

4

ISSN 0233-7673

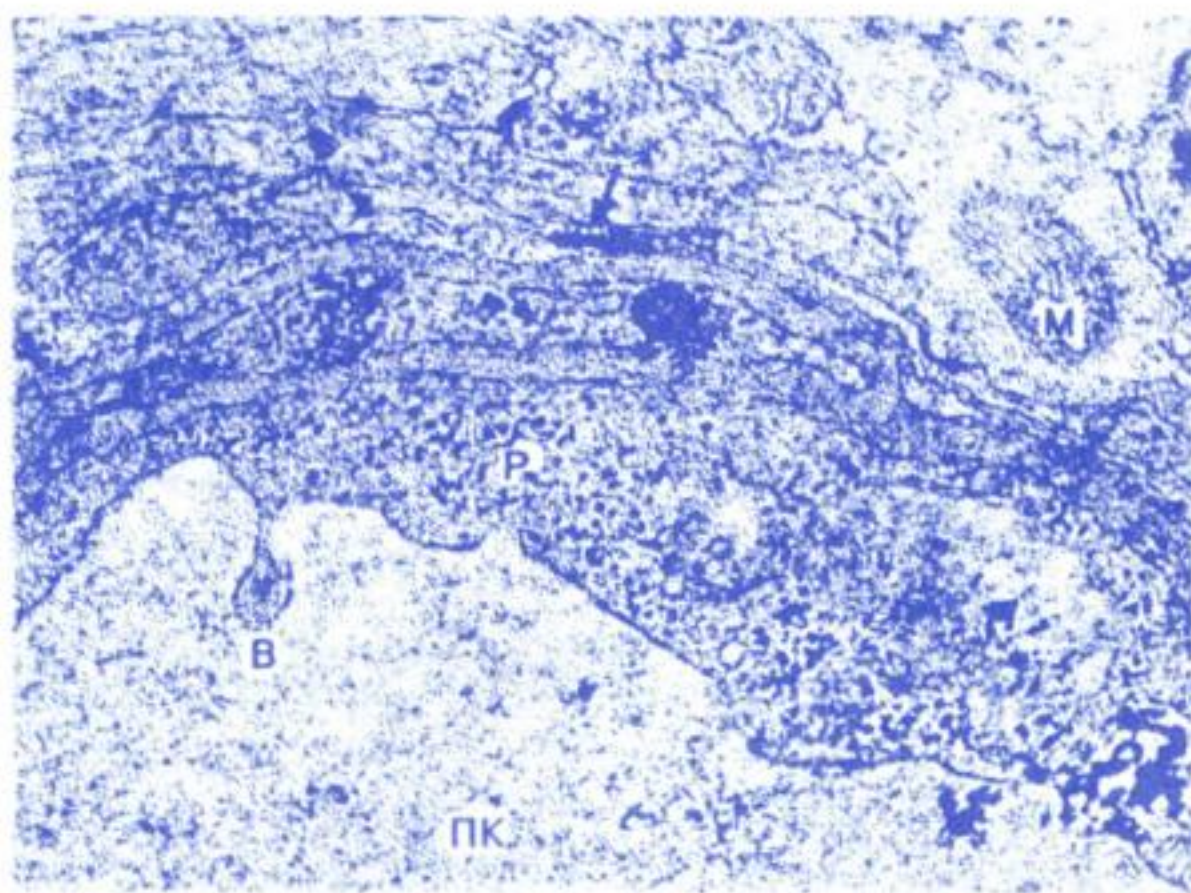
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ, БИОХИМИИ,
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1997

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ПРОБЛЕМЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Суббота Н.П.

К КОНЦЕПЦИИ ЭКЗИСТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ
ОХЛАЖДЕННОГО МОЗГА. ЧАСТЬ I. *Марченко В.С.*

ИЗМЕНЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ МЕМБРАННО-СВЯЗАН-
НЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПРИСУТСТВИИ НЕКОТОРЫХ
КРИОПРОТЕКТОРОВ *Нардид О.А., Дюбко Т.С., Зинченко А.В.,
Соловьева А.С.*

Главный редактор В.И.Грищенко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Editor-in-Chief V.I.Grishchenko

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

4

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1997

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

<i>Суббота Н.П. Проблемы современной биологической медицины</i>	3
<i>Марченко В.С. К концепции экзистознцефалической системы охлажденного мозга. Часть I.</i>	14
<i>Нардид О.А., Дюбко Т.С., Зинченко А.В., Соловьева А.С. Изменение термостабильности мембранно-связанных белковых комплексов в присутствии некоторых криопротекторов</i>	21
<i>Бондаренко Т.П., Лупилова Н.А. Осмолярность и температура среды как факторы, контролирующие поведение эритроцитов</i>	24
<i>Дунаевская О.Н., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Гиперосмотический стресс эритроцитов и антигемолитическая активность трифторперазина</i>	28
<i>Зинченко А.В., Соловьева А.С. Влияние 1,2-пропандиола на тепловую денатурацию бычьего сывороточного альбумина</i>	33

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

<i>Легач Е.И., Чуйко В.А., Бондарева И.М. Влияние димексида и пропандиола на освобождение кортизола срезами адренокортикальной ткани и ее чувствительность к действию стимуляторов</i>	37
<i>Копейка Е. Ф., Черепанов В. В., Дзюба Б. Б. Анализ содержания АТФ и креатинфосфата в сперме карпа (<i>Cyprinus carpio</i>) до и после криоконсервации</i>	41

КРИОМЕДИЦИНА

<i>Суббота Н.П., Кебкало А.Б. Использование криоконсервированных ксеногепатоцитов при лечении экспериментальной механической желтухи</i>	45
<i>Шаповал С.Д. Применение криоконсервированных ксеногепатоцитов у больных сепсисом</i>	50
<i>Спиженко Н.Ю. Лечение патологии шейки матки методом криодеструкции с последующей кондомтерапией при бесплодии</i>	54
<i>Зарицкий О.Б. Экспериментально-морфологичне та клінічне обґрунтування кріохірургічних способів попередження ускладнень при ампутації стегна</i>	57

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Марченко В.С. К фрактальной геометрии гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга</i>	62
<i>Палагина И. А. Особенности биосинтеза гистоновых и негистоновых белков при воздействии дисперсных азокрасителей</i>	65
<i>Shanina I.V. and Kravchenko L.P. Metabolic properties of isolated rat hepatocytes after long-term storage at 4 °C</i>	66



CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Subbota N. P.</i> Current problems of biological medicine	3
<i>Marchenko V. S.</i> On the concept of the existoencephalic system of the cooled brain. Part I.	14
<i>Nardid O. A., Dyubko T. S., Zinchenko A. V., Solovyova A. S.</i> Changes in thermal stability of the membrane-bound protein complexes in the presence of some cryoprotectants	21
<i>Bondarenko T. P., Lupilova N. A.</i> Osmolarity and temperature of the medium are the factors, which control the red cell behavior	24
<i>Dunayevskaya O. N., Shpakova N. M., Bondarenko V. A.</i> Hyperosmotic stress of red cells and the antihemolytic activity of trifluoperazine	28
<i>Zinchenko A. V., Solovyova A. S.</i> Action of 1,2-propanediol on thermal denaturation of bovine serum albumin	33

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

<i>Legach E. I., Chuiko V. A., Bondareva I. M.</i> Effect of dimexide and propanediol on release of hydrocortisone by slices of adrenocortical tissue, and its susceptibility to the action of stimulators	37
<i>Kopeika E. F., Cherepanov V. V., Dzuba B. B.</i> ATP and creatine phosphate content analysis in carp sperm (<i>Cyprinus carpio</i>) before and after cryopreservation	41

CRYOMEDICINE

<i>Subbota N. P., Kebkalo A. B.</i> Application of cryopreserved xenohepatocytes in treatment of experimental mechanical jaundice	45
<i>Shapoval S. D.</i> Application of cryopreserved xenohepatocytes in septic patients	50
<i>Spizhenko N. Yu.</i> Treatment of a pathology of the neck of the uterus using cryodestruction followed by a condom therapy	54
<i>Zaritsky A. B.</i> Experimental-morphological and clinic substantiation of cryosurgical ways of complication prevention at thigh amputation	57

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Marchenko V.S.</i> On the fractal geometry of the blood-brain barrier of the cooled brain	62
<i>Palagina I.A.</i> Distinguishing features of histone and nonhistone proteins during the action of dispersed azodyers	65
<i>Shanina I. V. and Kravchenko L. P.</i> Metabolic properties of isolated rat hepatocytes after long-term storage at 4 °C	66

Свидетельство о государственной регистрации: Серия КВ, №98 от 23.09.93

Адрес редакции:

310015, Харьков,
ул. Переяславская, 23,
тел. (0572) 72-10-39

Научный редактор *В.И.Луговой*

Редактор *Л.А.Рябинина*

Компьютерный набор и верстка: *Л.А.Рябинина, И. Г. Пятигорская*

Подп. в печ. 28.11.97. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 6,0.
Тираж 350 экз. Цена договорная. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

ПРОБЛЕМЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научный обзор современного состояния исследований в области биологической медицины

Научные исследования, проведенные в последние десятилетия в области биологии, медицины, фармакологии, иммунологии, сформировали новую область знаний — биологическую медицину. Основой проводимых разработок в этой области является получение и использование естественных биологических препаратов, выделенных из клеток и тканей животных и человека для коррекции ряда патологических состояний организма. Достижения в биологической медицине тесно связаны с разработками, проводимыми в области криобиологии, поскольку низкие температуры в данном случае используются не только для получения биопрепаратов, но и для их длительного сохранения в жизнеспособном состоянии [2, 19, 26, 30, 60].

Развитие криобиологии на Украине связано с созданием в 1972 г. в Харькове Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Ориентирование проводимых разработок в основном на фундаментальные исследования по выяснению механизмов действия низких температур и криопротекторных соединений на биологические объекты позволило разработать надежные научно обоснованные методы их криозащиты [3, 31]. Тщательно изучались биообъекты, длительное хранение которых при низких температурах или в условиях лиофилизации было целесообразно с точки зрения создания банка клинического назначения.

Исследование особенностей структурно-функциональных свойств биообъектов, выделенных из тканей и органов человека и животных разных сроков развития, позволило выявить уникальные свойства, присущие только клеткам и тканям, находящимся на ранних стадиях онтогенетического развития организма (фетальные клетки и ткани (ФКиТ)) [6, 7, 11, 12, 17, 27, 38, 53, 57, 62]. К этим свойствам ФКиТ относятся:

- высокая приспособляемость за счет роста, миграции, возможности образовывать межклеточные контакты, связанная с высоким содержанием бластных клеток;
- выраженная устойчивость к гипоксии, благодаря использованию энергетически более “древнего” пути окисления субстратов — гликолиза;
- способность подвергаться изменениям и дифференцировке в соответствии с заложенной генетической информацией в ответ на воздействия окружающей среды;
- содержание и продуцирование большого количества различных биологически активных веществ, стадиоспецифических белков и пептидов;
- способность быстрее и с более частыми интервалами делиться;
- отсутствие иммунной реакции отторжения, поскольку в I-м и II-м триместрах гестации еще не экспрессированы белки гистосовместимости I-го и II-го классов. Удаление из имплантатов сопутствующих высокоантиген-

- ных клеток (лимфоциты, купферовские клетки, макрофаги, лейкоциты) повышает их иммунологическую толерантность;
- защита плода в матке от воздействия микроорганизмов.

Именно наличие вышеизложенных свойств ФКиТ явилось основанием к их использованию в качестве эффективной клеточно-тканевой терапии (КТТ) при ряде патологических состояний человека, в основном как мощных биогенных стимуляторов.

История использования клеточного и тканевого материала (в том числе и фетального) насчитывает не одно десятилетие [10, 34]. Спектр показаний к их применению, определившийся благодаря проведению экспериментальных разработок, довольно обширен [18, 35, 45, 64].

С большим успехом в эксперименте, а в некоторых случаях и в клинике, фетальные препараты (ФП) используют при лечении патологии центральной нервной системы (болезнь Паркинсона, Гентингтона, наследственная атаксия, эпилепсия и др.) [47]. Успех определяется тем, что в нейронах и глии фетальной мозговой ткани человека, как указывалось выше, антигены I-го и II-го классов главного комплекса гистосовместимости до рождения не экспрессированы. Показано, что трансплантированные фетальные клетки (ФК) стриатума способны высвобождать в область стриатума пациента нейромедиаторы, а также образовывать с нейронами поврежденной части ЦНС реципиента синаптические связи. Это преимущество фетальной мозговой ткани позволяет возлагать большие надежды на ее использование, поскольку известно, что нервные клетки ЦНС с возрастом теряют способность к пролиферации, а способность к регенерации поврежденных аксонов и дендритов ограничена. В настоящее время существует выработанная стратегия в подходе к лечению данных нарушений, заключающаяся в имплантации ФК соответствующей части головного и спинного мозга в спинномозговую жидкость реципиента [22].

Считают [16, 61], что положительный эффект терапии ФКиТ при патологии ЦНС связан, в частности, с содержанием в них широкого спектра нейтрофинов, влияющих на нейрональные компоненты многих функциональных систем. Эти нейротрофические факторы представляют собой полифункциональные белково-пептидные регуляторы. Именно они контролируют процессы дифференцировки, созревания и образования нейронных сетей в эмбриональном и раннем постэмбриональном развитии. Они же поддерживают жизнеспособность зрелых нейронов ЦНС и ПНС и участвуют в процессах регенерации аксонов и проводящих путей. По мнению авторов [1, 41, 58], влияние периферически введенных ФК на мозговые процессы обусловлено их способностью секретировать нейротрофические факторы в виде растворимых форм в экстрацеллюлярное пространство и способностью переноситься током крови к органам-мишеням. Нейротрофические факторы ретроградно трансформируются в тело нейрона, взаимодействуя с соответствующими мембранно-связанными рецепторами на отростках нейронов. Они способны активировать деятельность систем, тесно связанных с развитием ЦНС (например, иммунной и эндокринной). Таким образом, существующие в настоящее время данные позволяют считать, что нейропептиды выполняют роль медиаторов и модуляторов синаптической передачи. При этом они оказывают действие на трофические процессы и кровоток в нервной ткани, опосредованно влияют на патогенетические звенья демиелинизирующих процессов нервной системы.

Положительный эффект использования мозговых тканей плода при болезни Дауна связывают с двумя механизмами воздействия. Первый включает способность фетальных клеток мозга, содержащих пептиды и белки, перехватывать суперактивный анион-радикал, тем самым ингибируя свободнорадикальные повреждения нейронов [5, 51]. По-видимому, имплантация этих “ловушек супероксида” замедляет процесс гибели нейронов. Вторым механизмом является реализация способности малодифференцированных клеток специализироваться в зависимости от условий. Фетальные клетки, как показано, замещают патологически измененные клетки больного (они способны при этом преодолевать гематоэнцефалический барьер и мигрировать через эндотелий в мозг), стимулируя развитие и функционирование собственного мозга детей, больных СД.

Следующей группой заболеваний, при которых также с успехом используются ткани и клетки человека и животных, являются эндокринные расстройства [23, 41, 48, 49, 56]. Так [65], клиническое использование поджелудочной железы животных имеет более чем 50-летнюю историю. Для этой цели с успехом служат доноры-новорожденные поросята, доноры-кролики [23, 37, 65]. Для поджелудочной железы кролика характерна близость строения к инсулину человека, что и определило предпочтение, отдаваемое в последние годы этому виду доноров при заготовке материала к клиническому использованию.

Имплантацию поджелудочной железы кадаверов человека проводят в клиниках более чем два десятилетия. Научные исследования показали, что использование фетальной поджелудочной железы (как животных, так и человека) имеет ряд преимуществ: фетальная поджелудочная железа содержит значительно больше эндокринной ткани, больше предшественников и стволовых клеток эндокринного происхождения.

Эндокринная миопатия — еще одна из патологий, при которой имплантация культивируемых клеток (миобластов и фибробластов), выделенных из аналогичных мышц плодов человека 12–22 недель гестации, приводит к значительному улучшению состояния больных.

Использование имплантации ФКиТ эффективно при лечении инсультов, травм головного и спинного мозга [54].

Гемопоетические клетки человека 4–18 недель гестации являются идеальным источником полипотентных гемопоетических стволовых клеток, не вызывающих реакцию отторжения, и имеют более чем 35-летнюю историю клинического использования. Их с успехом применяют, как и клетки тимуса, при лечении иммунодефицита, острой миелогенной и лимфобластической лейкемии, аплазии тимуса и т.д. [17, 44, 51].

Многие гематологические и иммунные заболевания (как приобретенные, так и обусловленные генетически) также могут быть излечены при использовании стволовых клеток. Эти клетки способны снабжать организм реципиента как иммунокомпетентными, так и недостающими клетками крови [42, 44].

Интересным проектом является имплантация стволовых клеток с целью восстановления системы гемопоеза после проведения противоопухолевой терапии [44, 51].

Использование ФК при лечении наследственных метаболических расстройств — еще одна из областей исследований, привлекающих внимание врачей.

Положительный эффект использования ФКиТ получен также при лечении мужского бесплодия. После введения ФК происходит постепенное сни-

жение доли сперматозоидов, покрытых антителами, снижается их аффинность, увеличивается подвижность и концентрация.

В современной биологической медицине используются полученные из ФКиТ биологические субстанции для замещения утраченной кожи, стимуляции репаративных процессов в ожоговых ранах благодаря повышенной пролиферативной и сниженной антигенной активности. Для этой цели эффективна также пересадка выращенных вне организма пациента кератиноцитов или фибробластов [24, 40]. Эмбриональные ткани человека и животных являются незаменимыми при лечении ожогов благодаря повышенной пролиферативной и сниженной антигенной активности, содержанию факторов роста, антибактериальным и анальгезирующим факторам [4].

