небольших размеров бокаловидных клеток, содержащих гликопротеины и гликозаминогликаны. Респираторный отдел легкого характеризуется участками дистелектаза, что с большой долей вероятности позволяет расценивать это как физиологическую атрофию альвеол. Спадание альвеол, как правило, связано с пониженной выработкой большими альвеолоцитами поверхностноактивного вещества – сурфактанта [135, 137].

Селезенка спящих сусликов обычно характеризуется мощным кровенаполнением и является настоящим, в полном смысле этого слова, депо крови. Венозные синусоиды красной пульпы и ретикулярная ткань пульпарных тяжей вместе с клетками крови образовывали единый мощный резервуар. Но при этом отмечалась высокая морфологическую сохранность эритроцитов в столь полнокровном органе. Гипертрофия стенок селезеночных и трабекулярных артерий и вен, развитие эластических и гладких мышечных волокон в трабекулах и капсуле рассматривается как проявление компенсаторно–приспособительных процессов в организме животного, направленных на укрепление прочности систем. Островки лимфоидной ткани сконцентрированы в "спокойных" лимфатических фолликулах со слабо выраженным герминативным центром, но мощной фолликулярной артерией [135].

Чрезвычайно важной и мало изученной является проблема сохранения постоянства внутренней среды организма гетеротермных животных в период их пассивного пищеварения. В стенке желудка по данным гистологии определяется четыре характерных оболочки – толстая слизистая и мощная трехслойная мышечная. Покровный эпителий желудка слегка обезвожен, однороден, обильно покрыт слизью, в состав которой входят гликопротеины и гликозаминогликаны, а также липиды. В исследуемом фундальном отделе слизистая оболочка содержит "покоящиеся" простые трубчатые железы, в которых активно функционирующими являются слизистые щечные клетки. Рыхлая соединительная ткань собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы богата эластическими волокнами, неинкапсулированными лимфатическими фолликулами и плазматическими клетками [127, 138]. Отмечается кровенаполнение крупных кровеносных сосудов. Мышечная оболочка желудка находится в тонусе.

В двенадцатиперстной кишке спящих сусликов отмечается депонирование крови в мелких венах и сосудистых сплетениях слизистой оболочки и подслизистой основы богатой липидами. Микроциркуляторное русло ворсинок умеренно кровенаполнено, лимфатические капилляры сжаты, соединительнотканная основа органа уплотнена за счет легкого обезвоживания, однако клеточные элементы стромы находятся в активном состоянии. Особо следует отметить развитие популяции гладкомышечных клеток ворсинок, многие из которых берут свое начало от мышечной оболочки кишки и играют важную роль в процессе сокращения органа. В рыхлой волокнистой соединительной ткани подслизистой основы определяются многочисленные бруннуровы железы и лимфатические фолликулы, а также плазматические клетки и эозинофилы [135, 138, 139].

Энтероциты находятся в неактивном состоянии, они уплотнены, у каемчатых клеток в апикальной части сохранен гликокаликс, бокаловидные клетки бедны секретом. В целом двенадцатиперстная кишка сокращена, в

связи с чем ворсинки уменьшены в размере и приобретают листовидную форму [139].

Для почек также характерно обилие липидов, гликопротеинов и, в меньшей мере, гликозаминогликанов в соединительнотканной основе почки. Эпителиальная выстилка извитых и, особенно прямых канальцев уплотнена, уплощена, дегидратирована, просвет собирательных трубок без содержимого. Перестройка кровеносного русла наиболее проявляется в сосудах эластомышечного типа в виде глубокой складчатости волокон соединительнотканного каркаса, особенно внутренней эластической мембраны, утолщения мышечной оболочки и интимы [5, 137].

Электронно-микроскопические исследования показали, что у животных, приспособленных к холодным воздействиям в природных условиях ультраструктурная организация печени в разные периоды года имеет существенные различия [140]. Авторы отмечают, что высокий энергетический потенциал печени, обусловленный большими резервами гликогена, и возросшей мощностью митохондриального аппарата является по-видимому, закономерным для гетеротермов и может рассматриваться как один из важнейших параметров адаптации. Биохимическими методами установлено, что в период спячки в печени и миокарде достоверно повышается содержание гликогена, соответственно, на 72 и 48% по сравнению с активным состоянием, а при пробуждении снижается. Авторы полагают, что пополнению запасов гликогена вследствие гликонеогенеза могут способствовать периодические пробуждения.

Таким образом, морфо-функциональное состояние ряда внутренних органов длиннохвостых сусликов, находящихся в периоде оцепенения, характеризуется ситуационной перестройкой кровообращения, изменением реологических свойств крови, появлением большого количества капилляров "закрытого" типа и полнокровием депонирующих сосудов [135, 138, 140]. Выраженные обезвоженность тканей и общая физиологическая атрофия органов со снижением реактивности клеток паренхимы и ее сохранением у

стромальных элементов ткани, а также накопление запасов гликопротеинов и липидов во всех изучаемых системах – типичная картина тканей для состояния спячки.

Краткий анализ состояния ряда органов гибернирующих животных свидетельствует об описательном характере морфологии органов. Молекулярно-клеточные механизмы структурных перестроек в клетках и их мембранах исследовались в гораздо меньшей мере

Млекопитающие гибернаторы представляют уникальную возможность для изучения природной «версии» хранения органов. Несмотря на недостаточное количество исследований в этом направлении, перспективность и актуальность его несомненна. Предварительные исследования показали, что почки суслика, находившегося в состоянии оцепенения, более устойчивы к 3-дневному ГХ (что определялось по выживаемости животного после трансплантации) по сравнению с почками нормотермического суслика, крысы или кролика [2]. S. L. Lindell с соавторами [123] исследовали устойчивость печени к холодовой ишемии-тепловой реперфузии в растворе UW. Было установлено, что в печени крыс и летних сусликов наблюдались значительные клеточные повреждения, определяемые по высвобождению печеночных ферментов и снижению желчеобразования, уже после 48 часов ГХ. В то же время печень торпидного суслика обнаруживала минимальные повреждения после 96 часов ГХ в UW. При использовании последующей тепловой реперфузии печень торпидного животного характеризовалась лучшим поддержанием митохондриального дыхания, желчеобразования и жизнеспособности синусоидальных выстилающих клеток, а также снижением сопротивления сосудов и фагоцитоза клеток Купфера после 72 ч ГХ. Повышенная устойчивость синусоидальных эндотелиальных клеток к ГХ-НТПП, по мнению Н. Carey с соавторами [5], может быть одним из механизмов повышенной толерантности печени торпидных животных к снижению температуры.

Таким образом, все вышеизложенное говорит о том, что сформированный в ходе эволюции механизм регулируемого гипометаболизма, свидетельствует о больших компенсаторных возможностях биологических систем. Несмотря на кажущуюся в этом смысле уникальность феномена гибернации, данные о том, что новорожденные человека, как и других млекопитающих, также отвечают гипометаболической реакцией на гипоксию [141], повышают общебиологическое значение исследований механизмов гибернации особенно на молекулярно-мембранном уровне. Кроме того, расшифровка молекулярных основ природного торпора (явления глубокого подавления интенсивности жизненных процессов) гибернирующих млекопитающих имеет важное прикладное значение, предлагая стратегии для решения проблем клинической медицины, включая устойчивость к гипотермии и ишемии, индуцированный регулируемый гипометаболизм, предотвращение мышечной атрофии, долгосрочное гипотермическое хранение клеток и органов, проблем геронтологии [2, 120, 142, 143]

.

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования. Материалом для исследования служили эритроциты зимоспящих сусликов *Citellus undulatus*, крысы, кордовой и донорской крови человека, заготовленной на среде «Глюгицир», а также фрагменты плаценты человека, печени крыс и зимоспящих сусликов. Перфузию проводили на целой печени крысы.

Для гипотермического хранения фрагменты печени и плаценты объемом 0,5 см³ помещали во влажную камеру (50 см³), либо в питательную среду 199 (50 мл) при 4 °С и хранили при этой температуре в течение 6, 12, 24, 48, 72 часов и 6 сут. После окончания каждого срока хранения образцы ткани препарировались для электронно-микроскопического исследования по общепринятому методу [144].

Получение эритроцитов. Плазма и форменные элементы крови удалялись 5-минутным центрифугированием при 3000 об/мин. Осадок эритроцитов трижды отмывали в четырехкратном объеме фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 20 мМ Na-фосфатного буфера (ФБ); 130 мМ NaCl; 5,6 мМ глюкозы, рН 7,2, затем ресуспендировали в фосфатном буфере равного объема. Гематокрит определяли в капиллярах на микроцентрифуге МГЦ-8.

Тепловая денатурация спектрина эритроцитов. Состояние эритроцитов в области температур термоденатурации спектрина исследовали после их нагрева в водном термостате (точность стабилизации $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) в течение 15 мин при 46, 48, 49, 50 и 51 °С. Точность стабилизации и измерения температуры дополнительно контролировалась одновременно двумя термометрами ($\Delta T = \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) и дифференциальной медь-константановой термопарой (второй спай термопары при 0 °С), компактно расположенными внутри камеры (Табл. 2.1). Это позволило оценить величину градиента температуры внутри используемых полиэтиленовых контейнеров объемом 1 мл, содержащих 0,5 мл дистиллированной воды или эритроцитов, а также

скорость достижения требуемой температуры в контейнере и откорректировать длительность экспозиции образца.

Таблица 2.1

Протокол измерения температуры и режима ее стабилизации в термостате.

Область темп. °С	Термостат шкала, °С,	Терм. (1), °С	Терм. (2), °С.	Термопара, мВ → °С
30	32	29,9	30,1	1,332 — 30,2
40	43	39,5	39,8	1,763 — 39,6
40	43	39,5	39,9	1,780 — 40
48	51	48	48,6	2,180 — 48,45
50	53	50	50,65	2,277 — 50,5

Исследование температурозависимой трансформации эритроцитов крыс, а также донорской и кордовой крови человека с нарушенным цитоскелетом (термоденатурация спектрина), осуществляли при температурах 37, 20 и 4°С с помощью методов замораживания-скалывания (состояние морфологии мембраны), оптической и растровой микроскопии.

Состояние эритроцитов фиксировали двумя способами: криофиксацией в переохлажденном в жидком азоте пропане и химической фиксацией глутаральдегидом (ГА), смешивая эритроциты в соотношении 1:1 (по объему) с 2,0 % раствором ГА на ФБ, температура которого была одинаковой с температурой клеток. Устойчивость к охлаждению эритроцитов с денатурированным спектрином оценивали по уровню гемолиза. Контролем служили нативные эритроциты, не подвергавшиеся нагреву. Гемолиз определяли на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО).

Перфузия и гипотермическое хранение цельной печени.

Исследования проведены на лабораторных беспородных крысах самцах (200–250 г), которые находились на стандартном пищевом рационе в условиях вивария ИПКиК НАН Украины. Все манипуляции с животными проводили согласно требованиям "Европейской конвенции защиты

позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других исследовательских целях”. Печень анестезированных животных перфузировали *in situ* охлажденным до 4°C консервирующим раствором объемом 50 мл через портальную вену с использованием перистальтического насоса (скорость перфузии 2.5–3.0 мл/мин/гр, перфузионное давление в вене – 12 мм. рт. ст). Отток крови и перфузата происходил через V. Cava Inf. (нижняя полая вена), которую надсекали в момент начала перфузии. После отмывания печени от крови и насыщения ее соответствующим (UW, сахарозо- или манит-содержащим) консервирующим раствором, в V. Porta (портальная вена) вводили катетер (диаметр 1.4 мм) и фиксировали его. Затем печень с катетером аккуратно извлекали и переносили в пластиковые емкости с охлажденным консервирующим раствором и хранили при температуре 4°C на протяжении 1 и 24 часов. После гипотермического хранения печень подвергали реперфузии минимальным солевым раствором Кребса-Рингера-бикарбоната (pH 7.4) в течение 60 минут при 37°C. Предварительно в раствор для реперфузии добавляли HEPES (10 мМ), глюкозу (5 мМ) и насыщали карбогеном (3 мин). Активности (U) ферментов (ЛДГ, АсАТ, АлАТ) определяли в перфузате с использованием готовых наборов фирмы «Sigma» (США). Результаты представлены в U/V, где U – количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль/л НАД за мин в условиях определения, V – объем перфузата (150 мл).

Для морфологического исследования использовали фрагменты печени (после 1 и 24 ч ее хранения и после реперфузии органа), которые готовились для электронно-микроскопических исследований по методике, изложенной ниже.

2.2 Методы исследования.

2.2.1 Метод трансмиссионной электронной микроскопии.

Подготовку материала и проведение электронно-микроскопического исследования производили по следующей общепринятой методике [144], частично модифицированной нами.

- 1) Фиксацию фрагментов ткани проводили в 2 %-м растворе ГА на ФСБ, pH 7,4 в течение 2 часов при 4°C. По окончании фиксации образцы дважды промывали ФСБ для удаления остатков ГА.
- 2) Постфиксацию проводили в 1 % -м растворе четырехокси осмия (OsO_4), приготовленном на фосфатном буфере. Продолжительность фиксации – 1–2 часа при 4°C. Затем материал трижды промывали ФСБ для удаления OsO_4 .
- 3) Дегидратацию образцов осуществляли в этиловом спирте возрастающей концентрации: 50°, 70°, 80°, 96° и трижды в абсолютном спирте, все по 15 минут при комнатной температуре. Для более тщательного обезвоживания образцы трижды помещались в абсолютный ацетон.
- 4) Заливка в эпоксидные смолы. Образцы пропитывали при комнатной температуре в смесях: абсолютный ацетон + эпоксидные смолы (эпон-аралдит, «Fluka» (США) в следующих концентрациях: ацетон: смола – 3:1 (60 минут); ацетон – смола 1:1 (12 ч); ацетон – смола 1:3 (2–3 ч); стандартная смесь смол для заливки – 2–3 часа. После пропитки образцы раскладывали в заливочные полиэтиленовые капсулы с эпон-аралдитовой смолой и оставляли на 6–12 часов при комнатной температуре. Далее смола в капсулах полимеризовалась при 56°C в течение 48 часов.

Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме УМТП-4 и УМТП-7 (АО «Selmi», г. Сумы), собирали на палладированные сеточки и контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца. Ультраструктуру клеток и ткани исследовали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К (АО «Selmi») при ускоряющем напряжении 75 кВ, снабженного системой съема и анализа изображения САИ-01А (АО «Selmi») с использованием высокочувствительной ССD камеры DX-2 и пакета программ обработки изображения фирмы «КАРРА», Германия.

Для оценки состояния гликокаликса эритроцитов, находящихся в средах с различного состава при длительном ГХ, использовали контрастирование рутениевым красным («Aldrich», США), специфично связывающийся с сиаловыми кислотами мембран [145].

Полутонкие срезы толщиной 0,5 мкм, окрашенные метиленовым синим и толуидиновым синим, просматривали в оптическом микроскопе ЛЮМАМ-МП-4 («ЛОМО», СССР), снабженном цифровой видеокамерой Panasonic WV-CP 470.

2.2.2 Метод замораживания скалывания.

Процессы внутриклеточного кристаллообразования при двухступенчатом замораживании, ультраструктуру мембран эритроцитов, а также температурозависимые изменения характера распределения внутримембранных частиц (ВМЧ) исследовали электронно-микроскопическим методом замораживания-скалывания. В основе метода лежат процессы фиксации и стабилизации биологических структур с помощью низкотемпературного воздействия – т.н. криофиксации, что является более щадящим по сравнению с химической фиксацией методическим подходом. При сверхбыстром и глубоком замораживании объекта удовлетворительно сохраняются физические и химические свойства, прижизненная локализация органических и неорганических компонентов клетки, включая и основной компонент – воду. В отличие от химической фиксации, криофиксация обеспечивает мгновенную остановку всех прижизненных процессов. При этом надежно фиксируются все промежуточные метаболиты и высокоактивные соединения [146–148]. Реализуется также возможность изучения морфологических характеристик структур в 3-мерном измерении.

Приготовление образца включает следующие методические операции: подготовка объекта к замораживанию, криофиксация, скалывание, травление, нанесение реплики на сколотую поверхность, очистка ее от биологических остатков, просмотр в электронном микроскопе и анализ полученных результатов.

Необходимо отметить, что техническое обеспечение метода замораживания-скалывания существенно отстает от методических

требований. Основная масса исследований выполнена на переоборудованных и дополненных различными приспособлениями вакуумных постах.

Нами на базе вакуумного поста ВУП-2К изготовлена действующая установка для метода замораживания-скалывания, позволяющая получать качественные реплики со сколотой поверхности замороженного образца. [149, 150].

Приведем некоторые сведения об устройстве для метода замораживания-скалывания (Рис. 2.1).

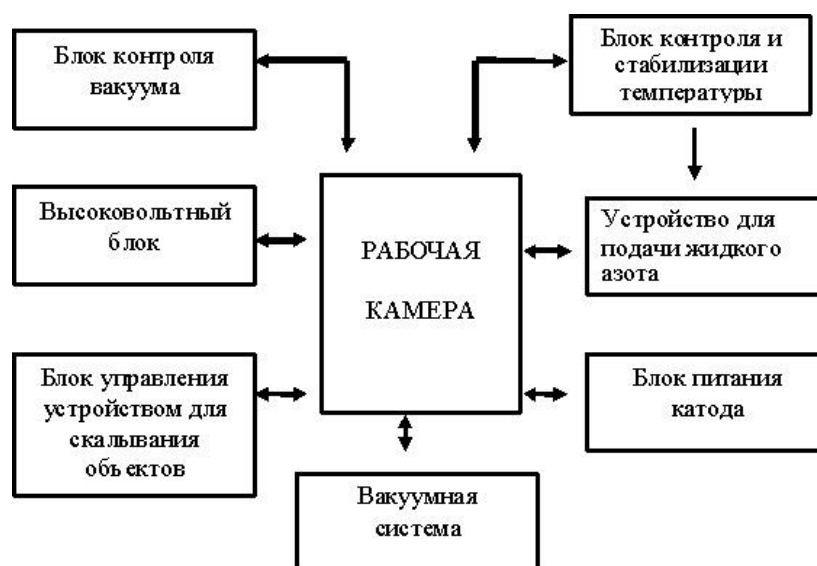


Рис.2. 1 Блок-схема установки для метода замораживания-скалывания.

Образцы, замороженные по определенной программе, либо криофиксированные, монтировались на специальный столик объектов и помещались в рабочую вакуумную камеру через шлюзовую камеру. Это избавляло от конденсационных эффектов в рабочем объеме при этой процедуре. Рабочий вакуум составлял 3×10^{-6} – 8×10^{-6} торр. Рабочая камера конструктивно отдалена от вакуумной системы и имеет дополнительную азотную ловушку на входе в камеру.

Основные этапы метода.

Подготовка объекта. Готовятся образцы заданных размеров и геометрии: кусочки ткани, размером не более 1–2 мм; суспензии клеток (не более 0,003 мл) нативные или обработанные 5–10% глицерином.

Криофиксация. Важнейшим параметром процесса криофиксации биологических объектов является скорость замораживания. Она, главным образом, зависит от размеров и формы объекта, охлаждающей среды, свойств пограничного слоя между объектом и охлаждающей средой – термического контакта. Наиболее полно требованиям хладагента удовлетворяет фреон-22 (точка затвердевания -145°C), который химически инертен и обеспечивает хороший контакт объекта с охлаждающей средой. Кроме фреона-22 в качестве промежуточных хладагентов используют переохлажденный в жидком азоте изопентан (точка затвердевания $-160,5^{\circ}\text{C}$), пропан (точка затвердевания $-187,1^{\circ}\text{C}$).

Теоретически для полной аморфизации воды необходимо заморозить ее до -100°C за время, соизмеримое со временем перегруппировки молекул воды (порядка 10^{-10} сек), т.е. со скоростью $10^{12}^{\circ}\text{C/сек}$. Практически удовлетворительной считают «аморфизацию» воды в биологических объектах, если кристаллическая фаза представлена субмикроскопическими кристаллами, не выявляемыми методами электронной микроскопии. Это соответствует скорости охлаждения около 10^4°C/сек [146, 151]. Применение криопротекторов позволяет получить аморфное состояние их водных растворов при скоростях охлаждения $10^2\text{--}10^3^{\circ}\text{C/сек}$.

Кривая охлаждения объекта в переохлажденном фреоне-22 представлена на рис. 2.2. Для записи скорости охлаждения использовали запоминающий осциллограф С1-18 и малоинерционную дифференциальную термопару. Из рисунка 2.2 видно, что фреон-22 позволяет повысить скорость охлаждения всего объекта, в сравнении с азотом, на порядок. В нашем случае измеренная скорость охлаждения объекта составляла около 300°C/сек .

Скалывание замороженного образца обеспечивает выявление клеточных и внутриклеточных структур и осуществляется либо ножом, либо разламыванием объекта на части. И в том, и в другом случае путь прохождения поверхности скола является структурно-обусловленным,

поскольку проходит по участкам и плоскостям с более слабыми в энергетическом отношении связями.

В целях исключения субъективного фактора и стандартизации скола нами разработана и изготовлена полуавтоматическая система скола, состоящая из столика объектодержателя, рассчитанного на шесть объектов и имеющего термостабилизацию; ножа с электромагнитным приводом и автономным охлаждением; а также блока управления, рассчитанного на шесть циклов: поворот на 60° плюс остановка и включение ножа. Для исследования ультраструктуры мембран эритроцитов мы в большинстве экспериментов использовали разлом/разрыв образца с помощью т.н. сендвич-метода.

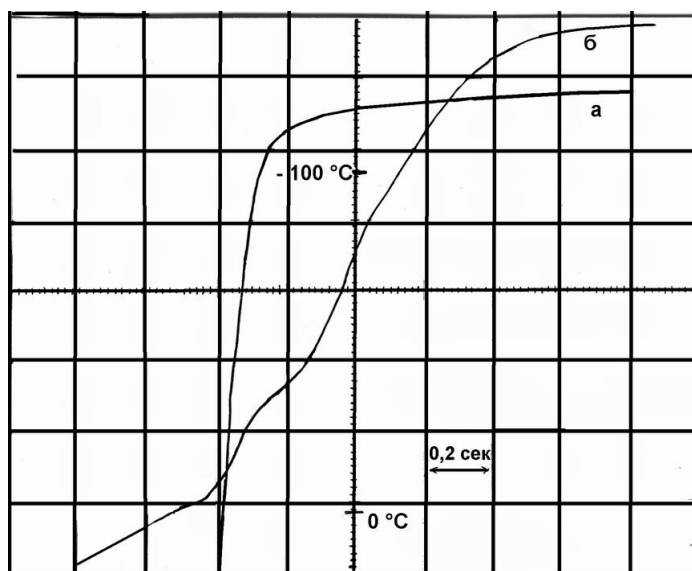


Рис. 2.2 Осциллограмма режима охлаждения объекта в переохлажденном фреоне-22 (а) и жидком азоте (б).

Травление. Сублимацию льда – травление, применяют для выявления биологических структур, лежащих ниже поверхности скола. В основе этого процесса лежит различие в скорости испарения (сублимации) веществ в вакууме. Скорость сублимации льда в вакууме (V) является функцией температуры, давления насыщенных паров воды и вакуума. Так для чистого льда при давлении порядка 10^{-5} торр, скорость сублимации при -100°C равна $V_{-100^\circ\text{C}} = 2,3 \text{ Å/сек}$, а $V_{-130^\circ\text{C}} = 0,01 \text{ Å/сек}$. Для нормальной сублимации льда

необходимо, чтобы вакуум был несколько выше, чем давление паров льда, в противном случае наблюдается конденсация молекул воды на поверхность образца. Именно конденсационными, а не фазовыми превращениями объясняется появление псевдоструктур типа шероховатой пленки или отдельных частиц, напоминающих глобулярные частицы мембран.

Применение антизагрязняющих ловушек, экранов, у которых скорость конденсации выше, чем скорость сублимации молекул воды над образцом, позволяет существенно снизить указанные артефакты. В качестве антизагрязняющей ловушки мы изготовили дополнительную азотную ловушку, расположенную между объемом рабочей камеры и диффузионным насосом. Над столиком объектов расположен подвижный азотный экран-ловушка ($-180\text{ }^{\circ}\text{C}$), обеспечивающий устранение конденсации паров воды на сколотой поверхности. Второй функцией экрана является защита объекта от теплового потока во время напыления.

Нанесение реплик. Для получения реплик использовали электронно-лучевые испарители и наиболее полно удовлетворяющие требованиям этапа напыления. В отличие от термического способа напыления материалов достоинствами применяемых испарителей являются малая тепловая нагрузка на замороженный объект, практически точечный источник распыления, многократность, управляемость и воспроизводимость процесса напыления. В качестве распыляемого материала используют платино-углеродную смесь в весовом соотношении 1:4. Полученная пленка-реплика не обнаруживает кристаллических образований на дифракцию. В нашем случае из части массивного угольного стержня (С), диаметром 6 мм, протачивался цилиндрический стержень диаметром 1,8 мм и внутренним отверстием 1,2 мм, в которое вплавлялась платиновая вставка (Pt) аналогичного диаметра (рис. 2.3).



Рис. 2.3. Платино-углеродный стержень, используемый в электронно-лучевом испарителе, для получения реплики. М. 1:2,5

Платино-углеродный испаритель расположен под углом к столику объектов, испаритель углерода – перпендикулярно. При напылении использован режим кругового отенения.

Измерение температуры. Известно, что при сублимации льда со сколотой поверхности, с целью выявления тонкой структуры биологического объекта, оптимальной является температура $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ и ее снижение всего на $5\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$ замедляет скорость сублимации, практически, на порядок [146]. В этой связи точность измерения температуры имеет существенное значение. Традиционные термопреобразователи на основе терморезисторов и термопар обеспечивают требуемую, порядка $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, точность преобразования температуры за малые времена от 1 сек до десятков суток, но их долговременная стабильность за годы эксплуатации прибора невысока из-за процесса старения термочувствительных материалов, из которых они сделаны. Известно, что большей эталонностью обладают кварцевые термочувствительные элементы на основе серийных кварцевых резонаторов. Такие термочувствительные элементы обычно применяют в автогенераторных преобразователях температуры с частотным или цифровым выходом. Нами в системе измерения и регулирования температуры в установке для замораживания-скалывания биологических объектов в вакууме наряду с термосопротивлением был также использован кварцевый двухчастотный автогенераторный преобразователь температуры ДАП.ТЦ-05, схема устройства которого изложена в работе [150].

2.2.3 Растровая электронная микроскопия.

Для исследования эритроцитов методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) суспензию эритроцитов дважды отмывали в ФСБ (рН 7,4), как изложено выше, и фиксировали в течение 2 ч в 1–2 % растворе ГА, приготовленного на ФБ. После отмывки в фосфатном буфере клетки

постфиксировали в 1% растворе четырехокси осмия в течение 1 ч. После промывки в фосфатном буфере, суспензию эритроцитов обезвоживали по 10–15 мин в спиртах возрастающей концентрации: от 50° до 96° и дважды в абсолютном (98°) спирте. Образцы эритроцитов, помещенные на 10–15 мин в ацетонитрил, наносили тонким слоем на объектодержатели и помещали в вакуумную напылительную установку ВУП-5М (АО «Selmi»). Эритроциты оттеняли серебром под углом 45°. Толщина напыляемого слоя серебра на поверхность объектов составляла 20–25 Å. Просмотр образцов осуществляли в растровом электронном микроскопе РЭММА-101А (АО «Selmi»), в режиме вторичных электронов, при ускоряющем напряжении 20–30 кВ и увеличениях от 2000 до 10000 крат. Прибор снабжен сертифицированной системой цифрового вывода изображения на монитор компьютера и программой обработки изображения, разработанной НКФ «SEO Image Lab» (г. Сумы, Украина). Разрешающая способность микроскопа - 6,0 nm.

2.2.4 Метод гистологических срезов. Исследование фрагментов печени проводили также по классическому гистологическое методу. Ткань фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина – 24 ч, после промывки фиксированного материала, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в целлоидин-парафин. Окраска целлоидин-парафиновых срезов, толщиной 5–7 мкм проводилась гематоксилином Эрлиха и эозином. Просмотр препаратов осуществляли на микроскопе ЛЮАМ-МП-4 («ЛМО», СССР)

2.2.5 Метод ЭПР спиновых зондов. Состояние мембранных липидов, а также степень обезвоживания эритроцитов на этапе изотермической экспозиции при двухступенчатом замораживании изучали методом ЭПР спиновых зондов [35]. В работе использовали жирно-кислотный зонд – амид пальмитиновой кислоты, спин-меченный в области полярной головки («Aldrich», США) и водорастворимый зонд 1-оксил-2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин – ТЕМПОН («Aldrich», США) в комбинации с уширяющим агентом феррицианидом калия, не проникающий в интактные эритроциты.

При определенных концентрациях зонда и уширителя регистрируется сигнал исключительно от внутриклеточного зонда [152, 153], что позволяет одновременно оценивать микровязкость цитозоля и сохранность барьерной функции мембраны. Спектры регистрировали на ЭПР-спектрометре ER-100Д «Bruker» (Германия) с термостатированной приставкой ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). По спектрам ЭПР определяли интенсивности компонент (I_0 , $I_{-/+}$), а также ширину центральной компоненты (ΔH_0 , G). По соотношению $I_0 / I_{-/+}$ вычисляли параметр подвижности зонда, который характеризует вязкость его микроокружения. Количество зонда в клетке на этапе изотермической экспозиции эритроцитов оценивали по параметру $I_0(\Delta H_0)^2$.

2.2.6 Определение водной диффузионной проницаемости мембраны эритроцитов методом ЯМР.

Количественно оценить проницаемость мембраны для воды можно, используя понятие времени обмена τ_0 – времени, в течение которого $1/e$ часть воды в клетке обновляется за счет обмена с внеклеточной водой. Предложенный в работе [154] метод определения τ_0 для эритроцитов с помощью так называемой методики «парамагнитного допинга» заключается в измерении времени спин-спиновой релаксации I_p потоков воды в суспензии эритроцитов, содержащей непроникающие в эритроцит парамагнитные ионы (напр. Mn^{2+}).

В нашей работе время спин-спиновой релаксации определяли по двухимпульсной методике [154], используя релаксометр спинового эха ЯМР [155], на частоте 15,9 МГц. На образец подавали последовательность 90 и 180° импульсов, разделенных временным интервалом, и регистрировали сигнал спинового эха. По амплитудам эхо-сигналов h_1 и h_2 при разных временных интервалах t_1 и t_2 , вычисляли время спин-спиновой релаксации протонов воды в суспензии эритроцитов по формуле [156]: $\tau = 2 (t_2 - t_1) / \ln (h_1 / h_2)$.

Для измерения времени релаксации в клеточной суспензии эритроцитарную массу смешивали в соотношении 1:1 с раствором,

содержащим 30 мМ MnCl_2 . Температуру образцов в измерительной ячейке ЯМР-релаксометра поддерживали с точностью $\pm 0,3^\circ\text{C}$. Погрешность определения времени водного диффузионного обмена не превышала 4% и 10% для эритроцитов донора и зимоспящих сусликов соответственно. Различия в погрешности, по-видимому, были вызваны существенным отличием проницаемости для воды их мембран.

2.2.7 Определение величины гемолиза. Величину гемолиза эритроцитов после различных воздействий определяли спектрофотометрическим методом. Для измерений гемолиза брали надосадок после центрифугирования суспензии эритроцитов в течение 5 мин при 3000 об/мин. Спектры поглощения надосадков регистрировали на спектрофотометре "Pye Unicam SP-8000" (Англия) и на спектрофотометре СФ-4А с проточной кюветой при длине волны 543 нм.

Гемолиз выражали в процентах по отношению к 100 % содержанию гемоглобина. За 100 % принимали поглощение пробы, в которую для полного разрушения эритроцитов добавляли детергент тритон Х-100 в концентрации 0,1%. Степень гемолиза (Г) рассчитывали по формуле: $G = A/A_{100} \cdot 100\%$, где А – оптическая плотность исследуемого образца, A_{100} – оптическая плотность образца, соответствующая 100% гемолизу. Каждый эксперимент повторяли не менее 6 раз в двух параллельных пробах не менее чем на 5-ти донорах.

2.2.8. Метод проточной цитофлуориметрии. Для анализа степени гетерогенности популяции эритроцитов был использован проточный цитофлуориметр FACS Calibur (BD, Bioscience, USA) с одновременной раздельной фиксацией малоуглового и прямого светорассеяния. Анализировался параметр (FSC), характеризующий форму клеток в средах с разными ионной силой и значениями pH. Полученные данные были обработаны с помощью программы Win MDI 2.8 и представлены в виде гистограмм (каждое измерение было сделано для 30000 эритроцитов из 2 мл суспензии, концентрацией 10^6 клеток/мл).

2.2.9 Определение осмотической устойчивости эритроцитов.

Осмотическую устойчивость клеток определяли путем переноса 100 мкл клеток из сред инкубации в 1 мл растворов NaCl (90 и 140 mOsm, соответственно, содержащие 20 ммоль/л ФБ, pH 7,2) при 37°C. Осмолярность гипотонических сред контролировали осмометром ОМКА-Щ-01.

2.2.10. Электрофорез в ПААГе.

Качественный и количественный состав мембраносвязанных белков эритроцитов суслика в трех физиологических состояниях определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия по методу Леммли [157] с модификацией для мембранных белков [158]. Концентрация акриламида составляла 10%. Денситометрирование гелей, окрашенных Кумасси, проводили на денситометре CDS-200. Для определения молекулярного веса белковых фракций использовали маркеры фирмы LMW "Pharmacia". Номенклатура полос по Fairbanks.

2.2.11. Метод собственной белковой флуоресценции.

Состояние мембранных белков изучали методом собственной белковой флуоресценции при длине волны возбуждения 296 нм (область минимального поглощения тирозина – триптофановая флуоресценция). Регистрацию спектров флуоресценции разбавленной суспензии теней эритроцитов проводили на спектрофлуориметре "Hitachi" MPF-2A. Температурные зависимости получали с помощью кюветы, точность термостатирования $\pm 1^\circ\text{C}$

2.2.13. Определение уровня внеклеточного калия.

Концентрацию ионов K^+ в надосадке суспензии эритроцитов (20% гематокрит) измеряли с помощью иономера «Мультитест ИПЛ-113» НВП «Семико» (Россия) Электроды «ЭЛИС-121К» калибровались растворами KCl (10^{-5} – 10^{-1} моль/л) перед каждым циклом измерения.

2.2.12. Метод кислотных эритрограмм. Кислотный гемолиз (HCl-гемолиз) эритроцитов проводили, как описано [159, 160]. Учитывая

холодовую толерантность гибернирующих млекопитающих, мы модифицировали методику для проведения температурных исследований [130].

Суспензию отмытых эритроцитов разводили физиологическим раствором до концентрации клеток, поглощение которых при 700 нм соответствовало 0.7– 0.8 отн.ед (гематокрит 0,05%). К 1,5 мл этой суспензии в термостатированной кювете спектрофотометра в нулевой момент времени добавляли 1,5 мл 0,004N HCl (разбавленную физ. раствором), термостатированную при той же (исследуемой) температуре. Кинетику HCl-гемолиза (acid hemolysis) определяли по изменению оптической плотности (при 700 нм) во времени на спектрофотометре Pye Unicam SP 8000. Влияние температуры в диапазоне 5–40°C на гемолиз оценивали с использованием термостатированной ячейки. Точность поддержания температуры $\pm 0.5^\circ\text{C}$.

Кислотную эритрограмму (распределение популяции эритроцитов по кислотной резистентности) и время кислотного гемолиза (t_{hem}) рассчитывали из кинетической кривой оптической плотности при 700 nm, определенной троекратно при каждой исследованной температуре для $n=5$ в каждой исследованной группе животных.

Полученные в работе результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента-Фишера [161]. Для расчетов использовали программу компьютерного анализа данных Exel-2003.

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТОВ И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ИХ МЕМБРАН ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЕМПЕРАТУРЫ.

3.1. Обоснование применения метода замораживания-скалывания в криобиологии.

В настоящее время с помощью электронной микроскопии накоплено большое количество новых данных о структуре и функционировании клеток и тканей. Прогресс в области электронно-микроскопических исследований во многом обусловлен разработкой оптимальных методов препарирования биологических объектов. Электронно-микроскопические работы, использующие для ультраструктурного анализа метод замораживания-скалывания (freeze-etching, freeze-fracturing), достаточно широко применяются в исследовательской практике. Объясняется это следующими обстоятельствами:

- 1) трехмерная реконструкция различных клеточных органелл, с использованием метода серийных ультратонких срезов, несмотря на научную важность, оказалась громоздкой, не дающей принципиально новых результатов;
- 2) замена биологического объекта его металлическим отпечатком позволила повысить до 20 Å и выше разрешение исследуемых объектов при использовании высокотемпературных, тугоплавких материалов;
- 3) возможность судить о «поверхности» биологических объектов, строении мембран клеток и их органелл, локализации и распределении мембранных компонентов явилась новым, в качественном и количественном отношении, шагом в электронной микроскопии;
- 4) исключение химической фиксации из практики электронной микроскопии, быстрота проведения эксперимента, широкий круг решаемых задач.

Как отмечалось в главе «Материал и методы исследования» прохождение плоскости скола в замороженном образце является структурно-обусловленным, т.е. скол-разлом проходит по участкам и плоскостям с более слабыми в энергетическом отношении связями. Общеизвестно, что

большинство мембран при скалывании расщепляется вдоль внутренней гидрофобной области, образуя две плоскости излома, а не вдоль внешней поверхности, отделяя ее от поверхности льда. Идея раскалывания мембран была предложена Брентоном в 1966 году [162]. Авторы работы [163], используя радиоактивные метки, доказали, что искусственные мембраны раскалываются вдоль гидрофобной области. Это объясняется тем, что при низких температурах гидрофобные связи внутри мембраны слабее, чем связи с окружающим льдом [162, 164]. Экспериментальное доказательство прохождения плоскости скола вдоль гидрофобных областей в природных мембранах приводится в работах [165, 166]. Для идентификации поверхности, выявляемой при продольном раскалывании мембран, были выполнены работы, в которых экстраклеточные и цитоплазматические поверхности мембран эритроцитов метили фибриллярным актином [167] и ферритином [167, 168]. Большинство экспериментальных данных подтверждает раскалывание биологических мембран вдоль гидрофобной области [169].

При раскалывании мембраны нативных клеток выявляются две относительно гладкие поверхности, обозначаемые согласно принятой международной классификации, как PF и EF, с характерным хаотическим распределением ВМЧ [170]. PF – поверхность части мембраны, прилежащей к цитоплазме, EF – поверхность части мембраны, контактирующей с внеклеточным пространством (рис. 3.1, а). На сколах PF-поверхность – выпуклая и содержит частицы размером около 8 нм, EF-поверхность – вогнутая, несет мало частиц и относительно гладкая. Преобладание частиц на PF-поверхности свойственно большинству мембран.

Практически, в клетке возможны несколько вариантов прохождения пути скола: вдоль внешней поверхности, внутри мембраны – вдоль гидрофобной области, и поперек клетки (рис. 3.1, б; рис. 3.2, а).

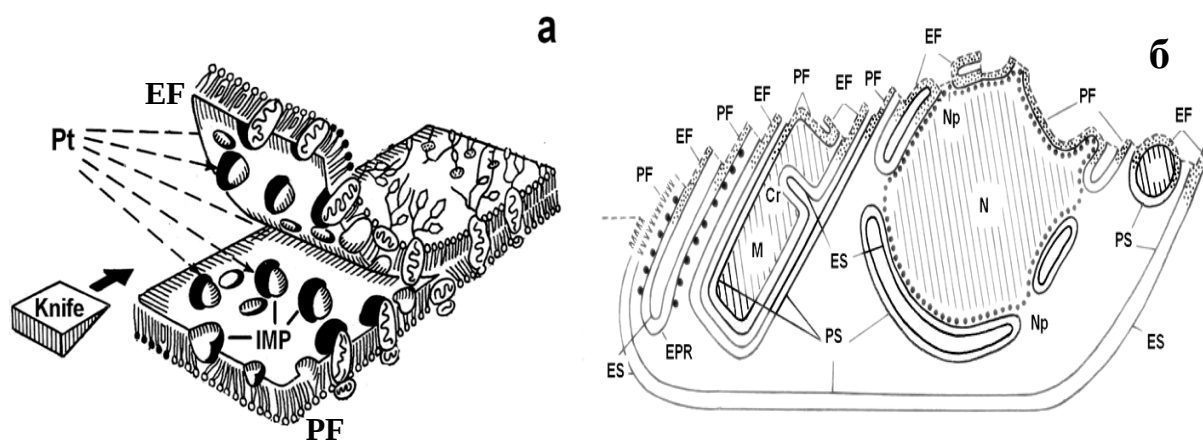


Рис. 3.1. Схема раскалывания мембраны вдоль гидрофобной области (а) и типы выявляемых поверхностей в случае поперечного раскалывания клетки (б) при использовании метода замораживания-скалывания. Обозначения: N- ядро, Np- ядерная пора, EPR- эндоплазматический ретикулум, М- митохондрия, Cr- криста, ES – внешняя поверхность, PS – внутренняя поверхность структуры, EF- прилежащая к внешней поверхности часть сколотой мембраны, PF – прилежащая к внутренней, цитоплазматической поверхности часть сколотой мембраны.

Поперечное раскалывание выявляет тонкую структуру внутриклеточного пространства и является уникальным морфологическим подходом, позволяющим исследовать такие важные для криобиологии процессы, как внутриклеточное кристаллообразование (рис. 3.2, б) и обезвоживание клеток, состояние цитозоля. Полученные нами результаты исследования процессов вне- и внутриклеточного кристаллообразования, обезвоживания клеток подробно изложены в монографии [171] и работах [35, 172]. Сверхбыстрое охлаждение образца позволяет зафиксировать его состояние в любой температурной точке, что является существенным моментом при морфологическом изучении быстропротекающих внутриклеточных процессов.

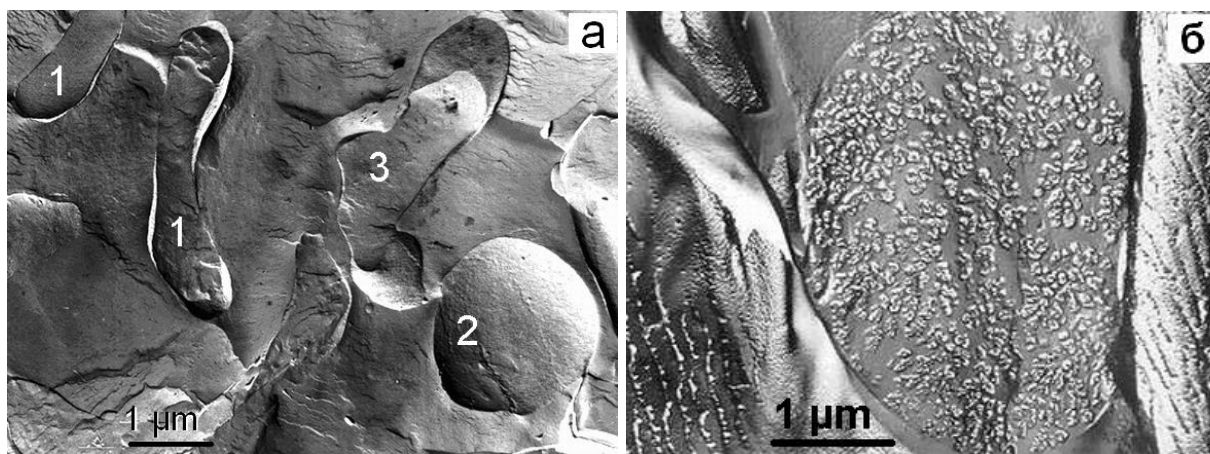


Рис. 3.2. Различные варианты прохождения плоскости скола в криофиксированных эритроцитах (1 – поперечный; 2 – продольный и 3 – смешанный) – (а); характер распределения внутриклеточных кристаллов, выявляемый при поперечном скалывании, в эритроците, замороженном с большой скоростью – (б).

Метод замораживания-скалывания широко применяется для изучения ультраструктурной организации различных мембран. Интерпретация получаемой информации при исследовании реплик со сколов мембран, а именно: гладкие области – липидный бислой, глобулярные частицы – белок-липидные комплексы, укладывается в существующие представления о строении мембраны, предложенные еще Зингером и Николсоном [173, 174] и дополненные другими авторами. Экспериментально доказано, что выявляемые на PF- и EF-поверхностях глобулярные частицы (ВМЧ) представляют собой интегральные белки, встроенные в липидную область мембраны. Доказательству этого вопроса было уделено достаточно много внимания в начале 70-х годов [175, 176, 177]. В работе [162] установлена корреляция между плотностью частиц в различных мембранах, функциональной сложностью и белковым составом мембран, что является доводом в пользу белковой природы частиц. Подтверждением белковой природы частиц явился эксперимент [178], в котором показано, что ингибирование синтеза белков в процессе клеточного роста приводит к

уменьшению числа частиц. Природу ВМЧ объясняют эксперименты с реконструированными мембранами, где частицы появлялись на поверхности скола только после введения белка пурпурных мембран [179] гликофорина [180], Са-АТФазы [181] в модельные липидные системы.

Наглядным и убедительным свидетельством различия в структуре поверхностей, выявляемых при скалывании двухслойных липидных везикул и естественных мембран, являются наши данные, представленные на рис.3.3.

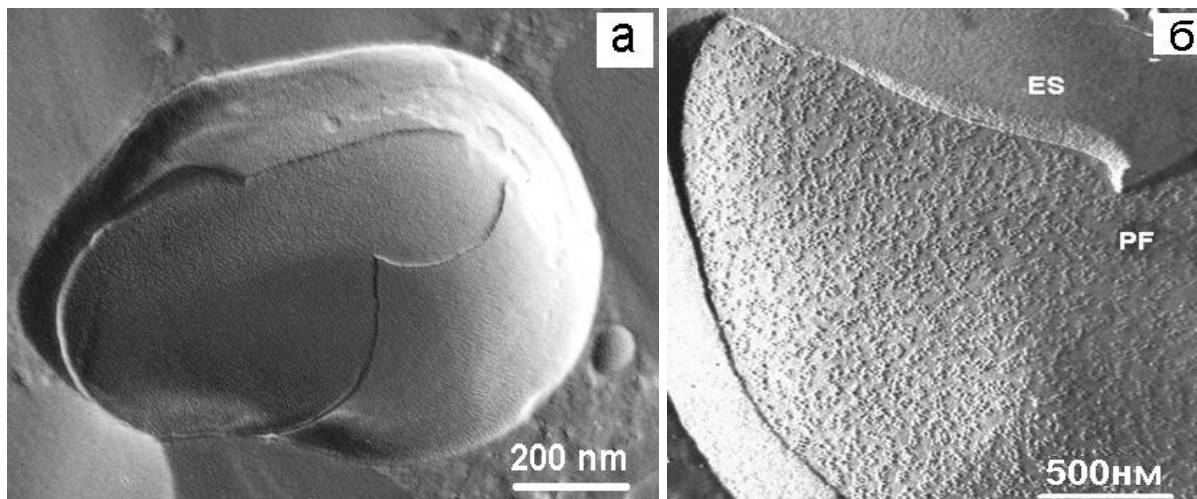


Рис. 3.3. Различие в морфологической картине поверхности скола липидной (безбелковой) везикулы (а) и мембраны эритроцита (б), выявляемое с использованием метода замораживания-скалывания. Гладкая, не содержащая частиц PF – поверхность липидной везикулы и внутренняя, PF – поверхность мембраны эритроцита, с характерным распределением ВМЧ.

Соответствие между ВМЧ и определенными группами белков однозначно установлено для мембраны эритроцита, где целым рядом авторов [176, 182, 183] показано, что в образовании ВМЧ участвуют трансмембранные белки – белок полосы 3 (БП3) и гликофорин С. В частности, в экспериментах с использованием ферритина, конъюгированного с конканавалином А и фитогемагглютинином, которые специфичны соответственно к БП3 и гликофору, было показано сходное распределение ферритиновых частиц на внешней поверхности мембраны и ВМЧ на EF-

поверхности скола [174,176]. Было также подсчитано, что число ВМЧ в мембране эритроцита равно 5×10^5 и приблизительно соответствует числу молекул этих интегральных белков. В ряде других работ [165, 184, 185] показано, что распределение в плоскости эритроцитарной мембраны составных частей белка полосы 3 и гликофорина - антигенов группы крови А, рецепторов для вируса гриппа и агглютенина сои, также отражает распределение ВМЧ. Все эти данные свидетельствуют, что гликофорин и белок полосы 3 образуют ВМЧ.

Строение мембраны эритроцита, ее количественный состав и функциональные параметры, достаточно подробно изложены в многочисленных обзорах и монографиях [14, 186, 187]. По общепринятой классификации мембранные белки делят на периферические и интегральные. Периферические белки (главные белки - спектрин, актин, и минорные белки полос 4.1, 4.2, 4.9 и др.) связаны с мембраной посредством электростатических взаимодействий образуют мембранный цитоскелет. Основные интегральные белки эритроцитарной мембраны – БПЗ и гликофорины А, В, С являются гликопротеинами. Внешние гидрофильные участки этих белков локализованы на наружной стороне мембраны [186] и являются специфическими рецепторами для различных вирусов и антител. Внутренние фрагменты трансмембранных, интегральных белков обращены в сторону цитозоля и обеспечивают взаимосвязь с подлежащим цитоскелетом [188] и компонентами цитозоля (гемоглобин, гликолитические ферменты [16]).

На рис. 3.4 представлена модель мембраны эритроцита: трансмембранные белки (полоса 3 и гликофорин) через так называемые якорные белки (полоса 2.1 – анкирин и полоса 4.1) связаны с периферическими цитоскелетными белками (спектрин, актин) посредством электростатических взаимодействий [189].

Известно, что в норме вращательная и латеральная подвижность мембранных белков резко ограничена спектрин-актиновой сетью [190].

Именно этим можно объяснить тот факт, что в нативной мембране (37°C, pH 7,2– 7,4) трансмембранные белки гликофорин С и БПЗ, наблюдаемые при раскалывании мембраны в виде ВМЧ, распределены хаотически (рис. 3.4, б) [11]. Данные литературы [14, 190], а также наши исследования [11] показали, что система мембрана-цитоскелет при физиологических условиях динамически устойчива, и наблюдать латеральное перераспределение ВМЧ в плоскости мембраны не удастся. Только в случае нарушения взаимодействий в цитоскелет-мембранном комплексе, приводящем к изменению динамического поведения трансмембранных белков, наблюдается агрегация ВМЧ.

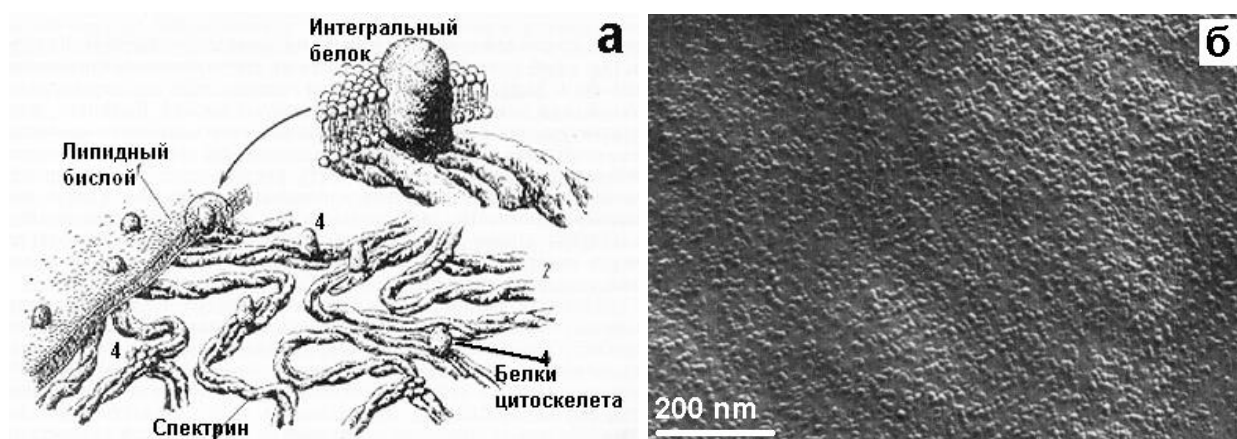


Рис. 3.4. Модель мембраны эритроцита, иллюстрирующая современные представления о ее строении и взаимодействии с прилежащим цитоскелетом (а); участок РF-поверхности с характерным, хаотическим распределением ВМЧ, выявляемый при продольном раскалывании мембраны эритроцита (б).

Установлено, что характер распределения частиц отражает динамику белок-липидных взаимодействий и определяется структурно-функциональным состоянием клетки и ее мембраны [11, 191, 192]. Для большинства исследованных мембран при нормальном физиологическом состоянии клетки отмечено хаотическое распределение ВМЧ. Исключением являются области клеточных контактов, где частицы находятся в агрегированном состоянии, образуя ряды, формирующие плотные структуры [151, 193], а также участки слияния мембран, характеризующиеся образованием розеток из частиц.

Агрегация ВМЧ может быть вызвана изменением функционального состояния клеток (истощение по АТФ при ГХ, снижение pH), действием на них различных мембранотропных соединений. Примером такого воздействия на мембрану является действие мелиттина. Будучи амфипатической, заряженной молекулой, мелиттин может взаимодействовать и связываться с различными белками [194–196] и изменять их свойства, вызывая т.н. мелиттин-индуцированную агрегацию белков. В бислоях мелиттин формирует потенциал-зависимые ионные каналы и вызывает лизис эритроцитов при микромолярных концентрациях [197–199]. Мы провели анализ состояния мембраны эритроцитов при действии различных концентраций мелиттина (рис. 3.5).

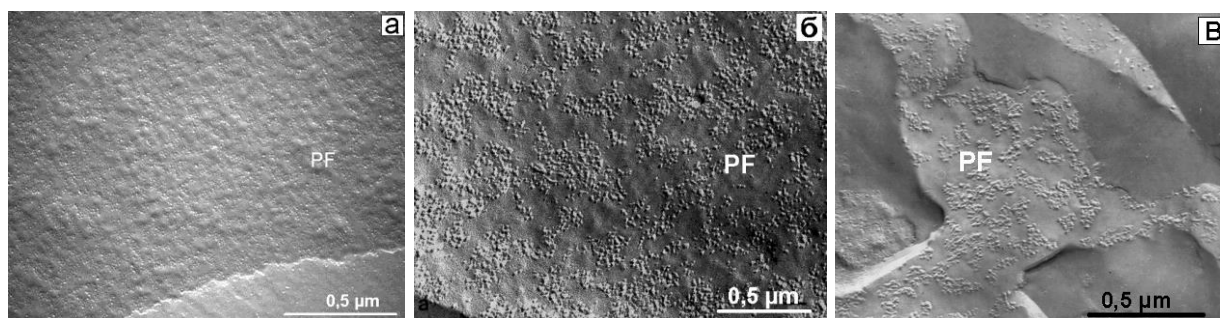


Рис. 3.5 Состояние PF-поверхности мембраны эритроцитов человека с характерным распределением ВМЧ при действии различных концентраций мелиттина и длительности экспозиции с ним: ((а) – 1,0 мкг/мл пчелиного яда; (б) – 2,5 мкг/мл пчелиного яда; в – 2,5 мкг/мл пчелиного яда, 1сут при 4°C

Как видно из рисунка, последствием действия мелиттина является агрегация ВМЧ и образование в мембране больших участков, свободных от мембранных белков, которые потенциально могут представлять собой области, где реализуется липидный механизм повреждения мембраны, в частности, образование поры. Изменение в распределении ВМЧ и ультраструктуры мембраны имеют дозозависимый характер. Способность пептида непосредственно взаимодействовать с белками подтвердили данные об уменьшении вращательной подвижности БПЗ в мембране эритроцитов, обработанных мелиттином [199, 200].

Традиционными параметрами оценки реорганизации мембран на ультраструктурном уровне являются также плотность и характер перераспределения ВМЧ между РF- и ЕF-поверхностями [11, 168, 201]. Установлено, что суммарная плотность ВМЧ на РF- и ЕF-поверхностях – величина достаточно постоянная для мембран эритроцитов одного вида и иногда значимо различается у различных видов животных. В частности показано, что мембрана эритроцитов ламы, имеющая повышенное количество белка полосы 3, характеризуется большей суммарной плотностью ВМЧ [202]. С другой стороны, эритроциты плода человека имеет меньшую плотность частиц, при увеличении их среднего размера [203].

Еще в 80-90-х годах была продемонстрирована связь этих параметров с состоянием клеточного цитоскелета [204], проницаемостью мембран для воды [193] и действием мембранотропных веществ [205]. Увеличение количества ВМЧ отмечается в клетках, устойчивых к различным воздействиям [206, 207].

Вместе с тем характер прохождения плоскости скола мембран также является чувствительным показателем модификации их состояния и отражает уровень изменения Ван-дер-ваальсовых сил в гидрофобной области бислоя [201]. Использование этого нетрадиционного параметра показало, что при экспозиции клеток в высоких концентрациях криопротекторов [208], в безглюкозной среде [209] и т. д. с большей вероятностью происходит поперечное раскалывание клеток, а не вдоль гидрофобной области их плазматических мембран, как ожидалось.

Таким образом, данные литературы и данные наших исследований (см. следующие главы) позволяют заключить, что параметры ультраструктуры, получаемые методом замораживания-скалывания, могут быть использованы для исследования влияния на клетки различных повреждающих факторов, в том числе связанных с действием холода.

3.2. Сравнительное исследование влияния температуры на эритроциты крысы, кордовой и донорской крови человека.

Нагрев эритроцитов выше 45°C используется для изучения обратимости структурных модификаций мембран клеток с нарушенным цитоскелетом при последующем охлаждении. Это связано с тем, что основной белок цитоскелета эритроцита – спектрин, испытывает в составе эритроцита денатурирующий термопереход при 49,5°C [210]. Большинство термопереходов в эритроцитарной мембране в области температур выше 50°C имеет необратимый характер и связано с потерей ряда функциональных свойств клетки. Показано, что при нагревании до 46–49°C происходит олигомеризация БПЗ, увеличение его вращательной и латеральной подвижности [12], а также изменение критического клеточного объема [211]. В этих условиях увеличивается микровязкость мембраны, происходит интенсивная везикуляция эритроцитов [187] и ряд других драматических событий, позволяющих поставить вопрос: а с каким объектом мы имеем дело после его экспозиции при 50°C? Мы проследили за морфологическим состоянием эритроцитов и их мембраны в интервале температур 46–51°C.

Материалом в данном разделе исследования служили эритроциты крови донора и кордовой крови человека, заготовленных на консерванте «Глюгицир» (цитрат натрия – 2 г; глюкоза безводная – 3 г; вода бидистиллированная до 100 мл, рН 5,4) а также эритроциты крысы на гепарине. Эритроциты освобождали от плазмы и форменных элементов крови с использованием методических приемов, изложенных в главе 2. Гематокрит во всех случаях составлял 20%. Протокол нагрева эритроцитов, подготовка к исследованию методами оптической и растровой микроскопии изложены в гл.2 «Материал и методы исследования». После каждой процедуры термовоздействия эритроциты в соотношении 1:1 фиксировались в 2,0 % растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере, температура которого была одинаковой с температурой клеток.

С целью устранения проблемы «эффект стекла» при просмотре в оптическом микроскопе, а также температурозависимых изменений формы клеток при дальнейших манипуляциях мы фиксировали их ГА в каждой экспериментальной точке. Это позволило проследить динамику трансформации их поверхности в интервале температур 46-51⁰С. Представленные на рис 3.6 иллюстрации, полученные с помощью оптической микроскопии, свидетельствуют о надежной фиксации морфологического состояния клетки и о достаточно хорошем соответствии данным, полученным с помощью РЭМ.

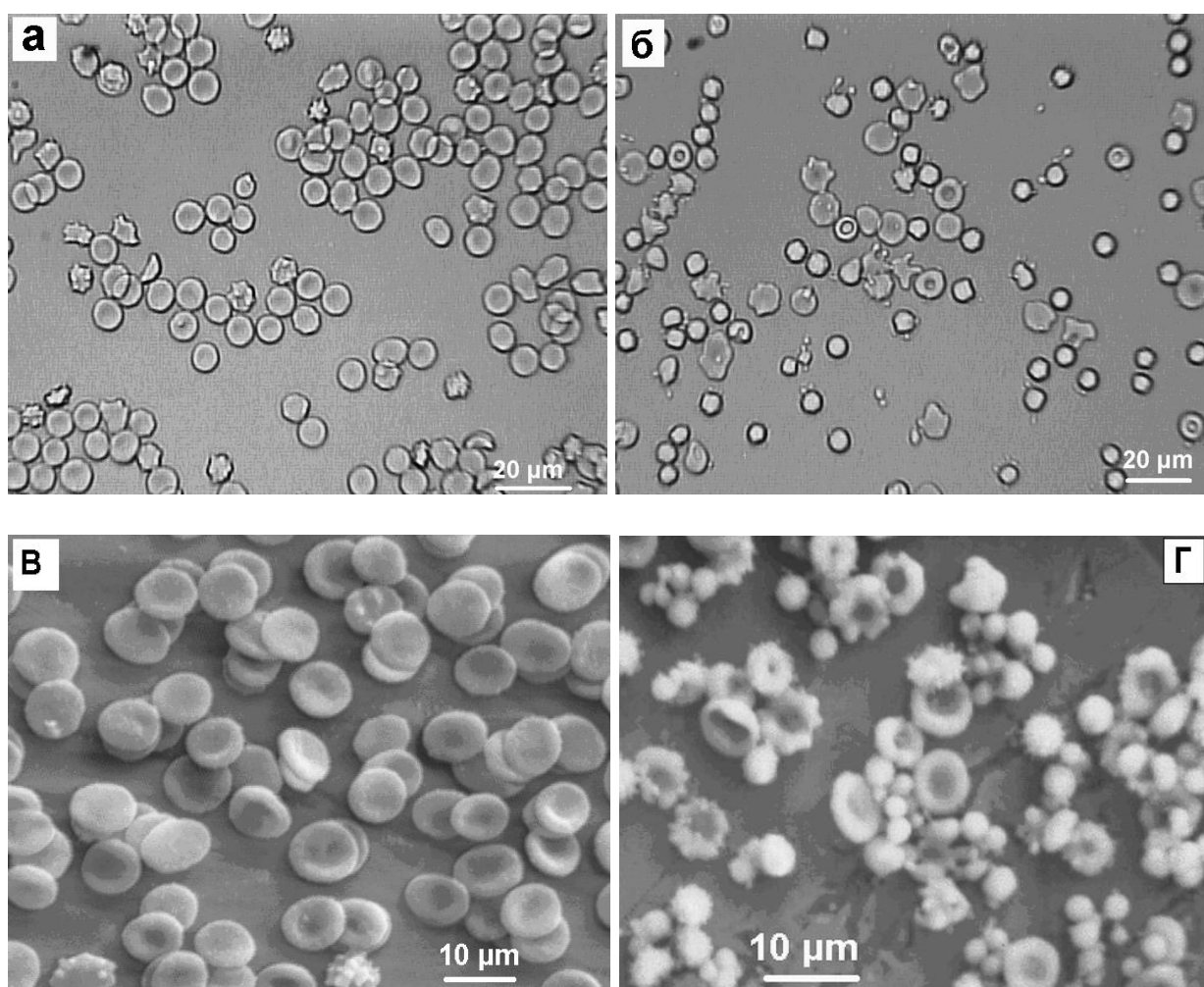


Рис. 3.6 Морфологическое состояние эритроцитов кордовой крови в контроле (а, в) и после температурного воздействия (+48⁰С) (б, г). Данные оптической (а, б) и растровой (в, г) микроскопии. Фиксация ГА.

Анализ эритроцитов кордовой крови человека этими методами показал, что наибольшую популяцию эритроцитов в контроле представляют

дискоциты, составляющие не менее 60-70% от их общего количества. Диаметр дискоцитов кордовой крови человека колеблется в широких пределах: от 6,7 до 11 мкм (рис. 3.7).

Таким образом, эритроциты кордовой крови человека имеют *большие* размеры и гетерогенность, по сравнению с эритроцитами донора. Физиологический диапазон вариаций диаметра эритроцитов взрослого человека составляет не более 3,5 мкм [212], в то время как у эритроцитов кордовой крови этот параметр составляет около 5 мкм.

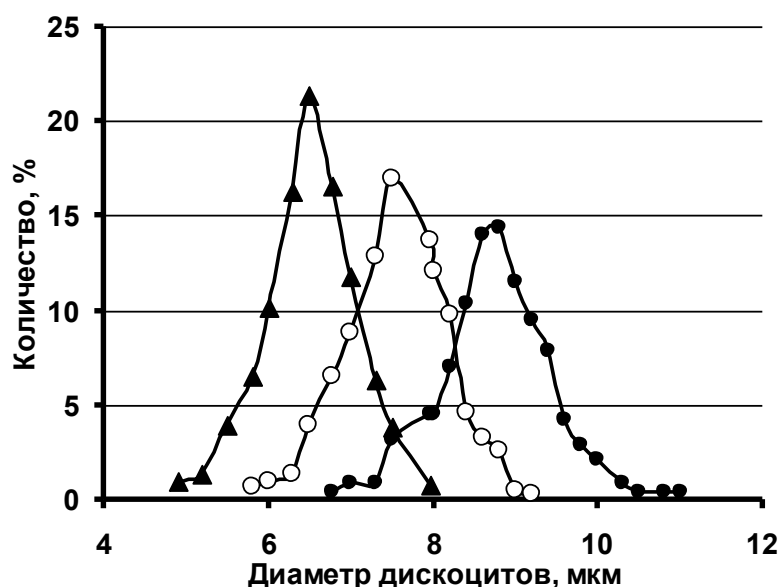


Рис. 3.7 Распределение дискоцитов кордовой (-●-) и донорской (-○-) крови человека и дискоцитов крысы (-▲-) по размеру их диаметра.

Известно, что в процессе нагрева клеток наблюдается два, идентифицируемых уже в области температур 46–48°C, варианта морфологических трансформаций – глубокие поперечные перетяжки клетки и волнообразная деформация поверхности клетки с последующим формированием спикул [213]. Мы также наблюдали два аналогичных типа морфологических изменений для всех исследуемых групп эритроцитов [15, 214].

На рис. 3.8 представлена последовательность трансформации эритроцитов крысы в интервале температур 46–50°C, по данным оптической микроскопии.

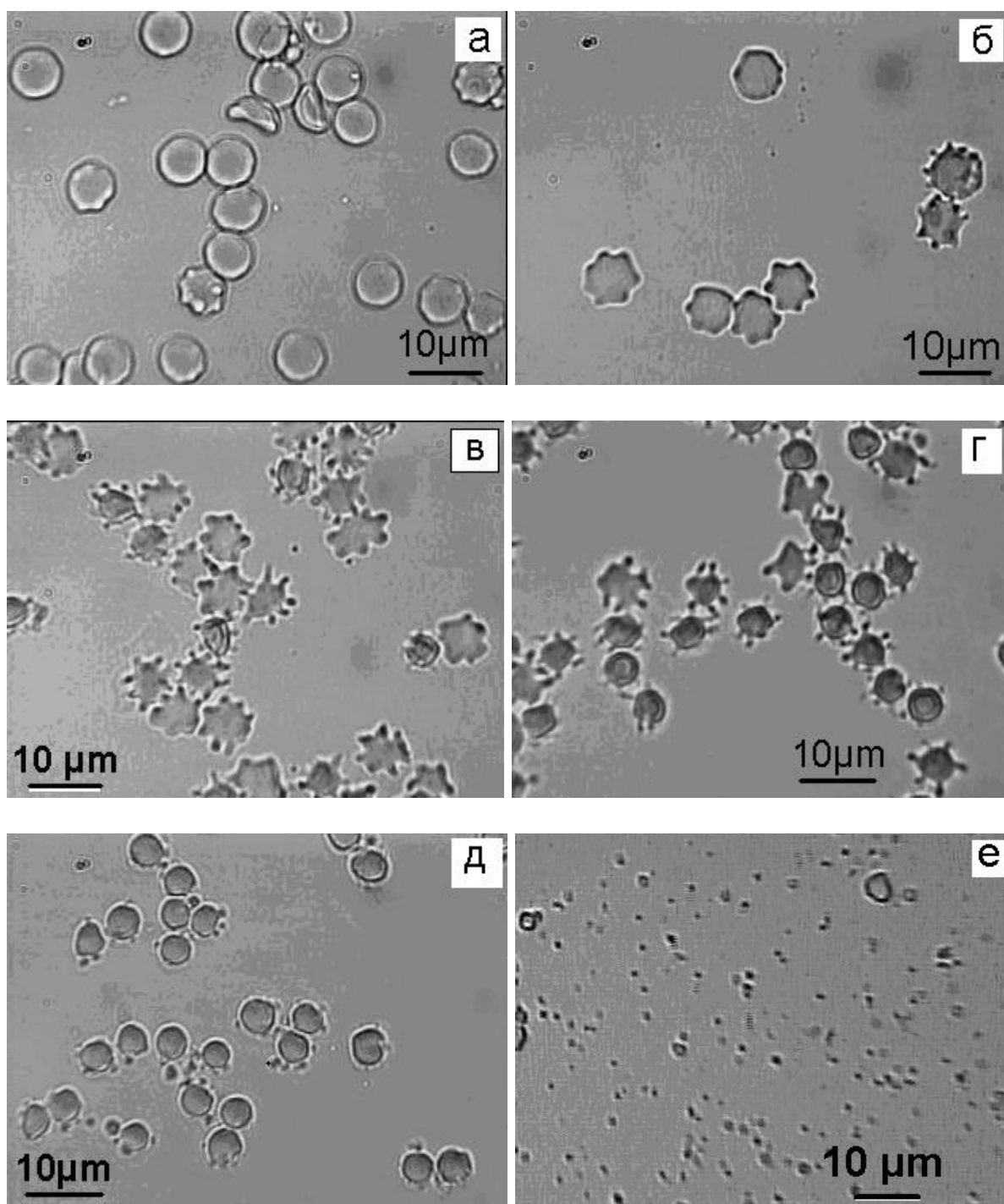


Рис. 3.8. Этапы деформации эритроцитов крысы и формирования спикул от вершин изгибов (б, в), приводящие к образованию сфероподобного остова (г, д) и отслоившихся везикул (е) при температурах: б – 48; в – 49; г – 50; д, е – 51°C; а – контроль.

Значимые различия формы эритроцитов в контроле и нагретых до температуры 46°C не наблюдались. Однако уже при 48 °C у основной массы

клеток на периферии дискоцита возникал волнообразный рельеф (рис. 3.8, б), изгибы которого, по мере повышения температуры, становятся более выраженными, а их количество возрастает (рис. 3.8, в, г).

При температурах 49–50°C клетки трансформируются в сфероэритроциты с большим количеством мембранных выростов – спикул. В области температур 50–51 °C происходит практически полное отслоение от эритроцитов спикул и формирование везикул, а также сфероподобного, меньших размеров остова – сфероцита (рис. 3.8, г, д).

Более детально исследован и наглядно проиллюстрирован для данных условий процесс трансформации эритроцитов крысы методом РЭМ (рис. 3.9). Волнообразная деформация поверхности клетки и формирование спикул от вершин изгибов при температурах 48–49°C, при дальнейшем нагреве приводят к формированию сфероподобного остова (4–5 мкм в диаметре) и мелких, от 0,3 до 1,5 мкм, везикул (рис. 3.8, е; 3.9, г). Данная трансформация формы клеток была характерна, в большей степени, для эритроцитов крысы. С нашей точки зрения, лимитирующим фактором, определяющим размер остова, может быть предел уплотнения собственно цитоскелета [15], поскольку согласно данным литературы и нашим исследованиям везикулы, образованные мембранным материалом, не содержат фрагментов цитоскелета [107].

Эритроциты человека до 46°C также не претерпевают значимых изменений в морфологии клетки, при этой температуре отмечается лишь незначительное уплощение клетки и увеличение, в среднем, на 0,5–0,7 мкм, их размера. У части клеток эта тенденция сохраняется и до 48°C. Однако в области температур 49–50°C отмечается качественно иная трансформация эритроцитов: наблюдается сферолизация и уменьшение их размеров, в среднем, до 5–5,5 мкм, набухание и «разрыхление» поверхности (рис. 3.10, д; 3.11, а), что свидетельствует о частичной потере мембранного материала. На поверхности клеток наблюдались спикулы, диаметр которых колебался от 0,2 до 0,5 мкм (рис. 3.11). У некоторых клеток на поверхности формируются

глубокие поперечные перетяжки, приводящие к фрагментации эритроцита и образованию крупных, до 3-4 мкм в диаметре, везикул (рис.3.10, д, е; 3.11, б).

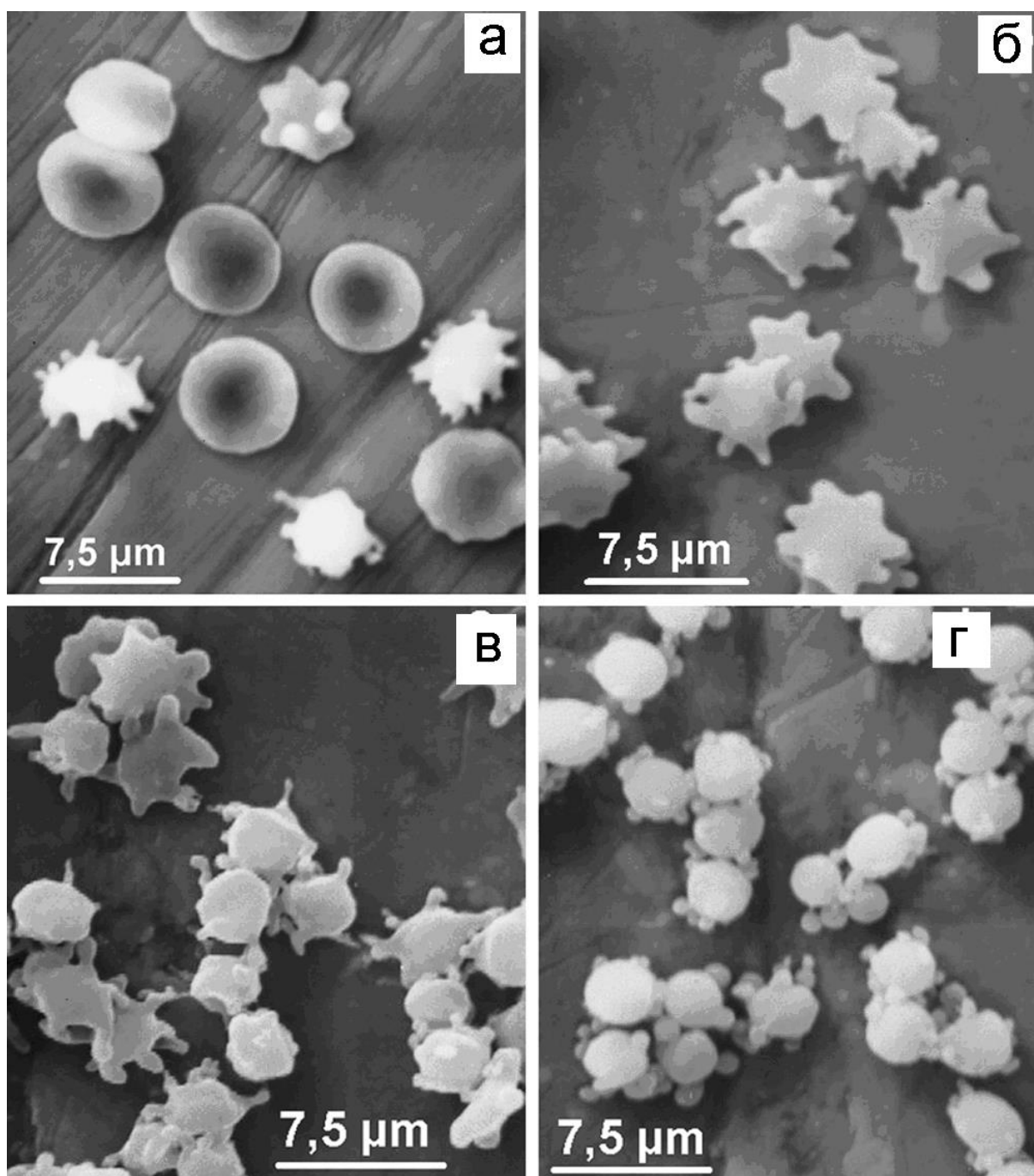


Рис. 3.9. Этапы деформации поверхности эритроцитов крысы и формирования спикул от вершин изгибов (б, в), приводящие к образованию сфероподобного остова (в, г) при температурах: а – 46- 48°C; б – 49°C; в – 50°C; г- 51°C.

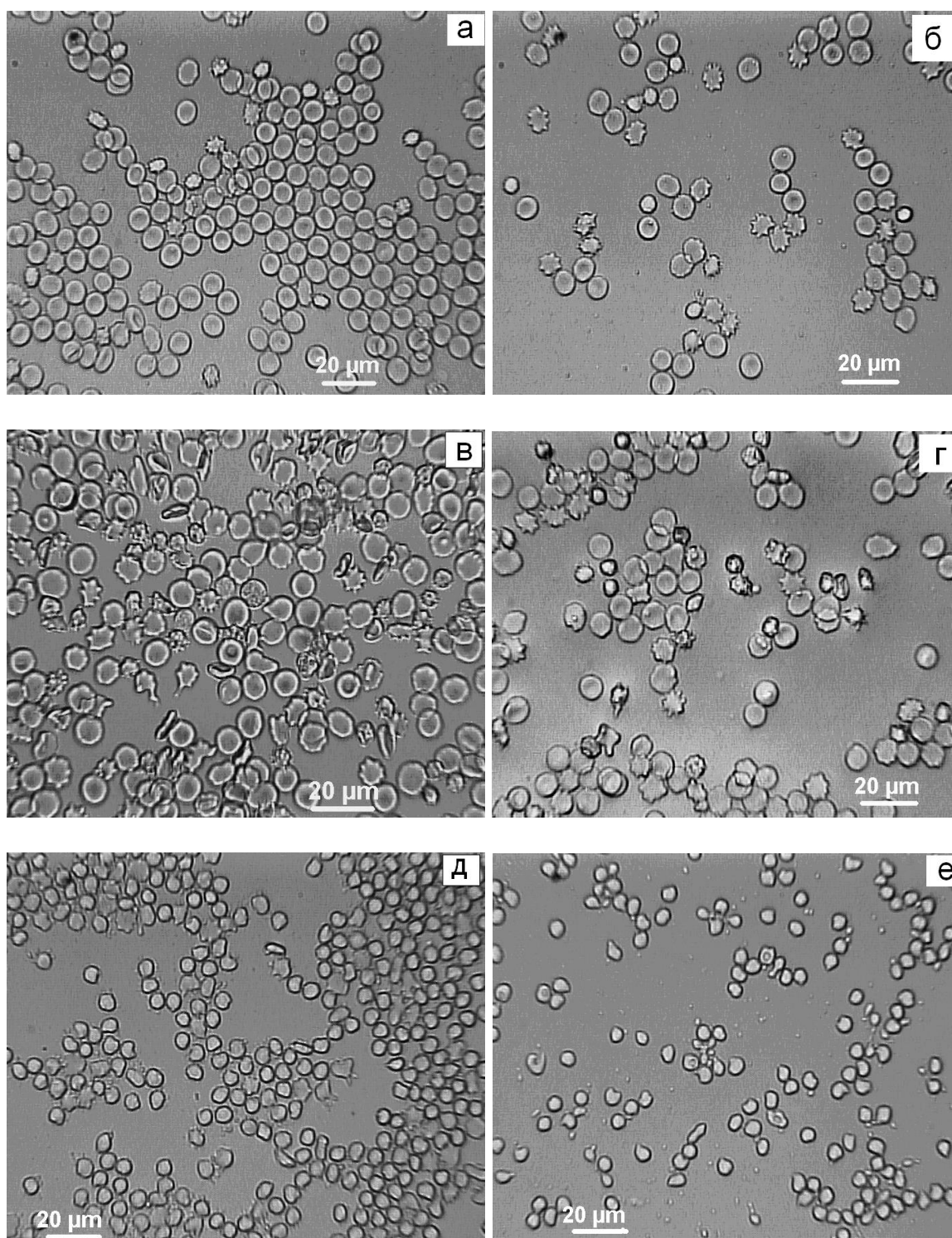


Рис. 3.10. Последовательность трансформации эритроцитов человека в интервале температур 46–50°C: а – контроль; б–г – эритроциты, нагретые до 48°C и фиксированные от температур: 48 – (б); 20 – (в) и 4°C – (г). Образование сфероподобного остова, а также крупных, до 3,5 мкм в диаметре, и мелких, до 1,5 мкм, везикул при температурах 49 - 50°C (д, е).

Мы провели оценку трансформации эритроцитов, нагретых до 48°C, при снижении их температуры до 20 и 4°C с последующей фиксацией ГА при этих температурах. Как видно из рисунка 3.10 (б–г), эритроциты при данной процедуре в основном сохраняют макрохарактеристики формы, однако наблюдается их уплощение и возрастание диаметра, в среднем, на 0,5 мкм, связываемые с частичным расслаблением спектриновых молекул. В этих условиях вероятность восстановления формы эритроцитов достаточно велика. При 50°C и выше изменения, сопровождаемые фрагментацией, везикуляцией – потерей мембранного материала, свидетельствуют о необратимых процессах, происходящих в структуре клетки (рис.3.10, д, е).

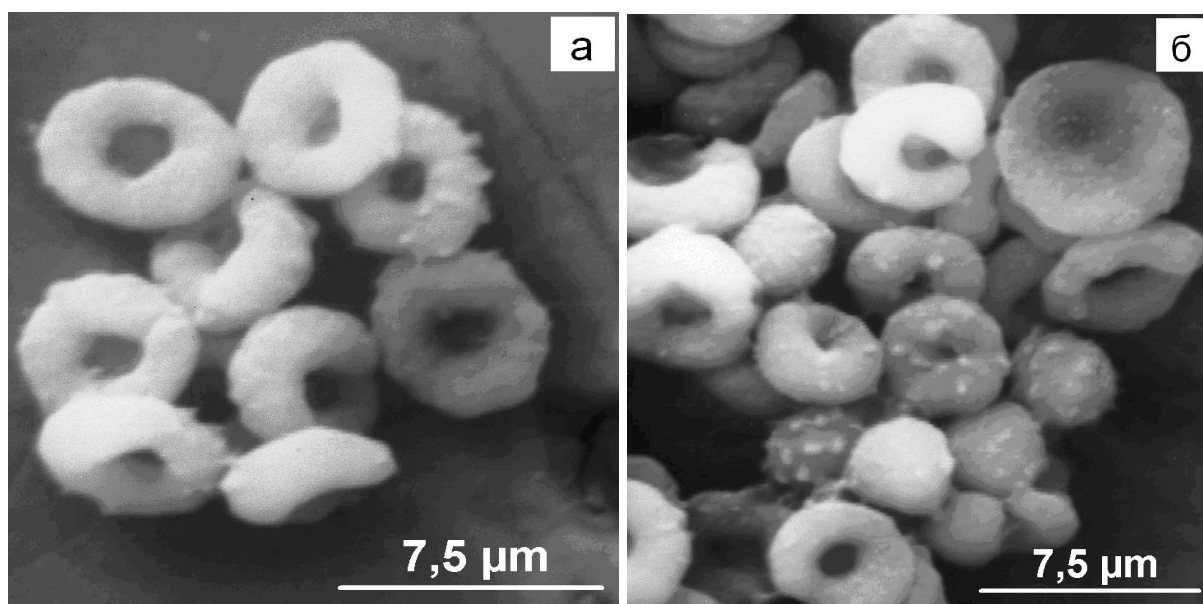


Рис. 3.11. Последовательность трансформации эритроцитов донора при температурах 49 (а) и 50°C (б). «Набухание и разрыхление» поверхности (а) и образование крупных, до 3,5 мкм в диаметре, и мелких, до 1,5 мкм, везикул (б).

Для эритроцитов кордовой крови в большей степени был характерен второй вариант изменения морфологии в области температур 49–50°C, а именно, формирование глубоких поперечных перетяжек, приводящих к фрагментации эритроцита и образованию крупных, до 3–4 мкм в диаметре, везикул (рис. 3.12 б, в). Как и в предыдущем случае, уменьшение размеров

эритроцитов до 5–5,5 мкм также были характерны для данного объекта исследования (рис. 3.6, б, г). Следует отметить, что большая гетерогенность эритроцитов кордовой крови по размерам приводила к более выраженным и разнообразным изменениям их формы в результате нагрева эритроцитов и термоденатурации спектрина. Фиксация глутаральдегидом охлажденных до температур 20 и 4°C клеток с денатурированным спектрином показала, что и в этих условиях доминирующим процессом является фрагментация, а снижение температуры – фактор, стимулирующий распад клеток и их дальнейшую морфологическую трансформацию.

Ранее было обнаружено существование в мембранах эритроцитов кордовой крови участков, свободных от контакта со спектрином [215]. Эти данные достаточно хорошо коррелируют с обнаруженной нами у эритроцитов новорожденных большей склонности к формированию глубоких, поперечных перетяжек, приводящих к фрагментации эритроцита. Особенности механических свойств эритроцитов новорожденных отмечены в работе [216]. Они могут объясняться значительным различием в параметрах теплопоглощения т.н. А- и В-переходов, в которые вовлечены белки спектриновой сети мембраны (спектрин, анкирин, актин, белок 4.1 и 4.2) [203, 210], по сравнению с эритроцитами донора.

Обращает на себя внимание и тот факт, что, несмотря на столь значимые нарушения в морфологии самой клетки (рис. 3,9; 3,10, в; 3,12, б), величина гемолиза была не столь существенной. В среднем, для эритроцитов донора и кордовой крови человека она составляла 4–4,5%, а для эритроцитов крысы 5–5,3% (рис. 3.13). То есть общепринятый показатель повреждения эритроцитов – «величина гемолиза», не всегда адекватно отражает степень нарушения клетки.

Это свидетельствует о том, что мембрана эритроцитов в этих условиях сохраняет способность к «самозапечатыванию» – залечиванию дефектов, образующихся при фрагментации эритроцитов, и вместе с находящимся

внутри крупной везикулы фрагментом цитоскелета обеспечивает сохранность (удержание) молекул гемоглобина во внутреннем объеме.

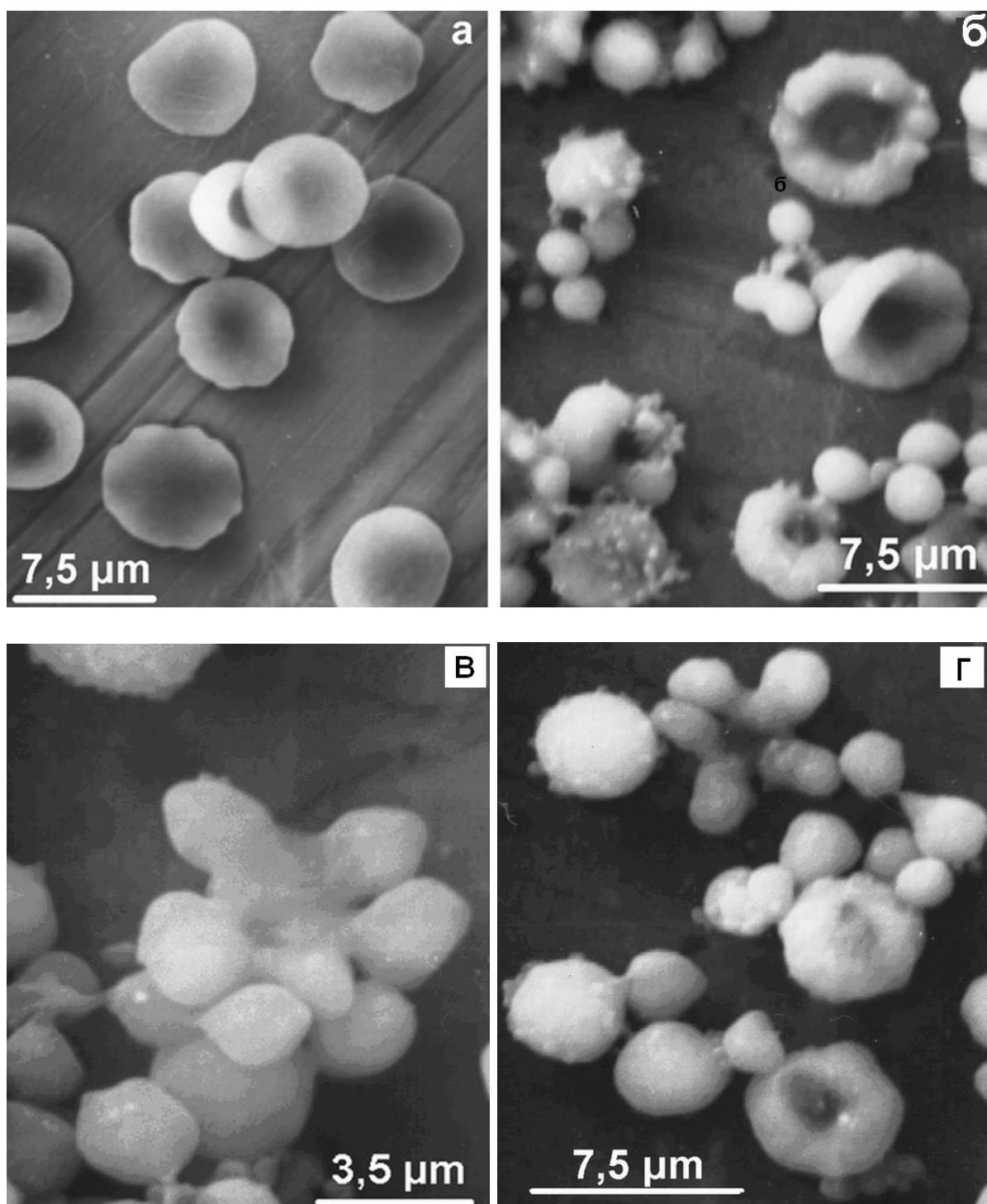


Рис. 3.12. Последовательность изменения формы и фрагментации эритроцитов кордовой крови при температурах: а – 46; б – 48; в– 50; г–51°C.

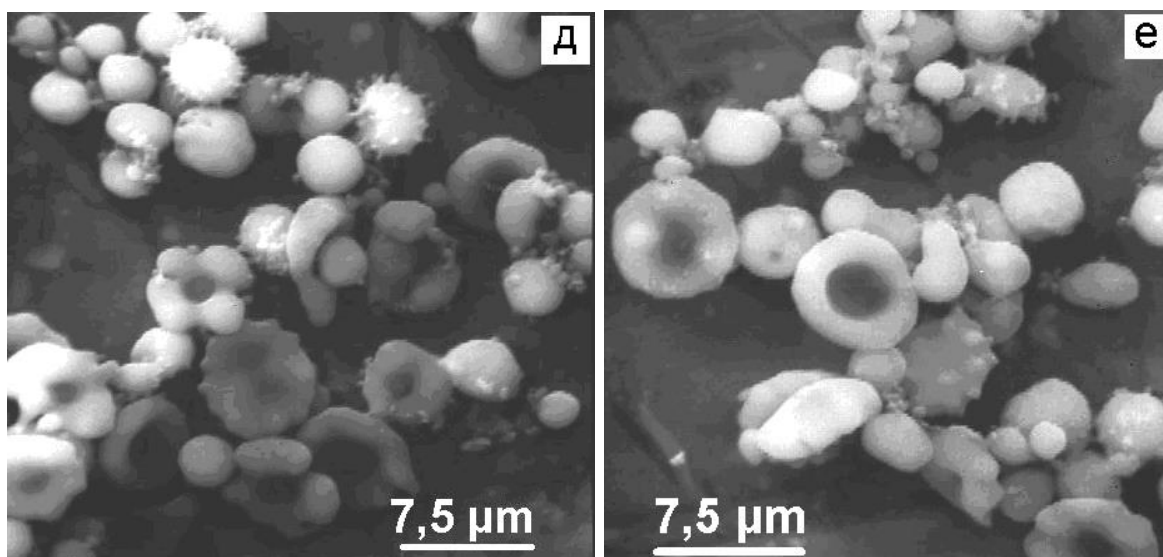


Рис. 3.12 (продолжение). Образование крупных, до 3,5 мкм в диаметре, везикул. Эритроциты, нагретые до 50°C и охлажденные до 20 и 4°C (д, е).

Нами отмечено также отличие эритроцитов кордовой крови от эритроцитов крысы и донорской крови человека, проявляющееся у эритроцитов кордовой крови в снижении температуры начала морфологических изменений, а также в характере деформации и везикулообразования, что может свидетельствовать об их меньшей термоустойчивости.

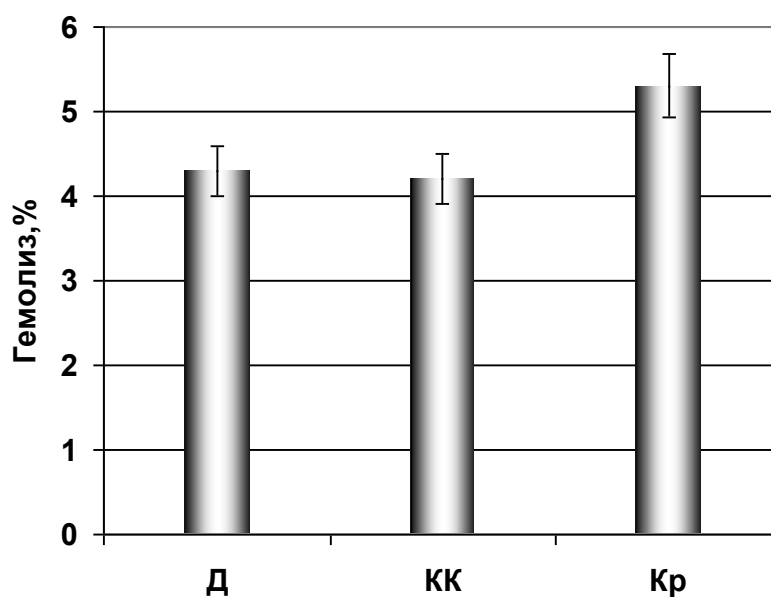


Рис. 3.13. Величина гемолиза эритроцитов донора (Д), кордовой крови человека (КК) и крысы (Кр) после нагрева клеток до 50°C.

Причина большей деформируемости эритроцитов кордовой крови и их меньшей термоустойчивости может быть связана с несколькими моментами.

Во-первых, популяция эритроцитов кордовой крови, по данным оптической микроскопии, более гетерогенна с большим средним значением диаметра (8,8 мкм), в то время как средний диаметр эритроцитов взрослого человека составляет 7,3 мкм, а эритроцитов крысы и того меньше – 6,5 мкм (рис. 3.7).

Во-вторых, известно, что гемоглобин эритроцитов кордовой крови обладает меньшей термостабильностью [217] и в большей степени подвержен окислению до метгемоглобина при нагреве, нежели гемоглобин эритроцитов взрослого донора. Данные по исследованию термогемолиза свидетельствуют, что эритроциты с повышенным содержанием мет-Нв гемолизуют при нагреве в первую очередь [218].