Обнадеживающими следует считать также результаты, полученные при воздействии ФКиТ, их экстрактов на организм-опухоленоситель. Показано [43, 59], что трансформация клетки в опухолевую сопряжена с депрессией некоторых эмбриональных генов, и как следствие — появление в сыворотке крови и на поверхности клеток больного эмбриональных антигенов: канцеро-эмбрионального антигена, α -фетопротейна и др., которые в норме, как известно, определяются лишь в эмбриональных тканях и клетках. Рак, действительно, во многом “скопировал” механизмы эмбриогенеза, включая депрессию эмбриональных генов, а также отмеченную выше продукцию эмбриоподобных факторов. Известна формула: “онкогенез — это искаженный эмбриогенез”. Доказанное существенное сходство между клетками злокачественной опухоли и трофобластом явилось основанием к выдвижению в 1911 г. трофобластической теории рака [33]. Отмеченные биохимические и иммунологические аналогии между супрессорными факторами, продуцируемыми злокачественной опухолью и трофобластом [59], стали предпосылкой тезиса, определившего использование естественных эмбриональных белковых веществ для противоопухолевой защиты [46]. Вместе с тем, если между продуктами жизнедеятельности эмбриона и злокачественной опухоли существует биологическая аналогия, необходимо было выяснить целесообразность иммунизации онкологических больных ФКиТ (или их препаратами) с целью предупреждения продукции или снижения активности продуцируемых злокачественными клетками иммуносупрессорных субстанций. Было показано [15], что эмбриональные клетки и выделенные из них растворимые фракции обладают выраженным иммунорегулирующим и противоопухолевым действием.

Проблемы лечения больных ортопедотравматического профиля также с успехом решаются при использовании гомогенной пастообразной массы, полученной из ФТ (кости, хрящи), хранимой при -196°C [20].

В качестве имплантируемого биоматериала используют также ткани и клетки мертвых плодов человека (18–24 недель гестации): плаценту, кишечник, брыжейку, надпочечник, гипофиз, кости свода черепа и т.д. [18, 20]. Помимо тканей, вводимых в организм с лечебной целью в форме пересадки или имплантации, используются также и некоторые алло- и гетеробиологические жидкости, полученные после гипотермического хранения трупа (трупная кровь, спинномозговая жидкость, водянистая влага, стекловидное тело). Широкое применение получили также водные экстракты консервированных на холоде тканей: экстракты яичка, плаценты, кожи, печени, селезенки. Считается [8, 34, 64], что действие экстрактов из консервированных клеток и тканей на организм очень сходно.

Теоретическим обоснованием использования консервированных на холоде при гипотермических температурах хранения препаратов является биохимическая перестройка метаболических процессов (обменных и энергетических) в отделенных от организма тканях в ответ на “затрудненные” условия жизни. Предполагают [34], что в условиях консервации в тканях развиваются иные стимуляторы, чем существующие и участвующие в метаболических процессах при обычных условиях функционирования. Эти вновь образованные биостимуляторы, позволяющие сохранить жизнь при неблагоприятных условиях, названы В. И. Филатовым “биогенные стимуляторы”. По его концепции появление биогенных стимуляторов под влиянием неблагоприятных факторов среды является общим законом для живой природы и связано с их действием на ферментативные реакции организма. Основная идея тканевой терапии была опубликована в 1933 г. Автор рассматривает биогенные стимуляторы в качестве эволюционно выработанного адаптационного механизма, включающегося в действие при неблагоприятных внешних воздействиях. Особое внимание обращается на то, что стимуляторы образуются в тканях, пока они еще живы, и существует какой-то “вероятный порог” их образования и функционирования в находящихся в состоянии переживания тканях.

Биостимуляторы не являются белками, так как тканевые препараты оказывают биологическое действие и после осаждения белков. Химическая природа биостимуляторов до настоящего времени полностью не расшифрована, однако показано, что они включают группу дикарбоновых кислот и оксикислот жирного ряда, группу ароматических кислот с большой молекулярной массой и группу непредельных ароматических кислот и оксикислот. Учитывая то, что биогенные стимуляторы появляются при неблагоприятных условиях, в том числе и при патологических состояниях, можно считать, что аккумуляцией их является феномен кризиса при инфекционных болезнях.

Интересны работы по изучению биогенных стимуляторов “цитомединов”, выделенных из различных органов и тканей крупного рогатого скота [36]. Считается [13, 14, 16], что регуляция гомеостаза межклеточных систем осуществляется на разных уровнях, включая нейроэндокринные, иммунологические, клеточные и молекулярные механизмы. Все эти механизмы, в сущности, выполняют единую задачу — координируют обмен и воспроизведение генетической информации. В последнее время уделяется внимание регуляторным пептидам: факторам роста, эмбриональным индукторам, кейлонам, лимфокинам, которые принимают участие в межклеточных взаимодействиях [8, 32, 36]. Множественность надклеточных регуляторных механизмов предполагает существование универсальных посредников в передаче информационных сигналов клеткам. Считают, что ими являются циклические нуклеотиды. Г. М. Яковлевым и др. (1987 г.) предложена одна из возможных теоретических моделей, дополняющих систему биорегуляции организма с участием пептидных медиаторов.

Физиологически активные вещества, в данной интерпретации — цитомедины, были выделены методом кислой экстракции из ткани головного мозга с последующей гель-хроматографией. Они оказывают выраженный эффект на защитные функции организма, состояние гомеостаза и репродуктивной системы. Это пептиды с молекулярной массой 1 000–10 000 Да. Большая работа проведена по выделению цитомединов из тимуса. Результаты показывают, что пептиды, содержащиеся в выделенном из тимуса препарате тималине, при взаимодействии с поверхностной мембраной Т-лимфоцитов

активируют экспрессию специфических рецепторов и тем самым повышают функциональную активность этих клеток. Тималин восстанавливает различные нарушения функций организма, иммунологическую реактивность, гемопоэз, нейроэндокринную регуляцию и т.д. Применение препарата способствует быстрому восстановлению защитных функций при травмах, осложненных инфекционными процессами, оказывает стимулирующее действие на регенерацию, высокоэффективен у больных в сочетании с лучевой терапией. Снижает частоту пострадикационных инфекционных осложнений, т.е. эффективен в профилактике иммунодефицитных состояний и осложнений при лучевой болезни. У больных после тимэктомии восстанавливается качество клеточного иммунитета и неспецифической защиты организма, уровень и содержание Т-хелперов, Т-супрессоров, нормализуются цАМФ-зависимые процессы и спектр изоферментов ЛДГ в лимфоцитах и т.д. [36, 45].

Именно с помощью цитомединов, выделенных из тимуса и лимфоидных органов, были изучены некоторые принципы системной и межсистемной пептидной регуляции клеточного гомеостаза. Выделенный из тимуса пептид оказывает стимулирующее действие практически на все звенья дифференцировки Т-лимфоцитов (от стволовой клетки до эффекторов клеточного иммунитета), что выражается в значительном повышении функций клеточного и гуморального иммунитета и неспецифической защиты организма. Он усиливает процессы дифференцировки лимфоидных клеток, индуцирует экспрессию дифференцировочных антигенов, нормализует количество Т-хелперов, Т-супрессоров и Т-клеток, восстанавливает коэффициент дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

Полученные в последнее время данные свидетельствуют о том, что цитомедины способны изменять функциональную активность генома на различных стадиях клеточного цикла. Считается, что взаимодействие генома с информационными молекулами (в частности, цитомединами), имеет важное значение для клеточного гомеостаза. Нарушение пептидной регуляции, а значит и переноса информационных молекул между клетками, неизбежно ведет к развитию патологии, сопровождающейся снижением устойчивости организма к повреждающим факторам. Необходимо отметить, что накопленный в настоящее время материал подтверждает точку зрения о неспецифичности действия биостимуляторов, поскольку эффект достигается как при введении человеческих тканей, так и растительных. Из органов и тканей крупного рогатого скота сейчас выделено более 20 новых биопрепаратов-цитомединов. Теоретическое обоснование и успешная реализация метода лечения с использованием цитомединов позволила реализовать новое направление в лечении ряда патологических состояний организма человека — биорегулирующую терапию.

Перечень нозологий, при которых с успехом используется лечение клеточно-тканевыми препаратами (КТП), может быть продолжен. Однако существует и другой аспект их использования для целей биологической медицины — в качестве экспериментальных моделей для реконструкции утраченных функций органа, при моделировании патологических процессов, для скрининга новых лекарственных препаратов, создания биологической информации и ее хранения в спецбанках и т.д. Например, успехи в области выделения из органов изолированных клеток, их культивирования, уже сейчас позволяют хранить доступную и недоступную биологическую информацию в клеточных банках, создавать банки и клеточные линии, являющиеся

стандартами или унифицированными моделями для проведения исследований в области клеточной биологии, биологической медицины [50].

Достижения в области биотехнологии позволили показать возможность проведения микромасштабных исследований, позволяющих формировать “молекулярное досье” любого пациента, используя лишь десятимиллионную часть процента клеток, содержащихся в организме [51, 52].

Следует отметить, что однородные суспензии клеток с успехом используются для скрининга лекарственных препаратов, позволяя исследовать молекулярные механизмы взаимодействия лекарственных препаратов и клеток-мишеней. Отделы клеточной биологии в настоящее время являются неотъемлемой структурной единицей крупных фармакологических фирм [52].

Значительные успехи достигнуты при разработке методов лечения патологии печени (как в эксперименте, так и в клинике) с использованием изолированных клеток кадаверов человека и животных [21, 25, 26, 28, 29].

Совершенно новые возможности открывают проведенные экспериментальные разработки по введению донорских крысиных ростовых факторов, выделенных из фетальных клеток, стимулирующих пролиферацию, в печень мышей-реципиентов [21, 51]. Это позволило получить в конце эксперимента печень, состоящую на 90% из гепатоцитов крысы. Полученные данные позволяют надеяться, что в недалеком будущем возможно использование стромального соединительно-тканного каркаса поврежденной печени для “биосборки” искусственной печени в организме человека [55].

В области биологической медицины привлекает внимание проект использования пересадки генов при помощи ретровирусной инъекции генетического материала в ядро клеток. Такие разработки успешно проводятся при замещении генетически поврежденных клеток у пациентов, например, с моноэнзиматическими дефектами печени.

Аспекты использования КТП многообразны. Однако следует отметить, что накопленный фактический материал во многих случаях противоречив. Анализ полученных результатов позволяет вплотную подойти к расшифровке механизмов действия лишь некоторых из них. Например, после выяснения механизмов действия биопрепаратов ФКиТ, различных по своему гистогенезу и приготовлению (криоконсервированные, лиофилизированные; фрагменты тканей, клетки, гомогенаты, криоэкстракты, биологически активные соединения), ряд исследователей полагают [6, 7, 8, 9, 39, 64], что они могут быть разделены на специфические и неспецифические, укладываясь в понятие “регенерации” и “вилогении” (симбиоз хозяина и вируса на генетическом уровне).

Введенные в организм реципиентов живые клетки могут выполнять и компенсировать некоторое время функции, утраченные тканями больного, т.е. осуществлять заместительную функцию (специфические механизмы). Считают [63], что введенные биопрепараты, состоящие из клеток одного вида или их “коктейля” уже через 24 ч занимают в организме положенные им места, преодолевая гематоэнцефалический барьер и “поедают” поврежденные клетки, строя на их месте другие [63]. Вещества введенных клеток вовлекаются в метаболизм различных тканей, приводя к улучшению функционирования поврежденных клеток. Эти процессы занимают в среднем время от 2 до 6 недель. Контроль регенераторных процессов, репарации, пролиферации и дифференцировки (неспецифические механизмы) происходит на более сложных уровнях и осуществляется через регуляторные системы организма (например, на эпигеномном и генетическом уровнях). Для реализации

этого эффекта необходимо включение механизмов, поддерживающих тканевой гомеостаз, например, нейроиммуноэндокринной регуляции. Немаловажное значение при этом имеют и эмбриональные антигены, определяющие ответ системы иммунитета (например, α -фетопротейн).

Существует и другая точка зрения на механизм действия биопрепаратов [6, 32]. В этом случае основное внимание уделяется действию регуляторных пептидов, принимающих участие в межклеточных взаимодействиях. Эти вещества, как считают авторы, переносят информацию, закодированную с помощью аминокислотной последовательности. При этом большую роль в поддержании структурной и функциональной целостности клеток, гомеостаза клеточных популяций авторы отводят факторам роста, эмбриональным индукторам-медиаторам (все они имеют пептидную природу — цитомедины — 1–10 000 Д).

При использовании фетальных клеточных компонентов, криоэкстрактов, биологически активных соединений реализуется второй, неспецифический, механизм действия ФКиТ.

Следует отметить, что как в первом, так и во втором случаях существенная роль в проявлении эффектов принадлежит системе иммунитета, которая реализует либо программу “отторжение чужого” (на клеточном и гуморальном уровнях) либо — “сохранение чужого в своем” (иммунологическая толерантность). В первом случае антигенный стимул приводит к образованию популяции антителообразующих клеток и/или клона киллеров Т-лимфоцитов. Во втором случае это сопровождается размножением специфических Т-супрессоров, блокирующих отторжение или нейтрализацию данного антигена и его носителя.

Увеличение регенераторного потенциала осуществляется с помощью содержащихся в фетальных препаратах биологически активных соединений (цитокины, тканевые гормоны, олигонуклеотиды, дифференцировочные антигены, промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот и т.д.). Эти соединения вызывают положительный клинический эффект при раневых процессах, трофических язвах, ожогах, вялотекущих нагноительных процессах и т.д. В то же время, воздействие этих же биологических факторов может привести к переключению программы “пролиферация без дифференцировки” на программу “пролиферация с дифференцировкой” [6, 7]. Введение в организм вместе с препаратами большого количества эмбриональных антигенов может приводить к “срыву” низкочувствительной иммунологической толерантности в отношении антигенов опухоли и к демаскировке на основе антигенной конкуренции мембранных антигенов опухолевых клеток, экранированных блокирующими факторами.

Считают [39], что важная и, возможно, определяющая роль в проявлении терапевтического эффекта при лечении биологическими препаратами принадлежит эмбриональным антигенам и прежде всего α -фетопротейнам, являющимся индукторами переключения программ стратегии в системе иммунитета. Раскрытие этих механизмов будет иметь большое значение для выработки стратегии лечения с использованием препаратов “медицины будущего” для лечения ряда патологических состояний организма, в частности — онкологических заболеваний.

Что же является основой работ, проводимых в области биологической медицины? Ею является принципиально новая концепция в подходе к лечению, а именно — использование естественного биопрепарата. Действие этого препарата, в отличие от существующих лекарственных форм, направлено не

на разрушение чего-то инородного (опухоли, вируса) или принадлежащего организму (гипертрофированные органы), а на восстановление или временное замещение функций.

Известно, что химические медицинские препараты главным образом ориентированы на специфические органы, вызывая все виды побочных эффектов на их пути через органы организма человека. Клеточно-тканевые препараты — это естественный биопродукт, оказывающий положительный эффект на организм в целом.

Показания для использования препаратов в биологической медицине различны и строятся скорее всего на функциях, а не на заболеваниях. Функциональный подход к использованию биопрепаратов является единственно возможным. При предписании КТТ врач должен помнить, что это не одиночный терапевтический эпизод, а полный повторяющийся курс. В этом отношении препараты КТТ не отличаются от обычных медикаментов того же происхождения, что и вакцины. Как однократная доза антигенов против столбняка или гепатита не является достаточной для иммунизации, так и воздействие КТТ является аккумулятивным и увеличивающимся посредством каждой заместительной имплантации. Даже интервалы между последовательными курсами лечения находятся в одном и том же диапазоне, варьируя от 3 мес до нескольких лет [63].

Таким образом, имплантация клеток и тканей животных и человека, как область биологической медицины, открывает совершенно новые перспективы в клинической медицине. Благодаря биологической медицине, впрочем, как и классической фармакологии и генной терапии, расширен арсенал современной медицины в “помощи живой природе” [20]. Однако эта ситуация, как и любой другой важный аспект человеческой деятельности, требует решения ряда этических и юридических проблем. Преимущество, отданное в настоящее время клиницистами использованию аллогенного материала, и особенно — ранних возрастных периодов развития, требует рассмотрения целого ряда этических проблем.

Одной из главных проблем является решение вопроса об искусственном прерывании беременности. В современном мире нет единой точки зрения на проблемы биомедицинской этики, в частности, на проблемы искусственного прерывания беременности, и различия юридических законов в разных странах связаны с исторически сформировавшимися под влиянием местной культуры, религии и философии этическими нормами. Римская католическая церковь, считая, что жизнь человека начинается с момента оплодотворения, любой случай прерывания беременности относит к категории убийств. Однако даже в тех странах, где право женщины на аборт узаконено, до настоящего времени нет единого мнения об этичности использования фетальных тканей для получения биопрепаратов КТТ. Согласно концепции Всемирной организации здравоохранения, “любой естественный препарат может быть использован в любой точке мира, так как все, что делается для сохранения здоровья и жизни человека — этически оправдано”. Однако развитие биологической медицины заставило человечество задуматься над целым рядом этических проблем. В настоящее время в клиниках, занимающихся получением КТП из фетального материала или использующих ФКиТ для лечения пациентов, должны быть соблюдены правила информированности и условия добровольного согласия женщины-донора на использование абортного материала. Прежде всего (это обязательное условие), решение сделать аборт

женщина должна была принять до того, как врач предложит ей использовать ее плод в научных или лечебных целях. Женщина может дать фетальную ткань для имплантации, однако ее согласие на использование нежизнеспособного плода должно быть оформлено в письменном виде после информирования ее обо всех известных медицинских и личных интересах, связанных с донорством. Полученный в результате аборта плод не может быть предметом купли-продажи. При этом, согласно “Хельсинской декларации” (пункт 9, раздел 1), “каждый потенциально испытуемый (реципиент) должен быть также проинформирован о целях, задачах, возможном риске при лечении с использованием препаратов КТТ, а также знать, что в любое время может отказаться от участия в эксперименте”. Лечащий врач обязательно в письменном виде должен иметь такое согласие реципиента до использования ПКТТ.

Существующие в настоящее время принципы работы при получении и использовании фетальных препаратов отражены в документе “Принципы медицинской этики”, который был принят в 1982 г. Генеральной ассамблеей ВОЗ. Ученые не должны проводить подобные эксперименты из любопытства, выгоды, удовлетворения научных интересов. И в связи с этим, конечно, подлежат запрету как этически неправомерные эксперименты по созданию определенных человеческих типов и химер, партеногенетическому размножению, клонированию. Эксперименты, направленные на выяснение фундаментальных вопросов, в терапевтических целях, требуют поощрения.

Несмотря на то, что правила получения и использования фетальных тканей достаточно стандартны и утверждены в 1991 г. Международной федерацией акушеров и гинекологов, юридическая сторона вопроса по их имплантации еще требует своего решения в целом ряде стран, в том числе и на Украине. Отсутствие закона о трансплантации и донорстве в значительной мере регламентирует развитие биологической медицины на Украине. Разрешающими документами в настоящее время являются методические рекомендации по использованию определенного вида биопрепаратов, которые разрешены МЗ Украины, как временные регламентирующие документы.

Необходимо также подчеркнуть и еще несколько важных аспектов, возникающих в связи с развитием биологической медицины, — обязательного всестороннего тестирования донорского материала, сертификации полученных препаратов, получения лекарственных форм биопрепаратов, доз и методов введения.

Анализируя развитие проблемы в целом, следует отметить, что пионерами исследований в этой области в бывшем СССР были ученые Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Исследования биологических свойств эмбриональных тканей, выделенных из органов человека и животных, были начаты творческим молодежным коллективом, созданным в 1976 г. по инициативе директора института чл.-кор. НАН Украины Н. С. Пушкаря. Проведенные поисковые исследования послужили основой для последующих фундаментальных научных работ, позволивших ученым ИПКиК НАН Украины занять приоритетное место и в области практических разработок биологической медицины. Благодаря этому в настоящее время подготовлена реальная база для создания новых биотехнологий, включающих использование уникальных свойств эмбриональных клеток и тканей. Примером могут служить, в частности, разработки, предложенные и проводимые автором статьи по созданию принципиально нового класса лекарственных препаратов — биогенных стимуляторов на основе криоэкстрактов из

тканей эмбрионов человека и лиофилизированных тканей эмбрионов овец, взятых в соответствующие сроки внутриутробного развития с соблюдением специально разработанной технологии подготовки первичного сырья.

Однако несмотря на все проблемы, изложенные в этой статье, а также трудности по созданию новых биотехнологий с использованием эмбрионального "сырья", к истории "побед" биологической медицины, в частности — клеточно-тканевой терапии, можно отнести успешное лечение с использованием этого метода более 2,5 млн. жителей планеты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бахарев В. Д. Клиническая нейрофизиология регуляторных пептидов. — Свердловск: Б. и., 1989.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А. // Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка. — 1982. — 256 с.
3. Белоус А. М. и др. // Криобиология. — 1987. — № 2. — С. 3–10.
4. Бочаров А. В. и др. // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека. — М.: Б. и., 1996. — С. 108–111.
5. Буркова М. И. и др. // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека. — Б. и., 1996. — С. 46–49.
6. Васильев Н. В. и др. Трансплантация фетальных тканей и клеток человека. — М.: Б. и., 1996. — С. 28–30.
7. Васильев Н. В. и др. Вопросы иммунологии опухолей. — Томск. — 1986.
8. Говалло В. И., Григорьева М. Н., Космиади Г. А. // Бюл. эксп. биол. — 1970. — 69, № 1. — С. 80.
9. Говалло В. И. и др. // Иммунология. — 1983. — № 2. — С. 81.
10. Гольдберг Д. И., Стояновский П. М. О применении эмбриональной мази в практике работы районной лечебницы. — Томск: Б. и., 1997.
11. Грищенко В. И. и др. Гемопозитические клетки эмбриональной печени. — Киев: Наук. думка. — 1988. — 192 с.
12. Дупин А. М., Даниловская Е. М. и др. // Бюл. эксп. биол. — 1996.
13. Зорин Е. В. // Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза. — Харьков: Б. и., 1987. — С. 73–74.
14. Космиади Г. А. и др. // Вопр. онкологии. — № 2. — С. 43.
15. Ключник Т. П. // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека. — М: Б. и., 1996. — С. 103–107.
16. Кулаков В. И. и др. // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека. — М: Б. и., 1996. — С. 10–13.
17. Лобынцева Г. С. и др. // Пробл. криобиологии. — 1993. — № 1. — С. 45–53.
18. Ольшанецкая Р. Л. Материалы по лечению злокачественных опухолей экстрактами из плаценты и тканей (экспер. -клин. исслед.). — Харьков, 1939.
19. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. // Актуальные проблемы криобиологии. — Киев: Наук. думка. — 1981. — 606 с.
20. Пятикоп В. А. Ортопедическая аллопластика дефектов костей свода черепа и твердой мозговой оболочки криоконсервированными тканями плода человека: Автореф. дис. . . . канд. мед. наук. — Киев, 1988. — 17 с.
21. Репин В. С. // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека. — М: Б. и. — 1996. — С. 19–27.
22. Савельев С. В. и др. // Бюл. эксп. биол. — 1994. — 117, № 4. — С. 369–372.
23. Словеснова Т. А. и др. // Пробл. эндокринологии. — 1989. — № 1. — С. 25–28.
24. Смирнов С. В. и др. // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека. — М: Б. и. — 1996. — С. 73–75.
25. Суббота Н. П. // Пробл. криобиологии. — 1993. — № 4. — С. 29–33.
26. Суббота Н. П. // Пробл. криобиологии. — 1997. — № 1–2. — С. 48–54.
27. Суббота Н. П. Получение, хранение и применение криоэкстрактов фетальных тканей человека. Метод. рекоменд. — Харьков, 1996. — 7 с.
28. Суббота Н. П. Функциональное состояние криоконсервированных гепатоцитов человека и животных: Автореф. дис. . . . д-ра биол. наук. — Харьков, 1993. — 31 с.
29. Суббота Н. П. и др. Способ получения изолированных клеток печени. — А. с. 1310426, 1985., 15. 05. 87. — Б. И., № 18.
30. Суббота Н. П., Белоус А. М. // Криобиология. — 1988. — № 3. — С. 21–26.
31. Сухих Г. Т. и др. // Бюл. эксперим. биол. — 1994. — 117, № 4. — С. 375–378.
32. Туровецкий В. Б. и др. // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека. — М. : — 1996. — С. 117–121.

33. Фель А. Я., Швембергер И. Н. Морфологическое и иммунологическое изучение цитодифференцировки экспериментальных опухолей. – Л. : Б. и., 1968.
34. Филатов В. П. // Тканевая терапия. Учение о биогенных стимуляторах. – М., 1952.
35. Филатов В. П. Инструкция по приготовлению и применению тканевых препаратов для лечения биостимуляторами по методу академика В. П. Филатова. – Одесса, 1955.
36. Яковлев Г. М., Новиков В. С., Хавинсон В. Х. // Резистентность, стресс, регуляция. – Л., 1990. – С. 200–205.
37. Bailey H., Keele K. D. // Proc. R. Soc. Med. – 29. – P. 42.
38. Bjorklung, Lindval O. // Trends Newrosci. – 1987. – 10. – P. 509–516.
39. Breder C. M. et al. // Science. – 1988. – P. 321.
40. Brychta P. et al. // Wounds Burns and Dressings, IWA 3-rd Internat. Surgery Cond. – Israel. T-A. 1994. – P. 29.
41. Fine A. // Cell Trausplant. – 1994. – 3. – № 2. – P. 113–145.
42. Geuer S. J., Gil T. J. et al. // Transplantation. – 1985. – 39. – P. 244–247.
43. Gill T. G. // Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. – 1992. – 27. – P. 87.
44. Glombelholme T. M., Longer J. C. et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1991. – 164. – P. 218–230.
45. Good R. A. // Lancet. – 1969. – № 1. – P. 946.
46. Gurchot Ch. // Oncology. – 1975. – 31. – P. 310.
47. Holtzman D. M. et al. // Newrology. – 1993. – 43. – P. 2668–2673.
48. Hu Y. F., Lhang H. et al. // Clin. Med. J. Engl. – 1985. – P. 236–243.
49. Hurst A. F., Tanner W. E., Osman A. A. // Proc. R. Soc. Med. – 1922. – 15. – P. 19.
50. Johnson L. B. et al. // Cell Transplant. – 1994. – 3. – P. 273–281.
51. Krivit W. et al. // Cell Transplant. – 1995. – 4. – P. 385–392.
52. Lindvall O. // Cell Transplant. – 1995. – 4. – P. 385–392.
53. Markovsky b., Lawler S. D. // Lancet. – 1977. – № 1. – P. 186–188.
54. Muidrick L. A., Baimbrige K. G. et al. // Exp. Brain Res. – 1989. – 76. – P. 333–342.
55. Rhim J., Sandgren E., Brinster R. // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1995. – 92. – P. 4942–4946.
56. Sandomirski B. P. et al. // Data Medica. – 1994. – № 2/17 – P. 60.
57. Seiger A., Olson L. // Cell Tissue Res. – 1977. – 179. – P. 285–316.
58. Stephani V. // J. Newrosci. Rec. – 1987. – № 17. – P. 25–35.
59. Stigbrand T., Ricklund K., THolander B. et al. // J. Gynec. Oncol. – 1989. – 11. – P. 531.
60. Subbota N. P. // Annual Meeting. "Cryo-93". – Atlanta, USA. – 1993. – P. 48.
61. Sunberg P. R., Koutosis T. K. et al. // Brain Res. Bull. – 1989. – 32. – P. 493–496.
62. Touraine J. L. et al. // Bone Marrow Transplant. – 1991. – 7. – P. 92–97.
63. Trotsky Y. // Data Medica. – 1993. – № 1. – P. 30.
64. Vanai J. et al. // Int. J. Newrosci. – 1995. – 81. – № 2. – P. 21.
65. Yan L. B., Bing H. et al. // Transplant. Proc. – 1990. – 22. – P. 280–282.

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

Поступила 01. 07. 97

Н. П. СУБОТА

ПРОБЛЕМИ СУЧАСНОЇ БІОЛОГІЧНОЇ МЕДИЦИНИ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Науковий огляд сучасного стану досліджень в області біологічної медицини

N. P. SUBBOTA

CURRENT PROBLEMS OF BIOLOGICAL MEDICINE

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

A scientific review of the state of art in the field of biomedical research

УДК 612.826.4:57. 043

В. С. Марченко

К КОНЦЕПЦИИ ЭКЗИСТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ОХЛАЖДЕННОГО МОЗГА. ЧАСТЬ I.

Обосновывается необходимость разработки новой научной концепции гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и медленной управляющей системы (МУС). Предлагается рассматривать ГЭБ как структурно-функциональную основу МУС.

Категория экзистенции, понимаемая как существование на грани возможного путем перехода на новый, часто гипометаболический уровень функционирования, по нашему мнению, может быть перенесена из сфер философии в область физиологии экстремальных состояний и криофизиологии, в частности.

Геологические, климатические и биологические события фанерозоя способствовали эволюции “функций катастроф” — от спорогенеза в растительном мире до гибернации млекопитающих. Конечно, развивались и другие “повседневные” специализированные защитные системы организма, в том числе иммунная, монооксигеназная, но нервная ткань в определенной степени вышла из-под их влияния. Опережающее эволюционное развитие нервной системы привело к ее необычайной ранимости, малоприспособленности к борьбе с инфекционным началом, к частичной потере способности нейтрализовать и обезвреживать чужеродное вещество и энергию. Естественно, что ослабление защитных свойств ЦНС сопровождалось совершенствованием других физиологических механизмов, способных оградить нейроглиальные комплексы от соприкосновения с повреждающими факторами. В таком контексте всегда традиционно имели в виду гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [8, 9, 14]. Однако защитная деятельность барьера вступает в действие только при состояниях напряжения или патологии, тогда как нормальная его функция в физиологических условиях несколько иная — регуляция состава и свойств внутренней среды мозга [2, 14]. Более того, наши эксперименты свидетельствуют, что в экстремальных условиях нейрофизиологические механизмы ГЭБ качественно видоизменяются [3–6, 10–12]. Координальная перестройка ГЭБ может происходить в основном по двум направлениям: 1) ГЭБ, выведенный экзогенными и/или эндогенными факторами из состояния равновесия, в большинстве структурно-функциональных проявлений сам приходит к своей противоположности: потеря ультраструктурной специфичности эндотелиоцитов мозговых капилляров и их окружения [12], существенное повышение проницаемости для биоактивных веществ [5, 11, 21], усиление колебательных элементов нейротрансмиссивных процессов [4]; 2) достигнув определенной стадии трансформации, ГЭБ приобретает важное свойство экзистенции — трансцендентность, т. е. выходит за свои пределы и может периодически в зависимости от характера воздействия захватывать в свою “орбиту” другие защитные или гомеостатические системы: иммунную, монооксигеназную, терморегуляторную и др.

Перестройки такого уровня должны неизбежно привести к серьезным колебаниям метаболизма и общей активности организма, а значит явиться системообразующим фактором для поиска новых стабильных ниш функционирования. Таким образом, можно говорить о возможности формирования в критических условиях на структурной основе элементов ГЭБ качественно иной нейрофизиологической системы защиты мозга, основная функция которой — “раскачка” установочной точки гомеостаза [16], что, в частности, при энергетическом “голоде” разного генеза будет толкать организм к “падению” на гипометаболический уровень, но в общем повышать его адаптационный потенциал. Систему с такой несколько “экзотической” функцией можно условно назвать экзистозэнцефалической (лат. *existentia* — существование, греч. *enkephalos* — головной мозг).

Подходы к разработке концепции экзистозэнцефалической системы (ЭЭС) представляются нам в плане развития в основном трех научных направлений

физиологических школ Минска (Р. И. Арчакова, Е. М. Белявский, В. Н. Гурин) [7], Москвы (Н. А. Аладжалова [1, 2], М. Я. Майзелис [14]) и Санкт-Петербурга (Н. П. Бехтерева, В. А. Илюхина [15], Ю. Ф. Пастухов [16]).

Принципы функционирования ЭЭС вытекают из концепции медленной управляющей системы мозга, впервые предложенной Н. А. Аладжаловой [1, 2], а в настоящее время успешно развиваемой исследователями научной школы академика Н. П. Бехтерева [15]. К сожалению, большинство положений этой гипотезы не опиралось на сколько-нибудь конкретную морфофункциональную основу. Авторы ограничились лишь отдельными замечаниями по этому поводу, “оттеняя лимбико-гипоталамические образования”, в которых при взаимодействии нейроглиальных элементов и межклеточной электрической матрицы (гиалуроновой кислоты) в неравновесных условиях могут возникать колебательные процессы ниже 0,5 Гц [2]. Основные положения о медленных управляющих механизмах мозга сформулированы только на основе анализа динамических характеристик сверхмедленной биоэлектрической активности. Вместе с тем еще 10 лет тому назад в Минском институте физиологии Е. М. Белявским были проведены исследования [7] (результаты которых полностью согласуются с нашими данными [4–6]), свидетельствующие о важной роли ГЭБ в генезе сверхмедленной ритмики.

Первые опыты по этим проблемам были проведены почти одновременно на рубеже нашего столетия, но их результаты долгое время либо оспаривались, либо не замечались. Обобщающий труд о сверхмедленных процессах увидел свет в 1962 г. [1], а годом раньше и годом позже вышли первые монографии, посвященные ГЭБ [9, 17]. В настоящее время оба направления получили должное признание и, по нашему убеждению, будут развиваться по пути создания единой научной концепции, раскрывающей их роль в механизмах поддержания гомеостаза организма человека и животных.

Можно предположить, что структурной основой медленной регуляции мозга являются элементы ГЭБ, динамика проницаемости которого, по крайней мере при гипотермических воздействиях, полностью отвечает основным десяти признакам [2] медленной управляющей системы (МУС).

1. МУС включается в процессы регулирования, когда реакции быстрой перестают быть оптимальными. Она вырабатывает новые программы для быстродействующей системы, которая определяет быстрые, почти мгновенные реакции на кратковременные, случайные или давно известные воздействия [2].

2. Повышение проницаемости ГЭБ, как и изменения сверхмедленной активности, происходит при систематически повторяющихся воздействиях или в ответ на длительные, чрезмерные для организма раздражители, без ответа на кратковременные или случайные возмущения. Так, по мере уменьшения неопределенности, “дисперсии” холодовых воздействий и, наоборот, увеличения их направленности, значимости для организма в ряду: общая — краниocereбральная — ритмическая — триггерная гипотермия неуклонно увеличивается проницаемость ГЭБ (рис. 1–3) однонаправленно с мощностью и пространственной когерентностью секундного биоэлектрического ритма (рис. 4). При этом на любой стадии воздействия ослабление его интенсивности (повышение температуры при КЦГ) или увеличение “случайности” (сбой ритма при триггерной гипотермии) ведет к резкому снижению проницаемости и пространственной десинхронизации сверхмедленной активности.