В-третьих, необходимо также отметить ряд функциональных отличий, присущих эритроцитам кордовой крови: более короткая продолжительность жизни, более низкая деформируемость и механическая стабильность при физиологических температурах, а также сниженная проницаемость для воды, $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ и неэлектролитов [216]. Указанные различия, очевидно, связаны с адаптацией данных эритроцитов к условиям газообмена и кровообращения плода.

Поскольку качественных различий в белковом и липидном составе мембран эритроцитов крысы, донора и кордовой крови по данным литературы не выявлено, естественно предположить, что причина различия в поведении эритроцитов при гипертермии кроется в особенностях структурной организации их мембранного скелета [219].

Объяснение указанному выше факту, что гемолизу предшествуют значительные перестройки в структуре мембраны, следует искать в более тонких, нежели морфология клетки, перестройках в цитоскелет-мембранном комплексе.

Для проверки этого мы провели исследование ультраструктуры мембраны эритроцитов при нагреве до 50°C методом замораживания-скалывания. Это позволило наблюдать характер распределения ВМЧ (трансмембранных белков) в плоскости скола мембраны (РФ и ЕФ-поверхности) при термоденатурации спектрина.

Экспозиция клеток при 50°C в течение 15 минут и последующее охлаждение до 37, 20 или 4°C вызывало выраженную агрегацию ВМЧ. По характеру распределения частиц мы наблюдали два вида РФ-поверхностей скола мембран эритроцитов. Мембраны, в которых ВМЧ образовывали большие скопления с появлением обширных свободных от белков участков (рис. 3.14, б), и мембраны, в которых агрегация частиц проявлялась в виде непрерывной сети (рис. 3.15, а).

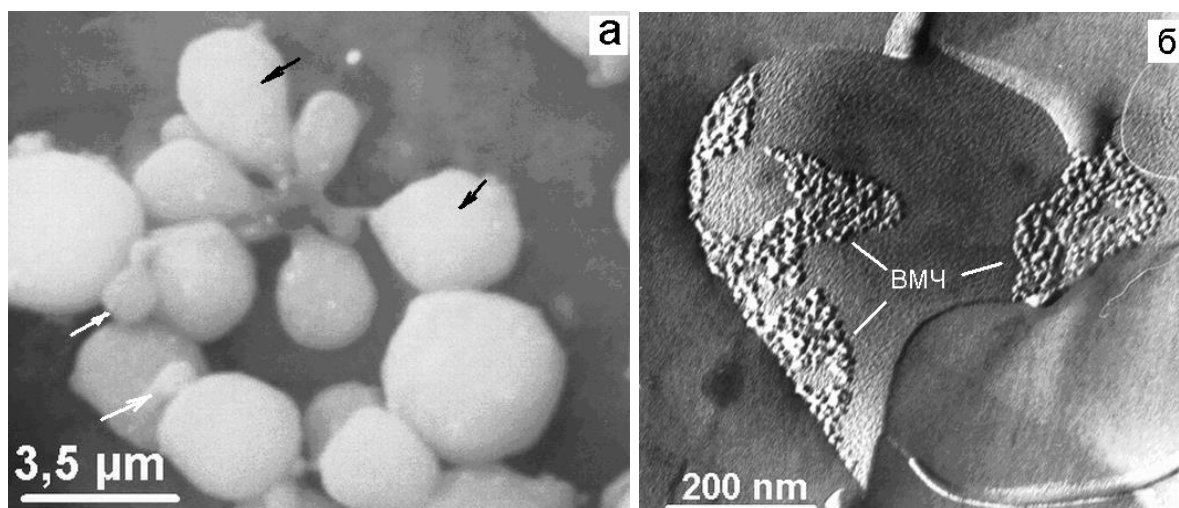


Рис. 3.14. Эритроциты, экспонированные 15 минут при 50°C (термоденатурация спектрина) и охлажденные до 4°C:

а – фрагментация эритроцитов после термоденатурации спектрина и последующего охлаждения. Формирование больших везикул (темные стрелки);
б – интенсивная агрегация ВМЧ с появлением больших, свободных от белков участков липидов, что характерно для малых (белые стрелки) везикул.

Отметим, что морфология и размеры ячеек сети, образованной трансмембранными белками на поверхности скола (рис.3.15, а), хорошо

коррелируют с морфологической картиной и размерами элементарной ячейки цитоскелета, представленных в литературе (рис. 3.15, б).

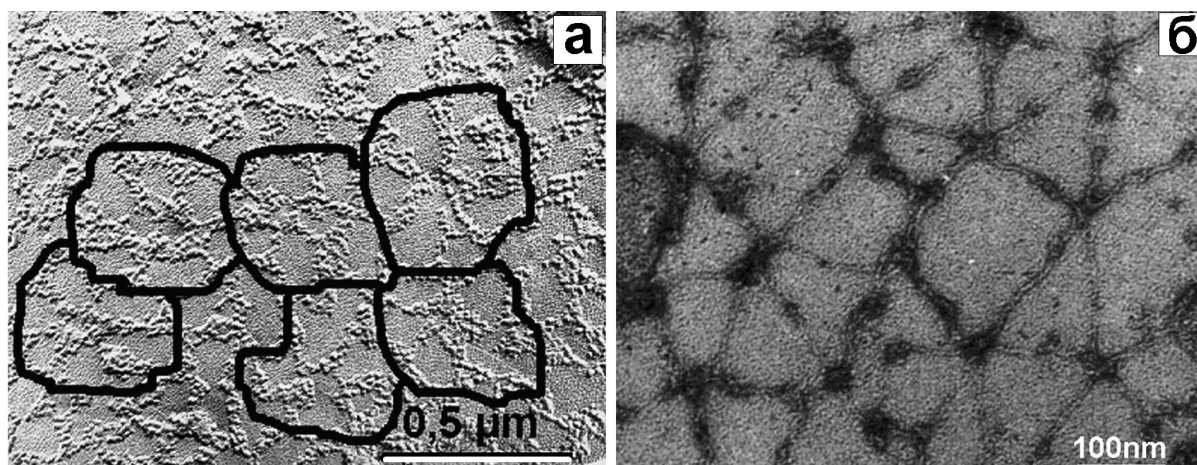


Рис. 3.15 Ультраструктура мембраны (а) и цитоскелета (б) эритроцита:

а – характерная, в виде непрерывной сети агрегация ВМЧ, в эритроцитах после 15-минутной экспозиции при 50°C и охлаждения до 4°C;

б – мембранная скелетная сеть по данным литературы [220].

Два наблюдаемых варианта агрегации ВМЧ соответствуют двум типам везикул, образующихся при нагреве до 50°C, – мелким (до 1–1,5 мкм), предположительно бесспектриновым, и крупным, вероятно содержащим денатурированный спектрин.

В первом случае, дополнительное температурное воздействие – снижение температуры до 4°C, вызывало интенсивную агрегацию ВМЧ. Индуцированное охлаждением формирование больших скоплений агрегированных частиц, и обширных, свободных от ВМЧ участков свидетельствуют об увеличении латеральной подвижности трансмембранных белков при устранении ограничений на их подвижность в плоскости мембраны, что возможно только при отсутствии цитоскелета или его взаимодействия с мембраной. Известно, что именно формирование дисульфидных мостиков между трансмембранными белками и белками цитоскелета – спектрином, актином, белком 4.1, обеспечивает удержание

основной массы трансмембранных белков, приходящихся на элементарную ячейку цитоскелета, в ее пределах [190].

Характер агрегации ВМЧ в виде непрерывной сети несколько неожиданный и отличается от классических примеров агрегации, вызванной действием мембранотропных веществ [221], температуры [11] и, в меньшей степени, низким рН [222].

В вопросе о причине такой организации мембранных белков после охлаждения эритроцитов с термоденатурированным спектрином, следует обсудить несколько моментов.

1. Не все мембранные белки имеют высокое сродство к спектрину. Известно, что в норме только около 40 % белка полосы 3 достаточно прочно связаны с цитоскелетом мембраны, а остальные 60% не связаны прочной связью с мембранным скелетом [223]. Именно этим можно объяснить хаотическое распределение ВМЧ в нативной мембране (37°C, рН 7,2-7,4).

2. Возможное усиление взаимодействия с липидным бислоем не может таким образом влиять на трансмембранные белки, поскольку, наблюдаемое при повышении температуры разжижение липидного бислоя наоборот приводит к увеличению латеральной и вращательной подвижности «свободных» трансмембранных белков, а последующие снижение температуры и кластеризация липидов могут вызвать и вызывают иной, менее выраженный тип агрегации ВМЧ. Это подтверждают данные об обратимости структурных переходов в липидах нативной мембраны при ее нагреве-охлаждении в области температур 4–37°C [224].

3. Возможность изменения структуры БПЗ при нагреве до 50°C также маловероятна. Известно, что БПЗ более «высокотемпературный» белок, поскольку его гидрофильные фрагменты денатурируют при 55–56°C, а гидрофобный участок – при 60°C [203, 210].

4. Два альтернативных события имеют место при гипертермии. С одной стороны, фрагментация клеток, образование везикул и значительная агрегация ВМЧ свидетельствуют в пользу существенных нарушений в

структурном состоянии цитоскелета, поскольку известно, что именно он в большей степени обеспечивает динамическую устойчивость эритроцита [225, 226]. С другой стороны, если распределение ВМЧ (их прочно связанная с цитоскелетом мембраны часть) в виде сети отражает структуру спектриновой сети, то следует вывод, что при нагреве в эритроцитах мембранный скелет еще сохраняет свою ячеистую структуру.

Данные литературы также не позволяют однозначно прояснить такое распределение. Хорошо известно, что спектрин локально регулирует мембранную жесткость, адсорбируясь на цитоплазматической поверхности бислоя. При денатурации спектрина происходит его частичная десорбция от мембраны, что, вероятно, ведет к увеличению растяжимости цитоскелета. Этот эффект, как предполагают [227], ответственен за увеличение критического клеточного объема. В тоже время показано, что при повышении температуры до 46°C спектрин становится повышенно устойчивым к низкоионной экстракции и при 50°C не экстрагируется.

Исследования, проведенные в работе [187] показывают, что нагревание эритроцитов человека при 50°C помимо воздействия на мембранную скелетную динамику и взаимодействие с мембранным бислоем, также затрагивает спектриновое димер-тетрамер равновесие. Также, в работе отмечается, что мембранный белковый состав в нагретых клетках изменен главным образом вследствие сильной ассоциации между скелетными и цитозольными белками. Однако, по мнению авторов, существующие данные не достаточны, чтобы установить, вызвана ли эта ассоциация структурными изменениями в спектрине и возможной, вызванной высокой температурой денатурацией цитозольных белков, или это взаимодействие белковых компонентов мембраны со скелетом служит для обеспечения его защиты от вызванного высокой температурой структурного повреждения [187].

Полученные нами ультраструктурные данные также указывают на усиление взаимодействия между трансмембранными белками и спектриновой сетью при гипертермии.

Необходимо также учитывать тот факт, что морфологические изменения в клетках во многом связаны с уровнем АТФ [228, 229]. Однако, как показано в работе [187], нагревание эритроцитов человека при 50°C в течение 15 минут не вызывало значительного изменения в уровне внутриклеточной АТФ (нормальные эритроциты – 1.02 ± 0.16 ; нагретые эритроциты – 0.97 ± 0.09 mmol/1 клетку) и GSH (158 ± 1.6 и 162 ± 2.9 мг/100 мл клеток). Авторы также указывают, что эта обработка преобразовывала форму клетки из дискоцита в сфероциты и «пойкилоциты». Аналогичные морфологические изменения эритроцитов были отмечены в более ранних исследованиях [213].

Таким образом, анализ данных, полученных в данном разделе исследований, позволяет заключить:

- характер распределения ВМЧ отражает динамику белок-липидных взаимодействий и определяется структурно-функциональным состоянием мембраны и ее цитоскелета, а нарушение взаимодействия цитоскелет-мембрана лишает эритроциты механизма структурной адаптации к температурному и другим воздействиям.
- нагрев до 50°C и последующее снижение температуры вызывает необратимые изменения морфологии эритроцитов, проявляющиеся в фрагментации эритроцитов и образовании везикул. В этих условиях мембрана сохраняет способность к «самозапечатыванию» – залечиванию дефектов, образующихся при фрагментации эритроцитов, о чем свидетельствует низкий уровень гемолиза эритроцитов.
- наблюдаемая при гипертермии агрегация ВМЧ в виде непрерывной сети, аналогичной спектриновой сети цитоскелета, свидетельствует об усилении сродства молекул спектрина с мембранными белками эритроцита. Агрегация ВМЧ в виде больших скоплений в везикулах менее 1мкм свидетельствует либо об отсутствии в них фрагментов цитоскелета или его взаимодействия с мембраной.

Кроме того, данные литературы, а также наши исследования (см. следующие главы) позволяют выделить два основных фактора, приводящих к структурным перестройкам в мембране и повреждающее действие которых связано с рядом ключевых проблем криобиологии:

– **температурный фактор**, вызывающий механические повреждения, вызванные кристаллообразованием и проявляющиеся в неоднородной деформации мембранной поверхности [171]; фазовые переходы в липидах [180] и перестройки в липид-белковых комплексах [11, 226, 230], что непосредственно связано с агрегацией белков мембраны и изменением взаимодействия мембрана-цитоскелет (изменение в распределении ВМЧ между PF- и EF- поверхностями) [11, 231].

– **ионно-осмотический фактор** непосредственно связан с перераспределением ионного состава, изменением pH среды экспозиции [232, 119, 233, 234], а также является результатом дегидратации, вызванной кристаллообразованием, действия криопротекторов и сопровождается локальными изменениями мембраны в виде сжатия и растяжения, перераспределением компонентов мембраны и цитоскелета [171, 223, 235–238].

Таким образом, оба фактора оказывают существенное влияние на характер взаимодействия компонентов мембраны между собой [239], что проявляется в характерном изменении морфологической картины структуры мембраны и клетки в целом. Именно эти моменты могут быть проанализированы методами электронной микроскопии, замораживания-скалывания и будут описаны более детально в следующих главах.

Глава 4. РОЛЬ ФАКТОРОВ СРЕДЫ И ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЭКСПОЗИЦИИ ПРИ 4°C В СОХРАНЕНИИ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ЭРИТРОЦИТОВ И ИХ МЕМБРАНЫ.

Гипотермическое хранение являет собой вариант воздействия, в котором, помимо температуры, существенным фактором, оказывающим влияние на состояние биологических объектов, является длительность экспозиции при пониженных, отличающихся от физиологической нормы температурных условиях. Внутренние защитные механизмы клетки способны обеспечить ее сохранность при кратковременном неблагоприятном воздействии, однако суммирование во времени даже незначительных изменений приводит к качественной трансформации состояния клетки.

Важным моментом в изучении процессов холодового воздействия на клетки является исследование плазматических мембран как одного из наиболее криолабильных ее компонентов [10]. Испытывая в процессе охлаждения или криоконсервирования действие многочисленных физико-химических факторов, клеточная мембрана в большей степени может быть подвержена структурным перестройкам, чем другие мембранные органеллы. Ключевая роль плазматической мембраны в функционировании клеток, предполагает ее участие в приспособительных реакциях.

Нами проведено исследование морфологии эритроцитов, а также их целостности и осмотической устойчивости в условиях изменения ионной силы и pH среды экспозиции, а также при длительном гипотермическом хранении.

4.1. Характер трансформации эритроцитов в зависимости от ионной силы и pH среды экспозиции.

Эритроциты являются удобным биологическим объектом для изучения механических свойств мембраны. Являясь в физиологических условиях двояковогнутыми дисками, их форма во многом зависит от физико-химических факторов среды экспозиции, оказывающих влияние на величину

внутриклеточного pH и трансмембранного потенциала, протонизацию спектрина и изменение конформации трансмембранных белков [13, 118, 240–242]. Изменение ионной силы и pH внешней среды затрагивает комплекс процессов, приводящих к нарушению ионного гомеостаза клетки и изменяющих ее объем, размер и форму [12].

При модификации физико-химических факторов среды экспозиции изменение формы клетки чаще всего происходит в течение секунд и обратимо при восстановлении физиологических условий [243], что позволяет предположить, что процесс трансформации, является результатом нарушения слабых, нековалентных взаимодействий между структурными компонентами плазматической мембраны и цитоскелета.

Механизм изменения формы можно достаточно хорошо объясняется изменением соотношения площадей двух монослоев мембраны при внедрении эндо- или экзогенных компонентов во внутренний или внешний слои липидного бислоя [12]. Так, с помощью производных ремантадина, имеющих различный заряд и встраивающихся, соответственно, в разные слои мембранного бислоя, показано, что увеличение площади внешнего липидного бислоя приводит к эффекту «положительной кривизны» – эхиноцитозу, а уменьшение – к стоматоцитозу [244].

Существует несколько гипотез, в той или иной степени объясняющих механизм изменения эритроцитарной формы. Установлено, что анионный обменник - белок полосы 3 (БПЗ) - играет главную роль в поддержании эритроцитарной формы, поскольку обладает рядом свойств, необходимых для выполнения этих функций [118, 237]. Предложен механизм трансформации эритроцитов, при котором конформационные изменения БПЗ контролируют соотношение его цитоплазматического и трансмембранного доменов, что сопровождается изменением площади соответствующего липидного монослоя, а также сокращением или расслаблением спектрина [14].

Однако множество механизмов изменения формы эритроцита, вызванного действием различных факторов, не могут быть объяснены в рамках какой-либо из существующих моделей-гипотез. В этой связи выяснение роли цитоскелет-мембранного комплекса в обеспечении адаптационных реакций клетки в ответ на экстремальные воздействия является важнейшей проблемой мембранологии.

Эксперименты выполнены на эритроцитах цельной донорской крови II группы (в каждой группе 5 доноров), трижды отмытых от плазмы и форменных элементов раствором фосфатно-солевого буфера (130 мМ NaCl; 5,6 мМ глюкозы; 20 мМ фосфатного буфера (ФБ); pH 7,2) центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин. Клетки (20%-й гематокрит) инкубировали 30 мин при комнатной температуре в средах различного состава: электролитные – среда 1 (130 мМ NaCl; pH 5,4; 7,2; 8,6) и среда 2 (130 мМ KCl; pH 5,4; 7,2; 8,6); слабоэлектролитные (неэлектролитные) – среда 3 (260 мМ маннита; pH 5,4; 7,2; 8,6) и среда 4 (260 мМ сахарозы; pH 5,4; 7,2; 8,6). Все исследуемые среды содержали 20 мМ ФБ.

Анализ изменения формы эритроцитов методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) показал, что в средах, содержащих 130 мМ NaCl или KCl, эритроциты сохраняют форму двояковогнутого диска со средним размером 6,6–7,0 мкм при нейтральных значениях pH (рис.4.1). При кислых значениях pH наблюдаются незначительное набухание вогнутой части диска и уменьшение размеров клеток до 5,8–6,2 мкм, а в среде KCl – появление клеток стоматоцитарной формы. При щелочных значениях pH в средах, с NaCl и KCl эритроциты принимают уплощенную дисковидную форму со средним размером 6,8–7,1 мкм (Рис.4.1).

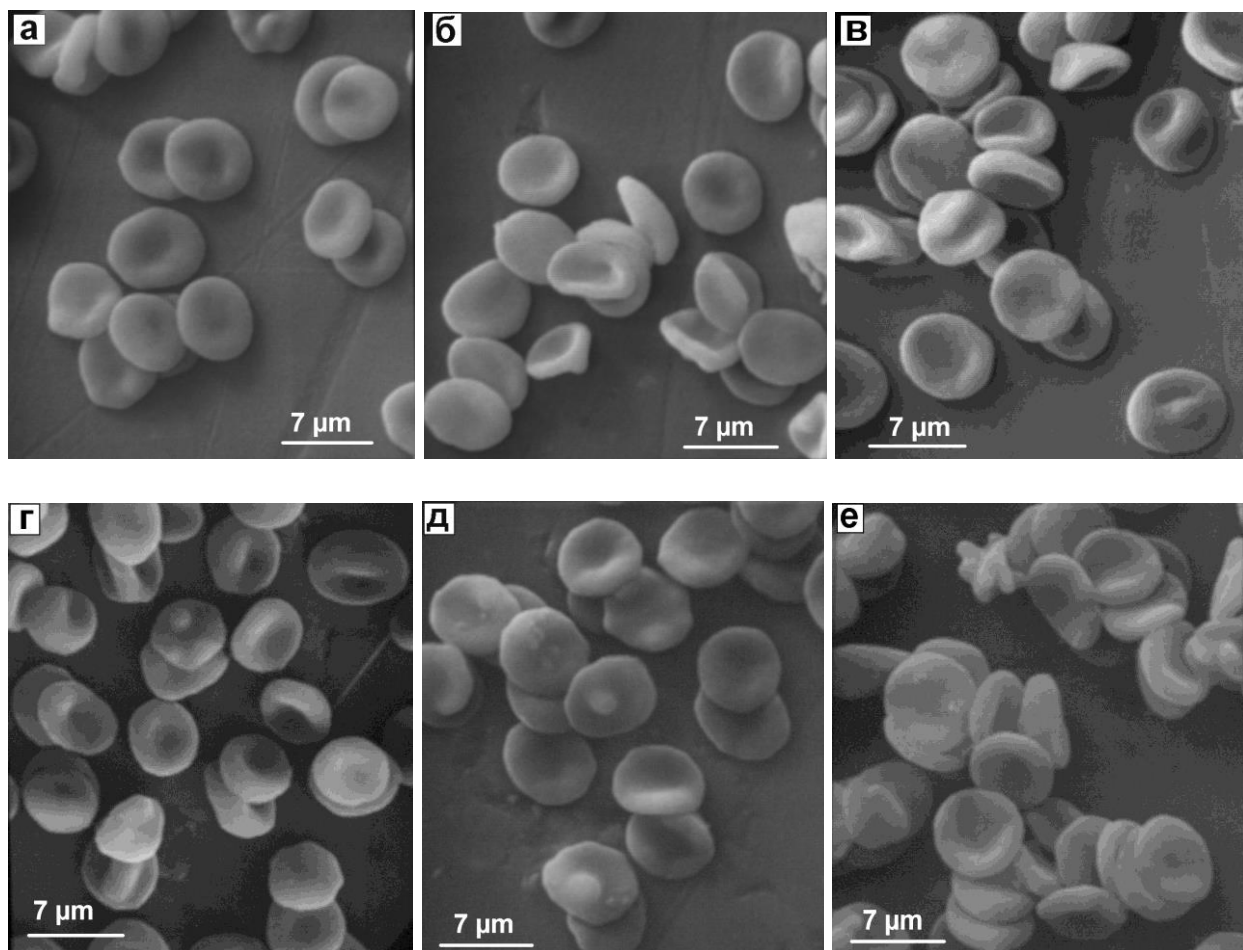


Рис. 4.1. Эритроциты после 30-минутной экспозиции при 20°C в электролитных средах, содержащих ФБ: (а–в) – среда 1; (г–е) – среда 2, рН 5,4 (а, г); 7,2 (б, д); 8,6 (в, е).

Методом проточной цитофлуориметрии также был проведен качественный сравнительный анализ морфологического состояния эритроцитов (30000 клеток) в средах с разными значениями ионной силы и рН по параметру FSC, отражающему размеры клеток (соотношение двух проекций клетки). Как видно из данных рис. 4.2, в электролитных средах (среда 1 и 2) эритроциты представлены гомогенной популяцией и имеют примерно одинаковые гистограммы распределения (1–6) при всех исследованных значениях рН среды (рис. 4.2, а).

В средах с низкой ионной силой (неэлектролитные среды 3 и 4) наблюдается иной характер изменения формы и размеров клеток в

зависимости от pH среды экспозиции. Данные проточной цитофлуориметрии относительно параметра FSC показали однотипность распределения клеток при кислых и нейтральных значениях pH (гистограммы 1–2, 4–5, рис.4.2, б).

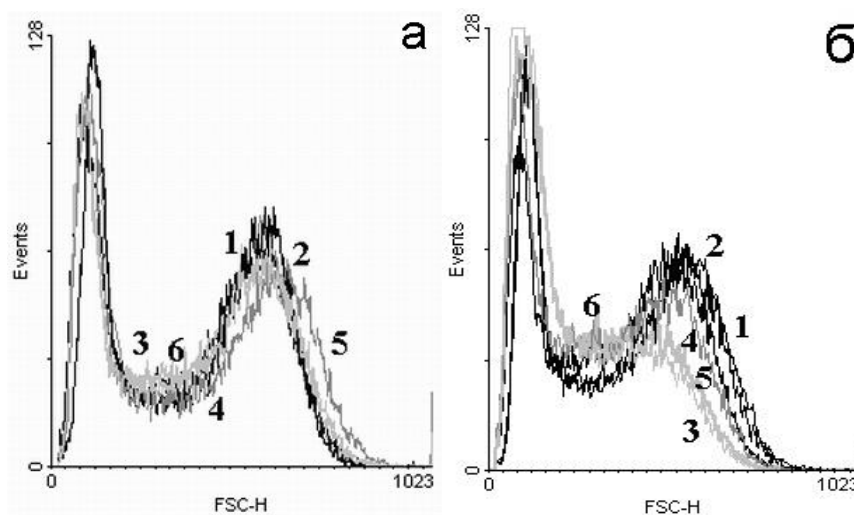


Рис. 4.2. Распределение эритроцитов по параметру FSC после 30-минутной экспозиции при 20°C в разных средах для трех значений pH – 5,4 (гистограммы 1 и 4); 7,2 (гистограммы 2 и 5); 8,6 (гистограммы 3 и 6):

а–электролитные среды (NaCl – 1,2,3 и KCl – 4,5,6);

б– слабозлектролитные среды (манит – 1,2,3 и сахароза – 4,5,6).

При щелочных значениях pH в неэлектролитных средах вид гистограмм качественно отличается в распределении клеток по исследуемому параметру (рис. 4.2, б, светлые кривые, стрелки). Нивелирование второго максимума на FSC–гистограмме свидетельствует о сближении размеров двух проекций клетки, что характерно для ее сферических форм.

По данным РЭМ в неэлектролитных средах, содержащих 260 мМ сахарозы или маннита, при кислых и нейтральных значениях pH эритроциты в значительной степени сохраняют форму дискоцитов и дискоэхиноцитов, а при щелочных – образуются их эхиноцитарные формы (рис. 4.3).

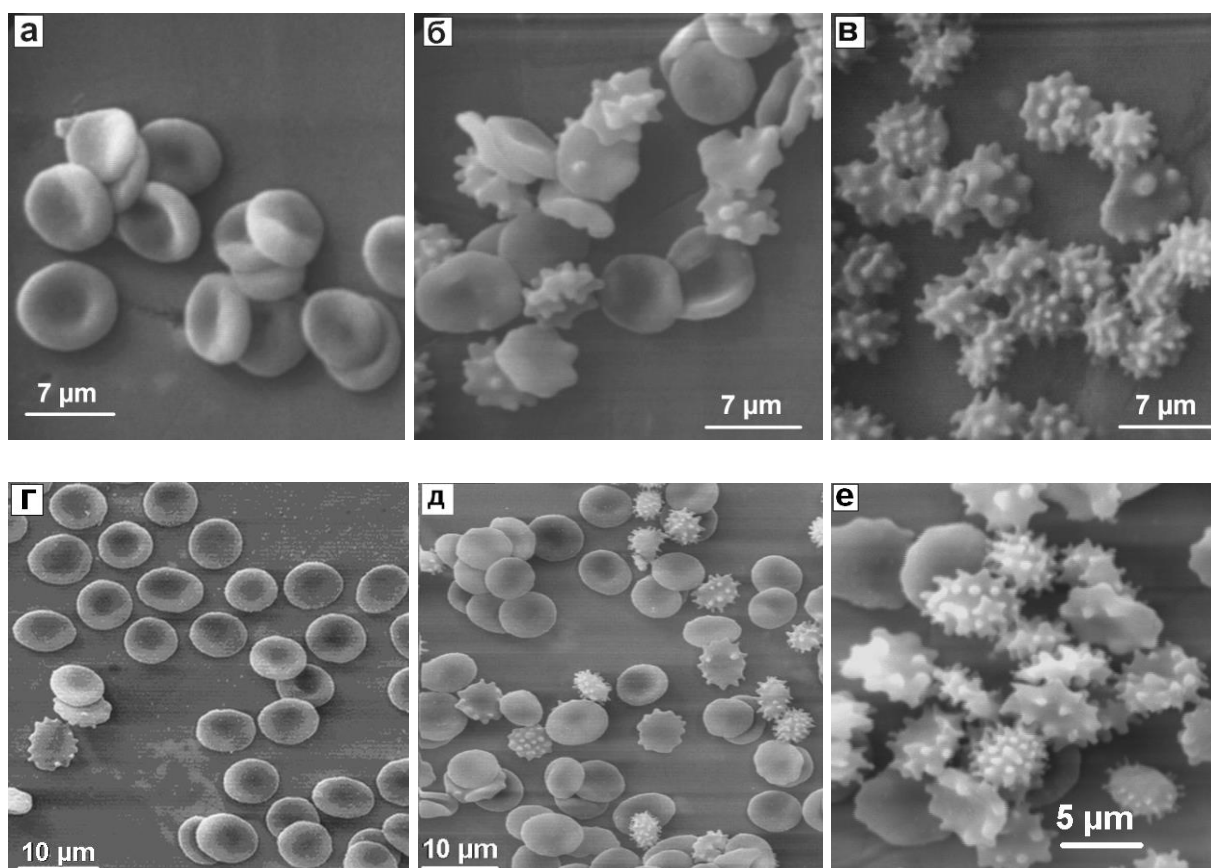


Рис. 4.3. Морфологическое состояние эритроцитов после 30-минутной экспозиции при 20 °С в неэлектролитных средах, содержащих ФБ:
(а–в) – среда 3; (г–е) – среда 4, рН 5,4 (а, г); 7,2 (б, д); 8,6 (в, е).

Аналогичные исследования были проведены с эритроцитами, в среде эквilibрации которых в качестве буферной смеси использовали Трис-НСI буфер, содержащий непроникающую через мембрану эритроцита молекулу Трис. Отметим, что в этих условиях морфологическое состояние клеток изменялось незначительно. В средах, содержащих 130 мМ NaCl или KCl для всех значений рН наблюдались незначительное уменьшение размеров клеток и набухание вогнутой части диска, а также увеличение при всех значениях рН количества клеток стоматоцитарной формы (Рис. 4.4).

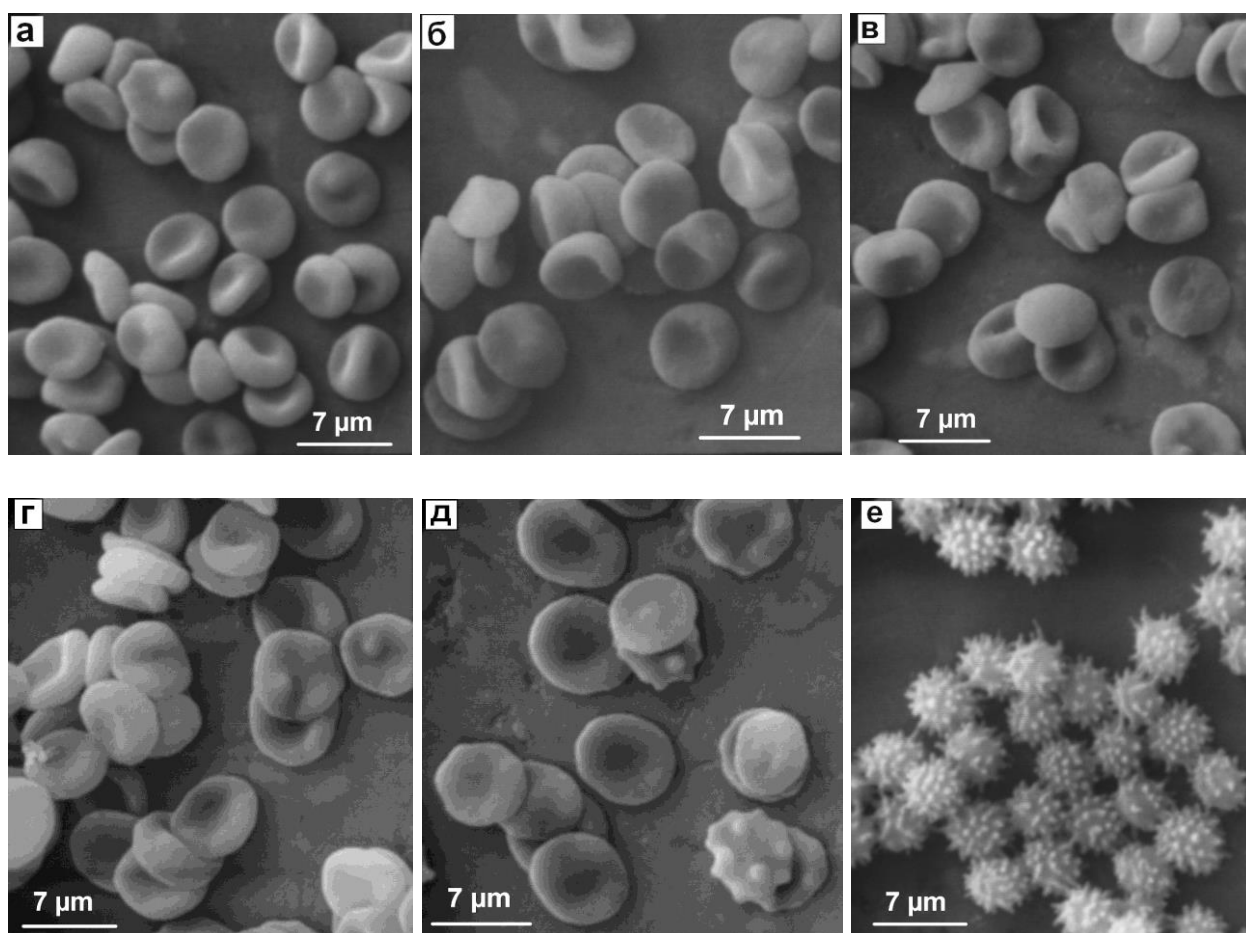


Рис. 4.4. Эритроциты после 30-минутной экспозиции при 20°C в электролитной (среда 1) и неэлектролитной (среда 3) средах, содержащих Трис-HCl буфер, при разных значениях pH.

Для неэлектролитных сред при кислых и нейтральных значениях pH в Трис-буферной среде характерны уплощение дискоидной формы клеток и незначительное увеличение их размеров до 7,0–7,2 мкм. Однако при pH 8,6 наблюдалась более интенсивная эхиноцитарная трансформация клеток с образованием сфероэхиноцитов с диаметром «остова» 4,6–5,1 мкм и содержанием большего количества спикул (рис. 4.4).

Отмеченные выше трансформации эритроцитов достаточно наглядно подтверждаются величиной морфологического индекса, вычисленного для исследуемых экспериментальных условий (рис. 4.5).

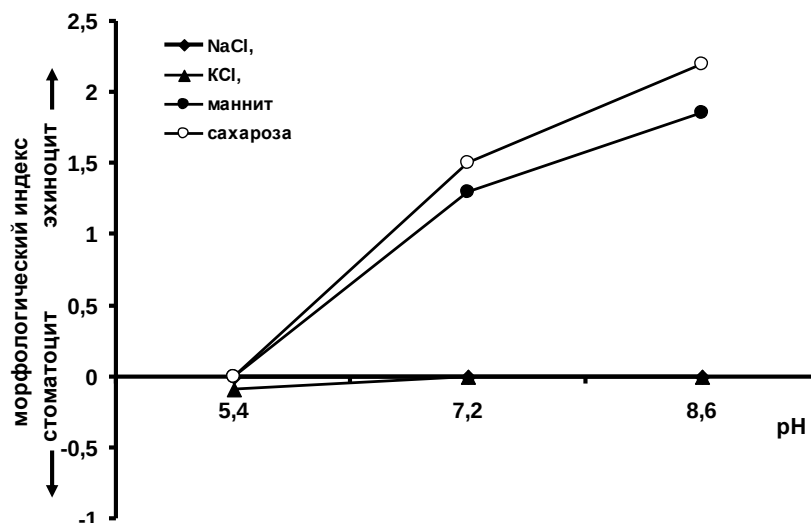


Рис. 4.5. Морфологический индекс формы эритроцитов после 30-минутной экспозиции в средах с различными значениями pH и составом: -◆- — среда 1 (NaCl); -▲- — среда 2 (KCl); -●- — среда 3 (маннит); -○- — среда 4 (сахароза).

Представляло интерес определить связь между исходной формой эритроцитов и их устойчивостью к действию некоторых физико-химических факторов, в частности к действию осмотического фактора. С этой целью мы провели анализ состояния клеток при их экспозиции в средах с разной степенью гипотонии. Такой подход позволяет выявить наличие скрытых дефектов в структуре мембраны клетки. Различие в длительности сохранения эритроцитами целостности в условиях гипотонии является общепринятым тестом их структурно-функционального состояния. Считается нормой, что свежевыделенные эритроциты, помещенные в условия гипотонии (90 мОсоль), гемолизуют через 60 минут.

Проведенные исследования показали, что степень чувствительности клеток при переносе их в гипотонические среды NaCl (90 и 140 мОсоль) определяется составом и значением pH исходной среды экилибрации (рис. 4.6). Максимальной осмотической устойчивостью к гипотонии (90 мОсоль) обладали эритроциты, ранее находившиеся в неэлектролитных средах при щелочных значениях pH и имевшие эхиноцитарную форму. Уровень гипотонического лизиса в этом случае составлял 22,5–25%.

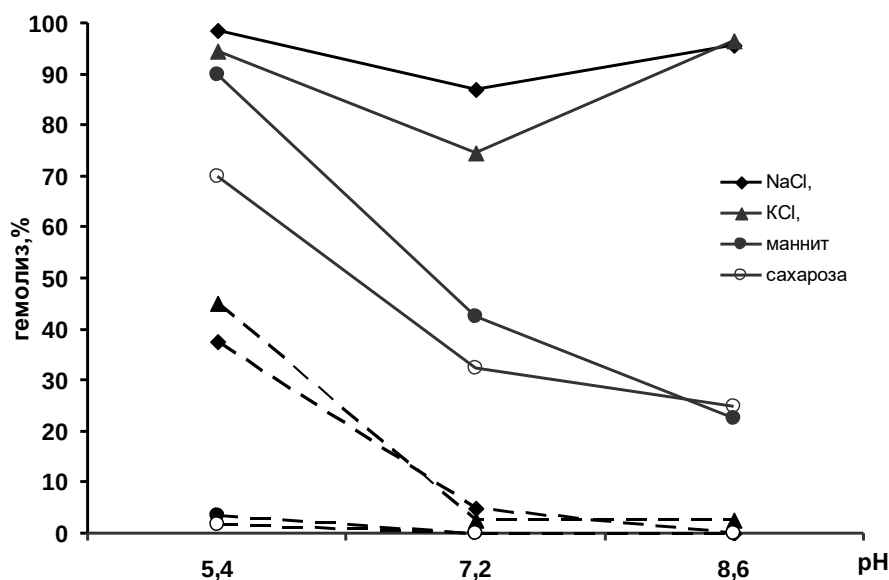


Рис. 4.6. Осмотическая резистентность эритроцитов в 90 (сплошная линия) и 140 мОсмоль (пунктирная линия) гипотонических средах NaCl после 30-минутной инкубации в средах с различным составом и значением pH.

Наиболее чувствительными к снижению осмолярности внешней среды оказались клетки, перенесенные из электролитных (уровень гемолиза 85 – 100 %) и неэлектролитных (уровень гемолиза 70–90 %) сред при кислых значениях pH. При повышении осмолярности раствора NaCl до 140 мОсмоль чувствительными к гипотонии были клетки, предынкубированные в электролитных средах при кислых значениях pH.

Существование взаимосвязи между формой клетки и ее осмотической устойчивостью иллюстрируют рисунки 4.5 и 4.6. Представленные на рисунке 4.5 величины морфологического индекса свидетельствуют о том, что максимальное изменение формы (эхиноцит), отмеченное у эритроцитов в средах с низкой ионной силой при pH 8,6, соответствует максимуму осмотической устойчивости (рис. 4.6). При pH 5,4 наблюдалось незначительное изменение формы в сторону стоматоцитов и снижение осмотической устойчивости.

Для понимания причин отмеченных выше трансформаций клеток необходимо оценить вклад каждого и суммарное действие таких мощных физико–химических факторов как ионная сила и pH.

Сравнение морфологии клеток в неэлектролитных и электролитных средах при нейтральных pH (см. рис. 4.1; 4.3) свидетельствует о незначительном увеличении количества эхиноцитарных форм в средах с низкой ионной силой. Это может быть обусловлено следующими причинами:

а) частичным выходом ионов K^+ и Cl^- по электрохимическому градиенту, что, как известно, вызывает появление эхиноцитарных форм [245, 246];

б) существованием осмотического градиента непроникающего электролита, вызывающего обезвоживание [247].

При кислых значениях pH среда экспозиции существенно не влияла на форму клеток: наблюдалась лишь тенденция к их незначительному набуханию и появлению слабо стоматоцитарных форм (Рис. 4.1; 4.4). Однако при щелочных значениях pH фактор среды играл значительную роль – сохранение дискоидной формы в электролитных средах и образование эхиноцитов в неэлектролитных.

Известно, при кислых значениях pH происходит вход в клетку ионов водорода по градиенту концентрации, что приводит к ингибированию выхода ионов K^+ , Cl^- [13, 119, 248] и, как следствие, к повышению осмотического давления внутри клетки. Механизм ингибирования выхода ионов может быть также связан с изменением трансмембранного потенциала [249], поскольку при снижении электрического заряда гликокаликса уменьшается выход K^+ в средах с низкой ионной силой [240, 246]. В этих условиях происходит титрование ионами H^+ цитоскелет-мембранного комплекса, в том числе и спектрина, в результате которого изменяется его заряд, что может привести к «расслаблению» цитоскелета, изменению локальной мембранной кривизны и формы клетки [240, 250]. Именно этим можно объяснить наблюдаемые нами при кислых значениях pH набухание и появление стоматоцитарных

форм эритроцитов, обладающих минимальной устойчивостью при переносе их в гипотонические среды.

При щелочных значениях pH избыток ионов гидроксила помимо образования более отрицательного потенциала на мембране в неэлектролитных средах, будет способствовать выходу ионов K^+ и Cl^- из клетки по электрохимическому градиенту (сдвиг доннановского равновесия), снижению внутриклеточного осмотического давления и, как следствие этого, созданию предпосылок для образования эхиноцитов [118, 240]. Отмеченная максимальная устойчивость клеток к переносу их в гипотонические среды может быть связана с внутриклеточной гипотонией, обусловленной снижением внутриклеточного осмотического давления и являющейся фактором адаптации клетки к внешней гипотонии. В электролитных средах при щелочных значениях pH присутствие в среде 130 мМ внеклеточных ионов Na^+ и Cl^- будет приводить, как минимум, к сохранению внутриклеточных ионов K^+ и Cl^- . Такое разное поведение клеток при щелочных значениях pH в зависимости от ионной силы, вероятно, связано с более отрицательным мембранным потенциалом в неэлектролитных средах [119, 249].

Таким образом, трансформация эритроцитов зависит от сочетанного действия ионной силы и pH среды экспозиции. При щелочных значениях pH фактор среды играет значимую роль: сохранение дискоидной формы в электролитных средах и образование эхиноцитов в неэлектролитных. При кислых значениях pH среда экспозиции не оказывала значимого влияния на изменение формы клеток: наблюдалась лишь тенденция к их незначительному набуханию и появлению слабо стоматоцитарных форм.

Эритроциты в форме эхиноцитов обладают повышенной устойчивостью к действию осмотического фактора.

4.2. Значение факторов среды хранения в обеспечении устойчивости эритроцитов к длительной гипотермии.

В последние годы много внимания уделялось подбору и разработке сред для гипотермического хранения (ГХ) эритроцитов. Установлено, что свою функциональную полноценность эритроциты сохраняют лишь в течение первых 3-х суток [251]. При ГХ эритроцитов снижаются внутриклеточный рН, концентрации АТФ и 2,3 ДФГ, повышается уровень свободного гемоглобина, а также изменяется концентрация внутриклеточных ионов и структура мембраны вплоть до формирования микровезикул [234, 252]. Таким образом, вопросы, связанные с оптимизацией условий гипотермического хранения, по-прежнему остаются актуальными.

Мы исследовали морфологию эритроцитов, ультраструктуру мембраны и состояние гликокаликса, их устойчивость к гипотоническому лизису при длительном ГХ в средах различной ионной силы и рН [18].

При переносе эритроцитов в среды с разными значениями рН установлена достаточно высокая сохранность их исходной формы практически до 2-х суток ГХ. Исключение составляли неэлектролитные среды при рН 8,6, в которых уже с 30-й минуты наблюдались интенсивные процессы трансформации клеток в эхиноциты, а после 2-х суток – в сфероэхиноциты (рис. 4.7). Следует отметить, что по данным оптической микроскопии в любой эритроцитарной популяции в норме существует не менее 3–5% клеток с измененной формой. Однако результаты РЭМ свидетельствуют, что этот процент гораздо выше, поскольку даже микронарушение структуры и свойств мембраны уже приводят к изменению не только тонкой топографии поверхности, но и формы клетки в целом.

При анализе морфологии клеток мы исходили из того, что если факт изменения формы наблюдался не менее чем у 70% клеток, то эффект воздействия считался достоверным.

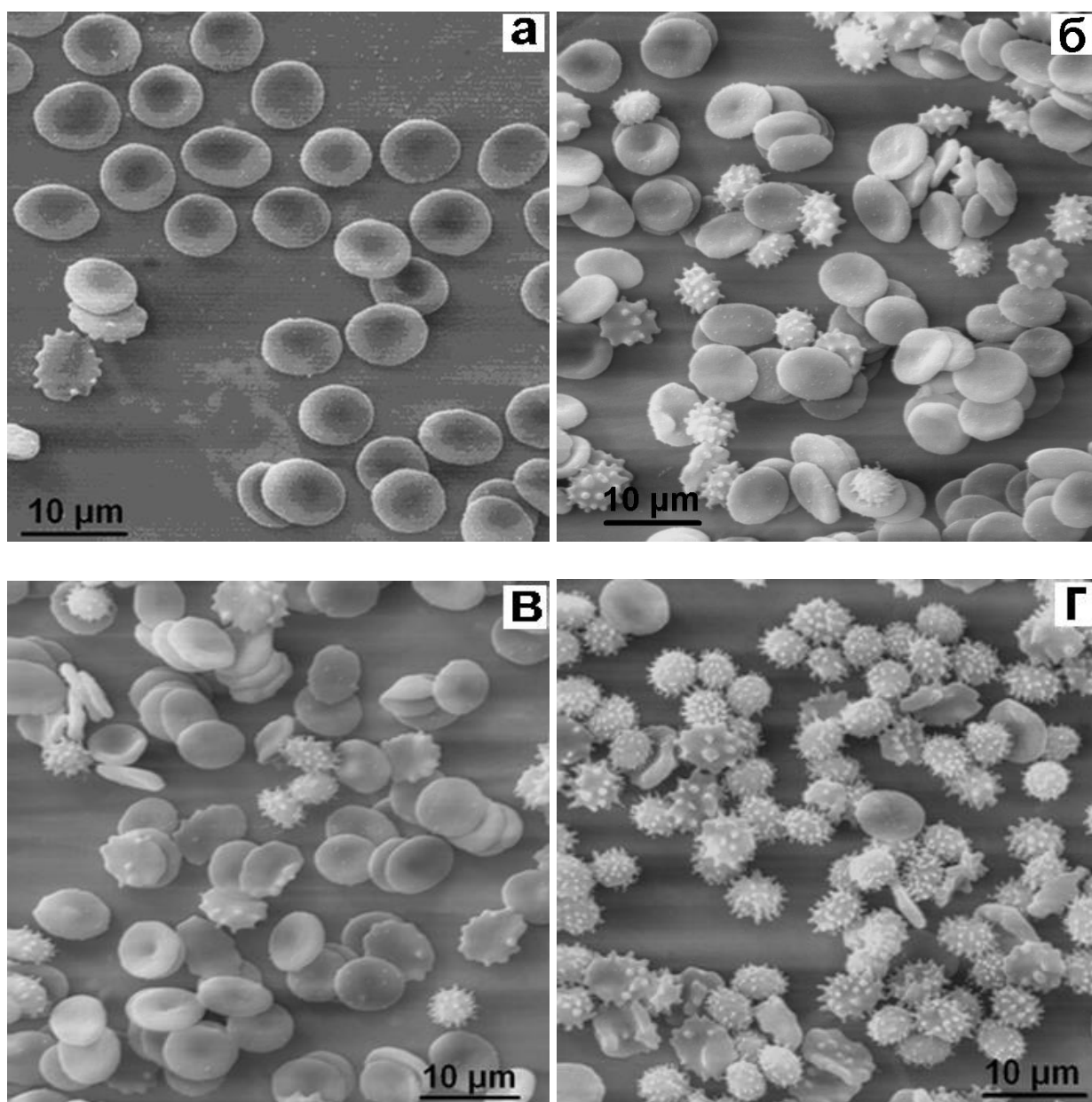


Рис. 4.7. Морфологическое состояние эритроцитов при ГХ после 2-х суток в зависимости от состава и рН среды экспозиции: а – среда 2 (рН 5,4); б – среда 2 (рН 8,6); в – среда 3 (рН 7,2); г– среда 3 (рН 8,6).

В процессе ГХ выявлены более выраженные изменения формы клеток в зависимости от состава и рН среды экспозиции. При кислых значениях рН в неэлектролитных средах и среде, содержащей NaCl, после 7-и суток ГХ наблюдалась гетерогенная популяция клеток, состоящая из дискоцитов и эхиноцитов (рис.4.8,а), тогда как в среде, содержащей KCl, практически все клетки трансформировались в слабостоматоцитарные формы (рис.4.8,б). При

нейтральных значениях pH в не- и электролитных средах после 7-и суток ГХ 90% клеток имели форму эхиноцитов (рис. 4.8, в).

Щелочные значения pH выявили разную направленность трансформации эритроцитов в зависимости от ионной силы. В электролитных средах наблюдается образование гетерогенной популяции клеток, состоящей из уплощенных дискоидных форм и сфероэхиноцитов (рис. 4.8, г), тогда как в неэлектролитных отмечено однонаправленное изменение формы клеток с образованием сфероэхиноцитов (рис. 4.9, б).

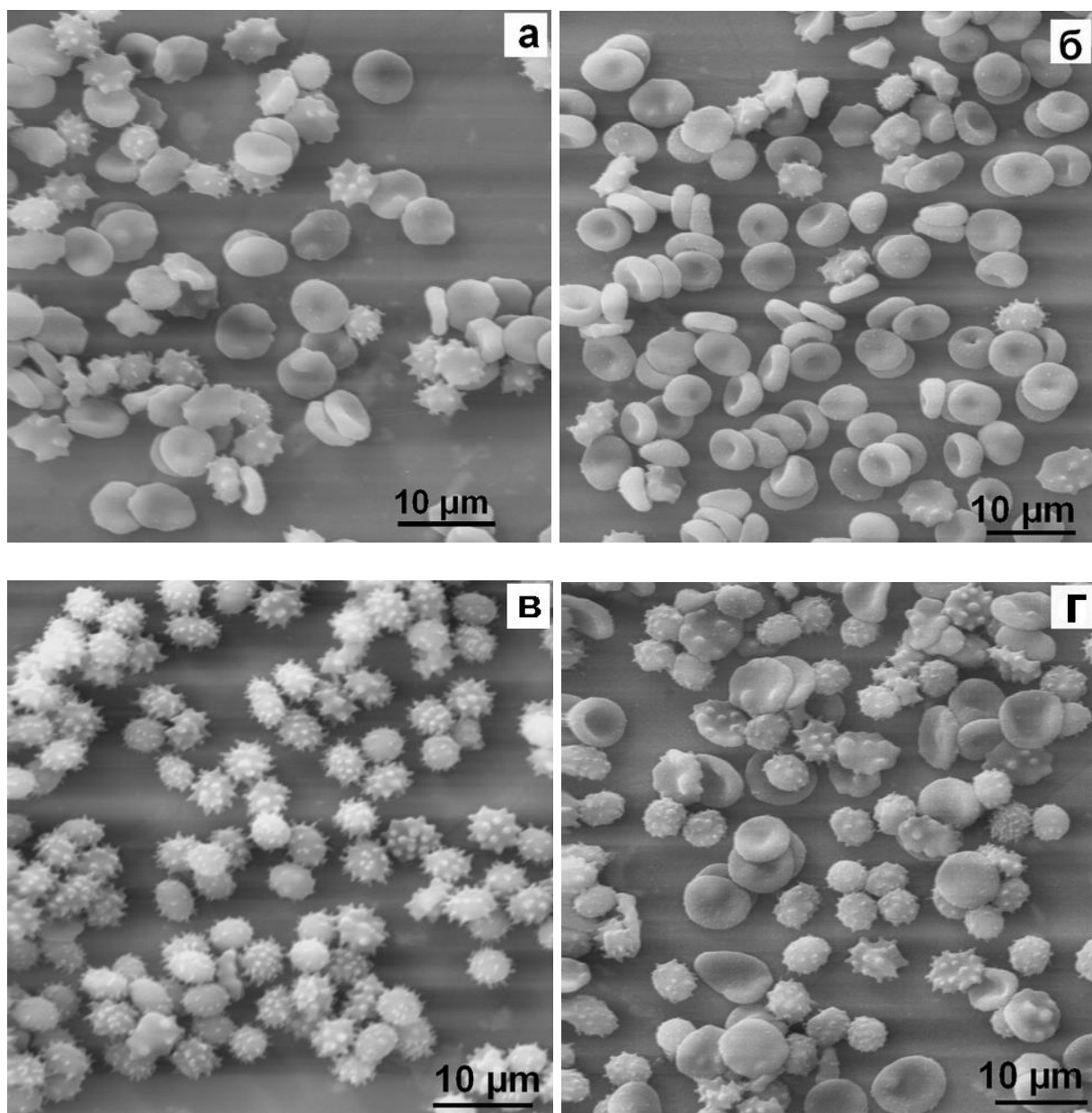


Рис.4.8. Морфологическое состояние эритроцитов после 7-и суток ГХ в электролитных средах и разных значениях pH среды: а – среда 1 (pH 5,4); б – среда 2 (pH 5,4); в – среда 1 (pH 7,2); г – среда 2 (pH 8,6).

Следует отметить, что после 7-и суток ГХ при щелочных рН образуются микровезикулы в средах обоих видов.

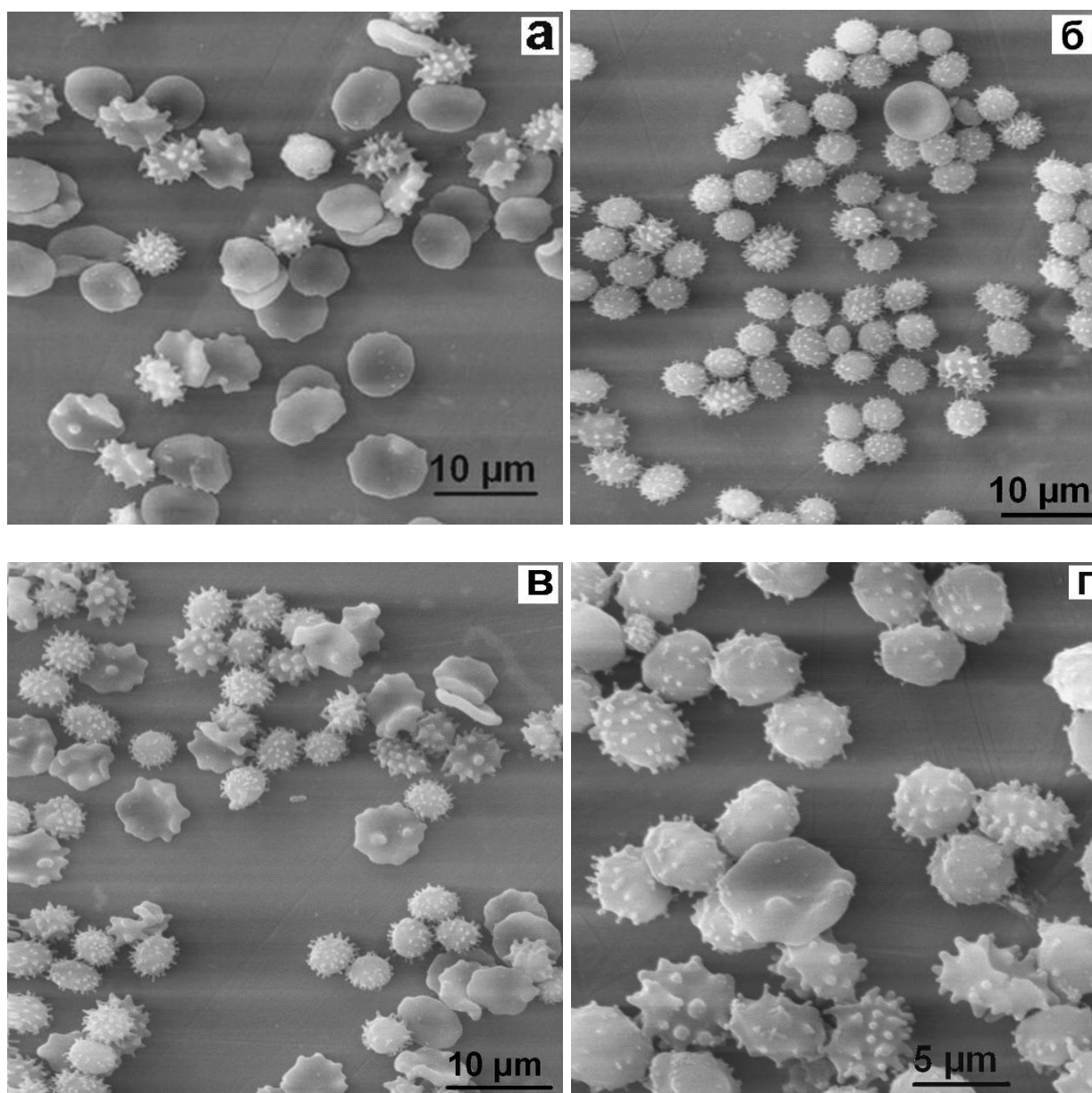


Рис. 4.9. Морфологическое состояние эритроцитов после 7-и суток ГХ в неэлектролитных средах при разных рН среды экспозиции:

а, б – среда 3 (рН 5,4 и 8,6); в, г – среда 4 (рН 7,2 и 8,6)

При увеличении сроков ГХ до 14 и 21-х суток в NaCl- и KCl-содержащих средах наблюдаются при рН 5,4 повреждение части клеток (о чем свидетельствует увеличение уровня гемолиза), а при рН 8,6 – тенденция к их слипанию (рис. 8.10,б). Сохранившиеся клетки трансформировались в

сфероэритроциты. В неэлектролитных средах при pH 5,4 основную массу клеток составляли эритроциты и дискоэритроциты (рис. 4.10, а). При нейтральных и щелочных значениях pH в средах обоих видов после 21-х суток хранения доминировали сфероэритроциты (рис. 4.10, в, г).

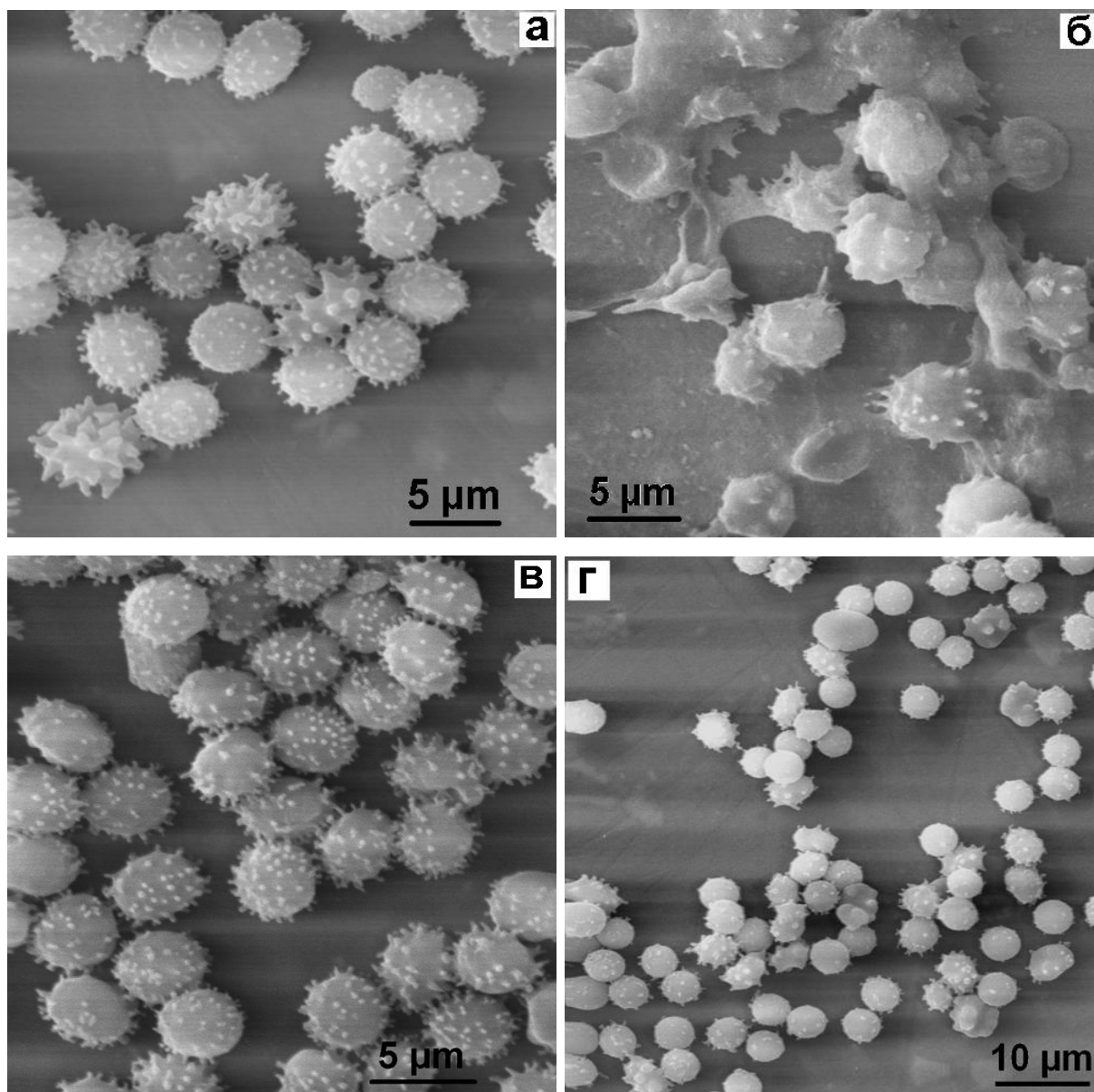


Рис. 4.10. Морфологическое состояние эритроцитов после 14-и (а) и 21-х (б–г) суток ГХ: а – среда 1 (pH 8,6) б – среда 2 (pH 8,6) в, г – среда 3 (pH 7,2 и 8,6 соответственно).

Используя метод проточной цитофлуориметрии, мы провели качественный сравнительный анализ морфологического состояния популяции эритроцитов ($n = 30\,000$ клеток) по параметру FSC, отражающему

размер и форму клетки, в средах с разными значениями pH и ионной силы в процессе ГХ. Данный подход оказался эффективным для анализа состояния формы клеток в процессе ГХ и позволил дополнительно подтвердить временной интервал изменения формы для основной массы исследуемой совокупности клеток. Из данных (рис. 4.11) видно, что в электролитных средах (среда 1 и 2; pH 5,4) эритроциты представлены гомогенной популяцией и имели примерно, одинаковый размер и форму, что проявлялось практически в полном совпадении всех пяти гистограмм (рис.4.1,а) и соответствует данными РЭМ (см. рис. 4.7 и 4.8). Гистограммы соответствующие значению pH 7,2 свидетельствуют о более гетерогенной популяции эритроцитов до 5 суток. хранения, а с 7-х суток. отмечается нивелирование второго максимума на FSC–гистограмме (рис. 4.11, б, г – кривая 5). Это указывает на сближение размеров двух проекций клетки, что характерно для ее сферо–эхиноцитарных форм (рис. 4.8, в)

При щелочных значениях pH в электролитных средах (среда 1; рис. 4.11, в) гистограммы до 5 суток имели вид, характерный для гетерогенной популяции клеток (кривые 1–4), тогда как после 7 суток (кривая 5) возрастало количество эхиноцитарных форм.

В средах с низкой ионной силой (неэлектролитные среды 3 и 4), по данным проточной цитофлуориметрии, наблюдается иной характер изменения формы и размеров клеток при разных pH среды и длительности экспозиции (рис. 4.12). Однотипность и практически полное совпадение всех пяти гистограмм распределения клеток при кислых и щелочных значениях pH в процессе хранения (кривые 1–5) свидетельствует об устойчивом сохранении формы клеток в этих условиях в течение 7 суток и хорошо согласуется с данными РЭМ (см. рис.4.7–4,9).

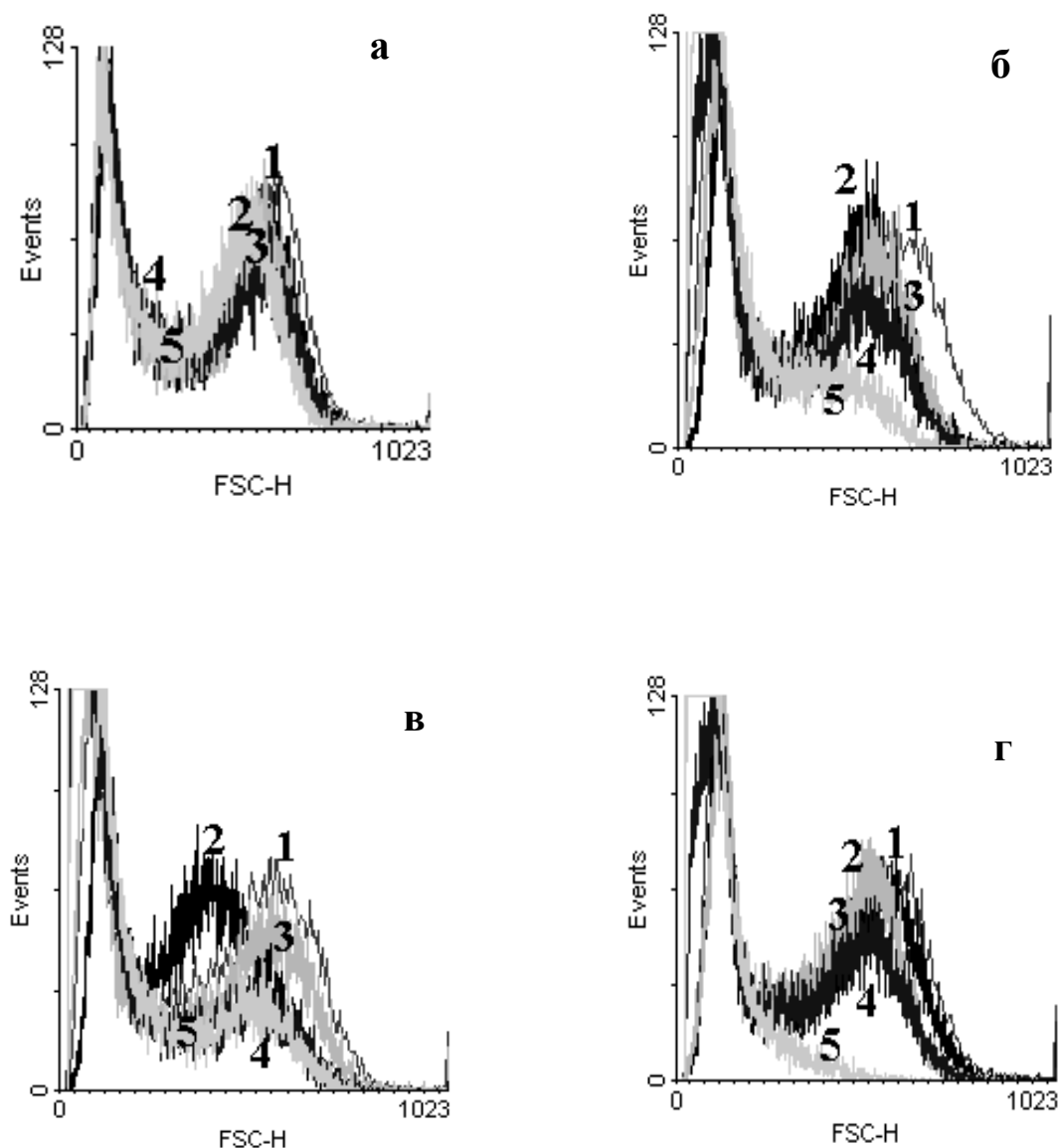


Рис. 4.11. Распределение эритроцитов по параметру FSC при ГХ в электролитных средах (среды 1 и 2) разных значений pH. а – в – среда KCl (pH 5,4; 7,2; 8,6, соответственно); г – среда NaCl (pH 7,2) Цифрами обозначены: 1 – контроль; 2 – 2 часа хранения; 3 – 2 сут. хранения; 4 – 5 сут. хранения; 5 – 7 сут. хранения.

При нейтральных значениях pH на 5-е сутки хранения происходит возрастание количества эхиноцитарных форм, на что, помимо электронной микроскопии, указывает резкое снижение интенсивности правого пика у 4-й и 5-й кривой гистограммы распределения (рис.4.12, б, г).

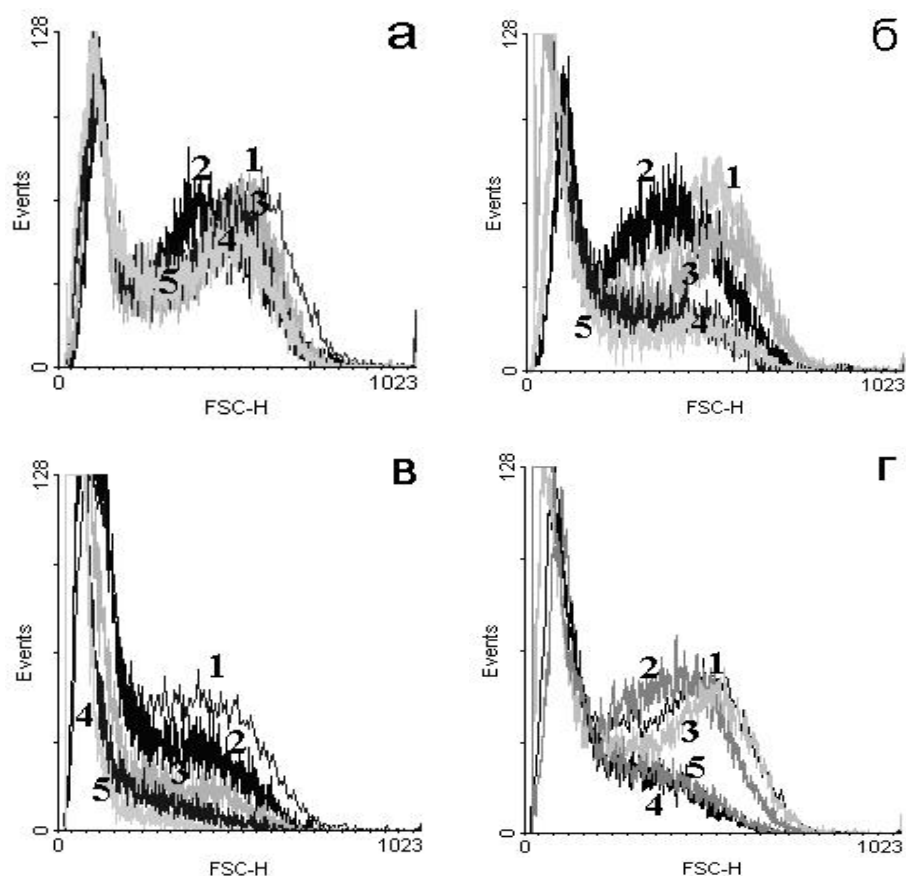


Рис. 4.13. Распределение эритроцитов по FSC-параметру при ГХ эритроцитов в неэлектролитных средах (среды 3 и 4) разных значений рН. а – в – среда 3 (рН 5,4; 7,2; 8,6, соответственно); г – среда 4 (рН 7,2). Цифрами обозначены: 1 – контроль; 2 – 2 часа хранения; 3 – 2 сут. хранения; 4 – 5 сут. хранения; 5 – 7 сут. хранения.

Анализ целостности клеток показал (рис. 4.14), что во всех исследуемых средах гемолиз отсутствовал на протяжении первых 7 суток ГХ, исключая электролитные среды при кислых значениях рН, где величина уровня гемолиза составляла 4–6%. На 14-е сутки отмечалось более выраженная зависимость гемолиза от значений рН среды. Максимальный повреждающий эффект оказывали среды с рН 5,4, в которых к 14-м суткам ГХ уровень гемолиза в электролитных средах составлял 17–20 %, а в неэлектролитных – 6–10 % (рис. 4.13). При рН 8,6 степень повреждения клеток была несколько ниже (11–14 и 5–6 % для обоих видов сред соответственно).

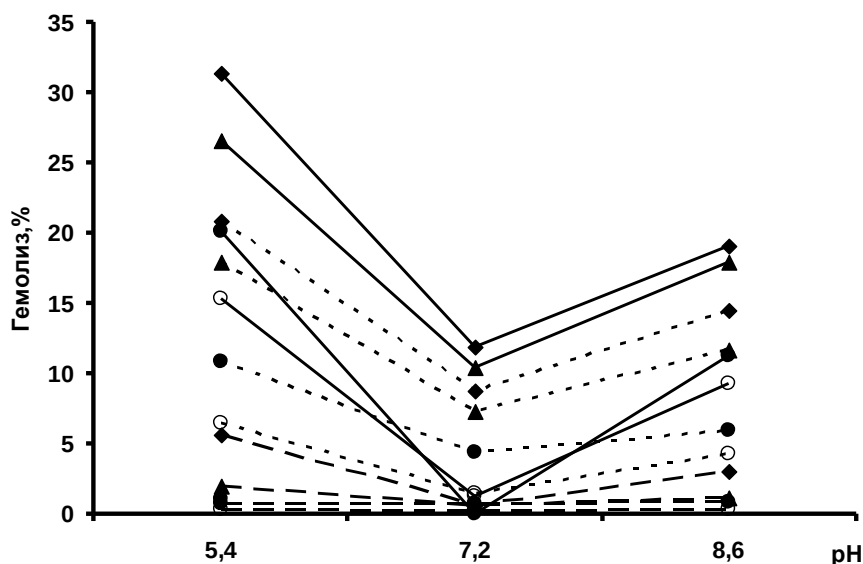


Рис. 4.13. Уровень гемолиза эритроцитов после 7-и (пунктирная линия), 14-и (пунктир-точки) и 21-х суток (сплошная линия) ГХ в зависимости от pH и состава среды инкубации: -♦- – среда 1 (NaCl); -▲- – среда 2 (KCl); -●- – среда 3 (маннит); -○- – среда 4 (сахароза)

Минимальная степень повреждения клеток после 14-и суток ГХ отмечена нами при pH 7,2 для обоих типов сред, у которых уровень гемолиза составлял 2–3 и 7–8 % для неэлектролитных и электролитных сред, соответственно. Отмеченная тенденция повреждения клеток в ходе ГХ в зависимости от состава и pH среды сохранялась и на 21-е сутки хранения (сплошные линии, рис. 4.13). Уровень гемолиза при pH 7,2 оставался минимальным по сравнению с кислыми и щелочными значениями pH в средах, как с высокой, так и низкой тоничностью. В электролитных средах на 21-е сутки гемолиз составлял 10–11%, а в неэлектролитных – 4–5%.

Одной из важнейших структурных составляющих мембраны является ее гликокаликс, образуемый отрицательно заряженными сиаловыми кислотами трансмембранных белков и который формирует поверхностный мембранный заряд. Считается, что заряд гликокаликса снижается при уменьшении pH среды [253]. Мы исследовали его состояние в процессе ГХ, используя специальный электронно-микроскопический фиксатор, который

содержит рутений-красный, специфически связывающийся с сиаловыми кислотами мембран [145]. Установлено, что если в норме и после небольших сроков хранения структура гликокаликса представлена непрерывным примембранным слоем (рис. 4,14, а, б), то к 10–14-м суткам поверхность эритроцита содержит лишь его фрагменты (рис. 4,14, в) либо лишена их вовсе (рис. 4,14, г).

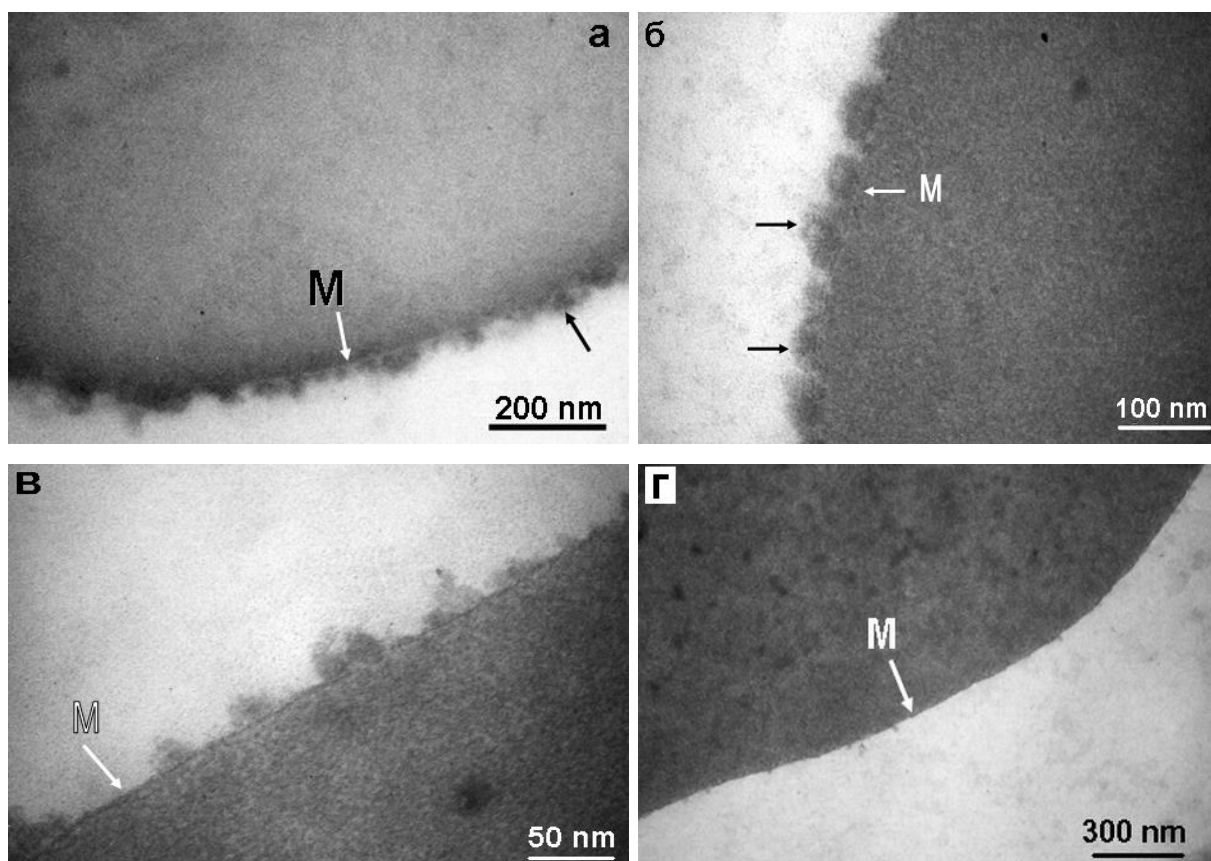


Рис. 4.14. Ультраструктура гликокаликса мембран эритроцитов после 1 суток ГХ (а, б) и его деградация к 10–14-м суткам (в, г) в нейтральных рН. (Темные стрелки – гликокаликс; М – мембрана эритроцита). Фиксация рутением-красным.

Отмеченные выше изменения в структуре гликокаликса находят подтверждение в работе Godin, Caprani [254], в которой показано, что после 6 суток хранения значительно снижается плотность заряда мембраны эритроцитов и уменьшается их электрофоретическая подвижность. Именно этим могут быть объяснены агрегация и слипание клеток, наблюдаемые нами, при более длительных сроках ГХ (рис. 4.10, б).

Мы провели сравнительный анализ состояния структуры гликокаликса в не- и электролитных средах при разных значениях pH в процессе ГХ. Представленные на рис. 4.15 данные иллюстрируют морфологическое состояние гликокаликса мембран эритроцитов донора после 7 суток ГХ. При щелочных значениях pH уже к 7 суткам мембрана эритроцитов практически полностью лишена структуры гликокаликса у клеток, хранившихся в среде 3, и отмечаются его небольшие фрагменты у клеток в среде 2. Таким образом, изменение pH среды хранения оказывает более сильное влияние на состояние гликокаликса.

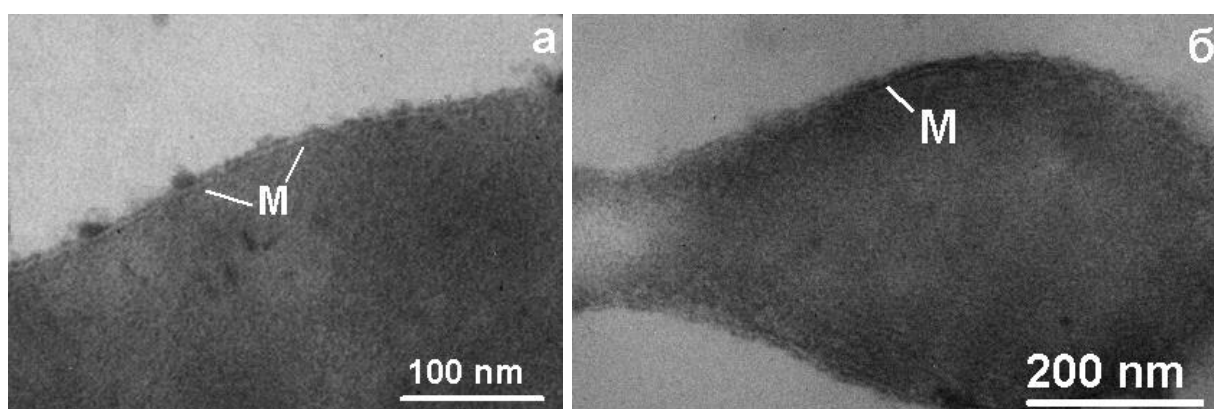


Рис.4.15. Состояние гликокаликса мембран эритроцитов после 7 суток ГХ в среде 2 при pH 8,6 (а) и среде 3 при pH 8,6 (б). (М – мембрана эритроцита). Фиксация рутением-красным.

Для выявления латентных повреждений клеток и объяснения возможного механизма изменения формы проанализирована устойчивость различных форм эритроцитов к гипотоническому лизису. С этой целью образцы, хранившиеся в разных условиях, помещали на 60 мин. в растворы NaCl разной гипотоничности (90, 140, 190 и 300 мОсмоль) при температуре 37°C и 10-и кратном разбавлении (рис. 4.16). Данные рисунка свидетельствуют, что эритроциты, хранившиеся в неэлектролитных средах, проявляют большую устойчивость к гипотонии. Следует отметить, что перенос клеток в изотонический раствор (300 мОсмоль) и нормотермию, во-первых, фактически моделирует условия трансфузии, а во-вторых, позволяет

утверждать об отсутствии эффекта «запечатывания» поверхности мембраны непроницаемыми через мембрану сахарозой и маннитом.

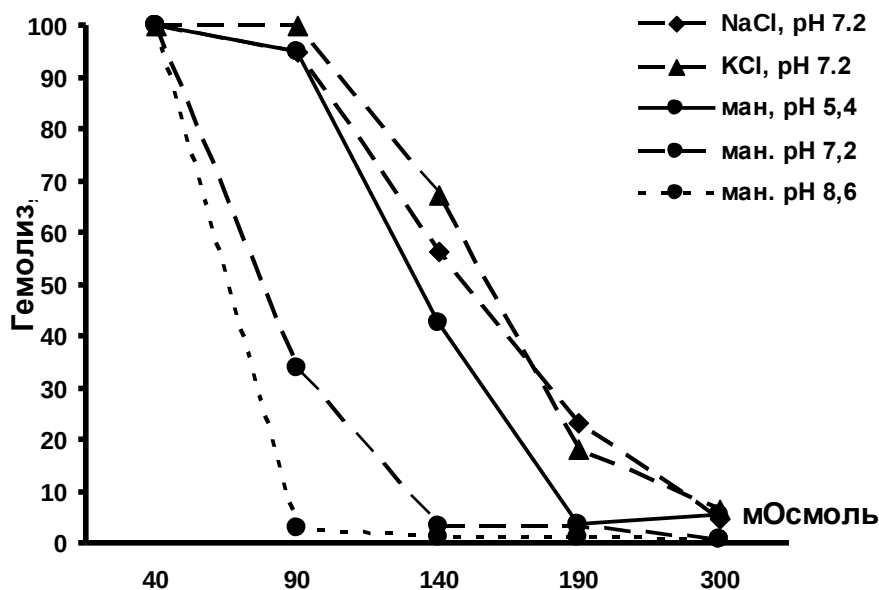


Рис. 4.16. Осмотическая резистентность эритроцитов на 7-е сутки ГХ в зависимости от степени гипотонии (по NaCl) в условиях 60-минутной экспозиции при 37 °С для клеток, хранившихся в средах с разным ионным составом: (-♦- — среда 1 (NaCl); -▲- — среда 2 (KCl); -●- — среда 3 (маннит) для разных значений pH среды инкубации (сплошная и пунктирная линии).

При переносе эритроцитов в гипотонические растворы наиболее устойчивыми оказались клетки, хранившиеся в неэлектролитных средах для всех значений pH (рис. 4.17). В случае электролитных сред чувствительность клеток к гипотонии определялась значением pH среды экспозиции: более устойчивы к действию осмотического фактора оказались клетки, хранившиеся при нейтральных значениях pH.

Наиболее высокая степень повреждения клеток отмечена при их переносе в гипотонию из среды, содержащей KCl, при pH 5,4.

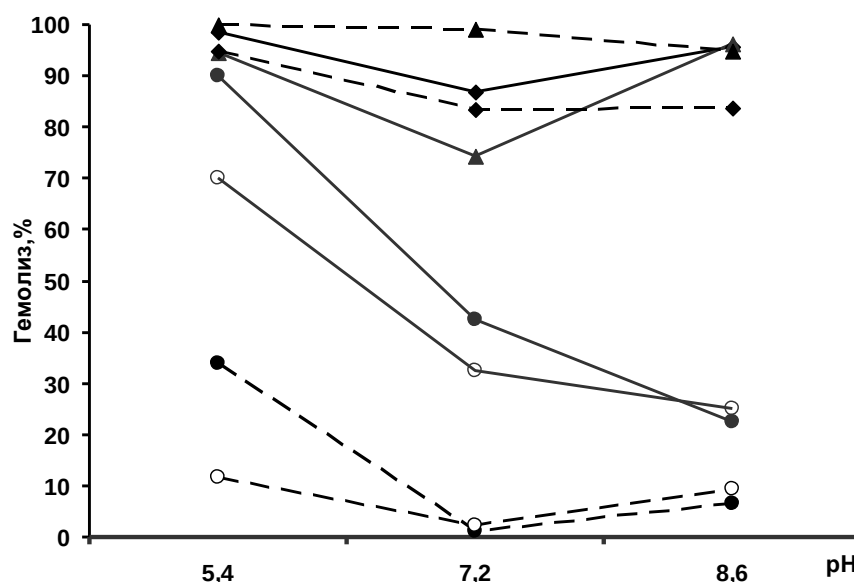


Рис. 4.17. Осмотическая резистентность эритроцитов в 90 мОсмоль NaCl после 30-минутной экспозиции при 20 °С (сплошная линия) и на 7-е сутки ГХ (пунктирная линия) в зависимости от pH среды инкубации с разным ионным составом: -♦- – среда 1 (NaCl); -▲- – среда 2 (KCl); -●- – среда 3 (маннит); -○- – среда 4 (сахароза)

Факт наибольшей устойчивости к гипотонии клеток, хранившихся 7 и более суток, по сравнению с 30-минутной экспозицией в средах с разным составом (рис. 4.17) иллюстрируется данными рис. 4.18. Представленные значения морфологического индекса свидетельствуют, что максимум «эхиноцитарности», отмеченный у эритроцитов во всех средах для значения pH 7,2 и в средах с низкой ионной силой при pH 8,6, соответствует минимуму повреждения (см. рис. 4.13) и максимуму осмотической устойчивости (рис. 4.17). Гетерогенная популяция (дискоциты, диско-эхиноциты и стоматоциты) в разных модификациях оказалась более чувствительной к действию осмотического фактора.

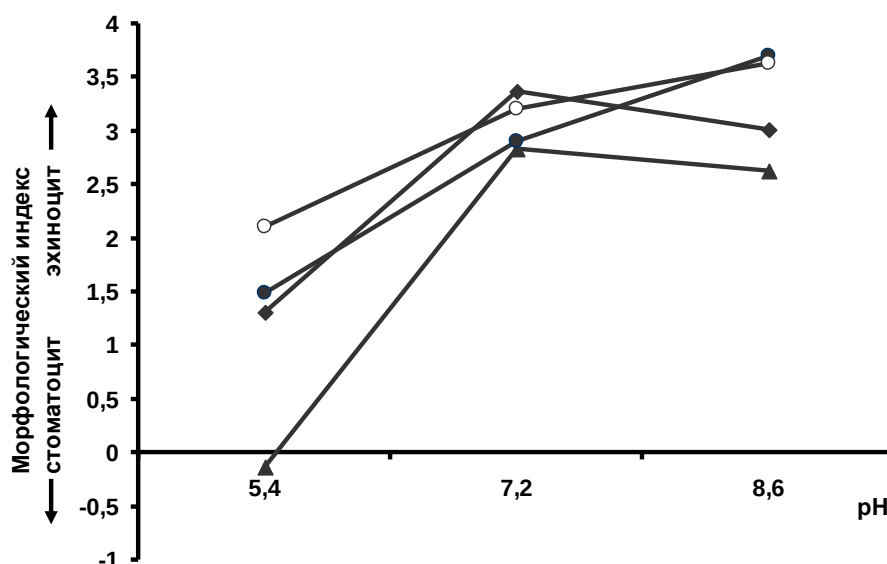


Рис. 4.18. Морфологический индекс формы эритроцитов на 7 сутки ГХ в зависимости от pH и состава среды инкубации: -♦- – среда 1 (NaCl); -▲- – среда 2 (KCl); -●- – среда 3 (маннит); -○- – среда 4 (сахароза).

Выявленные нами два максимума – повреждения (электролитные среды при pH 5,4) и сохранности (неэлектролитные среды при pH 7,2) эритроцитов, соответствующих разным формам клеток, необходимо рассматривать с точки зрения взаимосвязи формы и ионного гомеостаза клетки в обеспечении ее адаптации к меняющимся условиям. Факт минимальной устойчивости эритроцитов в кислых средах при относительном сохранении их формы, с нашей точки зрения, связан с повышенным внутриклеточным осмотическим давлением за счет входа ионов H^+ и блокирования выхода ионов K^+ и Cl^- [119; 246], а также с действием ионов H^+ на отрицательно заряженные компоненты цитоскелет-мембранного комплекса и мембранную проницаемость [119]. Аналогичная точка зрения относительно увеличения количества внутриклеточных ионов хлора при низких pH, приводящего к изменению конформации БП-3, изложена в работе [12]. Предполагается, что происходящая в этих условиях протонизация внешнего домена БП-3, вызывает изменение соотношения хлора между вне- и внутриклеточной средой, приводя к увеличению его концентрации внутри

клетки. Корреляция между концентрацией внутриклеточного хлора и изменением формы при изменении pH клетки отмечена ранее [119, 255].

Для проверки данного предположения и оценки состояния внутриклеточного калия мы провели анализ выхода ионов K^+ из эритроцитов в процессе их ГХ в средах, имеющих различный состав и разные значения pH (рис. 4.19). Как следует из рисунка более быстрая потеря K^+ происходила в неэлектролитных средах. Для всех экспериментальных случаев максимум сохранности внутриклеточного калия наблюдался в средах с pH 5,4, при этом более высокий уровень его сохранности отмечен в электролитных средах.

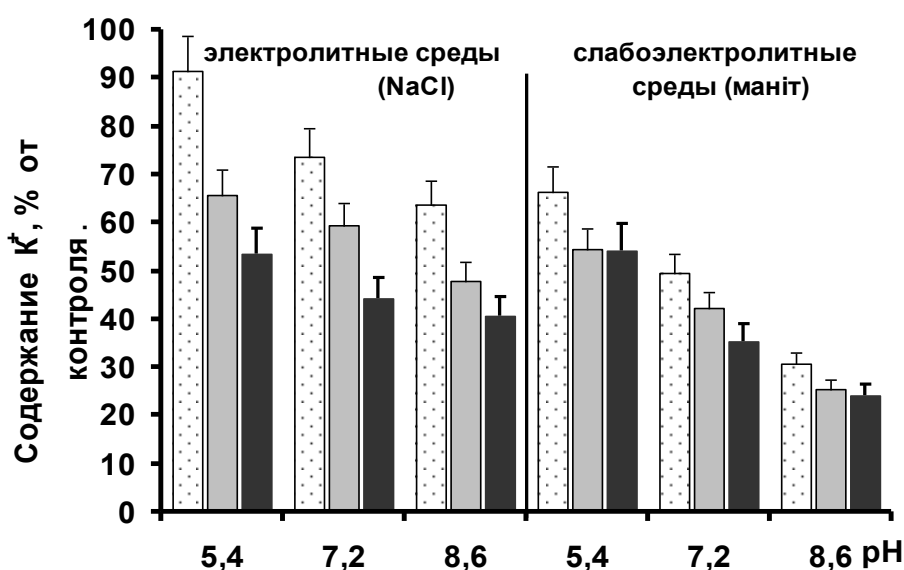


Рис. 4.19. Характер изменения содержания внутриклеточного калия в эритроцитах в процессе гипотермического хранения (1–14 суток.) в электролитных средах, для различных значений pH.

В средах с pH 8,6, наблюдалась максимальная потеря ионов калия, при сохранении различия между электролитными и слабоэлектролитными средами. Данные рис. 19 позволяют проследить временную зависимость потери ионов K^+ в процессе ГХ. Как и следовало ожидать, максимальная потеря K^+ происходила в течение первых суток для всех экспериментальных условий, исключая натриевую среду при pH 5,4, для которой отмечался высокий (более 92%) уровень внутриклеточного K^+ .

Таким образом устойчивость к действию гипотонии клеток эхиноцитарных форм, хранившихся при щелочных рН в средах низкой ионной силы достаточно хорошо объясняется снижением внутриклеточного осмотического давления за счет выхода из клетки ионов K^+ и Cl^- по электрохимическому градиенту и приводящему к образованию эхиноцитов. В то же время, происходящие при этих условиях морфологические изменения (сферо-эхиноцитарная трансформация, изменение размеров клеток, потеря гликокаликса и образование везикул) позволяют сделать предположение, что они могут затрагивать, а по нашим результатам и затрагивают ультраструктурную организацию цитоскелет-мембранного комплекса.