3. Скрытый период реакции ГЭБ и сверхмедленной биоэлектрической активности может исчисляться минутами и часами [2, 4, 5].

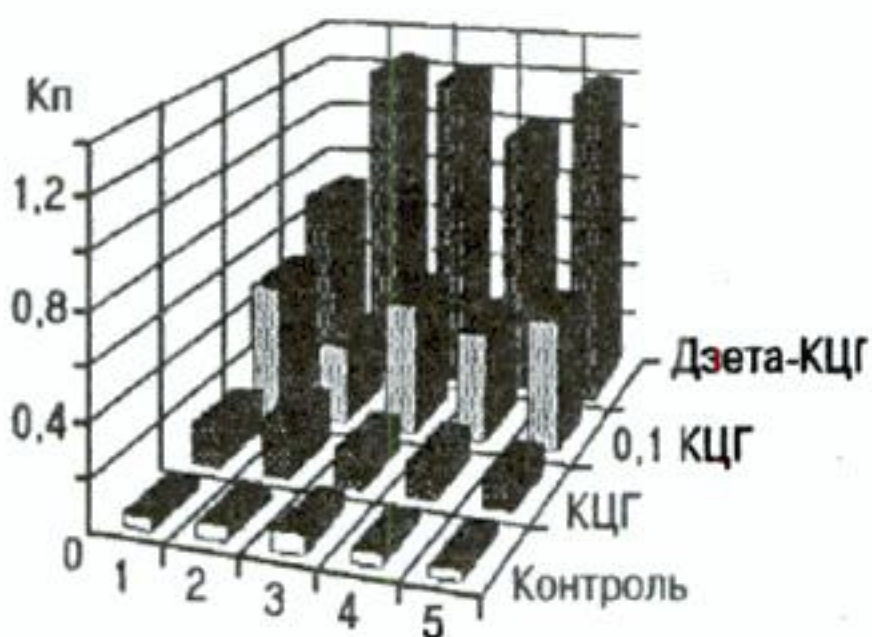


Рис. 1. Проницаемость ГЭБ для адреналина при гипотермических воздействиях (Кп — коэффициент проницаемости): 1 — передний отдел гипоталамуса, 2 — задний отдел гипоталамуса, 3 — таламус, 4 — гиппокамп, 5 — кора. КЦГ — краниocereбральная гипотермия, 0,1 КЦГ — ритмическая КЦГ (длительность единичного воздействия 1 с, частота 0,1 Гц); дзета-КЦГ — триггерная гипотермия с обратной связью по секунднему ритму биоэлектрической активности неокортекса

4. ГЭБ, как и медленная управляющая система, осуществляет регулирование и после прекращения действия сигнала внешней среды [2, 10].

5. Обе функциональные системы участвуют в регулировании в течение многих часов и суток [2, 10, 12].

6. Авторы теории сверхмедленной регуляции только декларировали, что она опирается на систему с изменяющейся структурой, которая обладает способностью селективно выбирать нужные значения параметров [2], тогда как активация ГЭБ при гипотермии конкретно это демонстрирует. Показано, что при гипотермических воздействиях происходят специфические изменения ультраструктуры эндотелиоцитов капилляров мозга — резко увеличивается количество клатриновых везикул, т. е. активируется рецептор-индуцируемый трансцитоз [11, 12], что способствует повышению избирательной проницаемости для нейромедиаторов, участвующих в теплопродукции, но не для нейротрансмиттеров, опосредующих теплоотдачу (рис. 1–5).

7. МУС, как и ГЭБ, характеризуется множественным вовлечением структур и функциональных систем мозга в ответ на предъявление нового систематиче-

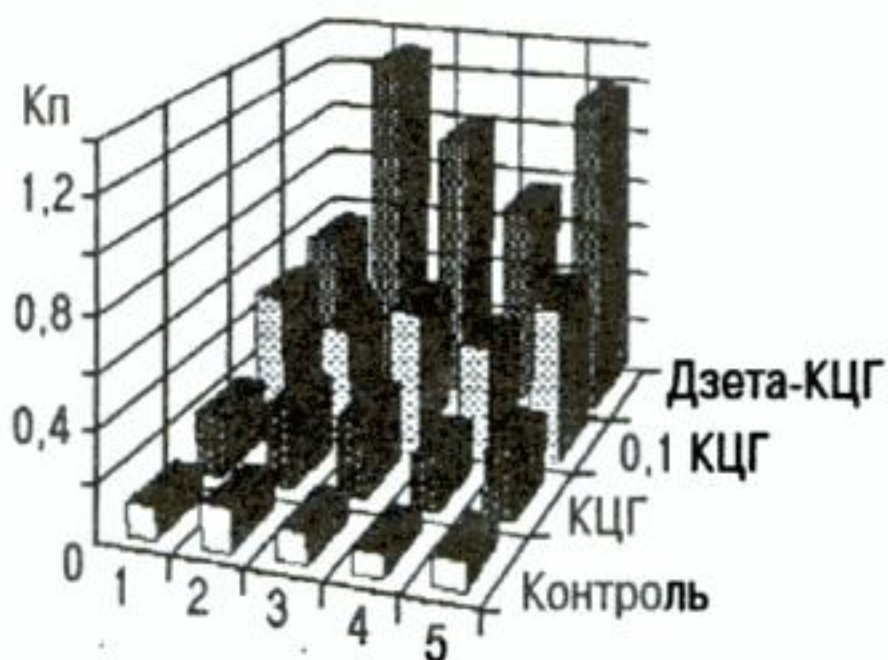


Рис. 2. Проницаемость ГЭБ для норадrenalина при гипотермических воздействиях. Обозначения те же, что и на рис. 1.



Рис. 3. Проницаемость ГЭБ для ацетилхолина при гипотермических воздействиях. Обозначения те же, что и на рис. 1.

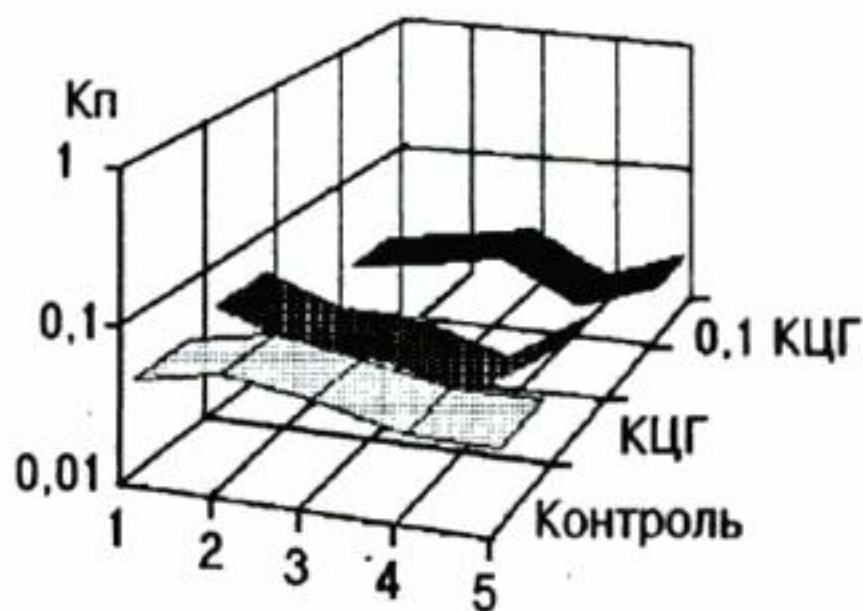


Рис. 4. Проницаемость ГЭБ для серотонина при гипотермических воздействиях. Обозначения те же, что и на рис. 1.

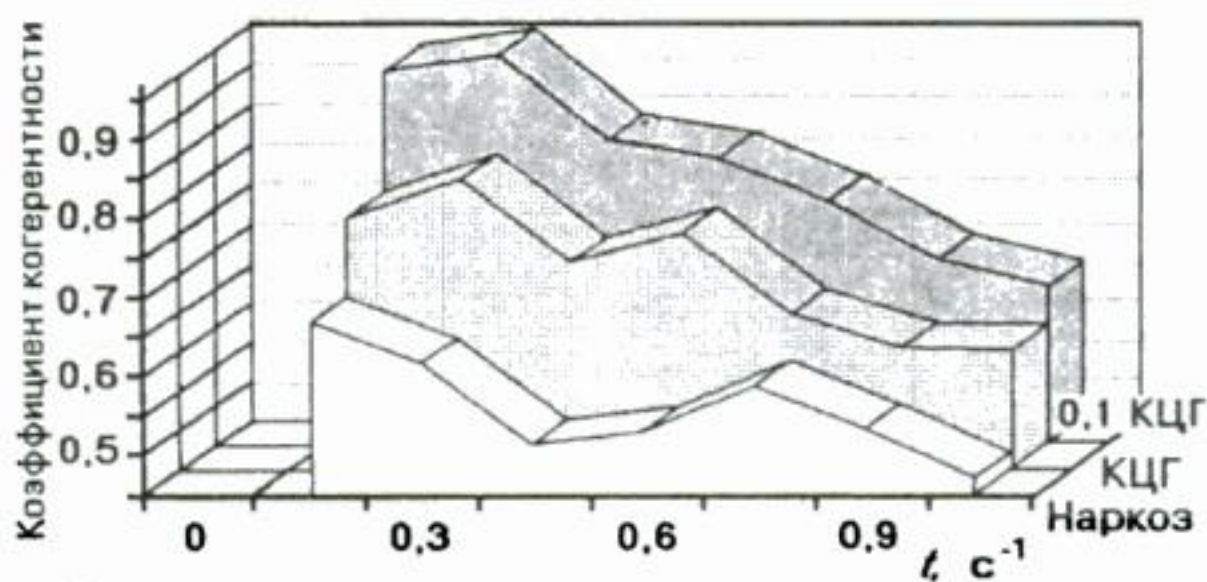


Рис. 5. Изменение функции когерентности при различных видах охлаждения. Обозначения те же, что и на рис. 1

могут быть использованы каналы с малой информационной емкостью [2]. Такими каналами, в частности, являются гормональные. Один из самых важных аппаратов ГЭБ также является гормональным.

9. На первый взгляд, есть одно принципиальное отличие ГЭБ от МУС, которая охватывает все уровни регуляции от субклеточных взаимодействий до нейроглиальных контактов и межструктурных отношений головного мозга [12, 15], тогда как особенности ГЭБ традиционно определяются в основном спецификой эндотелиоцитов микрососудов и их окружения, эпителиоцитов сосудистого сплетения желудочков и особенностями мозговых оболочек [8, 20]. Однако, по нашему мнению, узкоклассические представления о ГЭБ можно и нужно расширить. В этой связи уместно вспомнить заключительные слова из последнего публичного выступления классика отечественной школы по изучению ГЭБ Л. С. Штерн. Обосновывая общебиологическое значение гистогематических барьеров, она высказала интересную для своего времени догадку о внутриклеточных барьерных механизмах [18]. Она считала, что изучение физико-химических, биофизических, физиологических особенностей и свойств внутриклеточной сети контактирующих поверхностей из мембранных и субмембранных образований прольет свет на истинный механизм селективной проницаемости ГЭБ. Этот механизм может лежать в основе еще не открытых функций барьера, которые, по мнению Штерн, будут иметь большое значение для решения принципиальных вопросов физиологии и общей биологии [18]. По сути самым автором классического определения кровемозговых барьеров в неявном виде была высказана идея о том, что ГЭБ осуществляет регуляцию на разных уровнях: от субмембранного до организменного. Недавно было показано [13], что вопрос — проходит или нет вещество через ГЭБ? — сводится к другому: достаточно ли его количество, чтобы оказать физиологический эффект? Точно так же, по нашему мнению, к компонентам ГЭБ следует отнести все структуры и системы, стоящие на пути вещества из крови до точки его центрального приложения. Действительно, вещество может пройти через эндотелиоциты капилляров, но задержаться, например, между отростками астроцитов (рис. 6). Можно ли в этом случае говорить, что ГЭБ для него проницаем? Другими словами, ГЭБ, как и МУС, может осуществлять регуляцию на разных уровнях организации мозга.

10. Результат регулирования МУС заключается в выборе новых параметров системы для перехода на новый уровень активности, в новую область устойчивости. Иначе говоря, функционирование МУС направлено на то, чтобы перевести существенные параметры организма в область физиологически благоприятных значений для работы с предвидением действия нового фактора в будущем

ского возмущения: увеличивается проницаемость для всех изученных структур, активируются центральные механизмы терморегуляции (рис. 1–3).

8. Дисперсия распределения влияния общего управления больше дисперсии избирательного управления, поэтому для запуска общей регуляции

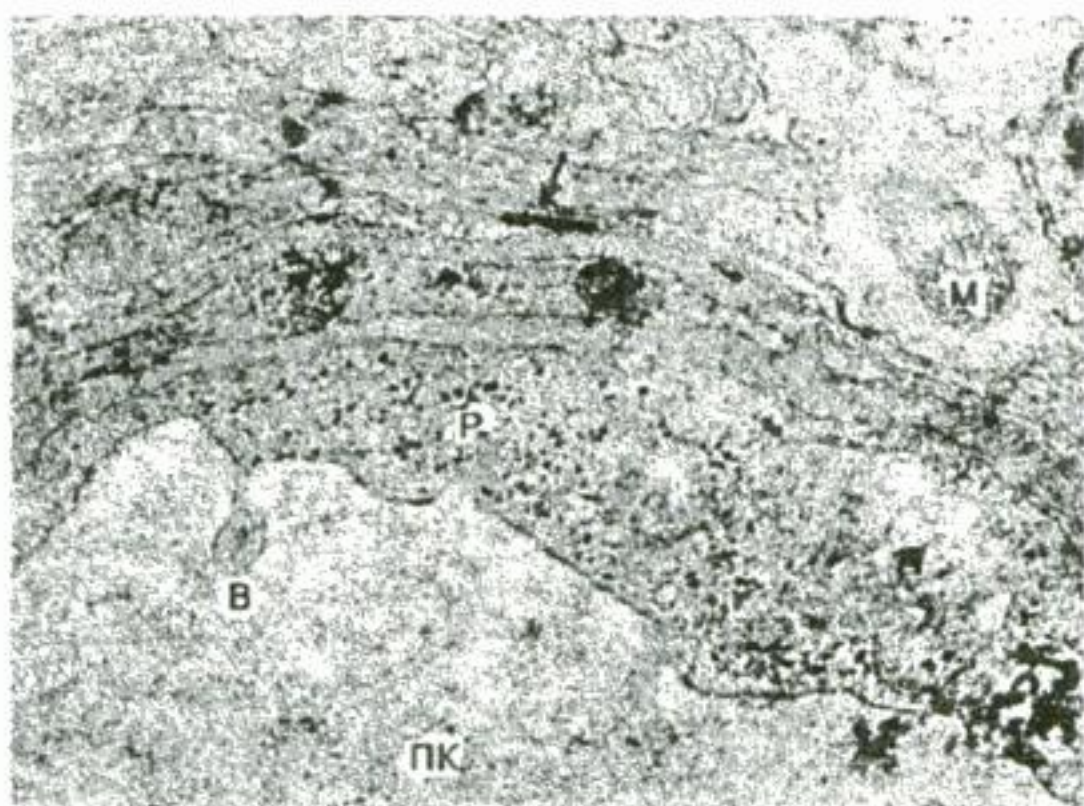


Рис. 6. Фрагмент просвета капилляра ПГТ мозга крысы после ритмической гипотермии. $\times 50\,000$. Стрелкой указано фрагментарное отложение электронно-плотного осадка продукта реакции пероксидазы хрена с субстратом между концевыми ножками астроцитов: ПК — просвет капилляра, В — микровили, Р — рибосомы, М — митохондрии (микрофото любезно предоставлено Л. Н. Марченко)

[2]. Наши данные свидетельствуют, что от функциональной активности ГЭБ прямо зависит протекание так называемой “реакции ожидания гипотермии”, которая формируется приблизительно через сутки после краниоцеребральной гипотермии (КЦГ). Эта системная приспособительная реакция, готовящая организм к повторной встрече с данным воздействием, на нейрохимическом уровне заключается в формировании комплекса условий, обеспечивающих сохранение активности ключевых нейромедиаторов после их усиленного функционирования при гипотермии. Например, уже через

6 ч после КЦГ наблюдается устойчивая тенденция к нормализации синаптической передачи и проницаемости ГЭБ, но приблизительно через сутки в нормальных условиях происходит повторное снижение активности нейрохимических процессов, приводящих к уменьшению уровня норадреналина и повышению проницаемости ГЭБ для катехоламинов [10].