4.3. Структурные перестройки в цитоскелет-мембранном комплексе при сфероэхиноцитарной трансформации. Механизм везикулообразования.

Анализируя различные экспериментальные условия, в которых формируются сфероэхиноциты, содержащие различное количество спикул, мы обратили внимание на следующий факт. Как в случае тепловой ($49,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) денатурации спектрина [15, 187], так и при гипотермической экспозиции в средах разным составом и значениями рН [18, 259], результатом трансформации эритроцита является образование везикул и сферического остова клетки (mother body) с диаметром $4,86 \pm 0,48$ мкм. Количественную оценку площади поверхности, теряемой эритроцитом в ходе данных морфологических изменений, мы провели с учетом следующих фактов:

– величину площади поверхности дискоцита в норме рассчитывают по его диаметру ($d_{\text{OM}}=7,5$ мкм), измеренному в оптическом микроскопе (ОМ). По данным ряда авторов площадь поверхности дискоцита составляет 130; 145, 163 мкм² [186, 223, 253];

– диаметр дискоцита, измеренный в РЭМ, в среднем на 0,7 мкм меньше по сравнению с данными оптической микроскопии [256, 257] и составляет в среднем 6,75 мкм. Таким образом, площадь поверхности дискоцита $S_{РЭМ}$ рассчитанная по данным, полученным методом РЭМ, связана с «истинным» значением этого параметра в ОМ $S_{ОМ}$ следующим отношением: $S_{РЭМ} / S_{ОМ} \rightarrow d_{РЭМ}^2 / d_{ОМ}^2$ и равно 0,8. Различие в значениях диаметра клеток в растровом и оптическом микроскопах обусловлено особенностями препарирования биообъектов для РЭМ.

Предположив, что при трансформации дискоцита в сфероцит площадь поверхности эритроцита не изменяется, то диаметр сфероцита $d_{сф}$ в ОМ для среднего значения поверхности (145 мкм^2) составляет примерно 6,8 мкм. В пересчете для РЭМ численные значения площади поверхности дискоцита и диаметра сфероцита составляют примерно 115 мкм^2 и 6,05 мкм. Именно эти величины мы будем использовать в дальнейших рассуждениях.

Потерю мембранного материала, вызванную «отшнуровыванием» от мембраны спикул и образованием везикул, нетрудно оценить, зная диаметр сфероэхиноцита после отслоения от него везикул. В этом случае: $S_{сфэх} / S_{сф} = d_{сфэх}^2 / d_{сф}^2 = (d_{сфэх} / d_{сф})^2$, что, с учетом разброса значений диаметра остова, составляет величину изменяющуюся от 0,55 до 0,82 или в среднем около 0,7. Индексы (сфэх) и (сф) относятся к сфероэхиноциту и сфероциту соответственно. Таким образом, в ходе сфероэхиноцитарной трансформации, эритроцит может терять до 30% своей поверхности. Возникает вопрос, что же в этой ситуации происходит с внутренним содержимым эритроцита, включая цитоскелет, и с его мембраной?

По данным литературы и нашим экспериментальным данным, в процессе везикуляции мембраны наблюдаются следующие закономерности:

– отслоившиеся от мембраны везикулы не содержат элементов цитоскелета [107, 258] и, следовательно, при везикуляции происходит сжатие (уплотнение) цитоскелета внутри сферического остова (mother body);

– процесс везикуляции не приводит к существенному возрастанию уровня гемолиза в клеточной суспензии вне зависимости от причины, его вызывающей [15, 259];

– диаметр сфероподобного остова (4,5–5,5 мкм) слабо зависит от условий его образования (изменение состава среды и значений pH, нагрев до температуры термоденатурации спектрина или истощение по АТФ) [15, 209, 259];

– мембранный скелет, связанный с внутренней поверхностью бислоя, растянут при физиологических условиях [223] и, следовательно, должен обладать тенденцией к сокращению.

Учитывая изложенное выше, мы исследовали структурные перестройки в цитоскелет-мембранном комплексе и механизм отслоения везикул от поверхности эритроцита при его сфероэхиноцитарной трансформации методами растровой и трансмиссионной электронной микроскопии, а также замораживания – скалывания.

Проведенные исследования показали, что как в средах с различным составом и pH при ГХ, так и других условиях, вызывающих трансформацию клеток в сфероэхиноциты, существуют общие закономерности формирования спикул. На начальном этапе трансформации в структуре мембраны возникают «микровозмущения» в виде небольших с положительной кривизной возвышений на поверхности эритроцита (Рис. 4.20, черные стрелки), свидетельствующие о локальном отслоении цитоскелета от мембраны, которое, вероятнее всего, вызвано сокращением спектриновой сети. Указанные возвышения размером 200–250 нм, приблизительно, соответствует размеру элементарной ячейки цитоскелета [223, 260] и потенциально могут являться участками дальнейшего формирования спикул. При этом в структуре мембраны наблюдается незначительное изменение в распределении трансмембранных белков (слабая агрегация ВМЧ и уменьшение их плотности на вершине выроста; рис. 4.20, б), т. е. в этом

случае есть все основания говорить о появлении в мембране структурно-нестабильных участков.

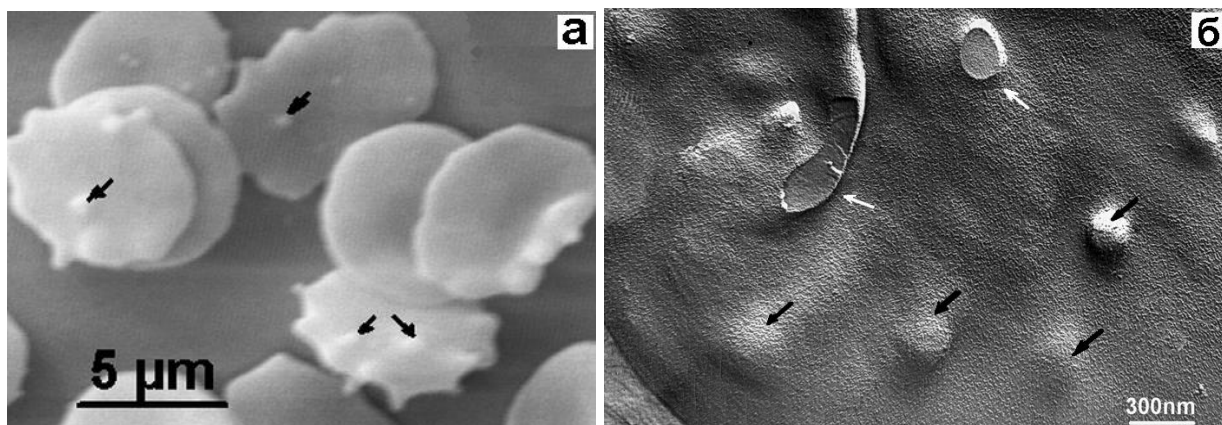


Рис. 4.20. Начальный этап формирования спикул на поверхности эритроцита по данным РЭМ (а) и замораживания-скалывания (б).

а – 30-минутная экспозиция эритроцитов в сахарозной среде, при РН 8,6

б – RF-поверхность мембраны эритроцита с характерным хаотическим распределением ВМЧ. На сколотой поверхности видны мембранные выросты, в виде небольших возвышений и имеющих положительную кривизну (черные стрелки) и спикулы со сколотыми верхушками (белые стрелки).

Пусковым механизмом изменений состояния цитоскелет-мембранного комплекса могут служить совершенно разные воздействия, например утечка ионов, вызванная изменением рН, снижение уровня АТФ, обезвоживанием клеток и др. Длительное действие эхиноцитогенного фактора приводит к увеличению числа спикул на поверхности эритроцита и завершается формированием сфероэхиноцитов (рис. 4.21). Различие в количестве спикул на поверхности клеток (рис. 4.22 а, в), их структуре (рис. 4.21 б, г) и вероятнее всего, связано с возрастной и функциональной гетерогенностью клеточной популяции.

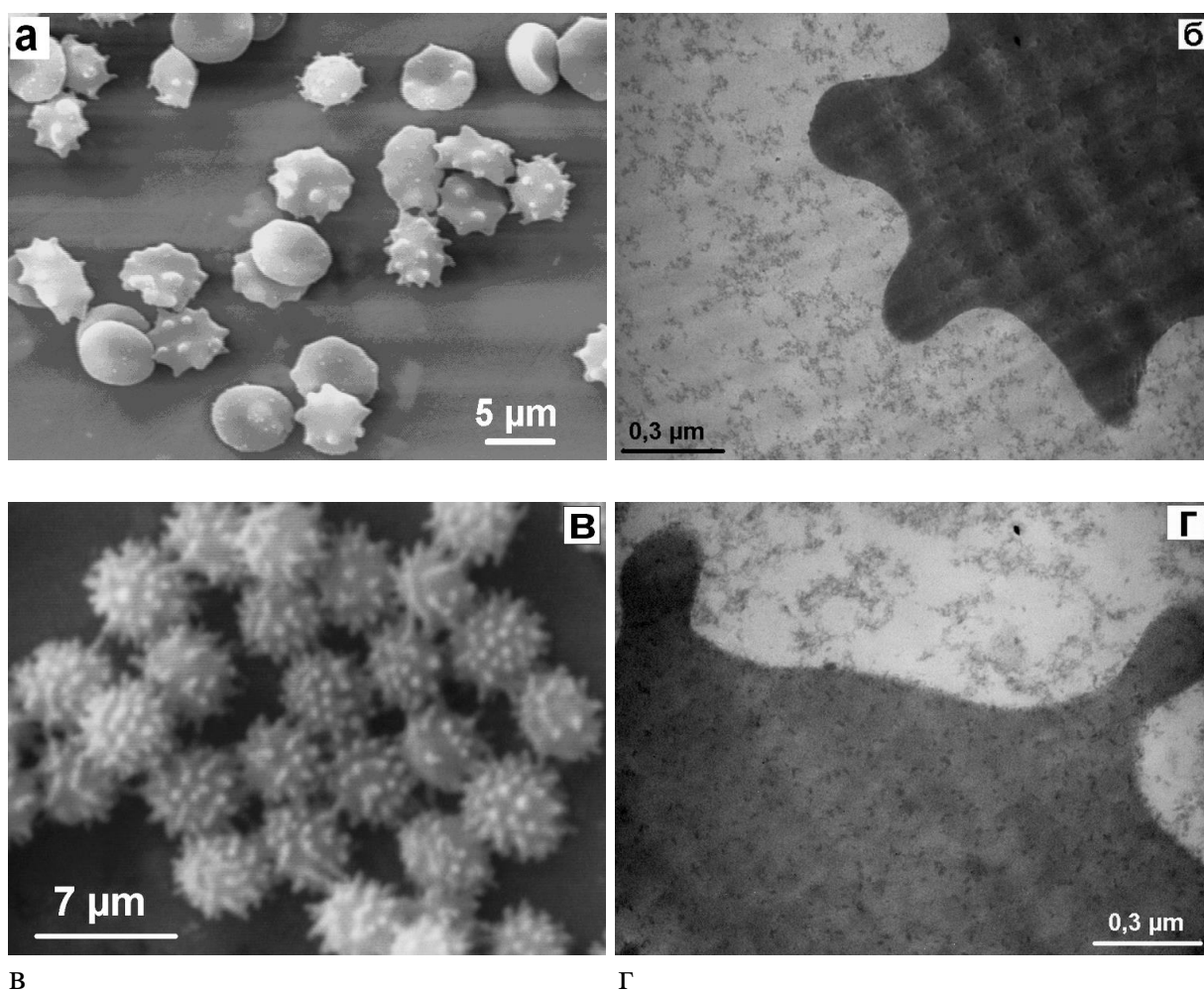


Рис. 4.21. Этап увеличения числа спикул на поверхности эритроцита, приводящий к формированию сфероэхиноцитов. Различие в числе спикул на поверхности клеток (а, в) и их ультраструктуре (б,г).

Завершается этап трансформации эритроцитов формированием сфероцитов, на поверхности которых либо имеются единичные спикулы (рис. 4.22, а, б), либо они отсутствуют полностью. В последнем случае наблюдается остов сферической формы (mother body) диаметром от 4,5 до 5,5 мкм (рис.4.22, б-г). Следует отметить, что размер и ультраструктура спикул и сфероэхиноцитов, анализируемых различными методами, существенно не различаются. При всем кажущемся разнообразии спикул, можно выделить 3 основные формы: коническая, цилиндрическая и булавовидная.

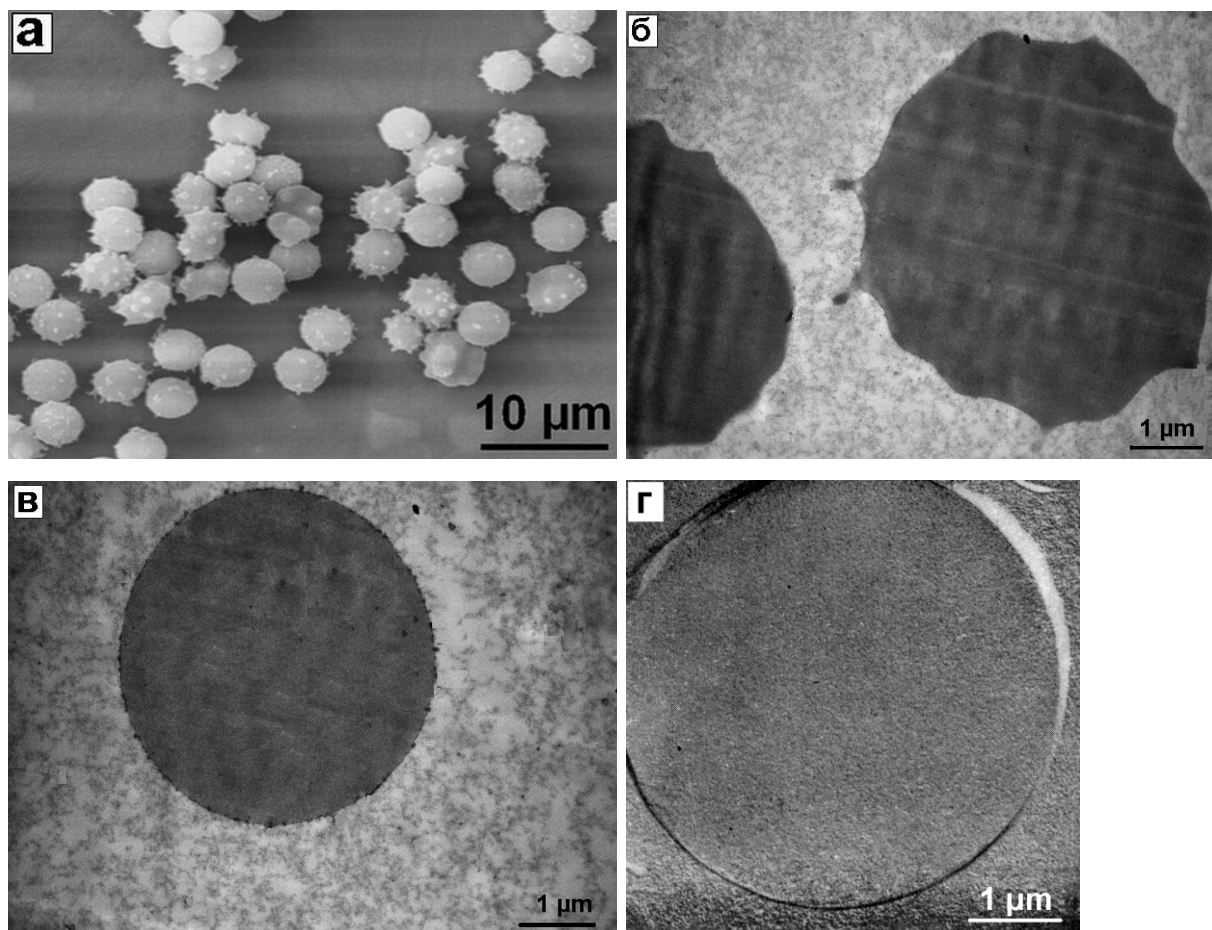


Рис. 4.22. Морфологическое состояние сфероэхиноцитов. Завершающий этап формирования спикул на поверхности сфероэхиноцитов (а,б) и их отсутствие у сфероцитов (в, г). Исследование методами РЭМ (а), ТЭМ (б, в) и замораживания-скалывания (г).

Формирование и отрыв спикул от клеточной поверхности в виде везикул происходят в несколько этапов. Возникая на поверхности клеток в виде конусообразного возвышения (см. рис. 4.21, а, б), спикулы удлиняются, оставаясь при этом устойчивой формой мембранных выростов (см. рис. 4.22. б, в). Дальнейшее влияние эхиноцитогенного фактора не только увеличивает число спикул, но и изменяет их геометрию: за счет уменьшения (сокращения) основания и утолщения верхушки конуса они приобретают цилиндрическую или булавовидную форму (рис. 4.23).

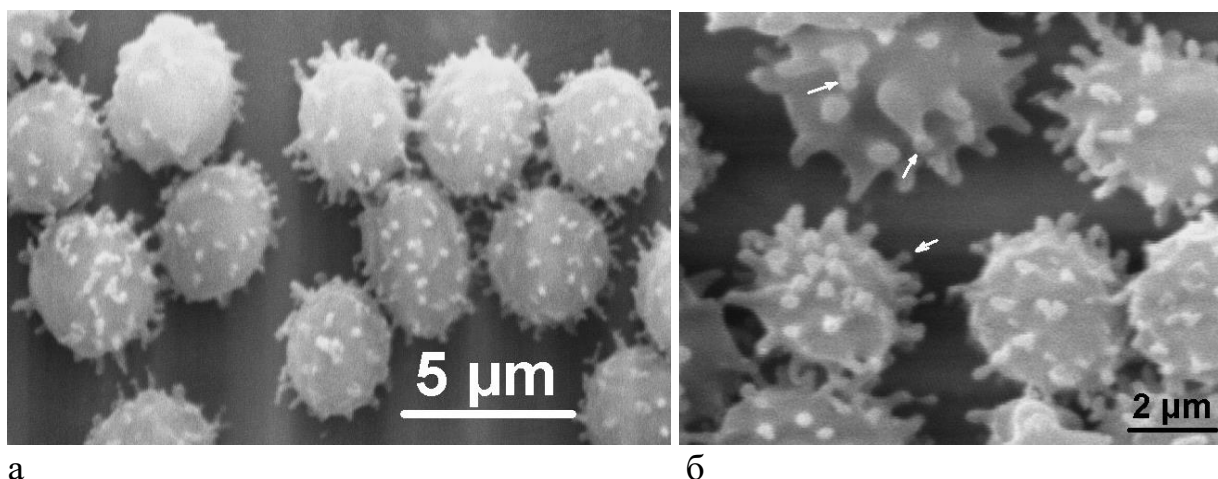


Рис. 4.23. Формы спикул на поверхности сфероэхиноцитов (а,б). Стрелками показаны спикулы булавовидной формы.

Представленные на рис. 4.24 данные иллюстрируют процесс отпочковывания везикул от мембраны эритроцита. Примерно на одной трети высоты спикулы от поверхности клетки возникает «перетяжка», проявляющаяся в локальном уменьшении диаметра и просветлении в этой области внутреннего содержимого спикулы (рис. 4.24. б; короткие стрелки). Как показали проведенные измерения, диаметр спикул зависит от степени «эхиноцитарности» эритроцита. В случае эхиноцитов III и IV степени кренирования (по принятой в литературе классификации [256, 257]) среднее значение диаметра спикул составляет 435 ± 43 и 257 ± 37 нм, соответственно. В местах утончения диаметр поперечного сечения спикул уменьшается до 137 ± 25 нм.

Остов клетки и спикулы имеют одинаковое характерное трехслойное строение мембраны (рис. 4.24, б, вставка, длинная стрелка), что свидетельствует о наличии и в составе оболочки спикулы трансмембранных белков. В то же время в структуре оболочки (мембране) спикул и везикул наблюдаются участки с «потерей» непрерывности трехслойного строения (рис. 4.15, б; 4.24, б), которые могут быть результатом локального перераспределения интегральных белковых компонентов мембраны (агрегация), что косвенно свидетельствует об отсутствии в них цитоскелета.

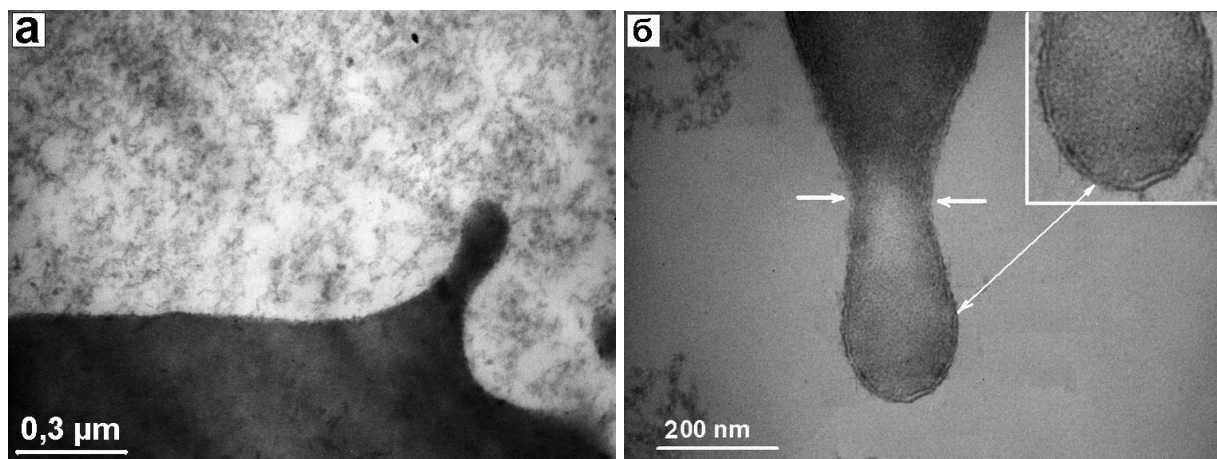


Рис. 4.24. Ультраструктура спикеры; а – фрагмент поверхности эритроцита со спикерой; б – спикера с характерным, трехслойным строением мембраны (длинная стрелка); короткие стрелки – участок утончения тела спикеры.

Завершающим этапом исследуемого процесса является отпочковывание от клетки мембранных везикул (рис.4.25). В месте истончения тела спикеры (Рис. 4.25, а) под влиянием различных внешних и внутренних воздействий (изменение осмотических параметров среды, тепловые флуктуации в мембране и т.п.) происходит отпочковывание от поверхности клетки сферических везикул с последующим замыканием мембраны клетки и оболочки везикулы (рис. 4.25, б). Отпочковавшиеся везикулы имеют округлую форму и в зависимости от степени «эхиноцитарности» эритроцита их размер составлял 495 ± 87 и 348 ± 65 нм для эхиноцитов III и IV степени кренирования, соответственно (рис. 25, а, б). Примерно такой же размер везикул получают, с учетом геометрических параметров спикер. Если предположить, что от мембраны клетки отпочковывается фрагмент цилиндрической формы, высотой $2/3$ длины спикеры, то для спикер с диаметром поперечного сечения 200, 250, 300 и 430 нм диаметр везикул будет составлять 300, 340; 350 и 460 нм, соответственно.

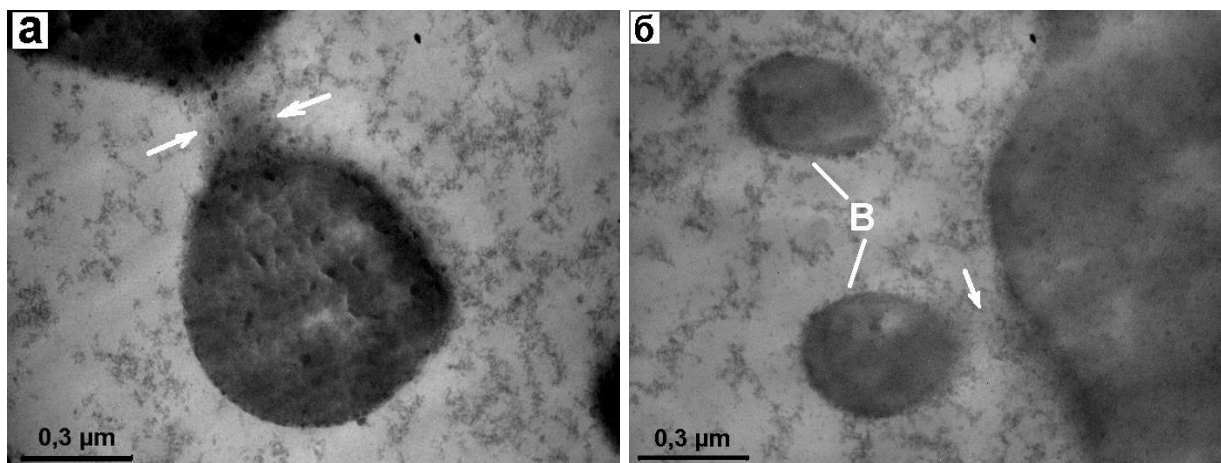


Рис. 4.25. Завершающий этап формирования спикул и образование везикул:
а – истончения тела спикулы (стрелки); б – отпочковывание от клетки мембранных везикул (В).

Зная средний размер отпочковавшихся от мембраны эритроцита везикул, можно оценить площадь мембраны, теряемую эритроцитом в виде везикул при трансформации из сфероэхиноцита в сфероцит, подсчитав число спикул на поверхности сфероэхиноцита. С этой целью, используя метод РЭМ, мы определили площадь поверхности и количество спикул сфероэхиноцитов (рис. 4.26). Как видно из рис. 4.26, в направлении, указанном стрелкой, можно наблюдать спикулу, вершина которой находится в точке (б) за «линией горизонта» остова (точка а) на расстоянии $a-b$. Рассчитанная таким образом «невидимая поверхность» сфероэхиноцита, отсекаемая $X-X$ -линией, составляет примерно около одной трети от общей поверхности клетки. Количество спикул, наблюдаемое на поверхности сфероэхиноцитов, колеблется в пределах – от 35 до 89 на одну клетку и составляет в среднем 60 спикул (рис. 4.26). Такой разброс в количестве спикул может быть обусловлен неодинаковой потерей мембранного материала клетками с различным исходным функциональным статусом. Вычисленная таким образом суммарная площадь, теряемая при отпочковывании везикул от клетки, составляет примерно 15-20 % от исходной, что несколько меньше, чем указанная выше.

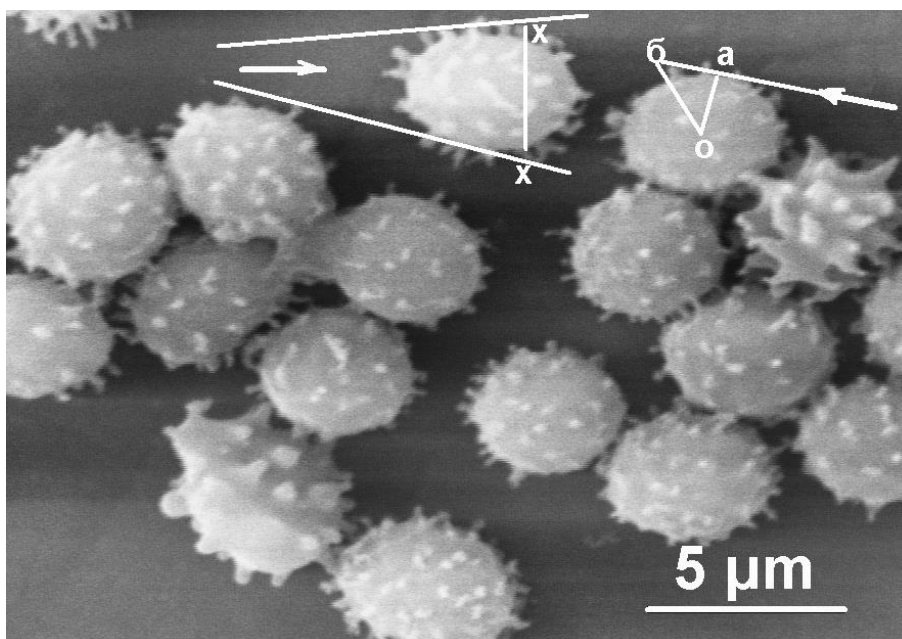
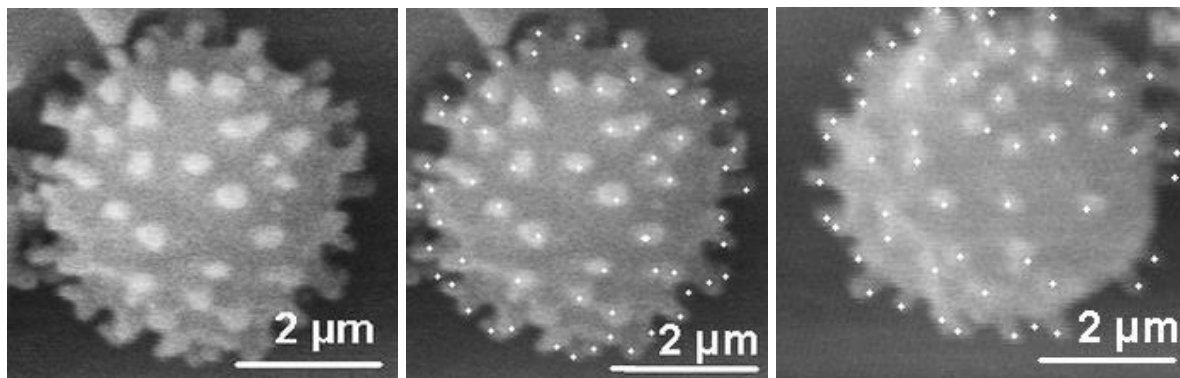


Рис. 4.26. Соотношение видимой и «невидимой» поверхности сфероэхиноцита, наблюдаемого в РЭМ.



89спикул

72 спикулы

Рис. 4.27. Пример подсчета числа спикул на поверхности сфероэхиноцита. Число видимых спикул (белые точки) увеличивалось на треть при окончательном подсчете.

Проведенная количественная оценка позволила определить:

- средний диаметр спикул (435 ± 43 и 257 ± 37 нм для эхиноцитов III и IV степени кренирования соответственно);
- диаметр спикул в местах их утончения (137 ± 25 нм);

– размер отпочковавшихся везикул для эхиноцитов III и IV степени кренирования (495 ± 87 и 348 ± 65 нм соответственно);

– количество спикул на поверхности сфероэхиноцитов (35 – 89 на одну клетку, в среднем 60 спикул).

В литературе обсуждаются возможные варианты перестроек в структуре мембраны при отщеплении мембранных везикул от клетки [209, 223, 261–263]. Считается, что этот процесс является проявлением необратимых изменений, которые приводят к потере жизнеспособности эритроцитов [251, 264, 265]. Очевидно, что отщепление везикул от клеток является лишь завершающим процессом в последовательности изменений, происходящих с клеткой при сфероэхиноцитарной трансформации. Поэтому важно понять, какие условия инициируют структурные перестройки в мембране и цитоскелетном комплексе и предшествуют отщеплению везикул от клеточной мембраны.

Во-первых, структурно–функциональными составляющими, ответственными за такие перестройки являются мембранный бислой, цитоскелет и активные метаболические процессы, обеспечивающие поддержание гомеостаза клетки:

Во-вторых, бислой несжимаем [223] и, следовательно, уменьшение площади его поверхности возможно только в случае потери клеткой части мембранного материала. Кроме того, сравнение площади цитоскелета (30 мкм^2), полученной из теоретических расчетов, с площадью мембраны «тени» эритроцита, измеренной экспериментально (130 мкм^2) [266], свидетельствует о том, что площадь мембранного скелета, свободного от мембранного бислоя, существенно меньше, чем площадь мембраны «тени» эритроцита [239, 267]. Следовательно, скелет, связанный с внутренним монослоем мембраны, при физиологических условиях растянут и потенциально способен к самопроизвольному сокращению [223, 226, 268]. В результате возникает тенденция к изгибу мембраны и локальному изменению ее кривизны при сокращении спектрин-актиновой сети.

Таким образом, любые условия, которые вызывают сокращение спектриновой сети, инициируют локальное, положительного знака изменение спонтанной кривизны мембраны в виде выступов на ее поверхности и как следствие могут приводить к эхиноцитозу и формированию спикул. Подтверждением такого развития событий могут служить также следующие соображения. Различие в радиусе кривизны мембраны в области этих выступов и в ее остальной части, обуславливает энергетически выгодные условия и инициирует латеральное перераспределение компонентов мембраны с большей по абсолютной величине спонтанной кривизной, в область выступов. В этом случае будет наблюдаться взаимосвязь между завершением процесса формирования спикулы и минимизацией возможного значения свободной энергии деформации мембраны, что является предпосылкой для «длительного и устойчивого» нахождения спикулы на поверхности клетки.

Энергетическое обеспечение процессов внутриклеточного гомеостаза (прежде всего, ионного) и поддержание формы эритроцитов осуществляются за счет энергии гидролиза АТФ, образующейся в процессе гликолиза и являющейся основным источником метаболической энергии в эритроцитах [229]. Истощение эритроцитов по АТФ приводит к ряду нарушений, в частности к прекращению работы ионных насосов и изменению ионного баланса в системе среда–клетка, модификации белков и липидов мембраны и дефосфорилированию спектрина [229, 269–271]. Это, вероятно, приводит к ослаблению взаимодействий и локальным нарушениям в спектрин–актиновой сети. Исследованию фосфорилирования в АТФ-зависимых изменениях формы эритроцитов уделяется много внимания [228, 272], поскольку этот процесс оказывает существенное влияние не только на структурное состояние белков цитоскелета, но и на характер их взаимодействия с заряженными фосфолипидами и интегральными белками мембраны [273]. Уровень фосфорилирования спектрина, белков полос 4.1, 4.2, 4.9 определяет эластичность белковой сети цитоскелета и соответственно способность

эритроцитов к упругой деформации, а также форму клеток [274]. Об этом свидетельствуют и данные других авторов [226, 275], показывающих, что мембранная механическая стабильность регулируется фосфорилированием β -спектрина мембраносвязанной казеинкиназой I. [276–278]. Известно также, что молекулы анкирина фосфорилируются в нескольких участках мембраны, включая спектрин-связующий домен [223, 236]. В результате фосфорилирования анкирина в три-четыре раза уменьшается его сродство к молекулам спектрина, организованного в тетрамеры, и в то же время не оказывает подобного эффекта на связывание анкирина со спектрином - димером [258, 273], а также ингибирует процесс ассоциации анкирина с цитоплазматическим доменом БПЗ [268]. Таким образом, фосфорилирование белков скелета потенциально может влиять на физиологическую функцию нативной мембраны эритроцита.

Сфероэхиноциты и сфероциты обычно классифицируются как завершающие, предлитические стадии изменения формы эритроцита, что, на наш взгляд, нуждается в некотором уточнении. Сфероцит, образовавшийся из стоматоцита или дискоцита при помещении в гипотонический раствор и полностью сохранивший в количественном отношении состав мембраны, принципиально отличается от сфероцита, который образуется на завершающем этапе эхиноцитарной трансформации, сопровождаемый потерей значительной части мембранного бислоя, и который имеет модифицированный, за счет сокращения площади мембраны, цитоскелет.

Об этом свидетельствуют представленные выше результаты, относительно осмотической устойчивости эритроцитов различной формы при их помещении в раствор NaCl 90 мОсмоль (рис. 4.17). Эти данные иллюстрируют следующую особенность: эритроциты после 7 суток экспозиции в неэлектролитных средах в некоторых случаях обладали более высокой осмотической устойчивостью, чем свежевыделенные. Учитывая, что после 7 суток ГХ в неэлектролитных средах с нейтральными и щелочными значениями pH популяция эритроцитов представлена в основном

эхиноцитами (рН 7,2) и сфероэхиноцитами (рН 8,6), можно предположить, что сфероэхиноциты и сфероциты, рассматриваемые обычно как предлитическое состояние клеток, проявляют более высокую осмотическую резистентность по сравнению с дискоцитами.

Этот факт можно было бы объяснить снижением внутриклеточного осмотического давления и созданием «внутриклеточной гипотонии» в результате выхода из клетки по электрохимическому градиенту ионов K^+ и Cl^- . Как показывают данные, полученные при измерении внутриклеточного содержания K^+ в процессе ГХ, для всех экспериментальных условий, кроме калий-содержащей среды 2, уровень внутриклеточного K^+ снижается (см. рис. 4.19). Выход катионов K^+ из эритроцитов и форма клеток напрямую не коррелируют. Действительно, наиболее существенная потеря ионов K^+ происходит в течение первых суток, а форма клеток за этот период практически не изменяется по сравнению с контролем, за исключением случая экспозиции клеток в неэлектролитных средах при рН 8,6.

Вероятно, что устойчивость клеток к гипотонии может быть также связана со структурными изменениями в мембране и цитоскелете. Очевидно, потеря клеткой в ходе сфероэхиноцитарной трансформации до 30 % и более поверхности липидного бислоя, содержащего интегральные белки, может существенно влиять не только на пластические свойства и устойчивость мембраны к гипотонии, но и на мембранную проницаемость.

Изучение латеральной и вращательной подвижности БПЗ в мембране показало, что он может находиться в двух различных состояниях. По данным ряда авторов в эритроците до 40 % БПЗ прочно связано со спектриновой сетью мембраны и может совершать только колебательные движения. Остальная часть – (около 60 %) непрочна связана с цитоскелетом и способна к свободной латеральной диффузии в пределах элементарной ячейки цитоскелета [236, 190]. Это подтверждено результатами многочисленных ультраструктурных исследований мембраны, в которых показано, что ВМЧ в норме хаотически распределяются на сколотой поверхности мембраны

эритроцита [11, 168, 170] и скапливаются в агрегаты при денатурации спектрина [15, 279, 280].

Можно предположить, что именно эта, не прочно связанная с цитоскелетом и свободно диффундирующая часть трансмембранных («функциональных») белков участвует в формировании спикул. Прочно связанные с цитоскелетом («структурные») белки в основном участвуют в стабилизации формы клетки и отвечают за взаимодействие мембраны с цитоскелетом. Тот факт, что сфероэритроциты и сфероциты проявляют более высокую устойчивость к гипотонии по сравнению с дискоцитами, вероятно, связан с потерей в составе везикул «функциональных» трансмембранных белков, обеспечивающих мембранную проницаемость. Оставшаяся часть «структурных» белков сохраняет достаточно высокую стабильность к различным воздействиям, в том числе и к гипотонии, ГХ (рис. 4.28).

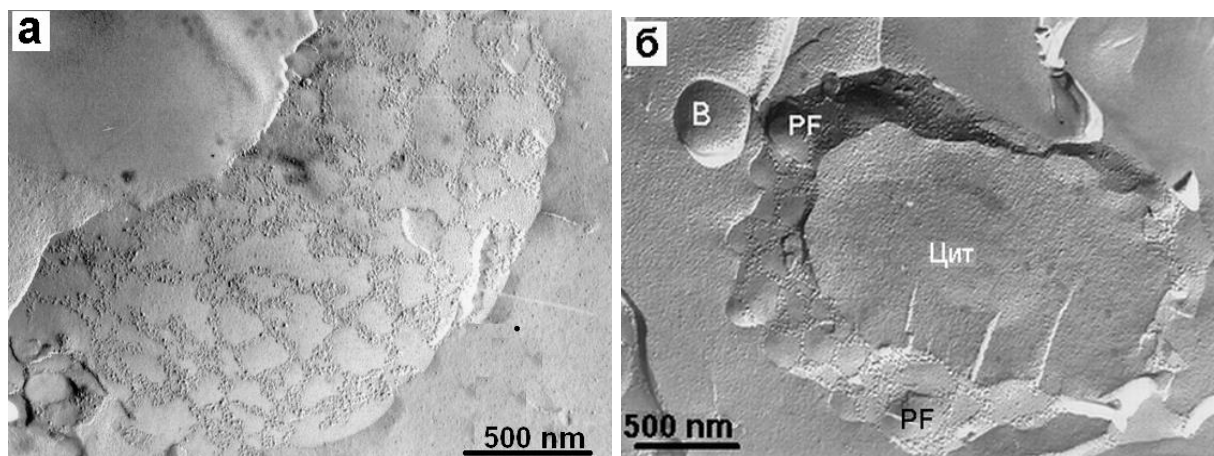


Рис. 4.28. Ультраструктура мембран эритроцитов после 30 (а) и 45 суток (б) ГХ. Обозначения: Цит – цитозоль; PF- внутренняя, прилежащая к цитоплазме поверхность скола с характерным распределением ВМЧ; В – везикула.

Ультраструктура мембран сфероцитов, образовавшихся в результате ГХ в течение 30 и 45 суток при, рН 7,2, иллюстрирует, что трансмембранные белки, наблюдаемые в виде характерного, подобного сети распределения

ВМЧ (рис. 4.28), свидетельствует о сохранении «структурных» белков мембраны и усилении их взаимодействия с белками цитоскелета.

Как известно, значительное уменьшение содержания свободно диффундирующего БПЗ без снижения состава скелетно-связанного БПЗ приводит к мембранной нестабильности. Подтверждением этому являются также данные о дестабилизации структуры цитоскелета и увеличении мембранной жидкостности в эритроцитах, для которых характерен частичный дефицит БПЗ в мембране, наблюдаемый при сфероцитарной гемолитической анемии [280].

Существует несколько вариантов объяснения механизма формирования спикул и их отщепления от мембраны в виде везикул [209, 263]. По мнению [209], участок поверхности мембраны, утративший связь со спектрин-актиновым каркасом, «отторгается» клеткой. Автор считает, что выпячивание и отшнуровывание этого аномального мембранного участка может осуществляться в результате множественных разрывов и потери фрагментов цитоскелета, а также при участии сил гидростатического давления и поверхностного натяжения. Однако в работе Г. В. Гасс с соавторами [281] подчеркивается, что разрыв даже нескольких связей в спектрин-актиновой сети уже может привести к образованию спикулы на поверхности эритроцита.

Мы считаем, что процесс отпочковывания везикул от мембраны клетки происходит «не посредством множественных разрывов и потери фрагментов цитоскелета» как указывается в работе [209], а в результате локального его отслоения от мембраны и последующего сокращения (уплотнения) непрерывного цитоскелета (рис. 4.29).

Схематически это может выглядеть следующим образом. На участке мембранного бислоя с типичным распределением ВМЧ (рис. 4.29; этап 1), в процессе ГХ при снижении уровня АТФ и дефосфорилирования спектрина происходят локальное отслоение (провисание) и сокращение спектриновой сети, приводящие к локальному «излишку» поверхности бислоя и

формированию на нем мембранного выроста с положительной кривизной (рис. 4.29; этап 2, 3).

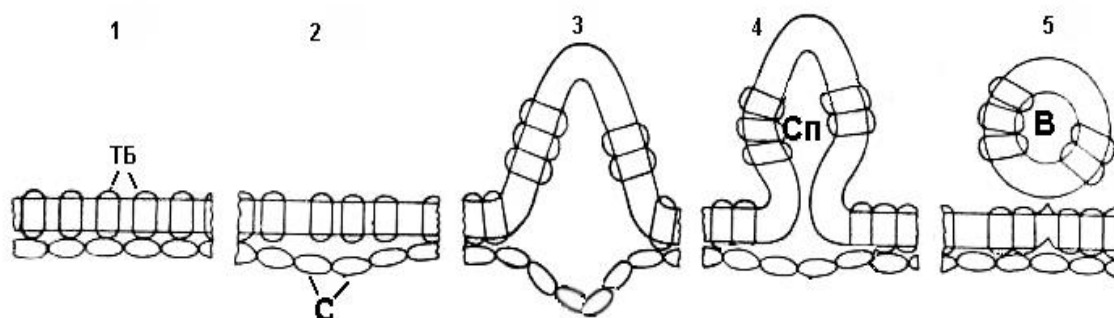


Рис. 4.29. Этапы (1–5) формирования и отпочковывания мембранных везикул. (ТБ – трансмембранные белки; Сп – спикула; С – молекулы спектрина; В – везикула)

Отслоение скелета от мембраны приводит к появлению дополнительной свободы латерального перемещения трансмембранных белков и липидов, что проявляется в их агрегации. Дальнейшее метаболическое истощение эритроцитов вызывает еще большее сокращение спектриновой сети и выпячивание не связанных со спектриновым каркасом участков мембраны в виде спикул (рис. 4.29; этап 4), которые затем отпочковываются от поверхности клетки как сферические везикулы (рис. 4.29; этап 5). При этом неизбежно должно происходить уплотнение цитоскелета (рис. 4.30).

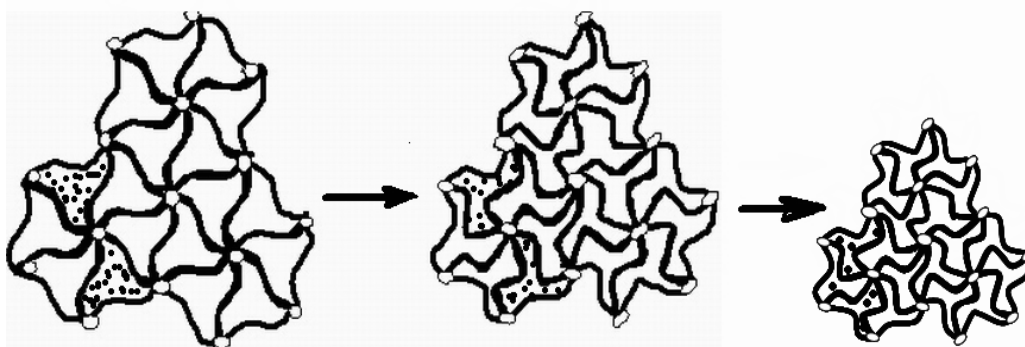


Рис. 4.30. Гипотетическая последовательность трансформации цитоскелета (фрагмента) при переходе от дискоцита к сфероэритроциту.

О такой трансформации цитоскелета эритроцита свидетельствуют имеющиеся экспериментальные факты.

Во-первых, при электронно-микроскопическом исследовании при указанных выше трансформациях внутри эритроцитов молекулы спектрина и тем более фрагменты цитоскелета, не ассоциированные с внутренней поверхностью мембраны клетки не выявлены. Известно, что размер молекулы гемоглобина составляет 6,8 нм, а ее молекулярная масса – 64,5 кДа [88]. Для спектрина в наиболее устойчивой, димерной, форме эти величины составляют 100 нм и 220-240 кДа, соответственно [186]. Такое 3–10-кратное различие указанных показателей для молекул спектрина, по сравнению с молекулами гемоглобина не могло быть «не замечено» методами ТЭМ, при условии, что фрагменты цитоскелета отщеплялись от внутренней поверхности мембраны эритроцита.

Во-вторых, если бы при ГХ происходила потеря элементов цитоскелета, то на гель-электрофореграммах наблюдалось либо уменьшение содержания белка полосы 1.2 по отношению к белку полосы 3 или, по крайней мере, оно не изменялось. Экспериментальные данные свидетельствуют об обратном [107, 282].

В-третьих, поскольку белковый скелет не непрерывно, а точечно ассоциирован с мембраной, то наиболее вероятно, что трансформация поверхности клетки при сокращении скелета будет иметь локальный характер и проявляться в формировании спикул, основания которых сохраняют контакт с белковыми «якорями» скелета [267, 283]. С большой долей вероятности можно утверждать, что процесс везикуляции является циклическим и проявляется в чередовании фаз сокращения скелета, формировании и отщеплении везикул, а также замыкании бислоя мембраны.

Полученные результаты в совокупности указывают на то, что происходящие при различных условиях ГХ эритроцитов морфологические изменения (размеры и форма клеток, образование мембранных везикул и утрата клеткой гликокаликса, частичная потеря и агрегация

трансмембранных белков) непосредственно затрагивают ультраструктурную организацию цитоскелет-мембранного комплекса.

Вопрос о влиянии параметров среды на образование везикул и повреждение эритроцитов при их гипотермическом хранении является важным, поскольку везикуляция, вероятно, является тем процессом, который непосредственно может быть связан как с потерей эритроцитами их жизнеспособности, так и с их адаптацией к изменившимся условиям.

Данные литературы свидетельствуют, что увеличение сроков ГХ эритроцитов путем подбора соответствующего состава среды, устранения «эффекта стекла» за счет использования пластиковых сосудов для хранения связано со снижением степени везикуляции эритроцитов [106, 284]. На морфологическом уровне существует корреляция между старением эритроцитов *in vivo* и процессами, вызывающими изменение эритроцитов *in vitro* при ГХ и сопровождающимися везикуляцией.

Таким образом, изучение структурных перестроек в эритроцитах в условиях температурного воздействия и модификации состава среды показало, что наблюдаемые изменение формы и деформация плазматической мембраны, перестройки во внутриклеточном объеме и ряд других изменений указывают на участие в этих процессах не только липидного бислоя и белков мембраны, но и ионного состава, цитоскелетной сети, состояние которой в итоге, посредством белок-белковых взаимодействий контролирует форму и объем клеток.

- В процессе ГХ (1–21 сут) в зависимости от ионной силы и pH среды эквilibрации наблюдается взаимосвязь между морфологическим состоянием клеток, их осмотической устойчивостью и степенью повреждения. При кислых значениях pH эритроциты трансформируются в гетерогенную популяцию дискоцитов и эхиноцитов вне зависимости от состава среды хранения, тогда как нейтральные значения pH вызывают трансформацию эритроцитов в гомогенную, эхиноцитарную популяцию. При

щелочных значениях pH в неэлектролитных средах клетки уже на 1-е сут ГХ интенсивно трансформируются в сфероэритроциты, тогда как в электролитных образуется гетерогенная популяция дискоцитов и эритроцитов.

- Степень повреждения клеток в неэлектролитных средах в процессе ГХ является достоверно более низкой, а их осмотическая устойчивость более высокой по сравнению с повреждением в электролитных средах. Установлено, что вне зависимости от ионной силы среды при кислых значениях pH наблюдается минимальная осмотическая устойчивость эритроцитов. Наиболее устойчивой к действию факторов среды является эритроцитарная форма клеток. Исследование состояния примембранного слоя эритроцитов в процессе ГХ показало, что между 10 и 14-ми сутками хранения происходит разрыхление структуры гликокаликса, а при некоторых условиях его отслоение от мембраны в окружающий клетки раствор.

- Потеря внутриклеточного K^+ происходит в течение первых суток ГХ эритроцитов для всех экспериментальных условий, исключая натриевую среду при pH 5,4, для которой отмечался высокий, более чем 92%, по сравнению с контролем, уровень содержания K^+ внутри эритроцитов. В неэлектролитных средах наблюдалась более динамичная потеря внутриклеточного K^+ . Выход K^+ из эритроцитов и форма клеток напрямую не коррелируют между собой. Исключением является неэлектролитная среда при pH 8,6. Максимум потери K^+ происходит в течение первых суток, а форма клеток в этот период практически не меняется и остается на уровне контроля.

- В ходе сферо-эритроцитарной трансформации в результате отслоения везикул эритроцит теряет до 30 % мембранной поверхности. Для эритроцитов III и IV степени кренирования значение диаметра спикул составляет 435 ± 43 нм и 257 ± 37 нм, а размер отпочковавшихся везикул – 495 ± 87 нм и 348 ± 65 нм, соответственно. Значение диаметра спикул в местах их утончения составляет, в среднем, 137 ± 25 нм; количество спикул, на

поверхности сфероэритроцитов колеблется в пределах от 35 до 89 на одну клетку и, в среднем, составляет 60 спикул.

ГЛАВА 5. РЕАКЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ГЕТЕРО- И ГОМОЙОТЕРМНЫХ ОРГАНИЗМОВ НА ТЕМПЕРАТУРНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ.

Обоснование данного направления исследований. В ходе эволюции у млекопитающих выработалось несколько механизмов адаптации к холоду, характеризующихся активацией термогенеза у гомойотермов, естественным снижением температуры тела у зимоспящих организмов и развитием холодоустойчивости при замедлении обмена веществ вплоть до анабиоза у пойкилотермов (определения используемых терминов см. [6, 285]). В первом случае создание искусственной гипотермии путем исключения термогенеза осуществляется с помощью фармакологических препаратов. У гетеро- и пойкилотермов возможность существования при околонулевых температурах закреплена генетически и обеспечивается в значительной степени не только за счет снижения общего метаболизма, но и в результате структурных перестроек в мембранах клеток, их органеллах. Достаточно надежно установлено, что в состоянии глубокой спячки общий уровень метаболизма снижается до 2-4% от нормального, а большинство физиологических функций прерывается вообще, либо осуществляются со значительно сниженными скоростями [9, 138]. При этом биохимические процессы, работа органов и систем организма перестраиваются так, что даже при очень низкой температуре тела поддерживается определенный гомеостаз [120, 123, 285]. Это делает гетеротермов удобной природной моделью для изучения адаптационных возможностей биологических объектов на клеточном и организменном уровнях [9].

Об уникальности явления гибернации сказано очень много (см. обзоры [2, 5, 6, 9, 120, 285–287]). Стоит лишь подчеркнуть, что, во-первых, этот феномен представляет не только теоретический, но и практический интерес, поскольку именно в нем, вне всяких сомнений, кроются новые подходы в решении ряда медицинских проблем, в том числе и такой как гипотермия органов и организма в целом [123, 142]. Кроме того, было установлено, что в состоянии оцепенения млекопитающие переносят без вреда для организма

недостаток кислорода, действие многих ядов, заражение смертельными болезнями, действие летальных доз радиации и эта устойчивость присуща не только организму в целом, но и изолированным из него клеткам и органам. [121–123].

В изданных в последние годы монографиях и обзорных статьях [5, 6, 288, 289] достаточно подробно изложены теоретическое обоснование и методические подходы и рекомендации по практическому использованию гипометаболического состояния на различных видах организмов; получены обнадеживающие результаты по хранению органов при гипотермии [2]. В то же время морфологических критериев обратимости перестроек, происходящих в структуре различных биологических объектов при входе в гипометаболическое состояние и выходе из него, в научной литературе крайне мало. В значительной степени это связано с трудоемкостью данных исследований, ограниченной доступностью данных объектов исследования и с некоторой неоднозначностью получаемых результатов.

Очевидно, что различия между «устойчивым» к температурным колебаниям и «термолабильным» организмами во многом определяются способностью клеточных мембран функционировать в условиях пониженных и изменяющихся температур тела. В то же время необходимо учитывать, что структурно-функциональные свойства биомембран определяются двумя основными компонентами - белками и липидами. Их взаимодействие и взаимовлияние является ключевым моментом регуляции структурных и функциональных свойств клеточных мембран. Именно этим можно объяснить, что значительное число работ, посвященных выяснению механизма адаптации гетеро- и пойкилотермных организмов, касается изучения качественного и количественного состава липидов, функционирования мембраносвязанных ферментов и белковых комплексов, «триггеров спячки», обеспечивающих сохранение жизнеспособности клеток при пониженных температурах [8,189].

Из классических обзорных работ [5, 189, 285, 287], касающихся мембранных аспектов адаптации, следует, что у гибернаторов существуют специфические функциональные модификации мембранного транспорта, мембраносвязанных ферментных систем. Однако в литературе отсутствуют четкие представления об их структурной обусловленности. Анализ изучения липидного состава и текучести липидного бислоя показал, во всяком случае, что процесс "гомеовязкостной адаптации", имеющий место у прокариотов и у некоторых пойкилотермов при акклимации к низким температурам, не является характерным для большинства мембран клеток гибернаторов [189, 285]. При этом практически отсутствуют данные, касающиеся возможного изменения состава и структурного состояния мембраносвязанных белков гибернирующих млекопитающих при резкой смене животными фаз зимней спячки. Поскольку в сезон гибернации гетеротермы периодически, за короткий промежуток времени (2–3 часа) изменяют температуру тела от околонулевой в состоянии торпора до 37⁰С при эутермии, у них должна постоянно поддерживаться способность функционирования систем различного уровня организации при гипо– и эутермических температурах.

В этой связи хотелось бы подчеркнуть преимущества эритроцита как одного из наиболее подходящих объектов для этих исследований. Первое и основное его преимущество – принадлежность к кровеносной системе, функционирующей и при глубокой гибернации. Это предполагает необходимость структурно-функциональной температурной адаптации этих клеток. Второе – хорошо изучен состав и строение эритроцитарной мембраны гомойотермных организмов, установлено наличие термоиндуцированных перестроек и их связь с определенными компонентами мембраны [224, 228]. Показано также регуляторное влияние на структурно-функциональное состояние эритроцитарной мембраны мембранного скелета, связанного с интегральными компонентами бислоя слабыми электростатическими взаимодействиями [206, 207, 290]. Это позволяет учитывать не только модификацию структуры интегральных

компонентов и их взаимодействий, но также возможную роль "слабых" связей в комплексе мембрана-цитоскелет. И еще одно преимущество данной клетки - возможность получать изолированные мембраны (тени) с хорошей степенью нативности (т.е. сохранением их структурно-функциональных характеристик) лишь манипуляцией ионной силой раствора.

Все это позволяет рассматривать эритроцит в качестве адекватной модели клеточной системы для изучения молекулярных и ультраструктурных мембранных механизмов температурной адаптации клеток.

Выявить структурные модификации мембраносвязанных белков при "холодовой адаптации" гибернаторов возможно, применив сравнительные исследования их состояния при фиксированной температуре суспензии клеток и их мембран. Однако, учитывая термотропность мембранных структур (способность к термоиндуцированным структурным переходам), более плодотворными, на наш взгляд, может быть сравнение температурных зависимостей структурных характеристик мембранных белков гетеротермного и гомойотермного организмов, во-первых, и гетеротермов в различных физиологических состояниях, во-вторых.

Необходимо также отметить, что использование электронно-микроскопических подходов, и в частности метода замораживания-скалывания, позволяет «визуализировать» ряд структурных перестроек, происходящих в цитоскелет-мембранном комплексе и цитозоле клетки. В первую очередь, это связано с характером распределения интегральных белков мембраны, наблюдаемых в виде внутримембранных частиц (ВМЧ), а также с гликокаликсом мембраны, цитозолем клетки и опосредовано с ее цитоскелетом. При физиологических условиях в мембранах эритроцитов гомойотермов плотность ВМЧ по данным различных авторов, составляют 2300–2600 и 900–1000 частиц в 1 мкм^2 на выявляемых при скалывании RF- и EF- поверхностях, соответственно, причем отмечается их постоянство в клетках одного донора, у различных доноров и от вида к виду [192, 206].

Несмотря на возросшее в последние годы количество работ по молекулярным аспектам гибернации и определенные достижения в понимании молекулярных механизмов гибернации, эти вопросы остаются во многом невыясненными. В частности это касается проблем регуляции процессов в цикле спячка-бодрствование, и в особенности это связано с возможностью осуществления регуляторных процессов на уровне посттрансляционной модификации белков, когда их активность прямо или опосредованно контролируется за счет изменения их взаиморасположения или связи с другими белками [5, 120]. Такой тип регуляции осуществляется, по нашему мнению, в эритроцитах гетеротермов, что обеспечивает, им способность одинаково «успешно функционировать» в организме животного от субнулевой температуры тела до эутермии во время межбаутного пробуждения и активности.

Для доказательства этого предположения проведены исследования структурно-функциональных особенностей эритроцитов длиннохвостого якутского суслика *Citellus undulatus* в сезон гибернации (декабрь-февраль) в состоянии гибернации (ГС, температура тела 2–6°C), пробуждения (ПС, 33–35°C) и активности (АС, 37°C) в зимний период, а также влияния на эритроциты гибернатора длительного гипотермического хранения.

5.1 Температурозависимые изменения ультраструктуры мембран эритроцитов гетеротермов при различных физиологических состояниях животного.

Анализ морфологии эритроцитов методами световой и растровой электронной микроскопии показал идентичность формы эритроцитов донора и зимоспящих сусликов при физиологических температурах (37°C). Различие наблюдалось лишь в их размере, составляющем, соответственно, 6,5–7,5 и 5–6 мкм, (рис. 5.1), что подтверждается данными измерения другими методами [291].

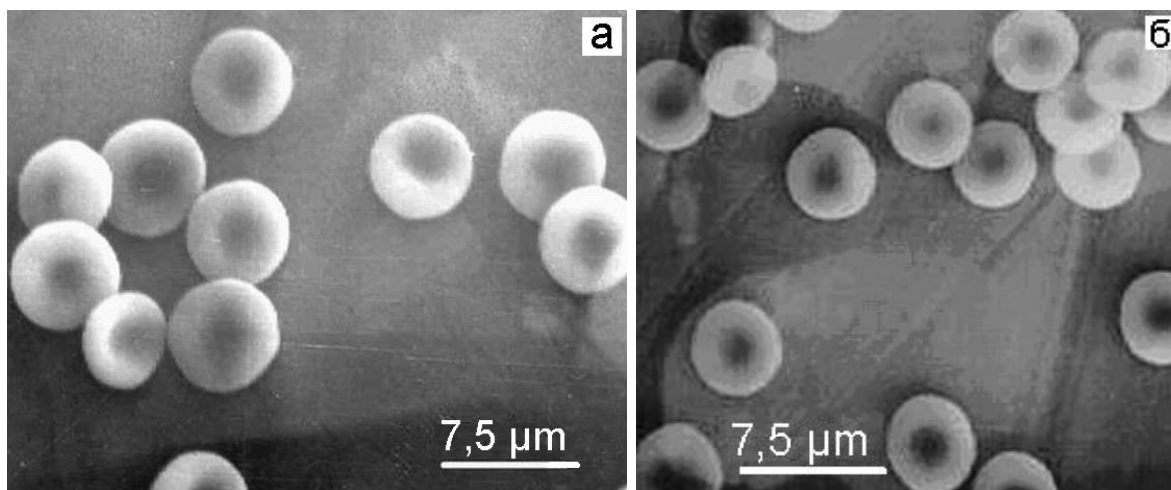


Рис. 5.1. Морфологическое состояние эритроцитов человека (а) и активного в зимний период суслика (б) при 37°C. Метод РЭМ.

Исследование параметров ультраструктуры мембраны эритроцитов активного в зимний период суслика также показало сходство ее морфологических характеристик с мембранами эритроцитов человека и гомойотермных животных: равномерно гладкая поверхность, хаотическое распределение ВМЧ (рис. 5.2) и примерное соответствие численных значений их плотности, составляющей 2383 ± 197 и 1094 ± 91 частиц в 1 мкм^2 на PF- и EF-поверхностях, соответственно.

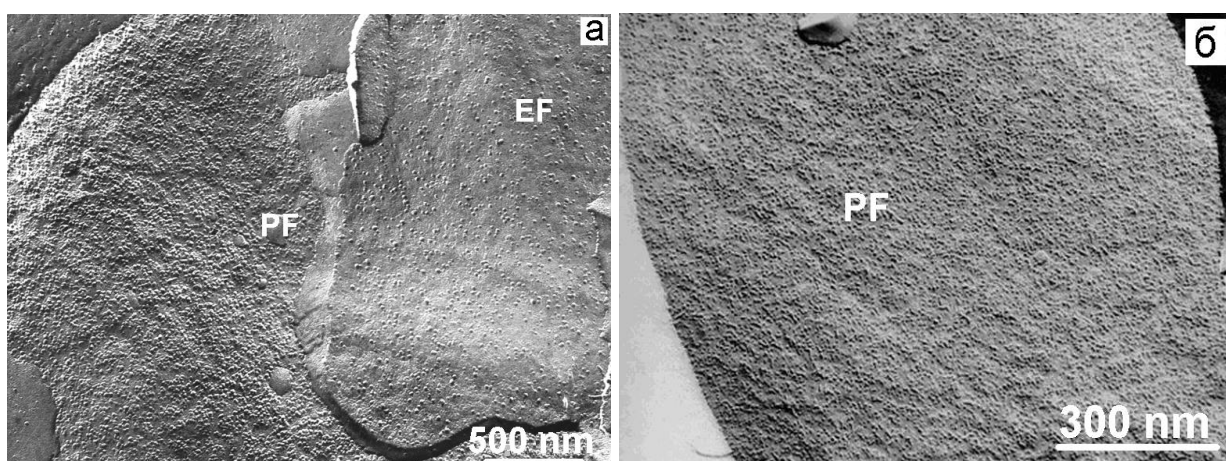


Рис. 5.2. Ультраструктура PF-поверхности мембраны эритроцитов человека (а) и активного в зимний период суслика (б) при 37°C. Замораживание—скалывание. Криофиксация от 37°C.

Ультраструктура мембраны эритроцитов, взятых у сусликов в состоянии спячки и криофиксированных от 4°C (рис. 5.3), имела ряд существенных отличий от мембран эритроцитов активного животного:

- около 40–50% мембран обнаруживали характерные микровозмущения рельефа PF- поверхности в виде «бугристости», размер которых в плоскости мембраны составлял 100–200 нм (рис. 5.3, а, б), а ВМЧ имели тенденцию к агрегации с уменьшением локальной плотности частиц на буграх и возрастанием ее во впадинах;

- часть поверхностей мембран (30–40%) имела относительно равномерное распределение ВМЧ, однако для них было характерно множественное отклонение прохождения плоскости скола (*) с образованием небольших (80–200 нм) участков, лишенных ВМЧ (рис. 5.3, в);

- примерно 20% поверхностей имели четко выраженную агрегацию частиц (рис. 5.3, г). Размер участков мембраны, свободных от ВМЧ, был равен 100–250 нм;

- средние значения плотности ВМЧ на PF- и EF- поверхностях составляли, соответственно, 2824 ± 210 и 750 ± 68 частиц в 1 мкм^2 .

Отмеченные особенности мембраны эритроцитов, вероятнее всего, свидетельствуют о большей гетерогенности эритроцитов спящего животного, например, по возрастному и структурно-функциональному статусу, а также могут явиться результатом незначительного (около 3,1 %) уменьшения размеров эритроцитов в период спячки [291], что, по нашему мнению, может быть связано, в том числе, с сокращением молекул спектрина и уплотнением цитоскелета.

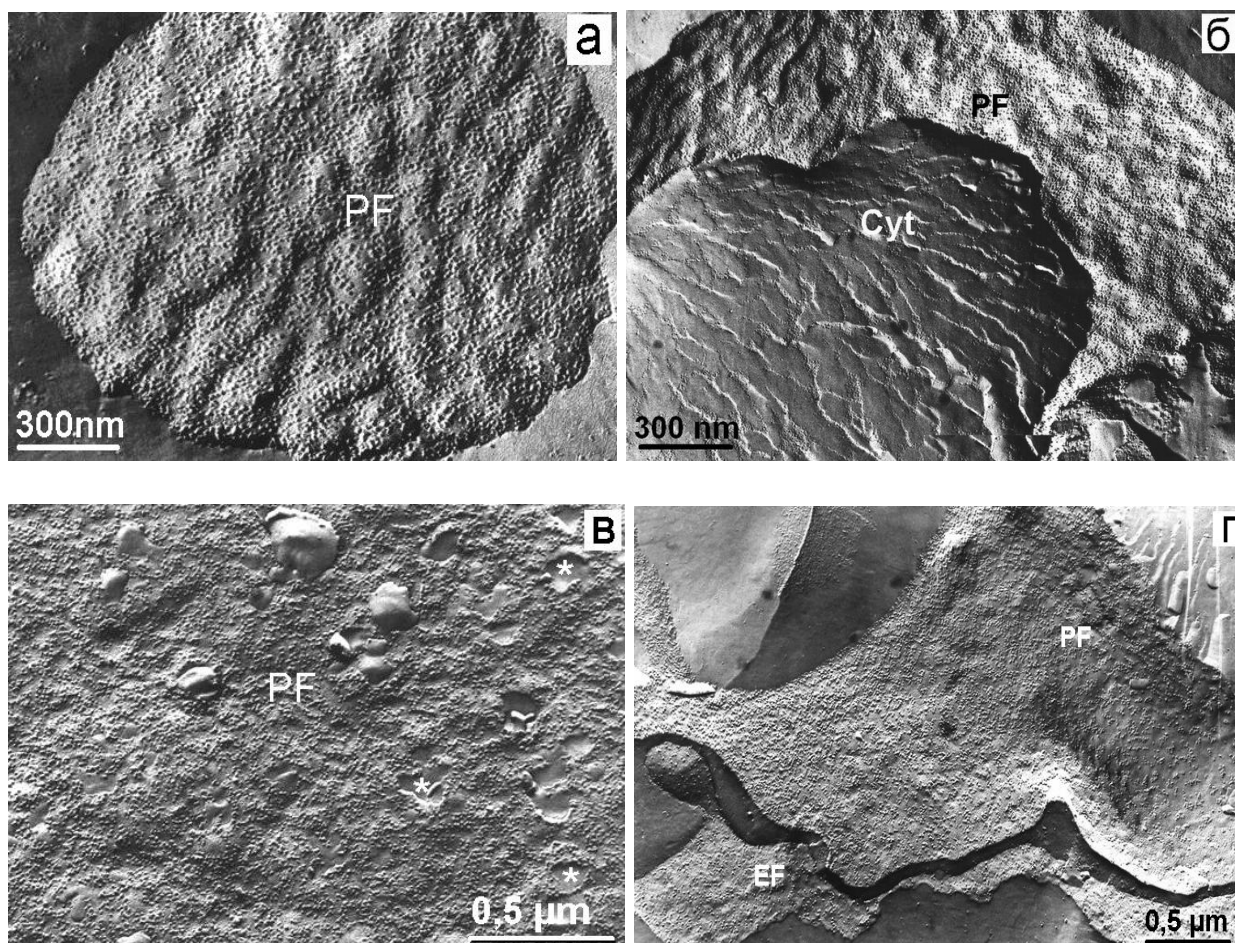


Рис. 5.3. Ультраструктура мембран эритроцитов суслика в состоянии глубокой гибернации. Различие в морфологии PF-поверхностей (а–г) и характерная структура цитозоля (Cyt) эритроцитов (б).

У сусликов в состоянии пробуждения мембрана эритроцитов (рис. 5.4) характеризовалась некоторой «неустойчивостью»: в зависимости от температуры исследования (криофиксации) она приобретала черты характерные для ультраструктуры мембран эритроцитов спящего или бодрствующего животных. При 4°C их мембрана приобретала признаки, характерные для эритроцитов спящего суслика: волнообразный рельеф PF-поверхности, отклонение прохождения плоскости скола, плотность ВМЧ 2688 ± 185 и 775 ± 58 частиц на 1 мкм^2 на PF- и EF-поверхностях соответственно.

При 36°C мембрана эритроцитов проснувшегося суслика, практически не отличалась по морфологии от мембраны эритроцитов животного в активном состоянии (рис. 5.4, г). Плотность ВМЧ составляла 2463 ± 210 и 1164 ± 98 частиц в 1 мкм^2 на PF- и EF-поверхностях соответственно.

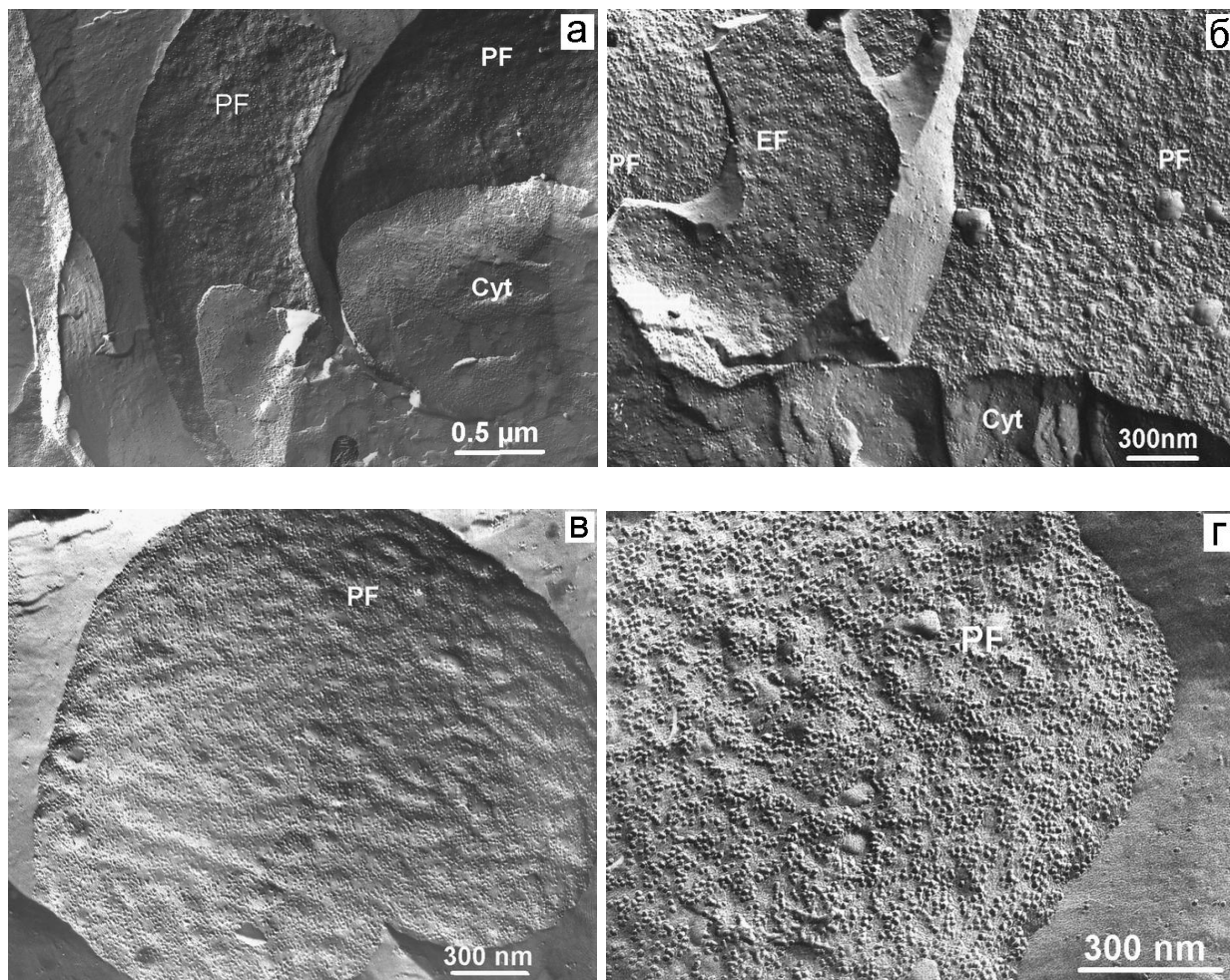


Рис. 5.4. Ультраструктура EF- и PF-поверхностей мембран эритроцитов суслика в состоянии пробуждения; (а–в) – криофиксация от 4°C; (г) – от 36 °C

Как уже отмечалось выше, прохождение плоскости скола, характер распределения ВМЧ в плоскости мембраны, а также их перераспределение между поверхностями скола отражают динамику белок-белковых и белок-липидных взаимодействий и определяются структурно-функциональным состоянием мембраны.

Учитывая это, мы провели подсчет частиц на выявляемых поверхностях скола мембран эритроцитов для трех состояний животного

(рис. 5.5). Как следует из рисунка, при относительно неизменной суммарной плотности частиц на двух поверхностях, происходит их перераспределение между PF- и EF-поверхностями мембраны эритроцита в зависимости от состояния животного.

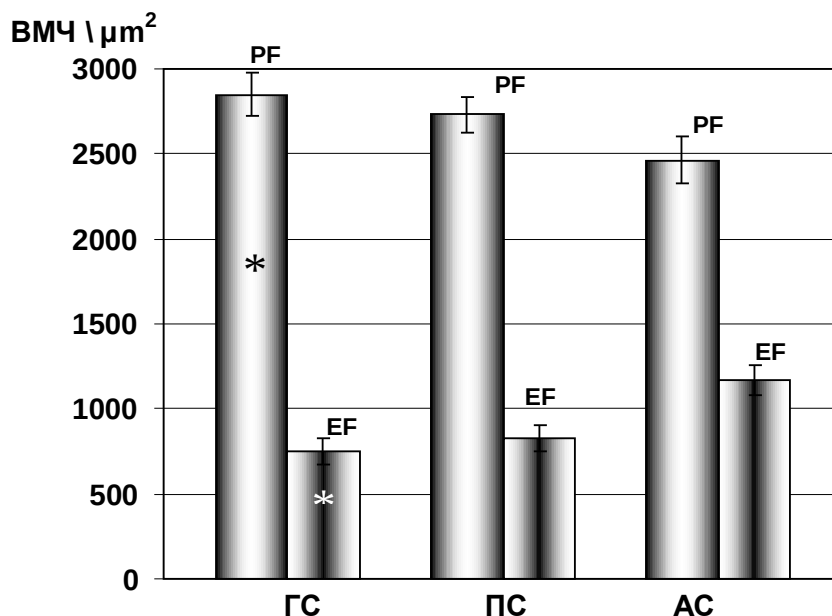


Рис. 5.5. Гистограмма распределения плотности ВМЧ на EF и PF-поверхностях мембран эритроцитов для трех состояний (ГС, ПС, АС) животного. ($n=10$, $p < 0,05$); * – достоверное отличие по сравнению АС.

Последний факт свидетельствует об изменении характера межмолекулярных взаимодействий в мембрано-цитоскелетном комплексе: увеличение плотности ВМЧ на PF, прилежащей к цитозолю поверхности, указывает на усиление взаимодействия трансмембранных белков и цитоскелета в эритроцитах спящего животного.

Подтверждением модификации межмолекулярных взаимодействий в мембране эритроцитов в ответ на изменение физиологического состояния животного явились данные исследования динамического состояния свободных липидов методом ЭПР спиновых зондов и собственной флуоресценции белков мембран эритроцитов суслика, позволившие также

выявить отличие мембран эритроцитов спящего от эритроцитов пробуждающегося и активного животного [129].

С помощью спин-меченого в области полярных головок амида пальмитиновой кислоты были обнаружены особенности динамического состояния свободных липидов, сопровождающие изменение физиологического состояния гибернатора в интервале 4–37°C (рис. 5.6).

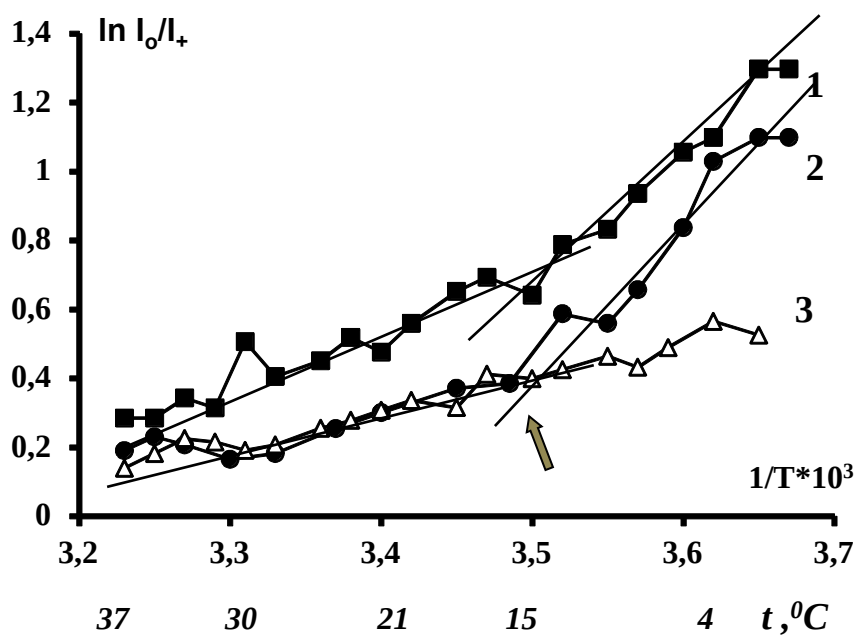


Рис. 5.6. Аррениусовы зависимости параметра подвижности жирнокислотного зонда в мембранах эритроцитов суслика в спящем (1) и активном (2) состояниях и человека (3)

Состояние глубокой спячки характеризовалось повышенной по сравнению с состоянием активности микровязкостью липидов во всем исследованном диапазоне температур. У мембран эритроцитов, взятых у спящего животного, время корреляции вращательной подвижности спин-меченого в области полярной головки амида пальмитиновой кислоты, измеренное при 4°C, в 1,5 раза выше, чем у бодрствующего. Это различие сохранялось в интервале 4–30°C и практически нивелировалось в области физиологических температур (35–37°C). Ниже 15–13°C отмечено изменение энергии активации вращательной подвижности зонда в обоих случаях, с

резким затормаживанием подвижности зонда, более выраженном у активного животного. Отметим, что состояние липидов мембраны эритроцитов активного животного и человека также различаются при температурах ниже 15°C.

Сравнительное исследование термотропного «поведения» мембранных белков эритроцитов сусликов в разных физиологических состояниях также выявило определенные особенности (рис. 5.7). Значение параметра $\lambda_{\text{макс.}}$, отражающего полярность и релаксационную подвижность ближайшего микроокружения белковых триптофановых остатков, в случае активного зимнего и пробуждающегося животных слабо зависело от температуры в диапазоне 2–40°C и составляло в среднем 337–338 нм (рис. 5.7, зависимость 1). Такое же значение $\lambda_{\text{макс.}}$ при физиологической температуре характерно для триптофановой флуоресценции белков эритроцитов гомойотермного организма – человека.

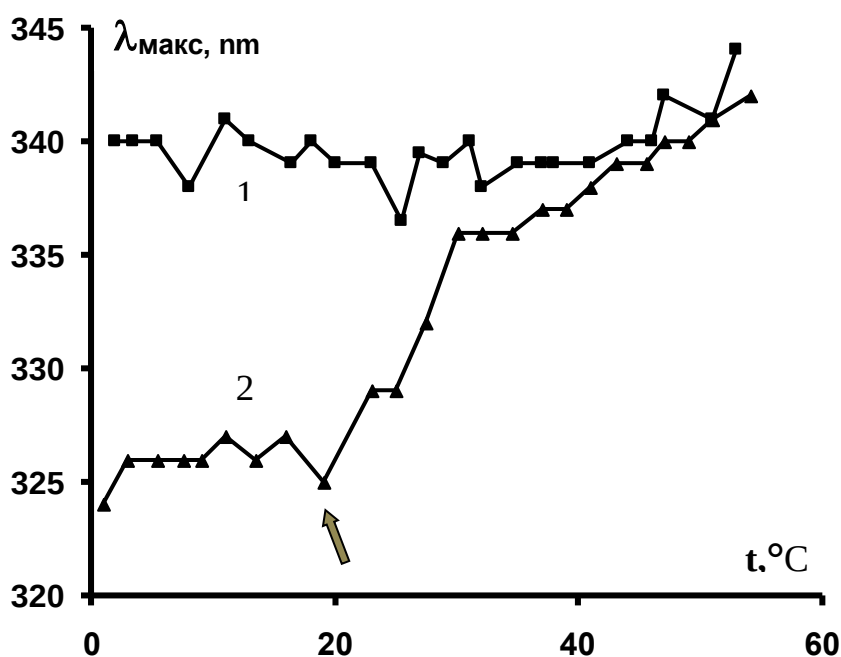


Рис. 5.7. Температурная зависимость триптофановой флуоресценции мембраносвязанных белков эритроцитов «зимних» сусликов в состоянии активности (1) и гибернации (2)

В то же время, состояние спячки сопровождается существенной модификацией термотропного поведения мембраносвязанных белков эритроцитов, что проявлялось в выраженной зависимости состояния белков от температуры (рис. 5.7, зависимость 2). Наибольшая заторможенность и гидрофобность микроокружения триптофанов наблюдается ниже 15–20°C (значение $\lambda_{\text{макс}}$ равное 325–327 нм коротковолновое и практически не зависит от температуры), выше этой температуры происходило существенное длинноволновое смещение спектра так, что при 37°C значение $\lambda_{\text{макс}}$ становилось сравнимым со значением этого параметра для эритроцитов пробуждающегося и активного животных.

Таким образом, как показали данные оценки микровязкости бислоя и состояния белков эритроцитов спящих сусликов, в интервале температур 4–37°C имеется температурная область, в которой происходит резкое изменение динамического состояния липидов (растормаживание вращательной подвижности зонда) и состояния мембранных белков (увеличение полярности микроокружения триптофановых остатков, вероятно, в результате разрыхления структуры белка).

С целью выяснения влияния температурного фактора на морфологию мембраны и выделения собственно клеточных реакций на изменение температуры (имитация «пробуждения» *in vitro*) мы провели ультраструктурное исследование мембран эритроцитов спящего животного, криофиксированных от 4, 12, 20 и 35°C (рис. 5.8). Показано, что при нагреве эритроцитов до температур не выше 15–20°C их мембрана сохраняла признаки, характерные для морфологии мембран животного в состоянии спячки, лишь отклонение прохождения плоскости скола отмечалось в меньшей степени.

Для области температур 4–8°C отмечено изменение ультраструктуры цитозоля, которая визуализируется в виде бифазной структуры – гладкие области и участки «конденсированного гемоглобина» (рис. 5.8, б). Подобная картина структуры внутриклеточного содержимого наблюдалась и ранее (см.

рис. 5.3, б), что достаточно хорошо согласуется с имеющимися в литературе представлениями об образовании гелеподобной структуры цитозоля в области околонулевых температур [292]. Стоит отметить, что наблюдаемая морфология цитозоля для данной области температур характерна как для эритроцитов гомойотермных, так и для эритроцитов гетеротермных организмов. Данные литературы также указывают на образование двухфазной структуры при охлаждении растворов белков и углеводов [292].

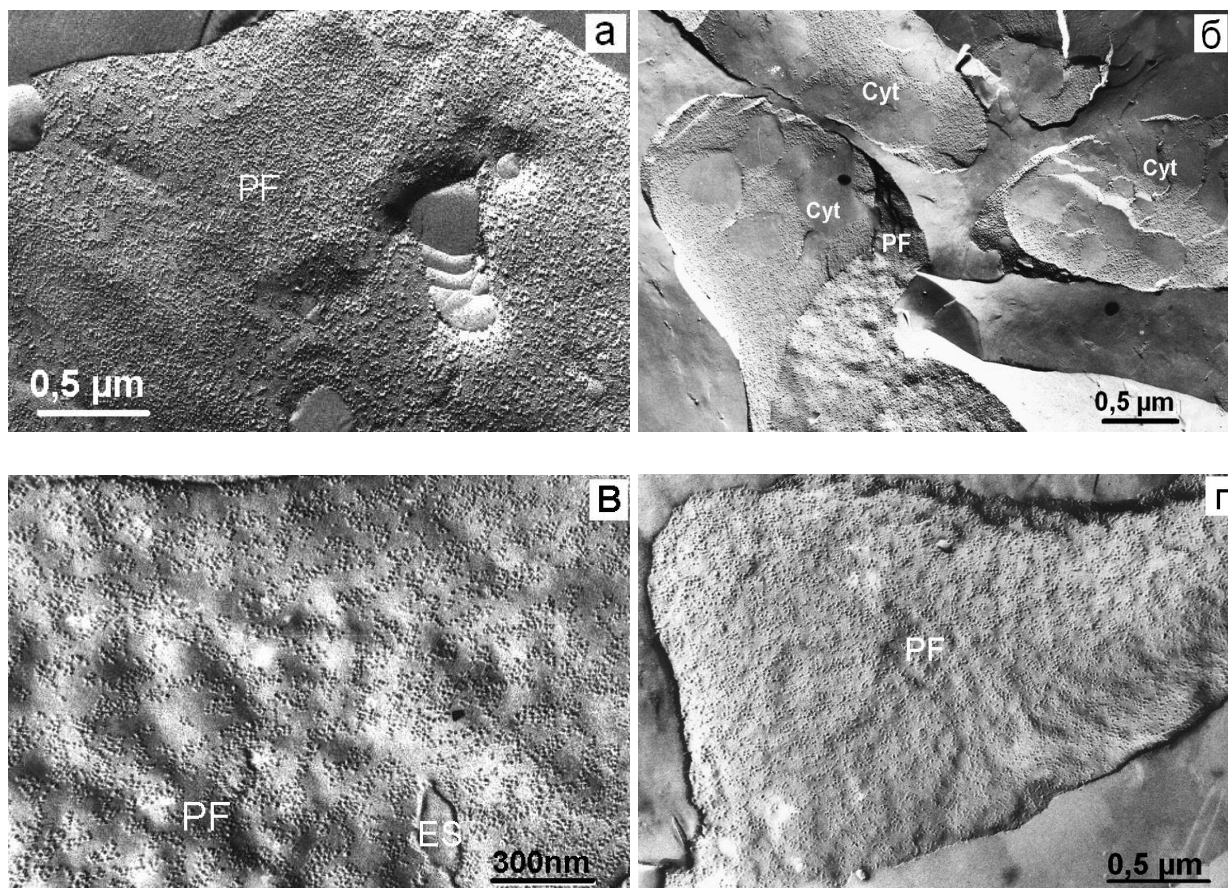


Рис. 5.8. Характер изменения ультраструктуры PF-поверхностей мембран эритроцитов спящего суслика (температура тела 4°C) при криофиксации от 6 (а, б), 20 (в) и 36°C (г) («модель пробуждения» *in vitro*).

При нагреве эритроцитов спящего суслика до 35–37°C и их криофиксации от этих температур (рис. 5.8, г) морфология мембраны была такой же, как у активного животного при этой температуре (см. рис. 5.2, б). Однако плотность частиц значительно не изменялась и составляла 2760 ± 220

частиц в 1 мкм² на PF– поверхности, т.е. в диапазоне температур 4–37°C была больше, чем у эритроцитов сусликов в активном и пробуждающемся состояниях, что коррелирует и с повышенной микровязкостью липидного бислоя эритроцитов гибернирующего животного.

Для морфологии мембраны эритроцитов спящего животного, в какой-то мере «особой температурной областью» оказалась область 15–20°C, при которой наблюдалась значительная агрегация ВМЧ (рис. 5.8, в). Изменение в распределении ВМЧ коррелировало и с существенным длинноволновым сдвигом спектра флуоресценции мембранных белков, а также перестройками в липидном бислое при этих температурах. Известно, что возможность агрегации ВМЧ в эритроцитах человека обеспечивается лишь в случае нарушения спектрин-актинового комплекса либо при модификации его взаимодействия с мембраной [15, 204, 279]. Например, подобная картина агрегации наблюдается в эритроцитах человека при добавлении в среду их инкубации парахлормеркурийбензоата (ПХМБ), вызывающего высвобождение с мембранного скелета части актина и спектрина [205]. Наблюдаемая нами агрегация ВМЧ, резкое изменение состояния мембранных белков и липидов в мембране эритроцитов спящего суслика при нагреве клеток *in vitro*, указывает на особенность температурного поведения комплекса мембрана-цитоскелет при 15–20°C, которая может заключаться в изменении прикрепленности спектрина при 15°C [293].

Анализ белкового состава мембран эритроцитов сусликов для трех состояний животного свидетельствует, что качественно он не различается и не отличается от состава мембранных белков эритроцитов человека (рис. 5.9). Также нет различия в количественном составе мембранных белков эритроцитов сусликов в состояниях активности и пробуждения, а по процентному распределению белков в мембранах этот показатель практически не различается для этих двух состояний животного и приближается к его значению у эритроцитов человека.

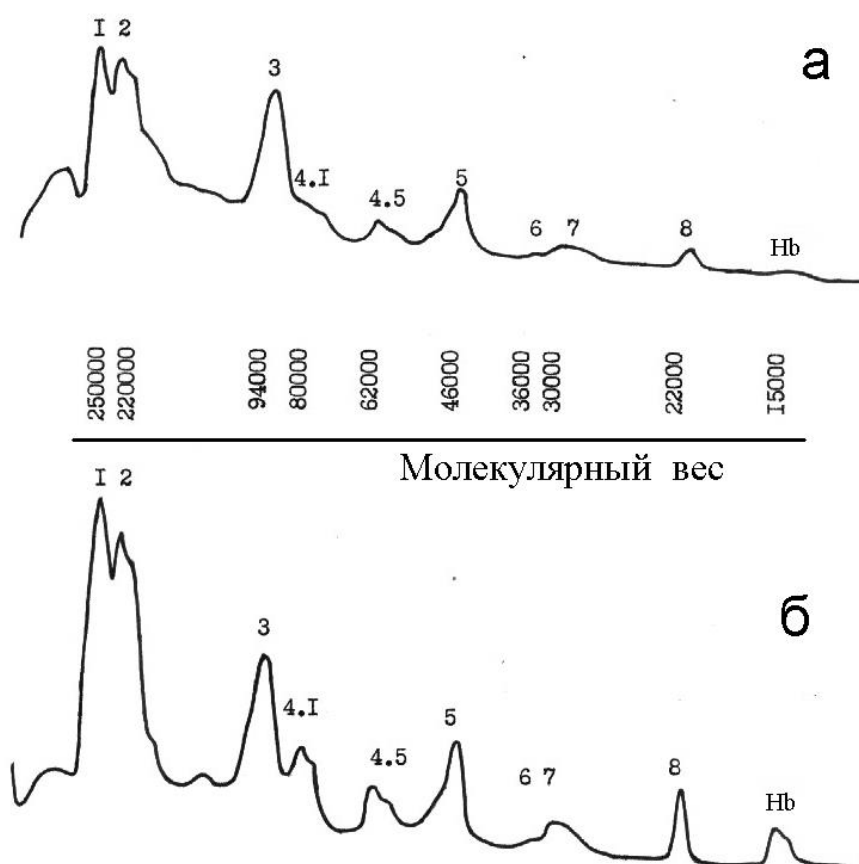


Рис. 5.9. Электрофореграммы мембраносвязанных белков эритроцитов сусликов в активном (а) и спящем (б) состояниях.

Однако в состоянии спячки с мембраной эритроцита оказывается больше связано спектрина, белка полосы 4.1, белка полосы 8 (в 1,5 раза) и гемоглобина (в 4,5 раза). В целом же в эритроцитах сусликов отмечается меньшее количество мембраносвязанного гемоглобина и гликолитического фермента ГЗФД по сравнению с эритроцитами человека. Этот факт может быть обусловлен тем, что связывание фермента с мембраной ингибирует его активность [206] и является необходимым в условиях спячки. С другой стороны, это может являться характерной чертой эритроцитов данного вида млекопитающих, по аналогии, например, с эритроцитами крысы, у которых практически отсутствует фракция мембраносвязанного ГЗФД [206]. Более прочная связь с мембраной молекул гемоглобина наблюдается в фетальных эритроцитах человека, обладающих рядом ультраструктурных и функциональных отличий (уменьшение плотности и увеличение диаметра

ВМЧ, пониженная проницаемость мембраны для анионов HCO_3^- , Cl^- и воды) [294, 215, 203].

Увеличение в процентном содержании мембраносвязанного белка полосы 8, рассматриваемого в качестве Са-резервуара и участвующего в поддержании ионного гомеостаза [294], обычно связано с истощением эритроцитов по АТФ, эритроцитарными анемиями и т.п. и коррелирует с увеличением содержания внутриклеточного кальция. Однако известно, что эритроциты гибернирующего животного эффективно регулируют уровень внутриклеточного Ca^{2+} даже при 5°C [295].

Считается, что экстрагируемость спектрина существенно зависит от метаболического состояния эритроцитов [296] и уровня Ca^{2+} [206], поэтому наблюдаемое в случае гибернирующего суслика увеличение его процентного содержания в мембране можно было бы объяснить сниженным метаболизмом. Однако в работе [126] показано постоянство уровня АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах при переходе животного из состояния гибернации к активности.