Таким образом, не только все признаки, но и основная функция медленной управляющей системы присуща ГЭБ. А проблема заключается уже не в том, являются или нет структурные элементы барьера основой сверхмедленной регуляции, но в том, при каких условиях ГЭБ может оказаться функциональной системой медленного управления суммарной активностью мозга. И все же в известном смысле медленная управляющая система — более широкое понятие [15], а ГЭБ во многих случаях удобнее рассматривать узко традиционно [19, 21], однако и наши представления кажутся оправданными. Для них мы и предлагаем ввести новый термин — экзистоэнцефалическая система, нейрофизиологическим, нейрохимическим и ультраструктурным особенностям которой будет посвящена вторая часть статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аладжалова Н.А. Медленные электрические процессы в головном мозге. — М.: Акад. наук СССР, 1962. — 240 с.
2. Аладжалова Н.А. Психофизиологические аспекты сверхмедленной ритмической активности головного мозга. — М.: Наука, 1979. — 214 с.
3. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Пастухов Ю.Ф. и др. К механизмам регуляции гематоэнцефалического барьера. Сообщение 1. Системное введение бомбезина повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера для нейромедиаторов // Пробл. криобиол. — 1995. — № 1. — С. 3–10.
4. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Шило А.В. и др. К механизмам регуляции гематоэнцефалического барьера. Сообщ. 2. Ритмические холодовые воздействия повышают проницаемость гематоэнцефалического барьера для терморегуляторных нейромедиаторов // Пробл. криобиол. — 1995. — № 2. — С. 3–9.
5. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Марченко Л.Н., Алтуева Е.В. К механизмам регуляции гематоэнцефалического барьера. Сообщение 5. Гематоэнцефалический барьер как структурно-

- функциональное звено центральных нейротрансмиттерных механизмов терморегуляции // Пробл. криобиол. – 1996. – № 1. – С. 22–28.
6. Бабийчук Г.А., Марченко В.С. Триггерная функция гематоэнцефалического барьера в нейротрансмиттерных механизмах терморегуляции при гипотермии и гибернации // Пробл. криобиол. – 1997. – № 1–2. – С. 72–77.
 7. Бежавский Е.М., Арчакова Р.И., Нетуков Н.И. Структурно-функциональная организация центра терморегуляции в нормальных условиях и при развитии лихорадки // Минск: Наука и техника, 1989. – С. 18–43.
 8. Бредбери М. Концепция гематоэнцефалического барьера. – М.: Медицина, 1983. – 408 с.
 9. Касиль Г.Н. Гемато-энцефалический барьер. Анатомия, физиология, методы исследования, клиника. – М.: Акад. наук СССР, 1963. – 408 с.
 10. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Ломако В.В. Общий подход к проблеме повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера и холодовой устойчивости организма // Пробл. криобиол. – 1994. – № 1. – С. 24–32.
 11. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Шило А.В. и др. К механизмам регуляции гематоэнцефалического барьера. Сообщение 3. Оксид азота (П) — один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма? // Пробл. криобиол. – 1995. – № 3. – С. 10–19.
 12. Марченко Л.Н., Бабийчук Г.А., Марченко В.С. и др. К механизмам регуляции гематоэнцефалического барьера. Сообщение 4. Ультраструктурные особенности и функциональная активность гематоэнцефалического барьера при ритмических холодовых воздействиях // Пробл. криобиол. – 1995. – № 4. – С. 10–19.
 13. Марьянович А.Т., Поляков Е.Л. Нейропептиды и гематоэнцефалический барьер // Усп. физиол. наук. – 1991. – 22, № 2. – С. 33–51.
 14. Майзелис М.Я. Современные представления о гематоэнцефалическом барьере: нейрофизиологические и нейрохимические аспекты // Журн. высш. нервн. деятельности. – 1986. – XXXVI. – Вып. 4. – С. 611–626.
 15. Механизмы деятельности мозга человека. Часть 1. Нейрофизиология человека / Ред. Н.П. Бехтерева. – Л.: Наука, 1988. – 677 с.
 16. Пастухов Ю.Ф. Явление сезонного гипометаболизма млекопитающих // Терморегуляции. Информационный бюл. – Вып. 2. – Минск, 1991. – С. 7–18.
 17. Росин А.Я. Нейро-гуморальная регуляция и гемато-энцефалический барьер. – М.: АН СССР, 1961. – 120 с.
 18. Штерн Л.С. Об основных путях развития исследований по гисто-гематическим барьерам // Развитие и регуляция гисто-гематических барьеров. – М.: Наука, 1967. – С. 3–10.
 19. Brust P. Blood-brain barrier transport under different physiological and pathophysiological circumstances including ischemia // Exp. Pathol. – 1991. – 42, № 1. – P. 213–219.
 20. Hatten M.E., Liem R.K., Shelanski M.L., Mason C.A. Astroglia in CNS injury // Glia. – 1991. – № 2. – P. 233–243.
 21. Oztas B., Kaya M., Camurcu S. Influence of profound hypothermia on the blood-brain barrier permeability during acute arterial hypertension // Pharmacil. Res. – 1992. – 26, № 1. – P. 75–85.

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

Поступила 22.04.97

В. С. МАРЧЕНКО

ДО КОНЦЕПЦІЇ ЕКЗИСТОЕНЦЕФАЛІЧНОЇ СИСТЕМИ ОХОЛОДЖЕНОГО МОЗКУ. ЧАСТИНА 1.

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Обґрунтовується необхідність розробки нової наукової концепції гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ) та повільної керуючої системи (ПКС). Пропонується розглядати ГЕБ як структурно-функціональну основу ПКС.

V. S. MARCHENKO

ON THE CONCEPT OF THE EXISTOENCEPHALIC SYSTEM OF THE COOLED BRAIN. PART I.

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

The author substantiates the necessity for development of a new scientific concept of the blood-brain barrier (BBB) and slow controlling system (SCS). The BBB is proposed to be a structure-functional basis of the CSC.

**О.А.Нардид, Т.С.Дюбко, А.В.Зинченко,
А.С.Соловьева**

ИЗМЕНЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ МЕМБРАННО-СВЯЗАННЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПРИСУТСТВИИ НЕКОТОРЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Тепловая денатурация суспензии мембран эритроцитов в присутствии 1,2-пропандиола и глицерина исследована методом сканирующей микрокалориметрии. Обнаружено, что при добавлении данных криопротекторов температуры максимумов теплопоглощения, соответствующие термоденатурации комплексов мембранно-связанных белков, сдвигаются в низкотемпературную область. Предполагается, что дестабилизирующее влияние 1,2-пропандиола связано с изменением структурного состояния интегральных белков мембраны путем нарушения белок-липидных контактов, в то время как глицерин взаимодействует с периферическими белками мембраны.

Известно, что изменение физико-химических свойств среды влияет на структуру сложных белковых комплексов мембраны [4, 5]. К такого рода воздействиям относится и введение органического соразтворителя, которое может приводить к изменению структуры и свойств мембранных белков, что в свою очередь индуцирует структурные перестройки мембраны [9, 11]. Особый интерес в этом отношении представляют собой криозащитные вещества, широко применяемые в практике криоконсервирования биологических объектов.

Одним из эффективных методов изучения структурных изменений белковых макромолекул является метод сканирующей микрокалориметрии, который дает возможность оценить изменения теплофизических параметров, сопровождающих конформационные перестройки белковых молекул [6].

Целью настоящего исследования было изучение изменения термостабильности белковых комплексов эритроцитарных мембран в присутствии 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и глицерина методом сканирующей микрокалориметрии.

Тени эритроцитов получали согласно Фейрбанксу [10]: эритроциты трижды отмывали 0,15 М раствором NaCl; мембраны эритроцитов получали гемолизом эритроцитов 5 мМ Na-фосфатным буфером, ($pH = 8,0$) с последующим осаждением путем ультрацентрифугирования при 15 000 g в течение 20 мин. Далее мембраны дважды отмывали средой гемолиза а затем суспендировали в 20 мМ Na-фосфатном буфере, $pH = 7,4$. Все процедуры проводили при 4 °C.

Концентрацию белка в полученных мембранах оценивали с помощью спектрофотометра "PYE Unicam SP-8 000" (Великобритания) на длине волны 280 нм. Концентрация белка в суспензии мембран составляла приблизительно 0,7 мг/мл. Растворы криопротекторов готовили весовым методом. Исследуемую аликвоту суспензии мембран инкубировали в присутствии криопротекторов в течение 1 ч при 4 °C.

Кривые теплопоглощения мембран эритроцитов регистрировали на прецизионном дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре DASM-4 (СКББП АН России, Пущино) при скорости сканирования 1 °C/мин и избыточном давлении 2,5 атм.

Термограммы суспензии мембран эритроцитов в нативном состоянии и в присутствии 1,2-ПД представлены на рис. 1. Кривые теплопоглощения суспензии мембран эритроцитов в нативном состоянии (рис. 1, кривая а) хорошо согласуются с результатами, приведенными в литературе [3, 5, 7, 8]. Так,

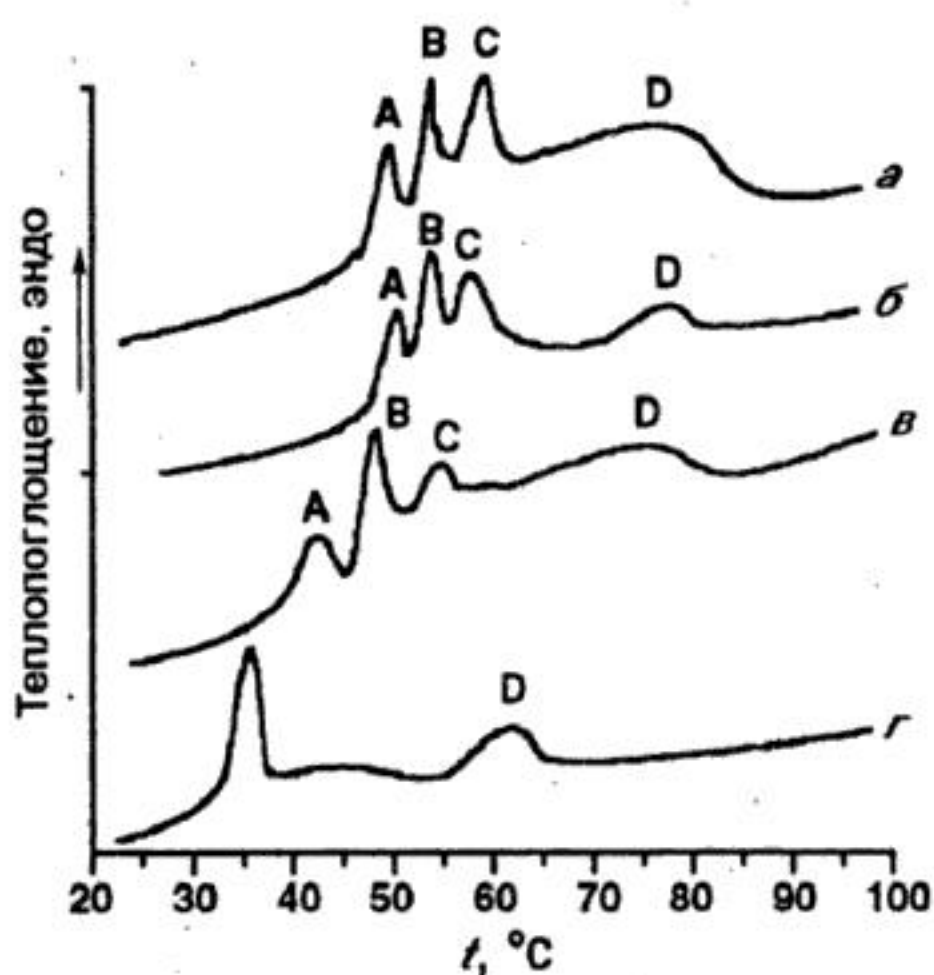


Рис. 1. Изменение теплопоглощения мембран эритроцитов в присутствии 1,2-ПД (20 мМ Na-фосфатный буфер, $pH = 7,4$): *a* — нативные мембраны, *б* — + 10 мас. % 1,2-ПД, *в* — + 30 мас. % 1,2-ПД, *г* — + 50 мас. % 1,2-ПД

ранее было установлено, что термограмма денатурации суспензии мембран содержит 4 хорошо разрешенных максимума. Переход А (51 °С) соответствует термоденатурации белков мембранного каркаса спектрина и анкирина. При электрофоретическом разделении белков эритроцитарной мембраны — это полосы 1 и 2 и полоса 2.1 соответственно [7]. Переход В (58 °С) относят к денатурации белков полосы 4.2, 4.9 и актина (полоса 5) [1, 5]. Переход С (64 °С) соответствует денатурации белков полосы 3 (анионпереносящий белок), полосы 4.1; глицеральфосфатдегидрогеназы (полоса 6) [3, 5, 8]. Переход D (82 °С) характеризует денатурацию тропомиозина (полоса 7) [1].

При добавлении 1,2-ПД к суспензии мембран эритроцитов отмечают-

ся существенные изменения кривых теплопоглощения. Так, в присутствии 10 мас. % 1,2-ПД максимумы теплопоглощения переходов А и В не подвергаются значительным изменениям, а переход С сдвигается в область более низких температур (рис. 1, кривая б). Переход С относится к термоденатурации блока интегральных белков, тесно связанных с липидным бислоем [8], и можно предположить, что в силу мембранотропных свойств 1,2-ПД дестабилизирующее воздействие данного криопротектора в первую очередь сказывается на структурном состоянии этого комплекса белков. При дальнейшем увеличении содержания 1,2-ПД в растворе термостабильность всех белковых комплексов падает, что выражается в смещении температур переходов А, В, С, D в низкотемпературную область. При концентрации 50 мас. % термоденатурация белковых комплексов, соответствующая переходам А, В, С, происходит при одной и той же температуре 34 °С (рис. 1, кривая г). Молекула 1,2-ПД имеет гидрофобную часть, и снижение температуры перехода С может быть связано с нарушением белок-липидных взаимодействий в мембране, что выражается в дестабилизации интегральных белков эритроцитарной мембраны. Аналогичная тенденция изменения термостабильности мембранно-связанных белков была обнаружена при добавлении к суспензии мембран эритроцитов возрастающих концентраций этанола [3]. Авторы данного исследования предполагают, что явление дестабилизации белка полосы 3 связано с нарушением определенных белок-липидных контактов в результате растворения этанола в липидной фазе мембраны. Известно, что взаимодействия соединений, имеющих гидрофильно-гидрофобные свойства как с липидами, так и с белками связаны с наличием гидрофобного "хвоста", представляющего собой неопредельную углеводородную цепь, причем дестабилизирующий эффект усиливается с ростом длины цепи [9, 11, 12].

При исследовании влияния глицерина на термостабильность мембран эритроцитов выявлены существенные изменения температур денатурации

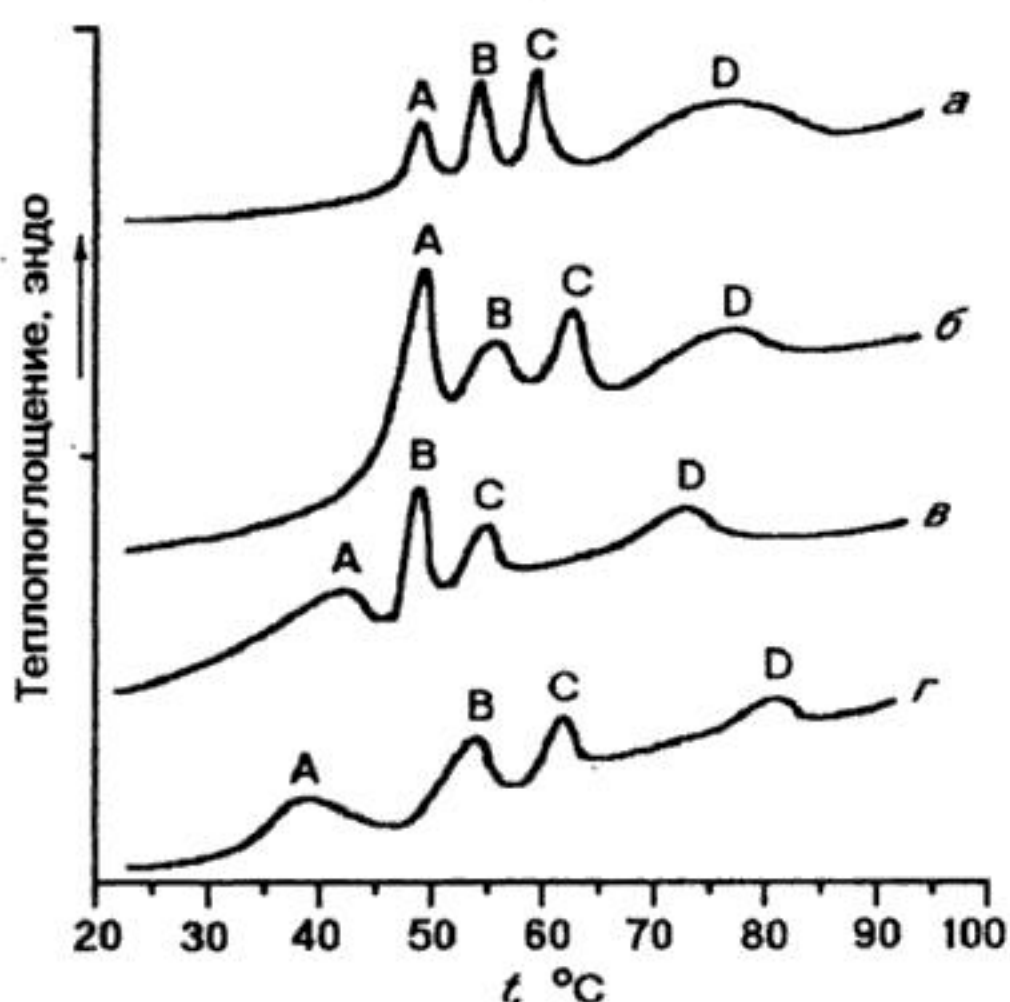


Рис. 2. Изменение теплопоглощения мембран эритроцитов в присутствии глицерина (20 мМ Na-фосфатный буфер, $pH = 7,4$): а — нативные мембраны, б — + 10 мас. % глицерина, в — + 15 мас. % глицерина, г — + 20 мас. % глицерина

звано структурными перестройками интегральных и периферических белков мембраны эритроцита. По всей видимости, дестабилизирующее действие 1,2-ПД на мембраны связано с его воздействием в значительной степени на интегральные мембранные белки, в то время как глицерин главным образом взаимодействует с периферическими белками мембраны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акоев В. Р., Бобровский Р. В., Жадан Г. Г. и др. Калориметрическое исследование структурных переходов в мембранах эритроцитов собаки // Биол. мембраны. — 1991. — 8, № 1. — С. 78–84.
2. Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология. — Киев: Наук. думка, 1994. — 430 с.
3. Заводник И. Б., Лапишина Е. А., Степура И. И. Термостабильность эритроцитарных мембран в присутствии этанола // Биофизика. — 1994. — 39, № 3. — С. 470–474.
4. Конев С. В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. — Минск: Наука и техника. — 1987. — С. 11–13.
5. Лапишина Е. А., Заводник И. Б. Термостабильность белков эритроцитарных мембран при варьировании ионной силы и состава среды // Биофизика. — 1994. — 39, № 6. — С. 1015–1020.
6. Привалов П. Л. Энергетика структуры белковых молекул // Биофизика. — 1985. — 30, № 4. — С. 722–733.
7. Brandts J. F., Erikson L., Lysko K. et al. Calorimetric studies of structural transitions of human erythrocyte membrane. The involvement to spectrin in the A transitions // Biochemistry. — 1977. — 16, № 15. — P. 3450–3458.
8. Brandts J. F., Taverna R. D., Sadavisin E., Lysko K. Calorimetric studies of structural transitions of human erythrocyte membrane (studies of B and C transitions) // Biochimica et Biophysica Acta. — 1978. — 512, № 4. — P. 566–578.
9. Characterization of proteins // Ed. by Franks F. — Cambridge U. K. — 1988. — 561 p.
10. Fairbanks G., Steck T. L., Mallach D. F. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. — 1971. — 10, № 12. — P. 2606–2617.
11. Franks F., Eagland E. Role of solvent interaction in protein conformation // Crit. Rev. Biochem. — 1975. — 3. — P. 165–219.
12. Velicelebi G., Sturtevant J. M. Thermodynamics of the denaturation of lysozyme in alcohol–water mixtures // Biochemistry. — 1979. — 18, № 2. — P. 1180–1186.