Наличие на поверхности мембраны «микровозмущений», изменение прохождения пути скола, агрегация ВМЧ и другие морфологические особенности эритроцитов ГС (рис. 5.3), а также проявление их у клеток просыпающегося животного при охлаждении эритроцитов до 4°C (рис. 5.4, в) в значительной степени могут быть связаны с изменением характера взаимодействия цитоскелета с интегральными компонентами мембраны – его прикрепленностью, либо с модификацией собственно структуры цитоскелета эритроцитов ГС.

При анализе подобных изменений необходимо учитывать следующее:

- размер этих «микровозмущений» в среднем составляет 100–200 нм и примерно соответствует размерам элементарной ячейки цитоскелета эритроцитов [236];
- отмеченное в работе [291] незначительное (около 3,1%) уменьшение размеров эритроцитов в период спячки, по нашему мнению, может быть

связано, в том числе, с сокращением молекул спектрина, уплотнением цитоскелета и как следствие этого появлением «излишка» поверхности мембраны в виде выростов. Во всяком случае, наблюдается морфологическая общность между начальным этапом появления мембранных спикул (размер микровозмущения, перераспределение трансмембранных белков), вызванного сокращением цитоскелета эритроцитов при сферо-эхиноцитарной трансформации (см. гл. 4, рис. 4.21), и структурой мембран эритроцитов спящего животного (рис. 5.3, а, б).

Перераспределение ВМЧ между внешним и внутренним монослоями мембраны у спящего животного может быть следствием закисления внутренней среды организма гибернатора во время спячки, в т.ч. снижения рН крови. В ряде работ показано, что при кислых значениях рН среды связь белка полосы 3 с анкирином и ассоциация спектриновой сети с мембраной становятся более прочными [119, 292].

Исследование морфологии мембран эритроцитов человека, охлажденных до 4°C и криофиксированных от этой температуры, не выявило подобных изменений в ультраструктуре мембран. В то же время нагрев эритроцитов спящего животного до 37°C приводил к восстановлению морфологии мембраны.

Таким образом, выявленные, наряду с морфологическими, особенности термоиндуцированного поведения мембранных белков и липидов, а также изменение состава мембраносвязанных белков в эритроцитах спящего животного по сравнению с другими физиологическими состояниями отражают существенную модификацию межмолекулярных взаимодействий в мембране эритроцитов спящего суслика.

Исследованиями последних лет установлено, что регуляция физиологии эритроцита осуществляется за счет перехода цитозольных компонентов из собственно цитозольного в мембраносвязанное состояние, а также изменения цитоскелет-мембранных взаимодействий [290, 297], что, по нашему мнению, и имеет место у гибернаторов.

Анализ результатов наших исследований позволяет заключить, что своеобразным быстродействующим «регулятором» структурно-функционального состояния эритроцитов гибернирующих млекопитающих при подстройке физиологии клетки к изменению физиологического состояния животного является перестройка взаимодействия цитоскелет-мембрана, а именно температурозависимое изменение прикрепленности цитоскелетных и цитозольных компонентов к интегральным компонентам бислоя. Мы рассматриваем это как ключевое звено механизма температурной адаптации.

5.2. Структурные перестройки в мембранах эритроцитов зимоспящих сусликов при длительном гипотермическом хранении.

В предыдущем разделе было отмечено, что охлаждение клеток до 4°C (в случае спячки нахождение при 4°C), а также длительное воздействие этого фактора *in vitro* вызывает определенные структурные изменения в клетках и их мембранах. С точки зрения действия температурного фактора, гипотермическое хранение клеток и их нахождение в спящем организме с аналогичной температурой, имеет много общего. В этой связи мы предполагали выяснить общность и различие в реакции клеток на действие температуры *in vivo* и *in vitro*, а также временной предел сохранности структуры и обратимости происходящих изменений.

Небольшие сроки хранения (до 7–10 суток) эритроцитов спящего суслика не приводили к существенным изменениям их формы и ультраструктуры мембран (Рис. 5.10, а) В цитозоле клеток сохранялась компактизация гемоглобина, наблюдаемая в виде бифазной структуры – гладких областей и зон конденсированного гемоглобина (рис. 5,10, б) и характерная для эритроцитов спящего животного. Распределение ВМЧ и прохождение плоскости скола находились в пределах нормы.

При анализе численных значений плотности ВМЧ на PF- и EF-поверхностях скола мембраны эритроцитов установлено, что в процессе

начального этапа хранения отмечается устойчивая тенденция перераспределения ВМЧ между внутренним (PF) и внешним (EF) монослоями мембраны в пользу последнего: 2625 ± 187 и 1040 ± 79 частиц в 1 мкм^2 соответственно.

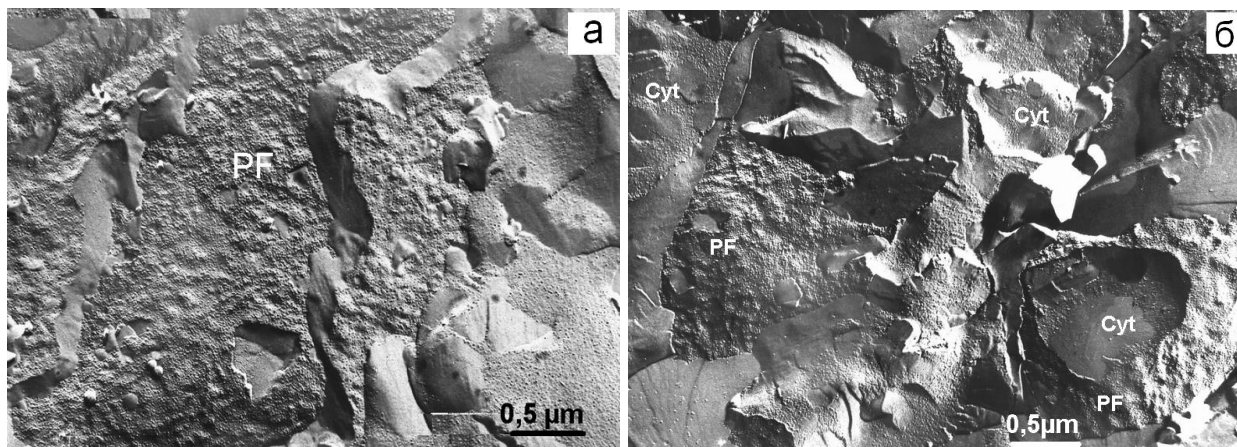


Рис. 5.10. Характер изменения ультраструктуры PF-поверхностей мембран (а) и цитозоля (Cyt) (б) эритроцитов спящего суслика после 4 суток гипотермического хранения при 4°C. Криофиксация от 4°C.

Это свидетельствует об ослаблении белок-белковых взаимодействий в самой мембране, а также между интегральными компонентами мембраны и цитоскелетом. Существует предположение, что увеличение погруженности трансмембранных белков во внутренний монослой происходит при пониженных значениях pH [119, 241, 292].

Мы провели сравнительную оценку степени сохранности эритроцитов гомойотермного и гетеротермного организмов при их ГХ. Представленные на рис. 5.11 зависимости уровня гемолиза эритроцитов свидетельствуют о резком нарастании различия в их сохранности уже после 4–5 сут. ГХ.

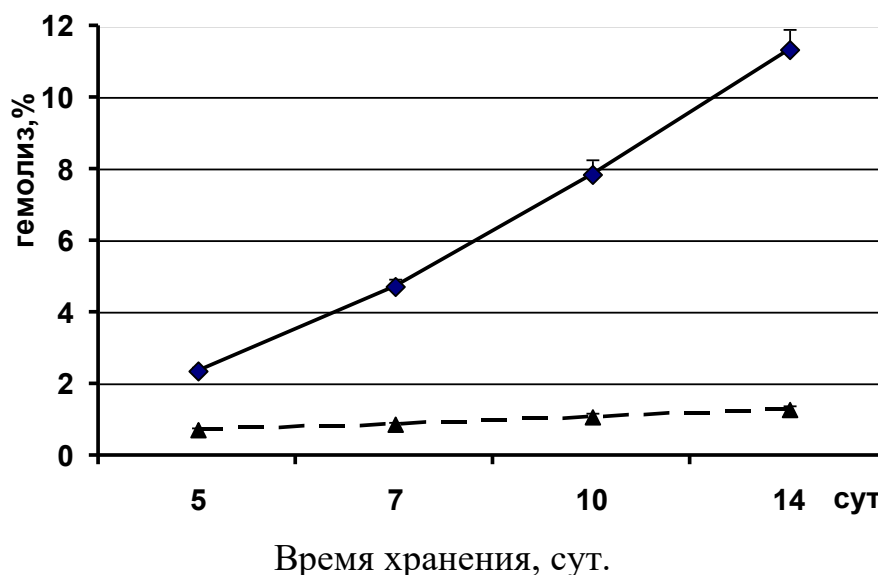


Рис. 5.11. Различие в степени сохранности эритроцитов крысы (сплошная кривая) и спящего суслика (пунктир) на начальном этапе ГХ.

При сроках хранения 20–25 суток отмечено изменение формы эритроцитов и поверхности их мембран, образование впячиваний и выростов на мембранной поверхности, характерных для истощенных по АТФ эритроцитов (рис.5.12, а, б). При 25–30 сутках хранения у значительной части клеток (40% и более) наблюдается характерная для измененного состояния спектрина агрегация ВМЧ (рис. 5.12, в, г).

Начиная с 30-х суток, у некоторых эритроцитов спящего суслика происходит процесс эхиноцитарной и сферо-эхиноцитарной трансформации, а на их поверхности наблюдается появление мембранных выростов – спикул (рис. 5.13, а). При более длительном сроке хранения (30 суток и более) в суспензии эритроцитов нами отмечены гладкие, лишенные ВМЧ везикулярные образования, что свидетельствует об их липидной природе (рис. 5.13, б), а также возрастание плотности ВМЧ на РF-поверхности (рис. 5.13, в, г). Образование везикул свидетельствует об интенсивной потере мембранного материала. Величина гемолиза составляла 30–40% для эритроцитов активного и около 10% эритроцитов спящего животного.

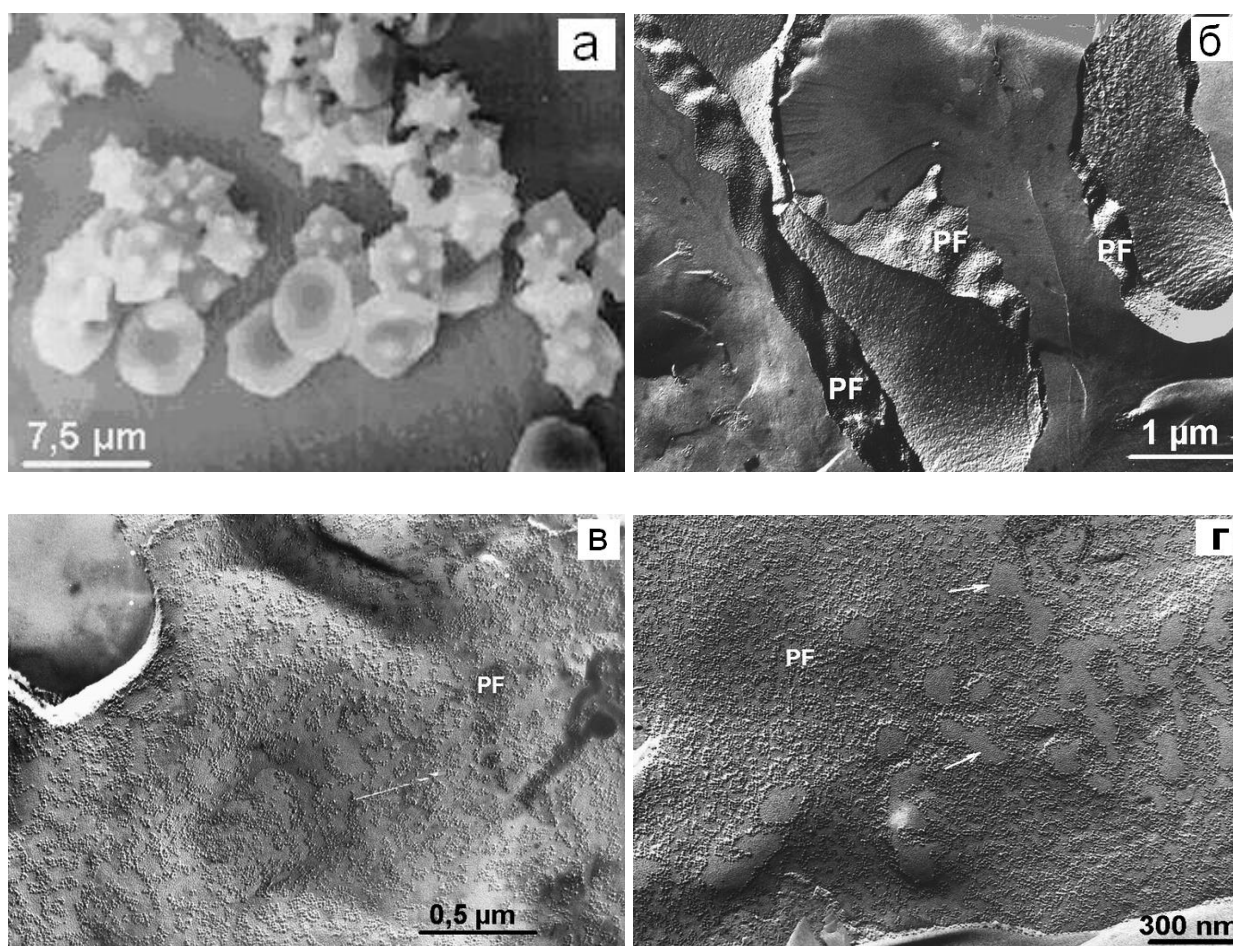


Рис. 5.12. Морфологическое состояние эритроцитов к 20–25 суткам ГХ:

а – характер трансформации эритроцитов к 20 сут ГХ; б – образование впячиваний и выростов на мембранной поверхности; в, г – характер распределения ВМЧ на PF- поверхности мембраны эритроцитов после 25 суток ГХ эритроцитов спящего (в) и активного (г) животного.

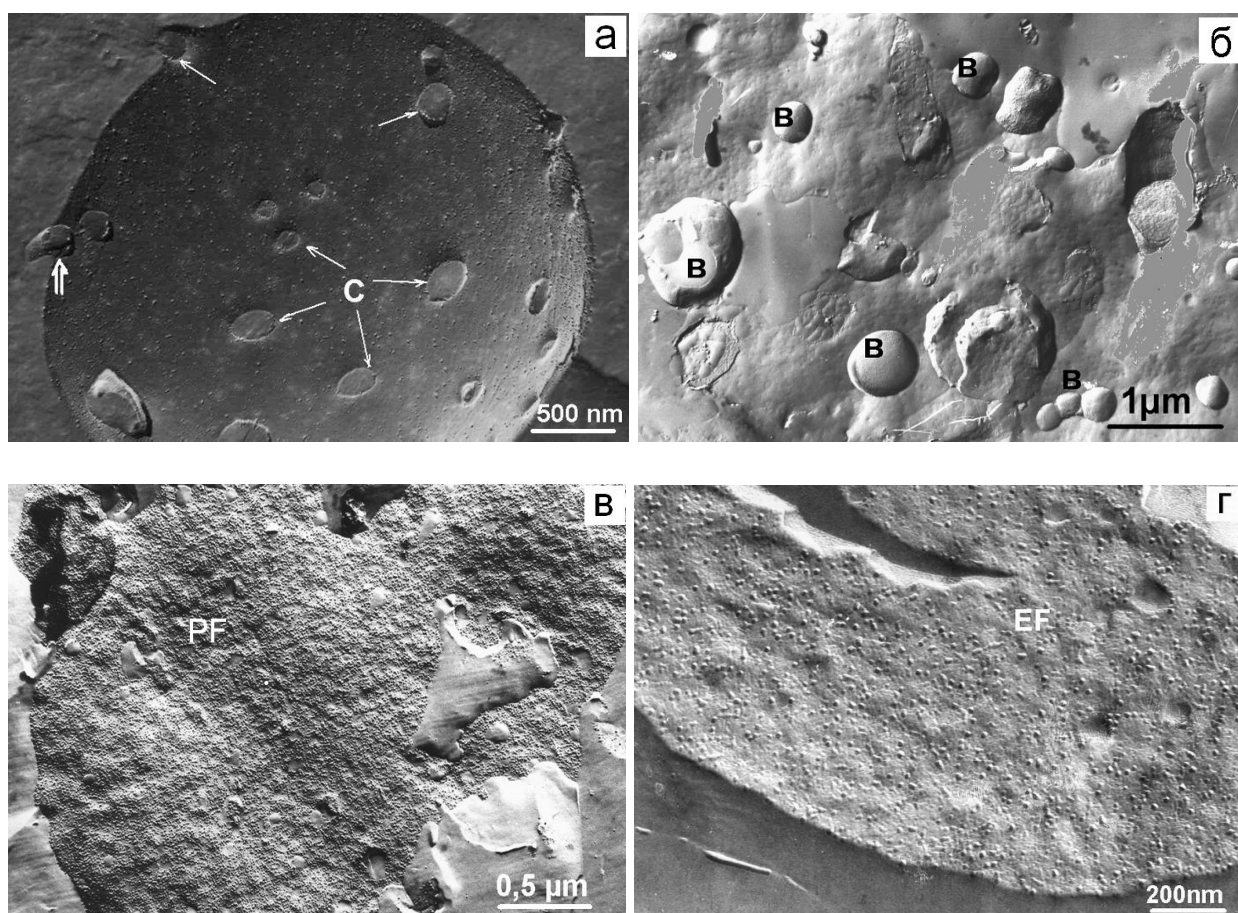


Рис. 5.13. Морфологическое состояние мембран эритроцитов спящего животного при GX: а – формирование спикул (С) на поверхности эритроцитов после 30 суток GX, (стрелками отмечены основания отломившихся при скалывании спикул); б – гладкие без ВМЧ везикулярные образования (В). Характер распределения ВМЧ на PF (в) и EF-поверхностях (г) мембран эритроцитов к 60 суткам GX:

Хранение эритроцитов спящего животного *in vitro* при 4°C в течение 21 суток не оказало существенного влияния также на параметры их кислотной резистентности (рис 5.14). Наблюдается лишь уменьшение среднего времени кислотного гемолиза эритроцитов. При этом среднее время кислотного гемолиза эритроцитов спящего суслика, хранившихся 21 сутки, фактически соответствует этому показателю для нативных эритроцитов летнего активного животного и человека (см. раздел 5.3). Вид эритрограммы (рис.

5.14, 2) свидетельствует о большей однородности эритроцитарной популяции по кислотной устойчивости.

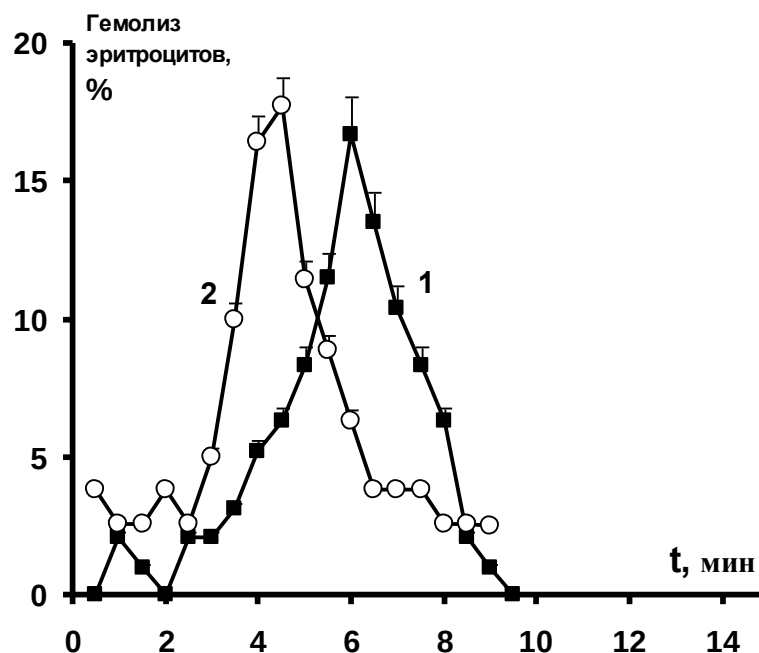


Рис. 5.14. Распределение популяции эритроцитов спящего «зимнего» суслика по кислотной резистентности (при 24°C) в норме (1) и после 21 сут. ГХ (2).

Исследование методом ЭПР-спектроскопии влияния гипотермического хранения эритроцитов на проницаемость их мембран для ионов феррицианида калия показало, что наибольшей устойчивостью обладают мембраны эритроцитов спящих и просыпающихся сусликов, сохраняющие барьерную функцию до 2–3 месяцев, в отличие от эритроцитов крыс, сохраняющих целостность лишь в течение 2 недель [129].

Вероятно, в эритроцитах гибернирующих животных как отмечено нами выше, имеют место структурные перестройки белков цитоскелета и/или модификация их связи с интегральными компонентами бислоя, что обеспечивает их функционирование при 4°C *in vivo* и сохраняет структурно-функциональную целостность клетки при длительном гипотермическом воздействии *in vitro*.

5.3. Особенности устойчивости эритроцитов гибернирующих млекопитающих к кислотному гемолизу.

Удивительная способность эритроцитов гибернирующих млекопитающих одинаково «успешно» функционировать в организме с околонулевой температурой тела и при быстром (2–3 часа) ее повышении до 36°C в период пробуждения между баутами, сопровождающегося резким скачком метаболизма, как в самой клетке, так и в организме в целом, является примером высокодинамичной адаптации к изменяющимся условиям.

Одной из основных функций эритроцитов, как известно, является связывание кислотных и щелочных остатков, образующихся в тканях при метаболизме. У гибернаторов эта функция приобретает особое значение, поскольку установлено, что дыхательный ацидоз, возникающий в результате задержки выведения CO₂ из тканей в торпидном состоянии, во время пробуждения животного сменяется на ацидоз, вызванный накоплением молочной кислоты [286]. Происходящее в этих условиях закисление организма может дополнительно привести к активации эндогенных цитотоксических метаболитов [298] и оксидантов [299], что в конечном итоге могло бы вызывать окислительное повреждение эритроцитов вплоть до их гемолиза [300, 301]. Однако этого не происходит. В этой связи вполне естественно предположить, что у гибернирующих млекопитающих должны существовать механизмы толерантности к ацидозу, закислению организма, особенно в период повышения температуры тела до нормотермической при переходе в состояние активности, сопровождаемом резкой интенсификацией метаболизма и восстановлением нормальных скоростей физиологических процессов.

Исследование кинетики кислотного гемолиза [300] в сочетании с методом кислотных эритрограмм [159] позволит провести сравнительную

оценку кислотной резистентности эритроцитов и их распределение по этому показателю в клеточной популяции.

Целью данного фрагмента работы было сравнение кислотной устойчивости эритроцитов гетеротермов в состояниях спячки, пробуждения и бодрствования в зимний период.

Сравнение кислотных эритрограмм активного летнего суслика (рис. 5.15) и человека (для которого предложен метод распределения популяции эритроцитов по кислотной резистентности в процентах [159]) при 24 °С, позволяет сделать вывод, что популяция эритроцитов гетеротермного млекопитающего в летний период и гомойотерма (человек) принципиально не различаются по среднему времени гемолиза и виду кислотных эритрограмм.

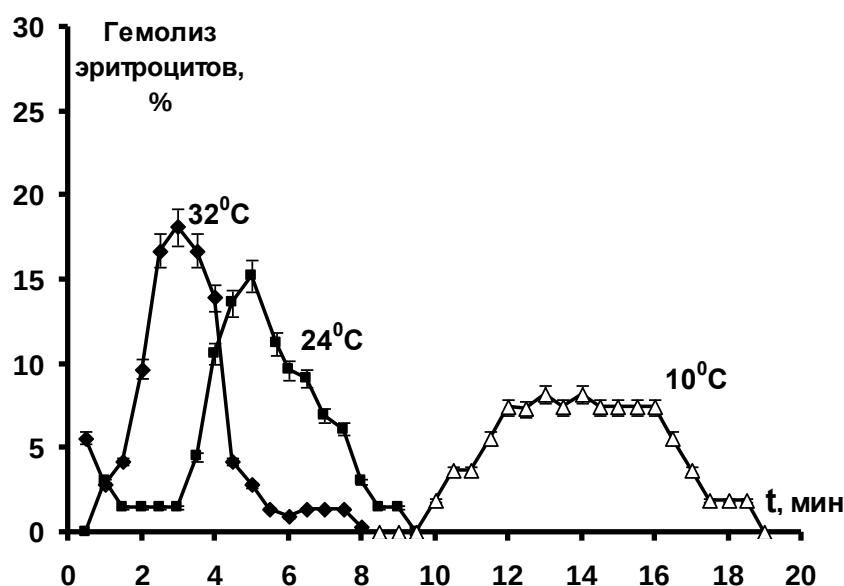


Рис. 5.15. Распределение популяции эритроцитов активного «летнего» суслика по кислотной резистентности при разных температурах.

Однако, вид кислотных эритрограмм эритроцитов спящего зимнего суслика (рис. 5.16) и активного в межбаутный период (рис. 5.17) существенно различается, особенно при пониженных температурах (10°C). При общем сдвиге вправо кислотных эритрограмм суслика в состоянии

спячки (т.е. эритроциты более кислотно-резистентны), при пониженных температурах в этом состоянии наблюдается значительная вариация времени кислотного гемолиза, что свидетельствует о большей гетерогенности популяции эритроцитов (рис. 5.16).

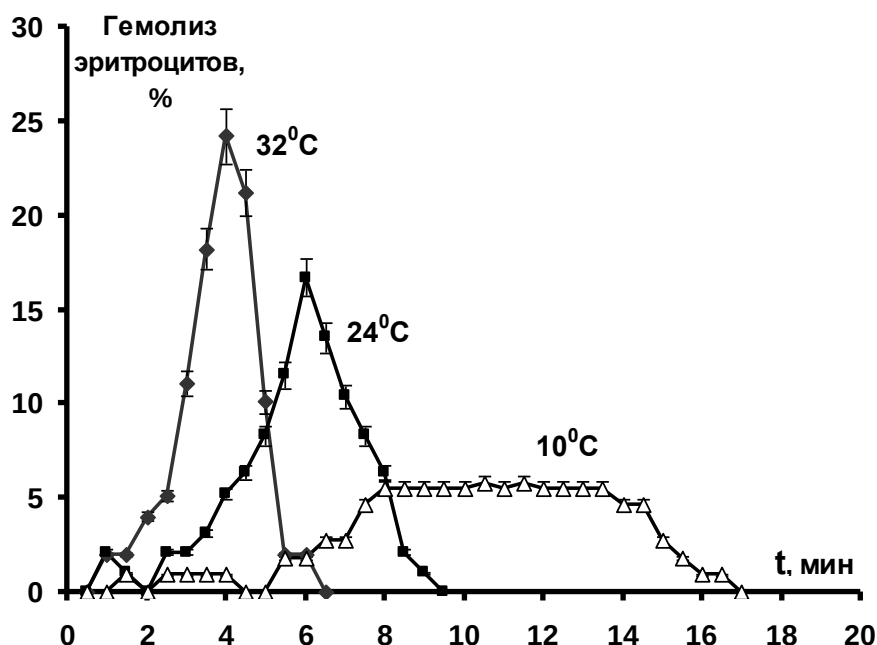


Рис. 5.16. Распределение популяции эритроцитов гибернирующего «зимнего» суслика по кислотно-резистентности при разных температурах.

При 24 °C для эритроцитов спящего животного (торпор) отмечается возрастание времени кислотного гемолиза до 7,5–8,0 минут, что свидетельствует о наличии в клеточной популяции так называемых высокостойких эритроцитов. Согласно имеющимся данным для гомойотермных организмов [159, 160], смещение эритрограммы вправо свидетельствует о возрастании в клеточной популяции доли молодых устойчивых эритроцитов, связываемом с интенсификацией процесса эритропоэза. Показано, что вид эритрограмм гомойотермов (человек) существенно зависит от биохимического состава мембраны (количество холестерина), а также состояния и особенностей гемоглобина [302].

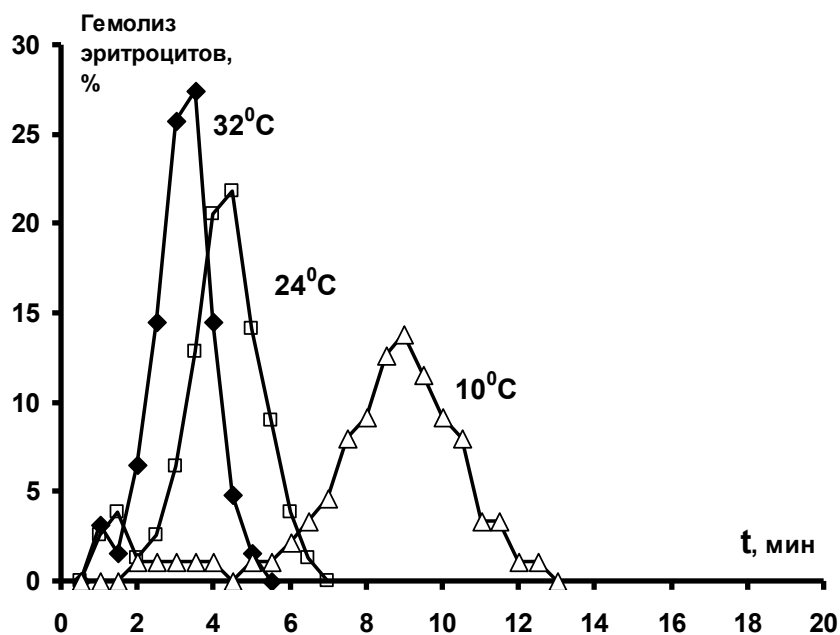


Рис. 5.17. Распределение популяции эритроцитов «зимнего» активного суслика по кислотной резистентности при разных температурах.

Значение среднего времени гемолита и вид эритрограмм зависят не только от состояния животного, но и от температуры измерения кислотного гемолита (рис. 5.15–5.17). В этой связи мы провели сравнительный анализ температурной зависимости среднего времени кислотного гемолита (для интервала 4–38°C), что позволило получить дополнительную информацию об особенностях кислотной резистентности эритроцитов гибернатора, связанных с изменением его физиологического состояния.

Как следует из рис. 5.18, наблюдаются принципиальные различия вида кривых температурной зависимости времени гемолита — $t_{\text{гем}}$ эритроцитов для всех состояний в сезоне гибернации по сравнению с летней активностью. Для последнего характерным является наличие изломов на кривой температурной зависимости $t_{\text{гем}}$ в определенных температурных областях. Для всех состояний животного эритроциты сусликов в сезон гибернации характеризуются сглаженными температурными зависимостями $t_{\text{гем}}$, что является показателем температурной адаптации биосистемы [130, 303].

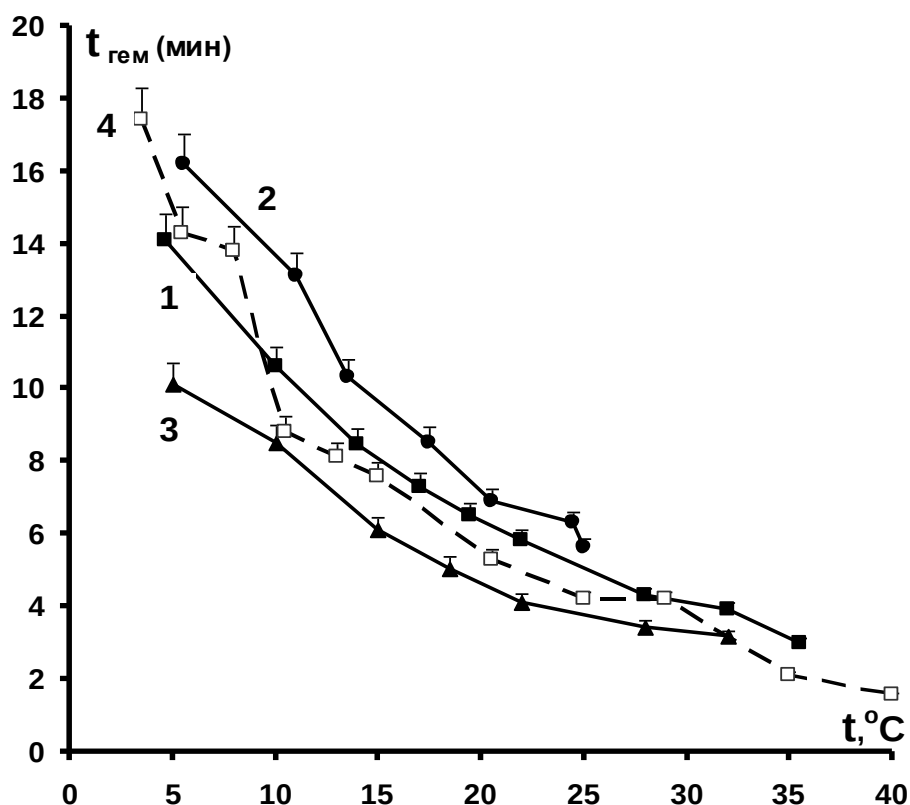


Рис. 5.18. Температурная зависимость времени кислотного гемолиза эритроцитов «зимнего» суслика в состояниях спячки – (1), пробуждения – (2) и активности в межбютный период – (3) и летом – (4).

Изменение хода кривых, а значит и характера зависимости кинетики кислотного гемолиза от температуры, наблюдается при температурах около 10°C, где, как известно, происходит модификация белка полосы 4.1, связывающего спектрин с интегральными компонентами мембраны [304]. Это может указывать на существенную роль взаимодействия цитоскелета с мембраной в механизме кислотного гемолиза.

В случае «зимних» сусликов для трех физиологических состояний по степени кислотной резистентности эритроциты располагаются в следующей последовательности: пробуждающийся > спящий > активный во всем исследованном температурном диапазоне. Наблюдаемое увеличение кислотной резистентности эритроцитов сусликов на этапе пробуждения по сравнению с эритроцитами спящего и активного животных, в значительной

степени может быть связано, с необходимостью в повышенной устойчивости эритроцитов к действию кислот, высвобождаемых из тканей спящего животного в период пробуждения и приводящих к дополнительному «закислению» организма.

Таким образом, устойчивость эритроцитов гибернатора к повышенной концентрации протонов, определяемая по параметрам кислотного гемолиза, зависит от физиологического состояния в период сезона гибернации.

Очевидно, что стратегия толерантной адаптации гибернирующих млекопитающих включает на уровне клетки (эритроцита) структурно-функциональные перестройки в мембране и цитозоле, что проявляется в виде изменения кислотной резистентности эритроцитов и в распределении их популяции по этому показателю. Величина среднего времени кислотного гемолиза – интегральная характеристика сложного процесса реакции эритроцитов на повышенную концентрацию протонов. Несмотря на неоднозначность трактовки молекулярных механизмов кислотной резистентности, некоторыми авторами отмечается, что обязательными «звеньями» механизма HCl-гемолиза являются изменение конформации интегральных мембранных белков и их латеральная агрегация [300, 305].

Несмотря на то, что некоторыми авторами ставится под сомнение значимая роль спектрина в механизме кислотного гемолиза [286], есть основания считать, что цитоскелет играет важную роль в кислотной резистентности эритроцитов. Так, показано, что агрегация цитоскелета при низком pH вызывает преобразование формы эритроцита от стоматоцита до сфероэхиноцита [306, 307].

Латеральная агрегация интегральных мембранных белков практически невозможна при нативности цитоскелетной сети [204]. С другой стороны, закисление цитозоля до pH 6,0–4,0 вызывает агрегацию спектрина, что, в свою очередь, приводит к изменению структурно-динамического состояния интегральных мембранных белков [204, 233, 308]. О существенной, если не лимитирующей роли спектрина в механизме кислотной резистентности, по

крайней мере, в эритроцитах гибернатора, свидетельствуют наши данные об усилении прикрепленности цитоскелетных (спектрин, полоса 4.1) и цитозольных (гемоглобин) компонентов к интегральным компонентам мембраны эритроцитов в условиях перехода спячка-пробуждение-активность (см раздел 5.1) [129].

Выявленные нами различия в кислотной резистентности эритроцитов сусликов, находящихся в состоянии гибернации, пробуждения и бодрствования в зимний период, свидетельствуют, что наибольшей устойчивостью обладают эритроциты пробуждающегося и спящего животных. Снижение температуры кислотного гемолиза в диапазоне от 30 до 5°C проявляет различия в значениях среднего времени гемолиза и в виде кислотных эритрограмм между тремя исследованными состояниями [130].

Из представленных нами данных, а также данных литературы по исследованию ультраструктуры мембраны при различных значениях pH [204] следует, что важным звеном реализации клеточного механизма адаптации, в том числе и к повышенному содержанию протонов, является модификация структурно-функционального состояния белка полосы 3, цитоскелета и их взаимодействия [129].

Таким образом, переход гетеротермного животного из состояния спячки к пробуждению и бодрствованию в зимний период сопровождается не только изменением температурного поведения белков и липидов, изменением морфологии мембран эритроцитов, а также их устойчивостью к гипотермическому хранению и кислотному гемолизу.

5.4. Реакция мембран эритроцитов новорожденных (5-7 дней) крысят на температурное воздействие *in vivo*.

Нами проведено исследование влияния температуры на морфологию мембран эритроцитов гомейотермного организма при их охлаждении *in vivo*. [309]. В качестве объекта исследования были выбраны эритроциты 7-

дневных ненаркотизированных крысят, подвергнутых охлаждению всего организма в интервале температур от 37°C до 26°C.

Предпосылкой для проведения подобных исследований явились данные литературы о повышенной устойчивости клеток новорожденных организмов к действию экстремальных факторов и схожесть данных об увеличении количества цитоскелетных и цитозольных компонентов в мембраносвязанном состоянии в эритроцитах спящего суслика (раздел 5.1) и плода человека [206]. Кроме того, представлялось интересным выяснить, существует ли на ультраструктурном уровне различие в реакции клеток на снижение температуры при их охлаждении *in vivo* и *in vitro*.

Проведенные морфологические исследования эритроцитов, подвергнутых охлаждению *in vivo*, позволили выявить некоторые особенности их реакции на снижение температуры. Если в норме эритроциты имели классическую форму и хаотическое распределение ВМЧ на сколотых поверхностях, то при охлаждении тела животных до 26°C мы наблюдали изменение морфологии клеток. Это проявлялось в их набухании и появлении на поверхности эритроцитов большого количества мембранных выростов, размеры которых варьировали, в среднем, от 0,1 до 0,3 мкм в диаметре (рис. 5.19, а). Для данного экспериментального воздействия наблюдается также агрегация ВМЧ (рис. 5.19 в, г). Следует отметить, что снижение температуры клеток при их охлаждении *in vitro* до 26°C не вызывает подобных изменений в морфологии эритроцитов и их мембран (рис. 5.8), а иное “поведение” клеток при их охлаждении *in vivo*, вероятно, связано со стрессовыми явлениями, происходящими в организме при гипотермических температурах.

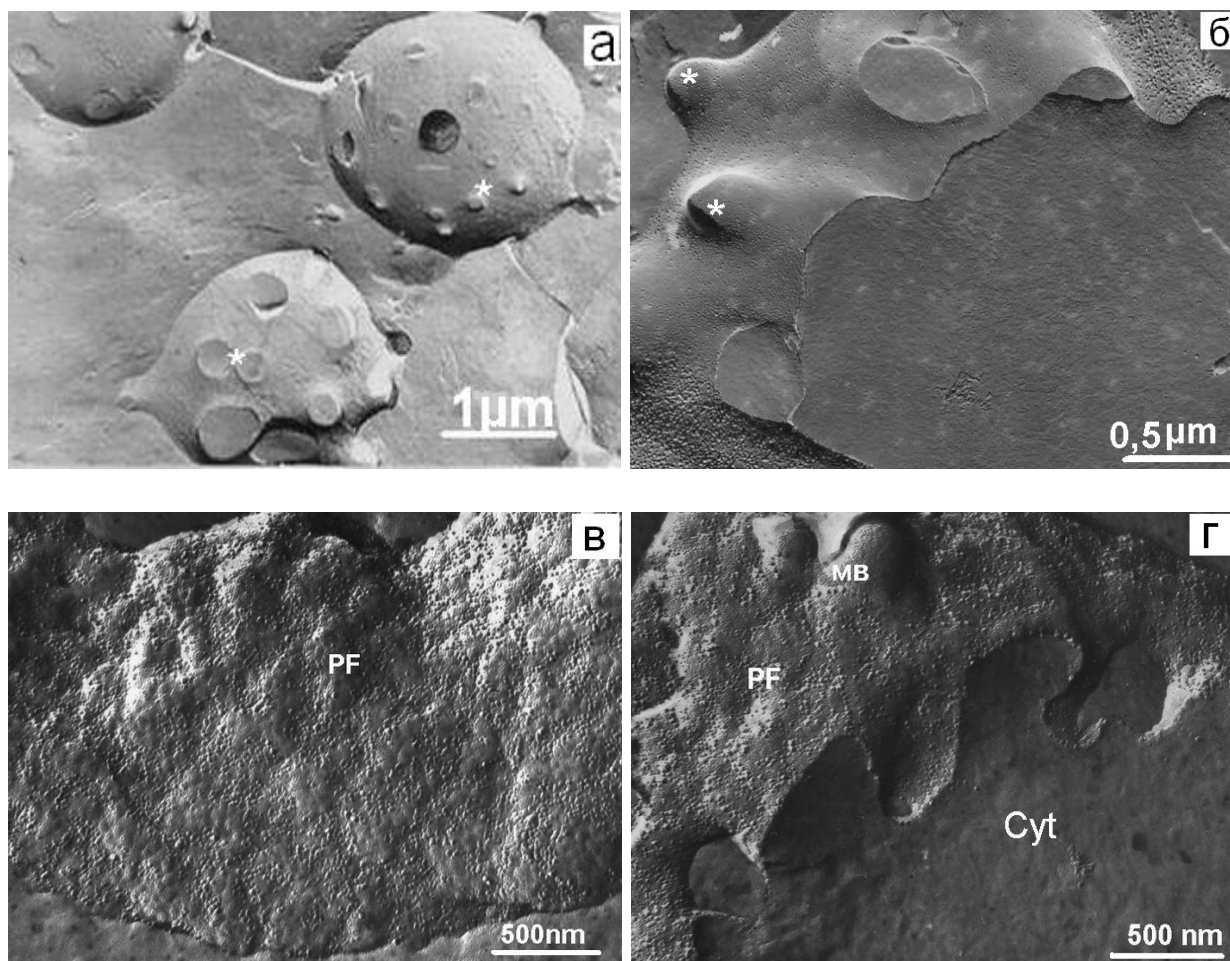


Рис. 5.19. Морфологическое состояние эритроцитов 7 дневных крысят, подвергнутых охлаждению в составе организма до 26°C. Формирование мембранных выростов (а, б) и характер распределения ВМЧ на РР–поверхностях (в, г)

Для проверки данного предположения нами проведены исследования по изучению влияния адреналина концентрацией 10^{-4} – 10^{-5} М на морфологию эритроцитов крысы и донора [309, 310]. Показано, что добавление адреналина к клеточной суспензии, отмытой от плазмы в буферном растворе, вызывает изменение дискоцитной формы эритроцитов в кренированную. На их поверхности появляются тонкие мембранные выросты (рис. 5.20, б), аналогичные наблюдаемым у эритроцитов крысят, при их охлаждении *in vivo*. Эритроциты утончались и увеличивались в поперечном размере. Данные изменения наблюдались у эритроцитов донора и в меньшей степени

у эритроцитов крысы (рис. 5.20, б). Следует отметить температурозависимый характер действия адреналина: при температуре 4°C он инактивировался.

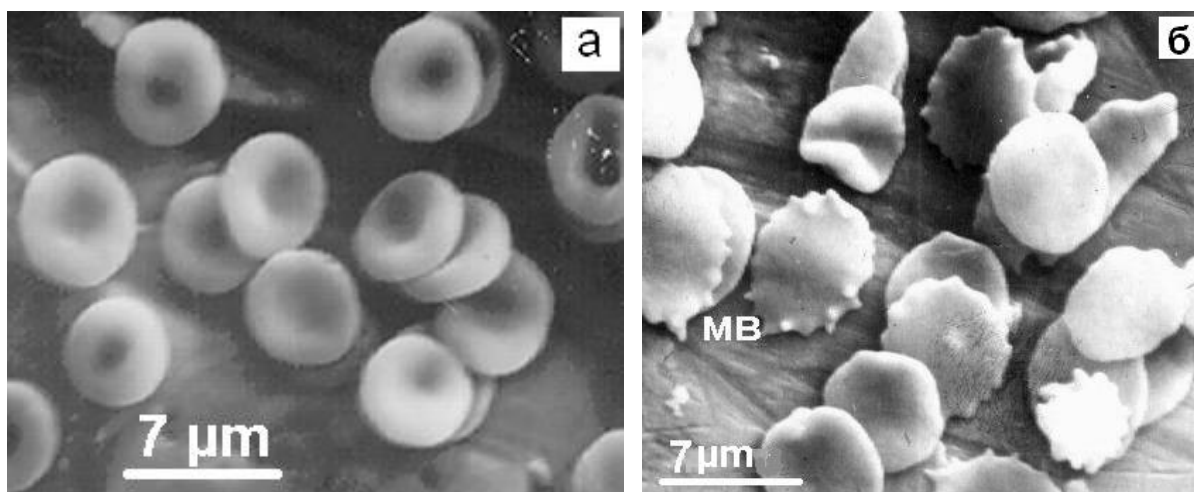


Рис. 5.20. Морфологическое состояние эритроцитов крысы при эквilibрации в среде, содержащей адреналин концентрацией 10^{-4} – 10^{-5} М при температуре 4°C (а) и 37°C (б)

Согласно данным литературы, при охлаждении животных до гипотермических температур (30–20°C) в их организме наблюдается повышение содержания кетоновых тел, холестерина, меняется соотношение его свободной и этерифицированной форм, усиление процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [29, 134, 311]. Считается, что интенсификация процессов ПОЛ в крови при гипотермии происходит на ее начальных этапах, имеет, вероятнее всего, стрессовую природу и представляет наибольшую опасность для мембран форменных элементов крови и в большей степени для эритроцитов [134]. Показано, что при гипотермии в плазме крови крыс значительно увеличивается концентрация свободного гемоглобина, что свидетельствует об усилении внутрисосудистого гемолиза и снижении стабильности мембран.

Реакция эритроцитов гетеро- и пойкилотермов на снижение температуры *in vivo* существенно отличается от гомойотермных организмов. Если у экзотермов при снижении температуры доминирует изменение

физико-химических характеристик мембраны, сопровождающихся отмеченными выше структурными перестройками и изменением тонких характеристик ультраструктуры мембраны, то у эндотермов на структуру мембраны существенное влияние также оказывают стрессовые факторы. Очевидно, что эти факторы в значительной степени зависят от скорости снижения температуры, длительности и глубины гипотермии, применения или отсутствия наркоза, тренированности организма и т.д.

Таким образом, данные результаты свидетельствуют, что при охлаждении эритроцитов в составе организма новорожденных крысят происходит более выраженная дестабилизация их мембран. Она в первую очередь не столько связана со снижением температуры и изменением физико-химического состояния мембран, сколько определяется стрессовыми факторами и может в значительной степени зависеть от характера изменения в крови кортикостероидов, уровня глюкозы и свободных жирных кислот, их соотношения, процессов ПОЛ.

Заключая данный раздел исследования, отметим, что у эритроцитов сусликов наблюдаются особенности морфологического состояния мембран, динамических характеристик белков и липидов, большая устойчивость к кислотному гемолизу, что отличает термоиндуцированное поведение мембран клеток гетеротермов от гомойотермных организмов. В основе этих отличий лежит модификация белок-липидных взаимодействий в мембране за счет изменения взаимодействия между интегральными и цитоскелетными и, возможно, цитозольными структурами. При охлаждении клеток гомойотермов *in vivo* доминирующим влиянием на ультраструктуру эритроцитов являются стрессовые факторы.

- Переход гетеротермов из состояния активности к гибернации сопровождается термоиндуцированными коротковолновым смещением спектра флуоресценции белков мембран эритроцитов (на 10–12 нм), повышением в 1,5 раза параметра микровязкости бислоя в области полярных головок липидов, изменением морфологии и перераспределением ВМЧ, а

также повышением устойчивости эритроцитов к длительному гипотермическому хранению и кислотному гемолизу.

- Особой областью температур для эритроцитов спящего животного является 15-20⁰С; повышение температуры клеток до 37⁰С приближает исследованные параметры мембраны к значениям, характерным для активного животного.

- Эффективным подходом для выявления различий, связанных с изменением физиологии гетеротермов, а также в сравнении с гомойотермами оказались исследования температурных зависимостей.

ГЛАВА 6. ВОДНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ГЕТЕРО- И ГОМОЙОТЕРМНЫХ ОРГАНИЗМОВ ПРИ ГИПОТЕРМИИ И ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ.

Обоснование исследований данного раздела. Интерес, проявляемый к изучению механизма зимней спячки млекопитающих, во многом определяется существованием целого ряда уникальных свойств, которыми обладают зимоспящие животные [312]. Значительное число работ, посвященных выяснению механизмов адаптации гетеротермных организмов, касается изучения качественного и количественного состава липидов, функционирования мембрано-связанных ферментов и белковых комплексов, триггеров спячки, обеспечивающих сохранение жизнедеятельности клеток при пониженных температурах [132, 189, 313; 314]. Имеются данные, в которых показано, что высокая устойчивость клеток зимоспящих животных к понижению температуры во многом определяется способностью плазматических мембран функционировать в широком диапазоне температур [122, 189].

В то же время необходимо учитывать, что структурно-функциональные свойства биомембран определяются тремя основными компонентами: водой, белками и липидами, а также их взаимодействием и взаимовлиянием. Необходимым условием нормального функционирования элементов мембраны и клетки в целом является присутствие молекул воды, которая по своим физическим свойствам в клетке может быть отнесена к примембранной, связанной и объемной. Примембранная вода участвует в структурной стабилизации компонентов мембраны, а свободная – в регуляции транспорта веществ через мембрану. Взаимодействие воды с мембраной не только является фактором, обуславливающим её структурные характеристики, но и зависит от физико-химических свойств и состояния компонентов мембраны. Считается, что конкретная природа структуры воды, контактирующей с твёрдой

поверхностью, во многом определяется свойствами самой поверхности [315]. Достаточно напомнить, что трансляционная подвижность связанной воды характеризуется коэффициентом диффузии 10^{-9} см²/с, что примерно соответствует значению этой величины для липидов, в то время как для объемной воды значение коэффициента равно 10^{-5} см²/с [316]. Доказано, что свойства компонентов мембраны в значительной мере зависят от степени их гидратации, то есть от состояния примембранной воды, которая в свою очередь регулирует характер гидрофобных, водородных и других взаимодействий.

Таким образом, принцип взаимного влияния компонентов мембраны и воды является ключевым моментом регуляции структурных и функциональных свойств клеточных мембран [29].

В то же время работы, посвященные изучению водного трансмембранного обмена в клетках зимоспящих, отсутствуют. Хотя известно, что во время спячки в организме животного практически сохраняется ионный баланс, продолжается утилизация продуктов жизнедеятельности – процессы, происходящие на фоне значительного снижения основного метаболизма, незначительного закисления организма и требующие определённого водного обмена [133, 189, 317].

Естественно предположить, что для быстрого включения всех систем клетки и организма в целом при переходе из спячки в активное состояние требуется большая проницаемость мембран для воды, чем у гомойотермных организмов, то есть мембраны клеток зимоспящих организмов (во время спячки) должны обладать меньшим энергетическим барьером для трансмембранного обмена водой.

Для проверки этого предположения в работе проведено изучение температурозависимого водного диффузионного обмена мембран эритроцитов у зимоспящих сусликов, находящихся в трех физиологических состояниях – ГС, ПС и АС, в диапазоне температур 4–38°C. Мы полагали, что температурная зависимость времени водного диффузионного обмена может быть не только

тестом, чувствительным к структурным перестройкам в самой мембране, но и позволит охарактеризовать пути водной диффузии.

Общепринятыми параметрами, характеризующими процесс диффузионного выхода воды из клетки, являются величина энергии активации E , коэффициент проницаемости мембраны для воды L_p и время диффузионного обмена τ . Величины L_p и τ характеризуют степень проницаемости мембраны для воды и связаны между собой простым соотношением: $\tau = V / S L_p \pi$, где V и S – объем и площадь поверхности клетки, соответственно, а π – осмотическое давление физиологического раствора [172].

Количественно оценить коэффициент проницаемости мембраны для воды L_p можно, используя понятие времени обмена τ – времени, в течение которого $1/e$ часть воды в клетке обновляется за счет обмена с внеклеточной водой.

Для определения τ обычно применяется метод импульсной спектроскопии ЯМР-спинового эха, использующий различие времени спин-спиновой релаксации протонов эритроцитов и плазмы, обогащенной Mn^{2+} при подаче на образец, находящийся в постоянном магнитном поле, двух разделенных интервалом времени Δt высокочастотных импульсов различной продолжительности.

Выбор эритроцитов гетеротермов как объекта исследования обусловлен следующими соображениями:

- изучение водной проницаемости мембран выполнено в большей степени на эритроцитах гомойотермов [34, 319–324].
- для эритроцитов гомойотермов определены значения времени τ и энергии активации E_a .
- для эритроцитов идентифицированы мембранные комплексы (белок полосы 3 и гликофорин), участвующие в трансмембранном выходе воды и выявляемые электронно-микроскопически.
- на клетках гетеротермов исследования водной проницаемости, практически,

не проводились.

Сразу же отметим, что значительное число работ, касающихся изучения водного диффузионного обмена, выполненных на эритроцитах человека, позволили установить следующее:

- значение времени τ и величины E в эритроцитах и замкнутых телях практически не отличаются [325];
- диффузия воды через мембрану не чувствительна к факторам, изменяющим состояние белков спектринового комплекса (денатурация спектрина за счет нагрева до 50°C, фиксация формальдегидом) [186];
- на температурной зависимости τ для эритроцитов человека наблюдается скачкообразное изменение времени водного диффузионного обмена в области температур 8–12°C [326] и 25–30°C [319, 327, 328];
- зависимость Аррениуса характеризуется двумя-тремя прямыми с разными углами наклона. Температура, при которой происходят изломы, находится, как правило, в области 8–13°C и 25–30°C.

Численные значения энергии активации несколько варьируют у разных авторов, в основном, для области температур 12–30°C. Более однозначные данные приводятся для температур ниже 10–12°C, где происходит скачкообразное изменение энергии активации в 2–3 раза по сравнению с высокотемпературной областью, а значения энергии активации несколько больше 40 кДж/моль. Для температур 12–30°C значение E колеблется от 17,5 до 28 кДж/моль [329].

6.1. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов зимоспящих сусликов *Citellus undulatus*.

Типичные графики в координатах Аррениуса, полученные нами для водного диффузионного обмена эритроцитов, имеют различный вид зависимости для каждого состояния животного.

Активное состояние. Температурная зависимость времени водного диффузионного обмена (ВДО) для эритроцитов суслика в активном зимнем состоянии, представленная на рис. 6.1 имеет четыре участка с характерными изменениями угла наклона прямой при температурах около 10, 22 и 30°C с соответствующими значениями энергии активации (табл. 6.1).

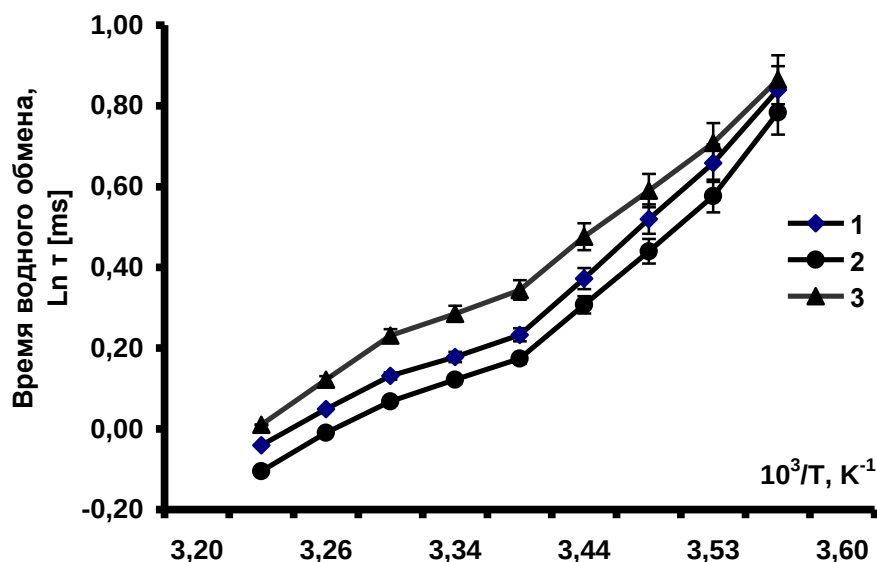


Рис. 6.1. Аррениусова зависимость времени диффузии воды через мембрану эритроцитов суслика *Citellus undulatus* в состоянии активности. Приведены данные трех измерений для каждого животного ($n=6$), выполненных на протяжении 3-х сезонов гибернации (1,2,3).

Сравнение температурных зависимостей водного обмена эритроцитов активного зимой суслика с данными литературы для эритроцитов человека и крысы показало, что на графиках Аррениуса имеется два интервала температур: 6–10 и 22–30°C, в которых значения энергии активации существенно различаются. В области температур 6–10°C среднее значение энергии активации равно $29,2 \pm 2,25$ кДж/моль (табл. 6.1), что значительно ниже ее значений для эритроцитов человека, где, как показано в работах [318, 326, 327, 330], энергия активации составляет 44–48 кДж/моль и близка к значению, полученному для

диффузии молекул воды через липидные бислои.

Таблица 6.1

Значения энергии активации (E_a) водного диффузионного обмена мембран эритроцитов сусликов в активном (АС), пробуждающемся (начальный этап – ПС-1, завершающий – ПС-2) и гибернирующем (ГС) состояниях в различных интервалах температур.

Состояние	Температура, °C							
	6–10	10–14	14–18	18–22	22–26	26–30	30–34	34–38
*АС	29,2 ±2,25	23,02 ±1,93	21,09 ±1,85	22,41 ±1,95	9,91 ±1,33	9,48 ±1,35	17,55 ±2,02	19,45 ±2,05
*ГС	21,65 ±1,73	26,42 ±2,15	25,61 ±2,11	23,82 ±1,91	23,19 ±1,97	21,27 ±1,85	24,75 ±2,03	26,76 ±2,11
*ПС-1	13,72 ±1,35	14,45 ±1,39	15,19 ±1,43	18,53 ±2,04	17,05 ±1,95	17,82 ±1,98	19,29 ±2,01	30,48 ±2,35
*ПС-2	27,34 ±2,22	23,34 ±2,12	25,77 ±2,08	23,57 ±1,85	21,70 ±1,93	24,32 ±1,87	10,32 ±1,47	11,27 ±1,55

(*) – численные значения (E_a) вычислены по результатам измерений времени водного диффузионного обмена τ для каждого состояния животного ($n=6$), выполненных на протяжении 3-х сезонов гибернации.

Обращает на себя внимание несколько пониженное значение энергии активации в интервале температур 22–30°C, составляющее около 10 кДж/моль. Слабую зависимость времени водного обмена от температуры в данном интервале обычно связывают со структурной "нестабильностью" мембраны эритроцитов в области температур 17–20°C и 25–28°C. Это подтверждается данными ряда работ, где указывается на многочисленные изменения структурно-функциональных характеристик мембраны эритроцитов в интервале 17–30°C. При этих температурах наблюдаются изломы на графиках Аррениуса активности ацетилхолинэстеразы [186, 314], осмотической устойчивости эритроцитов человека при 18 и 25°C, быка (при 19 °C), транспорта глюкозы в интактных эритроцитах и в их тенях [186].

Ряд данных свидетельствует о том, что в области 17–30°C в мембране эритроцита происходит переход, проявляющийся в изменении состояния

белкового компонента [186]. В то же время убедительные данные, свидетельствующие, что причина перехода – модификация структуры белков, отсутствуют. Скорее всего, это связано с изменением белок-липидных взаимодействий, вследствие, как уже указывалось, структурных (фазовых) переходов в аннулярных липидах. На возможность таких переходов в нативных мембранах указывают данные о том, что холестерин, оказывающий влияние на структурные переходы в мембране, может «выталкиваться» из области прибелковых липидов [331].

Некоторое возрастание энергии активации в области около физиологических температур (в нашем случае 30–38°C) вероятно всего связано с завершением фазового перехода в наружном монослое липидов, что приводит к большей его однородности и, как следствие, значительному уменьшению структурных дефектов в мембране.

С нашей точки зрения, подтверждением влияния фазовой гетерогенности липидов на водную диффузионную проницаемость мембран служат эксперименты по предварительному прогреву клеток до 30–40°C [327]. Показано, что время обмена возрастает при увеличении температуры прогрева и достигает максимума при температурах 37–40°C, что, по мнению авторов, связано с "расплавлением" всё большего числа "твёрдых" липидов.

Естественно предположить, что в этих условиях диффузия воды с большей вероятностью может идти через водные поры – белковые комплексы, осуществляющие трансмембранный обмен водой.

В целом отмеченный характер температурной зависимости выхода воды и изменения энергии активации этого процесса в интервале температур 6–38°C достаточно хорошо согласуется с данными о термотропном структурном изменении мембранных белков эритроцитов активного суслика и человека [332]. Указывается на общность термопереходов в белках эритроцитов человека и бодрствующего животного при температурах около 5, 10, 15, 20, 30°C, где

происходит длинноволновое смещение спектра, связанное с увеличением полярности ближайшего микроокружения белковых хромофоров, а также изменение характера тушения триптофановой флуоресценции, вызванные, вероятно, разрыхлением белковых молекул и/или изменением белок-липидных взаимодействий.

Состояния пробуждения и гибернации. Для пробуждающегося животного отмечена некоторая неоднородность в характере температурной зависимости времени водного обмена, которая была связана, вероятнее всего, с температурой тела животного при забое. На рис. 3.2 представлены зависимости для образцов крови, взятых при температурах ниже 15°C (8–12°C – начало пробуждения) и выше 20°C (30–36°C – завершение пробуждения).

Видно, что при относительно монотонной зависимости в области температур 6–30°C, что больше характерно для ГС, наблюдается различие угла наклона кривых при 30–38°C. Для обеих зависимостей (ПС-1и ПС-2) в области температур около 30°C отмечается различие в изломе на кривых с соответствующим, изменением энергии активации.

В гибернирующем состоянии зависимость водного обмена в диапазоне 6–38°C практически аппроксимируется прямой со слабо выраженным изломом в области температур около 20°C и средними значениями энергии активации равными, примерно, 23,3 и 25,4 кДж/моль для температур больших и меньших 20°C соответственно (рис. 6.2).

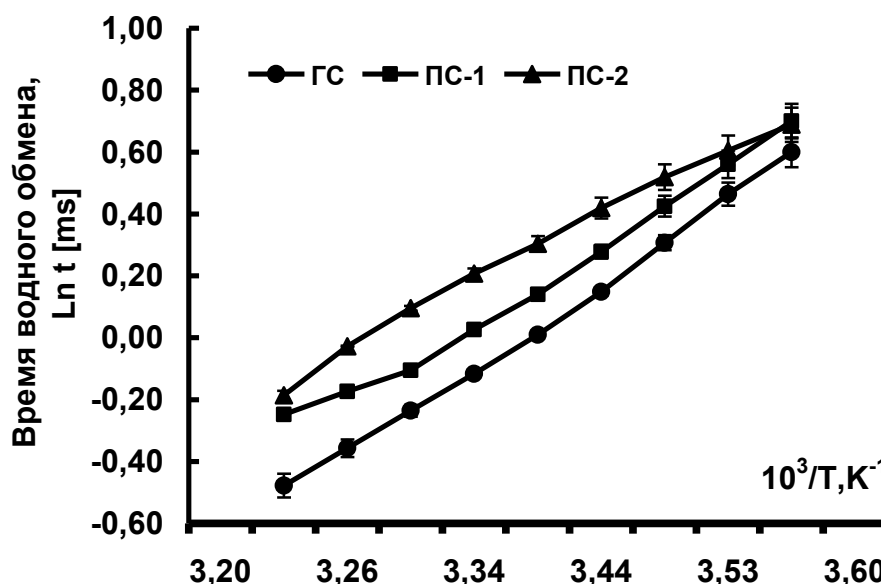


Рис. 6.2. Аррениусова зависимость времени диффузии воды через мембраны эритроцитов сусликов в гибернирующем (ГС) и пробуждающемся (начальный этап – ПС-1, завершающий – ПС-2) состояниях.

Таким образом, при анализе полученных результатов следует, прежде всего, отметить, что для гибернирующих животных типичен иной характер температурных зависимостей, нежели для гомойотермных организмов [326, 327], а время водного диффузионного обмена на порядок (в 7-8 раз) меньше, чем у эритроцитов донора. Одной из причин, могущей оказывать влияние на интенсивность водного обмена, является изменение соотношения объема клетки V к площади ее поверхности S . Проведенные нами исследования формы и объема клетки с помощью методов световой и электронной микроскопии, а также данные литературы [291] позволили определить, что эритроциты сусликов в норме имеют форму дискоцитов со средним размером порядка 5-6 мкм. То есть уменьшение времени водного обмена по сравнению с эритроцитами человека за счёт изменения поверхностно-объемного соотношения маловероятно. Кроме того, наблюдается достоверно воспроизводимое различие численных значений τ в зависимости от состояния

животного для каждого измерения в интервале температур 6–38°C. Эритроциты суслика, взятые у спящего животного (рис. 6.2), во всем температурном диапазоне более проницаемы для воды, чем клетки активного животного (рис. 6.1).

Линейная зависимость кривой Аррениуса времени водного диффузионного обмена эритроцитов суслика, находящегося в состоянии спячки, и практически неизменное значение энергии активации во всём исследованном температурном интервале, представляют собой достаточно интересный, но в какой-то мере известный факт и подлежат обсуждению с точки зрения адаптированности системы (в частности, организма или клетки) к пониженным температурам.

Высказанное в работе [333] утверждение, что об адаптированности динамической структуры мембраны к пониженным температурам судят по отсутствию изломов на аррениусовых зависимостях мембранных характеристик или по их сдвигу к более низким температурам и меньшей крутизне, находит здесь прямое подтверждение.

В работе [334] при исследовании температурной зависимости выброса ионов водорода, потребления O_2 и захвата Ca^{2+} в печени арктического суслика показано, что в состоянии спячки все три процесса в интервале 4–37°C хорошо аппроксимируются прямой с энергией активации равной 15 ккал/моль. Отмечается также, что при спячке скорости процессов во всем температурном интервале ниже, чем в бодрствующем состоянии, для которого указанные три процесса имеют изломы при 21–23°C.

При исследовании мембраносвязанных ферментов в плазматической мембране клеток печени гибернарующих хомячков показано [333], что трансмембранные ферменты – K^+ , Na^+ –АТФ-азы имели две температуры перехода при 25 и 13°C, а более низкотемпературный переход снижался в состоянии гибернации до 4°C. Был сделан вывод, что отмеченные изменения

имеют место в липидном матриксе внешней части мембраны, что подтверждено изменением флуоресценции мембранных зондов в области более низкой температуры фазового перехода.

Вопрос об адаптированности системы к тому или иному воздействию, в частности, температурному, является ключевым в понимании механизма структурных перестроек, обеспечивающих функционирование различных компонентов клетки и её мембраны в изменяющихся температурных условиях.

Каковы же причины, приводящие к различию в температурном поведении, казалось бы, одинаковых систем – эритроцитов суслика, находящегося в различных физиологических состояниях? С точки зрения анализируемой проблемы – состояния мембраны и её водной проницаемости, доминирующим фактором может оказаться изменение гомеостаза организма и. клетки в процессе подготовки животного к спячке. Из множества изменений в организме животного, оказывающих влияние на структурно-функциональное состояние мембран, отметим следующие:

- значительное возрастание (за счет накопления бурого жира) доли ненасыщенных жирных кислот (олеиновая, линолевая, линоленовая), температура плавления которых составляет 16–18°C; $-3\div-5^\circ\text{C}$ и $-10\div-11^\circ\text{C}$ соответственно;

- образование в тканях животного веществ белковой природы, оказывающих гипометаболический эффект. Данные пептиды, выделенные из различных тканей гибернирующих животных, идентифицированы по молекулярной массе, степени их активности и по концентрационным дозам [8, 335, 336];

- определенную роль здесь может играть холестерин, который, присутствуя в бислое, вызывает "разжижение" и приводит к уменьшению проницаемости мембраны. Однако, в крови гетеротермных организмов в период подготовки к спячке наблюдается значительное снижение уровня холестерина:

общего – на 15% и свободного – на 43% [132].

Вполне естественно предположить, что изменение в мембранах уровня ненасыщенных кислот и холестерина, присутствие в крови пептидов, обладающих гипометаболическими свойствами, могут оказывать влияние не только на физико-химические параметры мембраны за счет возможного встраивания ненасыщенных жирных кислот, перераспределения холестерина и других перестроек, но и приводить к изменению белок-липидных взаимодействий внутри самой мембраны.

6.2. Влияние «триггера спячки» пептида (1–10 кДа) на водный диффузионный обмен эритроцитов человека.

В последнее время значительный интерес исследователей направлен на изучение свойств и гипометаболического эффекта пептидов – "триггеров спячки" при действии на системы различного уровня организации гомойотермных организмов [8]. Имеющиеся данные литературы свидетельствуют о широком спектре действия пептидов, проявляющемся в снижении уровня потребления кислорода [7, 335] и биоэнергетической активности коры головного мозга крысы [337], ингибировании развития оплодотворённых яйцеклеток морских ежей [338], и возбудимости миокардиальных волокон [339], угнетении биосинтеза [313].

Представлялось интересным проследить, изменяется ли диффузионная водная проницаемость мембран эритроцитов человека в присутствии пептида? Согласно имеющимся данным, наибольшей активностью обладает фракция 1–10 кДа. Используемые концентрации пептида для клеточных суспензий составляют обычно около 10^{-5} М. Для ответа на поставленный вопрос мы провели исследование влияния фракции 1–10 кДа концентрации 10^{-5} М на водную диффузионную проницаемость эритроцитов донора. Методически это было сделано следующим образом: к 500 мкл эритроцитарной массы добавляли

30 мкл раствора пептида и 470 мкл физраствора, 60 мкл пептида и 430 мкл физраствора и 500 мкл раствора пептида, то есть были получены образцы клеточной суспензии, объемом 1000 мкл, содержащие 30, 60 и 500 мкл раствора пептида или 3×10^{-7} ; 6×10^{-7} и 5×10^{-6} М, соответственно. Контролем служили клетки, разбавленные физраствором в таком же соотношении. Таким образом, параллельно проводилось определение концентрационного влияния растворов пептида на водную проницаемость. Результаты проведенных исследований представлены на рис. 6.3.

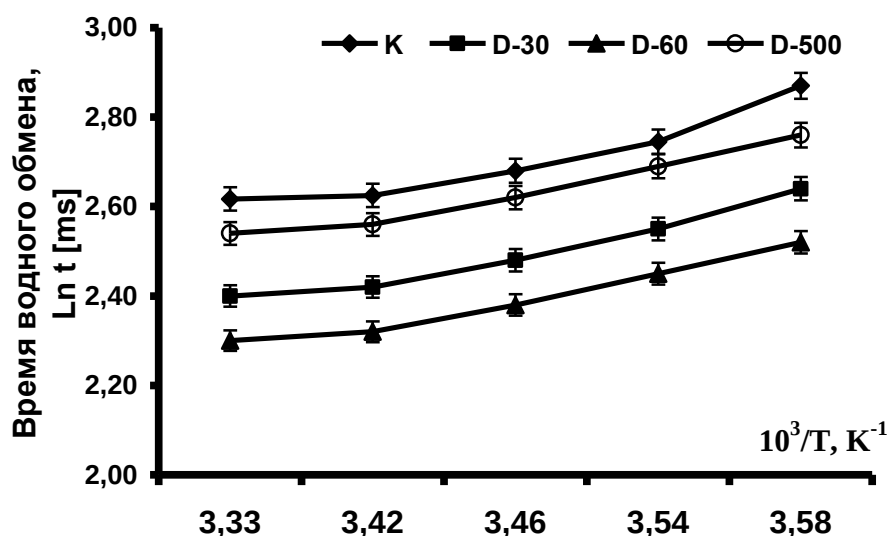


Рис.6.3. Аррениусовы зависимости времени диффузии воды через мембрану эритроцитов человека в присутствии «триггера спячки» – пептида 1–10 кДа, различной концентрации.

В результате исследования нами установлено:

- присутствие пептида приводит к снижению времени водного диффузионного обмена эритроцитов человека;
- наибольший эффект снижения τ наблюдается при добавлении 60 мкл раствора пептида, в среднем, на 25–30% в каждой измеряемой точке температурного интервала 6 –27°C, в сравнении с контролем;
- в присутствии меньших (30 мкл) и больших (500 мкл) концентраций эффект

снижения проницаемости менее выражен (18 –20% и 6 –8% соответственно). – температурная зависимость τ , представленная на рис. 6.3, показала, что если для контрольного образца в низкотемпературной области наблюдался излом, с возрастанием энергии активации при температуре 10°C, то у эритроцитов в присутствии пептида он исчезал. В то же время, в высокотемпературной области при 22°C для всех образцов наблюдалось изменение характера зависимости в сторону уменьшения значений энергии активации. Последний факт достаточно хорошо согласуется с результатами, полученными на эритроцитах активного суслика, где в области температур 22–30°C наблюдалось также снижение энергии активации.

Этот несколько «неожиданный» результат подлежит обсуждению с точки зрения механизма действия пептидов на структурно-функциональное состояние мембраны. Если предположить, что сам пептид либо факт его присутствия модифицируют мембрану таким образом, что приводит к увеличению её проницаемости, то следовало бы ожидать скачкообразное возрастания τ , поскольку, согласно имеющимся данным, "триггер спячки", присутствующий в крови гибернирующего животного, частично инактивируется при 20°C и полностью при 37°C в течение 30 минут нахождения *in vitro* [121]. Однако, как у эритроцитов активного суслика, так и у человека в области температур выше 20°C наблюдается снижение энергии активации выхода воды.

С одной стороны, полученные результаты находятся в некотором несоответствии с указанными выше данными о частичной инактивации "триггера" и возможном резком изменении водного обмена при температурах выше 20°C. Однако других причин, кроме как присутствие пептида, вызывающих снижение времени водного обмена, у клеток одного и того же донора в нашем случае не было.

Вопрос о том, почему его влияние сохраняется выше 20°C, связан с возможным различием нативного и выделенного пептида, обладающего более

широким, в температурном отношении, спектром действия. В пользу этого свидетельствуют данные о выраженном гипометаболическом эффекте действия пептида фракции 1–10 кДа, при введении его в организм гомойотермных животных, температура тела которых 37–38°C [8, 335], и его влиянии на функциональную активность различных ферментов *in vivo* [340]. К сожалению, метод ЯМР не позволяет объяснить отмеченные факты с точки зрения возможных модификаций в структуре мембраны, повлекших за собой изменение водной проницаемости. Более адекватными в выявлении возможных структурных перестроек в мембране эритроцита, вызванных присутствием пептида, является метод электронной микроскопии – замораживания скалывания. При изучении состояния ультраструктуры мембраны эритроцитов с помощью метода замораживания-скалывания нами было установлено, что присутствие пептида определенным образом модифицирует мембрану. Представленный снимок (рис. 6.4) иллюстрирует качественное нарушение "классической" морфологии поверхности сколотой мембраны, проявляющееся во множественных отклонениях прохождения плоскости скола.

Подобное изменение ультраструктуры мембраны может свидетельствовать либо об усилении межмолекулярного взаимодействия в гидрофобной области липидного бислоя, либо об ослаблении взаимодействий в гидрофильной области внешнего слоя мембраны и усилении прикреплённости трансмембранных белков к цитоскелету. Такая морфология мембраны, как показано в предыдущей главе, в большей степени характерна для эритроцитов гетеротермов в состоянии спячки. Возрастание плотности ВМЧ на внутренней, прилежащей к цитоплазме PF-поверхности является тому подтверждением.

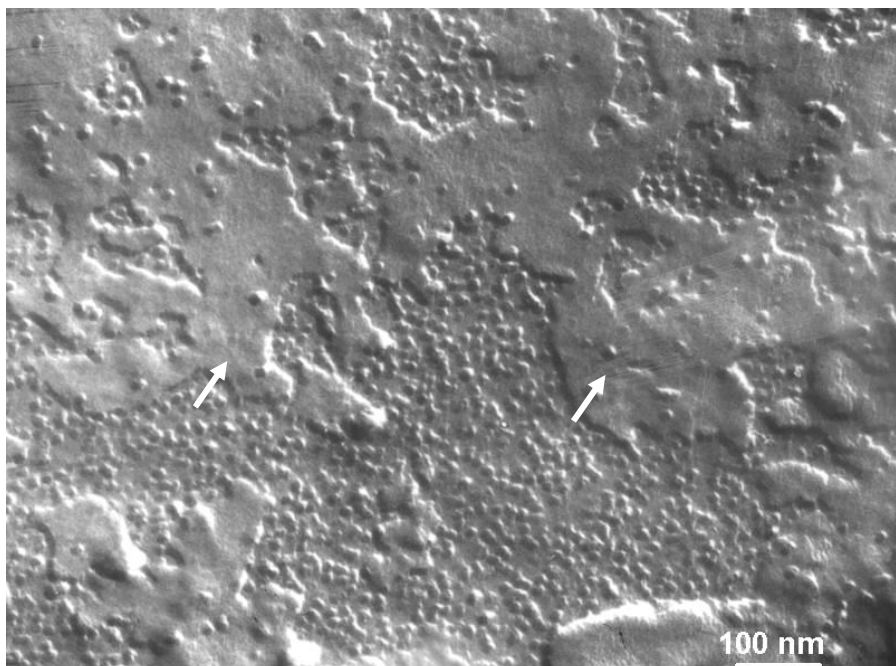


Рис. 6.4 Ультраструктура сколотой поверхности мембраны эритроцитов донора в присутствии пептида «триггера спячки» – 1–10 кДа. Множественные нарушения прохождения плоскости скола (стрелки).

Таким образом, добавление к эритроцитам человека пептида «триггера спячки» с м.м. 1–10 кДа модифицирует структуру их мембраны и приводит к снижению времени водного диффузионного обмена на 25–30% при конечной концентрации раствора пептида 6×10^{-7} М. Влияние пептида имело дозозависимый характер. Наибольший эффект снижения τ наблюдался, в температурном интервале 6–27 °С. По степени проницаемости мембраны для воды эритроциты человека (Ч) и гетеротермов в трех физиологических состояниях распределились таким образом: ГС > ПС > АС > Ч.

6.3. Оценка водной проницаемости мембран эритроцитов человека и зимоспящих сусликов методом быстрого двухступенчатого замораживания.

Краткое обоснование исследований данного раздела. Анализ условий эксперимента.

Необходимо отметить, что существующие в настоящее время представления о двух возможных путях выхода воды через мембрану – "белковом" и "липидном", базируются, в основном, на данных метода ЯМР о различии в энергии активации трансмембранного диффузионного переноса воды в "низкотемпературной" (4–12°C) и "высокотемпературной" (выше 20°C) областях [318, 325]. В то же время известно, что при медленном снижении температуры потеря внутриклеточной воды в эритроцитах (обезвоживание) происходит вплоть до температуры затвердевания цитозоля ($-25 \div -28^\circ\text{C}$).

Одним из методических подходов, широко используемых в практике низкотемпературного консервирования, является двухступенчатое замораживание [341–343]. Этот метод отличается достаточной простотой и воспроизводимостью параметров режима замораживания, т.е. скоростью охлаждения до температуры изотермической экспозиции, температурой и временем экспозиции (температурная остановка), а также скоростью охлаждения после этапа температурной остановки. Попытки определения корреляционных связей между сохранностью клеток и процессами массопереноса, происходящими при двухступенчатом замораживании, были предприняты в работах [208, 172, 238].

Проведенные ранее исследования на лимфоцитах [342, 344], а также теоретические расчеты и оценки [238] показали, что на этапе изотермической экспозиции под влиянием термодинамической силы, пропорциональной разности кривизн вне- и внутриклеточных кристаллов, происходит перенос внутриклеточной воды через клеточную мембрану во внеклеточное пространство, сопровождающийся "растворением" внутриклеточных кристаллов.

В то же время в литературе отсутствуют детальное морфологическое описание процессов рекристаллизации и обезвоживания клеток, протекающих в них при изотермической экспозиции. Исходя из этого, мы проанализировали

процессы, происходящие на этапе температурной экспозиции при двухступенчатом режиме замораживания, а также количественно оценили проницаемость мембраны эритроцитов для воды в области отрицательных температур, используя электронно-микроскопический метод замораживания-скалывания, в основе которого лежит криофиксация (сверхбыстрое замораживание).

В качестве объекта для изучения процессов рекристаллизации и таяния внутриклеточного льда были выбраны эритроциты из-за отсутствия в них органелл, оказывающих влияние на формирование внутриклеточных кристаллов и маскирующих процесс льдообразования. В то же время, согласно данным литературы, высокая проницаемость мембраны эритроцитов для воды в области околонулевых температур не позволяет другими морфологическими методами наблюдать в них динамику изменения внутриклеточных кристаллов.

Капля клеточной суспензии, объемом 0,02 мл, помещалась на специальный объектодержатель и быстро погружалась в охлажденную, криофиксирующую жидкость, температура которой была несколько ниже температуры изотермического выдерживания. Мы учитывали, что температура охлаждаемого объекта экспоненциально достигает температуры охлаждающей среды. Поэтому величина последней была такова, чтобы значение температуры экспозиции находилось на линейном участке кривой охлаждения. Скорость охлаждения на первом этапе (до температуры экспозиции) составляла около 5 тыс. град/мин. Точность стабилизации и измерения температуры контролировалась одновременно низкотемпературным термометром ($\Delta T \pm 0,1^\circ\text{C}$) и дифференциальной медь-константановой термопарой (второй спай термопары находился при 0°C), компактно расположенными внутри камеры. Криофиксацию эритроцитов после различных интервалов времени экспозиции осуществляли в переохлажденном в жидком азоте пропане (точка плавления – $-189,6^\circ\text{C}$) [146].

Для исследования состояния цитозоля на этапе изотермического выдерживания нами также применен метод ЭПР спиновых зондов [152] с добавочным уширением. В работе использован водорастворимый зонд 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил (ТЕМПОН) (конечная концентрация 1 мМ) и уширяющий агент – феррицианид калия (100 мМ), не проникающий через мембрану интактных эритроцитов. Последнее обстоятельство позволяет следить за сигналом ЭПР исключительно от зонда, находящегося внутри клетки

6.3.1. Рекристаллизация льда и обезвоживание клеток на этапе изотермического выдерживания.

Проведенные исследования показали, что быстрое замораживание эритроцитов до температуры изотермической экспозиции ($-20 \div -30^{\circ}\text{C}$) приводит к образованию мелких внутриклеточных кристаллов, размером 0,06–0,08 мкм, равномерно распределенных по всему объёму эритроцита (рис. 6.5, а). Внеклеточная среда представляла собой большие кристаллические области сложного строения, разделенные каналами эвтектики, в которых обычно располагались клетки.

Выдерживание образца при температуре экспозиции вызывало интенсивную рекристаллизацию вне- и внутриклеточного льда, которая завершалась, в основном, к 15–20 мин. температурной остановки (рис. 6.5, б; 6.6, а). Размеры внутриклеточных кристаллов при этом достигали 0,3–0,5 мкм.

Начиная с 20-й минуты, в эритроцитах наблюдалось постепенное "таяние" кристаллов внутриклеточного льда с хорошо выраженной границей плавления (рис. 6.6, б). Завершался этот процесс к 30-й минуте изотермической экспозиции, при этом происходило практически полное исчезновение внутриклеточных кристаллов, а содержимое клетки представляло собой гладкую область, лишенную всяких видимых неоднородностей (рис. 6.7, а).

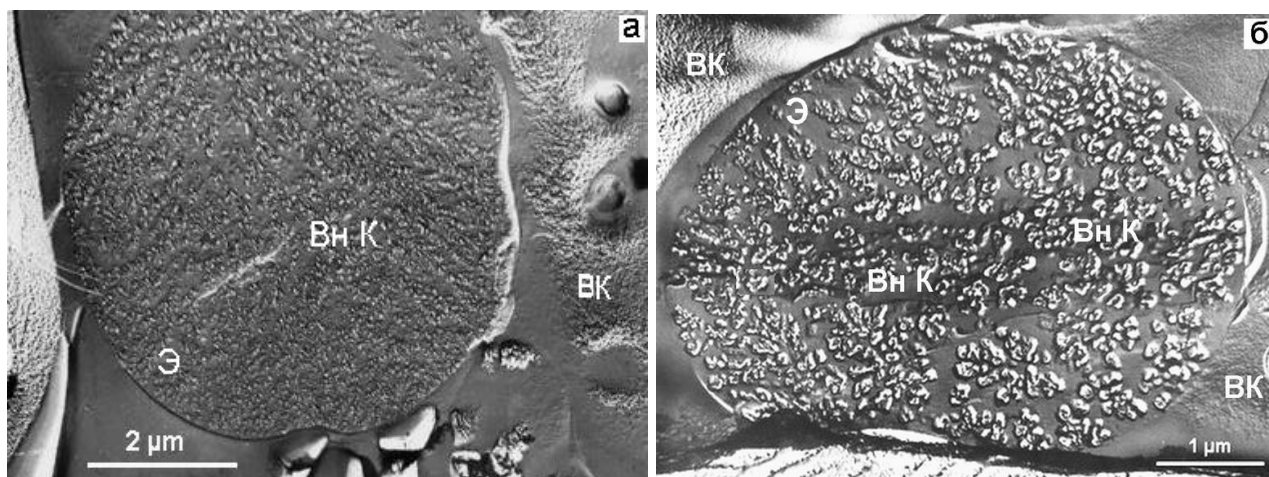


Рис. 6.5. Образование мелких, внутриклеточных кристаллов (ВнК) в эритроцитах (Э) человека после первого этапа охлаждения (а); характер рекристаллизации внутриклеточного льда в эритроцитах донора на начальном этапе изотермической экспозиции – 10 мин при -20°C (б). ВК– кристаллы внеклеточного льда.

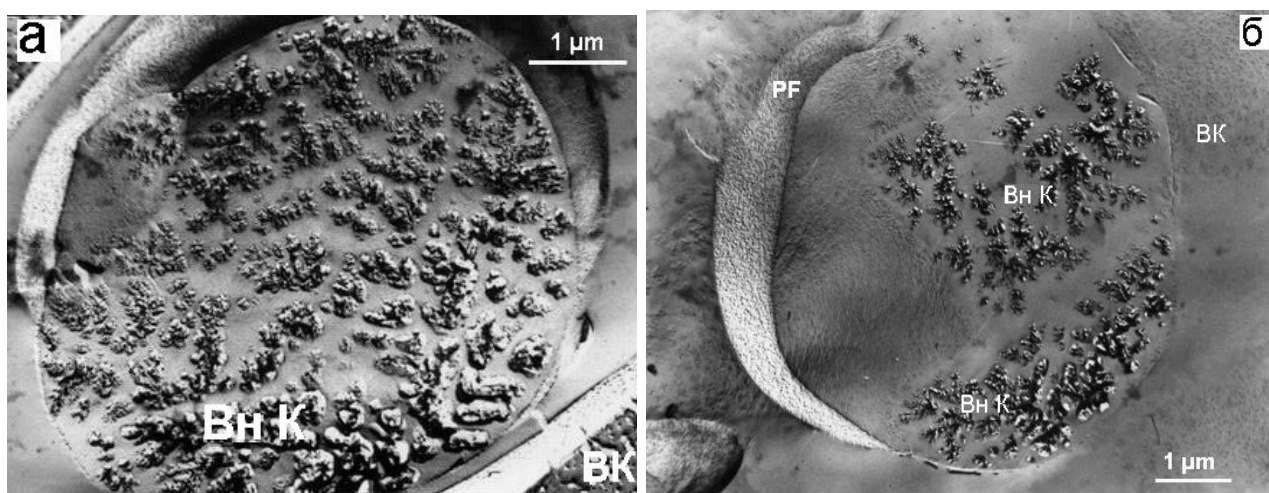


Рис. 6.6. Процессы рекристаллизации и «таяния» кристаллов внутриклеточного льда в эритроцитах человека на этапе изотермической экспозиции при -20°C в течение 15–20 мин (а); 30 мин (б). Обозначения как на рис.6.5.

Понижение температуры экспозиции до -30°C существенно не сказывалось на характере протекания процессов рекристаллизации и таяния льда внутри клетки. Отметим лишь, что после быстрого замораживания до

-30°C в клетках образовывались более мелкие внутриклеточные кристаллы, чем в первом случае. Кроме того, к 30-й минуте экспозиции при -30°C в клетках ещё присутствовали незначительные микровключения кристаллов. При более длительной температурной экспозиции (60 и 90 мин. при -20 и -30°C , соответственно) мембрана приобретала складчатую поверхность, что свидетельствует о значительной обезвоженности клеток (рис. 6.7).

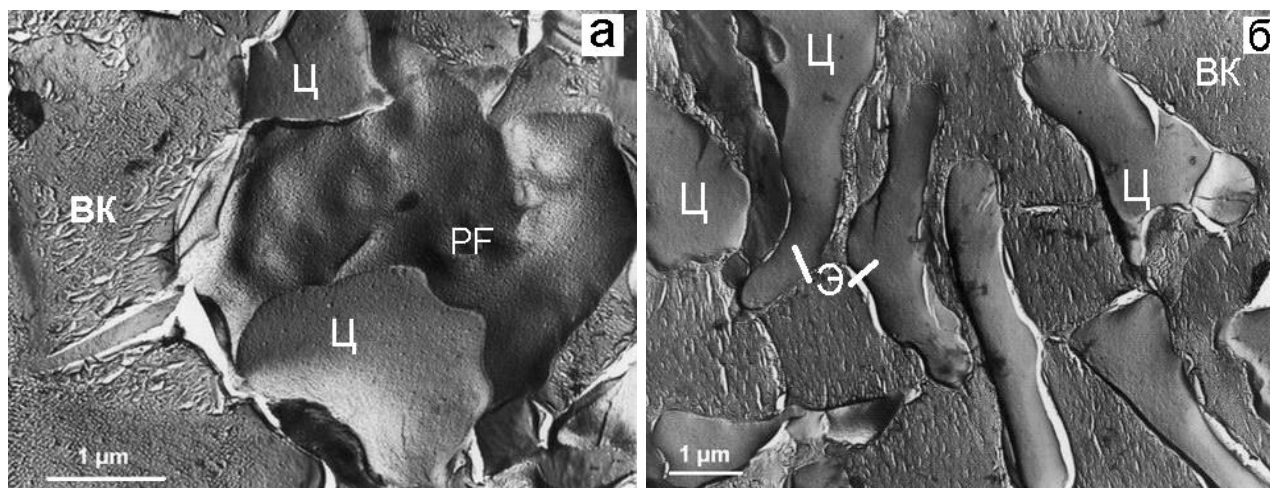


Рис. 6.7. Состояние цитозоля и поверхности эритроцитов (Э) после 60 мин при -20°C (а); 90 мин при -30°C (б). Обозначения: РФ –поверхность эритроцита; Ц – внутриклеточный объем эритроцита (цитозоль); ВК – внеклеточные кристаллы.

Таким образом, время, за которое происходит растворение внутриклеточных кристаллов на этапе температурной остановки в эритроцитах донора, составляло 30–35 минут и в интервале $-20\div-30^{\circ}\text{C}$ слабо зависело от температуры экспозиции.

В ряде работ было дано теоретическое обоснование процессов рекристаллизации кристаллов льда и обезвоживания клеток, протекающих на этапе температурной экспозиции. На основании теоретической модели, предложенной для описания данного процесса, в работах [172, 238] было получено выражение для времени растворения кристаллов внутриклеточного

льда t :

$$t = (kTa_0^4 / 8 \delta V_s K_w R^2) + (kTa_0 / 24 \delta V_s D) \quad (1)$$

где: k – постоянная Больцмана, δ – коэффициент поверхностного натяжения границы кристалл льда-расплав, a_0 – начальный радиус внутриклеточного кристалла, K_w – коэффициент проницаемости мембраны для воды, V_s – объем молекулы льда, T – абсолютная температура, D – коэффициент внутриклеточной диффузии, R – радиус клетки.

Следует отметить, что термодинамические причины обезвоживания клеток при различных условиях одноэтапного охлаждения достаточно подробно изложены в работах [345, 346]. Движущей силой выхода воды из клетки при замораживании является разность химических потенциалов воды между вне- и внутриклеточным растворами, поскольку предполагается, что химический потенциал воды вне клетки равен химическому потенциалу льда на границе раздела фаз. На этапе температурной экспозиции, когда дальнейшего охлаждения не происходит и отсутствует переохлаждение внутриклеточного раствора, разность химических потенциалов воды вне и внутри клетки будет определяться средней кривизной вне- и внутриклеточных кристаллов льда. Неизбежные процессы рекристаллизации и выделяющееся при этом тепло приведут к изменению разности химических потенциалов таким образом, что внутриклеточные кристаллы начнут таять, а клетка обезвоживаться, поскольку размеры внутриклеточных кристаллов меньше внеклеточных и, в пределе, ограничены размерами клетки.

Вне- и внутриклеточные процессы, вызванные температурной остановкой, можно проанализировать также и с точки зрения диаграммы фазового состояния. Частичная потеря внутриклеточной воды и наличие кристаллов льда будут приводить к повышению концентрации растворенных внутри клетки веществ, что в условиях постоянства температуры будет неизбежно вызывать плавление внутриклеточных кристаллов. Таким образом, существует, по

крайней мере, два взаимосвязанных процесса, вызывающих растворение внутриклеточных кристаллов и обезвоживание клетки

В представленной выше теоретической оценке сделан ряд допущений, принципиально не изменяющих реальную картину:

- вода вне и внутри клетки находится в термодинамическом равновесии с вне- и внутриклеточным льдом соответственно;
- средняя кривизна поверхности кристаллов внеклеточного льда много больше, чем внутриклеточного;
- форма клетки близка к сферической.

В предельном случае, возникшие на первом этапе охлаждения внутриклеточные кристаллы могут рекристаллизоваться в один кристалл, т.е. реализуется случай $a_0 = R$. В том случае, когда лимитирующим звеном при растворении внутриклеточного кристалла является перенос молекул воды через мембрану, а не внутриклеточная диффузия, $3DR \gg K_w$, и выражение (1) преобразовывается к виду: $t \approx kTR_o^2 / 8 \delta V_s K_w$, Учитывая, что $K_w = L_p kT/V_s$ получим: $t \approx R_o^2 / 8 \delta L_p$

Данное выражение позволяет оценить величину коэффициента фильтрации L_p , зная экспериментально полученное время растворение кристаллов льда t : $L_p \approx R_o^2 / 8 \delta t$.

Принимая во внимание, что для эритроцитов человека $R_o = 4 \times 10^{-6}$ м, $\delta = 20$ дин/см $= 2 \times 10^{-2}$ н/м², $t = 2 \times 10^3$ сек, получим: $L_p \approx 0.5 \times 10^{-13}$ н⁻¹ м³ сек⁻¹.

Значение коэффициента проницаемости достаточно хорошо согласуется с данными литературы [347] для проницаемости липидных бислоев. Этот факт интересен и является подтверждением «липидного» характера проницаемости мембраны для воды в области отрицательных температур.

Таким образом, есть все основания полагать, что температурная остановка при двухступенчатом замораживании влечет за собой качественное

изменение процесса обмена воды между клеткой и окружающей ее средой, а длительность экспозиции может служить мерой обезвоженности клеток.

Несомненный интерес представляет вопрос о том, может ли морфологически установленный факт наличия или отсутствия внутриклеточных кристаллов в эритроцитах разных организмов, замороженных при одинаковых условиях (режимах) охлаждения, служить критерием различия проницаемости их мембран для воды? Для выяснения этого необходимо, во-первых, исследовать «поведение» эритроцитов других животных на этапе температурной экспозиции, и, во-вторых, оценить вклад первого этапа охлаждения (критическая скорость кристаллообразования) в обеспечение максимальной сохранности клеток при двухступенчатом замораживании.

С этой целью нами исследованы эритроциты зимоспящих сусликов, кровь у которых забиралась у спящего животного с температурой тела 4°C . При охлаждении клеток на первом этапе двухступенчатого замораживания со скоростью (V_1) $80\text{--}100^{\circ}\text{C}/\text{с}$ было установлено, что уже к 10 минуте температурной экспозиции в эритроцитах суслика, практически, не наблюдаются кристаллы внутриклеточного льда (рис. 6.8).

Полученные результаты о длительности обезвоживания на этапе температурной экспозиции могут свидетельствовать о том, что эритроциты зимоспящих животных более проницаемы для воды, нежели эритроцита человека, и успевают обезводиться уже на первом этапе при указанном режиме охлаждения.

Это подтверждают также данные водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов донора и зимоспящих сусликов, полученные нами методом ЯМР (рис. 6.9).

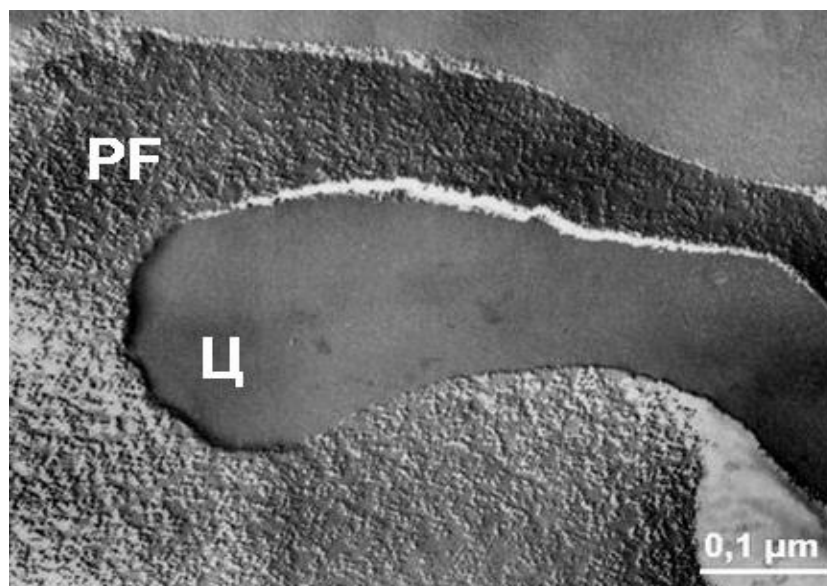


Рис. 6.8. Состояние цитозоля (Ц) и PF-поверхности мембран эритроцитов гибернирующих сусликов (10 мин. экспозиция при -20°C).

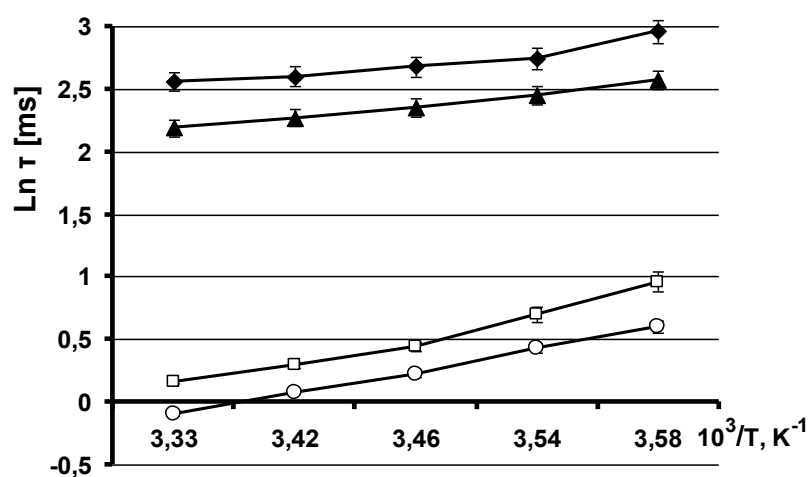


Рис. 6.9. Аррениусовы зависимости времени водной диффузионной проницаемости мембраны эритроцитов активного ($-\square-$) и спящего ($-\circ-$) сусликов, а также эритроцитов человека в контроле ($-\blacklozenge-$) и в присутствии пептида ($-\blacktriangle-$).

В каждой точке температурного интервала $6-27^{\circ}\text{C}$ измеренное значение времени водного диффузионного обмена эритроцитов суслика на порядок (в 7–8 раз) меньше, по сравнению с эритроцитами человека.

Хотя данные значения получены для положительного интервала температур, мы, учитывая данные электронной микроскопии, считаем, что отмеченную тенденцию можно экстраполировать и на область умеренно низких, отрицательных температур. Столь значимое различие в проницаемости мембраны для воды эритроцитов донора и суслика, вероятнее всего, как со структурными перестройками в мембране, так и с необходимостью быстрого изменения их физиологического состояния в период кратковременных пробуждений во время зимней спячки.

Роль внутриклеточного кристаллообразования в повреждении клеток интенсивно исследовалась криобиологами, начиная с 70-х годов. В ряде работ было установлено [147, 348, 349], что критическая скорость кристаллообразования для эритроцитов многих видов животных находится в интервале $2000 - 5000^{\circ}\text{C} / \text{мин}$, то есть несколько ниже значений скорости V_1 , использованной нами.

Считается, что вероятность внутриклеточного кристаллообразования экспоненциально возрастает со степенью переохлаждения внутреннего содержимого клетки [350], и в значительной мере зависит от скорости и конечной температуры охлаждения, а также от величины проницаемости мембраны клеток для воды [326, 349].

Мы провели оценку морфологического состояния эритроцитов при варьировании значений скоростей одноэтапного режима охлаждения, приводящих к внутриклеточному кристаллообразованию и оказывающих, как выяснилось, влияние на характер распределения и геометрию кристаллов (рис. 6.10, б). Наблюдается четкое различие в количестве, размерах и расположении кристаллов льда во внутреннем объеме эритроцитов, находящихся в центре и на периферии замороженного образца. Это свидетельствует о значительном влиянии скорости охлаждения на процесс внутриклеточного кристаллообразования.

Известно, что на термограмме при одноэтапном режиме охлаждения

практически всегда существует ступенька т.н. «температурной (тепловой) остановки», обусловленная выделением тепла при образовании кристаллов льда. Чем выше скорость охлаждения, тем менее длительной является ступенька. В нашем случае, при меньших скоростях охлаждения, то есть при большей длительности тепловой остановки, в ходе замораживания успевают происходить заметные рекристаллизационные процессы и обезвоживание клетки, а внутриклеточные кристаллы, образовавшиеся на первом этапе кристаллизации, укрупняясь, располагаются в центре клетки (рис. 6.10, а).

При больших скоростях замораживания и, соответственно, меньшей длительности тепловой остановки, рекристаллизационные изменения и обезвоживание при замораживании выражены слабее. Более сильное переохлаждение приводит на первом этапе кристаллизации к возникновению более мелких внутриклеточных кристаллов, заполняющих практически весь объем клетки (рис. 6.10, б), однако, плотного контакта кристаллов внутриклеточного льда с клеточной мембраной в этих условиях не наблюдалось. При скоростях охлаждения, превышающих критическое значение, наблюдается формирование мелких кристаллов льда, заполняющих весь объем клетки и «плотно» контактирующих с ее мембраной (рис. 6.5, а).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при одноэтапном охлаждении существует достаточно широкий интервал скоростей, приводящих к образованию внутриклеточных кристаллов и в разных объемных долях, заполняющих клетку.

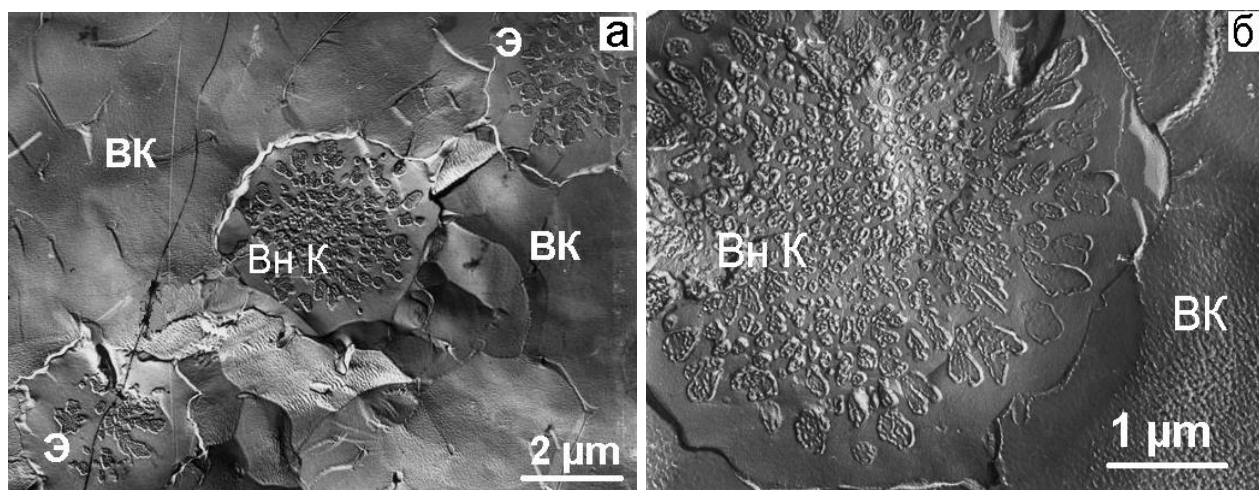


Рис. 6.10 Характер кристаллизации и распределения кристаллов внутриклеточного льда в эритроцитах человека, замороженных по одноэтапной программе со скоростью 4–5 тыс.°С /мин. Поперечное раскалывание образца, при исследовании методом замораживания-скалывания: а – эритроциты, расположенные в центральной части замороженного образца (скорость охлаждения меньше); б – эритроцит, находящийся в периферической части образца (скорость больше). Обозначения: Э – эритроцит; Вн К – внутриклеточные кристаллы; ВК – внеклеточные кристаллы

Отмеченные выше особенности характера кристаллизации и распределения кристаллов внутриклеточного льда в эритроцитах могут быть вызваны несколькими факторами:

- существованием градиента переохлаждения между центральной и периферийной частями клетки;
- перепадом концентрации растворенного вещества между центром клетки и примембранной областью, который реализуется в случае движения фронта кристаллизации от мембраны к центру клетки.

Таким образом, есть все основания полагать, что температурная остановка влечет за собой качественное изменение процесса обмена воды между клеткой и

окружающей ее средой, а длительность экспозиции может служить мерой обезвоженности клеток.

Мы предположили, что в связи с обезвоживанием клеток на этапе температурной остановки в них должно происходить изменение вязкости цитозоля, что возможно проанализировать методом ЭПР с помощью водорастворимого зонда ТЕМПОН, свободно проникающего через мембрану, и не проникающего уширителя сигнала – феррицианида калия. При изотермическом выдерживании суспензии клеток наблюдалась трансформация спектра ЭПР ТЕМПОНа, зависящая от параметров этапа температурной остановки – температуры и длительности экспозиции.

В качестве критериев использовались:

- спадание во времени нормированной интенсивности центрального компонента спектра $I_{o(n)}/I_{o(1)}$ (нормирование амплитуды центрального компонента спектра в момент времени n – $I_{o(n)}$ на значение $I_{o(1)}$ спектра, регистрируемого в момент достижения образцом температуры экспозиции);
- параметр $I_o(\Delta H_o)^2$, определяющий концентрацию зонда, где ΔH_o – ширина центрального компонента;
- соотношение амплитуд центрального и высокопольного компонентов спектра $I_o/I_{\text{—}}$, параметр подвижности зонда, характеризующий вязкость его микроокружения (микровязкость).

Анализ изменения величины I_n / I_o показал, что условно можно выделить три интервала температур экспозиции, в которых наблюдался сходный (однотипный) характер временной зависимости снижения интенсивности центрального компонента спектра (рис.6.11). Это температуры экспозиции до –20°C (–10 и –15°C), –20°C÷–35°C и –40°C÷–60°C. Резкое спадание интенсивности сигнала характерно для температурного интервала от –20 до –35÷–40°C, происходило оно в течение 20–25 мин. и коррелировало с процессами

обезвоживания клеток. При более длительных временах экспозиции наблюдалось замедление спада.

Ниже -45°C снижения сигнала практически не наблюдалось.

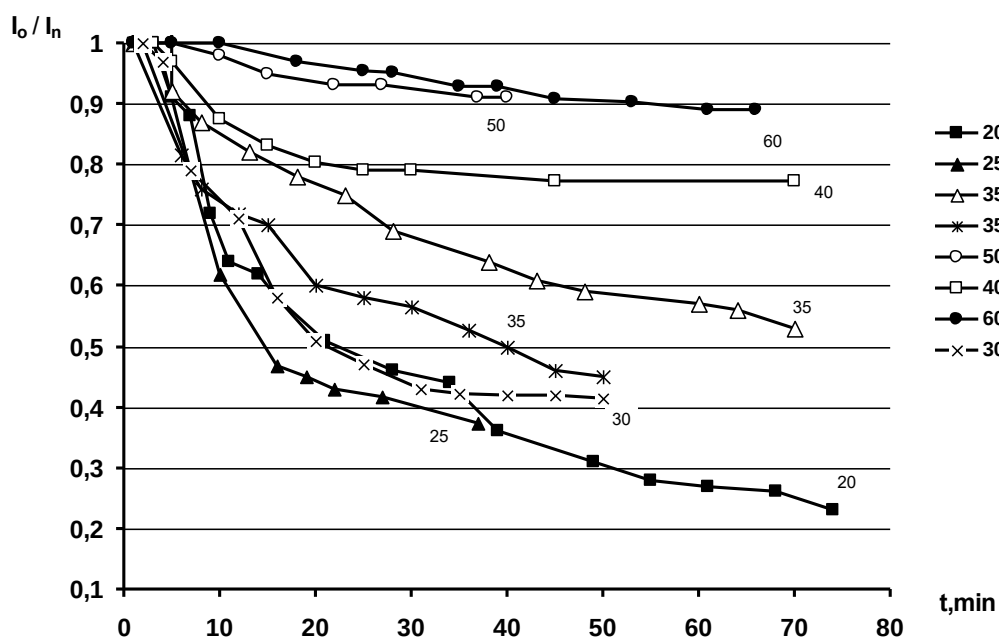


Рис. 6.11. Характер спада нормированной интенсивности центрального компонента спектра I_n / I_0 во времени для различных температур экспозиции

Каковы причины снижения интенсивности центрального компонента спектра? Очевидно, что их может быть несколько:

- выход радикала вместе с водой из клетки и его взаимодействие с уширителем во внеклеточном пространстве;
- вход уширителя в клетку по возможным дефектам в мембране.
- нельзя исключать восстановление зонда, вызванное его взаимодействием с веществами, содержащими SH-группы: серосодержащими аминокислотами и пептидами, белками [351].

При выходе радикала с водой его концентрация внутри клетки будет падать, вызывая снижение параметра $I_0(\Delta H_0)^2$, характеризующего концентрацию зонда. Представленные на рисунке 6.12 зависимости указывают на снижение этого параметра от времени экспозиции для

интервала температур $-20^{\circ}\text{C} \div -35^{\circ}\text{C}$. В то же время при температурах экспозиции ниже -45°C значения $I_0(\Delta H_0)^2$ практически не изменялись.

Для выяснения вопроса о возможном проникновении феррицианида калия внутрь клеток, мы анализировали параметр ΔH_0 . В случае проникновения феррицианида калия в клетку, величина ΔH_0 спектра ЭПР ТЕМПОНА должна возрастать в силу спин-спинового взаимодействия уширителя с зондом. Учитывая, что в нашем случае значения этого параметра практически не изменялись от времени экспозиции, можно предположить, что вход уширителя в клетку по возможным дефектам в мембране, маловероятен.

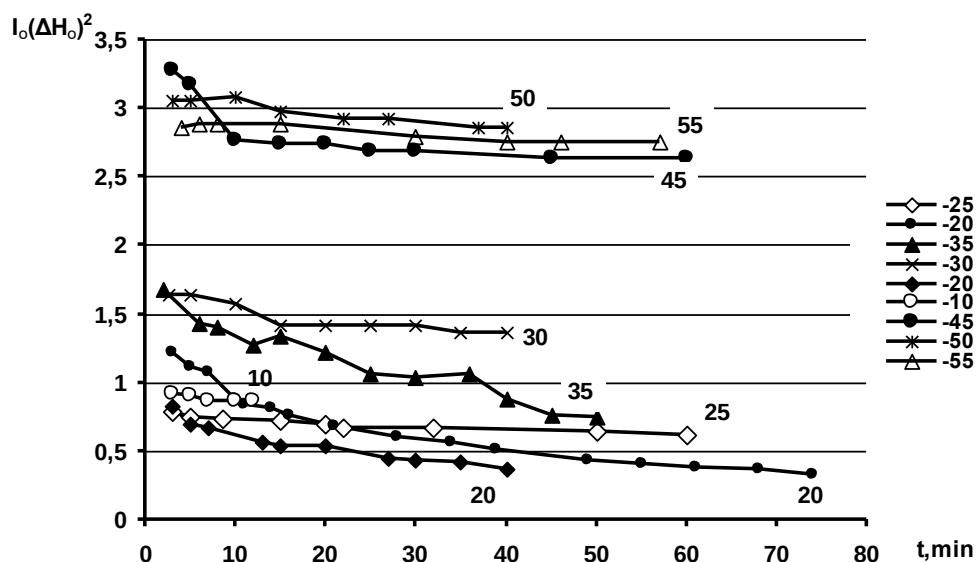


Рис. 6.12. Зависимость параметра $I_0(\Delta H_0)^2$, опосредуемого с концентрацией зонда во времени для различных температур экспозиции.

Анализ параметра I_0 / I_- , опосредуемого с микровязкостью окружения зонда показал отсутствие однозначной зависимости, как от длительности, так и от температур экспозиции (рис. 6.13).

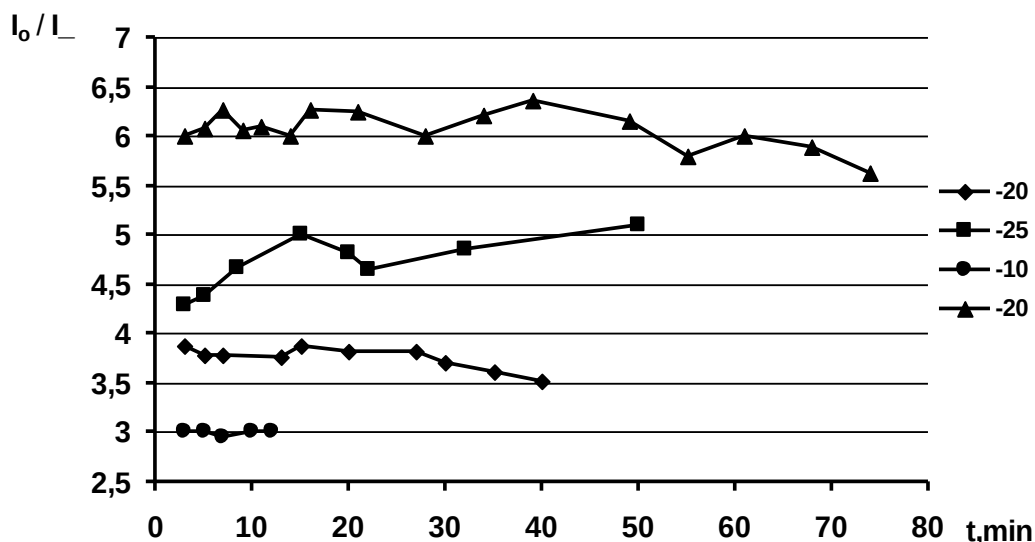


Рис. 6.13 Зависимость параметра I_0 / I_- , опосредуемого с микровязкостью окружения зонда, во времени для различных температур экспозиции.

Таким образом, проведенные ЭПР-исследования позволяют заключить, что наиболее вероятным процессом на этапе температурной экспозиции является выход зонда вместе с водой во внеклеточное пространство, т.е. происходит явление обезвоживания клеток.

Существующие в настоящее время представление о двух возможных путях выхода воды через мембрану-"белковом" и "липидном", базируются, в основном, на различии в энергии активации трансмембранного диффузионного переноса воды в «низкотемпературной» (меньше 10-12°C) и «высокотемпературной» (выше 20°C) областях, с одной стороны, и между липидными везикулами, приготовленными из отдельных компонентов или смеси липидов мембраны, и самой мембраной, с другой.

Идентификации структурных компонентов мембраны, ответственных за белковый и липидный пути трансмембранного переноса воды, посвящено значительное число работ [318, 319, 352–355]. Ряд данных, касающихся природы существующих в эритроцитарной мембране путей переноса воды,

были получены при исследовании влияния SH-реагентов на водный обмен. Установлено ингибирующее действие этих веществ на обменный поток воды через мембрану, что, по мнению авторов [318, 319; 356, 357], свидетельствует об участии белков в образовании водных пор. В тоже время однозначного ответа на вопрос, какие белки регулируют водный обмен, не получено. Считается, что наиболее вероятными претендентами среди основных трансмембранных белков на участие в формировании белкового пути проницаемости для воды могут быть белок полосы 3 и гликофорин. В пользу этого свидетельствуют следующие данные: ДТНБ – ингибитор диффузии воды избирательно связывается с белком полосы 3, а гликофорин при встраивании в искусственные липидные мембраны, вызывает усиление их проницаемости для воды. Если предположить, что в обеспечении водной проницаемости участвуют SH-группы белков, то, во-первых, гликофорин может принимать участие в переносе воды лишь вместе с другими белками, так как он вообще не содержит SH-групп [88], а во-вторых, не все SH-группы белка полосы 3 участвуют в переносе воды, поскольку обработка N-этилмалеимидом, сульфгидрильным реагентом, легко взаимодействующим с белком полосы 3, не оказывает существенного влияния на водный обмен. Из сравнения ингибирующего действия различных SH-реагентов следует, что SH-группы белков, участвующие в проницаемости мембраны эритроцитов для воды, локализованы в гидрофобном окружении [358]. В то же время отмечается, что ингибирование SH-реагентов трансмембранных потоков не полное, и уже при миллимолярных концентрациях ПХМБС происходит насыщение.

Было сделано предположение, что в мембране существует путь для прохождения воды, не связанный с SH – группами белков. Энергия активации переноса воды по такому пути составляет около 40 кДж/моль и близка к её значению для диффузии воды через липидные бислои [359].

Природа липидного пути обмена водой через мембрану эритроцитов

исследована в меньшей степени из-за неоднозначности получаемых результатов, вызванной присутствием холестерина. Если для искусственных липидных мембран увеличение вязкости (при включении холестерина) приводит к заметному снижению проницаемости к воде [360], то для мембран эритроцитов изменение содержания холестерина в широких пределах существенно не влияет на осмотический поток воды.

Заклячая данный раздел исследования, отметим следующее:

- разработан, базирующийся на предложенной теоретической модели, методический подход для оценки значения коэффициента проницаемости мембраны клеток для воды в области отрицательных температур при исследовании процессов вне- и внутриклеточной кристаллизации и обезвоживания эритроцитов на этапе температурной остановки ($-20 \div -30^{\circ}\text{C}$) режима двухступенчатого замораживания;
- показано, что температурная экспозиция влечет за собой качественное изменение процесса обмена воды между клеткой и окружающей ее средой, а длительность экспозиции может служить мерой обезвоженности клеток;
- для эритроцитов донора, экспериментально установленное время растворения внутриклеточных кристаллов составляет около 30 мин и слабо зависит от температуры в интервале $-20^{\circ}\text{C} \div -35^{\circ}\text{C}$. Эритроциты зимоспящих обладают большей проницаемостью их мембраны для воды;
- теоретическая модель и морфологическое исследование процессов рекристаллизации внутриклеточного льда и обезвоживания эритроцитов человека и гетеротермов на этапе температурной остановки позволили оценить коэффициент проницаемости их мембраны для воды в области отрицательных температур. Для эритроцитов донора его значение равно $0,5 \times 10^{-13} \text{ н}^{-1} \text{ м}^3 \text{ сек}^{-1}$, для эритроцитов зимоспящих сусликов – $10^{-13} \text{ н}^{-1} \text{ м}^3 \text{ сек}^{-1}$;
- добавление к эритроцитам человека пептида «триггера спячки» с м.м. 1–10 кДа модифицирует структуру их мембраны и приводит к снижению времени водного диффузионного обмена. Наибольший эффект снижения (на

25–30%) наблюдался в температурном интервале 6–27°C при конечной концентрации раствора пептида 6×10^{-7} М. В присутствии меньших (3×10^{-7} М) и больших (5×10^{-6} М) концентраций эффект снижения τ составлял 18–20 и 6–8%, соответственно. По степени проницаемости мембраны для воды эритроциты человека (Ч) и гетеротермов в трех физиологических состояниях распределились таким образом: ГС > ПС > АС > Ч.

ГЛАВА 7. ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КЛЕТОК И ИХ МЕМБРАН ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ.

7.1. Динамика ультраструктурных изменений выделенных гепатоцитов и клеток фрагментов печени крысы при различных условиях их гипотермического хранения.

Обоснование выбранного направления исследования. В последние два десятилетия вновь значительно возрос интерес к изучению закономерностей влияния гипотермии и охлаждения различной степени на состояние выделенных из организма и сохраняемых органов и тканей, в том числе печени [101, 361]. Актуальность этой проблемы обусловлена потребностью в разработке эффективных методов хранения органов для последующей трансплантации.

Гипотермия, приводящая к значительному снижению метаболизма, как в ткани в целом, так и в формирующих ее клеточных элементах, широко используется в экспериментальной и клинической практике как способ краткосрочного хранения и консервации клеток, тканей, а также органов [62, 362–364].

Еще в 70–80-х годах исследования ряда авторов [21, 25, 44, 62, 364–366] убедительно показали, что уменьшение интенсивности обменных процессов при пониженных температурах повышает устойчивость биологической системы к развивающимся гипоксии и аутолизу. Однако считается, что в связи с нарастающими в клетках деструктивными изменениями, сроки гипотермического хранения биологических объектов с сохранением ими жизнеспособности кратковременны [363, 365, 367]. В некоторых работах было отмечено, что высокая степень морфологической сохранности гепатоцитов крысы в составе фрагментов ткани и гомеостатических процессов в них наблюдалась лишь при краткосрочном (до 6 часов) хранении при 4°C [135]. В то же время в ряде работ показано, что гепатоциты в составе фрагментов ткани и выделенные из печени сохраняют

высокий уровень морфологической сохранности и жизнеспособности до 48–72 часов ГХ [63, 66, 368].

Данные многочисленных источников литературы свидетельствуют, что подбор оптимальных сред позволяет существенно увеличить сроки хранения печени в удовлетворительном состоянии и обеспечить восстановление ее функции после создания для этого оптимальных условий [24, 40, 52, 369, 370, 371]. В этой связи, исследование характера структурно-функциональных изменений, развивающихся в ткани печени на этапах ее выделения из организма и последующего хранения, является актуальным. Представляет также большой интерес и имеет общебиологическое значение изучение компенсаторно-приспособительных процессов, осуществляющихся на внутриклеточном уровне в клетках, находящихся в составе выделенных и хранящихся органов. Однако лишь незначительное количество работ посвящено электронно-микроскопическим исследованиям, позволяющим в комплексе с морфометрическим методом проводить глубокий и многосторонний анализ состояния клеток печени на этапах гипотермического хранения [366, 367, 369].

Считается, что продолжительность хранения биологического материала в жизнеспособном состоянии при 4°C в составе ткани лимитируется, как правило, несколькими часами [21, 25, 62], ядродержащих клеточных суспензий – 1–3 сутками [1, 69], а эритроцитов – 1–2 неделями [256, 371].

Хранящиеся при пониженной температуре клетки и ткани подвергаются комплексному, разнонаправленному воздействию повреждающих факторов, вызывающих качественные и количественные изменения в их функционировании. Реализуемые в условиях снижения метаболизма автономные приспособительные реакции на уровне различных систем клетки могут служить показателем лабильности или устойчивости гомеостатического процесса во времени.

Известно, что в печени, играющей ключевую роль в теплопродукции организма, осуществляется переработка значительной части энергетического и пластического материала, используемого организмом в процессе жизнедеятельности [62]. Представляется важным выяснение того, как печень, эволюционно адаптированная к функционированию в различных экстремальных условиях, будет реагировать на понижение температуры *in vitro*, а также определение «временного предела» морфологической устойчивости ее структуры к гипотермическому хранению.

В данном разделе работы нами изучено влияние различных условий длительного гипотермического хранения (во влажной камере и в жидкой фазе – среда 199) на ультраструктуру изолированных гепатоцитов и клеток печени крыс в составе фрагментов, а также последовательность деградации клеточных органелл при хранении. Предполагалось, что способ гипотермического хранения в среде 199 позволит поддерживать энергетический баланс гепатоцитов при длительном хранении и избежать обезвоживания граничных слоев фрагментов печени, что должно найти отражение в их морфологическом статусе.

В качестве объекта исследования для решения поставленной задачи были использованы изолированные гепатоциты и фрагменты печени крыс линии Вистар объемом 0,5 см³, которые для хранения помещали либо во влажную камеру (50 см³), либо в питательную среду 199 (50 см³) при температуре 4°C и хранили в течение 6, 12, 24, 48, 72 часов и 6 сут.

Целостность клеток после выделения их из ткани печени, оцененная методом витального окрашивания, которая составляла около 75%.

Хранение изолированных гепатоцитов. Исследование ультраструктуры изолированных гепатоцитов позволило установить, что значительная часть клеток после 12-часового ГХ сохраняла практически неизменным свое ультраструктурное состояние (рис. 7.1, а, б). Наблюдалась высокая степень сохранности ультраструктуры органелл, ядерной и цитоплазматической мембраны.

После 24 часов ультраструктура гепатоцитов близка к нормальной. Для митохондрий характерна округлая или овальная форма, двойная мембрана и матрикс средней электронной плотности (рис.7.1, в). Их диаметр составлял в среднем 0,4–0,7 мкм. Пузырьки и плоские цистерны комплекса Гольджи имели низкую электронную плотность. В некоторых участках клетки наблюдалась дезорганизация ЭПР. Клетки содержали некоторое число липидных капель, а также первичных и вторичных лизосом. Для данного срока характерно уменьшение числа мембранных выростов.

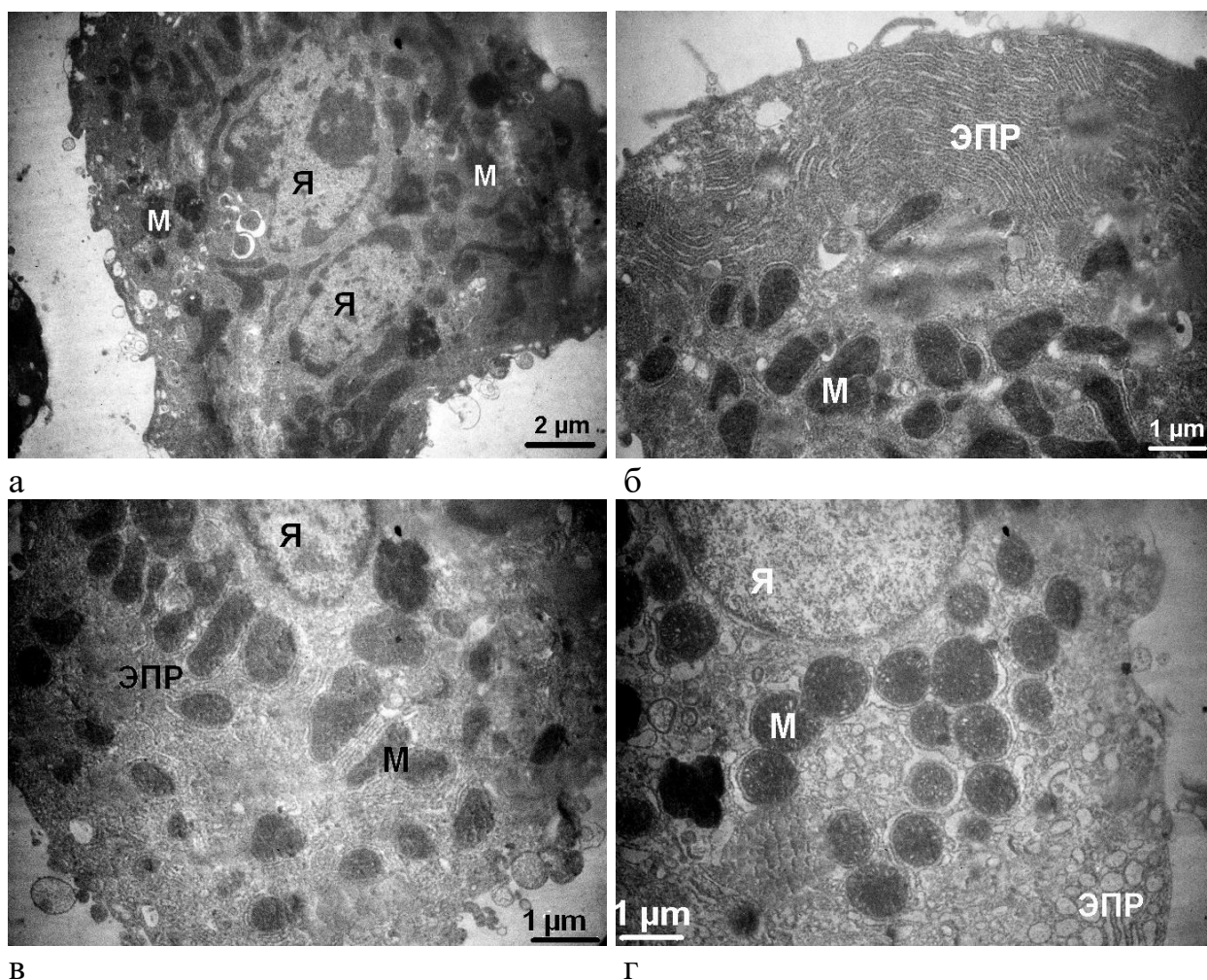


Рис. 7.1. Ультраструктурное состояние изолированных гепатоцитов после 12- (а, б), 24- (в) и 36-часового (г) гипотермического хранения в среде 199. Обозначения: Я – ядро, М – митохондрия, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Яд – ядрышко.

Начиная с 36 часов хранения, в клетках наблюдались качественные и количественные изменения параметров ультраструктуры (рис. 7.1, г; 7.2). Везикуляция ЭПР и фрагментация крист митохондрий, расширение перинуклеарного пространства мембраны и просветление матрикса ядра, уменьшение плотности цитоплазмы, полное отсутствие мембранных выростов и локальные микроразрывы мембраны (темная стрелка). Этот далеко не полный перечень изменений ультраструктуры клетки свидетельствует о нарушении барьерной функции ее мембраны, гидратации клетки, что непосредственно связано с изменением осмотического и электролитного баланса.

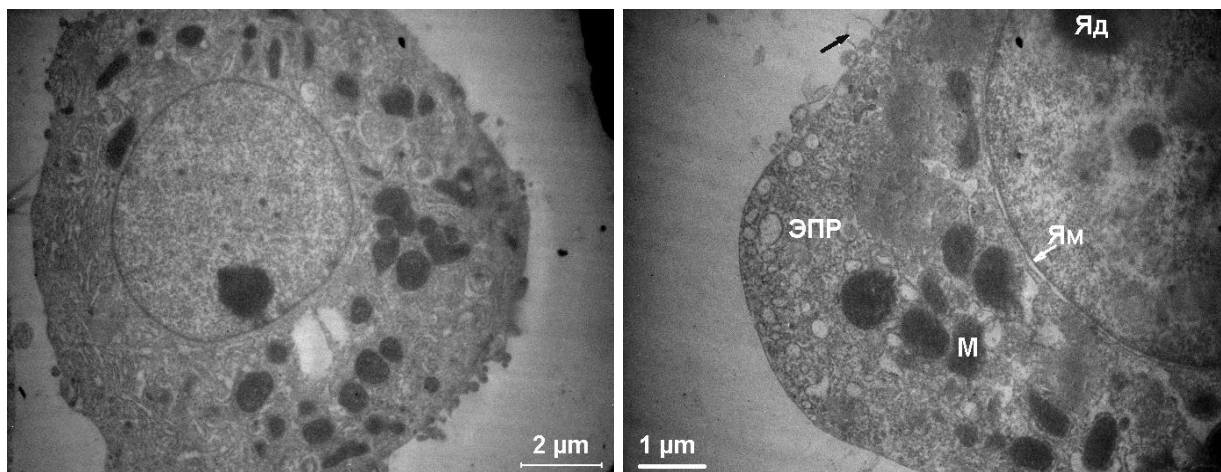


Рис. 7.2. Ультраструктурное состояние изолированных гепатоцитов после 48-часового гипотермического хранения в среде 199. Обозначения: Я – ядро, М – митохондрия, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Яд – ядрышко, Ям – ядерная мембрана.

При гипотермическом **хранении фрагментов печени** в среде 199 в течение 24 часов нами отмечено сохранение в них основных морфологических характеристик – трабекулярного строения печеночных долек и структуры микрососудистого русла. Форма гепатоцитов также не изменялась и была представлена, в основном, полигональными клетками (рис. 7.3, а, б). Их ядра светлые, округлой формы. Встречались ядра более крупных размеров с типичным, эксцентричным расположением ядрышек. В

просветленной цитоплазме хорошо идентифицируются ее органоиды в виде мелких глыбок. Просветы центральных вен и сосуды портальных трактов заполнены форменными элементами крови. Синусоиды четко выражены, в некоторых из них содержится скопление эритроцитов. Эндотелий сосудов без видимых изменений.

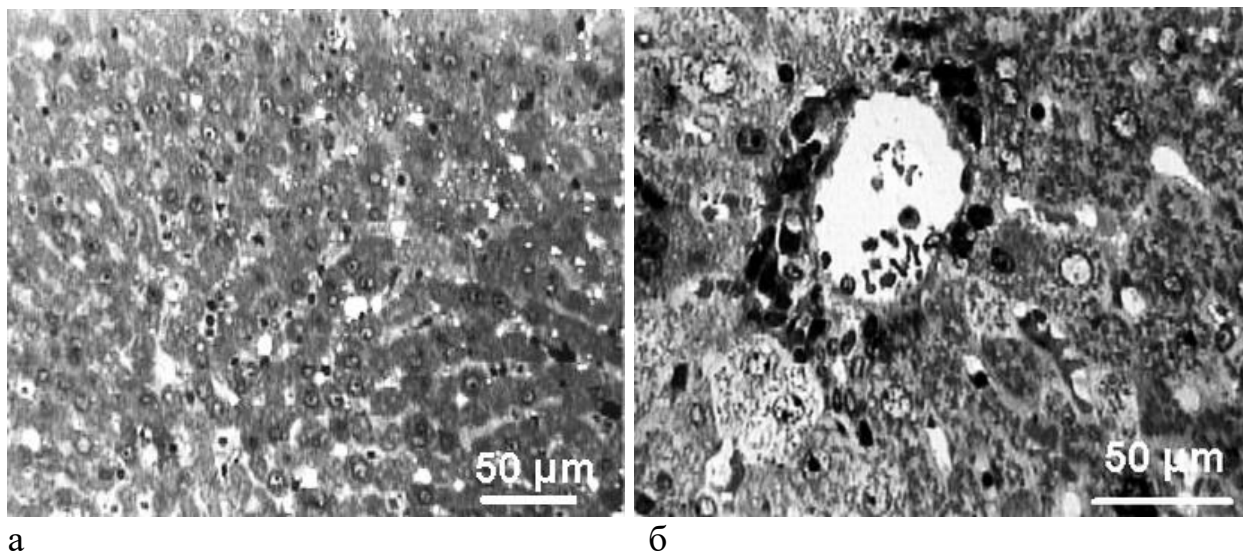


Рис.7.3. Морфологическое состояние фрагментов печени после 24 ч ГХ в среде 199: а – трабекулярное строение печеночных долек; б – структура микрососудистого русла.

Ультраструктурный анализ гепатоцитов подтверждает сохранность всех клеточных структур, а также тесную связь элементов белоксинтезирующей и энергообеспечивающей систем клетки: мембраны ЭПР непосредственно контактируют с митохондриями и ядром. Форма гепатоцитов и межклеточные контакты остаются неповрежденными. Ядро, как одна из наиболее устойчивых клеточных органелл, в данных условиях полностью сохраняет свою структуру (рис. 7.4, а). В цитоплазме гранулярный ЭПР представлен узкими канальцами, окружающими митохондрии, и параллельными цистернами, которые сосредоточены, главным образом, в околядерной зоне. Агранулярный ЭПР в виде небольших везикул и сравнительно коротких трубочек распределен по всей цитоплазме.

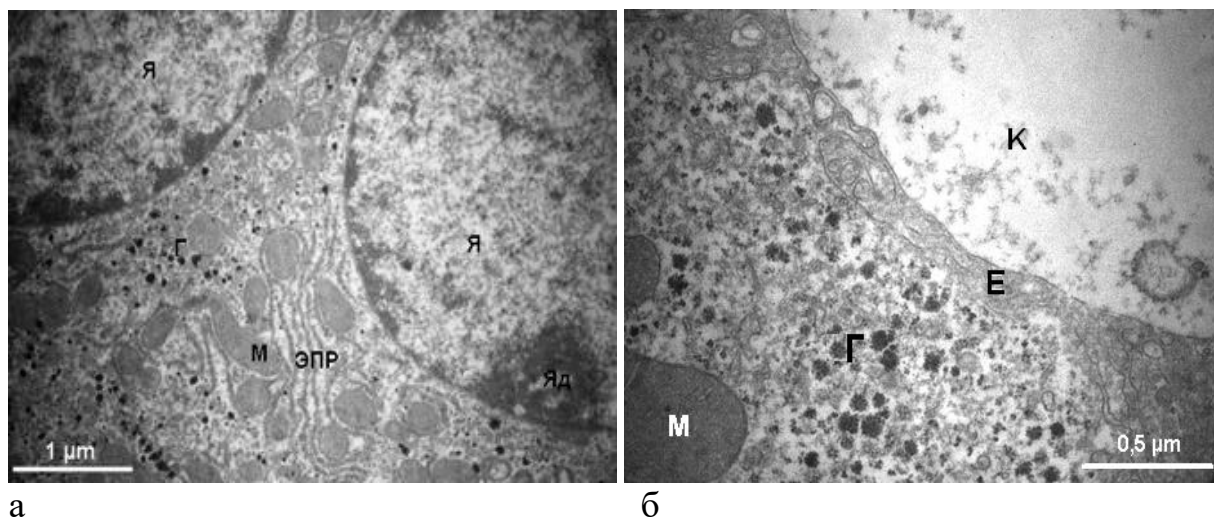


Рис. 7.4. Ультраструктура фрагмента двуядерного гепатоцита (а) и состояние синусоидного капилляра (б) после 24 ч гипотермического хранения фрагментов печени в среде 199. Обозначения: Я – ядро, М – митохондрия, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Г – розетки гликогена, Яд – ядрышко, Е – эндотелий, К – просвет капилляра.

Ультраструктура митохондрий близка к нормальной. Для них характерна округлая или овальная форма, четкая двойная мембрана и матрикс средней электронной плотности со слабовыраженными кристами, диаметр которых составлял, в среднем, 0,5–0,6 мкм. Аппарат Гольджи состоит из пузырьков и плоских цистерн, содержимое которых имеет низкую электронную плотность. Гликоген в виде скоплений гранул и розеток рассредоточен по всей цитоплазме. Выявляется некоторое число липидных капель, а также лизосом, которые представлены как первичными, так и вторичными структурами. Эндотелий синусоидных капилляров, как и в норме, представлен уплощенными эндотелиоцитами (рис. 7.4, б) с широкими порами и фенестрами в их периферических отростках, а также печеночными макрофагами. Желчные капилляры и пространство Диссе содержат хорошо выраженные микроворсинки, образованные цитолеммой гепатоцитов.

Морфологическое исследование ткани печени, хранившейся 24 часа при 4°C во влажной камере, показало, что архитектоника ткани печени также

значимо не изменяется. Сохраняется трабекулярное строение печеночных долек (рис. 7.5, а), которые радиальными тяжами располагаются вокруг центральных вен. У гепатоцитов периферийной части дольки границы имеют менее четкие контуры (рис. 7.5, б). Синусоиды в этих местах несколько сужены, хотя ближе к центральной вене они имеют типичное строение и заполнены хлопьевидным содержимым, а некоторые из них – клеточными элементами крови. Часть синусоидов заполнены тромбоподобными образованиями. Для гепатоцитов характерна полигональная форма, их ядра светлые, округлые, хотя некоторые имеют извилистый контур. Цитоплазма уплотнена и имеет мелкозернистую структуру, что указывает на ее частичную дегидратацию.

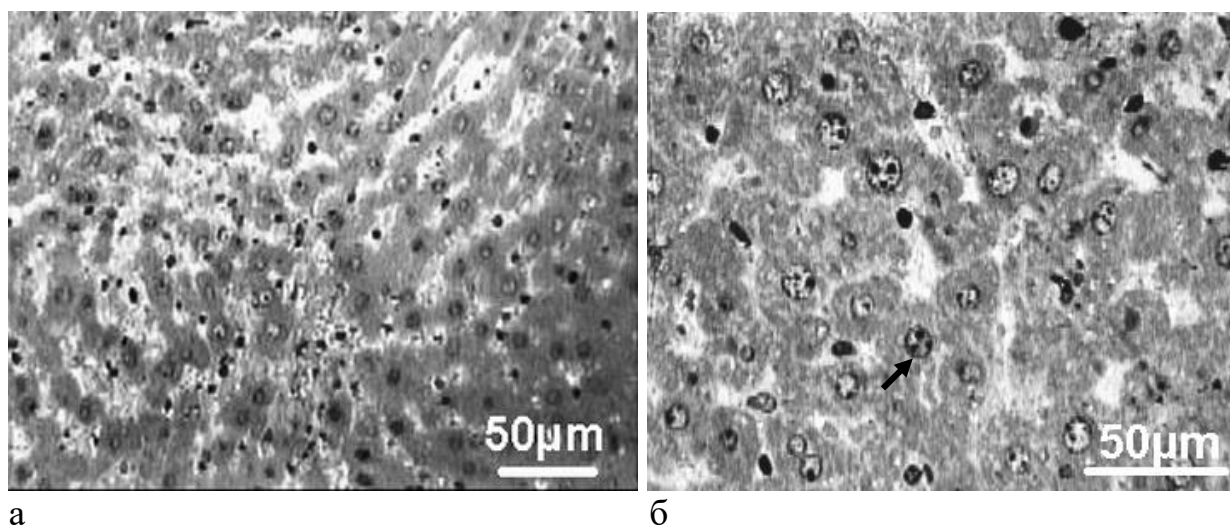


Рис. 7.5. Морфологическое состояние фрагментов печени после 24 ч ГХ во влажной камере: а – трабекулярное строение печеночных долек; б – морфология гепатоцитов.

Электронно-микроскопический анализ клеток печени не выявил существенных изменений в структуре ядра гепатоцитов за исключением незначительного расширения ядерных пор. Отличительной особенностью ультраструктуры при данных условиях хранения является набухание митохондрий, проявляющееся в просветлении матрикса и незначительном увеличении их размеров, – изменениях, в большей степени характерных для гепатоцитов периферийной части дольки (рис. 7.6).

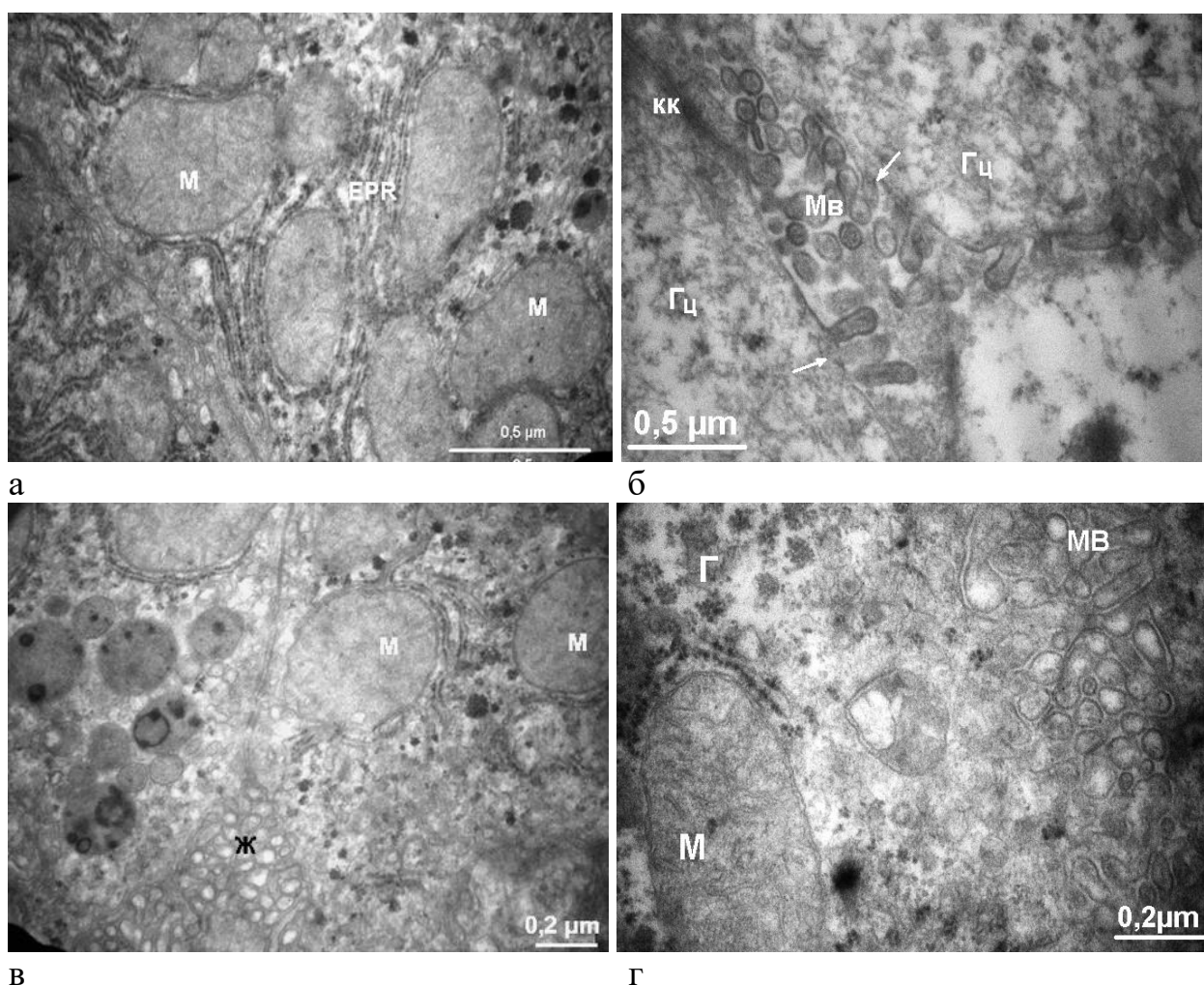


Рис. 7.6. Ультраструктура фрагмента цитоплазмы гепатоцита (а) и участки периферической части гепатоцитов (Гц), обращенных в пространство Диссе (б) и образующих желчный капилляр (в, г), после 24 ч ГХ во влажной камере. Обозначения: ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Г – розетки гликогена, М – митохондрии, Ж – желчный капилляр, Мв – микроворсинки, КК – клеточный контакт.

В то же время целостность обеих митохондриальных мембран, крист и тесная связь этих органелл с цистернами ЭПР свидетельствует о сохранении ими энергопродуцирующих функций (рис. 7.6, а, б, в). На мембранах ЭПР рибосомы размещены, в основном, равномерно, однако в некоторых участках цитоплазмы наблюдаются их небольшие скопления.

Структура аппарата Гольджи без видимых изменений. Гепатоциты содержат розетки гликогена, незначительное количество липидных

включений и лизосомоподобных телец. Для периферии дольки характерны синусоиды с более узким просветом. Эндотелий синусоидов сохранен и содержит четко выраженные фенестры и поры. Ультраструктура клеток Купфера близка к нормальной.

После 48 часов гипотермического хранения фрагментов печени во влажной камере гепатоциты характеризуются большим разнообразием формы – от типичной полигональной, до округлой, при сохранении балочной структуры печеночной дольки (рис 7.7, а). Просвет центральной вены незначительно сжат. В области триад хорошо выражена структура стенок артерии, вены и желчного протока. Просветы синусоидов имеют четкие границы, умеренно расширены и заполнены хлопьевидным материалом или эритроцитарной массой (рис. 7.7, а). В большей части синусоидов присутствует эндотелиальная выстилка и округлые клетки Купфера. Хорошо идентифицируются веретенообразной формы ядра эндотелиоцитов.

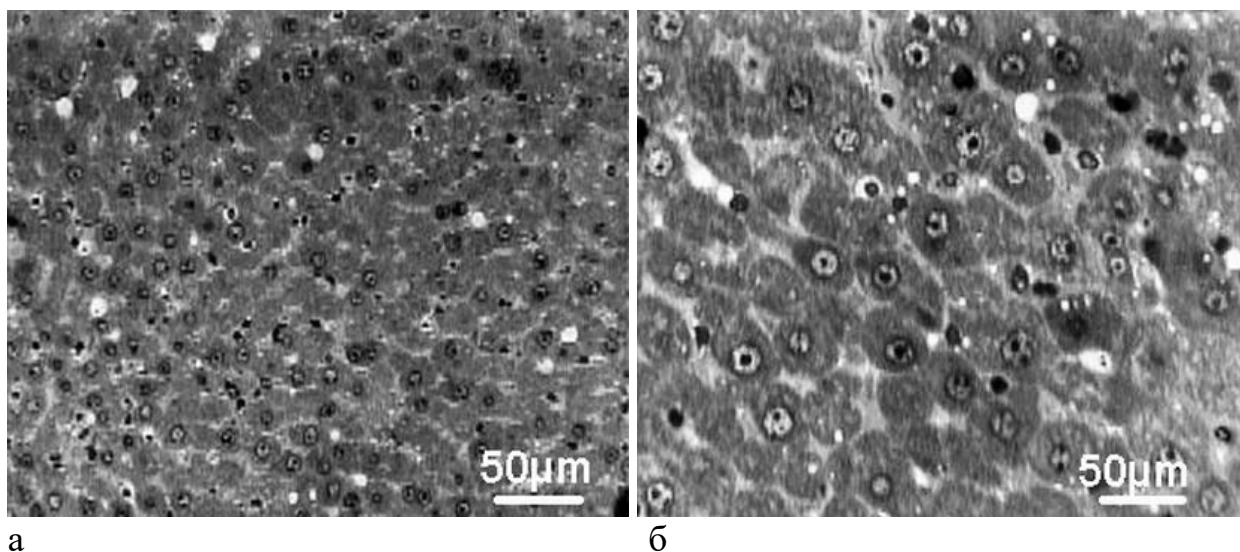


Рис.7.7. Морфологическое состояние фрагментов печени после 48 ч ГХ во влажной камере: а – сохранение трабекулярного строения печеночных долек; б – морфология гепатоцитов и синусоидов.

В то же время, примерно у 20% синусоидов эндотелиальная выстилка отсутствует. Гепатоциты имеют светлые, более крупные, по сравнению с предыдущим сроком хранения, ядра, что может быть связано с их отечностью. Объемная доля гетерохроматина незначительно возрастает

параллельно с просветлением и разрыхлением нуклеоплазмы, а также незначительным расширением ядерных пор (рис. 7.8, а, г). Ядрышки располагаются в центре ядра, их структура не претерпевает существенных изменений. Цитолемма гепатоцитов сохраняет свою целостность, однако большинство образованных ею ворсинок желчных капилляров набухает и уменьшается в размерах.

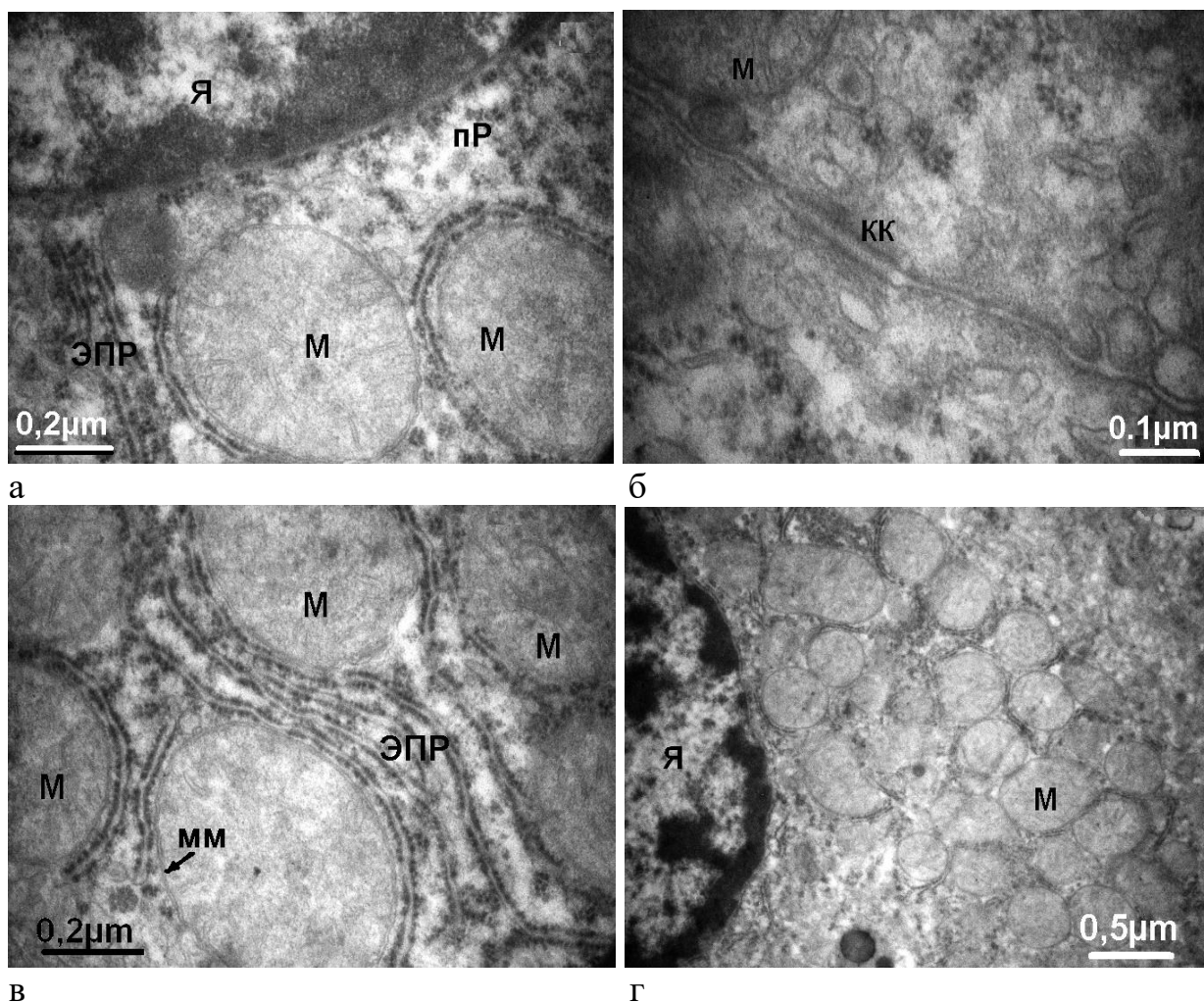


Рис. 7.8. Ультраструктура гепатоцитов после 48 ч ГХ фрагментов печени во влажной камере: а – зона ядра; б – сохранность межклеточных контактов; в, г – сохранение топологической связи ЭПР с митохондриями. Обозначения: М – митохондрии; мм – мембрана митохондрии; пР – полирибосомы; КК – клеточный контакт; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Я – ядро.

Для части гепатоцитов характерна изрезанность контура ядра без нарушения ширины перинуклеарного пространства. Цитоплазма гепатоцитов гомогенно-мелкозернистая, в ней появляются разной величины вакуоли и жировые капли. У некоторых митохондрий наблюдается просветление матрикса с сохранением структуры крист. Вместе с тем, обнаруживаются и митохондрии с нарушением целостности обеих митохондриальных мембран.

Следует также отметить, что у значительной доли гепатоцитов структура ЭПР, а также его топологическая связь с митохондриями и кариолеммой не нарушаются (рис 7.8, в, г).

Аппарат Гольджи сохраняет свое классическое строение в виде уплощенных цистерн и мелких пузырьков. В структуре цитоплазмы в пространстве между митохондриями наблюдается появление полирибосом.

После 48-часового гипотермического хранения фрагментов печени в среде 199 балочная структура печеночной дольки все еще хорошо выражена (рис. 7.9, а). В структуре ткани отмечается сохранность плотных контактов (десмосом) и желчных капилляров.

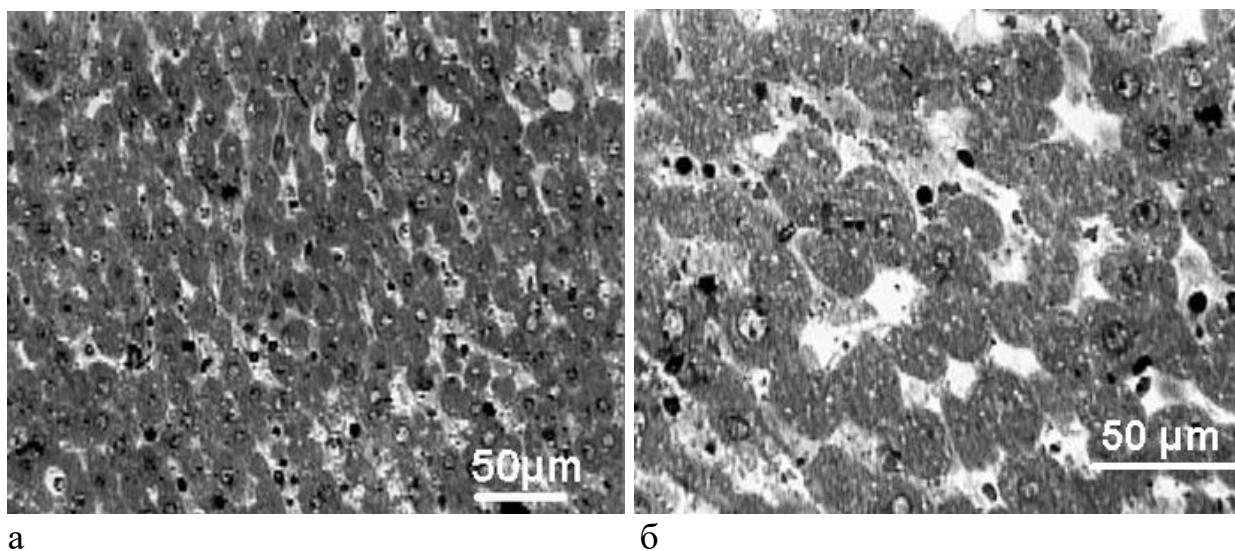


Рис. 7.9. Морфологическое состояние фрагментов печени после 48 ч ГХ в среде 199: а – сохранность трабекулярного строения печеночных долек; б – структура микрососудистого русла.

В отличие от хранения фрагментов печени во влажной камере, при хранении в среде 199 просветы синусоидов более расширены, содержат

хлопьевидный материал, а в некоторых – разрушенные клетки эндотелиоцитов. В то же время, в абсолютном большинстве синусоидов хорошо просматриваются ядра эндотелиоцитов веретенообразной формы и округлые клетки Купфера.

В этом сроке хранения более выражено разрыхление ткани, чем при 24-часовом, и в большей степени встречаются поврежденные клетки (рис. 7.9, б). Основная масса гепатоцитов имеют округлую или овальную форму, более светлые ядра и целостность цитолеммы. Ядра клеток имеют сходные ультраструктурные характеристики, что и при хранении фрагментов печени во влажной камере. Увеличение размеров ядер (на 5–10 %) по сравнению с 24-часовым сроком хранения в жидкой фазе вызвано их гидратацией. Возрастание объемной доли гетерохроматина в одних ядрах происходило параллельно с просветлением и разрыхлением нуклеоплазмы у других (рис. 7.10, а, б). Одно или два ядрышка располагаются в центре ядра, их структура не претерпевает существенных изменений.

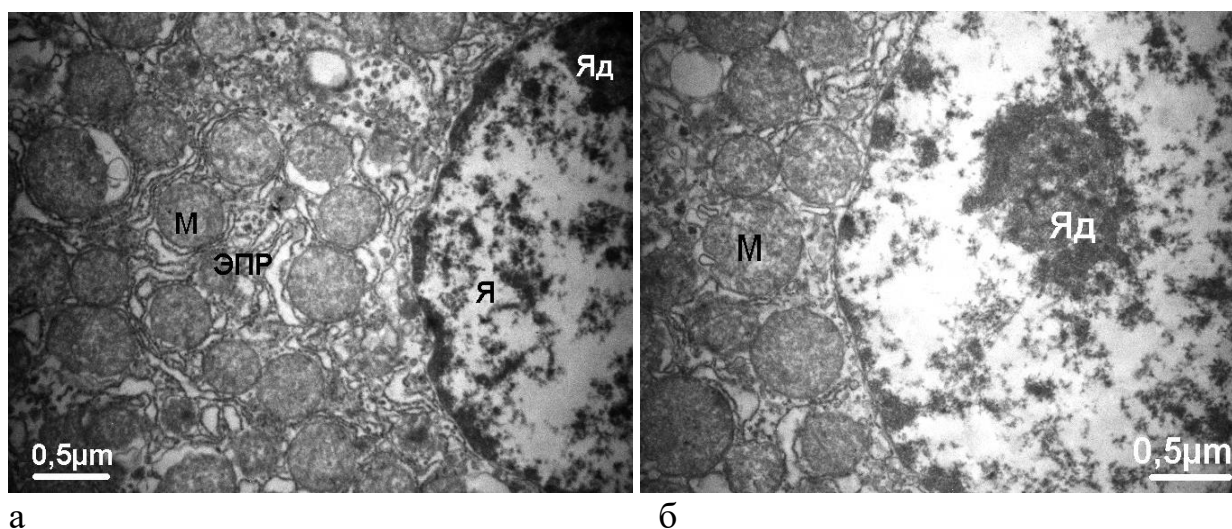


Рис. 7.10. Ультраструктура фрагмента гепатоцита после 48 ч ГХ в среде 199. Обозначения: Я – ядро, М – митохондрия, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Яд – ядрышко.

При 48-часовом хранении в среде 199 в структуре цитоплазмы и ее органеллах наблюдаются более существенные и более динамичные изменения, в первую очередь, затрагивающие митохондрии и ЭПР. У

митохондрий – их набухание, просветление матрикса и дезорганизация крист. У ЭПР – фрагментация, вакуолизация и расширение цистерн, уменьшение количества рибосом (рис. 7.10, б). Количество гликогена в цитоплазме гепатоцитов значительно уменьшается, что сопровождается появлением обширных просветленных участков цитоплазмы. В межклеточном пространстве встречаются отдельные, крупные вакуоли.

Таким образом, к 48 часам гипотермического хранения динамика морфологических изменений ткани печени, хранящейся в среде 199, проявлялась в большей степени, по сравнению с хранением ткани во влажной камере.

Гипотермическое хранение фрагментов печени в течение 72 часов в обоих вариантах эксперимента приводит к значительным, часто разнонаправленным, изменениям в структуре ткани и клеток (рис. 7.11, б). Это проявляется не только в изменении ее основных морфологических характеристик – балочном строении печеночных долек (рис. 7.11, а, в) и структуре микрососудистого русла (рис. 7.11, б, г), но и в ультраструктуре клеток.

Как и в предыдущие сроки, хранение во влажной камере приводит к уплотнению структуры ткани, в отличие от среды 199, где в большей степени наблюдается ее разрыхление. Изменение формы ядра при сохранении узкого перинуклеарного пространства и возрастание доли гетерохроматина, образующего заметные скопления вблизи внутренней ядерной мембраны и ядрышка, характерны для обоих условий хранения.

При данном сроке хранения происходит частичная деструкция мембран гранулярного ЭПР, что наблюдается в виде локального расширения и набухания цистерн, их фрагментации и образования большого количества гладкоконтурных везикул (рис. 7.12, а–в). Значительно возрастает гетерогенность формы митохондрий, их контуры становятся извилистыми. Внутреннее содержимое дезорганизовано. В отличие от среды 199, при хранении во влажной камере из-за дегидратации клеток отмечается

уплотнение матрикса цитоплазмы и митохондрий, что приводит к изменению их формы и размера, а также взаимному сдавливанию (рис. 7.12, в, г).

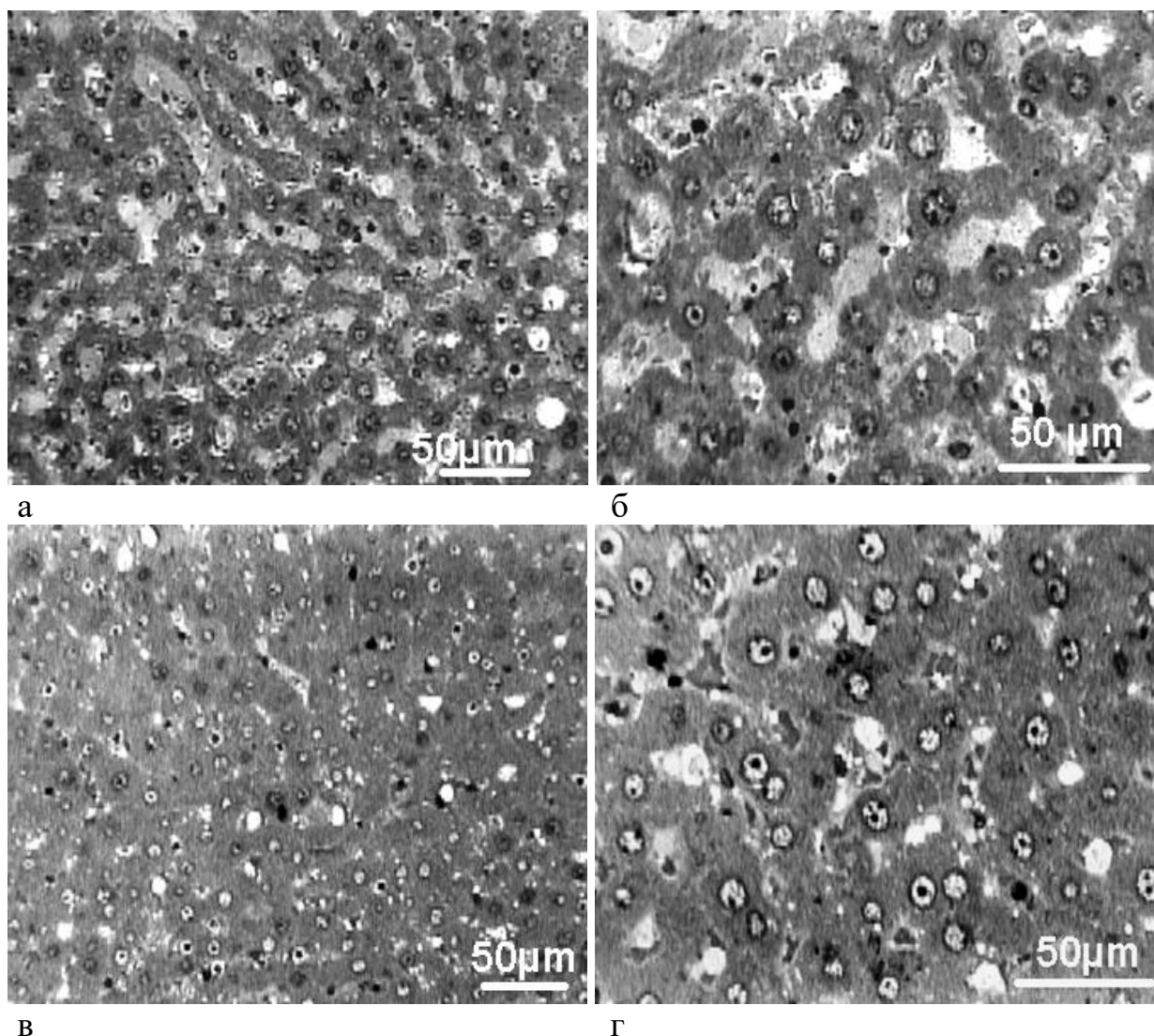


Рис. 7.11. Морфологическое состояние фрагментов печени после 72 ч ГХ в среде 199 (а, б) и во влажной камере (в, г): а, в – степень сохранности трабекулярного строения печеночных долек; б, г – морфологическое состояние гепатоцитов и синусоидов.

Между скоплениями митохондрий, а также вблизи ядра в цитоплазме располагаются розетки гликогена и фрагменты ЭПР (рис. 7.12, в, г). Отмечается гиперплазия комплекса Гольджи. Выстилка сосудов портального тракта и большинство эндотелиальных клеток синусоидов набухают, что приводит к сжатию их просветов (рис. 7.11, в, г).

Таким образом, гипотермическое хранение фрагментов печени в течение 72 часов вызывает существенные морфологические изменения в структуре печени, находящейся как во влажной камере, так и в среде 199.

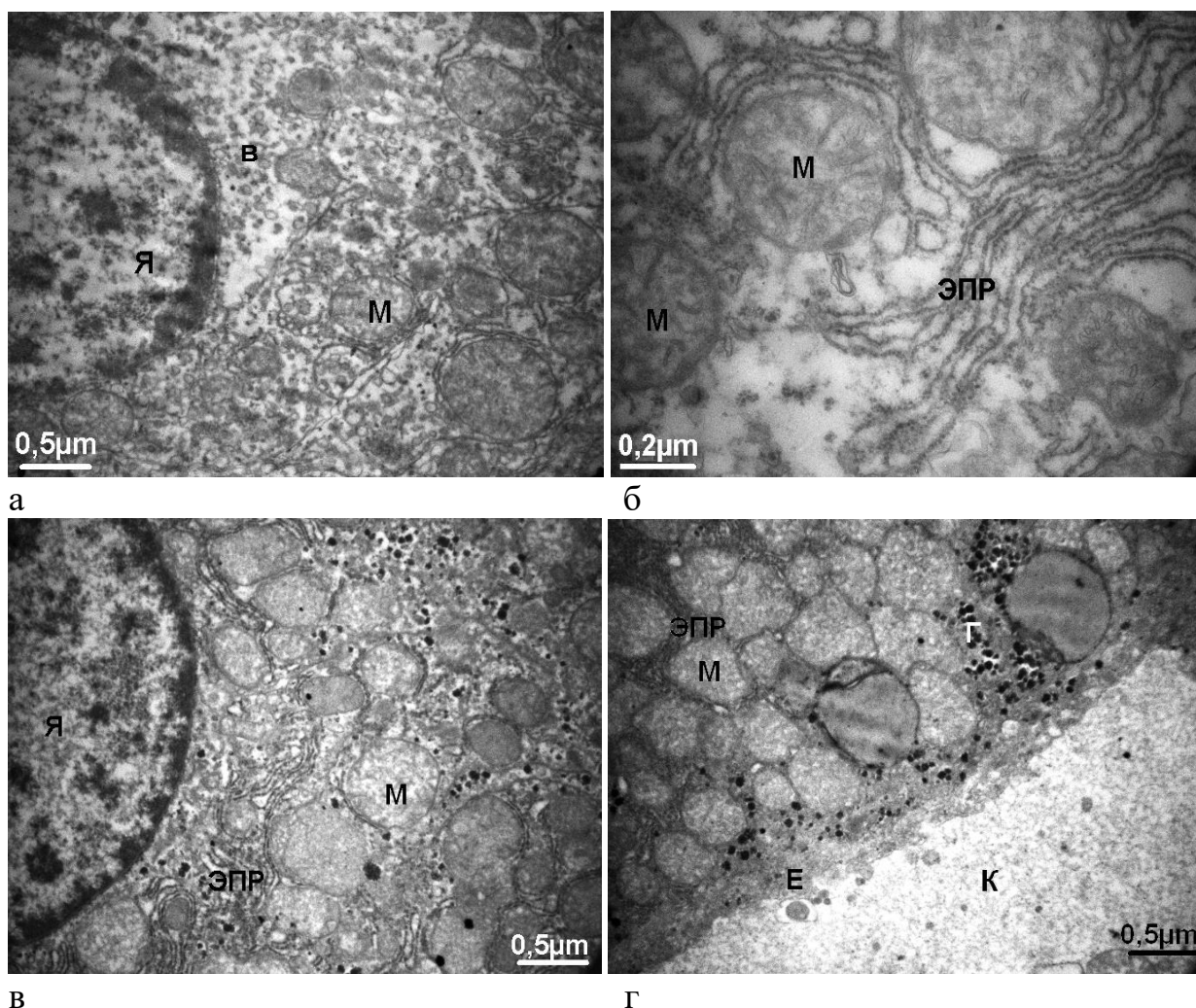


Рис. 7.12. Ультраструктура фрагмента гепатоцита (а–в) и состояние синусоидного капилляра (г) после 72 ч ГХ в среде 199 (а, б) и во влажной камере (в, г). Обозначения: Я – ядро, М – митохондрия, Г – розетки гликогена, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Е – эндотелий, К – просвет капилляра, в – везикулы ЭПР.

Увеличение сроков хранения во влажной камере до 6 сут вызывает дальнейшие изменения практически всех структурных компонентов ткани и клеток. Полностью нарушена балочная структура печеночной ткани. Границы клеток не определяются. Ядра светлые, с изрезанными контурами. Форма меняется от округлых до вытянутых. Цитоплазма рыхлая, с вакуолями

и жировыми каплями разных размеров. Стенки сосудов порталных трактов и соединительнотканной прослойки вакуолизированы. Прилежащие к ним клетки разрушены. Просветы синусоидов не определяются. Относительные нарушения более выражены в структуре ядра гепатоцитов, тогда как степень повреждения органоидов цитоплазмы в меньшей степени отличается от 72-часового хранения.

При хранении в среде 199 в течение 6 суток наблюдается значительная деструкция и дезорганизация всех субклеточных структур гепатоцитов, наряду с дальнейшей гидратацией цитоплазмы. В сосудистых компонентах ткани повреждения проявляются в виде отека стенок, десквамации эндотелия. Ядра гепатоцитов округлой формы. В цитоплазме возрастает доля вакуолей и жировых капель. Таким образом, после 6 суток гипотермического хранения фрагментов печени во влажной камере и среде 199 происходит дальнейшая деструкция структуры ткани, независимо от условий и состава среды. В большей степени изменениям подвергаются сосудистые компоненты клетки.

Заключая данный фрагмент работы, необходимо отметить, что проведенные нами морфологические исследования показали, что краткосрочное (до 24 ч) гипотермическое хранение фрагментов печени в жидкой фазе (среда 199) обеспечивает более высокий, по сравнению с влажной камерой, уровень сохранности ультраструктуры клеток, что позволяет говорить об обратимости наблюдаемых изменений. Начиная с 48 ч, аутолитические процессы в ткани печени во влажной камере протекают медленнее, чем в жидкой фазе. Пролонгация сроков хранения до 72 ч и далее приводит к частичной деструкции всех клеточных компонентов ткани, независимо от условий хранения. Исследование реакции ткани и ее ядродержащих клеток на длительное гипотермическое хранение позволило проследить последовательность деградации клеточных органелл при хранении. По степени устойчивости к действию гипотермии внутриклеточные органеллы гепатоцитов распределились следующим

образом: митохондрии $\geq$ эндоплазматическая сеть $>$ ядерный аппарат. Наблюдаемое уплотнение структуры клеток при 48-часовом ГХ фрагментов печени во влажной камере и разрыхление структуры при ГХ в жидкой фазе необходимо учитывать при разработке методов перфузии органов.

7.2. Морфологическое состояние нативной и криоконсервированной плаценты человека в норме и после гипотермического хранения

Плацента человека, являясь важнейшей структурно–функциональной единицей в системе «мать–плод», остается в центре внимания морфологов и клиницистов. Возникнув на высшей степени эволюции, плацента относится к гемохориальному типу и наиболее полно осуществляет анатомо–физиологическую связь между матерью и плодом [372, 373].

Функции плаценты многообразны: через нее происходит газообмен и транспорт питательных веществ, выведение продуктов метаболизма плода [374, 375]. Синтезируя многие гормоны с участием материнских и плодовых предшественников, плацента обеспечивает функцию иммунной защиты, способствует развитию и дифференцировке иммунокомпетентной системы плода [376, 377]. Даже краткий анализ выполняемых функций свидетельствует, что плацентарная ткань является морфологическим образованием, имеющим значительную клеточную гетерогенность и васкуляризацию. Функционирование плаценты в качестве железы внутренней секреции, содержащей и синтезирующей биологически активные вещества, гормоны, ферменты, также является наглядным подтверждением ее сложного морфологического состава.

Многочисленные биологически активные вещества, содержащиеся в ее структуре, нашли применение в практической медицине в виде экстрактов, взвесей и фрагментов ткани [378, 379]. Возникающая потребность в длительном хранении фрагментов ткани плаценты в настоящее время обеспечивается с помощью методов низкотемпературного консервирования. В то же время для получения препаратов из ткани плаценты широко

используется ее краткосрочное хранение при гипотермических (4°C) температурах. Несмотря на многочисленные морфологические исследования ткани плаценты при различных патологических состояниях [380–384], в литературе отсутствуют данные о степени сохранности ее структуры при длительном гипотермическом воздействии.

Целью данного фрагмента работы было исследование структурного состояния нативной и криоконсервированной тканей фетоплацентарного комплекса при гипотермическом хранении.

Данные исследования могут представлять интерес при сравнительном анализе реакции тканей различного структурно–функционального статуса (печень, плацента) на длительное гипотермическое воздействие.

Объектом исследования служили фрагменты плацент, полученных после операции «кесарево сечение» у здоровых женщин с нормально протекающей беременностью. Материал для исследований брался из центральной и краевой зон вне видимых патологических очагов в первые минуты после извлечения последа.

Для гипотермического хранения (1 и 2 суток) кусочки ткани помещали во влажную камеру (закрытая чашка Петри, объемом 15 см^3) при температуре 4°C .

7.2.1. Ультраструктура плаценты в исходном состоянии.

При микроскопическом исследовании плацент контрольной группы идентифицируются все основные компоненты плодной и материнской частей органа. Основа плодной части состоит из амниотической оболочки, покрытой однослойным призматическим эпителием равномерной толщины. Клетки имеют четкие границы, их цитоплазма базофильна, а ядра имеют овальную форму с плотными глыбками хроматина. Базальная мембрана состоит из рыхлой соединительной ткани, непосредственно переходящей в массивные пучки коллагеновых волокон хориальной пластинки (рис. 7.13, а).

Ворсины хориона имеют четкий синцитиальный покров, представляющий собой базофильную кайму с гиперхромными глыбчатыми ядрами, расположенными в один или несколько рядов (рис. 7.13, б), а также скопления ядер в виде узелков.

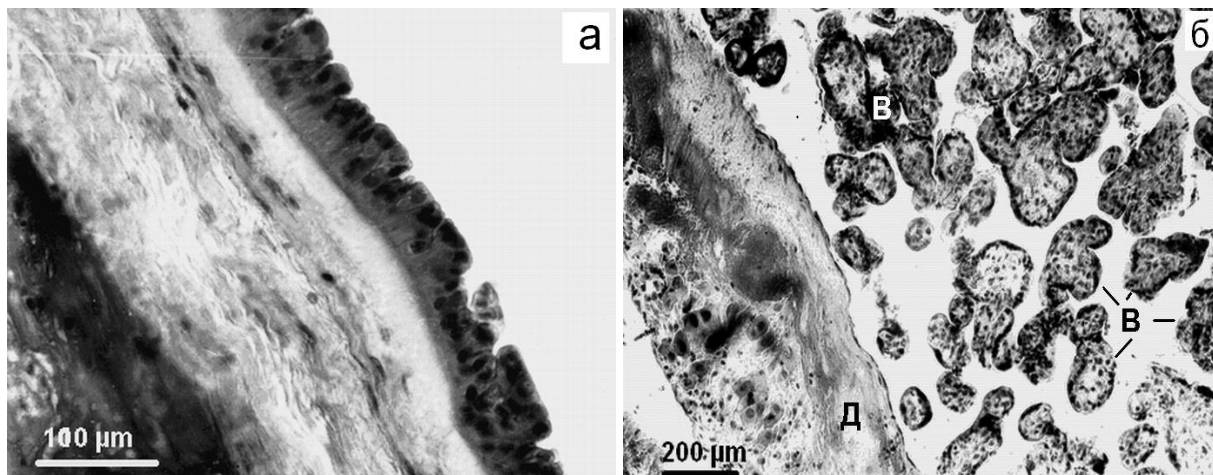


Рис. 7.13. Структура различных участков ткани плаценты в исходном состоянии: а – амниотическая оболочка; б – ворсинки (В) материнской части и децидуальный слой (Д) плаценты.

В децидуальном слое выявляются две разновидности клеток. Крупные одно- или двухядерные клетки, тесно прилегающие друг к другу. Ядра этих клеток овальные, а цитоплазма – низкой электронной плотности. Мелкие децидуальные клетки, веретенообразной или звездчатой формы, имеют хаотическое распределение.

Строма ворсин содержит большое количество фибробластоподобных клеток, расположенных в густой сети коллагеновых волокон. В структуре микроциркуляторного русла ворсин встречаются многочисленные сосуды и капилляры разнообразной формы. Лишь незначительные участки межворсинчатого пространства содержат скопления эритроцитов или заполнены фибриноидной субстанцией.

По данным электронной микроскопии, у ворсин хориона зрелой плаценты в исходном состоянии на поверхности синцитиотрофобласта, обращенной к материнскому кровотоку, имеются многочисленные

миковорсинки в виде нитевидных отростков средней электронной плотности. Некоторые из них обладают терминальным расширением. Синцитий (симпласт) охватывает всю поверхность ворсины и представляет собой единую синцитиоплазматическую массу. Цитоплазма синцития отделена от межворсинчатого пространства элементарной, внешней оболочкой, имеющей многочисленные, средней электронной плотности, нитевидные выросты – миковорсинки. Толщина данного слоя существенно варьирует и определяется, в значительной степени, наличием в нем ядер и клеток Ланганса. В структуре синцития по характеру распределения ядер выделяются безъядерные фрагменты со значительным истончением цитоплазмы, участки с монослойным их распределением и полинуклеарные зоны, с характерным скоплением плотно прилегающих друг к другу ядер полигональной формы (рис. 7.14, а). Наружная и внутренняя ядерные мембраны имеют четкие контуры с узким перинуклеарным пространством равномерной ширины. Диффузный хроматин рассеян по всей нуклеоплазме, его глыбчатые скопления наблюдаются вдоль внутренней ядерной мембраны, а также небольшими островками распределены по всему объему ядра (рис. 7.14, а). В ядрах синцитиотрофобластических почек преобладает гетерохроматин. Вблизи безъядерных зон часто можно видеть расширенные капилляры стромы.

Для митохондрий синцития также характерна вариация по форме, размерам, их числу и внутренней структуре. В основном, они имеют овальную или округлую форму. Матрикс их светлый или умеренной электронной плотности с единичными четкими кристами.

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) синцития сильно полиморфен, гетерогенен по форме, размерам и плотности распределения его элементов в различных участках. Гранулярный ЭПР представлен узкими или резко расширенными цистернами, на которых равномерно располагаются многочисленные рибосомы. Агранулярный ЭПР имеет вид гладкоконтурных пузырьков (рис. 7.14, б).

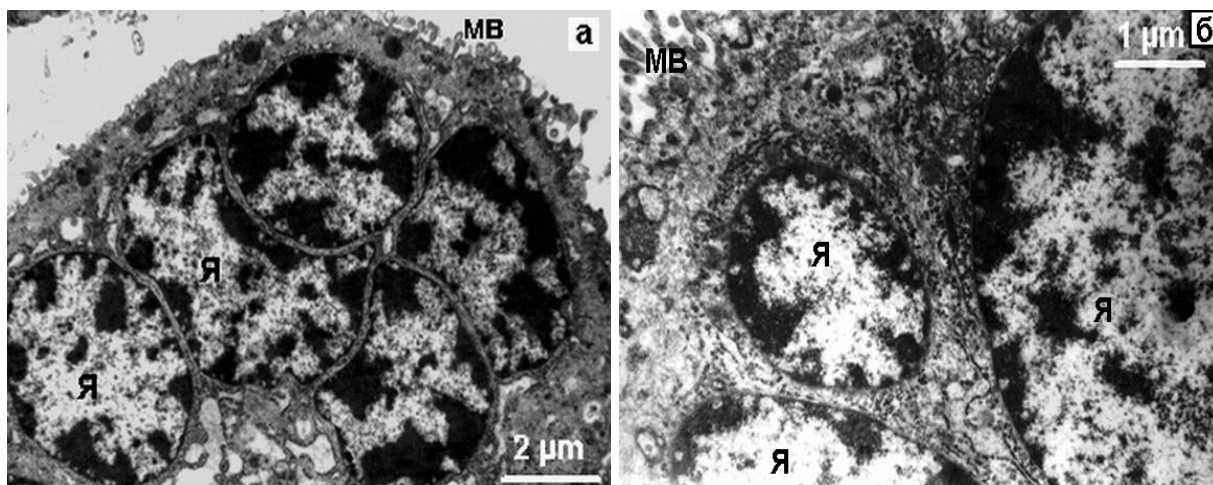


Рис. 7.14. Ультраструктура различных участков синцитиального слоя плаценты в исходном состоянии: а – скопление ядер синцития; б – истончение синцитиального слоя. Обозначения: Я – ядра, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, МВ – микроворсинки.

Аппарат Гольджи встречается часто и имеет типичное строение – гладкостенные цистерны, окруженные мелкими зернистыми гранулами и пузырьками. Вдоль апикальной поверхности синцития в цитоплазме обнаруживаются большое количество различных по величине пиноцитозных пузырьков и вакуоли с хлопьевидным содержимым, размер которых увеличивается по мере приближения к базальной мембране. Синцитий также содержит небольшое количество хаотически распределенных мелких липидных включений и лизосом, ограниченных одноконтурной мембраной.

Между синцитием и базальной мембраной располагаются единичные клетки цитотрофобласта (клетки Ланганса), характеризующиеся низкой электронной плотностью ядра и цитоплазмы. По своей ультраструктуре они не однотипны. Встречаются клетки, практически не имеющие органелл, а также клетки с множеством везикулоподобных элементов ЭПР. Ядра этих клеток значительно крупнее синцитиальных, имеют округлую форму, с характерным строением ядерной оболочки. Гетерохроматин концентрируется вдоль внутренней ядерной оболочки, плотно контактируя с ней. В средней части ядра хроматин располагается диффузно, хотя и здесь встречаются небольшие сгущения ядерного материала. В цитоплазме обнаруживаются

немногочисленные митохондрии продолговатой формы с матриксом различной плотности и четкими кристами. Размеры митохондрий значительно крупнее митохондрий синцития. В непосредственной близости от митохондрий располагаются расширенные цистерны гранулярного ЭПР (рис. 7.15, а).

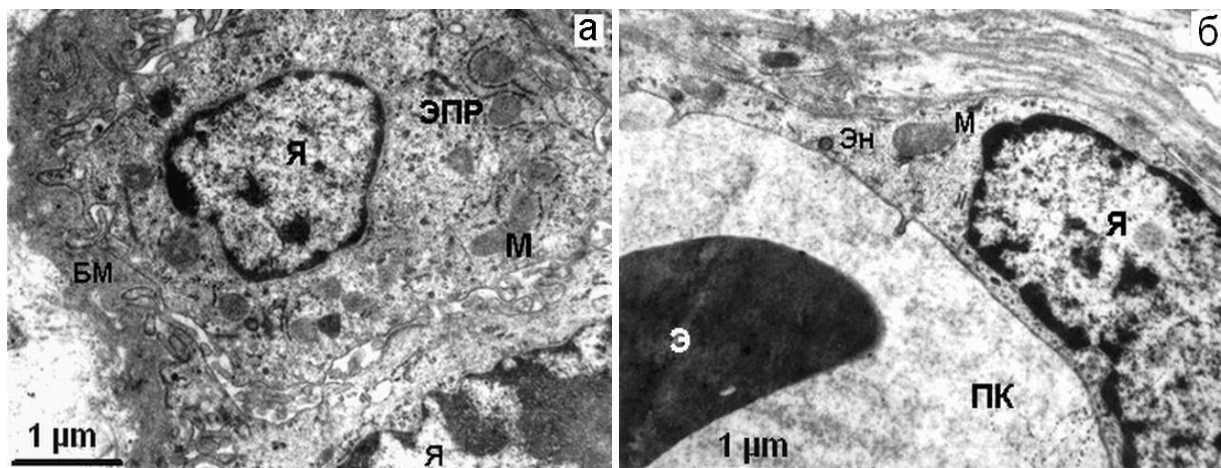


Рис. 7.15. Элементы структуры микроворсинки в норме: а – ультраструктура цитотрофобласта в исходном состоянии; б – фрагмент fetalного капилляра. Обозначения: Я – ядро, М – митохондрии, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Эн – эндотелиоцит, Э – эритроцит в просвете капилляра (ПК), БМ – базальная мембрана.

Подэпителиальная базальная мембрана, как правило, имеет вид полосы гомогенного вещества умеренной электронной плотности и неравномерной толщины, в которой иногда определяется тонковолокнистая структура. В ней часто встречаются фрагменты с разрыхленной структурой. Для зрелой плаценты характерно возрастание числа капилляров, просветы которых расширены и содержат умеренное количество эритроцитов. Уплощенные эндотелиальные клетки образуют стенки капилляров, вокруг которых располагается собственная базальная мембрана. К наружной поверхности базальной мембраны большинства наблюдаемых капилляров примыкают перициты. Эндотелиальные клетки, в основном, сохраняют свои

ультраструктурные особенности, однако количество выростов люминальной мембраны увеличивается (рис. 7.15, б).

Значительно реже в структуре ворсин представлены клетки Кащенко–Гофбауэра, имеющие крупные размеры. Их цитоплазма содержит единичные митохондрии и слабо развитый ЭПР, а также мелкие пузырьки, гранулы и вакуоли, дополняющие ультраструктурную картину данных клеток.

В строме ворсин среди клеточных элементов преобладают фиброциты. Они окружены пучками коллагеновых волокон, имеют удлинённую веретенообразную форму. Их цитоплазма содержит небольшое количество органелл, что свидетельствует об их функциональной зрелости. Фибробласты встречаются редко и практически лишены отростков, в их цитоплазме определяются расширенные канальцы ЭПР и вытянутые митохондрии. Гистиоциты имеют структуру, характерную для малодифференцированных клеток.