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

Поступила 26.06.97

водорастворимых периферических белков (переходы А и В) по сравнению с интегральными белками эритроцитарной мембраны (рис. 2). Данное явление может быть связано с высокой гидрофильностью молекулы глицерина, не имеющего активных гидрофобных центров, и способностью данной молекулы вызывать переориентацию водородных связей водного окружения белковых молекул [2].

Таким образом, из приведенных результатов исследований можно заключить, что добавление глицерина и 1,2-ПД к суспензии мембран эритроцитов приводит к снижению термостабильности мембранно-связанных белковых комплексов, что может быть вызвано структурными перестройками интегральных и периферических белков

О. А. НАРДІД, Т. С. ДЮБКО, О. В. ЗІНЧЕНКО, О. С. СОЛОВЬОВА

ЗМІНА ТЕРМОСТАБІЛЬНОСТІ МЕМБРАННО-ЗВ'ЯЗАНИХ БІЛКОВИХ КОМПЛЕКСІВ У ПРИСУТНОСТІ ДЕЯКИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Теплова денатурація суспензії мембран еритроцитів у присутності 1,2-пропандіолу і гліцерину досліджена методом скануючої мікрокалориметрії. Виявлено, що при додаванні даних кріопротекторів температури максимумів теплопоглинання, які відповідають термоденатурації комплексів мембранно-зв'язаних білків, зсуваються в низькотемпературну зону. Передбачається, що дестабілізуючий вплив 1,2-пропандіолу пов'язаний зі зміною структурного стану інтегральних білків мембрани шляхом порушення білок-ліпідних контактів; у той час як гліцерин взаємодіє з периферичними білками мембрани.

O. A. NARDID, T. S. DYUBKO, A. V. ZINCHENKO, A. S. SOLOVYEVA

CHANGES IN THERMAL STABILITY OF THE MEMBRANE-BOUND PROTEIN COMPLEXES IN THE PRESENCE OF SOME CRYOPROTECTANTS

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

Thermal denaturation of the suspension of red cell membranes was studied in the presence of glycerol and 1.2-propanediol, using a method of differential scanning calorimetry. The authors found that injection of the cryoprotectant results in the displacement of the temperature values of the heat absorption peaks, which correspond to thermal denaturation of the membrane-bound protein complexes, into the low-temperature region. It is speculated that a destabilizing action of 1.2-propanediol can be explained by the changes in the structural state of the membrane integral proteins due to destruction of the lipid-protein contacts, while glycerol interacts with the peripheral membrane proteins.

УДК 57.043:612.111.45:577.112

Т.П.Бондаренко, Н.А.Лупилова

ОСМОЛЯРНОСТЬ И ТЕМПЕРАТУРА СРЕДЫ КАК ФАКТОРЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ПОВЕДЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ

Исследовано состояние эритроцитов на основе их барьерных характеристик в изменяющихся условиях среды, реализующихся при снижении температуры. Установлено, что частично дегидратированные клетки имеют одинаковые механизмы, регулирующие чувствительность клеток к холодovому и осмотическому шоку. Обсуждаются возможные пути вклада температурного фактора среды и ее осмолярности в ответ клетки на нефизиологические условия.

Поведение клеток при охлаждении—замораживании обусловлено изменением состояния плазматической мембраны и белкового цитоскелета [1]. Ассоциация белкового скелета с интегральными компонентами плазматической мембраны обеспечивает постоянство внутриклеточной среды и зависит от температуры, pH , концентрации ионов в среде и т.д. [4, 6]. Белковый цитоскелет способен изменять свое структурное состояние, в частности, механическую прочность при действии таких факторов, как температура и осмолярность. Механизм регуляции состояния цитоскелета, а следовательно, и его стабильность состоит в поддержании определенной концентрации белка в единице объема внутриклеточного растворителя. Отсюда следует, что наиболее простым способом регуляции структурной стабильности клеток является их дозированное обезвоживание, обеспечивающее увеличение концентрации белка и формирование вблизи мембраны прочного кортикального слоя.

Целью данного исследования явилось изучение поведения эритроцитов в изменяющихся условиях среды (факторов, реализующихся при охлаждении) в зависимости от ее начальных условий, приводящих к частичному обезво-

живанию клеток, а следовательно, и к изменению концентрации белков цитоскелета в единице объема внутриклеточного растворителя.

Объектом исследования явились эритроциты донорской крови человека II-й группы, полученные с Харьковской областной станции переливания крови. Для удаления плазмы и форменных элементов кровь подвергали трехкратному центрифугированию в пятикратном объеме 0,15 М раствора NaCl, содержащего 5 мМ фосфатного буфера, pH 7,4. Конечный осадок эритроцитов ресуспендировали в равном объеме отмывочного раствора, затем в зависимости от условий эксперимента суспензию помещали в ту или иную среду. Конечная концентрация эритроцитов во всех экспериментах составляла 2%.

Холодовой шок эритроцитов осуществляли, как описано в [5], гипертонический — согласно [2]. На всех этапах работы барьерные свойства мембраны контролировали по выходу макромолекул (гемоглобина). Гемоглобин определяли спектрофотометрически на СФ-4 с проточной кюветой при 543 нм. Осмотическое давление среды измеряли на осмометре ОМКА-Щ-01.

Для решения ряда криобиологических задач используется принцип, заключающийся в выявлении роли температуры как фактора, управляющего состоянием клеток при их переносе в неизотонические условия [2]. Данный принцип в качестве управляющего фактора включает также осмолярность среды, которая способна модифицировать состояние клеток в широком диапазоне температур. Выявление влияния взаимосвязи между исходной температурой и осмолярностью на устойчивость клеток к изменяющимся условиям представляет существенный интерес для криобиологов, так как гипертонический стресс является ведущим фактором криоповреждений [1, 2], что позволяет использовать перенос клеток в сильно гипертонические среды при положительных температурах как процесс, моделирующий замораживание.

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что чувствительность эритроцитов к холодному шоку ($37 \rightarrow 0^\circ\text{C}$) в присутствии 1,2 М NaCl (кривая 1) и осмотическому шоку в 4,0 М NaCl (кривая 2) зависит от исходной осмолярности и температуры среды. При холодном шоке наблюдается критическая граница исходной концентрации NaCl (0,6–0,8 М), выше которой клетки становятся чувствительными к осмотическому стрессу. При этом наблюдается отчетливый максимум сохранности в интервале 0,4–0,5 М NaCl с двумя

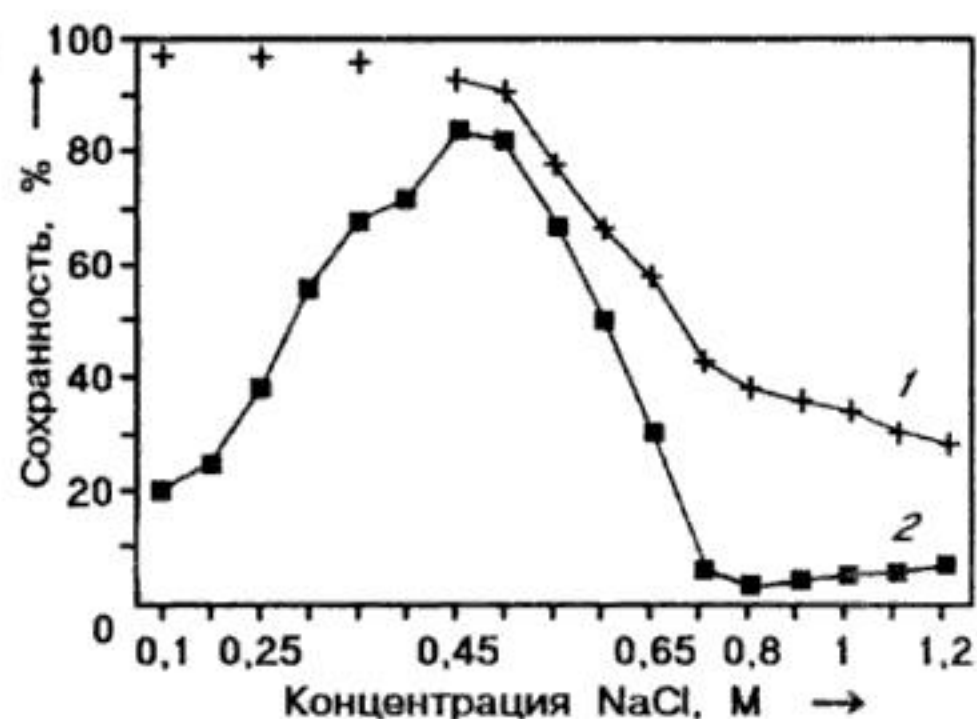


Рис. 1. Зависимость между исходной тоничностью среды и чувствительностью эритроцитов к охлаждению от 37 до 0°C (1) и переносу в 4,0 М NaCl в цикле $0 \rightarrow 0^\circ\text{C}$ (2). Время инкубации на каждом этапе 10 мин

ветвями ее снижения: левой — “изотонической” и правой — “гипертонической”. В данной серии экспериментов клетки исходно инкубировались при 0°C (10 мин), затем проводили классический холодный шок ($37 \rightarrow 0^\circ\text{C}$). Снижение температуры инкубации приводило к повышению сохранности клеток как при охлаждении, так и гипертоническом стрессе по сравнению с классической постановкой эксперимента [2].

Тот факт, что повышение осмолярности выше 0,6–0,8 М способствовало появлению у эрит-

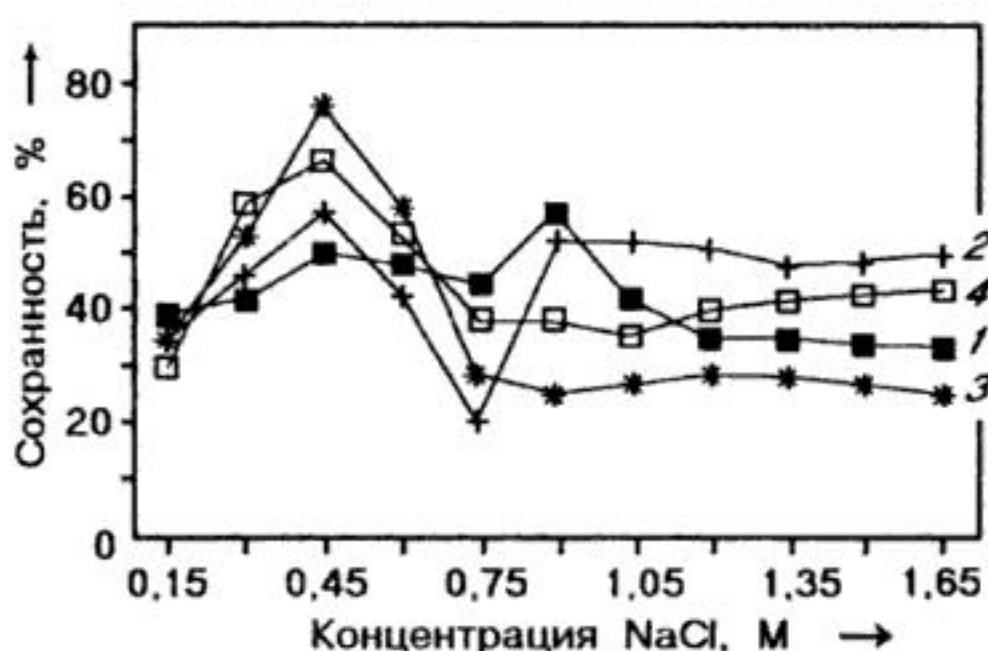


Рис. 2. Сохранность эритроцитов при 0 °С (10 мин) в присутствии 0,15–1,6 М NaCl и последующей инкубации (37 °С) в присутствии 1,0 М NaCl (1, 2) или в растворе с исходной тоничностью (3, 4) и последующим переносом в 4,0 М NaCl при 0 °С (1, 3) и 37 °С (2, 4). Время инкубации на каждом этапе 10 мин

роцитов чувствительности к холодовому и осмотическому шоку, указывает на сходство механизмов сенсibilизации клеток. В этой связи можно говорить, что перенос клеток из 1,0 М NaCl в 4,0 М NaCl при постоянной температуре можно рассматривать по аналогии с охлаждением клеток в присутствии 1,0 М NaCl. Варьирование исходной осмолярности среды в широком интервале (0,15–1,6 М) при 0 °С с последующим переносом в растворы с той же осмолярностью при 37 °С или из каждого раствора в 1,0 М NaCl (рис. 2) и последующее моделирование осмотического и холодового шока показали наличие определенного сходства в реакции эритроцитов при холодовом и осмотическом воздействиях. Наиболее выраженным элементом сходства является наличие двух областей концентраций (0,15–0,75 и 0,70–1,60 М), в пределах которых эритроциты по-разному реагируют на перенос в 4,0 М NaCl. В первой области наблюдается максимум сохранности, высота которого зависит от температуры переноса в 4,0 М NaCl, во второй — сохранность клеток в меньшей степени зависит от осмолярности и здесь нет максимума. Для минимального значения осмолярности характерно отсутствие зависимости уровня сохранности от температурных и осмотических режимов воздействия. Для самого максимального значения существует определенная взаимосвязь между сохранностью клеток и используемыми вариантами температурного и осмотического воздействий. Кривые 1 и 3 соответствуют конечной температуре (0 °С) переноса в 4,0 М NaCl, а кривые 2 и 4 — температуре 37 °С, свидетельствуют о разном поведении, зависимом от конечной температуры.

Наблюдаемые особенности можно объяснить тем, что чувствительность эритроцитов к холодовому и осмотическому шоку при повышении осмолярности наружной среды контролируется появлением трансмембранных дефектов на этапе исходной инкубации, размеры которых недостаточны для индукции лизиса. Дополнительное воздействие (охлаждение или гиперосмолярность) способствует росту размеров и времени жизни дефектов. В данном случае температура является фактором, который определяет эволюцию этих дефектов. При значениях осмолярности ниже 0,75 М NaCl появляются дефекты, связанные с формированием устойчивого состояния вблизи 0,45 М NaCl (рис. 1), а также после переноса в 1,0 М NaCl (рис. 2). Различия, относящиеся к 1,0 М NaCl, могут быть связаны с исходной температурой 0 °С. Если принять, что перенос клеток из 1,0 М NaCl в 4,0 М NaCl в цикле 37 → 37 °С соответствует осмотическому шоку, а в цикле 37 → 0 °С — холодовому, то данные, представленные на рис. 2, можно рассматривать как свидетельство сходства механизмов, контролирующих эти процессы.

При сопоставлении данных, приведенных на рис. 1 и 2, можно выделить две особенности: 1) видимые различия чувствительности эритроцитов к хо-

лодовому шоку при значениях осмолярности, близкой к изотонической (рис. 1). Высокая чувствительность изотонических клеток к осмотическому шоку указывает на то, что повреждения в этом случае обусловлены дегидратацией; 2) практически одинаковая чувствительность клеток к холодовому и осмотическому шоку при исходной концентрации электролитов 0,7 М и выше. Этот факт связан с исходной дегидратацией, которая происходит на начальных этапах. Из этого следует, что при осмотическом воздействии на клетку возникают условия, при которых дегидратация способна изменить поведение клетки в изменяющихся условиях. Общей основой указанных эффектов дегидратации может быть изменение объема и формы клеток. Соответственно высокая устойчивость клеток вблизи 0,45 М NaCl связана с относительным уменьшением изотонического объема, обеспечивающего минимальную амплитуду объемных изменений при последующем осмотическом воздействии и недостаточным для того, чтобы вызвать изменения, проявляющиеся в появлении чувствительности к холодовому и осмотическому воздействиям. Это означает, что ведущим фактором, контролирующим устойчивость клеток, является осмолярность среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 256 с.
2. Бондаренко В. А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1989. – 446 с.
3. Поздняков В. В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1989. – 126 с.
4. Фултон А. Цитоскелет, архитектура и хореография клетки. – М.: Мир, 1987. – 118 с.
5. Lovelock J. E. Physikal instability and thermal shock in red blood cells // Nature. – 1954. – 173, № 4406. – P. 659-661.
6. Stokke B. T., Mikkelsen A., Elgsaeter A. The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic gel. I. Membrane mechanochemical properties // Eur. Biophys. J. – 1986. – 13, N 4. – P. 203-219.