Таким образом, результаты исследования показали, что структура ткани плаценты соответствует физиологической норме зрелой плаценты [385, 386]. Для этого срока развития характерно истончение синцитиального слоя, приближение капилляров терминальных ворсин к апикальной поверхности эпителия, преобладание зрелых соединительно-тканых клеток, увеличение количества выростов люминальной мембраны капилляров, – факты, свидетельствующие о функциональной специализации мелких ворсин, направленной на повышение диффузии через плацентарный барьер. (Основная задача к этому периоду развития плода).

7.2.2. Характер изменения морфологического состояния плаценты при гипотермическом хранении.

Морфологическая оценка ткани плаценты при ее гипотермическом хранении (4°C) в течение 1 сут. показала, что ее структура близка к исходному состоянию.

Однослойный амниотический эпителий, как и в контроле, представлен призматическими клетками, цитоплазма которых базофильна, а ядра имеют овальную форму с плотными глыбками хроматина. В то же время изредка обнаруживаются очаговые дистрофические изменения в виде снижения четкости клеточных границ и десквамации отдельных клеток (рис. 7.16, а). В структуре еще узкой полоски базальной мембраны амниотического эпителия появляются участки с незначительным утолщением. Синцитиальный покров ворсин представлен в виде слоя менее базофильных клеток с глыбчатыми и менее гиперхромными ядрами.

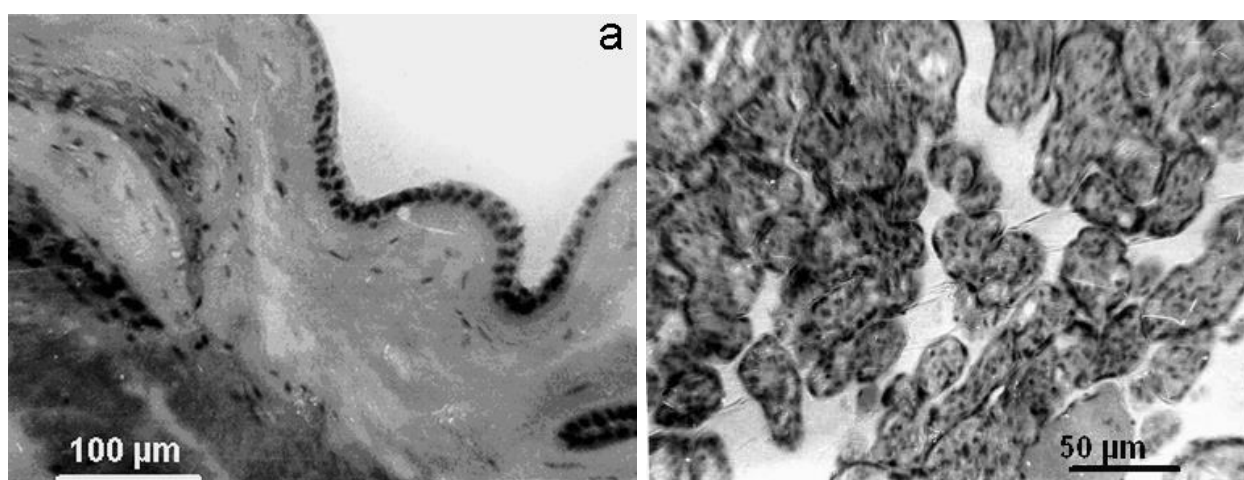


Рис. 7.16. Морфологическое состояние различных участков ткани плаценты после 1 сут гипотермического хранения: а – амниотическая оболочка; б – сужение межворсинчатого пространства и слипание ворсин хориона.

В макроструктуре хориона наблюдаются уменьшение межворсинчатого пространства и слипание соседних ворсин. Строма ворсин содержит густую сеть коллагеновых волокон с хорошо сохранившимися соединительно–тканными клетками. Сосуды ворсин большей частью расширены и содержат клеточные элементы крови (рис. 7.16, б).

Децидуальная оболочка представлена клетками со слабооксифильной и частично вакуолизированной цитоплазмой.

Ультраструктура клеток ворсинчатого хориона также существенно не отличается от таковой в исходном состоянии. Поверхность синцитиотрофобласта содержит многочисленные микроворсинки различной длины и электронной плотности. В то же время у некоторых из них наблюдается разрыхление структуры. Как и в исходном состоянии, характер распределения ядер синцития гетерогенен. Обращает на себя внимание появление ядер с расширенным перинуклеарным пространством и преобладанием доли гетерохроматина (рис. 7.17, а). В цитоплазме синцитиотрофобласта наряду с митохондриями и канальцами ЭПР обычной структуры появляются крупные цистерны ретикулума и набухшие митохондрии с просветленным матриксом.

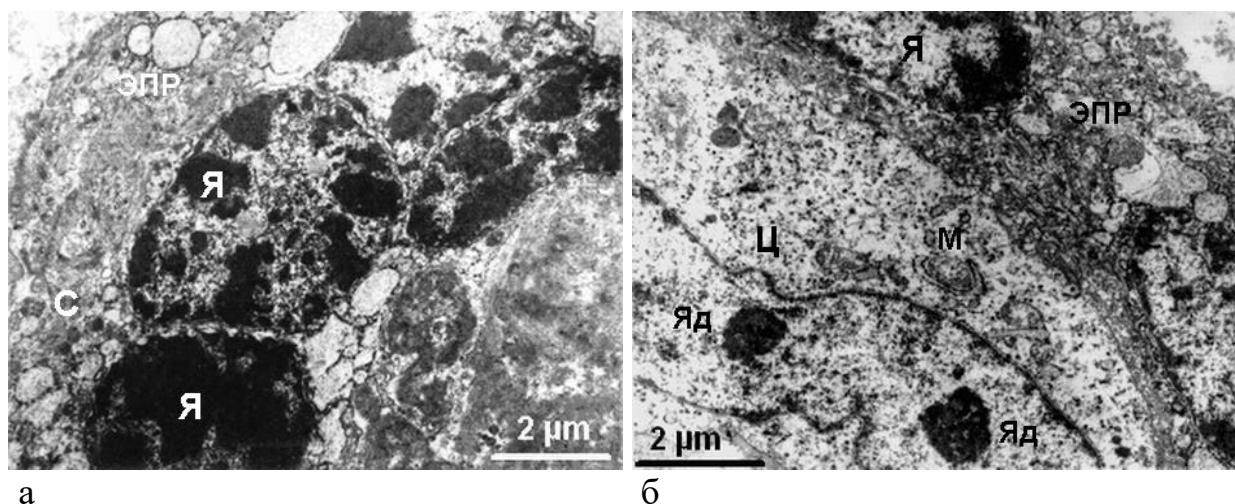


Рис. 7.17. Состояние ультраструктуры синцития и цитотрофобласта ворсины хориона после 1 сут ГХ плаценты: а – монослойное распределение ядер в структуре синцития; б – фрагмент цитотрофобласта, непосредственно контактирующий с синцитием. Обозначения: С – синцитий, Ц – цитотрофобласт, Я – ядро, ЭПР – расширение цистерн эндоплазматического, М – митохондрии, Яд – ядрышки.

Направленность изменений ультраструктуры цитотрофобласта во многом идентична изменениям синцитиотрофобласта: незначительные просветление матрикса и набухание органелл клетки (рис. 7.17, б).

Подэпителиальная базальная мембрана существенно не изменяется, хотя и в ней, по сравнению с исходным состоянием, чаще встречаются фрагменты с разрыхленной структурой, вакуоли, гранулы.

Как и в исходном состоянии, обнаруживаются участки истончения собственной базальной мембраны капилляров. Эндотелиальные клетки, в основном, сохраняют свои ультраструктурные особенности, не меняется структура и количество выростов люминальной мембраны, что свидетельствует о сохранении реактивности эндотелия. В апикальной части цитоплазмы обнаруживаются немногочисленные митохондрии с плотным матриксом и короткими кристами.

Таким образом, после 1 сут гипотермического (4°C) хранения плаценты наблюдаются незначительные изменения, как в структуре ткани, так и в ультраструктуре ее клеток, свидетельствующие о значительной устойчивости исследуемой системы к изменившимся условиям среды.

Увеличение сроков ГХ ткани плаценты до 2 сут приводит к более выраженным деструктивным изменениям практически во всех ее элементах: вакуолизации и нарушению целостности клеток амниотического эпителия, локальным расширениям базальной мембраны амниона, еще большему слипанию ворсин хориона, десквамации синцитиального слоя и разрыхлению стромы ворсин (рис. 7.18, а).

Нарушение структуры и целостности синцитиального покрова проявляется в его частичной десквамации. Обращает на себя внимание разрыхление и просветление стромы ворсин. Фетальные кровеносные сосуды также претерпевают изменения. Вокруг них образуются однородные гиалиноподобные массы. Показателями существенных функциональных нарушений в ткани плаценты являются гемолиз эритроцитов в сосудах и экссудация плазмы (рис. 7.18, б).

Клетки эпителиального слоя амниона частично теряют свою структурную целостность. В них нередко встречаются дистрофические изменения в виде вакуолизации цитоплазмы и отсутствия четкости границ.

Базальная мембрана амниона имеет локальные расширения. Обнаруживаются обширные участки «слипшихся» ворсин, для которых характерно снижение количества синцитиальных узелков (рис. 7.18, а).

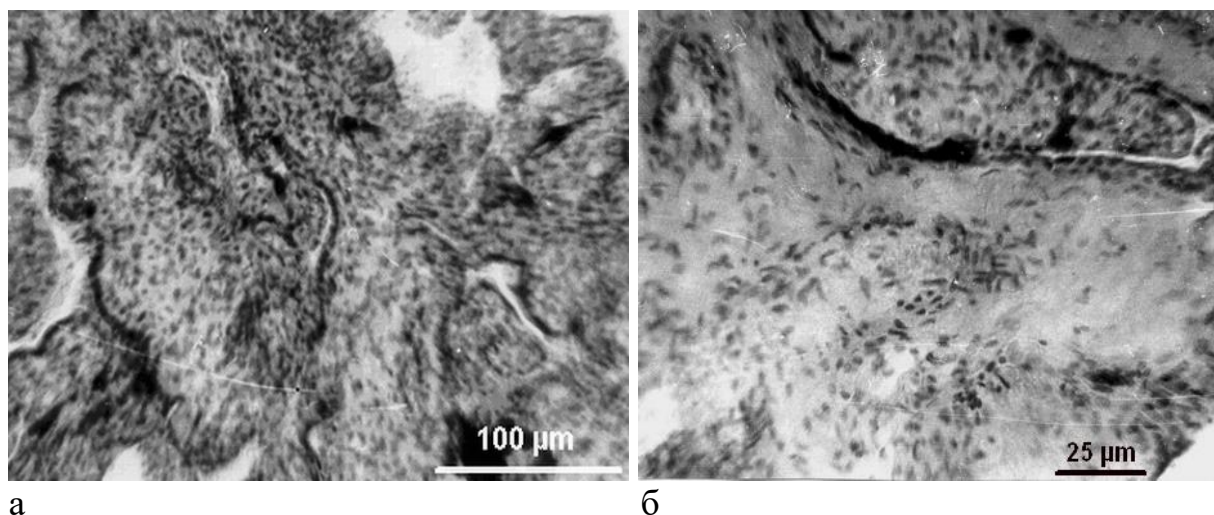


Рис. 7.18. Морфологическое состояние различных участков ткани плаценты после 2 сут ГХ: а – слипание ворсин с исчезновением границ между ними; б – образование гиалиноподобных масс и экссудация плазмы из фетального кровеносного сосуда.

Ультраструктурный анализ хориальных ворсин после 2 сут гипотермического хранения плаценты свидетельствует о значительных проявлениях деструкции и дистрофии в их структуре. В синцитии обнаруживаются участки с набухшими микроворсинками, имеющими неравномерно просветленный матрикс и лишенными синцитиальных выростов. В цитоплазме синцитиотрофобласта наблюдаются множественные очаги набухания и деструкции цитоплазматических органелл. Ядра, в большинстве своем, имеют неровные контуры и расширенное перинуклеарное пространство. Увеличивается доля более грубого и уплотненного гетерохроматина. Для митохондрий при 2-суточном хранении характерно просветление матрикса и частичное разрушение крист. В структуре ЭПР и комплекса Гольджи наблюдаются расширение цистерн со

скоплением хлопьевидного материала и очаговая деструкция мембран (рис. 7.19, а).

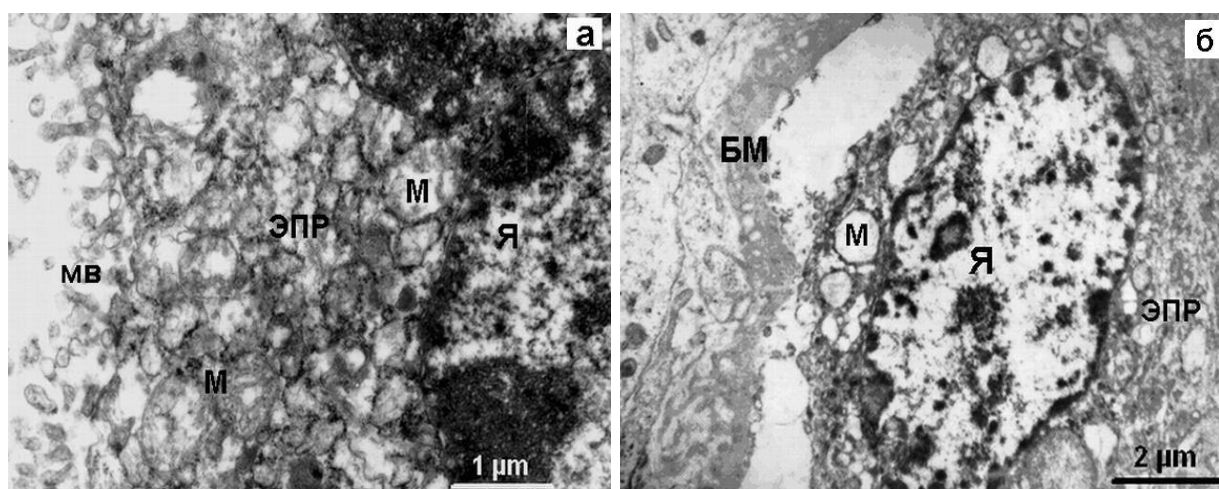


Рис. 7.19. Структура хориальных ворсин после 2 сут гипотермического хранения плаценты: а – набухание митохондрий (М) и цистерн ЭПР синцитиального слоя, б – отслоение синцитиального слоя от базальной мембраны (БМ). Обозначения: Я – ядро синцития; МВ – микроворсинки

Базальная мембрана эпителия утолщается. Иногда в ней присутствуют участки с разволокненной структурой, содержащие вакуоли и гранулы. Часто наблюдается отслоение синцитиального слоя от базальной мембраны (рис. 7.19, б).

В строме ворсин часто выявляется большое количество разрыхленных коллагеновых волокон, среди которых находятся клетки соединительно-тканной природы. Одним из ультраструктурных показателей реакции этих клеток на 2-суточное гипотермическое хранение являются изменения соотношения конденсированных и диффузных участков хроматина ядер, набухание цитоплазматических структур. Однако эти изменения менее выражены в сравнении с изменениями эпителия ворсин.

Существенные деструктивные изменения были отмечены и со стороны эндотелия капилляров – разрывы контактов между эндотелиальными клетками и разрыхление базальной мембраны (рис. 7.20), что обычно

приводит к повышению сосудистой проницаемости, экссудации плазмы и образованию гиалиноподобных масс, а также снижению пиноцитозной активности эндотелиальных клеток.

Необходимо отметить, что капиллярная сеть ворсин хориона, являясь наиболее чувствительным звеном в субэпителиальном слое, характеризуется нарастанием признаков реактивности эндотелия. Это проявляется в выпячивании ядер в просвет сосуда, подтягивании периферических фрагментов цитоплазмы в околоядерную область, расхождении плотных контактов и образовании поверхностью эндотелиоцитов микровилл (рис. 7.20, б).

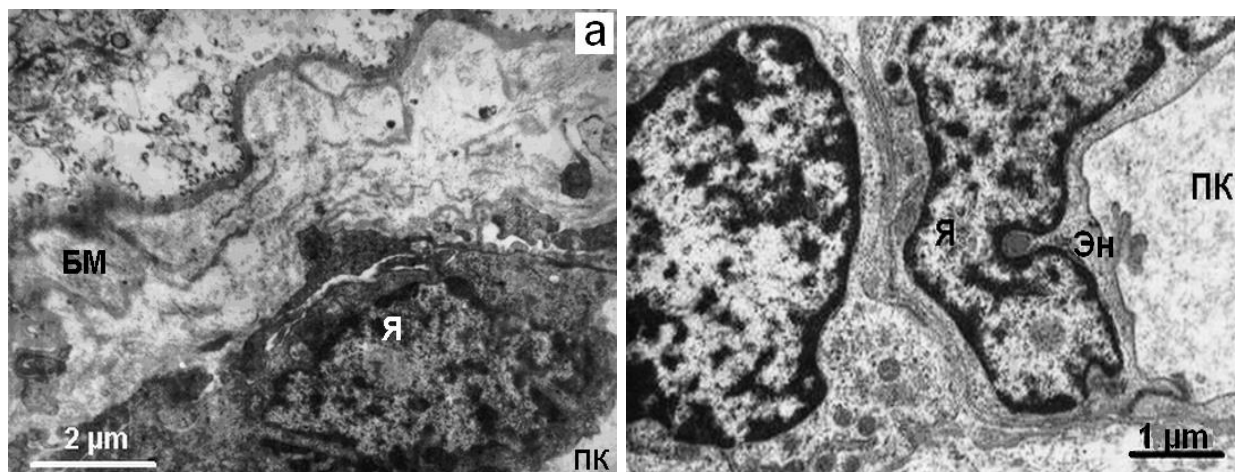


Рис. 7.20. Морфологическое состояние fetalного капилляра сосудистого русла после 2 сут ГХ фрагмента ткани плаценты: а – фрагмент стенки капилляра, разрыхление базальной мембраны (БМ); б – реактивное состояние эндотелиоцита (Эн) в стенке капилляра. Обозначения: ПК – просвет капилляра, Я – ядро эндотелиоцита

Таким образом, после 2-х суток гипотермического хранения фрагментов плаценты происходят нарастающие деструктивные изменения, как на уровне ткани, так и в структуре клеток. Эпителий в большей степени подвергается повреждению, чем строма ворсин, что частично объясняется особенностями строения стромы – наличием неклеточных компонентов.

7.2.3. Ультраструктура плаценты после криоконсервирования.

Использование для консервации плаценты низких (-196°C) температур существенно ограничивает спектр изменений, происходящих в ней при длительной гипотермии. Вместе с тем цикл замораживания-оттаивания сам оказывает повреждающее действие на структуру ткани, и в первую очередь, за счет процессов кристаллообразования, перераспределения электролитов, изменения физических свойств липидных компонентов мембран, внутриклеточного рН.

Применение криопротекторов позволяет смягчить действие перечисленных факторов криповреждения, однако привносит дополнительные проблемы, связанные с их токсичностью, характером взаимодействия с биологическим объектом до этапа охлаждения, в частности, со структурными компонентами мембран, преимущественной локализацией криопротекторов в клетке или внеклеточной среде. Учитывая, что ткань плаценты используется, в основном, либо в качестве фрагментов для подсадки, либо для получения экстрактов плаценты, нами проведено изучение ультраструктуры плаценты после низкотемпературного консервирования без криопротектора.

По данным электронной микроскопии, после низкотемпературного консервирования плаценты в отсутствие криопротектора происходит ряд существенных ультраструктурных изменений ворсинчатого хориона. В первую очередь, это касается поверхности синцитиотрофобласта, у которого нередко обнаруживаются участки, лишенные синцитиальных выростов, а также отслоение микроворсинок от поверхности синцития (рис. 7.21, а). Цикл замораживания-отогрева оказывает значительное влияние на структуру ядер эпителия ворсин.

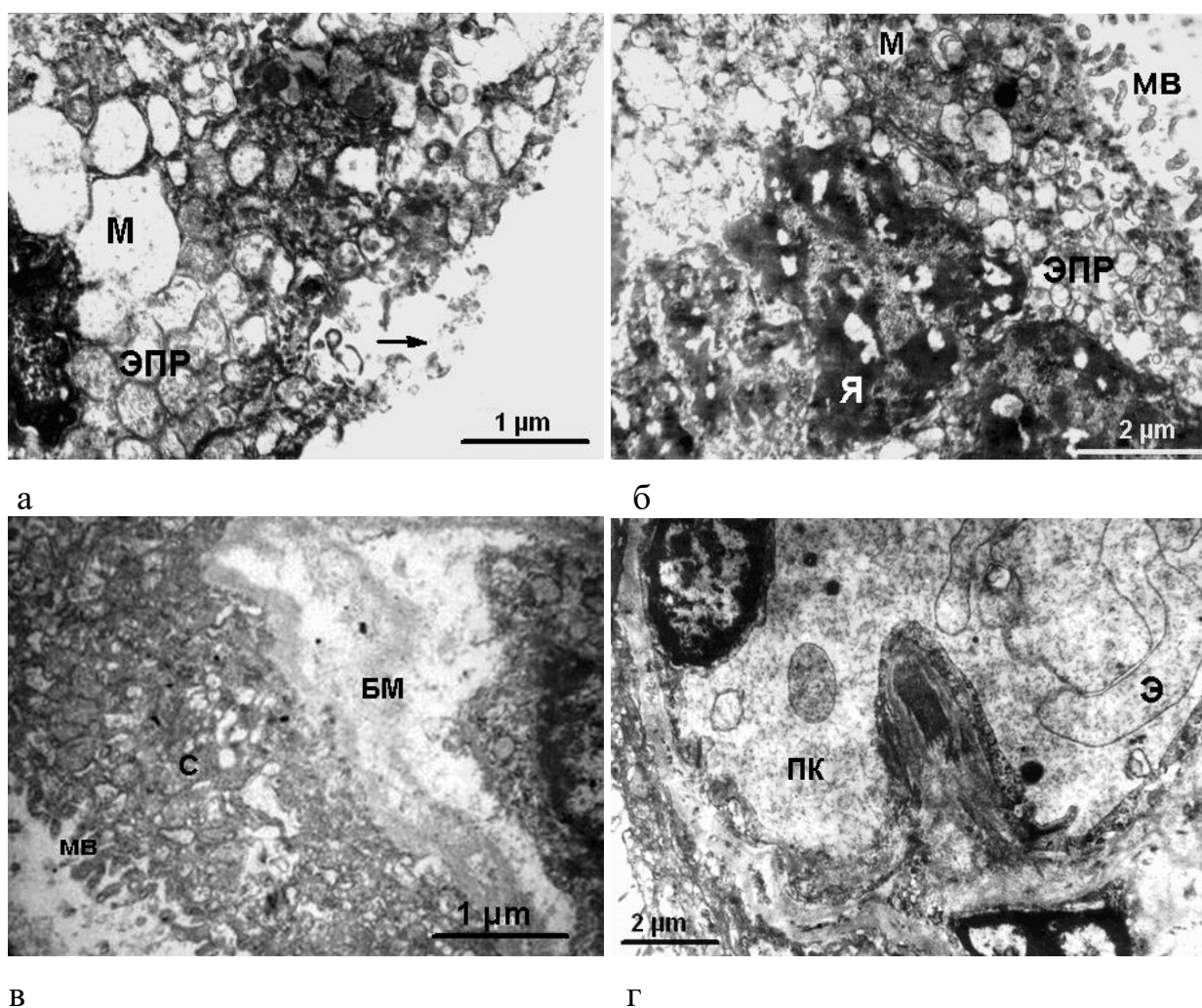


Рис. 7.21. Ультраструктура синцитиального слоя терминальной ворсины после замораживания плаценты без криопротектора: а – участок отслоения микроворсинок от поверхности синцитиотрофобласта (стрелка); б – расширение и вакуолизация цистерн ЭПР синцития; в – отслоение синцитиального слоя (С) от поверхности терминальной ворсины, разрыхление базальной мембраны (БМ); г – фрагмент фетальной артериолы, с характерной структурой гемолизировавших эритроцитов (Э). Обозначения: Я – ядро, М – митохондрии с разрушенными кристами, МВ – микроворсинки, ПК – просвет капилляра.

Изрезанность контура, неравномерно расширенное перинуклеарное пространство и конденсация хроматина в плотные, почти непрерывные скопления, располагающиеся по всему объему ядра, – далеко не полный

перечень изменений, наблюдаемых в ядре. Мембранные структуры синцития также претерпевают значительные изменения. Для митохондрий характерно просветление матрикса и выраженная деструкция крист, а в структуре ЭПР доминируют расширенные цистерны и вакуоли с нарушением упорядоченности расположения рибосом на их мембранах. Как результат отмеченных нарушений, а также вакуолизации аппарата Гольджи, в цитоплазме появляется много замкнутых везикул, свободных рибосом и гранул различной электронной плотности (рис. 7.21, а, б).

По сравнению с синцитиотрофобластом изменения ультраструктуры цитотрофобласта менее выражены. Это, в первую очередь, относится к структуре его ядра. В то же время немногочисленные митохондрии цитотрофобласта характеризуются просветлением матрикса и дезорганизацией крист, ЭПР – набуханием цистерн. Базальная мембрана эпителия на всем протяжении неравномерно расширена и разрыхлена. Для использованного режима замораживания (см. «Материалы и методы») характерно частичное отслоение эпителиального пласта от стромы (рис. 7.21, в). Наблюдается разрыхление межклеточного вещества стромы с образованием вакуолеобразных, без клеточного содержимого, полостей. В то же время клеточные элементы стромы менее подвержены структурным изменениям.

Эндотелиоциты нередко образуют цитоплазматические выросты в просвет сосудов, что свидетельствует о сохранении их реактивного состояния (рис. 7.21, г). Отмечаемые изменения формы просвета артериол вызваны сокращением гладкомышечных клеток (рис. 7.21, г).

Таким образом, морфологическое исследование плаценты человека в исходном состоянии и после ГХ ее фрагментов, а также криоконсервированной плаценты показали, что наиболее чувствительным звеном в субэпителиальном слое плаценты на начальном (до 24 ч.) этапе действия гипотермии является капиллярная сеть ворсин хориона, характеризующаяся нарастанием признаков реактивности эндотелия. Строма

ворсин в меньшей степени подвергается повреждению по сравнению с эпителием, из-за наличия в ней неклеточных элементов. Увеличение сроков ГХ ткани плаценты до 2 сут приводит к вакуолизации и нарушению целостности клеток амниотического эпителия, локальному расширению базальной мембраны амниона, десквамации синцитиального слоя и разрыхлению стромы ворсин, а также слипанию ворсин хориона – признаки, свидетельствующие о необратимости произошедших изменений. Цикл замораживания-отогрева в отсутствие криопротектора вызывает нарушение практически во всех элементах структуры плаценты, не совместимых с сохранением жизнеспособности. Этот факт может быть использован для получения криоэкстрактов плаценты.

Заключая данный раздел работы, отметим, что:

- морфологическое исследование двух, различающихся своим строением и функцией тканей – печени и плаценты, а также изолированных гепатоцитов показало, что 24-часовое гипотермическое хранение в жидкой фазе обеспечивает высокий уровень их морфологической сохранности и позволяет на ультраструктурном уровне с большой долей вероятности утверждать об обратимости наблюдаемых изменений;
- гипотермическое хранение фрагментов печени в жидкой фазе (питательная среда) обеспечивает более высокий, по сравнению с влажной камерой, уровень морфологической сохранности клеток. Это позволяет рекомендовать данный способ для краткосрочного (1–24 ч) хранения фрагментов ткани и органа. При ГХ в течение 24–48 ч во влажной камере изменения в ткани печени протекают медленнее, чем в жидкой фазе;
- по степени устойчивости к действию гипотермии внутриклеточные органеллы гепатоцитов распределялись следующим образом: митохондрии < эндоплазматическая сеть < ядерный аппарат.

ГЛАВА 8. УЛЬТРАСТРУКТУРА И МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ЗИМОСПЯЩИХ СУСЛИКОВ (*CITELLUS UNDULATUS*) В РАЗЛИЧНЫХ ФАЗАХ ЕСТЕСТВЕННОГО ГИПОБИОЗА И ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ ЕЕ ФРАГМЕНТОВ.

8. 1. Морфо-функциональное состояние клеток печени зимоспящего суслика, находящегося в трех физиологических состояниях: спячки, пробуждения и бодрствования.

Обоснование выбранного направления исследований. Естественный гипобиоз гетеротермных млекопитающих имеет сложную эволюцию и находится в тесной связи с филогенезом биоэнергетики теплокровного организма. Выработанная организмами в процессе развития способность повышать свою резистентность не за счет интенсификации метаболизма, а, наоборот, путем значительного его снижения, закрепились генетически и является в эволюции вторичной [2, 4, 5, 9].

Детальное изучение особенностей функционирования систем зимоспящего организма, находящегося в различных физиологических состояниях, необходимо для выяснения закономерности развития адаптивных процессов в организме гетеротермов при естественном холодовом воздействии. В частности, на эритроцитах зимоспящих показано, что структурно-функциональные перестройки их мембраны в зимний период характеризуются изменением характера взаимодействия цитоскелета с мембраной [11], модификацией систем, контролирующих перекисное окисление липидов, систем транспорта ионов и метаболизма АТФ.

Известно, что в печени, играющей значительную роль в теплопродукции организма, осуществляется переработка значительной части энергетического и пластического материала, используемого организмом в процессе жизнедеятельности и в различных экстремальных условиях [387].

Предпосылкой для проведения исследования структурных адаптационных изменений в организме зимоспящих явились также данные о том, что как организм гетеротермов, так и выделенные из них ткани и клетки, способны длительное время сохранять устойчивость не только к пониженным температурам, но и к радиации, канцерогенезу, инфицированию [122]. Показано, что печень спящего суслика обнаруживала минимальные повреждения до 72 час ГХ в растворе UW [123].

В данном разделе работы в качестве объекта исследования были взяты гепатоциты в составе фрагментов печени длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*). Сусликов исследовали в сезон гибернации (декабрь-февраль). Животные находились в состояниях глубокой спячки (ректальная температура 2–6°C), пробуждения (33–35°C) и межбаутной активности (37°C). После декапитации животных извлекалась печень, кусочки которой брали для экспериментов. Как и в предыдущих исследованиях, выделение фрагментов печени для изучения производилось из одного и того же участка органа (середина левой боковой доли).

8.1.1. Морфологическое состояние печени и ультраструктура гепатоцитов сусликов в активной фазе периода зимней спячки

Гистологическое исследование печени активных «зимних» сусликов (ректальная температура 36–37°C) свидетельствует о ее умеренном кровенаполнении. Она имеет слабо выраженную балочную структуру долек и представлена относительно однородным составом клеток паренхимы, где преобладают эозинофильные гепатоциты с округлыми светлыми ядрами и равномерно распределенным хроматином и ядрышками. В зонах триад располагаются темные гликогенсодержащие гепатоциты с гиперхромными ядрами. В реактивном состоянии находятся эндотелиоциты синусоидов и Купферовы клетки. Полигональной формы гепатоциты плотно контактируют друг с другом, образуя синусоидные капилляры, заполненные эритроцитами. Цитоплазма гепатоцитов мелкодисперсная, гомогенная. Форма ядер

округлая, с четким контуром цитолеммы и равномерной плотностью хроматина. В составе балок обнаруживаются двуядерные гепатоциты и редко расположенные печеночные макрофаги, имеющие удлиненную форму ядер (рис. 8.1, а).

По данным электронной микроскопии гепатоциты центральной зоны печеночных долек в основной массе также однородны по своему строению. Ядра клеток содержат одно или два ядрышка. Нуклеоплазма светлая. Гетерохроматина мало и он, в основном, расположен в виде небольших скоплений вдоль ядерной мембраны. Перинуклеарное пространство узкое и равномерной ширины.

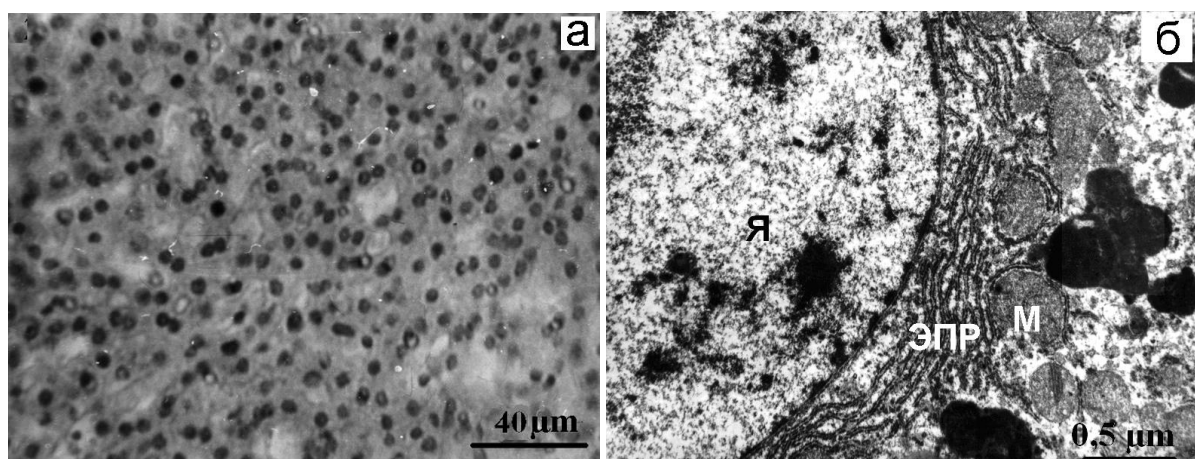


Рис. 8.1. Морфологическое состояние (а) и ультраструктура окооядерной части гепатоцита (б) фрагмента печени суслика в активном состоянии. Обозначения: М – митохондрии, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Я – ядро.

Большая часть органоидов цитоплазмы – эндоплазматический ретикулум, митохондрии, лизосомы, локализованы в окооядерной зоне гепатоцита. Для периферической зоны характерно скопление гранул гликогена.

Митохондрии имеют, в основном, округлую или овальную форму, матрикс средней электронной плотности и редкие радиально расположенные кристы. Внутренний матрикс митохондрий содержит глыбки высокой

электронной плотности. Данные морфометрии свидетельствуют, что суммарный объем митохондрий в клетке составлял, в среднем, $20,40 \pm 1,57\%$.

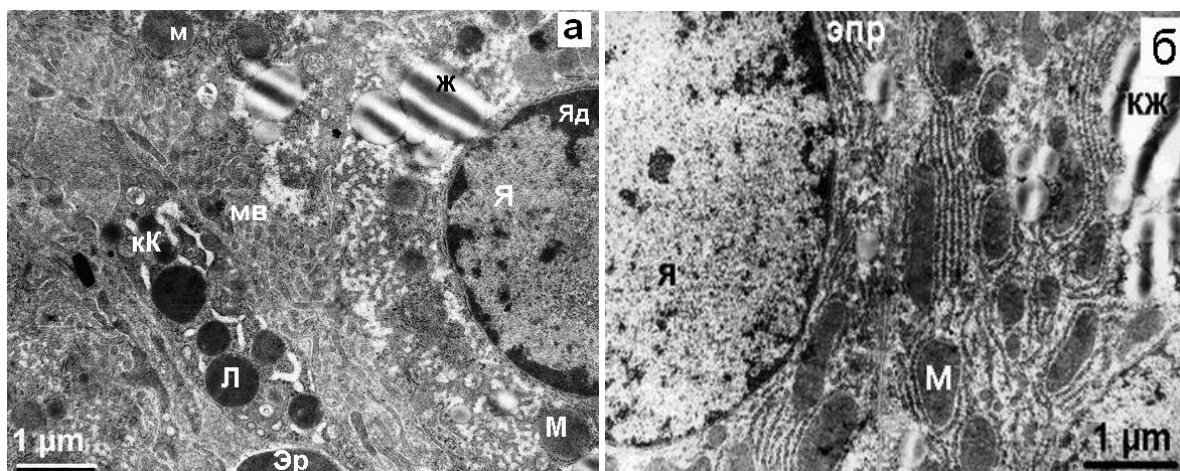


Рис. 8.2. Ультраструктура гепатоцитов суслика в активном состоянии (а, б). Взаиморасположение ЭПР и митохондрий в околоядерной зоне (б).

Обозначения: кК – клетка Купфера, Эр – эритроцит, М – митохондрии, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Ж – жировые капли, Я – ядро, Л – лизосомы, МВ – микровезикулы.

Шероховатый ЭПР представлен многочисленными, параллельно расположенными канальцами – мембранными структурами, содержащими рибосомы. В структуре ЭПР часто встречаются свободные рибосомы и полисомы в виде скопления нескольких электронно-плотных частиц. В цитоплазме ретикулум локализован в околоядерной зоне и в непосредственной близости от митохондрий (рис. 8.2, б). Короткие и расширенные микротрубочки гладкого ЭПР содержали негомогенное, средней электронной плотности вещество. Относительный объем шероховатого и гладкого ЭПР в клетке равнялся $2,9 \pm 0,31\%$ и $1,08 \pm 0,12\%$, соответственно.

Пластинчатый комплекс Гольджи (КГ), как правило, локализован в области желчных протоков. Он содержит короткие расширенные канальцы и секреторные гранулы средней электронной плотности. Здесь же встречаются различного размера везикулы и лизосомы (рис. 8.2, а).

Гликоген в виде больших скоплений занимает значительный объем цитоплазмы. В основном он представлен α -гранулами, иногда встречаются β - и γ -гранулы. Относительный объем гликогена в структуре гепатоцита – $2,07 \pm 0,15\%$.

Лизосомальный аппарат содержит первичные и вторичные лизосомы. Для первичных лизосом характерны небольшие размеры и высокая электронная плотность (рис. 8.2, а). В структуре гепатоцита встречаются единичные мультивезикулярные тельца и миелиноподобные структуры.

8.1.2. Морфологическое состояние печени и ультраструктура гепатоцитов сусликов в фазе спячки.

Исследования методом оптической микроскопии показали, что печень спящих сусликов (ректальная температура $2-6^{\circ}\text{C}$) отличается депонированием крови в воротных венах и печеночных артериях, а также в синусоидных капиллярах, располагающихся в зонах триад. Центральные вены и прилежащие к ним синусоиды почти не содержат крови. Характерно утолщение стенок портальных сосудов и капилляров, интенсивно окрашивающихся реактивом Шиффа и Суданом черным "В", что идентифицирует наличие в них гликопротеинов и фосфолипидов. Богата фосфолипидами также депонированная кровь (мембраны эритроцитов).

Паренхима печени слегка обезвожена, что проявляется в ее уплотнении. Она содержит относительно однородные уплотненные темные, так называемые "спокойные", гепатоциты с гиперхромными ядрами. Клетки содержат значительное количество гликогена и следы нейтральных жиров. Разрастания соединительной ткани (функционально активный элемент органа) в печени не наблюдается, ее небольшие прослойки встречаются только в зоне триад.

Структура печени животных, по данным оптической микроскопии, представлена полигональными гепатоцитами, с крупнодисперсной цитоплазмой и, преимущественно, округлыми, уплотненными ядрами.

Межбалочные пространства содержат эритроциты со слабо выраженным контуром мембраны и единичные печеночные макрофаги с уплощенным ядром (рис. 8.3, а; 8.4, а). Показательным морфологическим ориентиром для данного состояния животного является наличие большого количества гепатоцитов в различных стадиях жирового перерождения, располагающихся диффузно в паренхиме или группами, преимущественно в зонах триад. Степень выраженности дистрофических изменений в печени у разных животных различна.

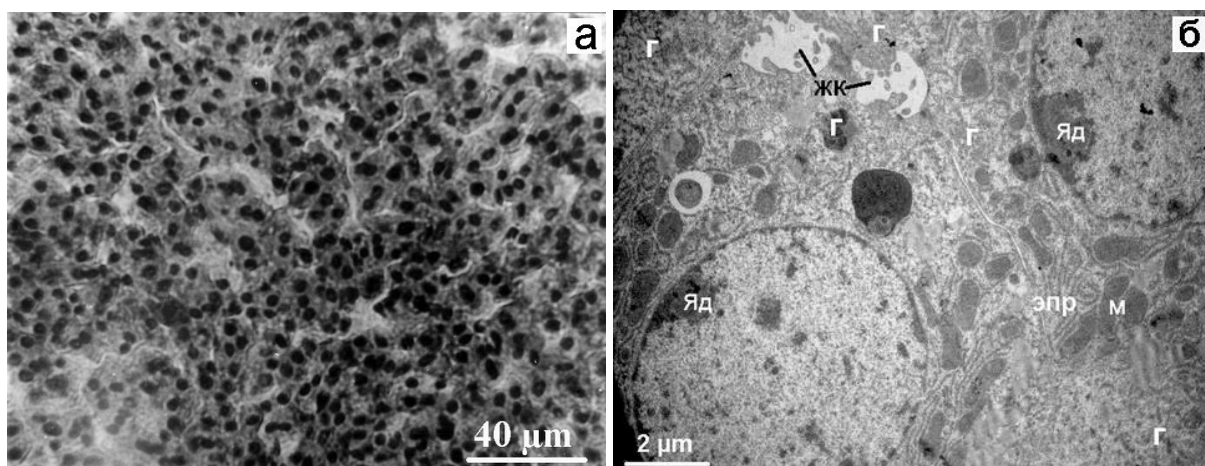


Рис. 8.3. Морфологическое состояние (а) и ультраструктура гепатоцита (б) фрагмента печени суслика в спящем состоянии. Обозначения: Г – гепатоцит, М – митохондрии, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Яд – ядрышко, ЖК – желчные капилляры.

Данные электронно-микроскопического исследования показали, что в состоянии гибернации в гепатоцитах наблюдаются выраженные структурные изменения – перестройки, затрагивающие как ядро, так и цитоплазму. Матрикс гепатоцитов значительно уплотнен. Ядра, характеризующиеся округлой формой и узким, равномерной ширины перинуклеарным пространством, содержат увеличенное количество гетерохроматина, который в виде небольших скоплений локализован вблизи ядрышка и ядерной мембраны. Ядрышки выражены слабо по сравнению с гепатоцитами животных в активном состоянии (рис. 8.3, б).

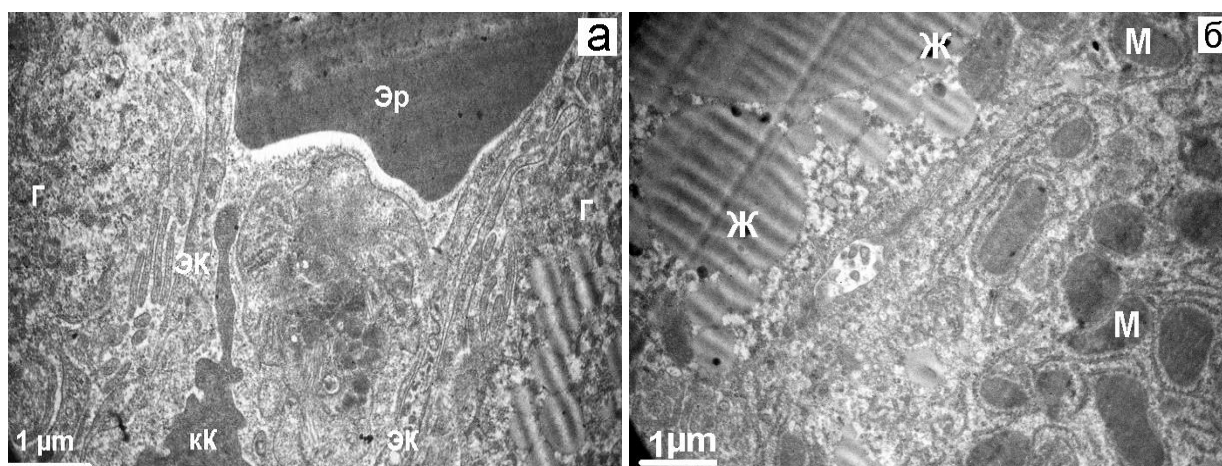


Рис. 8.4. Морфологическое состояние синусоида (а) и ультраструктура периферической части гепатоцита (б) печени суслика в спящем состоянии.

Обозначения: Г – гепатоцит, М – митохондрии, ЭК – эндотелиальная клетка, кК – клетка Купфера, Эр – эритроцит в просвете капилляра, Ж – жировые капли.

Таким образом, для структуры гепатоцитов сусликов в состоянии спячки характерна пониженная функциональная активность ядерного аппарата, структурно проявляющаяся в возрастании объема гетерохроматина и уплотнении кариоплазмы.

Шероховатый эндоплазматический ретикулум представлен узкими, равномерно распределенными во внутреннем объеме, канальцами. На поверхности мембран ретикулума расположены многочисленные рибосомы. Необходимо отметить, что в состоянии спячки сохраняется относительно высокое соотношение между шероховатым и гладким ЭПР, что в большей степени характерно для гепатоцитов активного животного. Аналогичное увеличение объемной доли шероховатого и снижение объема гладкого ЭПР отмечено в гепатоцитах краснощекого суслика [140].

Митохондрии характеризуются разнообразием форм и размеров. Их мелкогранулярный матрикс плотный, кристы расположены радиально. Для данного состояния животного характерен плотный контакт митохондрий с шероховатым ЭПР, содержащим рибосомы на мембранах (рис. 8.4, б; 8.5, б).

В сравнении с активным состоянием относительный, внутриклеточный объем митохондрий достоверно увеличен и составляет $21,45 \pm 1,63$.

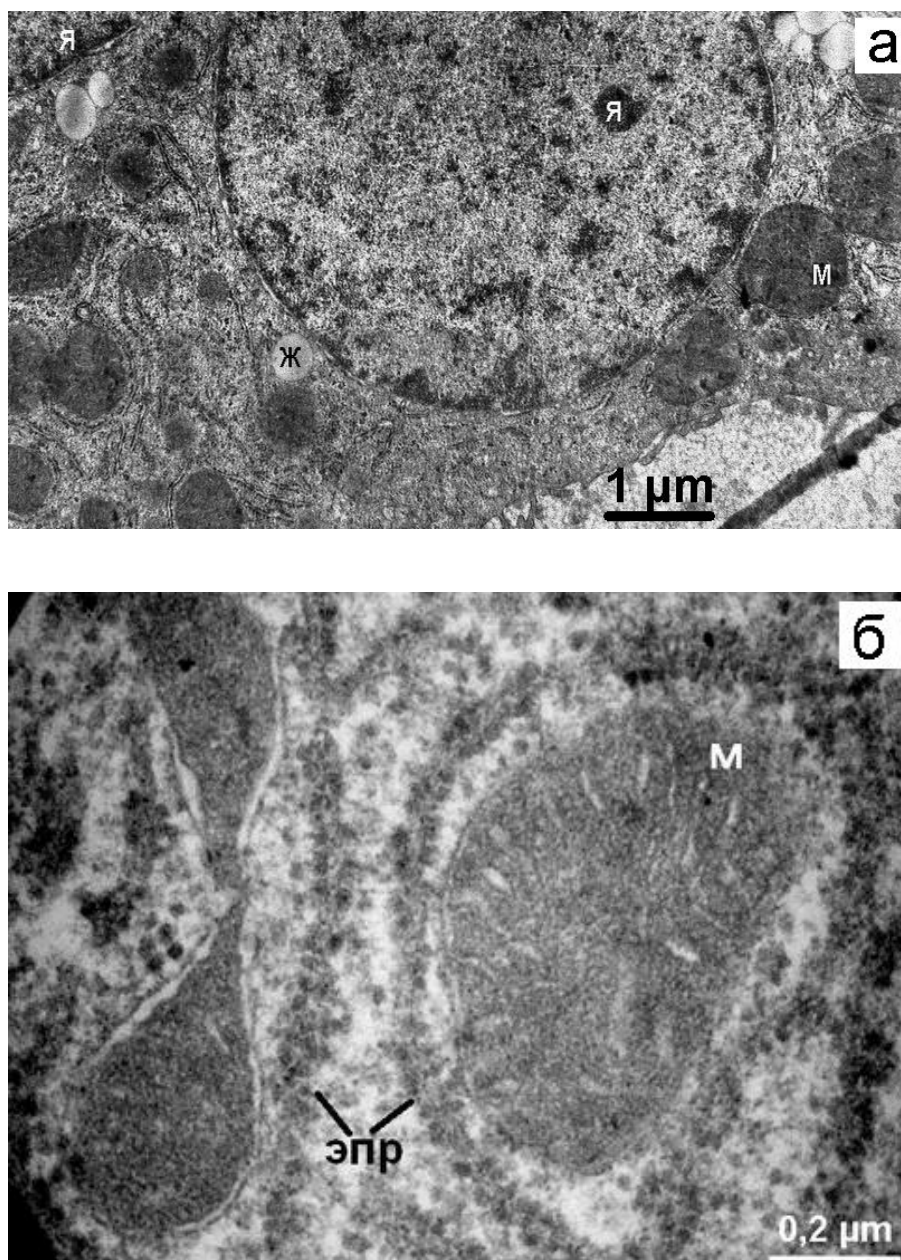


Рис. 8.5. Ультраструктура клеток печени суслика в состоянии спячки: фрагмент центральной части гепатоцита (а) и характер взаимосвязи ЭПР и митохондрий (б). Обозначения: ЭПР – эндоплазматический ретикулум, М – митохондрии, Я – ядро.

Комплекс Гольджи располагается вблизи ядра, практически полностью везикулирован и состоит из уплощенных цистерн, а также мелких везикул и пузырьков. Секреторные гранулы не встречаются.

Количественная оценка содержания гликогена свидетельствует, что его относительный внутриклеточный объем составляет $3,61 \pm 0,21\%$ и почти в 2 раза превосходит значение этого показателя для активного состояния. Он представлен в основном α -структурами и β -гранулами и в большинстве клеток локализован в периферической зоне.

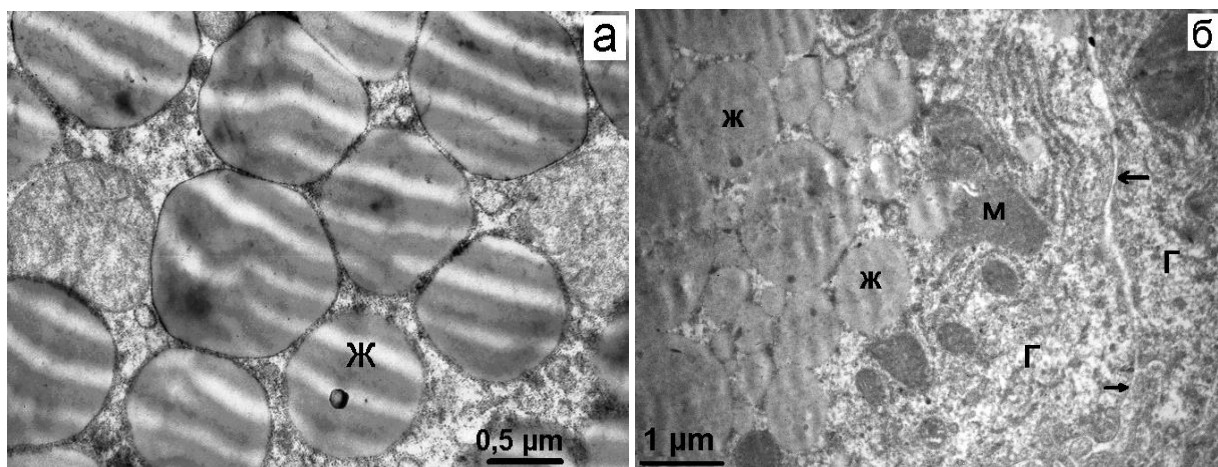


Рис. 8.6. Ультраструктура жировых капель (а) и обширное скопление жировых включений в периферической части гепатоцита (б) печени суслика в спящем состоянии. Деформация органелл клетки жировыми каплями.

Обозначения: Г – гепатоцит, М – митохондрии, Ж – жировые капли, черные стрелки – межклеточная граница.

По сравнению с активными животными, для данного состояния характерно наличие хорошо выраженного лизосомального аппарата, представляющего собой крупные, неомогенной природы структуры (рис. 8.5, а), большого количества липидных капель низкой электронной плотности (рис. 8.6), двукратное возрастание доли гликогена, а также значительное уплотнение структуры ткани печени, являющееся результатом ее обезвоживания.

8.1.3. Морфологическое состояние печени и ультраструктура гепатоцитов сусликов в фазе пробуждения

Наши исследования показали, что печень пробуждающихся сусликов (ректальная температура 33–36°C) характеризуется резкой гиперактивацией всех протекающих процессов на фоне частичного обводнения и дистрофии тканей. Кровеносные сосуды более равномерно кровенаполнены, их стенки разрыхлены, эндотелий набухший. В соединительно–тканной основе органа в портальных зонах отмечается уменьшение содержания липидов и гликопротеинов и появление гликозаминогликанов, играющих важную роль в поддержании водно–солевого гомеостаза данного участка ткани. «Округлены» и увеличены в размерах Купферовы клетки, в некоторых случаях они содержат фагоцитозные пузырьки, что свидетельствует об их превращении в свободные макрофаги.

Вариабельностью морфофункционального состояния отмечается паренхима печени. В ней обнаруживается полиморфный состав гепатоцитов – от гипертрофированных активно функционирующих клеток до дистрофически измененных и, вероятно, погибающих. Наряду с двоядерными определяется до 20 % одноядерных гигантских полиплоидных клеток с гиперхромными ядрами, плотно упакованными крупными глыбками гетерохроматина. Встречаются митотически делящиеся гепатоциты ($0,9 \pm 0,2\%$). Показательным морфологическим ориентиром для печени описываемого состояния является наличие гепатоцитов в различных стадиях жирового перерождения, хаотически распределенных в паренхиме или располагающихся группами преимущественно в зонах триад. Степень выраженности дистрофических изменений в печени у разных индивидуумов различна, она коррелирует с потерями клетками гликогена.

Гистологическое исследование печени пробуждающихся сусликов указывает на сохранение балочной структуры долек, состоящих из гепатоцитов полигональной формы с равномерно умеренной плотностью хроматина ядер. Границы между гепатоцитами определяются довольно

четко. Цитоплазма преимущественно мелкодисперсная. В межбалочных пространствах обнаруживаются печеночные макрофаги, ядра которых содержат плотный хроматин (рис. 8.7, а).

У пробуждающегося животного ультраструктурные характеристики клеток печени свидетельствуют об активизации их белок-синтезирующей системы. Электронно-микроскопические исследования позволили установить, что ядра гепатоцитов печени пробуждающихся сусликов округлой или овальной формы, с ровным четким контуром наружной и внутренней ядерных мембран и узким перинуклеарным пространством (рис. 8.7, б; 8.8).

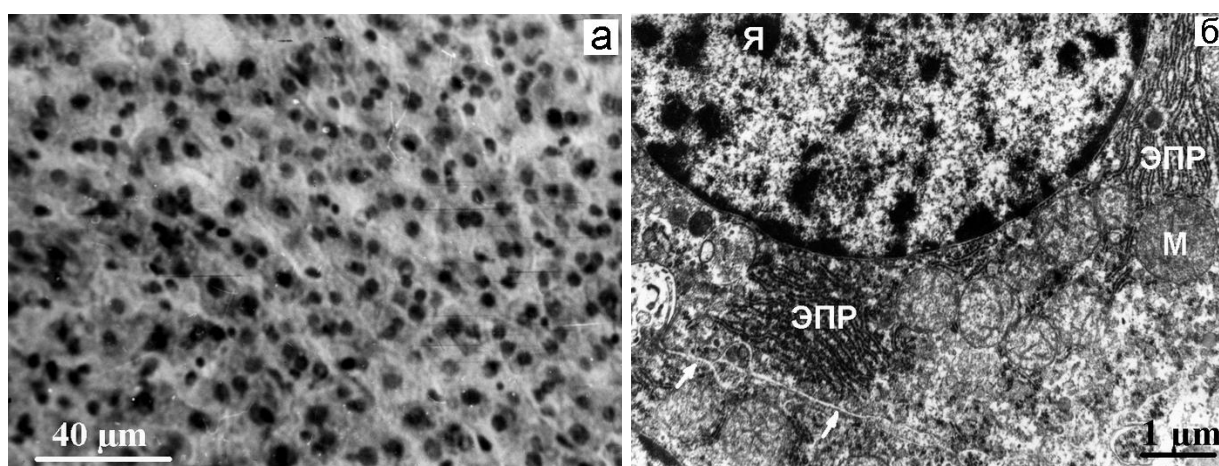


Рис. 8.7. Морфологическое состояние (а) и ультраструктура гепатоцита (б) фрагмента печени суслика в состоянии пробуждения. Обозначения: М - митохондрии, ЭПР - эндоплазматический ретикулум, Я – ядро, стрелки – межклеточная граница.

Эти клетки содержат большее количество эухроматина и хорошо выраженные ядрышки. Гетерохроматин в виде небольших скоплений распределяется вблизи ядрышка и ядерной мембраны.

Удлиненные каналцы зернистой эндоплазматической сети хаотично располагается по всей цитоплазме и плотно контактирует с митохондриями. У некоторых гепатоцитов в зоне ядра и в области эндоплазматической сети присутствуют скопления рибосом и полисом.

Возрастание объемной доли зернистого ЭПР и наличие на его мембранах многочисленных рибосом свидетельствует о готовности клетки к синтетическим процессам. Митохондрии округлой формы с матриксом средней электронной плотности (рис. 8.7, б).

Для данного состояния, как и для спящего животного, характерно наличие в структуре клеток значительного количества лизосом, представляющих собой округлые, неомогенной природы структуры, с большей вероятностью располагающихся в зоне ядра (рис.8.8, светлые стрелки).

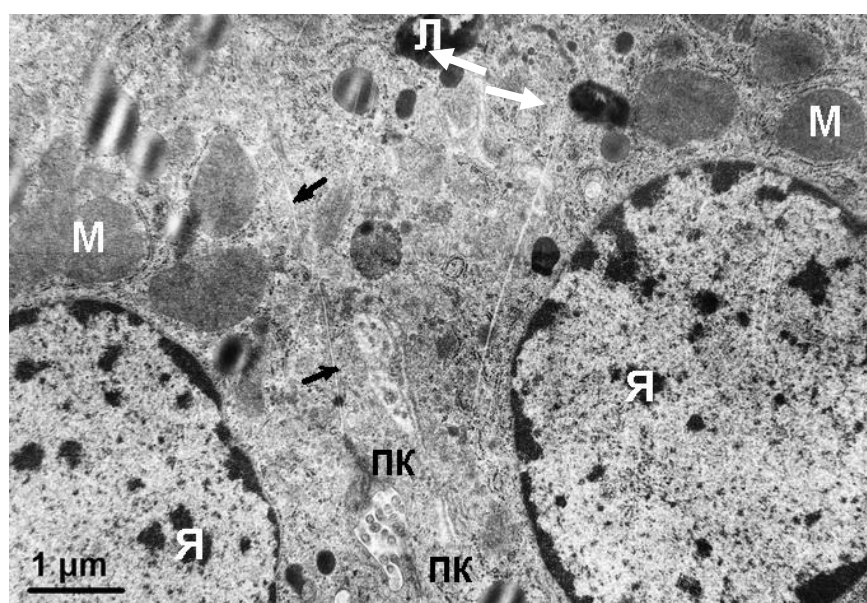


Рис. 8.8. Ультраструктура гепатоцитов суслика в состоянии пробуждения. Обозначения: М – митохондрии, ЖК – желчный капилляр, Я – ядро, ПК – межклеточные плотные контакты, Л – лизосомы, «темные стрелки» – межклеточная граница.

Вполне естественно предположить, что их функционирование особенно важно на этапе пробуждения, поскольку в клетках запускаются интенсивные процессы утилизации «отслуживших», поврежденных органелл и биомакромолекул, а образующиеся при этом низкомолекулярные компоненты вновь используются как субстраты в анаболических процессах на этапе перехода в активное состояние.

Активация процессов катаболизма и анаболизма в период кратковременного пробуждения между баутами отражает, вероятно, природный механизм «подстраивания» структуры клетки к новым физиологическим условиям.

Таким образом, проведенное электронно-микроскопическое исследование и морфометрический анализ гепатоцитов печени сусликов в норме для трех физиологических состояний в период гибернации позволили выявить ряд отличий ультраструктуры клеток спящего животного от клеток животных, находящихся в активном и пробуждающемся состояниях (табл.8.1, рис.8.9.). Отмеченные особенности заключаются в возрастании объемной доли гетерохроматина ядра, жировых включений и гликогена, уменьшении среднего размера митохондрий при соответствующем достоверном увеличении их количества, появлении большего числа лизосомоподобных структур, частичной деструкции сетчатого аппарата.

Таблица 8.1.

Морфометрические характеристики компонентов ультраструктуры гепатоцитов для различных физиологических состояний суслика.

Морфометрические характеристики, %	Состояние		
	АС	ГС	ПС
Объемная доля митохондрий	$20,4 \pm 1,57$	$21,45 \pm 1,63$	$19,84 \pm 1,25$
Объемная доля гликогену	$1,91 \pm 0,17$	$3,37 \pm 0,21^*$	$1,49 \pm 0,11$
Объемная доля шероховатого ЕПР	$2,93 \pm 0,23$	$3,87 \pm 0,16^*$	$2,91 \pm 0,17$
Объемная доля гладкого ЕПР	$1,17 \pm 0,13$	$2,41 \pm 0,19^*$	$1,48 \pm 0,14$

* – достоверное ($p < 0,05$) отличие по сравнению с активным состоянием и пробуждением.

Как видно из таблицы, в гепатоцитах спящего животного относительный объем гликогена превосходит почти в 2 раза значение этого показателя у животных в активном и пробуждающемся состояниях. Естественнo предположить, что феномен накопления гликогена в печени связан с поддержанием жизненно важных функций в состоянии длительного оцепенения и обеспечения возможности эпизодического, в период баутов,

пробуждения от спячки. Об этом свидетельствует значительное снижение его объема сразу после пробуждения.

Хорошо известно, что этот полисахарид является важнейшим энергетическим компонентом клетки и обнаруживается не только в виде гранул, но и в комплексе с белками (различают прочно- и лабильно связанный гликоген). В электронном микроскопе выявляются мелкие частицы гликогена диаметром 10–14 нм. Группируясь, эти частицы образуют агрегаты диаметром 50–120 нм. Иногда в клетках встречаются более крупные, до 500–1000 нм, частицы, видимые и в оптическом микроскопе – γ -, β - и α -гранулы, соответственно. Локализуется гликоген в цитоплазматическом матриксе между его фибриллами и элементами эндоплазматической сети, однако во внутреннем объеме цистерн ЭПР гликоген не обнаруживается.

Возрастание объемных долей и сохранение относительно высокого соотношения между шероховатым и гладким ЭПР в состоянии глубокой спячки свидетельствует о сохранении высокой потенциальной возможности протекания синтетических процессов в клетках гибернаторов. Это подтверждается данными работ [131, 388], в которых указывается на интенсивное протекание белкового синтеза уже на начальных этапах пробуждения еще при пониженных температурах тела и его гиперактивацию на финишном этапе пробуждения. Высокое соотношение между шероховатым и гладким ретикулумом в большей степени характерно для гепатоцитов активного и пробуждающегося животных. Обращает на себя внимание также возрастание численных значений анализируемых параметров в состоянии спячки.

Мы провели также оценку геометрических параметров (площадь - S ; периметр - P ; максимальный и минимальный размеры - l_1 и l_2 соответственно, а также отношение площади к периметру - S/P) внутриклеточных органелл гепатоцитов для трех состояний животного (табл. 8.2).

Таблица 8.2.

Морфометрические характеристики органелл гепатоцитов суслика для трех состояний животного.

Активность		S(e=-7)	P(e=-2)	l₁(e=-3)	l₂(e=-3)	S/P(e=-5)
	М	0,74±0,039* CI=0,078	0,63±0,021 CI=0,041	0,86±0,038 CI=0,077	0,56±0,018 CI=0,036	0,12±0,004 CI=0,007
	Гх	0,38±0,028* CI=0,06	0,53±0,023 CI=0,05	0,57±0,032 CI=0,06	0,20±0,019 CI=0,04	0,62±0,033 CI=0,07
	ЭПР	1,17±0,03* CI=0,06	1,08±0,033 CI=0,065	0,89±0,045 CI=0,089	0,52±0,018 CI=0,036	1,06±0,028 CI=0,057
Спячка		S	P	l₁	l₂	S/P
	М	0,58±0,017 CI=0,034	0,55±0,016 CI=0,031	0,68±0,017 CI=0,033	0,45±0,008 CI=0,017	0,14±0,002 CI=0,005
	Гх	0,60±0,02 CI=0,05	0,75±0,041 CI=0,08	0,60±0,02 CI=0,05	0,35±0,008 CI=0,02	0,87±0,043 CI=0,09
	ЭПР	0,68±0,032 CI=0,063	0,63±0,115 CI=0,23	0,81±0,027 CI=0,054	0,31±0,013 CI=0,027	1,08±0,047 CI=0,093
Пробуждение		S	P	l₁	l₂	S/P
	М	0,62±0,037 CI=0,074	0,73±0,031 CI=0,062	1,08±0,062 CI=0,123	0,58±0,021 CI=0,042	0,71±0,012 CI=0,042
	Гх	0,57±0,02 CI=0,04	0,62±0,024 CI=0,05	0,61±0,03 CI=0,07	0,36±0,01 CI=0,02	0,96±0,03 CI=0,05
	ЭПР	0,84±0,018 CI=0,035	0,66±0,02 CI=0,04	1,05±0,028 CI=0,055	0,33±0,014 CI=0,028	1,24±0,02 CI=0,041

Обозначения: М – митохондрии, Гх – области гетерохроматина, ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

* – значения параметров для активного животного достоверно ($p < 0,05$) отличаются от состояния спячки и пробуждения.

Представленные на рис. 8.9 гистограммы морфометрического анализа компонентов ультраструктуры гепатоцитов также достаточно хорошо коррелируют с наблюдаемыми качественными различиями в ультраструктуре гепатоцитов. Увеличение в клетке доли конденсированного хроматина и повышение плотности кариоплазмы, свидетельствующие о снижении активности ядерного аппарата [140], являются характерным проявлением реакции клеток на различные экстремальные воздействия [32, 387].

Однако в нашем случае следует отметить, что сохранение размеров областей гетерохроматина ядра и после пробуждения на том же уровне, что и у животного в спящем состоянии (рис. 8.9), свидетельствует о меньшей

востребованности процессов, происходящих в ядре, нежели в цитоплазме при пробуждении и на первых этапах бодрствования.

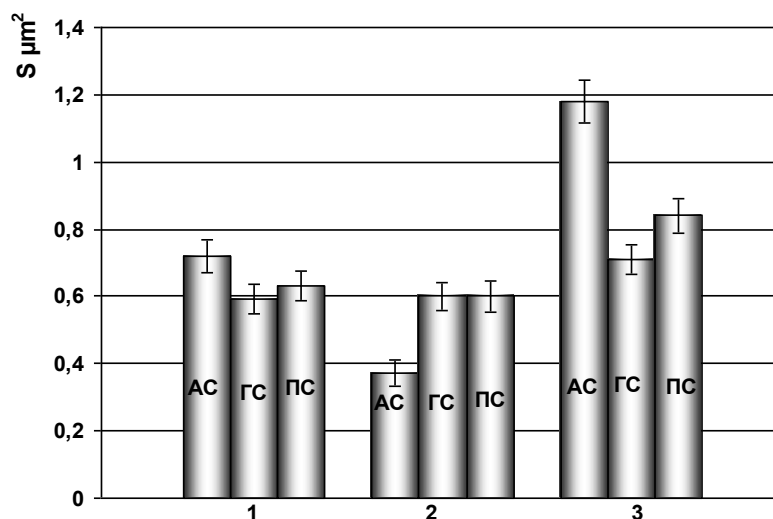


Рис. 8.9. Значения средней площади митохондрий (1), областей гетерохроматина ядра (2) и ЭПР (3) для трех (активность – АС, гибернация – ГС, пробуждение – ПС) состояний суслика.

Учитывая, что в состоянии спячки ткани животного испытывают состояние гипоксии, мы проанализировали окислительно–восстановительные ферменты в клетках печени сусликов при их различных физиологических состояниях. Выбор данных ферментов обусловлен их участием во внутриклеточных обменных процессах, протекающих в цитоплазме и митохондриях. В таблице 8.3 представлена активность исследованных нами ферментов в клетках печени, выраженная в условных оптических единицах, для 3–х состояний животных. Критерием для оценки интенсивности реакции служил диформаза – ярко окрашенный продукт реакции нитросинего тетразолия и фермента [389].

В клетках печени отложения диформаза имели типичный мелкокристаллический характер, с равномерным распределением в цитоплазме. Ни в одном из исследованных состояний животного мы не наблюдали изменения характера зерен, их агрегации, что дало возможность провести цитофотометрическое исследование.

Таблица 8.3.
Активность окислительно–восстановительных ферментов в усл. опт. ед. в клетках печени зимних сусликов.

Группы Ферменты	Активные животные	Спящие животные	Просыпающиеся животные
СДГ	89,3±1,03	74,3±1,37*	66,5±1,54**
ЛДГ	116,3±2,15	110,4±1,65	99,9±1,89**
α-ГФДГ	82,0±1,98	60,1±1,91*	91,1±2,22
НАД	55,2±1,44	60,2±1,90	54,5±1,83
НАДФ	54,7±0,90	81,5±1,48*	60,9±1,74

достоверное ($p < 0,05$) отличие активности ферментов:

* – спящего животного, по сравнению с активным и пробуждающимся.

** – пробуждающегося животного по сравнению с активным.

Анализ полученных данных и сравнительная оценка результатов исследований свидетельствуют о выраженной динамике в состоянии окислительно–восстановительных ферментов. Гистохимическая реакция на СДГ показала, что среднее значение удельной концентрации диформаза в печени спящих сусликов было достоверно снижено по сравнению с печенью активных. Значения удельной концентрации диформаза в реакции на ЛДГ в клетках печени животных свидетельствует о достоверном снижении активности этого фермента. спящих сусликов по сравнению с активными. Следует отметить, что активности этих двух ферментов у пробуждающихся животных достоверно снижены по сравнению с двумя другими состояниями.

Отмечено достоверное различие удельной концентрации диформаза в реакции на гликолитический фермент – α-ГФДГ в клетках печени для трех состояний, при этом минимальная активность наблюдалась у спящих, а максимальная – у пробуждающихся сусликов, что коррелирует с физиологическим состоянием животного (уровня его метаболизма).

В то же время активность коферментов НАД- и НАДФ-дегидрогеназ в клетках печени спящих животных достоверно выше, чем в группе активных

сусликов. Значения удельной концентрации диформаза для НАД-ДГ и НАДФ-ДГ составляли у активных сусликов $55,2 \pm 1,44$ и $54,7 \pm 0,90$ усл. опт. ед., тогда как для спящих животных эти величины равнялись $60,2 \pm 1,9$ и $81,5 \pm 1,48$ усл. опт. ед., соответственно.

Обнаруженные изменения активности ферментов в репрезентативных группах (активные и спящие суслики) свидетельствуют о выраженных структурно-функциональных изменениях в печени. Частично это может быть связано, как отмечалось ранее (Глава 7), со снижением влагосодержания тканей, что представляет собой один из механизмов обратимого перехода организмов из гипобиоза в активное состояние.

Представленные в настоящем разделе результаты не полностью согласуются с данными других авторов [134, 390], которые указывают на 20-кратное снижение интенсивности метаболизма в состоянии глубокой спячки, а также на 3-кратное уменьшение лактата в мозгу и 7-кратное – в печени. Гистохимическое изучение, проведенное нами, показало отсутствие столь резких различий при сохранении выраженной тенденции к снижению, а по отношению к кофакторам можно отметить даже достоверное увеличение их активности. Исследованная активность ряда окислительно-восстановительных ферментов в гепатоцитах гибернаторов показала хорошее соответствие с выявленными ультраструктурными особенностями клеток.

Таким образом, проведенные морфологические исследования позволяют заключить, что в гепатоцитах сусликов в состоянии гибернации не обнаружено каких-либо специфических клеточных перестроек или формирования структур, свойственных именно состоянию спячки. Однако, в совокупности, отмеченные различия (достоверное возрастание объемной доли гетерохроматина ядра, жировых включений и гликогена, уменьшение среднего размера митохондрий при соответствующем достоверном увеличении их количества, появление большего числа лизосомоподобных структур и частичная деструкция сетчатого аппарата) образуют картину

ультраструктуры клеток, характерную именно для спячки, а состояние ферментных систем подтверждают это.

8.2. Динамика морфологических изменений при гипотермическом хранении фрагментов печени сусликов в активном, спящем и пробуждающемся состояниях.

Изложенные выше результаты исследования показали, что структура клеток печени гетеротермов при подготовке и в состоянии спячки претерпевает ряд качественных и количественных изменений, обеспечивающих, вероятно, возможность их длительного нахождения и функционирования при гипотермических температурах. Рядом авторов при анализе структурных адаптационных изменений, происходящих в организме гетеротермов, было показано, что они и выделенные из них ткани и клетки способны длительное время сохранять устойчивость к ряду неблагоприятных воздействий, в том числе и пониженным температурам [122]. В этой связи, вопрос о том, каким образом клетки гибернаторов, адаптированные *in vivo* к гипотермическим температурам, будут реагировать *in vitro* на длительное хранение при 4°C, по-прежнему актуален и требует своего разрешения.

Нами проведено изучение структурных преобразований печени зимоспящих сусликов в трех состояниях – гибернации, пробуждении и активности, при ее гипотермическом хранении.

Для гипотермического хранения фрагменты печени помещали в стерильные пенициллиновые флаконы, содержащие 15 мл питательной среды 199, и хранили при температуре 4°C в течение 3, 6, 12, 24 часов и 4, 6, 10 суток. Во всех экспериментах контролем служили фрагменты печени животных, взятые сразу после декапитации, морфологическое состояние которых подробно изложено в предыдущих разделах данной главы.

При 3–6-часовом хранении фрагментов печени, взятых у животных в каждом из трех состояний, не выявлено существенных различий в

ультраструктуре по сравнению с гепатоцитами животных в исходном состоянии (см. рис. 8.1–8.7).

После 12 часов ГХ высокая степень сохранности структуры ткани наблюдалась как на морфологическом (рис. 8.10), так и на ультраструктурном (рис. 8.11 и 8.12) уровнях. По данным оптической микроскопии, для состояний спячки и пробуждения в структуре ткани гепатоциты располагаются относительно равномерно и по основным морфологическим признакам делятся на две группы клеток. Большая часть гепатоцитов – большие, неправильной формы клетки со светлой, крупнодисперсной цитоплазмой и округлым, светлым ядром, в нуклеоплазме которого определяются глыбки хроматина.

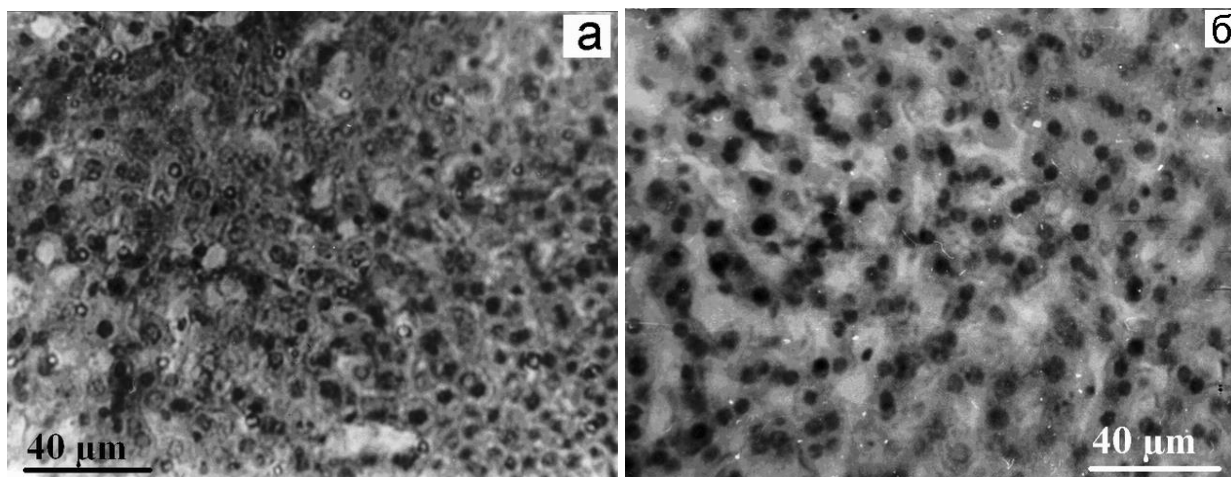


Рис. 8.10. Морфология печени суслика в спящем (а) и пробуждающемся (б) состояниях через 12 часов гипотермического хранения.

Вторая, меньшая часть гепатоцитов характеризуется неправильной, фибробластоподобной формой клеток и уплотненной цитоплазмой, в которой обнаруживаются гранулы. Ядро этих гепатоцитов преимущественно овальной формы, с умеренно плотным хроматином, равномерно распределенным в ядре. Значительное количество клеток со светлой цитоплазмой и вытянутым ядром, которые можно расценивать как активированные макрофаги, локализуется между гепатоцитами.

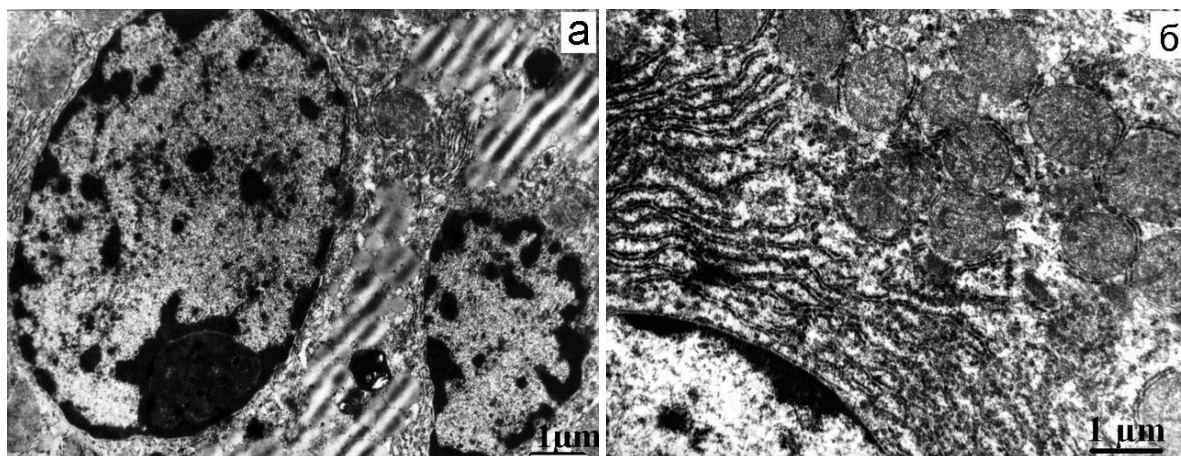


Рис. 8.11. Ультраструктура гепатоцитов печени суслика в спящем (а) и пробуждающемся (б) состояниях через 12 часов гипотермического хранения.

Ультраструктурные исследования свидетельствуют, что после 12-часового хранения клетки сохраняют округлую форму ядра и характерное для него узкое, равномерной ширины перинуклеарное пространство. Конденсированный хроматин концентрируется узкой лентой вдоль внутренней ядерной оболочки и в виде небольших скоплений локализован вблизи ядрышка. В цитоплазме зернистая эндоплазматическая сеть представлена уплощенными канальцами, находящимися вблизи ядра и митохондрий. Часть канальцев образуют ориентированные скопления, мембраны которых теряют четкость структуры. Митохондрии имеют мелкогранулярный матрикс (рис. 8.11, б). В клетках спящих животных сохраняется высокое исходное количество жировых включений (рис. 8.11, а).

При данном сроке хранения клеток животного в активном состоянии значительная часть гепатоцитов крупные, полигональной или отростчатой формы клетки с эухроматиновым округлым ядром и четким контуром ядрышек (рис. 8.12, а). Это свидетельствует о сохранении морфологических признаков активного морфофункционального состояния клеток. Встречается малое количество гепатоцитов с плотным хроматином. В межклеточных пространствах обнаруживаются гипертрофированные макрофаги.

По данным электронно-микроскопического исследования, при 6–12- часовом сроке хранения гепатоциты печени активного животного ограничены четкой плазматической мембраной (рис. 8.12, б). Ядро гепатоцитов имеет, как и в норме, практически сферическую форму и занимает в клетке обычно центральное положение. Большую часть ядерного объема составляет эухроматин. Гетерохроматин располагается по периферии ядра тонким слоем неравномерной ширины. Ядрышки в ядре гепатоцита имеют глобулярно-фибриллярную структуру и локализуются в любом его участке, как на периферии, так и в центре клетки.

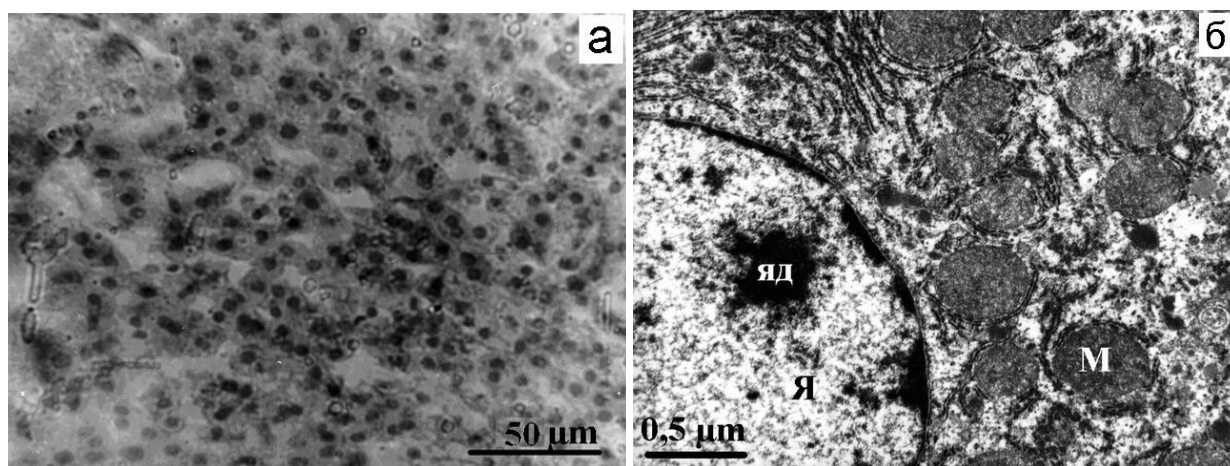


Рис. 8.12. Морфологическое состояние (а) и ультраструктура фрагмента гепатоцита (б) печени активного суслика через 12 часов гипотермического хранения. Обозначения: М - митохондрии, Яд - ядрышко

Зернистая эндоплазматическая сеть в виде узких канальцев хаотически располагается по всей клетке или в непосредственной близости от митохондрий. Митохондрии округлой или овальной формы, с четкой двойной мембраной. Перпендикулярно ориентированные кристы отчетливо выражены. В цитоплазме определяются глобулярные и везикулярные структуры

Через 24 часа гипотермического хранения фрагментов печени спящего и пробуждающегося сусликов наблюдается частичное сохранение балочной

структуры и разделение гепатоцитов по плотности внутриклеточного матрикса на 2 вида – светлые и темные клетки, располагающиеся группами (рис. 8.13). Большая часть клеток – светлые гепатоциты, содержат крупные ядра с крупноглыбчатым хроматином и ядрышком. Меньшая часть – темные гепатоциты, имеющие плотное ядро, отросчатую форму, окружены перицеллюлярными просветлениями. Обнаруживаются двуядерные гепатоциты. Межбалочные пространства, в связи с плотным расположением клеток, слабо определяются (рис. 8.13, б).

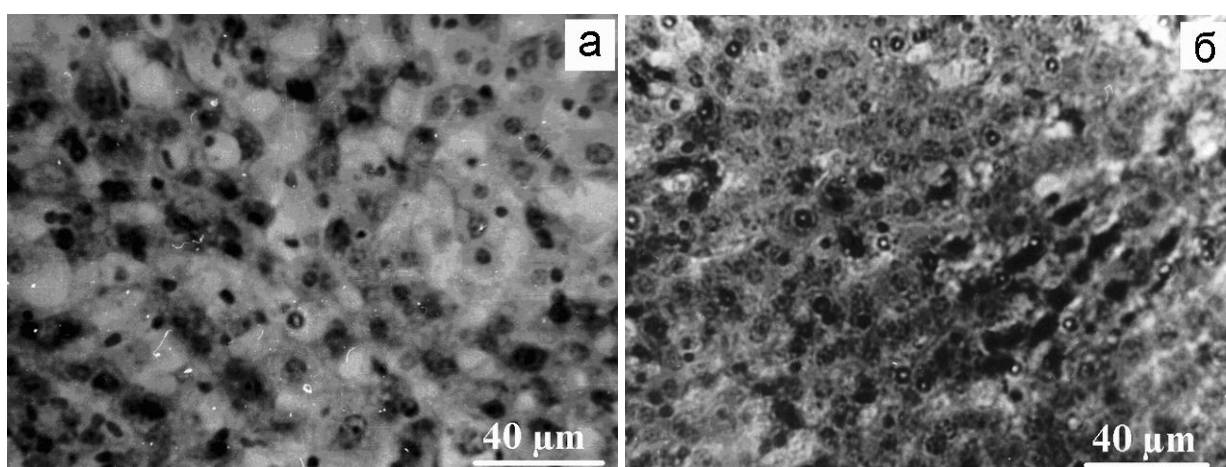


Рис. 8.13. Морфология печени суслика спящего (а) и пробуждающегося (б) через 24 часа гипотермического хранения.

Через 24 часа гипотермического хранения фрагментов печени активных животных балочная структура менее выражена, хотя межклеточные щели имеют четкие границы. Наблюдается гетерогенность структуры цитоплазмы и ядра (рис. 8.14, а). Для основной массы гепатоцитов характерно значительное (до 30 %) варьирование размеров ядра и плотности нуклеоплазмы. Сохраняется также большое количество двуядерных гепатоцитов. В межклеточных пространствах присутствуют единичные печеночные макрофаги со светлым ободком цитоплазмы и округлым гиперхромным ядром.

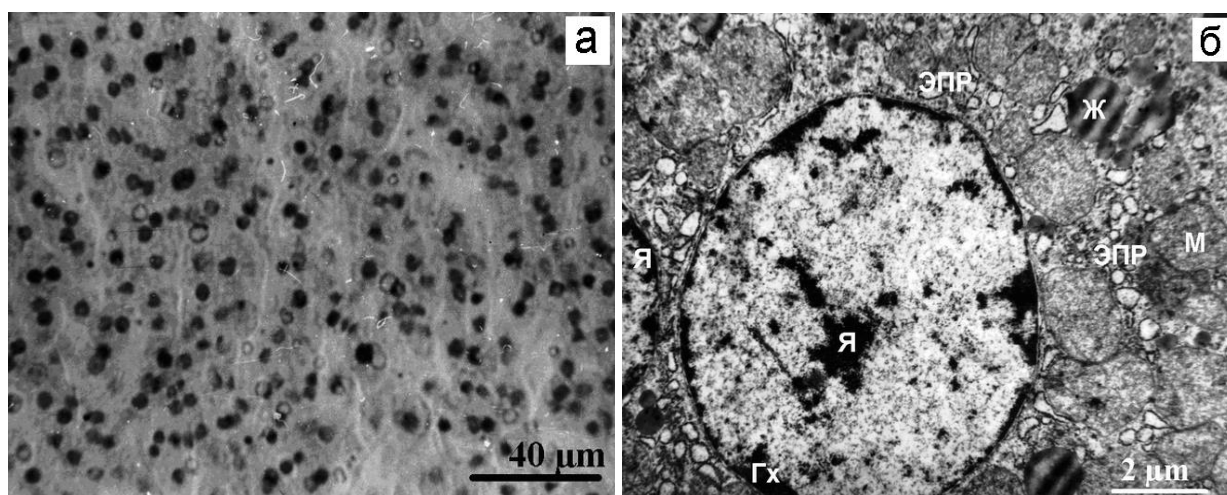


Рис. 8.14. Морфологическое состояние (а) и ультраструктура фрагмента гепатоцита (б) печени активного суслика через 24 часа гипотермического хранения. Обозначения: М – митохондрии, Я – ядро, Гх – гетерохроматин ядра, Ж – жировые капли, ЭПР – везикулоподобные фрагменты ретикулума.

Данные электронной микроскопии свидетельствуют, что через 24 часа хранения гепатоциты активного животного характеризуются полигональной формой, ограничены четкой плазматической мембраной. Зернистая эндоплазматическая сеть представлена, как правило, узкими канальцами, хаотически распределенными по всей цитоплазме. Однако, в некоторых клетках (10–15%) присутствуют неравномерно расширенные и заполненные хлопьевидным материалом канальцы ЭПР. Ультраструктура митохондрий и характер их распределения внутри клеток не претерпевают изменений – сохранена их геометрия, четкая двойная мембрана, матрикс средней электронной плотности. В то же время, в гепатоцитах активных и пробуждающихся животных при данном сроке ГХ с большей вероятностью обнаруживаются органеллы с просветленными участками матрикса и без четкой упорядоченной организации крист (рис. 8.14, б).

Морфологическое состояние ядерного аппарата гепатоцитов при 24-часовом хранении печени, в основном, сохраняется без изменений в случае спящего суслика (рис. 8.15) и претерпевает некоторые изменения в случае активного и пробуждающегося животных. Эти изменения заключаются в

эксцентричном или примембранном расположении ядрышек, локальном расширении перинуклеарного пространства и увеличении доли конденсированного хроматина, наблюдаемого в виде крупных глыбок, равномерно распределенных по нуклеоплазме.

После 4-х суток ГХ фрагментов печени сусликов практически при всех состояниях животного балочная структура печени слабо выражена. Гепатоциты плотно прилежат друг к другу, образуя большие скопления, между которыми иногда выявляются неравномерной ширины участки межбалочного пространства, содержащие одиночные гипертрофированные макрофаги. Контур цитолеммы определяется слабо. Цитоплазма преимущественно крупнодисперсная. Ядра крупные, округлые или овальные, с неровным контуром и глыбками хроматина в маргинальной зоне (рис. 8.16; 8.17; 8.19). Ядрышки определяются не во всех гепатоцитах.

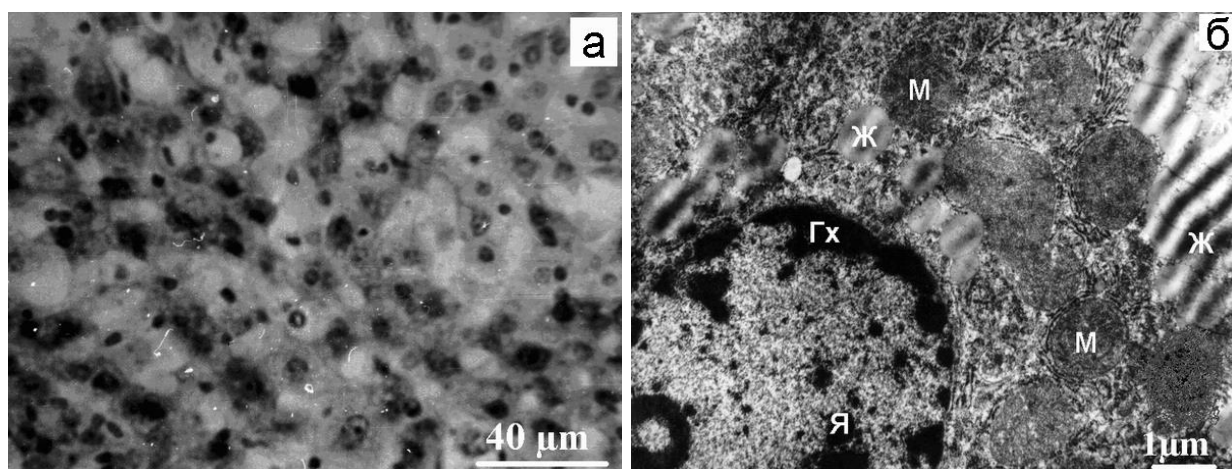


Рис. 8.15. Морфологическое состояние (а) и ультраструктура фрагмента гепатоцита (б) печени спящего суслика через 24 часа гипотермического хранения. Обозначения: М – митохондрии, Я – ядро, Гх – гетерохроматин ядра, Ж – жировые капли.

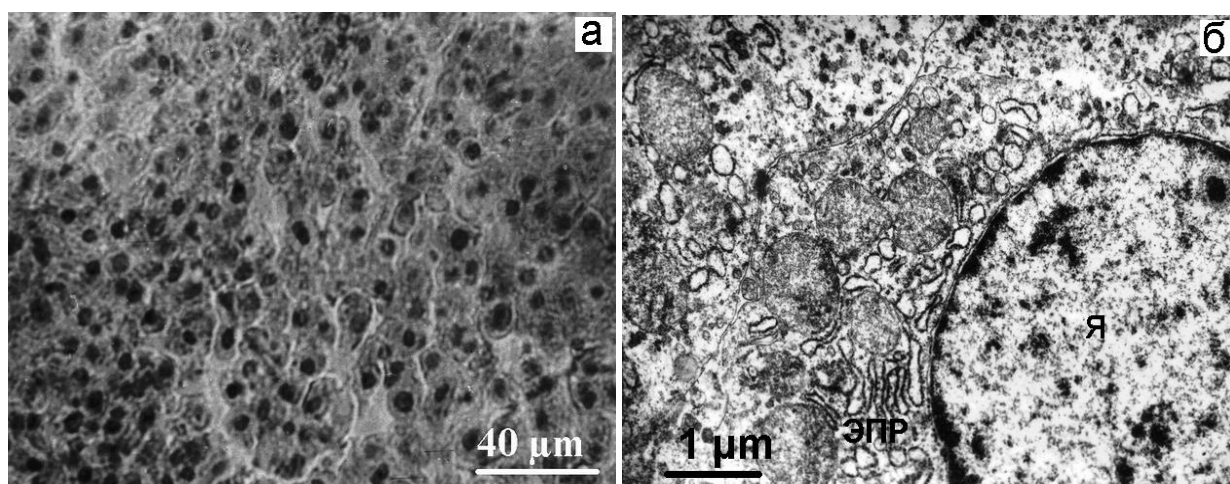


Рис. 8.16. Морфологическое состояние (а) и ультраструктура гепатоцитов с характерной фрагментацией и везикуляцией ЭПР (б) печени активного суслика через 4 суток ГХ.

Таким образом, после 4-х суток гипотермического хранения фрагментов печени гетеротермного млекопитающего для ее морфологической структуры характерны потеря четкости границы между гепатоцитами, неравномерная плотность и появление начальных признаков вакуолизации цитоплазмы, а также изменение формы ядра – свидетельства существенных проявлений внутриклеточной деструкции. Эти процессы, проявляющиеся в разной степени для печени животных в трех физиологических состояниях, в значительной степени связаны с выравниванием осмотических градиентов и, как следствие, набуханием клеток.

По данным электронно-микроскопического исследования, ядра гепатоцитов спящего животного к 4-м суткам хранения еще сохраняют округлую или овальную форму и ровный, без расширения межмембранного пространства контур нуклеолеммы (рис. 8.17–8.19, а). По сравнению с исходным состоянием наблюдается незначительное (до 5%) возрастание объемной доли гетерохроматина. Небольшие его скопления появляются, с большей вероятностью, во внутреннем объеме ядра, а также вблизи ядерной

мембраны. Структура ядрышка плотная, с участками просветлений между глобулярными и фибриллярными компонентами

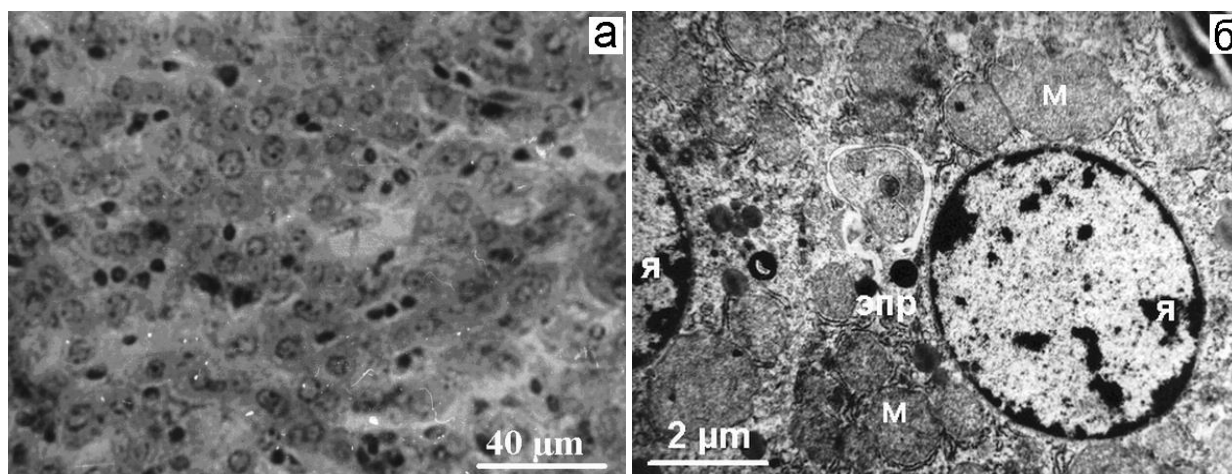


Рис. 8.17. Морфологическое состояние (а) и ультраструктура (б) гепатоцитов печени спящего суслика через 4 суток ГХ.

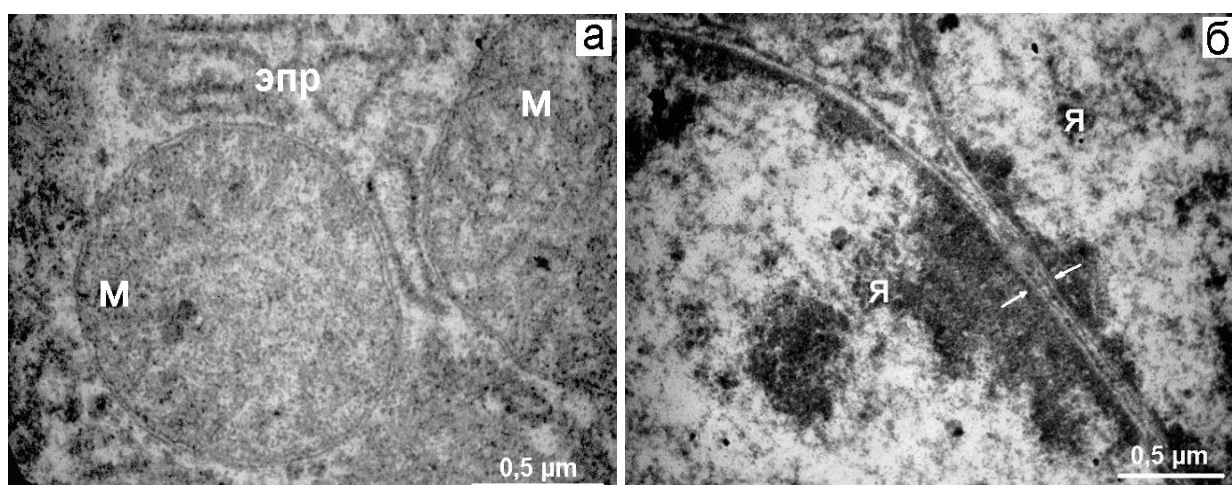


Рис. 8.18. Печень спящего суслика после 4-х суток ГХ. Ультраструктура митохондрий и сети ЭПР: изменение характера взаимного расположения канальцев сети и митохондрий (а); высокий уровень сохранности нуклеолеммы двуядерного гепатоцита (б). Стрелками отмечен участок плотного контакта двух ядер (Я).

Для структуры ЭПР характерны начальные проявления фрагментации, что наблюдается в изменении взаимного расположения канальцев сети и

митохондрий (рис. 8.18, а). Митохондрии с плотным, равномерным матриксом и цельной, двухслойной мембраной содержат фрагменты крист (рис. 8.18, а). Внутренний сетчатый аппарат состоит из мелких везикулярных образований.

Сравнение ультраструктуры клеток печени, взятой у животных в состоянии бодрствования (рис. 8.16, б), пробуждения (рис. 8.19, б) и спячки (рис. 8.17, б; 8.19, а), свидетельствует о существенном различии их морфологии после 4-х суток ГХ. Для ультраструктуры гепатоцитов суслика в состоянии бодрствования характерны практически полная фрагментация и везикуляция элементов ЭПР, сопровождаемые отделением рибосом и, как следствие, потерей возможности синтеза белка, а также расширение перинуклеарного пространства и просветление цитоплазматического и митохондриального матриксов.

Для гепатоцитов пробуждающегося животных типичным является наличие митохондрий с просветленными участками матрикса и без четкой упорядоченной организации крист (рис. 8.19, б). Возрастает число ядер с изрезанным контуром и увеличенным объемом гетерохроматина.

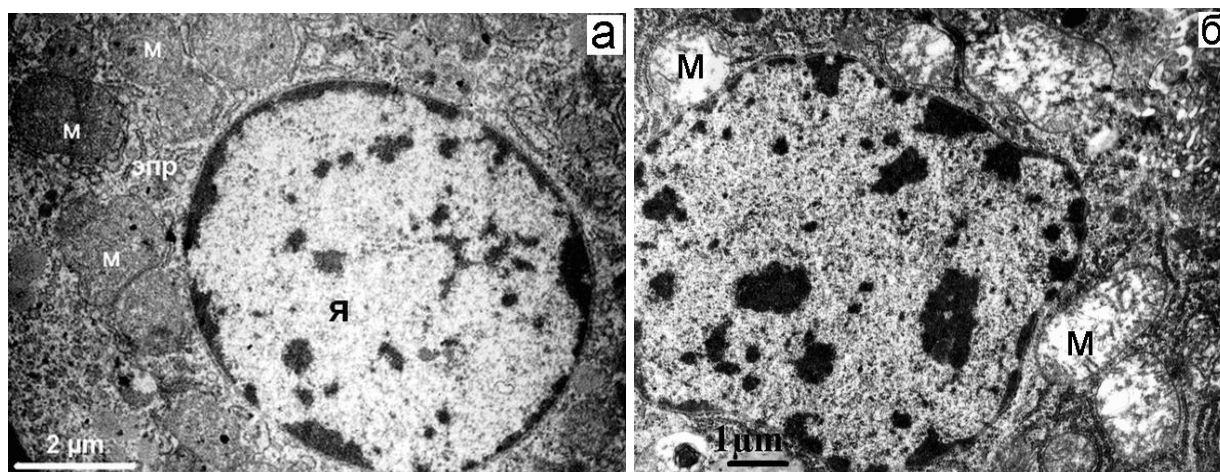


Рис. 8.19. Ультраструктура гепатоцитов печени суслика спящего (а) и пробуждающегося (б) через 4 суток ГХ.

Одним из морфологических критериев сохранности ткани является состояние эндотелия сосудистой системы. Состояние ультраструктуры

эндотелия капилляров и прилежащих к ним фрагментов гепатоцитов печени спящего и пробуждающегося сусликов на 4-е сутки ГХ свидетельствует о нарушениях в их тонкой структуре. Наиболее характерным для синусоидов печени спящего животного является их сужение. Просветы синусоидов содержат хлопьевидный материал, а в некоторых случаях и нарушенные клетки эндотелия (рис. 8.20, б). В то же время, у абсолютного большинства синусоидов хорошо просматриваются ядра эндотелиоцитов и округлой формы клетки Купфера.

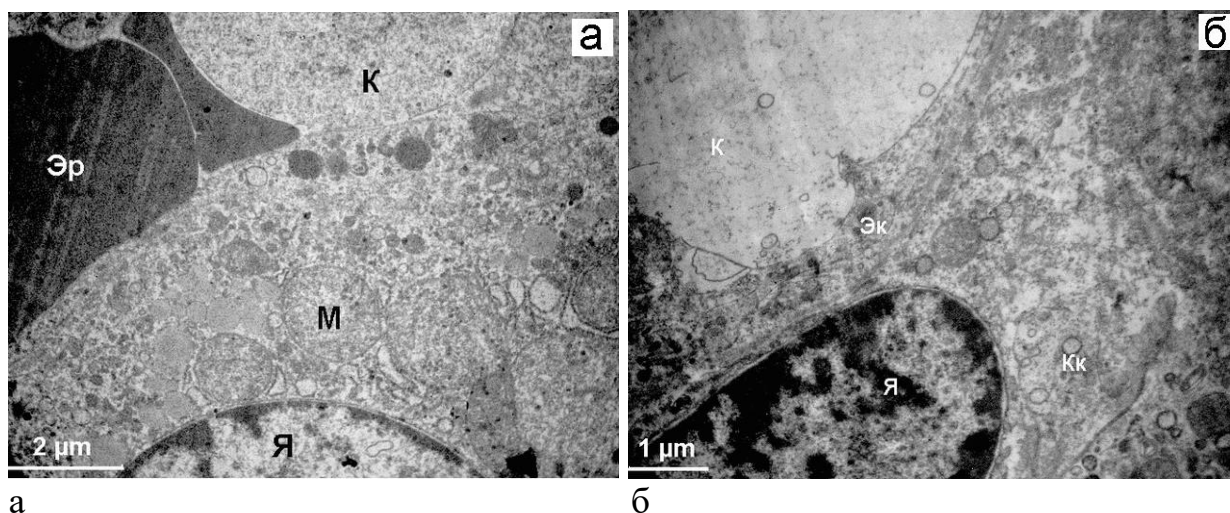


Рис. 8.20. Состояние эндотелия капилляров печени и прилежащих к ним фрагментов гепатоцитов на 4-е сутки ГХ печени суслика спящего (а) и пробуждающегося (б). Обозначения: М – митохондрии, Эк – эндотелиальная клетка, кК – клетка Купфера, Эр – эритроцит в просвете капилляра (К), Я – ядро.

Таким образом, после 4-х суток хранения для ультраструктуры гепатоцитов сусликов, находящихся в трех физиологических состояниях периода гибернации, характерно качественное и количественное возрастание изменений, отмеченных для 24-часового срока хранения и наиболее выраженных у гепатоцитов активного и пробуждающегося животных. Об этом свидетельствуют и данные морфометрического анализа (таблица 8.3; рис. 8.21). Как следует из рисунка 8.21, для митохондрий гепатоцитов

гибернатора в трех состояниях характерно увеличение площади по сравнению с контролем (рис. 8. 9), что свидетельствует об их набухании. В то же время двух-, трехкратное уменьшение средней площади ЭПР для изученных состояний животного свидетельствует о фрагментации и везикуляции ЭПР. Изменения в структуре ядра имеют разнонаправленный характер для различных состояний животного. Максимальный размер областей гетерохроматина на 4-е сутки хранения наблюдается у гепатоцитов печени активного животного.

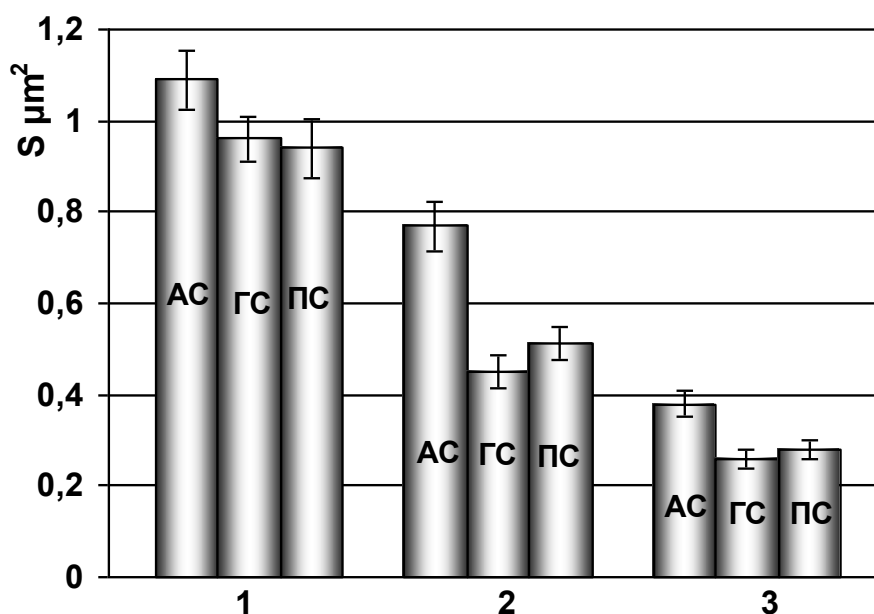


Рис. 8.21. Значения средней площади митохондрий (1), областей гетерохроматина ядра (2) и ЭПР (3) гепатоцитов после 4-х сут. хранения для трех состояний суслика (активность – АС, гибернация – ГС, пробуждение – ПС).

В двух других состояниях размеры площадей гетерохроматина были значительно меньше (рис. 8.21), что хорошо согласуется с данными об ультраструктурном состоянии клеток.

Таблица 8.3.

Морфометрические характеристики органелл гепатоцитов суслика для трех состояний животного после 4-х суток гипотермического хранения.

Активное		S(e=-7)	P(e=-2)	$l_1(e=-3)$	$l_2(e=-3)$	S/P(e=-5)
	М	1,09±0,045* CI=0,091	0,61±0,021 CI=0,042	0,89±0,024 CI=0,048	0,72±0,022 CI=0,044	1,79±0,024 CI=0,049
	Гх	0,77±0,038* CI=0,08	0,76±0,057 CI=0,11	0,69±0,036 CI=0,07	0,38±0,06 CI=0,03	0,24±0,049 CI=0,1
	ЭПР	0,38±0,008* CI=0,016	0,51±0,017 CI=0,033	0,35±0,009 CI=0,017	0,23±0,004 CI=0,007	0,93±0,026 CI=0,051
Гиберация	М	0,96±0,041 CI=0,08	0,69±0,033 CI=0,07	0,94±0,041 CI=0,08	0,68±0,024 CI=0,05	1,48±0,024 CI=0,05
	Гх	0,45±0,027 CI=0,05	0,84±0,056 CI=0,11	0,58±0,03 CI=0,06	0,28±0,013 CI=0,03	0,70±0,039 CI=0,08
	ЭПР	0,26±0,008 CI=0,02	0,49±0,024 CI=0,05	0,33±0,014 CI=0,03	0,19±0,004 CI=0,01	0,69±0,024 CI=0,05
Пробуждение	М	0,94±0,047 CI=0,09	0,88±0,047 CI=0,09	1,2±0,074 CI=0,15	0,78±0,029 CI=0,06	1,18±0,033 CI=0,07
	Гх	0,51±0,021 CI=0,04	0,79±0,057 CI=0,11	0,77±0,029 CI=0,06	0,34±0,011 CI=0,02	0,84±0,030 CI=0,06
	ЭПР	0,28±0,01 CI=0,02	0,52±0,024 CI=0,05	0,36±0,011 CI=0,02	0,23±0,004 CI=0,01	0,68±0,022 CI=0,04

Обозначения: М – митохондрии, Гх – области гетерохроматина, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, Я – ядро.

* – значения параметров для активного животного достоверно ($p < 0,05$) отличаются от состояния спячки и пробуждения

После 6–10-и суток хранения фрагментов печени спящего животного в макроскопической структуре ткани и гепатоцитов наблюдаются уже существенные проявления деструкции – потеря четкости границ между гепатоцитами и появление в цитоплазме вакуолеподобных образований, а также ядер неправильной формы с неровным контуром. Данные электронной микроскопии свидетельствуют, что у большинства гепатоцитов в ядрах перинуклеарное пространство неравномерной ширины, грубодисперсный эухроматин распределен по всей нуклеоплазме, а глыбки гетерохроматина были локализованы около внутренней ядерной мембраны, плотно контактируя с ней. Эндоплазматическая сеть представлена набухшими, расширенными цистернами. Для митохондрий характерен просветленный

матрикс, в котором большинство крист без четкой упорядоченной организации. В некоторых митохондриях определялись участки деструкции наружной и внутренней ядерной мембран. В составе внутреннего сетчатого аппарата преобладали вакуолеобразные и везикулярные структуры. У части клеток активных и пробуждающихся животных уже на 6-е сутки ГХ, помимо отмеченных выше, наблюдались изменения, проявляющиеся в разрушении цитолеммы, выходе гиалоплазмы во внеклеточное пространство, вакуолизации органелл цитоплазмы (рис. 8.22).

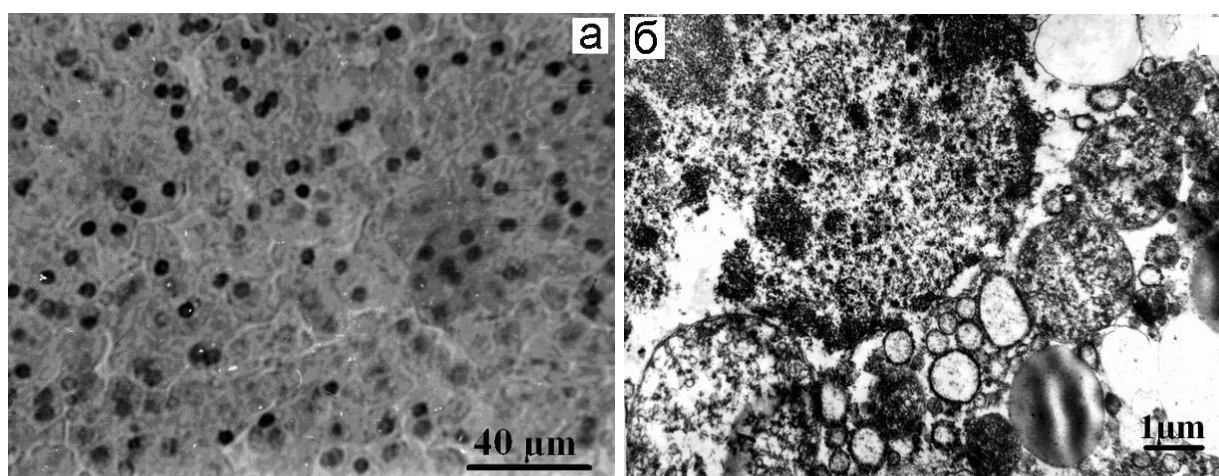


Рис. 8.22. Морфологическое (а) и ультраструктурное (б) состояние клеток печени пробуждающегося суслика после 6 суток гипотермического хранения.

10-суточное гипотермическое хранение печени вносит существенные изменения в макроскопическую структуру ткани печени и в ультраструктуру гепатоцитов. Клетки спящих животных (рис. 8.23, в, г) обладают более высокой устойчивостью к длительному ГХ и сохраняют еще достаточно хорошо идентифицируемую ультраструктуру, по сравнению с гепатоцитами активных и пробуждающихся животных (рис. 8.23, а, б). Дезорганизация структуры печени в виде вакуолизации и фрагментации органелл цитоплазмы – типичная морфологическая картина ткани в этих состояниях.

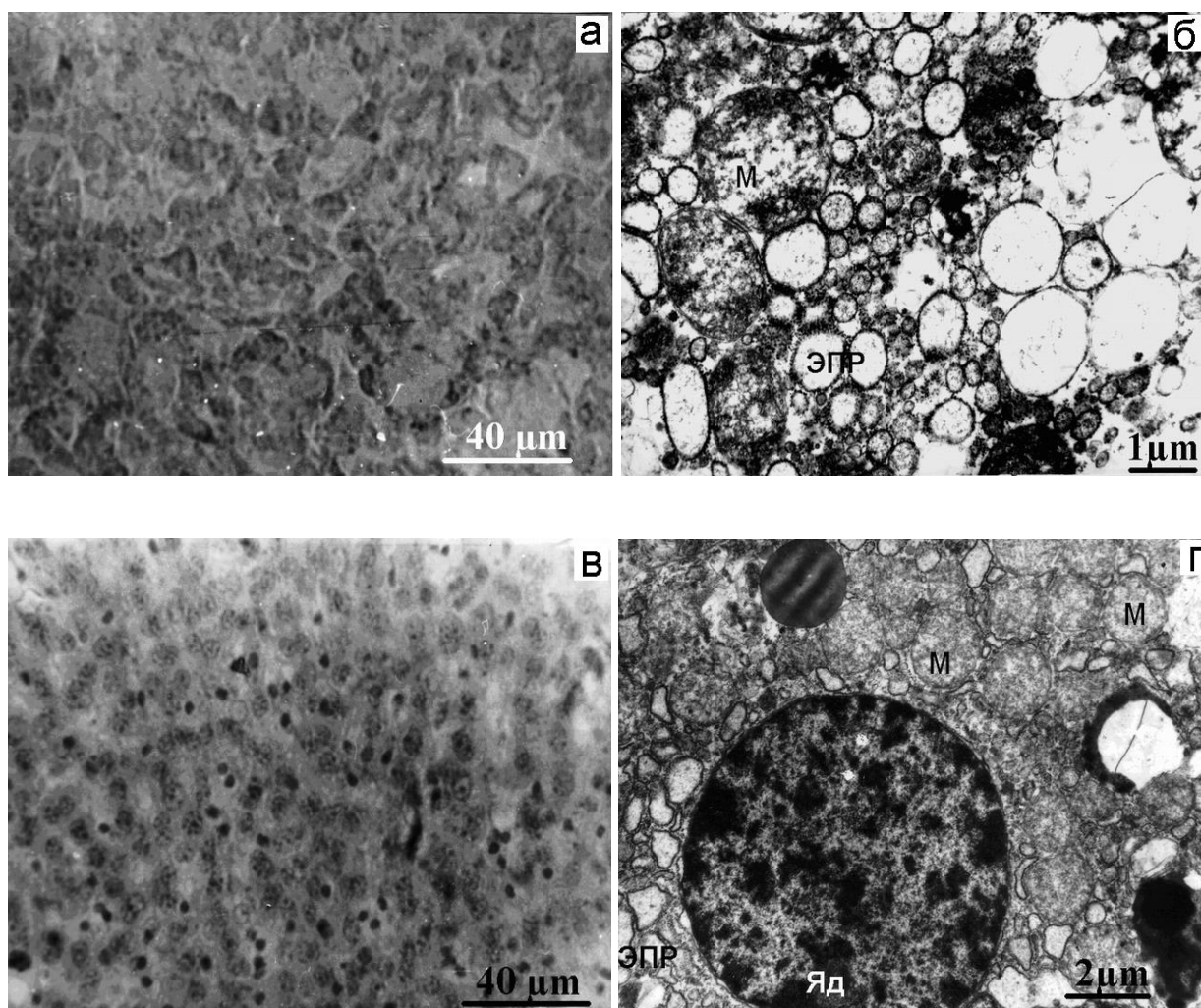


Рис. 8.23. Морфологическое состояние (а, в) и ультраструктура фрагментов гепатоцитов (б, г) печени пробуждающегося (а), активного (б) и гибернирующего (в, г) суслика после 10 суток ГХ. Обозначения: М – митохондрии, Яд – ядрышко, ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

Таким образом, сравнение морфологии ткани печени, взятой у контрольных животных, находящихся в состояниях спячки, пробуждения и активности, показало отсутствие принципиальных различий в их макро- и ультраструктуре. В то же время электронно-микроскопические исследования гепатоцитов печени сусликов в норме для трех состояний, а также морфометрический анализ, тем не менее, позволили достоверно выявить ряд отличий ультраструктуры клеток спящего животного от клеток животных в активном и пробуждающемся состояниях. Эти особенности, как отмечалось,

закljučаются в возрастании у спящего суслика объемной доли конденсированного хроматина и жировых включений в цитоплазме клеток, уменьшении среднего размера митохондрий при соответствующем, достоверном возрастании их количества, появлении большего числа лизосомоподобных структур, частичной везикуляции сетчатого аппарата. Увеличение доли конденсированного хроматина и повышение плотности кариоплазмы свидетельствуют о снижении активности ядерного аппарата, что характерно для клеток многих гибернаторов в состоянии спячки [140], и проявляется при реакции различных клеток на экстремальные воздействия [387]. Ранее был отмечен ряд характерных признаков в клетках желудка гибернаторов во время зимней спячки, наиболее выраженными из которых являются: уменьшение размеров клеток почти в 2 раза, уплотнении ядер и уменьшении ядрышек, вакуолизации аппарата Гольджи, увеличение количества свободных рибосом и лизисом, разрушение митохондрий [138]. Столь выраженные изменения клеток желудочно-кишечного тракта связаны с практически полным отключением пищеварительной системы от выполнения своей функции в период зимней спячки.

Таким образом, изучение влияния температурного фактора на состояние печени сусликов, находящихся в различных физиологических состояниях, позволило проследить последовательность деградации макро- и ультраструктуры в процессе гипотермического хранения.

■ По данным оптической микроскопии, в первую очередь, происходят изменения межклеточных взаимосвязей, степень выраженности которых пропорциональна длительности хранения. Наиболее характерными из них являются нарушения балочной организации структуры органа и неравномерное расширение межбалочного пространства, наблюдаемые уже на 4-е сутки ГХ. Практически для всех изученных состояний животного отмечается возрастание доли двуядерных гепатоцитов и сохранение просветленного матрикса у основной массы клеток в интервале 12–24 часа хранения, что может свидетельствовать о сохранении в ткани в этот период

некоторой активности клеточных процессов. Для этих и более длительных сроков хранения характерно разделение гепатоцитов по морфологическим признакам – различию по степени плотности цитоплазмы и ядра и по форме клеток.

- Электронно-микроскопические исследования позволили установить, что в процессе длительного хранения в клетках печени происходит набухание и частичная деструкция мембран зернистой эндоплазматической сети, что приводит к возрастанию количества свободных рибосом. Набухание митохондрий сопровождается просветлением матрикса и разрушением крист. В составе внутреннего сетчатого аппарата преобладают вакуолеобразные и везикулярные структуры. В ядрах клеток изменяется соотношение между гетеро- и эухроматином, с увеличением доли конденсированных участков. По мере увеличения сроков хранения (4 суток и более) наблюдается изменение формы ядра, увеличение объема межмембранного (перинуклеарного) пространства. Изменения в ядрышке менее выражены и регистрируются на более поздних сроках хранения в виде нарушения связей между филаментными и зернистыми структурами.

- Прослеженная нами последовательность изменений ультраструктуры гепатоцитов гетеротермного млекопитающего при гипотермическом хранении печени позволила установить, что по степени лабильности внутриклеточные органеллы располагались следующим образом: митохондрии $\geq$ эндоплазматическая сеть $>$ ядерный аппарат.

- В отличие от гомойотермных организмов, у которых выраженные изменения в клетках наблюдались уже к 18–24-м часам хранения, клетки печени гетеротермов сохраняют относительно устойчивую ультраструктуру в течение более длительных сроков хранения: до 24–48 часов у животных в активном и пробуждающемся состояниях и до 4-х суток у спящих животных.

ГЛАВА 9. МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ ПОСЛЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО ХРАНЕНИЯ В СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА И pH И НОРМОТЕРМИЧЕСКОЙ РЕПЕРФУЗИИ. ПРИЗНАКИ ПОВРЕЖДЕНИЯ И СОХРАННОСТИ ПЕЧЕНИ.

В последние два десятилетия достаточно много внимания уделяется разработке и подбору сред для гипотермического хранения (ГХ) клеточных суспензий, фрагментов тканей, а также целых органов [24 65, 68, 72]. Предложенный Ж. Коллинз с соавт. еще в 1969 году раствор внутриклеточного типа (Евро-Коллинз) для насыщения и последующего хранения печени получил широкое признание в конце 70-годов и послужил основой для дальнейшего совершенствования сред для ГХ [40].

Среда хранения, разработанная в Университете Висконсин (UW) и признанная в настоящее время наиболее универсальной для консервации почек, печени, сердца, поджелудочной железы, легких [55, 65, 96, 98, 99, 391], позволила значительно увеличить сроки хранения органов, обеспечив при этом достаточно высокое качество сохранности их основных структурно-функциональных параметров.

Однако высокая стоимость и многокомпонентность состава этой среды предполагают поиск новых, более простых и эффективных сред для ГХ органов. В работах зарубежных авторов, а также сотрудников нашего института на изолированных гепатоцитах и целом органе были проанализированы различные среды для ГХ [26, 68, 69, 72, 95, 101, 102, 392, 393].

Анализ данных работ позволил сделать несколько выводов:

- длительность ГХ зависит от качественного состава и pH среды;
- Na^+ - и K^+ -содержащие среды не эффективны для длительного ГХ гепатоцитов. Среда, содержащая изотоническую сахарозу, сбалансированную по основным солевым компонентам, и 1% сывороточный альбумин более благоприятна для хранения изолированных гепатоцитов при 4°C.

– считается, что 48 часов ГХ является критическим сроком для поддержания метаболического равновесия изолированных гепатоцитов, хотя однозначности в данном вопросе не существует.

– данные о состоянии ультраструктуры гепатоцитов в процессе хранения фрагментов печени или целого органа практически отсутствуют.

В то же время известно, что длительное воздействие гипотермии приводит к развитию в клетках и тканях прогрессирующих патологических изменений, вызывающих отек и гибель органа [62, 392]. Первичным ответом клеток печени на изменение тоничности среды в условиях снижения температуры является их осмотическое набухание. Важным фактором в увеличении степени сохранности органов играет состав консервирующих сред, а также возможность их модификации эффективными микродобавками. Удлинение сроков гипотермического хранения органов может быть достигнуто, главным образом, путем оптимизации методов перфузии и состава консервирующих растворов [40, 65, 364].

В результате экспериментальных исследований установлено, что важным условием для предотвращения отека органа при холодовом хранении является использование в консервирующих растворах слабо проникающих в клетку соединений [72, 394].

В соответствии с нашими данными (гл. 4), гипотермическое хранение эритроцитов в слабозлектролитных средах с пониженным значением рН, вызывая незначительное набухание клеток, обеспечивает, тем не менее, высокий уровень сохранности их формы в более длительном (до 2–5 сут.) периоде и практически полное восстановление морфологии клеток при их переносе в физиологические условия. Это предполагает возможность использования сахарозо- и маннитолсодержащих сред с пониженной кислотностью для краткосрочного гипотермического хранения изолированной печени.

Нами проведен сравнительный анализ морфологического состояния изолированной печени крыс, хранившейся при гипотермии в средах

различного состава в течение 1 и 24 часов, а также после ее нормотермической реперфузии (НТРП).

Нормотермическая реперфузия печени может являться в известной степени моделью трансплантации и служить в качестве метода оценки функционального состояния органа. Такая процедура позволяет выявить нарушения, развивающиеся на этапе гипотермического хранения, а также оценить способность органа к восстановлению и поддержанию своего гомеостаза после холодовой ишемии в условиях, приближенных к физиологическим.

В качестве растворов для гипотермического хранения печени мы использовали общепринятую UW-среду [40, 96], сахарозо–содержащую среду (СС), состоящую из 260 мМ сахарозы, 14 мМ KCl, 1 мМ NaCl, 3 мМ CaCl₂; pH 7,4 [64, 392, 396] и маннитсодержащую среду (МС), в состав которой входит 260 мМ маннита, 14 мМ KCl, 1 мМ NaCl, 3 мМ CaCl₂; pH 5,4 [395].

После 1- и 24-часового ГХ изолированной печени в средах UW и МС, орган подвергался 60-минутной НТРП (37°C) минимальным солевым раствором Кребс-Рингер-бикарбонат (pH 7,4), который предварительно (3 мин) насыщался карбогеном и дополнительно содержал HEPES (10 мМ), глюкозу (5 мМ).

В норме паренхима печени крыс характеризуется типичным трабекулярным строением печеночных долек с радиальным расположением печеночных балок вокруг центральных вен (рис. 9.1, а). Гепатоциты имеют, как правило, полигональную форму, округлые ядра, в которых определяются ядрышки и хроматин различной плотности. Цитоплазма характеризуется мелкозернистой структурой, содержит клеточные органеллы и мелкие жировые включения (рис. 9.1, б). В центролобулярных отделах долек обнаруживаются гепатоциты с двумя ядрами, а также единичные делящиеся и распадающиеся клетки. Стромальные элементы печени представлены слабо развитой междольковой соединительнотканной прослойкой, которая в

большей степени просматривается в портальной (или воротной) зоне, где располагаются воротная вена, печеночная артерия, желчный проток и лимфатический сосуд. Микрогемодикуляторное русло печени образовано синусоидами – капиллярами, выстланными эндотелием открытого типа, где преобладают клетки вытянутой формы, тесно контактирующие с поверхностью гепатоцитов, а также клетки Купфера (печеночные макрофаги, звездчатые эндотелиоциты).

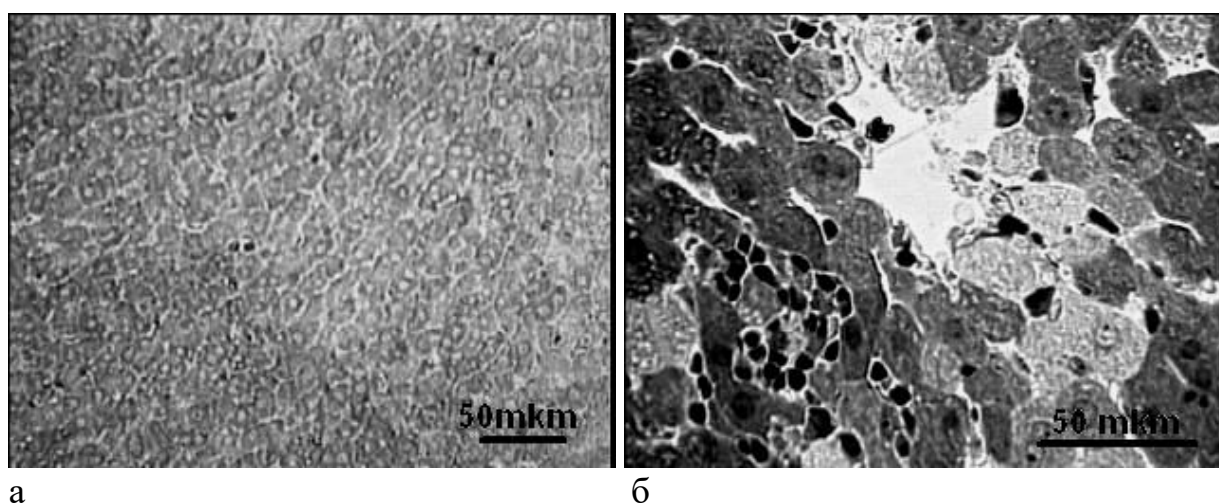


Рис. 9.1. Структура ткани печени крысы в норме. (а) – трабекулярное строение печеночных долек; (б) – периферическая часть дольки с просветлением цитоплазмы у гепатоцитов. Полутонкие срезы. Окраска толуидиновым и метиленовым синим.

Цитолеммы двух и более гепатоцитов образуют желчные капилляры. В портальной зоне желчные капилляры переходят в каналы Геринга и холангиолы, стенки которых образованы как гепатоцитами, так и клетками протоков. Желчные протоки выстланы клетками кубического или цилиндрического эпителия.

9.1 Морфологические и биохимические признаки повреждения печени при гипотермическом хранении в сахарозо-содержащей среде.

При гипотермическом хранении в течение 1 часа изолированной и перфузированной в СС печени сохраняется трабекулярное строение печеночных долек (рис. 9.2, а). В зависимости от локализации гепатоцитов в печеночной дольке характер изменения их структуры различен. В центролобулярной части ядро и цитоплазма гепатоцитов не претерпевают существенных изменений. Просветы центральных вен и сосуды портальных трактов расширены, светлые и практически не содержат форменных элементов крови (рис. 9.2, а). Артериола в зоне триад характеризуется признаками реактивности эндотелия, что проявляется в выпячивании околядерной зоны клеток в просвет сосуда. Отмечается небольшая отечность сосудистых стенок центральных вен и портальных зон, а также соединительнотканых прослоек. Синусоиды слегка расширены (рис. 9.2, б).

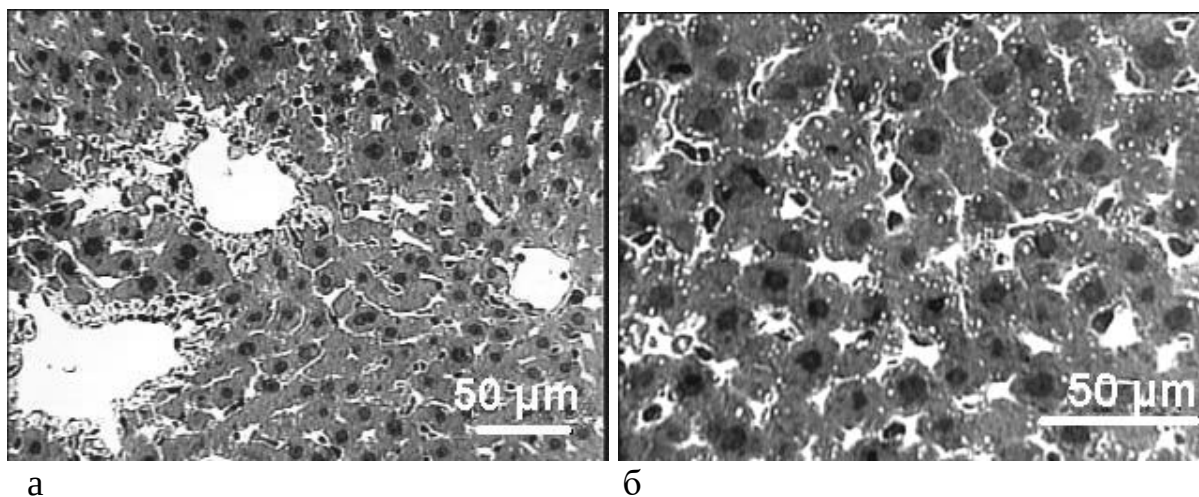


Рис. 9.2. Структура ткани печени после 1 ч гипотермического хранения изолированного органа в СС. (а) – сохранение трабекулярного строения печеночных долек; (б) – просветления цитоплазмы у гепатоцитов периферических частей дольки. Полутонкие срезы. Окраска толуидиновым и метиленовым синим.

В то же время в периферических частях долики у большинства гепатоцитов наблюдаются просветления цитоплазмы (рис. 9.2, б), главным образом в околоядерной зоне, которые в электронном микроскопе представляют собой полости низкой электронной плотности с небольшим количеством плотных мелких гранул, вероятно, ранее являвшихся местами локализации гликогена (рис. 9.3). Кроме того, наблюдается диффузная гомогенизация митохондрий и их агрегация в конгломераты. Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума состоят из коротких уплощенных канальцев, равномерно покрытых рибосомами.

Мембрана гепатоцитов сохраняет свою целостность, структура клеточных контактов и желчных капилляров имеет типичное строение (рис. 9.3, стрелки). Отмечается гиперплазия ворсинок гепатоцитов в пространстве Диссе. В то же время, вблизи крупных кровеносных сосудов, как правило, локализуются гепатоциты с обычной структурой.

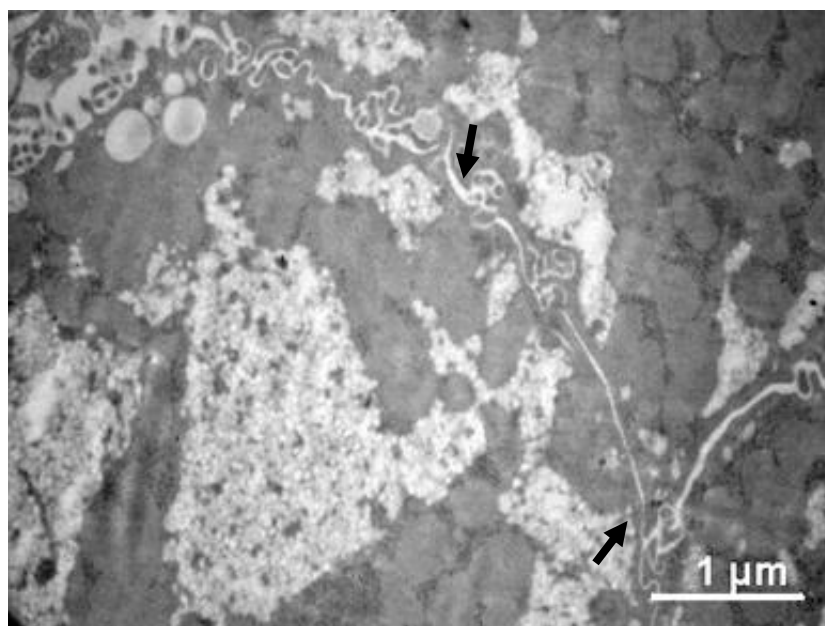


Рис. 9.3. Ультраструктура фрагментов двух гепатоцитов после 1 ч ГХ печени в СС. Стрелками отмечены клеточный контакт и желчный капилляр.

Таким образом, данные наблюдения показали, что в зависимости от локализации печеночных клеток внутри долики изменения их структуры имеют свои особенности. В то же время, признаков аутолитических

повреждений гепатоцитов и эндотелиальных клеток синусоидов не обнаружено, что может свидетельствовать о положительном влиянии ССС на начальном этапе гипотермического хранения органа.

После часового хранения изолированной печени в сахарозо-содержащей среде при 4°C орган подвергался 60-минутной нормотермической реперфузии (37°C) минимальным солевым раствором Кребс-Рингер-бикарбонат (рН 7,4). Установлено, что НТРП изолированной печени, предварительно подвергнутой гипотермическому хранению в СС в течение 1 часа, обеспечивает, в основном, сохранность балочной структуры печени (рис. 9.4, а, в), однако отмечаются участки ее нарушения в местах сильного расширения синусоидов (рис. 9.4, б, г). Гепатоциты гетерогенны по своей форме и размерам. Цитоплазма гепатоцитов мелкозернистая, гомогенная, содержит большое количество светлых вакуолей разного размера, идентифицируемых как жировые включения (рис. 9.4, б).

Просветы центральных вен и сосуды портальных трактов расширены, светлые, не содержат форменных элементов крови. Артериола в зоне триад характеризуется признаками реактивности эндотелия, при этом околядерная зона клеток сильно выступает в просвет сосуда. Отмечается отечность сосудистых стенок центральных вен и портальных зон, а также отечность соединительно-тканых прослоек (рис. 9.4, г). Некоторые синусоиды значительно расширены. Они имеют вид прозрачных полостей. Ядра эндотелиоцитов синусоидов более округлые, чем в контроле. Хорошо определяются клетки Купфера с гиперхромными ядрами. Структурные изменения клеток печеночной паренхимы в меньшей степени зависели от локализации их в пределах долики и характеризовались наличием в цитоплазме мелких вакуолей и просветленных участков.

Стенки центральной вены и сосудов зоны триад, а также соединительно-тканые прослойки незначительно разрыхлены и вакуолизированы (рис. 9.4, а, в, г). В расширенных синусоидах структура

эндотелиальной выстилки часто нарушается вплоть до десквамации клеток эндотелия (рис. 9.4, б).

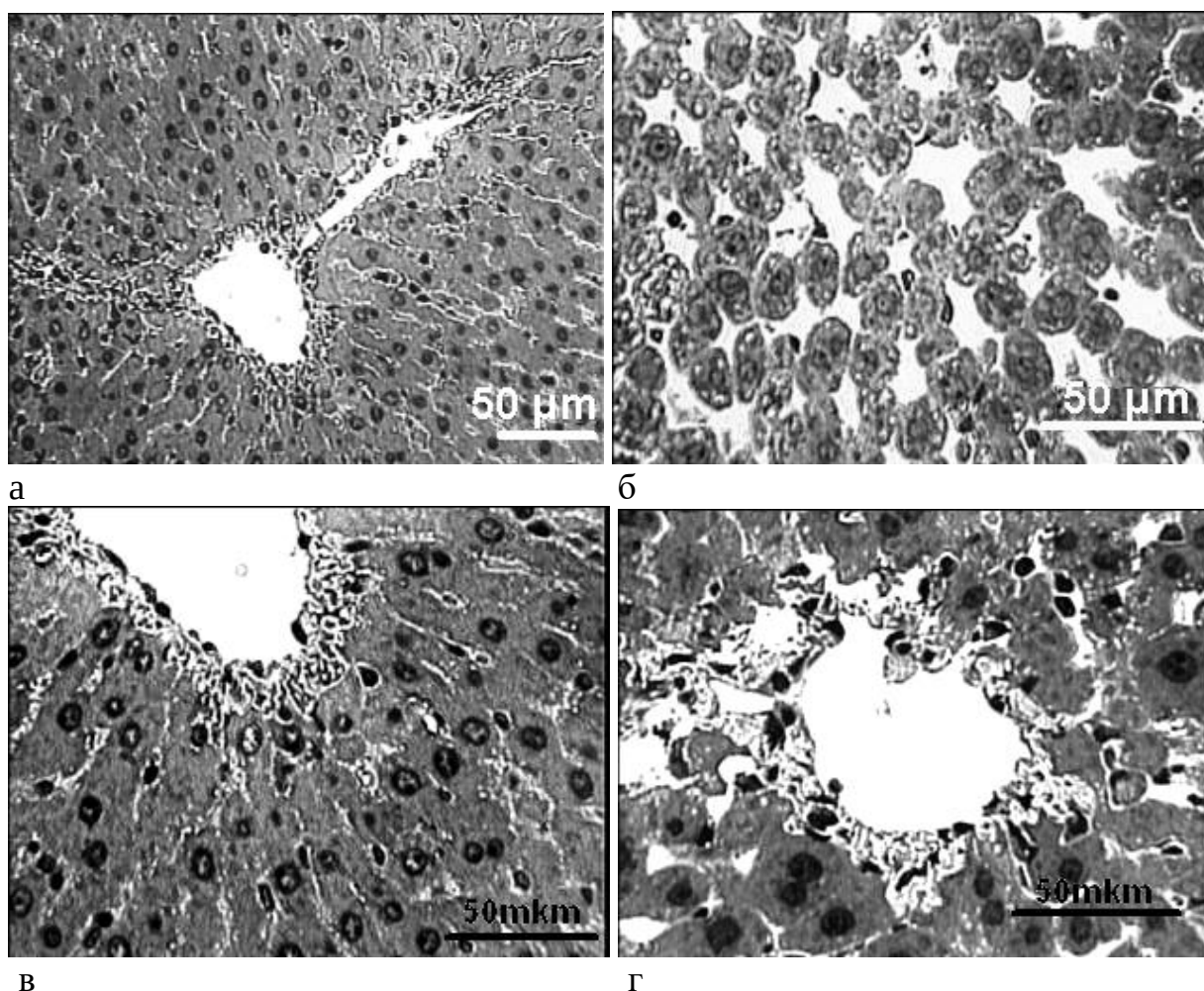


Рис. 9.4. Структура ткани печени после 60-минутной НТРП органа, хранившегося 1 ч при гипотермии в СС: а, в – сохранность балочной структуры печени; б – расширение синусоидов. Полутонкие срезы. Окраска толуидиновым и метиленовым синим.

Ультраструктурный анализ свидетельствует о том, что в цитоплазме гепатоцитов преобладают митохондрии с тонкими немногочисленными кристами и мелкозернистым матриксом. В то же время обнаруживаются и митохондрии с признаками деструкции, тесно прилегающие друг к другу и теряющие целостность мембран (рис. 9.5, а). Гранулярный ЭПР сохраняет свои особенности, характерные для 1-часового гипотермического хранения. Наблюдается также полная потеря гепатоцитами гликогена. В пространстве

Диссе отмечается гиперплазия микроворсинок, образованных, как цитолеммой гепатоцитов, так и клеточными мембранами эндотелиальных клеток (рис. 9.5, б). Клетки печеночных синусоидов более чувствительны к последствиям реперфузии, чем гепатоциты. Для клеток Купфера в выстилке синусоидов характерны признаки реактивности с увеличением количества лизосом и различных включений.

Необходимо отметить некоторое различие в структуре ткани печени у различных животных при одинаковых экспериментальных условиях хранения и перфузии, которое, вероятно, связано с индивидуальной реакцией на перфузию, а также локальным различием условий перфузии в пределах одного органа.

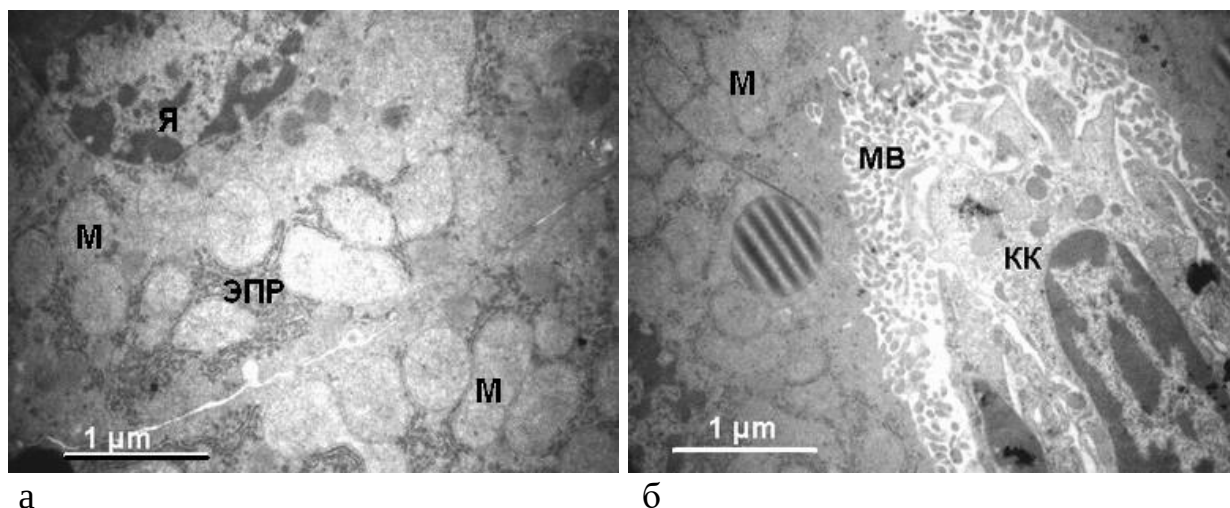


Рис. 9.5. Ультраструктура фрагмента гепатоцита (а) и фрагмента синусоидного капилляра (б) после 1 ч гипотермического хранения печени в СС и последующей нормотермической реперфузии. Обозначения: Я – ядро; М – митохондрии; ЭПР – скопление рибосом и фрагментов ретикулума, КК – клетка Купфера, МВ – микроворсинки.

Таким образом, нормотермическая реперфузия печени после 1 часа гипотермического хранения в СС не оказывает существенного влияния на структуру клеток печеночной паренхимы, тогда как микроциркуляторное русло органа демонстрирует существенные реактивные изменения.

При 24-часовом гипотермическом хранении изолированной печени в СС трабекулярная структура печеночных долек сохраняется. В то же время развитие дистрофических процессов в клетках печеночной паренхимы несинхронно нарастает и выражается в появлении гепатоцитов с изрезанным контуром ядра и просветленной цитоплазмой (рис. 9.6). Отмечаются также деструктивные повреждения клеток, формирующих выстилку капилляров: нарушение целостности клеточных мембран, разрывы в периферических отростках эндотелиоцитов и, как результат, обнажение синусоидального полюса гепатоцитов. Просветы центральных вен светлые, расширенные, иногда наблюдается десквамация эндотелия. В области триад обнаруживается хорошо выраженная и сохранившаяся структура стенок артерии, вены и желчного протока, окруженных тонкими прослойками соединительной ткани.

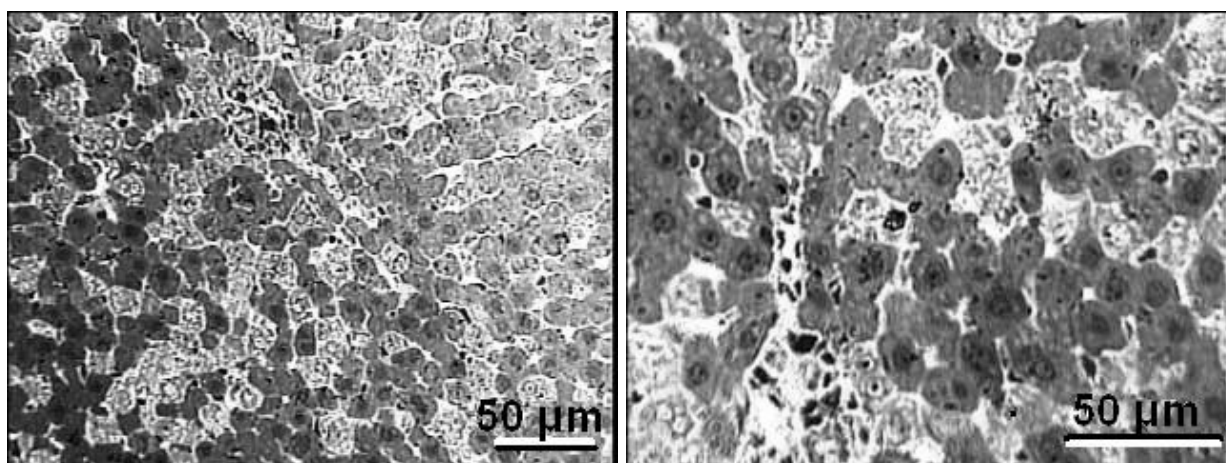


Рис. 9.6. Структура ткани печени после 24 ч ГХ изолированного органа в СС. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым и метиленовым синим.

По данным ультраструктурных исследований, ядерная мембрана некоторых гепатоцитов теряет четкость границ. Большинство митохондрий имеют гомогенизированный матрикс с разрушенными кристами, форма этих органелл изменена за счет их сдавливания из-за уплотнения гепатоцитов (рис. 9.7, а). Однако структура гранулярного ЭПР изменяется в меньшей степени. Эндотелий синусоидов находится в реактивном состоянии, при этом

увеличивается количество микроворсинок, образуемых поверхностью эндотелиоцитов (рис. 9.7, б), что также является косвенным свидетельством уплотнения и сжатия гепатоцитов.

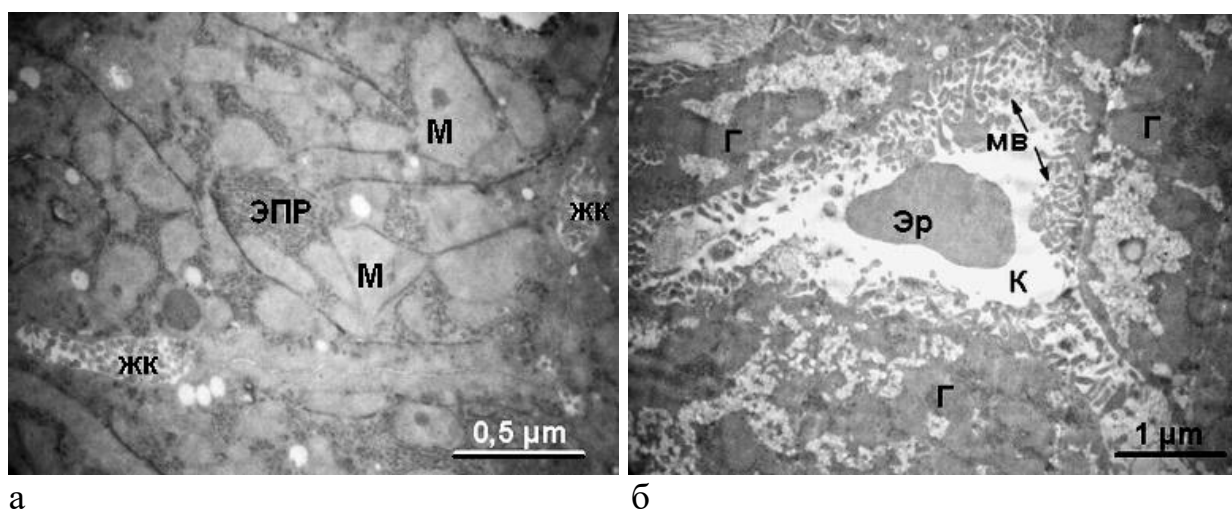


Рис. 9.7. Ультраструктура фрагмента гепатоцита (а) и синусоида (б) после 24 ч ГХ печени в СС. Обозначения: Г – гепатоциты, жк – желчные капилляры, М – митохондрии, ЭПР – скопление рибосом и фрагментов ретикулума, Эр – эритроцит, мв – микроворсинки, К – просвет капилляра.

Таким образом, хранение печени в СС в течение 24 ч оказывает более повреждающее действие на структуру ткани печени по сравнению с 1 ч. Это может быть обусловлено деструкцией синусоидальных клеток, содержащих гидролитические ферменты, которые ускоряют повреждения гепатоцитов [51].

После 24-часового ГХ изолированной печени в СС и последующей НТРП структурные повреждения гепатоцитов и синусоидальных клеток увеличиваются. Несмотря на сохранность балочной структуры печеночной дольки, гетерогенность формы и изменения внутриклеточного содержимого гепатоцитов выражены в большей степени (рис. 9.8, б), обнаруживаются участки разрушенных клеток (рис. 9.8, г). В некоторых гепатоцитах изменения носят дистрофический характер, что проявляется в изрезанности контуров ядер, наличии в цитоплазме не только просветлений гиалоплазмы, но и большого количества крупных вакуолей (рис. 9.8, б).

Большая часть синусоидов расширена и заполнена клеточным детритом, образовавшимся в результате деструкции эндотелиоцитов и синусоидальных областей гепатоцитов (рис. 9.8, а). Сосуды портальных трактов хорошо выражены, с отечными стенками. Наблюдается адгезия клеток крови к поверхности эндотелия артериол (рис. 9.8, в, г). Ядра эпителиоцитов желчных протоков с извилистым контуром и неправильной формы. Соединительно-тканые прослойки разрыхлены. Стенки сосудов портальных трактов отечны.

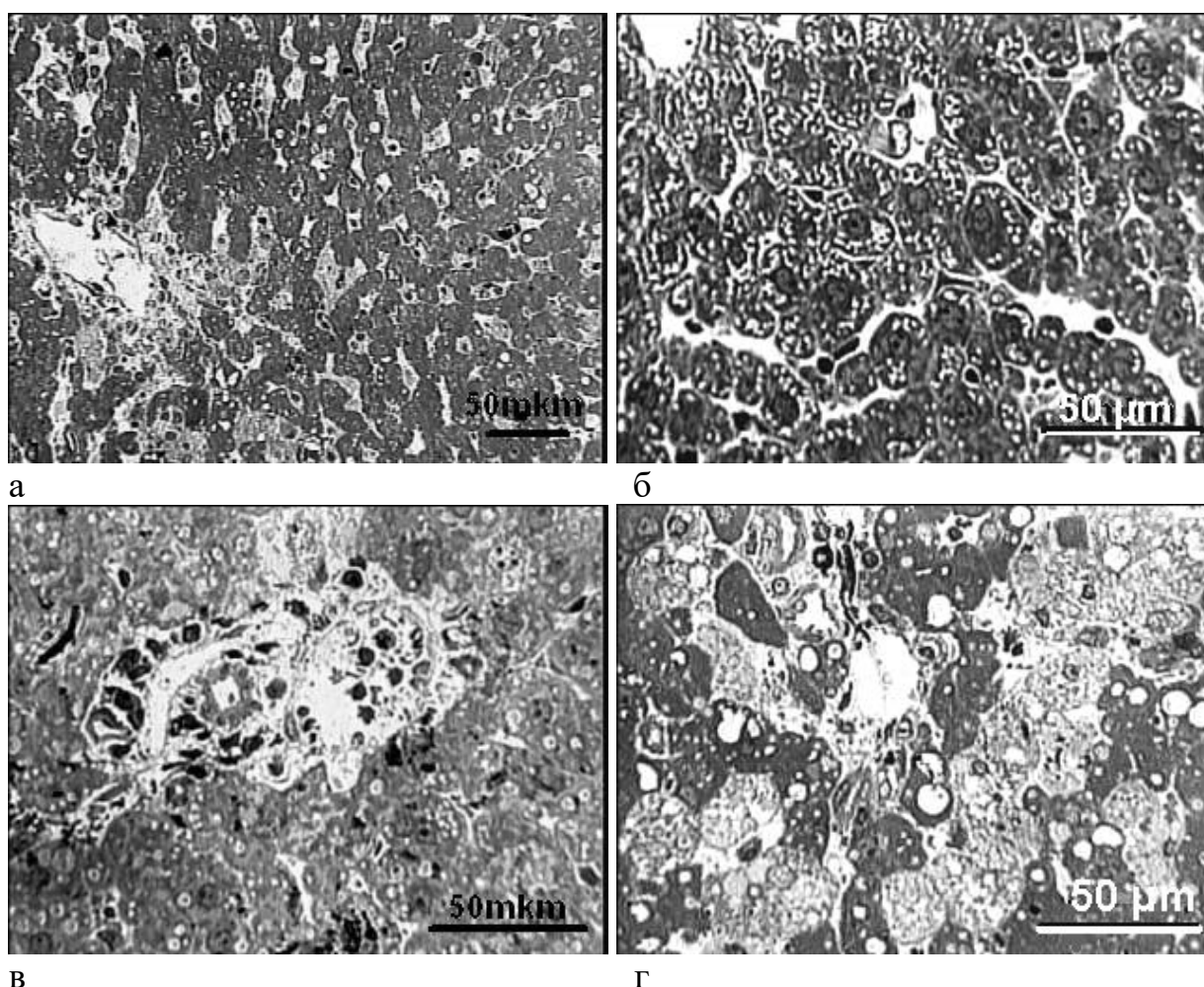


Рис. 9.8. Структура ткани печени после 60-минутной НТПП органа, хранившегося 24 часа при гипотермии в СС: а – сохранность балочной структуры печени, расширение синусоидов; б – вакуолизация цитоплазмы; в – отечность стенок сосудов портального тракта и соединительно-тканых прослоек; г – участки разрушенных клеток. Полутонкие срезы. Окраска толуидиновым и метиленовым синим.

По данным электронной микроскопии значительная доля митохондрий имеют явные нарушения, во многих из них слабо идентифицируется целостность мембранных комплексов, а также их связь с цистернами ЭПР (рис. 9.9, а). Изменения ЭПР выражены в меньшей степени, хотя и для него характерно образование больших, до 0,5–0,7 мкм, скоплений цистерн. В ядре возрастает доля гетерохроматина (рис. 9.9, а).

Таким образом, нормотермическая реперфузия после длительного (24 ч) хранения органа приводит к значительному ухудшению ультраструктуры всех клеточных компонентов ткани печени, что дает основание считать этот срок критическим для данных условий подготовки и хранения целого органа. Последующая реперфузия выступает как фактор дополнительного воздействия и проявляет прогрессирующие аутолитические процессы. Естественнo предположить, что отмеченное в условиях гипотермии и перфузии нарастание структурных повреждений клеток, может являться отражением биохимических нарушений, возникающих в клетках.

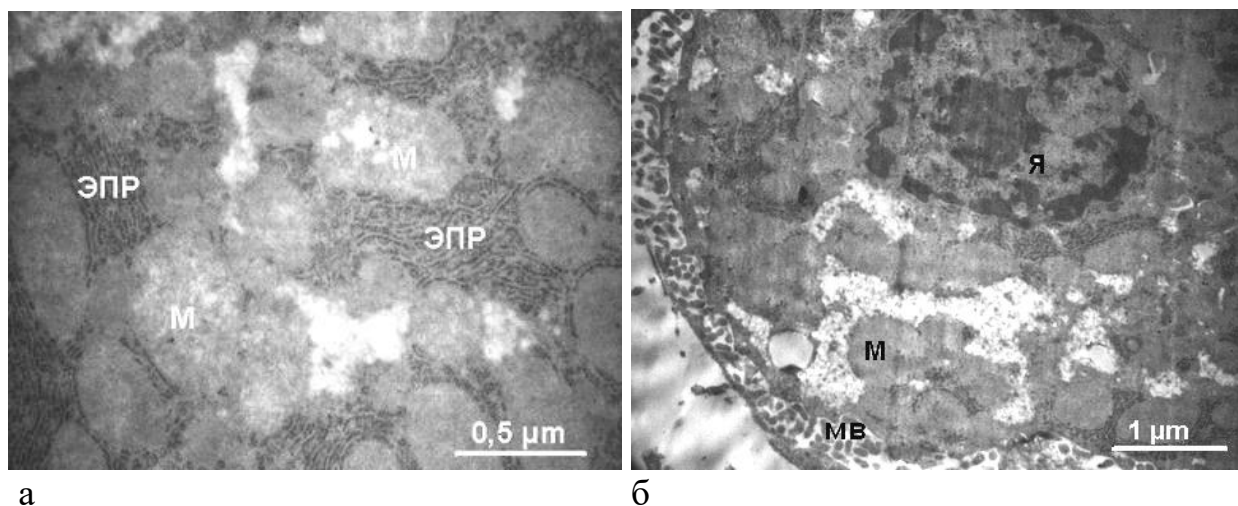


Рис. 9.9. Ультраструктура фрагмента гепатоцита после 24 ч ГХ печени в СС и последующей НТРП. Обозначение: Я – ядро, М – митохондрии; ЭПР – скопление фрагментов ретикулума и рибосом, мв – микроворсинки.

Доказательством сделанного предположения могут являться данные по элиминации цитозольных ферментов в среду нормотермической реперфузии печени после различных сроков гипотермического хранения органа.

Считается, что уровень высвобождения цитоплазматических ферментов является индексом, характеризующим целостность клеточных мембран, и зависит от степени повреждения клеток. В результате нарушения селективной проницаемости мембран происходит потеря растворимых ферментов, что приводит к дезорганизации работы клеток в целом.

Нами установлено [64], что 24-часовое хранение изолированной печени крыс в СС и последующая нормотермическая реперфузия приводят к увеличению активности в среде реперфузии ЛДГ и АсАТ почти в 2 раза, а АлАТ – в 4 раза по сравнению с 1-часовым хранением органа в таких же условиях (табл. 9.1).

Таблица 9.1.

Активность цитоплазматических ферментов в перфузате после гипотермического хранения печени (U/V)

ф е р м е н т	хранение 1 ч, 4°С	хранение 24 ч, 4°С
АсАТ	$3,4 \pm 0,3$	$7,3 \pm 1,6^*$
АлАТ	$1,9 \pm 0,3$	$7,9 \pm 1,0^*$
ЛДГ	$18,1 \pm 2,1$	$30,1 \pm 3,6^*$

U – количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль/л НАДН за минуту в условиях определения, V - объем перфузата (150 мл).

* - достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с 1-часовым хранением.

Динамика солюбилизации ЛДГ и трансаминаз в перфузат, после нормотермической реперфузии печени, которая следовала за 24-часовым гипотермическим хранением органа при 4°С, свидетельствует о серьезном повреждении клеток, которое подтверждается морфологическими исследованиями.

Полученные данные свидетельствуют о том, что применение в данных экспериментальных условиях консервирующего сахарозо-содержащего раствора, предупреждающего осмотическое набухание ткани печени, лимитируется временным фактором. Как показали аналогичные

исследования [392], после суточного холодового хранения в печени начинают развиваться структурно-метаболические повреждения. При этом интенсивность процессов метаболизма снижается до величин, не обеспечивающих поддержание энергетического баланса для сохранения ионного градиента между вне- и внутриклеточной средой, поддержания водного гомеостаза. В условиях гипотермии, по истечении критического срока хранения, в клетках истощаются субстраты окисления, нарушается равновесие между анаболическими и катаболическими процессами, нарастает ацидоз, развиваются цепные радикальные реакции, подавляются синтетические процессы, что в совокупности приводит к деструкции ткани.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о перспективности использования сахарозо-содержащего раствора для краткосрочного гипотермического хранения изолированной печени, что позволяет сохранить морфологические и биохимические характеристики органа. Пролонгирование гипотермического хранения печени в СС до 24 ч приводит к необратимым изменениям в структуре всех клеточных компонентов ткани, что исключает возможность восстановления их функций после последующей нормотермической реперфузии.

9.2 Морфологическое состояние изолированной печени крыс после нормотермической реперфузии и гипотермического хранения в UW и маннитол-содержащей средах при различных значениях рН.

Критерием эффективности растворов для ГХ органов является, в конечном итоге, до- и посттрансплантационное состояние органа. Несмотря на то, что использование раствора UW и его модификаций обеспечивает высокое качество сохранности органа и время, достаточное для транспортировки и проведения операции по трансплантации [96], тем не менее, большое количество экспериментаторов стремятся сократить время хранения органа до 12–15 часов, поскольку при трансплантации печени,

хранившейся более 24 ч, возрастает частота осложнений [27, 395]. Таким образом, поиск новых и модификация известных сред, обеспечивающих лучшую сохранность в более длительный период времени, остаются актуальными.

В данном разделе работы в качестве растворов для гипотермического хранения печени использовали общепринятую в мировой практике UW-среду [393] и манит-содержащую среду (МС). Отличительной особенностью МС являлось пониженное значение рН. Данные, полученные нами на эритроцитах (см гл.4), свидетельствуют, что кислые значения рН, в известной мере, «консервируют» морфологическое состояние клеток благодаря блокированию выхода внутриклеточных K^+ и Cl^- . Представляло определенный интерес выяснить, каким образом этот «консервирующий» эффект будет проявляться на сохранности структуры различных ядродержащих клеток в составе ткани при ГХ перфузированного органа.

Как было отмечено выше, краткосрочное, 1-часовое гипотермическое хранение изолированной и предварительно перфузированной в СС печени позволяет сохранить на достаточно высоком уровне ее морфологические и биохимические характеристики [64, 396].

В данном исследовании после часового ГХ изолированной перфузированной печени, как в UW, так и в МС средах мы также наблюдали сохранение синусоидов и трабекулярного строения печеночных долек, целостность гепатоцитов и некоторые особенности их структуры в зависимости от локализации печеночных клеток внутри дольки. Признаков аутолитических повреждений гепатоцитов и эндотелиальных клеток синусоидов не обнаружено.

После НТРП печени, хранившейся в течение 1 часа в UW и МС средах, балочная структура печени, в основном, сохраняется (рис. 9.10, а, г), однако отмечаются участки ее нарушения в местах сильного расширения синусоидов (рис. 9.10, б, в, г). В обеих средах структурные изменения клеток печеночной паренхимы слабо зависели от их локализации в пределах дольки. Гепатоциты

более гетерогенны по форме и размерам, их цитоплазма содержала незначительное количество мелких вакуолей.

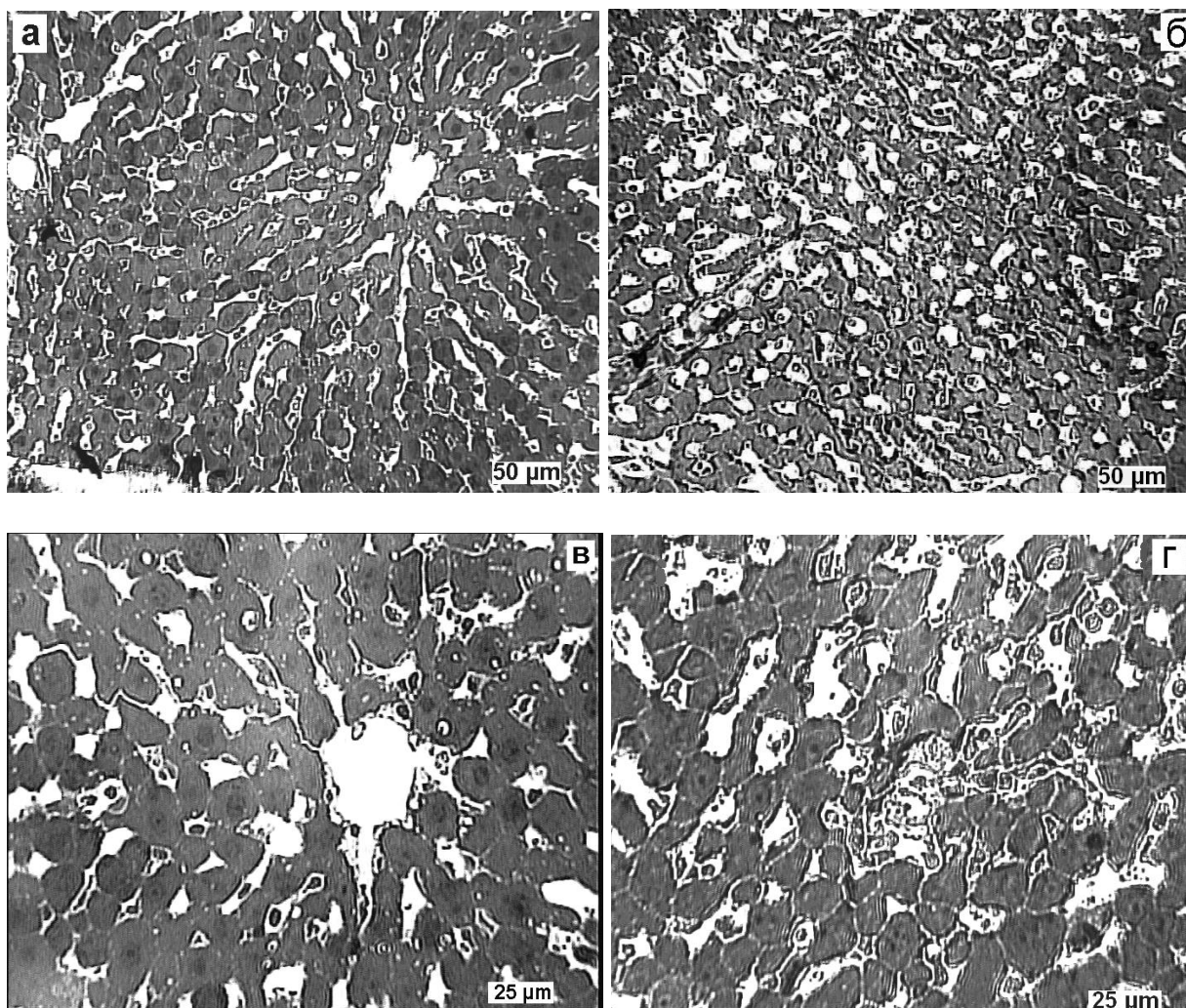


Рис. 9.10. Структура ткани печени после 60-минутной НТПП органа, хранившегося 1 ч при гипотермии в МС (а, в) и UW (б, г) средах. Полутонкие срезы. Окраска толуидиновым и метиленовым синим.

Анализ ультраструктуры гепатоцитов свидетельствует об их высокой сохранности в МС и UW средах. В цитоплазме гепатоцитов преобладали митохондрии с мелкозернистым матриксом и немногочисленными, тонкими кристами (рис. 9.11). В то же время, справедливости ради, необходимо отметить, что в структуре клеток печени обнаруживаются митохондрии с признаками деструкции крист и нарушением целостности мембран.

Считается, что сохранность структуры крист является морфологической предпосылкой функционирования ферментов цикла Кребса, а сохранность трех слоев мембраны – одно из условий выполнения функции сопряжения [44, 62].

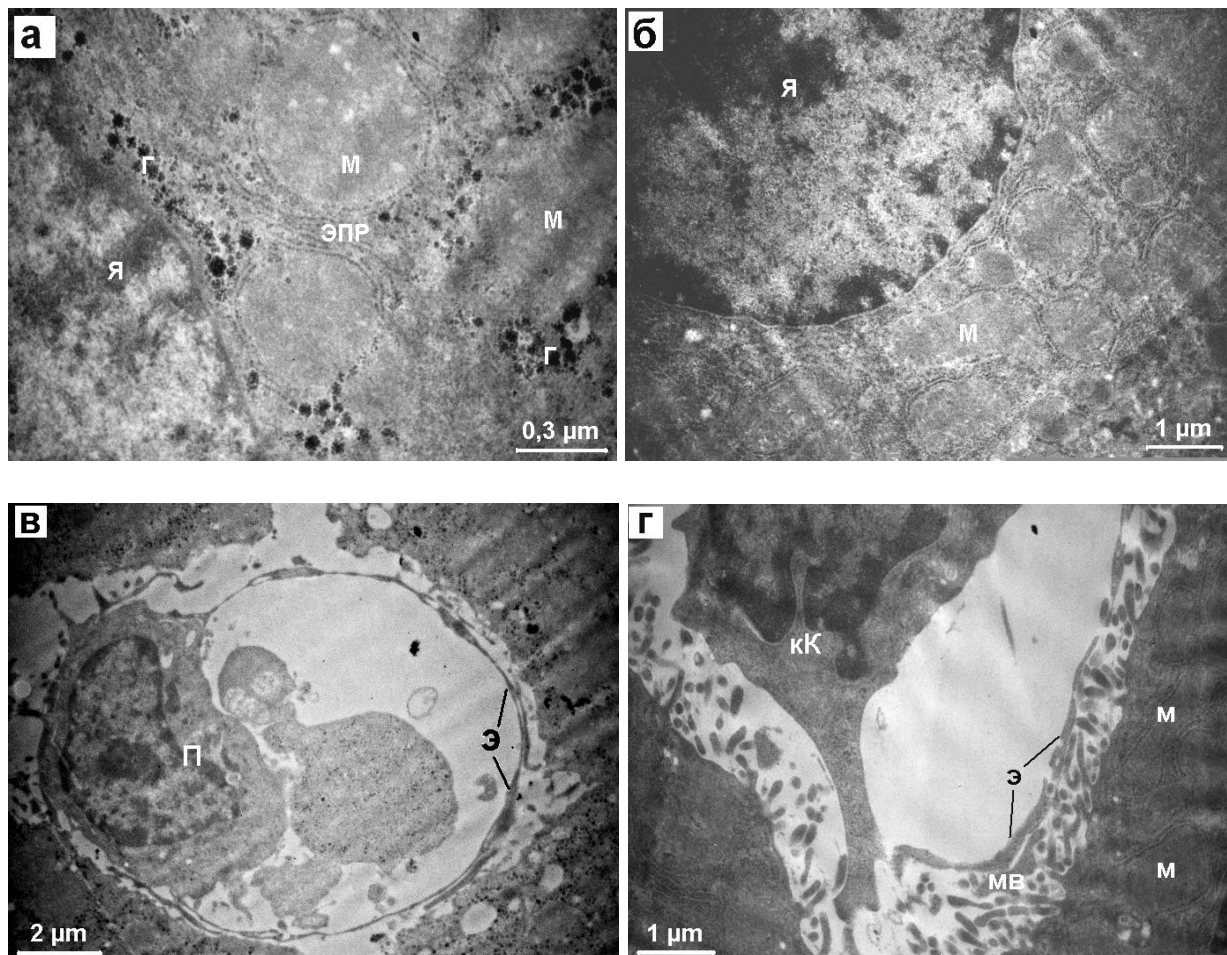


Рис. 9.11. Ультраструктура гепатоцитов (а, б) и синусоидных капилляров (в, г) после 1 ч ГХ и последующей 60-мин НТРП органа, хранившегося в МС (а, в) и UW (б, г) средах. Обозначения: М – митохондрии; Я – ядро; МВ – микровилли; Э–эндотелий; кК– клетка Купфера, П – перицит; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Г – розетки гликогена.

В структуре гепатоцитов доминирует шероховатый ЭПР. Он представлен многочисленными, параллельными канальцами, содержащими рибосомы на их мембранах, и плотно контактирует с митохондриями. Высокий уровень сохранности ЭПР наблюдался в обеих средах, однако в МС

ретикулярная сеть все же более дезорганизована, в ней чаще встречаются фрагменты трубочек и свободные рибосомы и полисомы. Гликоген, в виде больших скоплений (в основном, α - гранулы) занимает значительный объем цитоплазмы гепатоцитов в МС-среде и, практически, отсутствует в клетках, хранившихся в среде UW. В пространстве Диссе отмечается нормальное распределение микроворсинок в среде UW, тогда как в МС их гораздо меньше и они короче (рис. 9.11, в). Ранее было показано, что клетки печеночных синусоидов, по сравнению с гепатоцитами, подвергаются большему воздействию при реперфузии [64, 395]. В обеих средах в расширенных синусоидах структура эндотелиальной выстилки имела незначительные нарушения, о чем свидетельствуют факт сохранения в их просветах клеточных элементов и состояние ультраструктуры эндотелия (рис. 9.11, в, г). Стенки центральной вены и сосудов зоны триад, а также соединительно-тканые прослойки имеют незначительные разрыхление и вакуолизацию (рис. 9.10).

После 24-часового ГХ изолированной печени в МС и UW средах и последующей нормотермической реперфузии, независимо от состава среды происходит нарастание структурных повреждений гепатоцитов и синусоидальных клеток (рис. 9.12).

Несмотря на сохранность балочной структуры печеночной дольки, гетерогенность формы гепатоцитов и изменение их внутреннего содержимого выражены в большей степени, чем при 1-часовом ГХ. В обеих средах цитоплазма гепатоцитов характеризовалась наличием большего количества мелких вакуолей. Встречаются единичные клетки и группы гепатоцитов с изрезанным контуром ядра и просветленной цитоплазмой, в которой наблюдается деструкция органелл (рис. 9.12). Для среды UW характерны более расширенные синусоиды.

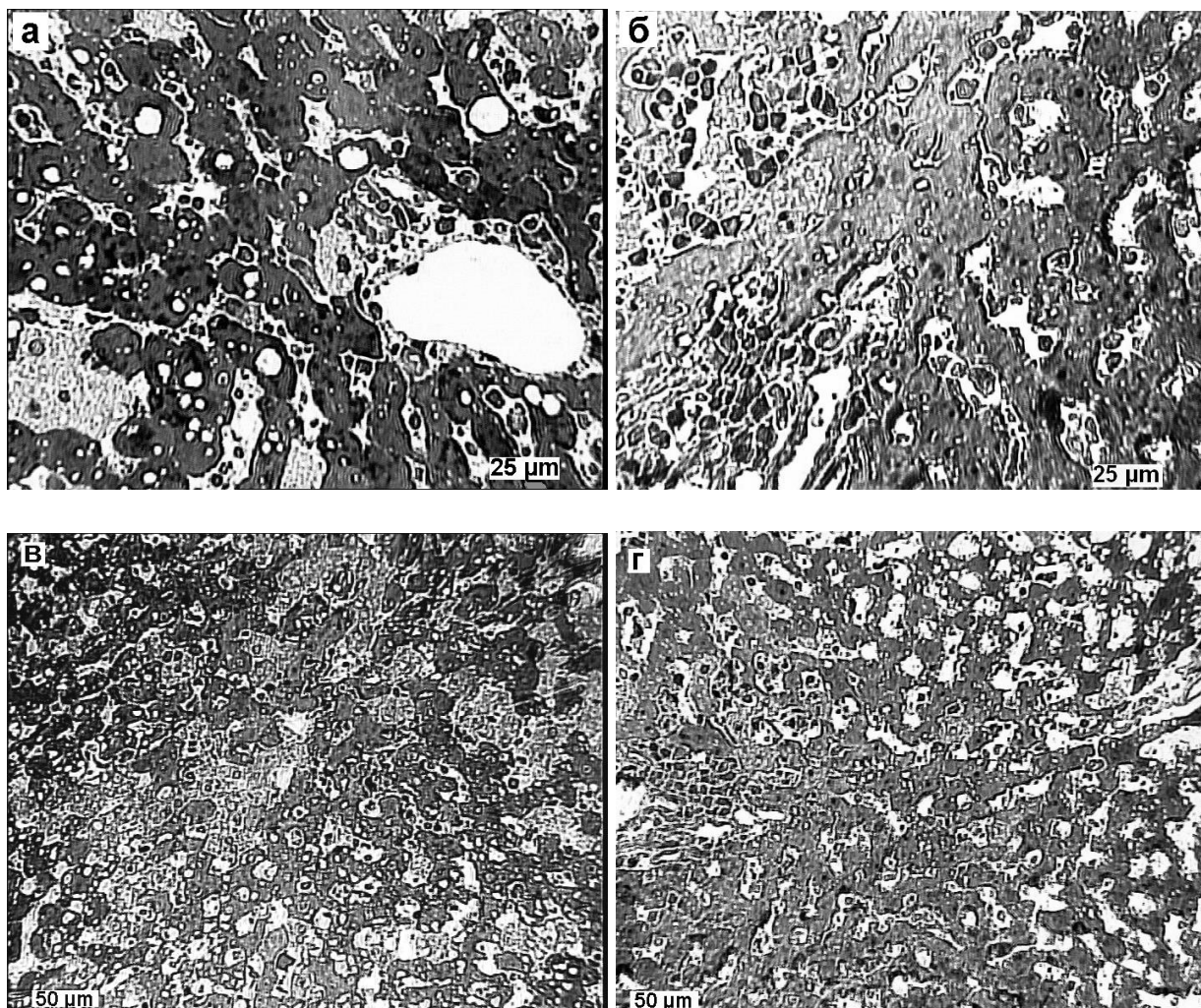


Рис. 9.12. Структура ткани печени после 60-минутной НТРП органа, хранившегося 24 ч при гипотермии в МС (а, в) и UW (б, г) средах. Полутонкие срезы. Окраска толуидиновым и метиленовым синим.

Анализ ультраструктуры клеток печени, подвергшейся НТРП после 24-часового ГХ в исследуемых средах, свидетельствует о достаточно высокой их сохранности (рис. 9.13). Межклеточные контакты, структура желчных протоков без видимых изменений. В ядрах гепатоцитов отмечается незначительное возрастание объемной доли гетерохроматина в примембранных областях. Их мембрана имеет четкие границы.

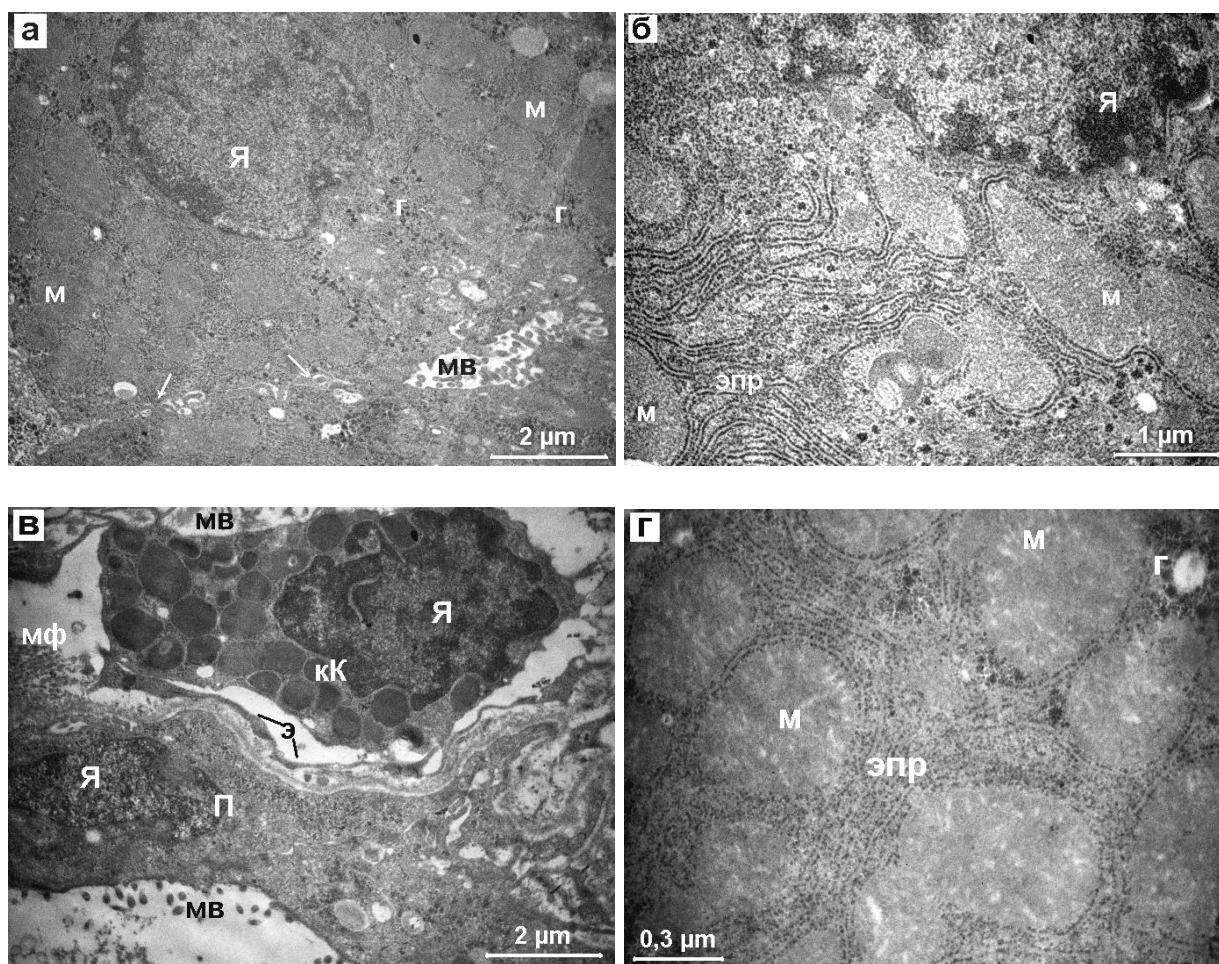


Рис. 9.13 Ультраструктура гепатоцитов (а, б, г) и синусоидного капилляра (в) после 24 ч ГХ и последующей 60-мин НТРП органа, хранившегося в МС (а, в, г) и UW (б) средах.

Обозначения: М – митохондрии; МВ – микроворсинки; Э – эндотелий; кК – клетка Купфера; П – перицит. ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Г – розетки гликогена; Я – ядро.

В околоядерном пространстве расположен шероховатый ЭПР, не претерпевший значительных изменений и плотно контактирующий с митохондриями. В обеих средах большинство митохондрий имеет слабо гомогенизированный матрикс, с неявно выраженными кристами. Форма этих органелл в МС-среде имеет признаки незначительного набухания и содержит небольшие, просветленные полости (рис. 9.13, г). Единичные розетки гликогена присутствовали в гепатоцитах лишь в МС среде. В обеих средах,

как и в предыдущем случае, в просветах синусоидов встречались клеточные элементы, которые, как и тонкая структура эндотелиальной выстилки, имели незначительные нарушения и характеризовались высокой степенью сохранности их ультраструктуры (рис. 9.13, в). Стенки сосудов портальных вен имели незначительную отечность.

Следовало ожидать, что переход от гипоксии при гипотермии в нормотермическое состояние во время реперфузии будет вызывать набухание клеточных органелл. Считается, что наиболее чувствительными к действию гипотермии и последующей тепловой реоксигенации являются митохондрии. Нарушение их функционирования влечёт за собой изменения в энергетическом состоянии как отдельного гепатоцита, так и печени в целом, увеличивая вероятность интенсификации свободнорадикальных процессов. Согласно данным литературы, это связано с высокой Ca^{2+} -аккумулирующей способностью митохондрий и потерей этой способности в условиях снижения pH и возможного нарушения целостности (проницаемости) их мембран [44].

Однако мы не наблюдали в клетках значимого увеличения доли конденсированного хроматина, чрезмерного набухания митохондрий и дезорганизации их крист, фрагментации, вакуолизации и расширения цистерн ЭПР – признаков, которые обычно связывают со снижением активности и нарушением ядерного аппарата и клетки в целом.

Ряд отличий (структура ЭПР, уровень гликогена, число микроворсинок и т.п.), отмечаемых в структуре ткани печени, подвергнутой НТРП после 1- и 24-часового ГХ в МС и UW средах при одинаковых экспериментальных воздействиях, с нашей точки зрения, в значительной степени все же связаны с pH раствора. Данные литературы и наши исследования показывают, что при кислых значениях pH происходит вход в клетку ионов водорода по градиенту концентрации, что приводит к ингибированию выхода ионов K^+ , Cl^- [18, 119, 259] и, как следствие, повышению внутриклеточного осмотического давления. Это вызывает, как правило, набухание клеток.

Именно с этим обстоятельством может быть связано уменьшение числа и размеров микроворсинок, набухание ЭПР и отслоение части рибосом в МС среде.

Необходимо отметить различие в изменении ультраструктуры клеток печени при снижении внутриклеточного рН при естественном аутолизе (активирование гликолиза и накопление молочной кислоты) и состоянием гепатоцитов при холодовой перфузии и хранении (4°C) печени в среде с пониженным значением рН, обеспечивающим, наряду с сохранением ультраструктуры, и сохранение макроэргов. Следует подчеркнуть, что классическое представление о процессах, происходящих при «высокотемпературной ишемии» и приводящих к снижению внутриклеточного рН (до 5,0 – 5,5), и как следствие, выходу лизосомальных ферментов и внутриклеточному аутолизу [25] не реализуется при помещении клеток печени в среду с низким значением рН. Закисление внутриклеточной среды на фоне истощения запасов АТФ рассматривается многими исследователями как механизм адаптации, препятствующий развитию некротических изменений в клетках, поскольку приводит к ингибированию ферментов деградации (фосфолипазы, кальпайны и др.), оптимум рН которых находится в нейтральной и щелочной среде. Мы не наблюдали у значительной доли гепатоцитов активизации лизосомального аппарата, нарушения структуры ЭПР, его топологической связи с митохондриями и кариолеммой, а также структуры самих митохондрий. Несмотря на то, что высокий уровень АТФ в органе после хранения коррелирует с его способностью к функциональному восстановлению, истощение пула АТФ ещё не служит абсолютным критерием потери жизнеспособности [84]. Существуют также работы, показывающие, что низкая концентрация АТФ в органе тесно связана с низкой выживаемостью реципиентов после трансплантации [53]. В любом случае, вопрос энергетического метаболизма органа в процессе ГХ и НТРП требует пристального внимания и детального изучения.

Таким образом, нормотермическая реперфузия после длительного (24 ч) хранения органа ухудшает состояние ультраструктуры всех клеточных компонентов ткани печени, по сравнению с 1 ч ГХ, что дает основание считать этот срок критическим для данных условий подготовки и хранения целого органа. Последующая реперфузия выступает как фактор дополнительного воздействия и проявляет прогрессирующие изменения/нарушения в структуре ткани.

Заключая данный фрагмент работы, необходимо подчеркнуть:

- проведенные исследования свидетельствуют о перспективности использования слабоэлектролитных растворов, позволяющих сохранить морфологические и биохимические характеристики органа, для краткосрочного гипотермического хранения. Реперфузия после краткосрочного, 1-часового ГХ изолированной печени в маннитсодержащей среде с низким рН обеспечивает сохранность основных морфологических характеристик органа и сохранение макроэргов. Для данных условий в клетках не наблюдается значимого увеличения доли конденсированного хроматина, чрезмерного набухания митохондрий и дезорганизации их крист, фрагментации, вакуолизации и расширения цистерн ЭПР – признаков, которые обычно связывают со снижением активности или нарушением ядерного аппарата и клетки в целом.