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

Поступила 19.02.97

Т. П. БОНДАРЕНКО, Н. А. ЛУПИЛОВА

ОСМОЛЯРНІСТЬ ТА TEMПЕРАТУРА СЕРЕДОВИЩА ЯК ФАКТОРИ, ЩО КОНТРОЛЮЮТЬ ПОВЕДІНКУ ЕРИТРОЦИТІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Досліджено стан еритроцитів на основі їх бар'єрних характеристик в змінюючих умовах середовища, що реалізуються при зниженні температури. Встановлено, що частково дегідратовані клітини мають однакові механізми, які регулюють їх чутливість до холодового та осмотичного шоку. Обговорюються можливі шляхи вкладу температурного фактора середовища та його осмолярності на поведінку клітини при нефізіологічних умовах.

T. P. BONDARENKO, N. A. LUPILOVA

OSMOLARITY AND TEMPERATURE OF THE MEDIUM ARE THE FACTORS, WHICH CONTROL THE RED CELL BEHAVIOR

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

The authors investigated the state of red cells on the basis of their barrier characteristics under changing conditions of the medium, which become effective after lowering of the temperature. It was found that partially dehydrated cells possess similar mechanisms, which regulate the susceptibility of cells to cold and osmotic shock. Probable contributions of the temperature and osmolality of the medium into the response to nonphysiological conditions are studied.

О.Н.Дунаевская, Н.М.Шпакова, В.А.Бондаренко**ГИПЕРОСМОТИЧЕСКИЙ СТРЕСС ЭРИТРОЦИТОВ И
АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИФТОРПЕРАЗИНА**

Изучалась связь между гиперосмотическим повреждением эритроцитов при 37 и 0 °С и проявлением антигемолитического эффекта трифторперазина. Показано, что трифторперазин защищает клетки при их переносе в гипертонические среды (2,0; 3,0 и 4,0 М NaCl). Однако при 0 °С, в отличие от физиологической температуры, наблюдается прирост гиперосмотического повреждения эритроцитов в присутствии трифторперазина при увеличении времени инкубации от 5 до 30 мин в лизирующей среде.

Гипертонический стресс является ведущим фактором криоповреждения, поэтому для моделирования замораживания используют перенос клеток в высококонцентрированные солевые растворы при положительных температурах. Эритроциты человека обладают высокой чувствительностью к изменениям осмотических условий среды, и лизис клеток при переносе в 4,0 М NaCl достигает 90% [1, 3]. В основе лизиса клеток лежат формирование и стабилизация гемолитической поры. Существует несколько путей повышения устойчивости клеток к гипертоническому стрессу [1–3]. Так, предварительная частичная дегидратация эритроцитов значительно снижает уровень повреждения клеток при переносе в 4,0 М NaCl [3]. Наличие некоторых амфифильных соединений в лизирующей среде также резко повышает сохранность клеток при переносе в 4,0 М NaCl [1, 2]. Например, положительно заряженные производные фенотиазина протектируют клетки от повреждения в условиях стресса [1, 4]. Особенность этих соединений заключается в способности оказывать множественное действие на клетки. В частности, они влияют на структурное состояние липидных и белковых компонентов мембраны и могут модифицировать белок-липидные взаимодействия [7, 8]. В указанной группе трифторперазин, относящийся к производным фенотиазина, также защищает клетки в условиях гиперосмотического стресса, т. е. при переносе эритроцитов в 4,0 М NaCl [2]. Антигемолитическую активность данного соединения связывают с его влиянием прямо или опосредованно на гемолитическую пору [2].

Целью данной работы явилось изучение связи между степенью влияния гиперосмотического стресса на эритроциты при 37 и 0 °С и проявлением антигемолитического эффекта трифторперазина.

Эритроциты получали из донорской крови II-й группы. После удаления плазмы эритромассу дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, *pH* 7,4) и хранили в виде плотного осадка не более 2 ч при 0 °С. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, *pH* 7,4.

Гиперосмотический шок осуществляли следующим образом. С помощью поршневого дозатора "Jilson" по 50 мкл осадка эритроцитов переносили в 0,5 мл раствора NaCl (0,15; 0,45 и 0,70 М) при заданной температуре (0 или 37 °С) и инкубировали 2 мин (этап предварительной инкубации). Затем из каждой пробы по 50 мкл переносили в 1,0 мл гиперосмотического раствора NaCl (2,0; 3,0; 4,0 М) при той же температуре на 5 или 30 мин (этап собственно гиперосмотического шока). Целые клетки осаждали центрифугированием и спектрофотометрически при длине волны 543 нм определяли количество гемоглобина в супернатанте. Выход гемоглобина из клеток

рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу в присутствии тритона X-100 (0,1%).

Трифторперазин находился в гиперосмотической среде в концентрации $3,0 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-5} М в момент добавления клеток. Концентрация стокового раствора трифторперазина составляла $3,0 \cdot 10^{-3}$ М, рН 6,8.

В работе были использованы: трифторперазин фирмы "Calbiochem" (США), реактивы отечественного производства квалификации ХЧ и ЧДА.

Предварительная частичная дегидратация изменяет чувствительность эритроцитов к гипертоническому стрессу, развивающемуся при переносе в 4,0 М NaCl. В экспериментах средами предварительной инкубации были выбраны: 0,15; 0,45 и 0,70 М NaCl. Данный выбор обусловлен тем, что указанные среды представляют соответственно: контроль (левая ветвь), оптимальную зону устойчивости и зону неустойчивости (правая ветвь) кривой зависимости уровня лизиса клеток в 4,0 М NaCl от концентрации сред предварительной инкубации [3].

Как видно из рис. 1, повышение величины гиперосмотического стресса (от 2,0 до 4,0 М NaCl) сопровождается увеличением уровня лизиса клеток при 37 °С. Однако в каждом конкретном случае реакция эритроцитов на действие стресса определялась тем, в какой среде предварительной инкубации находились клетки. Так, эритроциты, проинкубированные в физиологических по тоничности условиях (0,15 М NaCl), лизируют в 3,0 и 4,0 М NaCl (рис. 1, а), в то время как повреждение клеток после инкубации в 0,45 М NaCl отмечалось лишь в 4,0 М NaCl (рис. 1, б). Эритроциты, находившиеся в 0,7 М NaCl, начинают лизировать при относительно небольшом осмотическом стрессе — переносе в 2,0 М NaCl (рис. 1, в).

Следует отметить, что степень выраженности повреждения эритроцитов определяется используемым температурным режимом. Так, при 37 °С уровень лизиса клеток (при переносе в соответствующие гипертонические среды на 5 мин) выше по сравнению с уровнем, наблюдаемым при 0 °С (рис. 1 и 2).

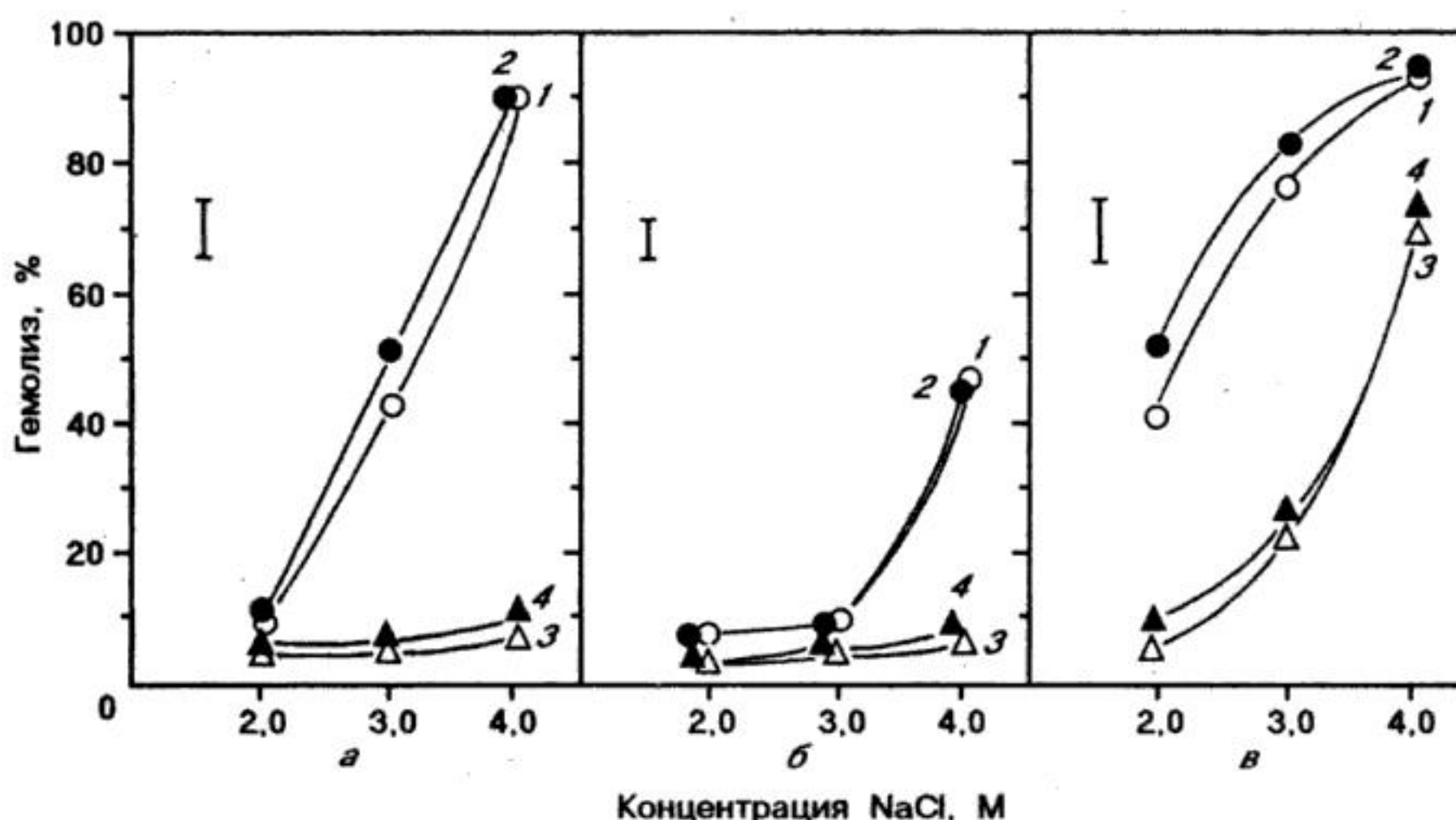


Рис. 1. Уровень гемолиза эритроцитов, перенесенных в солевые гиперосмотические среды после предварительной инкубации в 0,15 М (а), 0,45 М (б) и 0,70 М (в) NaCl при 37 °С в присутствии трифторперазина ($3,0 \cdot 10^{-5}$ М) и без него: 1, 2 — контроль; 3, 4 — трифторперазин. Время инкубации в гиперосмотических средах: 1, 3 — 5 мин; 2, 4 — 30 мин

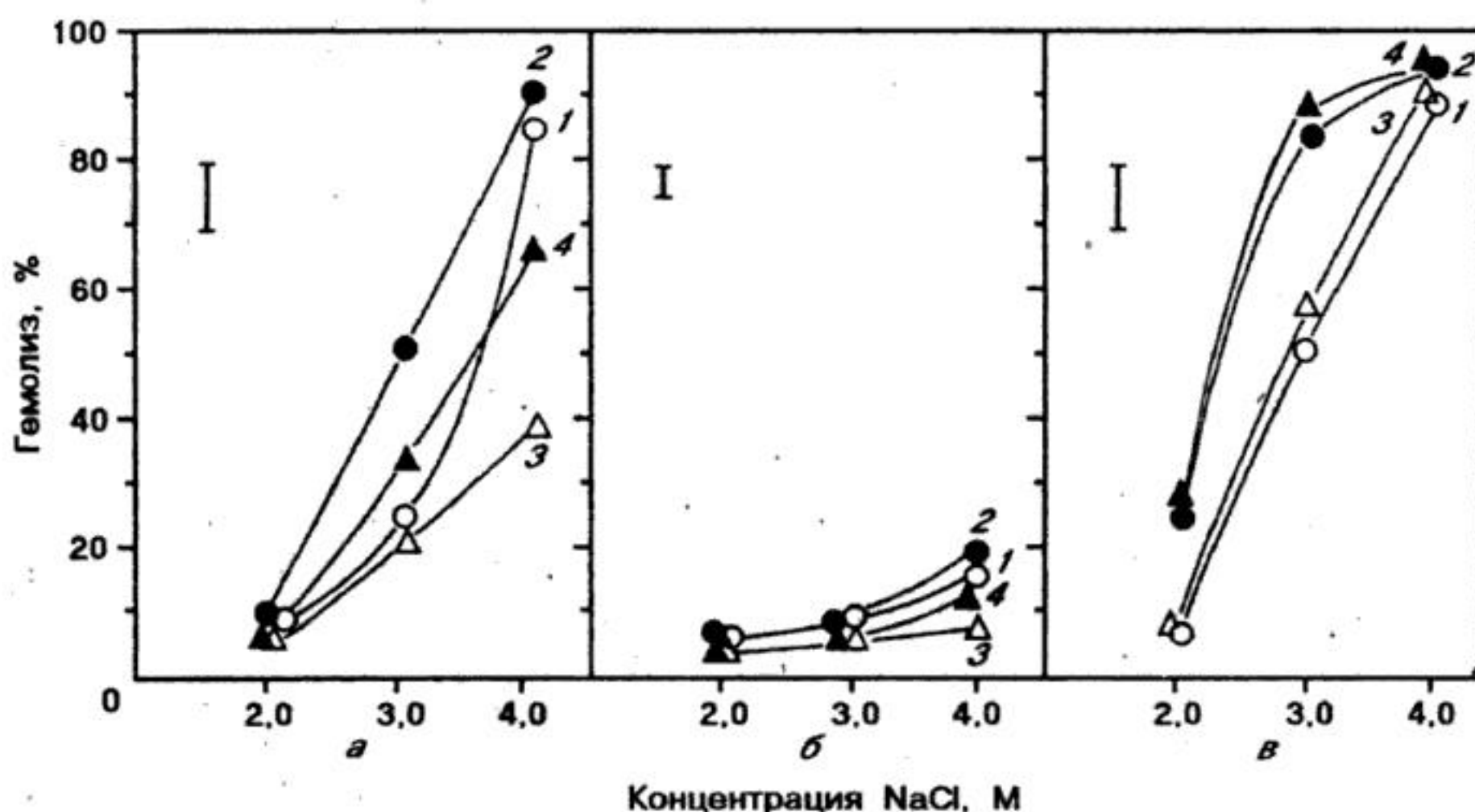


Рис. 2. Уровень гемолиза эритроцитов, перенесенных в солевые гиперосмотические среды после предварительной инкубации в 0,15 М (а), 0,45 М (б) и 0,70 М (в) NaCl при 0 °С в присутствии трифторперазина (10^{-5} М) и без него: 1, 2 — контроль; 3, 4 — трифторперазин. Время инкубации в гиперосмотических средах: 1, 3 — 5 мин; 2, 4 — 30 мин

Увеличение времени экспонирования клеток до 30 мин в гиперосмотических средах (2,0 и 3,0 М NaCl) сопровождается значительным приростом повреждения эритроцитов при 0 °С (примерно 20–30%). В среде, содержащей 4,0 М NaCl, прирост повреждения при увеличении времени действия гиперосмотического стресса составляет 10% и менее (рис. 2). При 37 °С эффект зависимости уровня лизиса эритроцитов от времени пребывания в гиперосмотической среде (2,0 и 3,0 М NaCl) выражен слабее, а для клеток в 4,0 М NaCl — отсутствует (рис. 1).

Таким образом, при 37 °С повреждения эритроцитов начинаются при меньших значениях гиперосмотического стресса и достигают больших величин. При 0 °С развитие лизиса клеток в гиперосмотических средах при увеличении времени инкубирования до 30 мин более выражено по сравнению с аналогичными процессами при физиологической температуре.

Трифторперазин защищает клетки от повреждений в условиях холодого и гиперосмотического стресса [1, 2]. Показано, что степень защиты эритроцитов трифторперазином при их переносе в 4,0 М NaCl, а также оптимальные концентрации амфифильного соединения при ингибировании лизиса определяются температурным режимом [1]. Оптимальной ингибирующей концентрацией вещества при 0 °С является 10^{-5} М, а при 37 °С — $3 \cdot 10^{-5}$ М [1]. В этой связи представляло интерес выяснить, как будет проявляться антигемолитический эффект трифторперазина при изменении величины гиперосмотического стресса, а также и при увеличении времени его действия.