- Пролонгирование ГХ печени до 24 ч приводит к более выраженным изменениям в структуре всех клеточных компонентов ткани, что исключает (ограничивает) возможность их репарации на этапе реперфузии и является критическим сроком для восстановления их функций в данных средах после НТРП.

- Микроциркуляторные повреждения в печени после ГХ и НТРП органа, связаны в большей степени с повреждением клеток сосудистого русла, хотя не все типы этих клеток равнозначно теряют качество ультраструктуры после данного холодового хранения и реперфузии печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя данные по устойчивости клеток гетеротермов к действию пониженных температур мы пришли к выводу, что одной из возможных причин их длительного переживания гипотермии *in vivo*, является общее «закисление организма».

Моделирование условий гипотермического хранения эритроцитов при варьировании состава, ионной силы и значений pH среды, позволило прийти к обоснованному выводу о том, что сниженные значения pH обеспечивали сохранение морфологии клеток на протяжении более длительного времени чем щелочные. При этом слабоелектролитные среды с пониженным pH способствовали большей осмотической устойчивости эритроцитов на фоне высокой морфологической сохранности, по сравнению с электролитными. Факт позитивного влияния слабоелектролитных сред со сниженным pH при ГХ клеток мы апробировали на более сложно организованную биосистему – печень. В частности на модели изолированной печени крысы было убедительно показано, что как краткосрочное (1 часовое) гипотермичное хранение, так 24 часовое хранение в слабоелектролитных средах с пониженным значением pH и последующая тепловая реперфузия обеспечивают высокий (аналогичный среде UW) уровень сохранности морфологических характеристик органа. Это свидетельствует о возможной перспективе применения сред с похожими характеристиками для хранения печени.

Первичным ответом клеток печени на изменение тоничности среды в условиях снижения температуры является их осмотическое набухание. Важным фактором в увеличении степени сохранности органов играет состав консервирующих сред, а также возможность их модификации эффективными микродобавками. Удлинение сроков гипотермического хранения органов может быть достигнуто, главным образом, путем оптимизации состава консервирующих растворов [40, 65, 364] и методов перфузии.

Состав консервирующего раствора имеет существенное значение для сохранения АТФ-синтетической функции клетки в ходе гипотермии. С большой долей вероятности можно утверждать, что эффективность среды UW, а также других сред во многом обусловлена высоким содержанием K^+ .

Снижение содержания K^+ в ходе ГХ, очевидно, обусловлено диффузией катиона по градиенту концентраций, поскольку в условиях гипотермии транспорт калия зависит исключительно от концентрационного градиента и скорости диффузии электролитов [160]. В связи с этим, поддержание уровня АТФ на протяжении ГХ печени в указанном растворе могло быть реализовано путём снижения энергетических затрат на транспорт K^+ в клетку.

Одним из реальных вариантов замедления выхода ионов K^+ из клетки, это присутствие ионов водорода, что реализуется в среде с пониженным значением pH. Как было показано нами [397], в эритроцитах при хранении потеря внутриклеточного калия была меньше в средах с пониженным значением pH.

Данные литературы и наши исследования показывают, что при кислых значениях pH происходит вход в клетку ионов водорода по градиенту концентрации, что приводит к ингибированию выхода ионов K^+ , Cl^- [18, 119, 259] и, как следствие, повышению внутриклеточного осмотического давления.

В пользу этого предположения свидетельствуют исследования, в которых показано, что использование калиевых растворов – фактически удержание калия внутри клетки, оказывает положительное действие на энергетику клеток при гипотермии, поскольку замедляет расход АТФ.

Кроме того, присутствие ионов водорода H^+ , и как следствие, удержание ионов калия в митохондриях, обеспечивает поддержание протонного градиента и потенциала на их внутренней мембране и ограничивает гидролиз митохондриального АТФ за счет ингибирования H^+ -АТФазы [53, 54].

Защеление внутриклеточной среды на фоне истощения запасов АТФ рассматривается многими исследователями как механизм адаптации, препятствующий развитию некротических изменений в клетках, поскольку приводит к ингибированию ферментов деградации (фосфолипазы, кальпаины и др.), оптимум рН которых находится в нейтральной и щелочной среде.

В наших исследованиях мы не наблюдали у значительной доли гепатоцитов активизации лизосомального аппарата, нарушения структуры ЭПР, его топологической связи с митохондриями и кариолеммой, а также изменения структуры самих митохондрий.

Вопрос о влиянии консервирующих растворов, величины рН, а также времени холодовой экспозиции на протонную проницаемость внутренней мембраны митохондрий в литературе практически не обсуждается, хотя имеется огромная масса исследований, посвященных ионному транспорту митохондрий.

В результате экспериментальных исследований установлено, что важным условием для предотвращения отека органа при холодовом хранении является использование в консервирующих растворах слабо проникающих в клетку соединений [72, 394]. В этой связи, применение в нашей работе слабозлектролитных сред явилось положительным моментом, позволившим также повысить уровень сохранности структуры.

Полученные данные свидетельствуют, что предложенные условия хранения эритроцитов и печени позволяет в значительной степени повысить сохранность клеток после ГХ, в том числе и после переноса их в среду с физиологическими условиями (тоничность и рН при НТРП печени), а также в значительной степени удешевить процедуру перфузии при получении высокой степени сохранности клеток.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе на основе теоретического и экспериментального моделирования с привлечением ряда электронно-микроскопических методов и оптической микроскопии, а также биофизических методов проведено комплексное исследование структурно-функционального состояния объектов различного уровня организации (мембрана–клетка–ткань–орган) гомойотермных и гетеротермных организмов в интервале температур 4–38°C, при длительном гипотермическом хранении в средах различного состава и значений pH и замораживания. Экспериментально (на морфологическом уровне) обоснована эффективность применения растворов низкой ионной силы на основе маннитола с пониженным значением pH для перфузии органов и в качестве основы для сред при хранении клеток.

1. Установлена взаимосвязь между морфологическим состоянием эритроцитов человека, их осмотической устойчивостью и степенью повреждения в зависимости от физико-химических характеристик среды экспозиции и при гипотермическом хранении. В процессе ГХ (1-21 сут) степень повреждения эритроцитов в слабозлектролитных средах достоверно более низкая, а их осмотическая устойчивость более высокая по сравнению с электролитными средами. Вне зависимости от ионной силы среды при кислых значениях pH наблюдается максимальная сохранность формы и минимальная осмотическая устойчивость эритроцитов. Наиболее устойчивой к действию факторов среды является эхиноцитарная форма клеток. Установлено, что между 10 и 14 сут хранения отмечается разрыхление структуры гликокаликса и его отслоение от мембраны.

2. В ходе сферо-эхиноцитарной трансформации при ГХ эритроцит в результате отслоения везикул теряет до 30 % мембранной поверхности. Для эхиноцитов III и IV степени кренирования диаметр спикул составляет 435 ± 43 нм и 257 ± 37 нм, а размер отпочковавшихся везикул – 495 ± 87 нм и 348 ± 65 нм, соответственно. Диаметр спикул в местах их утончения составляет, в

среднем, 137 ± 25 нм; количество спикул на поверхности сфероэритроцитов составляло 35 – 89 на одну клетку и в среднем – 60 спикул.

3. Максимум потери внутриклеточного K^+ происходит в течение первых суток ГХ эритроцитов при всех экспериментальных условиях, за исключением натриевой среды с рН 5,4, для которой отмечался высокий (92%), относительно контроля, уровень содержания внутриклеточного K^+ . В слабозлектролитных средах наблюдалась более динамичная потеря внутриклеточного K^+ . Выход K^+ из эритроцитов и их форма непосредственно не коррелировали между собой, поскольку форма клеток в течение первых суток соответствовала контролю, за исключением слабозлектролитных сред при рН 8,6.

4. Снижение температуры эритроцитов с нарушенным спектрином (термоденатурация) до $4^{\circ}C$ вызывает необратимые изменения их морфологии, проявляющиеся в везикуляции и фрагментации. Наблюдаемое при этом распределение ВМЧ в виде непрерывной сети (аналогично спектриновой сети цитоскелета) свидетельствует об усилении сродства трансмембранных белков и молекул термоденатурированного спектрина. Установлены общие закономерности процесса везикуляции эритроцитов, вызванного длительным ГХ и гипертермией.

5. Переход гетеротермов из состояния активности к гибернации сопровождается термоиндуцированными коротковолновым смещением спектра флуоресценции белков мембран эритроцитов (на 10–12 нм), повышением в 1,5 раза параметра микровязкости бислоя в области полярных головок липидов, изменением морфологии и перераспределением ВМЧ, а также повышением устойчивости эритроцитов к длительному гипотермическому хранению и кислотному гемолизу. Особой областью температур для эритроцитов спящего животного является $15-20^{\circ}C$; повышение температуры клеток до $37^{\circ}C$ приближает исследованные параметры мембраны к значениям, характерным для активного животного. Эффективным подходом для выявления различий, связанных с изменением

физиологии гетеротермов, и в сравнении с гомойотермами оказались исследования температурных зависимостей.

6. Впервые определено время водного диффузионного обмена (τ) мембран эритроцитов гетеротермов и показано, что Аррениусова зависимость τ в мембранах эритроцитов суслика в спящем состоянии, в отличие от гомойотермных организмов, имеет вид прямой, а величина τ на порядок (в 7-8 раз) меньше, чем у эритроцитов человека. Значения энергии активации процесса переноса молекул воды через мембрану эритроцитов сусликов не превышают 30 кДж/моль в интервале температур 6-38 °С.

7. Впервые показано, что добавление к эритроцитам человека пептида «триггера спячки» с м.м. 1–10 кДа модифицирует структуру их мембраны и приводит к снижению времени водного диффузионного обмена. Наибольший эффект снижения τ (на 25–30%) наблюдался, в температурном интервале 6–27 °С при конечной концентрации раствора пептида 6×10^{-7} М. В присутствии меньших (3×10^{-7} М) и больших (5×10^{-6} М) концентраций эффект снижения τ составлял 18–20 и 6–8%. соответственно. По степени проницаемости мембраны для воды эритроциты человека (Ч) и гетеротермов в трех физиологических состояниях распределились таким образом: ГС > ПС > АС > Ч.

8. Впервые проведено морфологическое исследование процессов рекристаллизации внутриклеточного льда и обезвоживания эритроцитов человека и гетеротермов на этапе температурной остановки ($-20 \div -30^\circ\text{C}$) и оценен коэффициент проницаемости их мембраны для воды в области отрицательных температур, значение которого равно $0,5 \times 10^{-13} \text{ н}^{-1} \text{ м}^3 \text{ сек}^{-1}$ для эритроцитов донора и $10^{-13} \text{ н}^{-1} \text{ м}^3 \text{ сек}^{-1}$ для эритроцитов зимоспящих сусликов.

9. Экспериментально обосновано, что ГХ фрагментов печени в жидкой фазе (питательная среда) обеспечивает более высокий, по сравнению с влажной камерой, уровень морфологической сохранности клеток. Это позволяет рекомендовать данный способ для краткосрочного (1–24 ч) хранения фрагментов ткани и органа. Состояние ультраструктуры клеток

свидетельствует об обратимости наблюдаемых при этом изменений. При ГХ в течение 24–48 ч во влажной камере изменения в ткани печени протекают медленнее, чем в жидкой фазе. Пролонгация сроков хранения до 72 ч приводила к частичной деструкции всех клеточных компонентов ткани, независимо от условий хранения. По степени устойчивости к действию гипотермии внутриклеточные органеллы гепатоцитов гомойотермных организмов распределялись следующим образом: митохондрии < эндоплазматическая сеть < ядерный аппарат.

10. Сравнительное исследование тканей различного структурно-функционального состояния и происхождения показало, что как для изолированных гепатоцитов, так и для клеток в составе фрагментов печени и плаценты существуют примерно одинаковые (24 ч) временные рамки высокого уровня сохранности ультраструктуры, а также последовательность и закономерности изменения ультраструктуры внутриклеточных органелл при длительном гипотермическом хранении.

11. Морфометрический и электронно-микроскопический анализ гепатоцитов зимоспящих сусликов выявили существенные отличия ультраструктуры клеток животного в ГС от клеток в АС и ПС: возрастание в 1,6 раза объемной доли гетерохроматина ядра, в 2 и 2,4 раза – гликогена и жировых включений; уменьшение среднего размера митохондрий при соответствующем достоверном увеличении их количества, а также появлении большего числа лизосомоподобных структур и частичная деструкция сетчатого аппарата. Отмеченные структурные изменения коррелируют с данными об активности ключевых ферментов в печени спящих животных: наблюдалось достоверное (в 1,22 и 1,37 раза) снижении активности СДГ и α -ГФДГ и возрастание (в 1,15 и 1,48 раза) активность НАДФ, НАД – ферментов.

12. Установлено, что клетки печени гетеротермов при ГХ имели высокий уровень сохранности ультраструктуры до 48 часов у животных в активном и пробуждающемся состояниях и до 4-х суток у спящих животных

в отличие от клеток гомойотермных организмов, у которых выраженные изменения наблюдались после 24 часов хранения. По степени устойчивости к действию гипотермии внутриклеточные органеллы гепатоцитов гетеротермов распределялись следующим образом: митохондрии < эндоплазматическая сеть < ядерный аппарат.

13. Впервые показано, что краткосрочное (1 час) гипотермическое хранение изолированной печени в слабоэлектролитных с пониженным значением pH средах и последующая нормотермическая реперфузия (НТРП) обеспечивают высокий (аналогичный среде UW) уровень сохранности морфологических и биохимических характеристик органа, что свидетельствует о перспективности использования данных сред для ГХ. Показано, что 24-часовое хранение в данных средах является критическим сроком восстановления функции печени после НТРП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Кравченко Л. П. Уровень АТФ в изолированных гепатоцитах на этапах холодового хранения в средах различного состава / Л. П. Кравченко, О. А. Семенченко, Б. Д. Фулер // Пробл. криобиол. – 2001. – № 2. – С. 56–60.
2. Reversible mitochondrial uncoupling in the cold phase during liver preservation/reperfusion reduces oxidative injury in the rat model q / A. Y. Petrenko [et al] // Cryobiology. – 2010. – V. 60. – P. 293–300.
3. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих / Николай Иванович Калабухов. – М.: Наука, 1985. – 264 с.
4. Carey H. V. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism at low temperature / H. V. Carey, M. T. Andrews, S. L. Martin // Physiol. Rev. – 2003. – V. 83. – P. 1153–1181.
5. Мельничук С. Д. Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини) / С. Д. Мельничук, Д. О Мельничук. – Київ, 2007. – 220 с.
6. Green C. Mammalian hibernation: lessons for organ preservation? / C. Green // Cryo-Letters. – 2000. – V. 21, № 2. – P. 91–98.
7. К вопросу о биологически активных веществах в тканях зимоспящих / Д. А. Игнатьев [и др.] // журн. Общая биология. – 1995. – Т. 56, № 4. – С. 450–469.
8. Игнатьев Д. А. Влияние синтетического аналога пептида TSKY, выделенного из мозга зимнеспящего суслика, на мозг крыс и мышей / Д. А. Игнатьев, В. В. Воробьев, Р. Х. Зиганшин // ж. Высшей нервной деятельности. – 2005. – Т. 55, № 1. – С. 84–90.
9. Storey K. B. Metabolic rate depression: the biochemistry of mammalian hibernation / K.B. Storey, J.M. Storey // Adv.Clin.Chem. – 2010. –V. 52.– P. 77–108.

10. Белоус А. М. Структурные изменения мембран при охлаждении / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко. – Киев: Наук. думка, 1982. – 255 с.
11. Репин Н. В. Ультраструктурные и динамические характеристики мембран эритроцитов. Влияние физиологического состояния и температуры / Н. В. Репин, С. В. Репина // Цитология. – 1990. – Т. 32, № 11. – С. 1094–1098.
12. Wong P. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc–sphere transformations of the erythrocyte / P. Wong // J. Theor. Biol. – 1999. – V. 196, № 3. – P. 343–361.
13. Wong P. A hypothesis on the role of the electrical charge of haemoglobin in regulating the erythrocytes shape / P. Wong // Med. Hypotheses. – 2004. – № 62. – P. 124–129.
14. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane / H. M. Van Dort [et al] // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276, № 50. – P. 46968–46974.
15. Repin N. V. Temperature–induced transformation of mammalian red blood cells during hyperthermia / N. V. Repin, E. N. Bobrova, S. V. Repina // J. Bioelectrochemistry. – 2008. – V 73, № 2 – P. 101–105.
16. Chu H. Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3 / H. Chu, P. S. Low // Biochem. J. – 2006. – V. 400. – P. 143–151.
17. Repin N. V. Erythrocyte membrane skeleton: a putative participator of adaptive cellular response to temperature variation / N. V. Repin, S. V. Repina // J. Cell. Mol. Biol. Letters. – 1998. – V. 3, № 2. – P. 196–197.
18. Репин Н. В. Роль факторов среды и длительности экспозиции при 4°C в сохранении формы эритроцитов и их мембраны. Механизм везикулообразования / Н. В. Репин, Т. Н. Юрченко // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / под ред. А. Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 165–206.

19. Браун А. Д. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы / А. Д. Браун, Т. П. Моженко. – Л.: Наука, 1987. – 232 с.
20. Курский М. Д. Биохимическая кинетика / М. Д. Курский, С. А. Костерин, В. К. Рыбальченко. – Киев: «Вища школа», 1977. – 264 с.
21. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения) / Марианна Владимировна Биленко. – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
22. Muleme H. M. Mitochondrial metabolism in hibernation: metabolic suppression, temperature effects, and substrate preferences / H. M. Muleme, A. C. Walpole, J. F. Staples // *Physiol. Biochem. Zool.* – 2006. – V. 79. – P. 474–483.
23. Loutit J. F. Factors influencing the preservation of stored red cells / J. F. Loutit // *J Pathol Bacteriology.* – 1945. – V. 57, Iss. 3. – P 325–335.
24. Collins G. M. New organ preservation solutions / G. M. Collins, W. N. Wicomb // *Kidney Int. Suppl.* – 1992. – V. 38. – P. 197–202.
25. Лушников Е. Ф. Аутолиз (Морфология и механизмы развития) / Е. Ф. Лушников, Н. А. Шапиро. – М.: Медицина, 1974. – 199 с.
26. Fuller B. J. Hypothermic perfusion preservation: The future of organ preservation revisited? / B. J. Fuller, Lee C. Y. // *Cryobiology.* – 2007. – V. 54, № 2. – P. 129–145.
27. Organ preservation: Current concepts and new strategies for the next decade/ E. E. Guibert [et al.] // *Trasfus Med Hemother.* – 2011. – V. 38, № 2. – P. 125–142.
28. Mitochondria: role in ischemia, reperfusion and cell death / P. Monteiro [et al.] // *Rev. Port. Cardiol.* – 2003. – V. 22, № 2. – P. 233–254.
29. Хочачка П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Д. Сомеро. – М.: Мир, 1988. – 567 с.

30. Liver metabolism in cold hypoxia: a comparison of energy metabolism and glycolysis in cold-sensitive and cold-resistant mammals / T. A. Churchill [et al] // J. Comp. Physiol. B. – 1994. – V. 164. – P. 396–404.
31. Churchill T. A. Stimulation of glycolysis by histidine buffers in mammalian liver during cold hypoxia / T. A. Churchill, C. J. Green, B. J. Fuller // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – V. 320, № 1. – P. 43–50.
32. Покровский А. А. Печень, лизосомы, питание / А. А. Покровский, Л. П. Крыстев. – София: изд-во Болгарской Акад. Наук, 1997. – 207 с.
33. Semenza G.L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1 / G.L. Semenza // Biochem J. – 2007. – V. 405, № 1. – P. 1–9.
34. Репин Н. В. Водная диффузионная проницаемость мембран эритроцитов зимнеявляющихся сусликов *Citellus undulates* / Н. В. Репин, В. И. Шейкин // Проблемы криобиологии. – 1996. – № 1. – С. 41–46.
35. Repin N. V. Two-step rapid freezing method: estimation of membrane hydraulic permeability in erythrocytes at temperature exposure stage / N. V. Repin // Cryo Letters. – 2009. – V. 30, № 4. – P. 250–261.
36. Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран: Монография / Владимир Петрович Скулачев – М.: Наука, 1989. – 564 с.
37. Skulachev V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics // Biochim. Biophys. Acta – 1998. – V. 1363. – P. 100–124.
38. Skulachev V. P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms // Mol. Aspects. Med. – 1999. – V 20, № 3. – P. 139–184.
39. Skulachev V. P. Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling / V. P. Skulachev // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 1999. – V. 31, № 5. – P. 431–445.

40. Kozlova I. Preservation of mouse liver tissue during cold storage in experimental solutions assessed X-Ray microanalysis / I. Kozlova, Y. Khalid, G. M. Roomans // *Liver Transplantation*. – 2003. – V. 9, № 3. – P. 268–278.
41. Pegg D. E. Metabolism of normal and ischemically injured rabbit kidneys during perfusion for 48 hours at 10 C / D. E. Pegg, M. C. Wusteman, J. Foreman // *Transplantation*. – 1981. – V. 32, № 5. – P. 437–443.
42. Kaji D. Volume-sensitive K transport in human erythrocytes / D. Kaji // *J. Gen. Physiol.* – 1986. – V. 88, № 6. – P. 719–738.
43. Potassium uptake and water content in hepatocytes isolated from rat liver preserved in Euro–Collins and UW solutions and after transplantation / D. Crenesse [et al.] // *Cryobiology*. – 1994. – V. 31. – P. 540–548.
44. Шахламов В. А. Реакции клеток на гипоксию / В. А. Шахламов, В. И. Сороковой // *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. – 1983. – Т. 85, № 7. – С. 12–25.
45. Иванова Л. И. Физиологические механизмы регуляции водно-солевого баланса у животных и человека / Л. И. Иванова // *Соросовский образовательный журнал*. – 1996. – № 10. – С. 4–12.
46. Margaret M. S. re: Dutch and Scottish clinical forensic medicine: a comparison. Turnbull J A, Hannaford P F, Busuttil A. 3: 15-19 / Margaret M. S. // *J Clin Forensic Med*. – 1997. – V. 4, № 1. – P. 55.
47. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis / E. Maeno [et al.] // *PNAS*. – 2000. – V. 97, № 17. – P. 9487–9492.
48. A comparative study of reducing the extracellular potassium concentration in red blood cells by washing and by reduction of additive solution / I. Bansal [et al.] // *Transfusion*. – 2007. – V. 47, № 2. – P. 248–250.
49. Hypothermic preservation of hepatocytes. I. Role of cell swelling / D. C. Marsh [et al.] // *Cryobiology*. – 1989. – V. 26, № 6. – P. 524–534.

50. Дунаєв О. В. Стан мітохондріального апарата передсердних кардіоміоцитів щурів в умовах гострої ішемії міокарда / О. В.Дунаєв // Морфологія. – 2007. – Т. 1, № 4. – С. 39–43.
51. Лопухин Ю. М. Ультраструктурные основы жизнеспособности печени, почек и сердца / Ю. М. Лопухин, Э. М. Коган, Я. Л. Караганов. – М.: Медицина, 1977. – 255 с.
52. Fuller B. J. Ultrastructural assessment of cryopreserved hepatocytes after prolonged ectopic transplantation / B. J. Fuller, J. Lewin, L. Sage // Transplantation. – 1983. – V. 35, № 1. – P. 15–18.
53. Di Lisa F. Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury / F. Di Lisa, P. Bernardi // Mol. Cell Biochem. – 1998. – V. 184. – № 1-2. – P. 379–391.
54. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus / T. El-Bacha [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – V. 1772. – № 10. – P. 1158–1166.
55. Energy metabolism following prolonged hepatic cold preservation: benefits of interrupted hypoxia on the adenine nucleotide pool in rat liver / S. J. Mitchell [et al.] // Cryobiology. – 1999. – V. 39, № 2. – P. 130–137.
56. Implication of mitochondrial dysfunction and cell death in cold preservation - warm reperfusion-induced hepatocyte injury / M. Duval [et al.] // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2006. – Vol. 84, № 5. – P. 547–554.
57. Rat liver preservation by hypothermic oscillating liver perfusion compared to simple cold storage / P. Dutkowski [et al.] // J. Cryobiology. – 1998. – V. 36, № 1. – P.61–70.
58. McAnulty J. F. The efficacy of antioxidants administered during low temperature storage of warm ischemic kidney tissue slices. // J. F. McAnulty, X. Q. Huang /Cryobiology.–1997.– Vol 34.– N4.– P.406–415

59. Jassem W. Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation / W. Jassem, N.D. Heaton // *Kidney Int.* – 2004. – 66. – N 2. – P. 514-517.
60. C. K. Kumar [et al.] Bioenergetic targeting during organ preservation:³¹P magnetic resonance spectroscopy investigations into the use of fructose to sustain hepatic ATP turnover during cold hypoxia in porcine livers / C. K. Kumar [et al.] // *Cryobiology*. – 2000. – V. 41, № 1. – P. 72–87.
61. Кондрашова М.Н. Адаптация к гипоксии посредством переключения метаболизма на превращения янтарной кислоты / М.Н. Кондрашова, Е.И. Маевский [и др.] // *Митохондрии. Биохимия и ультраструктура*. – М.: Наука, 1973. – С. 112–129.
62. Лопухин Ю. М. Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией / Ю. М. Лопухин, Э. М. Коган. – М.: Медицина, 1975. – 280 с.
63. Динамика ультраструктурных изменений клеток печени при различных условиях длительного гипотермического хранения ее фрагментов / Н. В. Репин [и др.] // *Світ медицини та біології*. – 2005. – № 3. – С. 60–64.
64. Морфологические и биохимические признаки повреждения печени при гипотермическом хранении в сахарозо-содержащем растворе / Н. В. Репин [и др.] // *Експериментальна і клінічна медицина*. – 2006. – № 3. – С. 51–56.
65. Comparison of rat liver preservation with Eurocollins and a modified University of Wisconsin solution: transplantation and isolation of hepatocytes for culture / A. Michel [et al.] // *Eur. Surg. Res.* – 1990. – V. 22, № 5. – P. 249–255.
66. Кравченко Л. П. Условия длительного хранения изолированных гепатоцитов при 4°C / Л. П. Кравченко, А. Н. Андриенко // *Пробл. криобиологии*. – 1993. – № 1. – С. 33–38.

67. Кравченко Л. П. Влияние гипотермии на некоторые биохимические показатели изолированных гепатоцитов / Л. П. Кравченко, А. М. Белоус, И. В. Шанина // Укр. биохим. журн. – 1994. – Т. 66, № 4. – С. 108–113.
68. Кравченко Л. П. Эффективность сахарозосодержащего раствора при холодовом хранении целой печени крысы / Л. П. Кравченко, И. В. Шанина, А. М. Белоус, В. Сампсон // Пробл. криобиологии. – 1997. – № 3. – С. 45–48.
69. Кравченко Л. П. Длительное холодовое хранение клеток печени *in vivo* и *in vitro* / Л. П. Кравченко, А. М. Белоус, И. В. Шанина // Пробл. криобиологии. – 1998. – № 2. – С. 39–41.
70. Производное пластохинона SkQ1, адресованное в митохондрии, снижает ишемически-реперфузионные повреждения печени при гипотермическом хранении для трансплантации / Д. В. Черкашина [и др.] // Биохимия. – 2011. – Т. 76, № 9. – С. 1254–1263.
71. Mitochondrial function after liver preservation in high or low ionic-strength solutions: a comparison between UW-based and sucrose-based (SBS) solution / A. Yu. Somov, O. A. Semchenko, C.J. Green, A.Yu. Petrenko, B. J. Fuller // CryoLetters. – 2009. – Vol. 30, N 1. – P.1-12.
72. Shanina I. Efficiency of the sucrose-containing solution on the cold preservation of whole liver / I. Shanina, L. Kravchenko, V. Sampson // Cryo-Letters. – 1998. – V. 19, № 4. – P. 231–236.
73. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species / U. Rauen [et al.] // FASEB J. – 1999. – V. 13. – P. 155–168.
74. Holloway C. M. Viability of sinusoidal lining cells in cold-preserved rat liver allografts / C. M. Holloway, P. R. Harvey, S. M. Strasberg // Transplantation. – 1990. – V. 49, № 1. – P.225-229.

75. Gao W. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation / W. Gao, R. C. Bentley, J. F. Madden, P. A. Clavien // *Hepatology*.—1998.— V. 27, № 6. — P.1652–1660.
76. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers / J.C. Caldwell– Kenkel [et al.] // *Hepatology*. – 1989. – V. 10, № 3. – P. 292–299.
77. Sinusoidal lining cell damage: The critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat / C.B. McKeown [et al.] // *Transplantation*. – 1988. – V. 46, № 2. – P. 178–191
78. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver / P. M. Huet [et al.] // *Hepatology* – 2004. – V. 39, № 4. – P. 1110–1119.
79. Apoptosis and regeneration of sinusoidal endothelial cells after extended cold preservation and transplantation of rat liver / Zhu J [et al.] // *Transplantation*. – 2007. – V. 84, № 11. – P.1483–1491.
80. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: a TNF- α /IL-6 –dependent mechanism / N. Selzner [et al.] // *Hepatology*. – 2002. –V. 36, № 4. – P. 812–818.
81. Prolonged storage of rat hepatocytes in UW solution impairs volume and pH regulation / P. Haddad [et al.] // *Hepatology*. – 1994. – V. 20, № 4. – P. 342–345.
82. Du G. Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro / G. Du, A. Mouithys-Mickalad, F. Sluse // *Free Radic. Biol. Med.* – 1998. – V. 25. – № 9. – P. 1066–1074.
83. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury / Jassem W. [et al.] // *Transplantation*. – 2002. – V. 73, № 4. – P. 493–499.

84. Impairment of hepatic mitochondrial respiratory function following storage and orthotopic transplantation of rat livers / I. A. Sammut [et al.] // *Cryobiology*. – 1998. – V. 36, № 1. – P. 49–60.
85. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney/ E. Y. Plotnikov [et al.] // *Kidney Int.* – 2007. – V. 72, № 12. – P. 1493-1502.
86. Solaini G. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion / G. Solaini, D. A. Harris // *Biochem J.* – 2005. – 1; 390 (Pt 2).–P. 377-394.
87. Barbiro E. Real time monitoring of rat liver energy state during ischemia / E. Barbiro, Y. Zurovsky, A. Mayevsky // *Microvasc Res.* – 1998. – V. 56, № 3. – P. 253–260.
88. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки / Ленинджер А. – М.: Мир, 1974. – 958 с.
89. LaManna J.C. Hypoxia/ischemia and the pH paradox / J.C. LaManna // *Adv. Exp. Med. Biol.* –1996. – V. 388. – P. 283–292.
90. Lemasters J.J. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes/ J.J. Lemasters [et al.] // *EXS.* – 1996 – V. 76. – P. 99–114.
91. Losser M.-R. Mechanisms of liver damage / M.-R. Losser, D. Payen // *Seminar in liver disease.* – 1996. – V. 16.– P. 357–367.
92. Ockner R. K. Apoptosis and liver diseases: Recent concepts of mechanism and significance / R. K. Ockner // *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* – 2001. – № 16. – P. 248–260.
93. Kerkweg U. Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron / U. Kerkweg, T. Li, H. de Groot, U. Rauen // *Hepatology.* – 2002. – Vol. 35, № 3. – P. 560 –567.
94. Jaeschke H. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury / H. Jaeschke, J.J. Lemasters // *Gastroenterology.* – 2003. – V. 125, № 4. – P. 1246–1257.

95. Dutkowski P. Liver metabolism during cold ischemic incubation in UW solution in the rat model / P. Dutkowski, J. Southard, T. Junginger // *Langenbecks Arch. Chir.* – 1997. – V. 382, № 6. – P. 343–348.
96. Organ preservation: experience with University of Wisconsin solution and plans for the future / F. Belzer [et al.] // *Clin. Transplant.* – 1990. – V. 4, № 2. – P. 73–77.
97. Machine perfusion preservation of the pig liver using a new preservation solution, polysol / M. Bessems [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2006. – V. 38, № 5. – P. 1238–1242.
98. Churchill T. A. Investigation of a primary requirement of organ preservation solutions: supplemental buffering agents improve hepatic energy production during cold storage / T. A. Churchill, N. M. Kneteman // *Transplantation.* – 1998. – V. 65, № 4. – P. 551–559.
99. Influence of 48 hours of cold storage in University of Wisconsin organ preservation solution on metabolic capacity of rat hepatocytes / O. Olinga [et al.] // *J. Hepatol.* – 1997. – V. 27, № 4. – P. 738–743.
100. Howden B. Liver preservation: a comparison of celsior to colloid- free University of Wisconsin solution / B. Howden, P. Jablonski // *Transplantation.* – 2000. – V. 70, № 8. – P. 1140–1142.
101. Дворцевой В. К. Функція серця після перфузії розчинами проникаючих кріопротекторів / В. К. Дворцевой, В.В. Кірошка // *Трансплантологія.* – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 79–80.
102. Кравченко Л. П. Дыхательная активность изолированных гепатоцитов при длительном холодном хранении и последующей нормотермической инкубации / Л. П. Кравченко, А. Ю. Петренко, А. Ю. Сомов, Б.Д. Фуллер // *Пробл. криобиол.* – 2001. – № 1. – С. 15–19.
103. Сомов А. Ю. Энергетическое состояние печени при гипотермическом хранении и нормотермической реперфузии: автореф. дисс... канд. биол.

наук: 03.00.19 / Сомов Александр Юрьевич; Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины НАНУ. – Х., 2005. – 21 с.

104. Cellular properties of human erythrocytes preserved in saline–adenine–glucose–mannitol in the presence of L-carnitine / A. Arduini [et al] // *Am. J. Hematol.* – 2007. – V. 82. – P. 31–40.
105. The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression / J. L. Holovati [et al.] // *Transfusion.* – 2008. – V. 48, № 8. – P. 1658–1668.
106. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells / A.G. Kriebardis [et al] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2007. – V. 11, № 1. – P. 148–155.
107. Черницкий Е. А. Везикуляция и изменение мембранных белков эритроцитов в процессе хранения консервированной крови и эритроцитной массы при 4 °С / Е. А. Черницкий, И. Е. Федорович, Е. И. Слобожанина // *Гематология и трансфузиология.* – 1993. – Т. 38, № 8. – С. 18–21.
108. Proteomics and transfusion medicine: future perspectives / P.A. Queloz [et al] // *Proteomics.* – 2006. – V. 6, № 20. – P. 5605–5614.
109. D'Amici G. M. Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage / G.M. D'Amici, S. Rinalducci, L. Zolla // *J. Proteome. Res.* – 2007. – V. 6, № 8. – P. 3242–3255.
110. RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components / A. G. Kriebardis [et al] // *Transfusion.* – 2008. – V. 48, № 9. – P. 1943–1953.
111. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions / G.J. Bosman [et al.] // *Transfusion.* – 2008. – V. 48, № 5. – P. 827–835.

112. Erythrocyte ageing *in vivo* and *in vitro*: structural aspects and implications for transfusion / G.J. Bosman [et al] // *Transfus Med.* – 2008. – V. 18. – № 6. – P. 35–47.
113. Spectroscopic characterization of vesicle formation on heated human erythrocytes and the influence of the antiviral agent amantadine / A. Herrmann [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.* – 1985. – V. 812, Is 1. – P. 277–285.
114. Yoshida T. Extended storage of red blood cells under anaerobic conditions / T. Yoshida, J.P. AuBuchon, L. Tryzelaar [et al] // *Vox Sang.* – 2007. – V. 92, N. 1. – P. 22–31.
115. Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools / O. Rubin [et al.] // *Vox Sang.* – 2008. – V. 95, № 4. – P. 288–297.
116. De Korte D. Prolonged maintenance of 2,3-diphosphoglycerate acid and adenosine triphosphate in red blood cells during storage / D. de Korte, M. Kleine, H.G. Korsten, A.J. Verhoeven // *Transfusion.* – 2008. – V. 48, № 6. – P. 1081–1089.
117. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose–saline-adenine-glucose-mannitol / M. H. Antonelou [et al.] // *Transfusion.* – 2010. – V. 50, Febr. – P. 376–389.
118. Wong P. A hypothesis on the disc-sphere transformation of the erythrocytes between glass surfaces and of related observation / P. Wong // *J. Theor. Biol.* – 2005. – № 223. – P. 127–135.
119. Gedde M. M. Cytoplasmic pH and human erythrocyte shape / M. M. Gedde, D. K. Davis, W. H. Huestis // *Biophys J.* – 1997. – V. 72, № 3. – P. 1234–1246.
120. Storey K.B. Out cold: biochemical regulation of mammalian hibernation - a mini-review/ K.B. Storey // *Gerontology.* – 2010. – V. 56, № 2. – P.220-230.

121. Oeltgen P.R. Characterization of a hibernation induction trigger / P. R. Oeltgen, W. A. Spurrier in: Survival in the cold. Hibernation and other adaptations. – N.-Y.: Elsevier North Holland, 1981. – P. 139–157.
122. Гаврилюк Б. К. Устойчивость к пониженной температуре культур клеток и тканей, выделенных из органов зимоспящих животных/ Б. К. Гаврилюк // Криобиология. – 1985. – № 3. – С. 28–30.
123. Natural resistance to liver cold ischemia-reperfusion injury associated with the hibernation phenotype / S. L. Lindell [et al.] // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2005. – V. 288. – P. 473–480.
124. Spurrier W. A. Several blood and circulatory changes in the hibernation of the 13-lined ground Squirrel, *Citellus tridecemlineatus* / W. A. Spurrier, A. R. Dawe // Comp. Biochem. Physiol. – 1973. – Vol. 44A. – P. 267–282.
125. Kimzey S. L. Resistance of erythrocytes of hibernating mammals to loss of potassium during hibernation and during cold storage / S. L. Kimzey, J. S. Willis // J Gen Physiol. – 1971. – Vol. 58. – P. 620–633.
126. Hall A.C. Differential effects of temperature on three components of passive permeability to potassium in rodent red cells / A. C. Hall, J. S. Willis // J Physiology. – 1984. – Vol. 348. –P. 629–243.
127. Gorham D. A. Hibernation induces expression of moesin in intestinal epithelial cells / D. A. Gorham, A. Bretscher, H. V. Carey // Cryobiology. – 1998. –Vol. 37. P. 146–154
128. Diakowski W. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily / W. Diakowski, M. Grzybek, A. F. Sikorski // Folia histochemica et cytobiologica. – 2006. – Vol. 44, No. 4. – P. 231–248
129. Репина С. В. О клеточных механизмах регуляции природного гипобиоза / С. В. Репина, О. А. Нардид, Н. В. Репин // Науковий вісник НАУ. – 2008. – №126. – С. 113–119.
130. Repina S. V. Peculiarities of RBCs resistance to acid hemolysis in hibernating

- mammals / S. V. Repina, N. V. Repin // J. Bioelectrochem. – 2008. – V. 73. – P. 106–109.
131. Жегунов Г. Ф. Синтез белка в клетках сердца и динамика ультраструктуры кардиомиоцитов зимоспящих животных в цикле гибернации / Г. Ф. Жегунов // Цитология. – 1988. – Т. 30, № 2. – С.157–162.
 132. Львова С. П. Влияние гипотермических состояний на липидные компоненты в тканях суслика // В сб. науч. трудов: Механизмы зимней спячки: тез. докл. Всесоюз. симп. – Махачкала, 1990. – С. 65–66.
 133. Бронников Г. Е. Возможные пути регуляции энергетического метаболизма у зимоспящих. Кинетический подход / Г. Е. Бронников // Механизмы зимней спячки: Сб. науч. трудов. – Пущино, 1987. – С. 24–32.
 134. Эмирбеков Э. З. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела / Э. З. Эмирбеков, С. П. Львова. – Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1985. – 79 с.
 135. Козлова В. Ф. Структурно-функциональная характеристика некоторых внутренних органов животных после глубокой гипотермии с премедикацией метронидазолом / В. Ф. Козлова, Т. Н. Юрченко // Пробл. криобиол. – 1995. – № 1. – С. 42–47.
 136. Burlington R. F. Ultrastructural changes in heart tissue during hibernation / R. F. Burlington, W. D. Bowers, R. C. Daum, P. Ashbaugh // Cryobiology – 1972. – V 9. – С. 224–228.
 137. Козлова В. Ф. Структурные аспекты адаптации зимнеспящих животных / В. Ф. Козлова, Т. Н. Юрченко // Пробл. криобиол. – 1996. – № 3. – С. 44–52.
 138. Виноградова М. С. Клетки желудочных желез зимнеспящего грызуна / М. С. Виноградова // В сб. науч. трудов: Механизмы природных гипометаболических состояний. – Пущино, 1991. – С. 50–58.

139. Шестопалова Л. В. Ультраструктурные особенности эпителиоцитов крипт двенадцатиперстной кишки зимнеспящего грызуна / Л. В. Шестопалова, С. В. Айдагулова // Механизмы природных гипометаболических состояний: Сб. науч. тр. – Пущино, 1991. – С. 77–89.
140. Филюшина Е. Е. Сезонные особенности ультраструктурной организации печени гибернантов и активных зимой животных / Е. Е. Филюшина, Л. В. Адодина // Механизмы природных гипометаболических состояний: Сб. науч. тр. – Пущино, 1991. – С. 58–66.
141. Mortola J.P. Implications of hypoxic hypometabolism during mammalian ontogenesis / J.P. Mortola // *Resp Physiol Neurobiol.* – 2004. – V. 141. – P. 345–356.
142. Hibernating mammals in sudden cardiac death in epilepsy: What do they tell us? / D. B. Colugnati [et al.] // *Medical Hypothesis.* – 2008. – № 70. – P. 929–932.
143. Bradbury J. How hibernators might one day solve medical problems / J. Bradbury // *Lancet.* – 2001. – Vol. 358. – P. 1164.
144. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. – М.: Мир, 1975. – 324 с.
145. Гайер Г. Электронная гистохимия / Г. Гайер. – М.: Мир, 1974. – 488 с.
146. Robards A. W. Low temperature methods in biological electron microscopy (Practical methods in electron microscopy) / A. W. Robards, U. B. Sleytr. – Amsterdam–New York–Oxford: Elsevier, 1985. – 551 p.
147. Fujikawa S. The effect of various cooling rates on the membrane ultrastructure of frozen human erythrocytes and its relation to the extent of haemolysis after thawing / S. Fujikawa // *J. Cell Sci.* – 1981. – V. 49. – P. 369–382.

148. Репин Н. В. Изучение вне- и внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах человека при различных режимах охлаждения / Н. В. Репин // Криобиология. – 1986. – № 3. – С. 31–36.
149. А.с. 1157597 СССР, МКИ G 01N 1/06. Устройство для скалывания биологических объектов в вакууме / Н. В. Репин, А. Вайсман, Б. А. Скорняков, В. П. Храмцов (СССР). – № 3674913; заявл. 13.12.83; опуб. 22.01.85, БИ.- ' 9.- С.154.: ил.
150. Кварцевый термопреобразователь ДАП.ТЦ-05 для устройств регулирования температуры / Н. В. Репин, В. Ф. Солодовник, С. В. Репина, М. И. Чебан // Пробл. криобиол. – 2001. – № 4. – С. 52–55.
151. Staehelin L. A. Structure and function of intercellular junctions / L. A. Staehelin // Int. Rev. Cytol. – 1974. – V. 39. – P. 191–283.
152. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии / Герц Ильич Лихтенштейн. – М.: Наука, 1974. – 256 с.
153. Цымбал Л. В. Влияние неспецифических факторов на динамическую структуру цитоплазмы эритроцитов // Пробл. криобиологии. – 2000. – № 3. – С. 8–14.
154. Conlon T. Water diffusion permeability of erythrocytes using an NMR technique / T. Conlon, R. Outhen // Biochem. Biophys. Acta. – 1972. – V. 288, № 2. – P. 354–361.
155. ЯМР релаксометр для определения водной проницаемости биологических мембран методом парамагнитного допинга / В. И. Шейкин [и др.] // Вестник Харьковского университета. – 1984. – № 225. – С. 91–93.
156. Фаррар Т. Импульсная и Фурье-спектроскопия / Т. Фаррар, Э. Беккер. – М.: Мир, 1978. – 168 с.
157. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.

158. Fairbanks G. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane / G. Fairbanks, T. L. Steck, D. F. H. Wallach // *Biochemistry*. – 1971. – V. 10. – P. 2606–2617.
159. Терсков И. А. Метод химических (кислотных) эритрограмм / И. А. Терсков, И. И. Гетельзон // *Биофизика*. – 1957. – Т. 2. – С. 259–266.
160. Леонова В. Г. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека / Вера Георгиевна Леонова. – Новосибирск: Наука, 1987. – 242 с.
161. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / Петр Фомич Рокицкий. – Минск.: Высшэйшая школа, 1967. – 328 с.
162. Branton D. Fracture faces of frozen membranes / D. Branton // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1966. – V. 55. – P. 1048–1056.
163. Lamellar and hexagonal lipid phases as visualized by freeze-etching / D. W. Diener [et al] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1970. – V. 219. – P. 47–60.
164. Branton D. Freeze-etching studies of membrane structure / D. Branton // *Phil. Trans. Rep. Soc. Lond. B*. – 1971. – V. 261. – P. 133–138.
165. Pinto da Silva P. Membrane splitting in freeze-etching. Covalently bound ferritin as a membrane marker / P. Pinto da Silva, D. Branton // *J. Cell Biol.* – 1970. – V. 45. – P. 598–605.
166. Tillack T. W. Demonstration of the outer surface of freeze-etched red blood cell membranes / T. W. Tillack, V. T. Marchesi // *J. Cell Biol.* – 1970. – V. 45. – P. 649–653.
167. Pinto da Silva P. Localization of A₁ antigen sites on human erythrocyte ghosts / P. Pinto da Silva, D. Branton, S. D. Douglas // *Nature*. – 1971. – V. 232. – P. 194–196.
168. Branton D. Membrane structure / D. Branton // *Ann. Rev. Plant. Physiol.* – 1969. – V. 20. – P. 209–238.
169. Hereward F. V. Fracture planes of the plasmalemma of some higher plants revealed by freeze-etching / F. V. Hereward, D. H. Northeote // *J. Cell Sci.* – 1973. – V. 13. – P. 621–635.

170. Pinto da Silva P. Membrane intercalated particles: the plasma membrane as a planar fluid domain / P. Pinto da Silva, D. Branton // *Chem. Phys. Lipids.* – 1972. – V. 8. – P. 265–278.
171. Влияние криопротекторов на биологические системы / Т. Н. Юрченко [и др.]. – Киев: Наук. думка, 1989. – 240 с.
172. Гордиенко Е. А. Теоретический и экспериментальный анализ защитного эффекта «температурной остановки» / Е. А. Гордиенко, Н. В. Репин // *Моделирование криобиологических процессов: Сб. науч. тр.* – Харьков, 1988. – С. 35–43.
173. Singer. S. J. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes / S. J. Singer, G. L. Nicolson // *Science.* – 1972. – V. 175. – P. 720–731.
174. Nicolson G. L. The localization of spectrin on the inner surface of human red blood cell membranes by ferritin-conjugated antibodies / G. L. Nicolson, V. T. Marchesi, S. J. Singer // *J. Cell Biol.* – 1971. – V. 51. – P. 265–272.
175. Yu J. Reconstitution of intramembrane particles in recombinants of erythrocyte protein Band 3 and lipid: Effects of spectrin-actin association / J. Yu, D. Branton // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1976. – V. 73, № 11. – P. 3891–3895.
176. Pinto da Silva P. Freeze-etch localization of concanavalin A receptors to the membrane intercalated particles of human erythrocyte ghost membranes / P. Pinto da Silva, G. L. Nicolson // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1974. – V. 363. – P. 311.
177. Elgsaeter A. Intramembrane particle aggregation in erythrocyte ghosts. I. The effect of protein removal / A. Elgsaeter, D. Branton // *J. Cell Biol.* – 1974. – V. 63. – P. 1018–1030.
178. Tourtellotte M. E. Freeze-fractured *Acholeplasma laidlawii*: Nature of particles observed / M. E. Tourtellotte, J. S. Zupnik // *Science.* – 1973. – V. 179. – P. 84–86.

179. Racker E. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation / E. Racker, W. Staerkenius // *J. Biol Chem.* – 1974. – V. 249. – P.662.
180. Grant C. V. M. Glycophorin in lipid bilayers / C. V. M. Grant, H. M. McConnell // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1974. – V. 71. – P. 4653–4657.
181. Membrane formation by the adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum / D. H. MacLennan [et al] // *J. Biol. Chem.* – 1971. – V. 246. – P. 2702–2710.
182. Pinto da Silva P. Membrane intercalated particles in human erythrocyte ghosts: sites of preferred passage of water molecules at low temperature / P. Pinto da Silva // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1973. – V. 70, № 5. – P. 1339–1343.
183. Tillack T. W. The structure of erythrocyte membranes studied by freeze-etching. II. Localization of receptors for phytohemagglutinin and influenza virus to the intramembranous particles / T. W. Tillack, R. E. Scott, V. T. Marchesi // *J. Exp. Med.* – 1972. – V. 135. – P. 1209–1227.
184. Pinto da Silva P. Anionic sites on the membrane intercalated particles of human erythrocyte ghost membranes. Freeze-etch localization / P. Pinto da Silva, H. H. Fudenberg // *Exp. Cell Res.* – 1973. – V. 81. – P. 127–138.
185. Grant C. W. Lipid lateral phase separations. Spin label freeze-fracture electron microscopy studies / C. W. Grant // *Biophys J.* – 1975. – V. 15, № 9. – P. 949–952.
186. Черницкий Е. А. Структура и функция эритроцитарных мембран / Е. А. Черницкий, А. В. Воробей. – Минск: Наука и техника, 1981. – 216 с.
187. Membrane skeleton-bilayer interaction is not the major determinant of membrane phospholipid asymmetry in human erythrocytes / S. R. Gudi [et al] // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 1990. – V. 1023. – P. 63–72.

188. Di Stasi A. M. M. Interactions of skeletal proteins with red blood cell membrane / A. M. M. Di Stasi, T. Forte, M. Giorgi, P. Grimaldi // *Ann. Ist. Super Sanita.* – 1988. – V.24. – P. 591 – 598.
189. Aloia R. C. Membrane function in mammalian hibernation / R. C. Aloia, J. K. Raison. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – V. 988. – P. 123–146.
190. Tomishige M. Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton / M. Tomishige, Y. Sako, A. Kusumi // *J. Cell Biol.* – 1998. – V. 142, № 4. – P. 989–1000.
191. Bullivant S. Evaluation of membrane structure facts and artifacts produced during freeze-fracturing / S. Bullivant // *J. Microsc.* – 1977. – V. 111, № 1. – P. 101–116.
192. Weinstein R. S. Fine structure of the band 3 protein in human red cell membranes: freeze-fracture studies / R. S. Weinstein, J. Khodadad, T. L. Steck // *J. Supramolec. Struct.* – 1978. – V. 8. – P. 325–336.
193. Комиссарчик Я. Ю. Анализ ультраструктурных изменений апикальной мембраны гранулярных клеток мочевого пузыря лягушки при стимулированном антидиуретическим гормоном в осмотическом потоке воды / Я. Ю. Комиссарчик, Е. С. Снигиревская, В. И. Романов, В. Г. Сабинин // *Биол. мембраны.* – 1985. – Т. 2, № 6. – С. 630–641.
194. Hu K.-S. Protein rotational diffusion measurements on the interaction of bee venom melittin with bacteriorhodopsin in lipid vesicles / K.-S. Hu, M. J. Dufton, I. Morrison, R. J. Cherry // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – V. 816. – P. 358–364.
195. Itakura M. Static and kinetic studies of calmodulin and melittin complex / M. Itakura, T. Iio // *J. Biochem.* – 1992. – V. 112, № 2. – P. 183–191.
196. Ladokhin A. S. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin / A. S. Ladokhin, M. E. Selsted, S. H. White // *Biophys. J.* – 1997. – V. 72, № 4. – P. 1762–1766.

197. Melittin lysis of red cells / M.T. Tosteson [et al] // J. Membr. Biol. – 1985. – V. 87. – P. 35–44.
198. Portlock S. H. Leakage of internal markers from erythrocytes and lipid vesicles induced by melittin, gramicidin S and alamethicin: a comparative study / S. H. Portlock, M. I. Clague, R. I. Cherry // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – V. 1030, № 1. – P. 1–10.
199. Schwarz G. Kinetics of melittin induced pore formation in the membrane of lipid vesicles / G. Schwarz, R. T. Zong, T. Popescu // Biochim. Biophys. Acta. – 1992. – V. 1110. – P. 97–105.
200. Schwarz G. Thermodynamic and kinetic studies on the association of melittin with a phospholipid bilayer / G. Schwarz, G. Beschiaschvili // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – V. 979. – P. 82–90.
201. Кириллов В. А. Изменение ориентации плоскости скола клеточных мембран при использовании метода замораживания-скалывания как показатель изменения структуры клеточных мембран / В. А. Кириллов, С. В. Конев // Цитология. – 1984. – Т. 26, № 5. – С. 520–524.
202. Khodadad J.K., Weinstein R.S. The band 3-rich membrane of llama erythrocytes: studies on cell shape and the organization of membrane proteins // J. Membr. Biol. – 1983. – V.72, № 3. – P. 161–171.
203. Матвеев А. В. Сравнительное исследование структурных переходов в эритроцитарных мембранах доноров и новорожденных / А. В. Матвеев [и др.] // Бюл. эксп. биол. и мед. – 1997. – Т. 123, № 2. – С. 196–200.
204. Elgsaeter A. Intramembrane particle aggregation in erythrocyte ghosts. II. The influence of spectrin aggregation / A. Elgsaeter, D. M. Shotton, D. Branton // Biochim. Biophys. Acta. – 1976. – V. 426. – P. 101–122.
205. Kunitomo M. p-Chloromercurobenzoate-induced dissociation of cytoskeletal proteins in red blood cells of rats / M. Kunitomo, K. Shibata, T. Miura // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – V. 905. – P. 257–267.

206. Kurantsin-Mills J. Freeze-etching and biochemical analysis of human fetal erythrocyte membrane / J. Kurantsin-Mills, L. S. Lessin // *Pediatr. Res.* – 1984. – V. 18. – P. 1035–1041.
207. Arsenault A. L. Altered plasma membrane ultrastructure in multidrug-resistant cells / A. L. Arsenault, V. Ling, N. Kartner // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – V. 938. – P. 315–321.
208. Репин Н. В. Электронно-микроскопическое изучение характера кристаллизации при замораживании водных растворов криопротекторов и некоторых клеток: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.19 / Репин Николай Васильевич; Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины НАНУ.– Х., 1984. – 20 с.
209. Кириллов В. А. Изучение процесса АТФ–истощения эритроцитов человека с помощью метода криоскалывания / В. А. Кириллов, В. Л. Вотяков, С. В. Конев // *Цитология.* – 1987. – Т. 29, № 11.– С. 1245–1249.
210. Brandts J. F. Calorimetric studies of the structural transitions of the human erythrocyte membrane. The involvement of spectrin in the A transition / J. F. Brandts [et al] // *Biochemistry.* – 1977. – V. 16. – P. 3450–3454.
211. Hansen J. C. An elastic network model based on the structure of the red blood cell membrane skeleton / J. C. Hansen, R. Skalak, S. Chien, A. Hoger // *Biophys J.* – 1996. – V. 70.– P. 146–166.
212. Кассирский И. А. Клиническая гематология / И. А. Кассирский, Г. А. Алексеев. – М.: Медицина, 1970. – С 50–72.
213. Coakley W.T. Effects of ionic strength, serum protein and surface charge on membrane movements and vesicle production in heated erythrocytes, / W. T. Coakley, J. O. T. Deeley // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – V. 602. – P. 355–375.
214. Repin N. V. Temperature-induced transformation of mammalian red blood cells during hyperthermia / N. V. Repin, E. N. Bobrova, S. V. Repina // 16th Meeting of the European Association for Red Cell Research, 16-19 March 2007: Abstracts. – Oxford, England, 2007. – P. 23.

215. Tokuyasu K. T. Domains of receptor mobility and endocytosis in the membranes of neonatal human erythrocytes and reticulocytes are deficient in spectrin / K. T. Tokuyasu, R. Schekman, S. J. Singer // *J. Cell Biol.* – 1979. – V. 80, № 2. – P. 481–486.
216. Matovcik L. The membrane of the human neonatal red cell / L. Matovcik, W. Mentzer // *Clin. Haematol.* – 1985. – V. 14, № 1. – P. 203–221.
217. Iamaïkina I. V. Temperature denaturation of erythrocyte spectrin: rheology, deformability and resistance to detergent hemolysis / I. V. Iamaïkina, V. A. Mansurov, E. V. Ivashkevich // *Biofizika.* – 1997. – V. 42. – P. 675–679.
218. Соловьева А. С. Сравнительное микрокалориметрическое исследование плавления гемоглобина из донорской крови до и после низкотемпературного воздействия / А. С. Соловьева, А. В. Зинченко // *Пробл. криобиол.* – 2000. – № 1. – С. 32–35.
219. Relationship of hypertermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins / J. R. Lepock [et al] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – V. 980, № 2. – P. 191–201.
220. Liu S.-C. Alteration of the erythrocyte membrane skeletal ultrastructure in hereditary spherocytosis, hereditary elliptocytosis, and pyropoikilocytosis / S.-C. Liu, L. H. Derick, P. Agre, J. Palek // *Blood.* – 1990. – V. 76, № 1. – P. 198–205.
221. Hui S. W. Electron microscopic observation of the aggregation of membrane proteins in human erythrocyte by melittin / S. W. Hui, C. M. Stewart, R. J. Cherry // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1990. – V. 1023, № 7. – P. 335–340.
222. Pinto da Silva P. Translational mobility of the membrane intercalated particles of human erythrocyte ghosts. pH-dependent, reversible aggregation / P. Pinto da Silva // *J. Cell Biol.* – 1972. – V. 53. – P. 777–787.

223. Козлов М. М. Мембранный скелет эритроцита. Теоретическая модель / М. М. Козлов, В. С. Маркин // Биол. мембраны. – 1986. – Т. 3, № 4. – С. 404–422.
224. Репина С. В. Влияние цитоскелетных белков на температурозависимые перестройки в мембранах эритроцитов / С. В. Репина, Л. В. Цымбал // Криобиология. – 1988. – № 2. – С. 49–51.
225. Ultrastructure of the human erythrocyte cytoskeleton and its attachment to the membrane / J. A. Ursitti [et al] // Cell Motil. Cytoskeleton. – 1991. – V. 19, № 4. – P. 227–243.
226. Manno S. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine–skeletal protein interactions modulate membrane stability / S. Manno, Y. Takakuwa, N. Mohandas // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – V. 99, № 4. – P. 1943–1948.
227. Wyatt K. Both ankyrin and band 4.1 are required to restrict the rotational mobility of band 3 in the human erythrocyte membrane / K. Wyatt, R. J. Cherry // Biochim. Biophys. Acta. – 1992. – V. 1103, № 2. – P. 327–330.
228. Слобожанина Е. И. Содержание внутриклеточного АТФ и структурное состояние белков в эритроцитарной мембране / Е. И. Слобожанина, Е. А. Черницкий, Н. М. Козлова // Биофизика. – 1982. – Т. 27, № 3. – С. 425–429.
229. Sheetz M. P. On mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. I. The role of spectrin complex / M. P. Sheetz, S. J. Singer // J. Cell Biol. – 1977. – V. 73. – P. 638–646.
230. Белоус А. М. Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – М.: ВИНТИ АН СССР – 1978. – Т. 9. – С. 80–113.
231. Репин Н. В. Структурные перестройки в клетках и их мембранах при длительном гипотермическом хранении / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха //

- Пробл. криобиол. – 2005. – Т. 15, № 4. – С. 630–635.
232. Репин Н. В. Значение факторов среды хранения в обеспечении устойчивости эритроцитов к длительной гипотермии / Н. В. Репин, В. В. Кирошка // Биофизика живой клетки. – 2008. – Т. 9. – С. 108–109.
 233. Low pH induced shape changes and vesiculation of human erythrocytes / M. Gros [et al] // Gen. Physiol. Biophys. – 1996. – V. 15, № 2. – P. 145–163.
 234. The role of electrolytes and pH in RBC ASs / J. R. Hess [et al] // Transfusion. – 2001. – V. 41. – P. 1045–1051.
 235. Скорняков Б. О. Електронно - мікроскопічні дослідження в кріобіології / Б. О. Скорняков, Т. П. Говоруха, М. В. Репін // Вісник АН УРСР. – 1986. – № 9. – С. 30–37.
 236. Козлов М. М. Механизм образования безбелковых участков мембраны: разрыв мембранного скелета / М. М. Козлов, Л. В. Черномордик, В. С. Маркин // Биол. мембраны. – 1989. – Т. 6, № 6. – С. 597–611.
 237. Gimsa J. A possible molecular mechanism governing human erythrocyte shape / J. Gimsa // Biophys J. – 1998. – V. 75. – P. 568–569.
 238. Гордиенко Е. А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е. А. Гордиенко, Н. С. Пушкарь. – Киев: Наукова думка, 1994. – 144 с.
 239. Johnson R. M. Shape and volume changes in erythrocyte ghosts and spectrin–actin networks / R. M. Johnson, G. Taylor, D. B. Meyer // J. Cell Biol. – 1980. – V. 86, № 2. – P. 371–376.
 240. Richter S. The monovalent cation “leak” transport in human erythrocytes: an electroneutral exchange process / S. Richter, J. Hamann, D. Kummerow, I. Bernhardt // Biophys J. – 1997. – № 73. – P. 733–745.
 241. Gedde M. M. Shape response of human to altered cell pH / M. M. Gedde, E. Yang, W. H. Huestis // Blood. – 1995. – V. 86, № 4. – P. 1595–1599.
 242. Tachev K. D. On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model / K. D. Tachev, K. D.

- Donov, P. A. Kralchevsky // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. – 2004. – № 34. – P. 123–140.
243. Rudenko S. V. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories / S. V. Rudenko // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2010. – V. 1798, № 9. – P. 1767–1778.
244. Черный В. В. Влияние амфифильных молекул на форму эритроцитов / В. В. Черный, М. Пауличке // *Биол. мембраны*. – 1990. – Т 7, № 8. – С. 838–842.
245. George S. J. Mechanism of the increase in cation permeability of human erythrocytes in low-chloride media/ S. J. George, P. A. Knauf // *The Rockefeller University press*. – 1985. – № 86. – P. 721–738.
246. Liu S. Q. Effects of external pH or substrate binding and on the inward chloride translocation rate constant of band 3 / S. Q. Liu, F. Y. Law, P. A. Knauf // *J. Gen. Physiol.* – 1996 – V. 107, № 2 – P. 271–291.
247. Hoffman J. F. On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells / J. F. Hoffman // *Blood cells*. – 1987. – V. 12, № 3. – P. 565–588.
248. Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic response of human red blood cells / J. D. Bisognano [et al] // *J. Gen. Physiol.* – 1993. – V. 102. – P. 99–123.
249. Glaser R. Does the transmembrane potential ($\Delta\psi$) or the intracellular pH (pHi) control the shape of human erythrocytes? / R. Glaser // *Biophys. J.* – 1998. – № 75. – P. 569–570.
250. Lim H. W. G. Stomatocyte– discocyte– echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer–couple hypothesis from membrane mechanics / H. W. G. Lim, M. Wortis, R. Mukhopadhyay // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – № 99. – P. 16766–16769.

251. Högman C. F. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate / C. F. Högman, H. Löf, H. T. Meryman // *Transfusion*. – 2006. – V. 46. – P. 1543–1552.
252. The survival, function, and hemolysis of human RBCs stored at 4°C in additive solution (AS-1, AS-3, or AS-5) for 42 days and then biochemically modified, frozen, thawed, washed, and stored at 4°C in sodium chloride and glucose solution for 24 hours / C. R. Valeri [et al] // *Transfusion*. – 2000. – V. 40. – P. 1341–1345.
253. Петренко Ю. М. Роль поверхностных зарядов в поддержании осмотической резистентности эритроцитов / Ю. М. Петренко, Ю. А. Владимиров // *Гематология и трансфузиология*. – 1987. – № 10. – С. 15–18.
254. Godin Ch. Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity / Ch. Godin, A. Caprani // *Eur. Biophys. J.* – 1997. – V. 26, № 2. – P. 175–182.
255. Gimsa J. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? / J. Gimsa, C. Ried // *Mol. Membr. Biol.* – 1995. – V. 12. – P. 247–254.
256. Крымский Л. Д. Растровая электронная микроскопия сосудов и крови / Л. Д. Крымский, Г. Д. Нестайко, А. Г. Рыбалов. – М.: Медицина, 1976. – 165 с.
257. Bessis M. Living blood cells and their ultrastructure / M. Bessis. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1973. – P. 140–175.
258. Lutz H. U. Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. I. Characterization of spectrin-free vesicles / H. U. Lutz, S. C. Liu, J. Palek // *J. Cell Biol.* – 1977. – V. 73. – P. 548–560.
259. Репин Н. В. Анализ морфологии эритроцитов и их устойчивости в зависимости от pH и ионной силы среды в условиях гипотермического

- хранения / Н. В. Репин, В. В. Кирошка, О. И. Головки // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 1. – С. 10–17.
260. Sheetz M. P. Membrane skeletal dynamics: role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins and shape / M. P. Sheetz // *Semin. Hematol.* – 1983. – № 20. – P.175–188.
261. Svetina S. Mechanical and functional aspects of membrane skeletons / S. Svetina, B. Bozic, J. Derganc, B. Zeks // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2001. – V. 6, № 3. – P 677–690.
262. Spherocyte shape transformation and release of tubular nanovesicles in human erythrocytes / A. Iglic [et al] // *Bioelectrochemistry.* – 2004. – № 62. – P. 159–161.
263. Božič B. Coupling between vesicle shape and lateral distribution of mobile membrane inclusions / B. Božič, V. Kralj-Iglič, S. Svetina // *Phys. Rev. E.* – 2006. – V. 73.– P. 041915.
264. Högman C. F. Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion/ C. F. Högman, H. T. Meryman // *Transfusion Medicine Reviews.*– 1999. – V. 13, Iss. 4. – P. 275–296.
265. Kralj-Iglic V. Shapes of bilayer vesicles with membrane embedded molecules / V. Kralj-Iglic, S. Svetina, B. Zeks // *Eur. Biophys. J.* – 1996. – V. 24. – P. 311–321.
266. Lerche D. Mechanical membrane properties of human red blood cells and their change due to metabolic disturbance / D. Lerche, G. Jucobasch, W. Meier, D. Megow // *Biomed. Biochim. Acta.* – 1983. – V. 42. – P. 112–116.
267. Lange Y. Role of the reticulum in the stability and shape of the isolated human erythrocyte membrane / Y. Lange, R. A. Hadesman, T. L. Steck // *J Cell Biol.* – 1982. – V. 92, № 3. – P. 714–721.
268. Kozlov M. M. Model of red blood cell membrane skeleton: electrical and mechanical properties / M. M. Kozlov, V.S. Markin // *J. Theor. Biol.* – 1987. – V. 129. – P. 439–452.

269. Birchmeier W. On the mechanism of ATP-induced shape change in human erythrocyte membranes. II. The role of ATP / W. Birchmeier, S. J. Singer // *J Cell Biol.* – 1977. – V. 73. – P. 647–659.
270. Anderson J. M. State of spectrin phosphorylation does not affect erythrocyte shape or spectrin binding to erythrocyte membranes / J. M. Anderson, J. M. Tyler // *J. Biol. Chem.* – 1980. – № 255. – P. 1259–1265.
271. Seigneuret M. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes / M. Seigneuret, Ph. F. Devaux // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1984. — V. 81. – P. 3751–3755.
272. Jinbu Y. Two steps in ATP-dependent shape change of human erythrocyte ghosts / Y. Jinbu, M. Nakao, M. Otsuha, Sh. Sato // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1983. – V. 112, N 2. – P. 384.
273. Батрукова М. А. Анкирин: строение, свойства и функции / М. А. Батрукова, В. Л. Бетин, А. М. Рубцов, О. Д Лопина // *Биохимия.* – 2000. – Т. 65, вып. 4. – С. 469–484.
274. Lutz H. U. A cyclic AMP–dependent phosphorylation of spectrin dimer / H. U. Lutz // *FEBS Lett.* – 1984. – № 169. – P. 323–329.
275. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by beta-spectrine phosphorylation and dephosphorylation / S. Manno [et al] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270, № 10. – P. 5659–5665.
276. Heterogeneous phosphorylation of erythrocyte spectrin in intact cells / S. Pedroni [et al] // *Biochem J.* – 1993. – V. 294. – P. 841–846.
277. Сторожок С. А. Зависимость стабильности и деформабильности мембран эритроцитов от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета / С. А. Сторожок, А. Г. Санников, А. В. Белкин // *Научн. вестн. ТГУ.* – 1996. – Т. 1. – С. 8–15.

278. Сторожок С. А. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства / С. А. Сторожок, А. Г. Санников, Ю. М. Захаров. – Тюмень: Изд. Тюмен. ун-та, 1997. – 140 с.
279. Elgsaeter A. A. The molecular basis of the erythrocyte shape / A. A. Elgsaeter, B. T. Stokke, A. Mikkelsen, D. Branton // *Science*. – 1986. – V. 234. – P. 1217–1223.
280. Ferretti G. Effects of intramembrane particle aggregation on erythrocyte membrane fluidity: an electron spin resonance study in normal and in dystrophic subjects / G. Ferretti, A. Tangorra, G. Curatola // *Exp. Cell Res.* – 1990. – V. 191, № 1. – P. 14–21.
281. Гасс Г. В. Локальные деформации мембран эритроцитов в переменном электрическом поле / Г. В. Гасс, Л. Б. Марголис, Л. В. Черномордик // *Биол. мембраны*. – 1990. – Т. 7, № 6. – С. 647–658.
282. Allan D. Microvesicles from sickle erythrocytes and their relation to irreversible sickling / D. Allan, A. R. Limbrick, P. Thomas, M. P. Westermant // *Br. J. Haematol.* – 1981. – V. 47. – P. 383–390.
283. Marchesi V. T. The red cell membrane skeleton: recent progress / V. T. Marchesi // *Blood*. – 1983. – V. 61, № 1. – P. 1–11.
284. A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion / M. S. D'Almeida [et al] // *Transfus Med.* – 2000. – V. 10, № 4. – P. 291–303.
285. Boyer B. B. Molecular and metabolic aspects of mammalian hibernation / B. B. Boyer, B. M. Barnes // *Bioscience*. – 1999. – V. 49. – P. 713–724.
286. Frerichs K. U. Hibernation in ground squirrels induces state and species-specific tolerance to hypoxia and aglycemia: an in vitro study in hippocampal slices / K. U. Frerichs, J. M. Hallenbeck // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1998. – V. 18. – P. 168–175.

287. Van Breukelen F. Invited review: Molecular adaptations in mammalian hibernators: unique adaptations or generalized responses? / F. Van Breukelen, S. L. Martin // J. Appl. Physiol. – 2002. – V. 92 – P. 2640–2647.
288. Пастухов Ю. Ф. Адаптация к холоду и условиям субарктики: проблемы термофизиологии / Ю. Ф. Пастухов, А. Л. Максимов, В. В. Хаскин. – Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2003. – Т. 1. – 373 с.
289. Malatesta M. Hypometabolic induced state: a potential tool in biomedicine and space exploration / M. Malatesta, M. Biggiogera, C. Zancanaro // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. – 2007. – V. 6. – P. 47–60.
290. Manno S. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation / S. Manno, Y. Takakuwa, N. Mohandas // J Biol Chem. – 2005. – V. 280. – P. 7581–7587.
291. Калабухова Т. Н. Оценка размеров эритроцитов зимоспящего суслика *Citellus undulatus* Pallas / Т. Н. Калабухова // Биофизика. – 2005. – Т. 50, № 2. – С. 376–377.
292. Stokke B. T. Spectrin, human erythrocyte shapes, and mechanochemical properties / B. T. Stokke, A. Mikkelsen, A. Elgsaeter // Biophys J. – 1986. – V. 49. – P. 319–327.
293. Johnson R. Loss of resealing ability in erythrocyte membrane. Effect of divalent cations and spectrin release / R. Johnson, D. Kirkwood // Biochim. Biophys. Acta. – 1978. – V. 509. – P. 58–66.
294. Sheehy R. Abnormal binding of spectrin to the membrane of erythrocytes in some cases of hereditary spherocytosis / R. Sheehy, G. B. Ralston // Blut. – 1978. – V. 36. – P. 145–148.
295. Hall A.C. The effects of temperature on Ca transport in red cells from a hibernator (*Spermophilus richardsonii*) / A.C. Hall, M.W. Wolowyk, L.C.H. Wang, J.C. Ellory // J Therm Biol. – 1987. – V. 12. – P. 61–63.
296. Salhany J. M. Binding of cytosolic proteins to the erythrocyte membrane / J. M. Salhany // J. Cell. Biochemistry. – 1983. – V. 23. – P. 211–222.

297. Campanella, M. E. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane / M. E. Campanella, H. Chu, P. S. Low // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2005. – V. 102. – P. 2402–2407.
298. Ilani A. The pH dependence of the hemolytic potency of bile salts / A. Ilani, R. Granoth // *Biochim Biophys Acta*. – 1990. – V. 1027. – P. 199–204.
299. Hermes-Lima M. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress / M. Hermes-Lima, T. Zenteno-Savin // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* – 2002. – V. 133. – P. 537–556.
300. Ivanov I. T. Low pH-induced hemolysis of erythrocytes is related to the entry of the acid into cytosole and oxidative stress on cellular membranes / I. T. Ivanov // *Biochim Biophys Acta*. – 1999. – V. 1415. – P. 349–360.
301. Ivanov I. T. Comparison of acid and alkaline hemolysis mechanisms in human erythrocytes / I. T. Ivanov // *Biofizika*. – 2001. – V. 46. – P. 281–290.
302. Калабухова Т. Н. Правило Вант-Гоффа в исследовании разных фаз зимней спячки суслика (*Gitellus undulatus* Pallas). Физико-химический путь холодовой адаптации / Т. Н. Калабухова // *Биофизика*. – 1998. – Т. 43, № 6. – С. 1076–1080.
303. Калабухова Т. Н. Кислотный гемолиз и параметры эритроцитов зимоспящего суслика *Citellus undulatus* Pallas / Т. Н. Калабухова // *Цитология*. – 2004. – Т. 46, № 9. – С. 798–799.
304. Forte T. Protein 4.1 is involved in a structural thermotropic transition of the red blood cell membrane detected by spin-labeled stearic acid / T. Forte, T. L. Leto, M. Minetti, V. T. Marchesi // *Biochemistry*. – 1985. – V. 24. – P. 7876–7880.
305. Трикуленко А. В. Кинетика кислотного лизиса эритроцитов в присутствии лигандов некоторых интегральных белков плазматических мембран / А. В. Трикуленко, У. В. Пинишко, Г. Л. Панкевич // *Биофизика*. – 1996. – Т. 41. – С. 1275–1277.

306. pH-induced denaturation of spectrin changes the interaction of membrane proteins in erythrocyte ghosts. Biochemical and electron microscopic evidence. / E. Baumann [et al] // *Ann Anat.* – 1994. – V. 176, № 1. – P. 93–99.
307. Bobrowska-Hagerstrand M. Membrane skeleton and red blood cell vesiculation at low pH / M. Bobrowska-Hagerstrand, H. Hagerstrand, A. Iglic // *Biochim Biophys Acta.* – 1998. – V. 1371, № 1. – P. 123–128.
308. Мажуль В. М. Исследование внутримолекулярной динамики мембранных белков эритроцитов человека методом триптофановой флуоресценции при модификации спектрина / В. М. Мажуль, И. В. Галец // *Биофизика.* – 2006. – Т. 51. – С. 413–417.
309. Репин Н. В. Характер трансформации формы эритроцитов при их охлаждении *in vivo* и *in vitro* / Н. В. Репин // *Актуальные проблемы медицины и биологии: Сб. научн. трудов.* – Киев, 2004. – № 1. – С. 190–194.
310. Кирошка В. В. Морфологические изменения эритроцитов при действии адреналина и 1,2-пропандиола / В. В. Кирошка, Н. В. Репин, В. К. Дворцовой // *Український журнал гематології та трансфузіології.* – 2008. – № 1. – С. 32–36.
311. Хаскин В. В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду / В. В. Хаскин. – Новосибирск: Наука, 1975. – 199 с.
312. Wang L. C. H. Physiological biochemical aspects of mammalian hibernation / L. C. H. Wang, D. J. Pehowich // *Circulation, respiration and metabolism* / R. Gilles. – Berlin: Springer-Verlag, 1985. – P. 531–542.
313. Ахременко А. К. Влияние фракции 1-10 кД из мозга холодадаптированного животного на синтез белка в тканях белых мышечных / А. К. Ахременко, В. И. Загнойко, Д. А. Игнатьев // *Механизмы зимней спячки: Сб. науч. трудов.* – Махачкала, 1990 – С. 23.

314. Кличханов Н. К. Ацетилхолинэстераза мембран эритроцитов при искусственной и естественной гипотермии / Н. К. Кличханов, А. А. Сфиев // В сб. науч. трудов: Механизмы зимней спячки: тез. доклада Всесоюз. симп. – Махачкала, 1990. – С. 54–55.
315. Drost-Hansen W. Phase transitions in biological systems: manifestations of cooperative processes in vicinal water / W. Drost-Hansen // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1973. – V. 204. – P. 100–112.
316. Finch E. D. Mobility of water bound to biological membranes. A proton NMR relaxation study / E. D. Finch, A. S. Schneider // Biochim Biophys Acta. – 1975. – V. 406. – P. 146–154.
317. Лоевский М. Н. Содержание катионов и фосфорорганических метаболитов гликолиза в эритроцитах сусликов в цикле зимней спячки / М. Н. Лоевский, Г. Ф. Жегунов // Механизмы зимней спячки: Сб. науч. трудов. – Пущино, 1987. – С. 61–64.
318. Water permeability in human erythrocytes: identification of membrane proteins involved in water transport / G. Benga [et al] // Eur. J Cell Biol. – 1986. – V. 41, № 2. – P. 252–262.
319. Water exchange through erythrocyte membranes: biochemical and nuclear magnetic resonance studies re-evaluating the effects of sulfhydryl reagents and of proteolytic enzymes on human membranes / G. Benga [et al] // J. Membr. Biol. – 1989. – V. 108, № 2. – P. 105–113.
320. On measuring the diffusional water permeability of human red blood cells and ghosts by nuclear magnetic resonance / G. Benga [et al] // J. Biochem. Biophys. Methods. – 1990. – V. 21, № 2. – P. 87–102.
321. Comparative nuclear magnetic resonance studies of diffusional water permeability of red blood cells from different species. V – Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) / G. Benga [et al] // Comp. Biochem. Physiol. B. – 1993. – V. 106, № 2. – P. 281–285.

322. Comparative nuclear magnetic resonance studies of water permeability of red blood cells from maternal venous blood and newborn umbilical cord blood / G. Benga [et al] // Clin. Chem. Lab. Med. – 2001. – V. 39, № 7. – P. 606–611.
323. Brahm J. Diffusional water permeability of human erythrocytes and their ghosts / J. Brahm // J. Gen. Physiol. – 1982. – V. 79, № 5. – P. 791–819.
324. Pirkle J. L. Pulse nuclear magnetic resonance measurements of water exchange across the erythrocyte membrane employing a low Mn concentration / J. L. Pirkle, D. L. Ashley, J. H. Goldstein // Biophys J. – 1979. – V. 25, № 3. – P. 389–406.
325. Effects of temperature on water diffusion in human erythrocytes and ghosts – nuclear magnetic resonance studies / G. Benga [et al] // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – V. 905. – P. 339–348.
326. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой / О. И. Гордиенко [и др.] // Биологические мембраны. – 1985. – Т. 2, № 3. – С. 310–314.
327. Жиликова Т. А. Температурные изменения состояния воды в биологических мембранах по данным методов ЯМР и СВЧ–диэлектрометрии: автореф. дисс... канд. биол. наук 03.00.22 / Жиликова Татьяна Александровна; Ин-т пробл. криобиологии и криомедицины НАНУ.– Х., 1991. –23 с.
328. Benga G. The proteins involved in water transport in human erythrocytes / G. Benga, O. Popescu, V. I. Pop // Stud. Biophys. – 1989. – V. 134, № 1–2. – P. 139–142.
329. Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран / Валерий Федорович Антонов. – М.: Наука, 1982. – 151 с.

330. Lipschitz-Farber C. Kinetics of water diffusion across phospholipid membranes. ^1H - and ^{17}O -NMR relaxation studies / C. Lipschitz-Farber, H. Degani // BBA. – 1980. – V. 600, № 2. – P. 291–300.
331. Jahnig F. The origin of a break in Arrhenius plots of membrane processes / F. Jahnig, J. Bramhall // Biochim Biophys Acta. – 1982. – V. 690, № 2. – P. 310–313.
332. Репина С. В. Молекулярные аспекты температурной адаптации клеток / С. В. Репина, Л. В. Цымбал // В сб.науч.тр.: Биохимические аспекты холодовых адаптаций, Харьков, 1991. – С. 123–130
333. Willis J.S. Membranes of mammalian hibernators at low temperatures/ J.S. Willis, J.C. Ellory, A.R. Cossins // Effects of low temperatures on biological membranes (G.J. Morris, A. Clarke, Ed.), Academic Press, London, New York 1981, 121–144.
334. Wang L. C. H. Life and low temperature: Mammalian hibernation / L. C. H. Wang // Cryobiology. – 1985. – V. 6, № 2. – P.257–274.
335. Игнатъев Д. А. Результаты тестирования некоторых биологически активных фракций, выделенных из тканей зимоспящих / Д. А. Игнатъев, С. Г. Колаева, И. И. Михалева и др. // В сб.науч.тр.: Механизмы зимней спячки. – Пущино. –1987. – С.106–118.
336. Игнатъев Д. А. О некоторых особенностях терморегуляции зимнеспящих. Возможность вызова состояния торпидности у гомеотермов / Д. А. Игнатъев // В сб.науч.тр.: Эколого-физиологические характеристики природных гипометаболических состояний. – Пущино. – 1992. – С.101–116.
337. Воробьев В. В. Влияние фракций 1000–10000 сыворотки крови гибернирующего и активного суслика на биоэлектрическую активность коры головного мозга крысы/ В. В. Воробьев, Д. А. Игнатъев, И. И. Круман, А. В.Ярков // В сб.науч.тр.: Механизмы зимней спячки. – Пущино. –1987. – С.127–132.

338. Крамарова Л.И. Низкомолекулярные вещества кишечника зимнеспящих сусликов – ингибиторы развития оплодотворенных яйцеклеток морских ежей (*Strongylogobiosus*) / Л. И. Крамарова, С. Г. Колаева, Г. Е. Бронников, И. В. Крафтс // В сб.науч.тр.: Механизмы зимней спячки. – Пушино. – 1987. –С. 138–145.
339. Действие веществ, содержащихся во фракциях мозга и тонкой кишки гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*) на возбудимость миокардиальных волокон / Ю. М. Кокос [и др.] // Механизмы зимней спячки: Сб. науч. трудов. – Пушино, 1987. – С. 146–159.
340. Гулевский А. К. Влияние низкомолекулярных пептидов из тканей гибернирующих и холодоадаптированных животных на пролиферацию клеток асцитной кациномы Эрлиха / А. К. Гулевский, В. И. Грищенко, О. С. Терещенко, И. И. Щенявский // Цитология. – 2006.–Т. 48, № 1. – С. 28–33.
341. Two-step freezing procedure for cryopreservation of rumen ciliates, an effective tool for creation of a frozen rumen protozoa bank / E. Nsabimana [et al] // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69, № 7. – P. 3826–3832.
342. Walter C. A. Ultrastructural appearance of freeze-substituted lymphocytes frozen by interrupting rapid cooling with a period at -26°C / C. A. Walter, S. C. Knight, J. Farrant // J. Cryobiology. – 1975. – V. 12. – P. 103–109.
343. McGann L. E. Survival of tissue culture cells frozen by a two-step procedure to -196°C . I. Holding temperature and time / L. E. McGann, J. Farrant // Cryobiology. – 1976. – V. 13. – P. 261–268.
344. Use of two-step cooling procedure to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing / J. Farrant [et al] // Cryobiology. – 1977. – V. 14. – P. 273–286.
345. On the problem of dehydration and intracellular crystallization during freezing of cell suspensions / N. S. Pushkar [et al.] // Cryobiology. – 1976. – V. 13, № 2. – P.147–152.

346. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing / P. Mazur // *J. Gen. Physiol.* – 1963 – V. 47. – P. 347–369.
347. Воинова М. В. Модель изменения объема липидных везикул при фазовом переходе, вызванном охлаждением / М. В. Воинова, В. Л. Галкин, А. М. Косевич // *Моделирование криобиологических процессов: Сб. науч. тр.* – Харьков, 1988. – С. 12–25.
348. Nei T. Freezing injury to erythrocytes. II. Morphological alterations of cell membranes. / T. Nei // *Cryobiology.* – 1976. – V. 13, № 3. – P. 287–294.
349. Репин Н. В. Изучение вне- и внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах человека при различных условиях охлаждения / Н. В. Репин // *Криобиология.* – 1986. – № 3. – С. 31–36.
350. Diller K. R. Intracellular freezing: effect of extracellular supercooling / K. R. Diller // *Cryobiology.* – 1975. – V. 12, № 5. – P. 480–485.
351. Жданов Р. И. Парамагнитные модели биологически активных соединений / Ренат Ибрагимович Жданов. – М.: Наука, 1981. – 280 с.
352. Toon M. R. Control of red cell urea and water permeability by sulfhydryl reagents / M. R. Toon, A. K. Solomon // *Biochim Biophys Acta.* – 1986 – V. 860, № 2. – P. 361–375.
353. Toon M. R. Modulation of water and urea transport in human red cells: effects of pH and phloretin / M. R. Toon, A. K. Solomon // *J Membr Biol.* – 1987. – V. 99, № 3. – P. 157–164.
354. Toon M. R. Modulation of water transport in human red cells: effect of urea / M. R. Toon, A. K. Solomon // *Biochim Biophys Acta.* – 1988. – V. 940, № 2. – P. 266–274.
355. Chasan B. Effect of thiourea on PCMBs inhibition of osmotic water transport in human red cells / B. Chasan, M. F. Lukacovic, M. R. Toon, A. K. Solomon // *Biochim Biophys Acta.* – 1984. – V. 778, № 1. – P. 185–190.

356. Kuchel P. W. Permeability coefficients from NMR q-space data: models with unevenly spaced semi-permeable parallel membranes / P. W. Kuchel, C. J. Durrant // *J. Magn. Reson.* – 1999. – V. 139, № 2. – P. 258–272.
357. Macey R. I. Properties of water channels in human red cells / R. I. Macey, D. M. Karan, R. E. Farmer // *Biomembranes.* – 1972. – V. 3. – P. 331–340.
358. Voigtlaender J. Transmembrane water influx via aquaporin-1 is inhibited by barbiturates and propofol in red blood cells // J. Voigtlaender, B. Heindl, B. F. Becker // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 2002. – V. 366, № 3. – P. 209–217.
359. Macey R. I. Water channels / R. I. Macey, T. Moura // *Methods Enzymol.* – 1986. – V. 127. – P. 598–609.
360. Finkelstein A. Effect of cholesterol on the water permeability of thin lipid membranes. / A. Finkelstein, A. Cass. // *Nature.* – 1967. – V. 216, № 5116. – P. 717–718.
361. Клейза В. Пути повышения эффективности подготовки печени к консервации / В. Клейза, Д. Витчюлите, Т. Жукаускас // *Вест. АМН СССР.* – 1981. – № 10. – С. 52–57.
362. Козлов С. А. Оптимизация режима консервации печени в температурном диапазоне 2–4°C / С. А. Козлов. – М., 1981. – С. 811. – Деп. в ВИНТИ, № 4188.
363. Квицинская Е. А. Влияние гипотермии на метаболизм в печени при ее консервации / Е. А. Квицинская, Д. Б. Кривулис, Ю. А. Сорокин // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* – 1978. – Т. 86, № 8. – С. 179–182.
364. Fuller B. J. Experimental studies on continuous hypothermic liver perfusion with a synthetic solution containing gelation polypeptides (Haemaccel) / B. J. Fuller, V. D. Attenburrow, C. Newsome // *Cryobiology.* – 1978. – V. 15, № 3. – P. 279–289.

365. Dobbs B. R. The effect of purification of commercial bovine serum albumin on the performance of isolated rat liver perfused at 5°C / B. R. Dobbs, D. Lee // *Cryobiology*. – 1979. – V. 16, № 5. – P. 461–467.
366. Schwabe K. G. Ultrastructural and thermocouple evaluation of rapid freezing techniques / K. G. Schwabe, L. Terracio // *Cryobiology*. – 1980. – V. 17, № 6. – P. 571–584.
367. Зыбин В. С. Изучение некоторых вопросов, связанных с проблемой консервации печени / В. С. Зыбин, М. Г. Серебряков // *Актуальные проблемы трансплантологии и искусственных органов*. – Москва, 1975. – С. 211–215.
368. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes: effects of iron-mediated oxidative stress on metabolic activity / P. De Loecker [et al] // *Cryobiology*. – 1997. – V. 34, № 2. – P. 150–156.
369. Gage A. M. Destruction of hepatic and splenic tissue by freezing and heating / A. M. Gage, M. Montes, A. A. Gage // *Cryobiology*. – 1982. – V. 19, № 2. – P. 172–179.
370. Moresco R.N. Effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution after 12 and 36 hours of rat liver preservation / R.N. Moresco, R.C.V. Santos, J.C.F. Alves Filho, J.R. De Oliveira // *Transplantation Proceedings*. – 2004. – V. 36. – P. 2593–2595.
371. Twelve-week RBC storage / J. R. Hess [et al] // *Transfusion*. – 2003. – V. 43. – P. 867–872.
372. Гистология, цитология и эмбриология: Атлас. Учебное пособие / Под ред. О. В. Волкова, Ю. К. Елецкого – М.: Медицина, 1996. – С. 493 – 530.
373. Федорова М. В. Плацента и ее роль при беременности / М. В. Федорова, Е. П. Калашников. – М.: Медицина, 1986 – 252 с.
374. Гаворка Е. Плацента человека / Е. Гаворка. – Варшава: Польское гос. мед. изд-во, 1970. – 470 с.

375. Субботин М. Я. Основные типы плацентарной трофики / М. Я. Субботин, Н. В. Донских // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1978. – Т. LXXV, № 10. – С. 13–19.
376. Булиенко С. Д. Роль плаценты в иммунологических взаимоотношениях матери и плода / С. Д. Булиенко, П. И. Фогел, В. В. Ткачишин // Акуш. и гинек. – 1976. – № 10. – С. 1–4.
377. Говалло В. И. Иммунология репродукции – М.: Медицина, 1987. – 303 с.
378. Шепітько К. В. Лікування стабільної стенокардії із застосуванням кріоконсервованої фетоплацентарної тканинної трансплантації / Шепітько К. В. [та інш.] // Пробл. криобиол. – 2001. – № 3. – С. 43.
379. Опыт применения клеточно-тканевой терапии в практике аллерголого-иммунологического центра / И. Н. Мелещенко [и др.] // Пробл. криобиол. – 2001. – № 3. – С. 31.
380. Грищенко В. И. Комплексное исследование морфо-функционального состояния плаценты у беременных с хроническим персистирующим гепатитом / В. И. Грищенко, О. П. Танько, О. А. Омельченко // Экспериментальная и клиническая медицина. – 1999. – № 4. – С. 87–89.
381. Миловидова А. Э. Ультраструктурная характеристика плацентарного барьера при железодефицитной анемии беременных / А. Э. Миловидова // Медицина сегодня и завтра. – 1999. – № 2. – С. 6–8.
382. Нечаева О. Н. Патоморфология и ультраструктура плаценты при невынашивании беременности / О. Н. Нечаева, М. И. Исакова, Л. П. Беретятко // Архив патологии. – 1988. – Т. L, № 5. – С. 105–110.
383. Яковцова А. Ф. Значение патоморфологического исследования последа в перинатологии / А. Ф. Яковцова // Архив патологии. – 1988. – Т. L, № 5. – С. 87–92.
384. Павлова Т. В. Ультраструктурная и ультрацитохимическая характеристика терминальных ворсинок плаценты при ЕРН-токсикозе

- беременности / Т. В. Павлова, Л. А. Барков, И.Б. Бухвалов // Архив патологии. – 1985. – Т. XLVII, № 12. – С. 21–26.
385. Цирельников Н. И. Гистофизиология плаценты человека / Николай Иванович Цирельников – Новосибирск: «Наука», 1980. – 184 с.
386. Ширшев С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий / Сергей Викторович Ширшев. – Екатеринбург: УрО РАН, 2009. – 583 с.
387. Шкурупий В. А. Ультраструктура клеток печени при стрессе / Вячеслав Алексеевич Шкурупий. – Новосибирск: Наука, 1989. – 144 с.
388. Жегунов Г. Ф. Индукция синтеза специфических белков у зимоспящих животных при гибернации и пробуждении / Г. Ф. Жегунов, А. М. Белоус, А. О. Котляров // ДАН УССР, сер. «Б». – 1988. – № 11. – С. 59–61.
389. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Э. Пирс. – М.: Иностранная литература, 1962. – 964 с.
390. Эмирбеков Э. З. Биохимические изменения в крови при искусственной и естественной гипотермии / Э. З. Эмирбеков, С. П. Львова, Н. К. Кличханов // Пробл. криобиол. – 1995. – № 1. – С. 14–21.
391. Effects of different cold preservation solutions on restoration of hepatic energy metabolism during cold reperfusion / S. J. Mitchell [et al.] // Cryobiology. – 1996. – V. 33, № 4. – P. 413–422.
392. Эффективность сахарозосодержащего раствора для суточного гипотермического хранения печени половозрелых крыс и эмбрионов человека / О. А. Семенченко [и др.] // Пробл. криобиол. – 2001. – № 3. – С. 86–87.
393. Tissue pH in cold-stored human donor livers preserved in University of Wisconsin solution: A noninvasive clinical study with $\{^{31}\text{P}\}$ -magnetic resonance spectroscopy / R. F. Wolf [et al] // Transplantation. – 1996. – V. 61, № 1. – P. 66–70

394. Пат. №16946 України, МПК⁵ С 12 N 5/00. Розчин для гіпотермічного зберігання ізольованих гепатоцитів / Кравченко Л. П., Андрієнко А. М., Семенченко О. А., Білоус А. М. (Україна). – № 4684421/SU; заявл. 20.02.89; опубл. 29.08.97, Бюл. №4.
395. Репин Н. В. Морфология изолированной печени крыс после нормотермической реперфузии и гипотермического хранения в средах различного состава / Н. В. Репин // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – Вип. 2. – С. 183–188.
396. Hafez T. Applications: Organ preservation and transplantation / T. Hafez, B. Fuller // Advances in biopreservation. – 2006. – P. 197-270.
397. Репин Н.В. Морфологическое состояние изолированной печени крыс после гипотермического хранения в слабозлектролитных средах и нормотермической реперфузии / Н. В. Репин // Пробл. криобиол. – 2012. – Т. 22, № 3. – С. 334.