Как видно из рис. 1, трифторперазин в концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ М защищает клетки при их переносе во все используемые гиперосмотические среды при 37 °С. Однако уровень протекции определяется исходными условиями, в которых находились клетки. Трифторперазин практически полностью подавляет развитие гиперосмотического лизиса эритроцитов, которые предварительно находились в 0,15 или 0,45 М NaCl, при любой величине гиперосмотического стресса (рис. 1). Однако эффект трифторперазина на клет-

ки, проинкубированные в 0,7 М NaCl и перенесенные в гипертоническую среду, зависит от величины осмотического стресса в конечной среде. Так, при относительно низком гиперосмотическом стрессе защита клеток амфипатом составляет 80–85%, а при переносе клеток в 4,0 М NaCl протекция эритроцитов в присутствии трифторперазина выражена в значительно меньшей степени ($\approx 25\%$). Таким образом, влияние трифторперазина на уровень гиперосмотического гемолиза клеток, которые ранее находились в 0,7 М NaCl, определяется величиной приложенного осмотического стресса. Чем выше его значение, тем больше клеток подвергается лизису (рис. 1). При 0 °С такая зависимость величины повреждения клеток в присутствии амфифильного соединения (10^{-5} М) от значений приложенного осмотического стресса характерна не только для эритроцитов, предварительно проинкубированных в 0,7 М NaCl, но и для клеток, находившихся в 0,15 М NaCl (рис. 2). Уровень защиты клеток трифторперазином при 0 °С ниже, чем при 37 °С.

Следует отметить, что при 0 °С, в отличие от физиологической температуры, наблюдается прирост гиперосмотического повреждения клеток в присутствии трифторперазина при увеличении времени инкубации эритроцитов в лизирующей среде от 5 до 30 мин. Таким образом, при 0 °С повреждение клеток развивается прогрессирующим образом даже при наличии амфифильного соединения.

В основе лизиса эритроцитов при действии различных стрессовых факторов лежат процессы формирования и стабилизации мембранных дефектов. Осмолярность среды контролирует процессы, связанные с формированием трансмембранных дефектов. Дальнейшая их эволюция, приводящая к формированию стабильной поры, зависит от температуры инкубации [5]. При низкой температуре липид-липидные и липид-белковые взаимодействия усиливаются, поэтому для формирования поры необходимы большие затраты энергии по сравнению с таковыми при высокой температуре. При 0 °С процесс зарождения поры затруднен, в то время как при 37 °С этот процесс облегчается. Этим можно объяснить тот факт, что при 37 °С лизис клеток наблюдается при меньших значениях приложенного осмотического стресса и достигает больших величин по сравнению с аналогичными значениями при 0 °С (рис. 1 и 2).

Наблюдаемый антигемолитический эффект трифторперазина (при действии на клетки стресса) связан с влиянием вещества на процессы, контролируемые формирование и время жизни трансмембранных дефектов [1, 2]. Можно предположить, что защитный эффект трифторперазина обусловлен неспецифическим характером влияния данного соединения на мембрану, а не его способностью ослаблять связь между мембранными липидами и белками цитоскелета, как указывалось в [1, 2]. Кроме того, показано, что неионные соединения, которые распределяются в наружный монослой липидного бислоя эритроцитарной мембраны, также протектируют клетки от повреждения в условиях гиперосмотического стресса. Это означает, что защита клеток необязательно должна быть связана с влиянием катионных амфифилов на белки цитоскелета. При оценке антигемолитической активности большой группы амфифильных соединений в условиях гипотонического шока эритроцитов был сделан вывод [6], что наблюдаемый защитный эффект определяется амфифильной природой исследуемых веществ и их неспецифическим действием на мембрану.

Температура (37 °C) и трифторперазин действуют однонаправленно и уменьшают время жизни трансмембранной поры, в результате чего при данной температуре наблюдается хорошо выраженный защитный эффект амфифильного соединения при действии на эритроциты гиперосмотического стресса (рис. 1). При 0 °C уже сформировавшаяся трансмембранная пора характеризуется низкой способностью к замыканию, поэтому увеличивается время ее жизни. Вероятно, по этой причине при 0 °C трифторперазин не в состоянии остановить процесс гиперосмотического повреждения эритроцитов.

Полученные данные позволяют конкретизировать существующие представления о механизме антигемолитического действия катионных амфифилов. Центральным звеном их влияния на процессы формирования и стабилизации трансмембранной поры следует считать модификацию текучести ее липидного окружения, что резко увеличивает вероятность и скорость ее замыкания, а также объясняет практически "мгновенный" протектирующий эффект амфифилов при переносе клеток в 4,0 М NaCl [2, 4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дунаевская О. Н., Панталер Е. Р., Шпакова Н. М., Бондаренко В. А. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовому и гиперосмотическому воздействию при использовании катионных амфиатов // Пробл. криобиол. – 1995. – 1. – С. 21–27.
2. Дунаевская О. Н., Шпакова Н. М. Защитный эффект трифторперазина при гиперосмотическом шоке эритроцитов // Укр. биохим. журн. – 1997. – 69, 2. – С. 30–35.
3. Поздняков В. В., Бондаренко В. А. Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гиперосмотическому стрессу в 4 М NaCl // Криобиология. – 1989. – 1. – С. 47–49.
4. Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия. – 1995. – 60, 10. – С. 1624–1631.
5. Aloni B., Eitan A., Livine A. The erythrocyte membrane site for the effect of temperature on osmotic fragility // Biochem. Biophys. Acta. – 1977. – 465, 1. – P. 46–53.
6. Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Interactions. – 1991. – 79. – P. 335–347.
7. Luxnat M., Gela H. -J. Partition of chlorpromazine into lipid bilayer membranes: effect of membrane structure and composition // Biochem. Biophys. Acta. – 1986. – 856, 2. – P. 274–283.
8. Svetina S., Vrhovec S., Gros M., Zeks B. Red blood cell membrane as a possible model system for studying mechanisms of chlorpromazine action // Acta Pharm. – 1992. – 42, 1. – P. 25–35.

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

Поступила 23.05.97

О. М. ДУНАЄВСЬКА, Н. М. ШПАКОВА, В. А. БОНДАРЕНКО

ГІПЕРОСМОТИЧНИЙ СТРЕС ЕРИТРОЦИТІВ ТА АНТИГЕМОЛІТИЧНИЙ ЕФЕКТ ТРИФТОРПЕРАЗИНУ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчався зв'язок між гіперосмотичним пошкодженням еритроцитів при 37 і 0 °C та проявою антигемолітичного ефекту трифторперазину. Встановлено, що трифторперазин захищає клітини при їх перенесенні в гіпертонічні середовища (2,0, 3,0 і 4,0 М NaCl). Але при 0 °C, на відміну від фізіологічної температури, спостерігається приріст гіперосмотичного пошкодження еритроцитів у присутності трифторперазину при зростанні тривалості інкубації від 5 до 30 хв у середовищі, що викликає лізис клітин.

O. N. DUNAYEVSKAYA, N. M. SHPAKOVA, V. A. BONDARENKO

HYPEROSMOTIC STRESS OF RED CELLS AND THE ANTIHEMOLYTIC ACTIVITY OF TRIFLUOPERAZINE

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

A relation of the hyperosmotic injury to red cells at 37 °C and 0 °C to the antihemolytic effect was investigated. It was shown that trifluoperazine protects cells in the hypertonic medium (4.0 M NaCl). In contrast to the physiological point, at 0 °C there occurred an additional increase in the hypertonic injury while the cells were exposed to the lytic medium for 30 min instead of 5 min, and trifluoperazine was added to the medium.

УДК 547.422+57.043

А. В. Зинченко, А. С. Соловьева

ВЛИЯНИЕ 1,2-ПРОПАДИОЛА НА ТЕПЛОВУЮ ДЕНАТУРАЦИЮ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

Исследован процесс тепловой денатурации бычьего сывороточного альбумина (БСА) как в нативном состоянии, так и в присутствии 1,2-пропандиола (1,2-ПД) в диапазоне концентраций 0–25 мас. %, а также после охлаждения (–196 °C) методом дифференциальной адиабатической сканирующей микрокалориметрии. Показано, что доменная структура молекулы БСА сохраняется во всем исследованном диапазоне концентраций 1,2-ПД. В области малых концентраций (до 10 мас. %) наблюдается стабилизирующее действие данного криопротектора. Дальнейшее увеличение содержания криопротектора в среде не приводит к существенным изменениям состояния белковой молекулы. Высокотемпературный домен более чувствителен к действию увеличивающейся концентрации 1,2-ПД, в отличие от низкотемпературных кооперативных единиц. Зависимости теплофизических параметров БСА от концентрации 1,2-ПД до и после охлаждения-нагрева симбатны, однако после действия низких температур их значения несколько ниже.

Сывороточный альбумин является одним из классических объектов при исследовании физико-химических особенностей структуры белковых молекул. Известно, что альбумин составляет около 50% общего белка сыворотки крови и играет особую роль в поддержании осмотического баланса крови и межклеточной жидкости [10]. Молекула альбумина имеет сложную мультидоменную структуру, представляющую собой три независимых кооперативных единицы, о чем свидетельствуют микрокалориметрические исследования [4, 7, 8].

Проблема взаимодействия белковой структуры с неводными растворителями [1, 5] является ключевой в области криобиологических исследований, так как основные криопротекторы (глицерин, 1,2-пропандиол) относятся именно к этой категории веществ. Особенности влияния веществ, обладающих криопротекторной активностью, на белковые структуры в основном исследовались с точки зрения поддержания их каталитической активности [3, 9], в то время как термодинамическая сторона этих взаимодействий практически не изучена. Известно, что присутствие криопротекторов и процесс охлаждения растворов до температуры жидкого азота способны изменять нативную конформацию молекулы белка [2, 9] и приводить к изменению термодинамических параметров системы, что может быть обнаружено методом сканирующей микрокалориметрии.

Целью работы было исследование процесса тепловой денатурации БСА как в нативном состоянии, так и в присутствии 1,2-пропандиола в диапазоне концентраций 0–25 мас. %, а также после быстрого охлаждения до –196 °C.

В работе был использован БСА фирмы "Serva", фракция 5; исследуемые растворы белка готовили на 5 мМ Na-фосфатном буфере; кажущаяся *pH* 7,4;

концентрация растворов белка составляла 5 мг/мл. Концентрацию белка контролировали спектрофотометрически, используя УФ спектрофотометр "Uniscan 8 000" и принимая $A_{0,1\%}^{280} = 0,66$ [6]. Растворы перегнанного 1,2-ПД готовили по массе; растворы белка инкубировали в присутствии криопротектора в течение 1 ч при 4 °С; однократное охлаждение проводили быстрым погружением в жидкий азот, нагрев осуществляли на водяной бане до температуры 25 °С.

Калориметрические измерения проводили на сканирующем калориметре DASM-4 с платиновой ячейкой объемом 0,46 мл (СКББП АН России, г. Пущино). Термограммы снимали при нагреве со скоростью 1 °С/мин и избыточном давлении 2,5 атм.

На рис. 1 представлены полученные термограммы нативного БСА. Вид профиля термоденатурации нативного БСА хорошо согласуется с литературными данными для альбумина с низким содержанием жирных кислот [7, 8]. Профиль термоденатурации БСА (рис. 1, кривая 1) сильно растянут по температуре и содержит 2 максимума теплопоглощения: первый при температуре 58,3 °С и второй — около 76 °С. В работе [8] был проведен очень подробный анализ кривых плавления БСА с использованием процедуры деконволюции кривой термоденатурации (разложения на простые функции), а также триптического гидролиза молекулы БСА на фрагменты. Результаты этого исследования показали, что структурные домены молекулы БСА имеют такие температуры перехода спираль-клубок: 59,4, 68,1 и 79,1 °С. Сопоставляя эти данные со значениями температур перехода, полученными в наших экспериментах, можно заключить, что, очевидно, область основного максимума (58,3 °С) включает плавление двух низкотемпературных доменов БСА, а минорный пик (76 °С) является результатом термоденатурации одного высокотемпературного домена БСА. Незначительные расхождения значений температур связаны, очевидно, с неодинаковым содержанием жирных кислот в образцах альбумина.

Из рис. 1 видно, что сложная доменная структура БСА сохраняется в при-

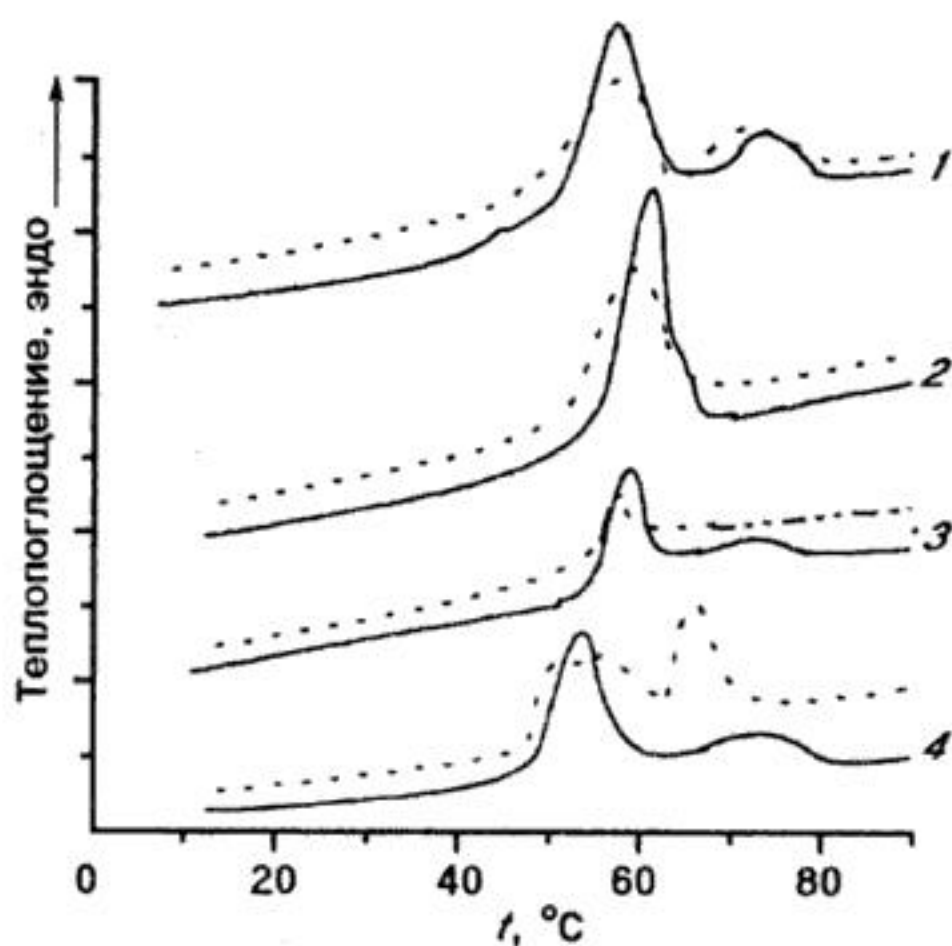


Рис. 1. Термограммы денатурации БСА (5 мМ Na-фосфат, pH 7,4): 1 — при отсутствии 1,2-ПД; 2 — в присутствии 5 мас. % 1,2-ПД; 3 — 10 мас. % 1,2-ПД; 4 — 25 мас. % 1,2-ПД. Пунктирная линия соответствует образцам, которые подвергали охлаждению-нагреву

сутствии 1,2-ПД во всем исследованном нами диапазоне концентраций, однако соотношение доменов между собой и их структурное состояние значительно изменяются. На рис. 2 и 3 представлены зависимости температур максимумов теплопоглощения обоих доменов от концентрации 1,2-ПД, а также после быстрого охлаждения. Для низкотемпературного пика теплопоглощения в области малых концентраций 1,2-ПД (до 7 мас. %) наблюдается значительный сдвиг температуры денатурации в высокотемпературную область с максимумом в области 5 мас. % (рис. 2,а). При этом температура денатурации низкотемпературного пика достигает 65 °С. Это явление,

очевидно, вызвано стабилизацией белковой молекулы, обусловленной модификацией ее гидратной оболочки [1]. При дальнейшем увеличении концентрации 1,2-ПД вплоть до 25 мас. % температура денатурации монотонно убывает. Однако при 25 мас. % максимум теплопоглощения (57,5 °С) лежит в области денатурации БСА при отсутствии 1,2-ПД и свидетельствует о том, что, по-видимому, процесс разрыхления молекулы белка в данной области концентраций 1,2-ПД еще не начался. После быстрого глубокого охлаждения до -196 °С (рис. 2,б) также наблюдается процесс стабилизации белка, однако менее выраженный, чем в вышеописанном случае.

Для высокотемпературного домена (рис. 3,а) в области концентраций 1,2-ПД 0–7 мас. % температура денатурации не изменяется. В области 10 мас. % наблюдается смещение температуры перехода в высокотемпературную область, после чего температура денатурации снижается до 68,5 °С при 25 мас. %, что значительно ниже температуры денатурации нативной молекулы БСА и свидетельствует о снижении термостабильности белковой молекулы. После охлаждения-нагрева на зависимости температуры денатурации от содержания 1,2-ПД в среде максимум температуры перехода спираль-клубок находится в области 5 мас. % 1,2-ПД. Дальнейшее увеличение концентрации криопротектора в среде приводит к более интенсивному процессу разрыхления молекулы белка, так как значения температур денатурации значительно ниже, чем для нативного состояния молекулы БСА (рис. 3,б).

Важным показателем тепловой стабильности белковой молекулы является тепловой эффект перехода спираль-клубок (энтальпия денатурации). На рис. 4 представлена зависимость изменения теплового эффекта денатурации (ΔH) от содержания 1,2-ПД в среде, а также после охлаждения-нагрева. Из рис. 4,а видно, что в области малых концентраций 1,2-ПД имеют место 2 максимума ΔH : при 1,0 и 5 мас. % 1,2-ПД. Увеличение теплового эффекта, особенно в области 5 мас. %, свидетельствует о значительном структурировании. Возможно, что в этом диапазоне концентраций 1,2-ПД происходит суперспирализация молекулы БСА. Следовательно, такие значительные колебания величины теплового эффекта свидетельствуют о нестабильном состоянии белка. При дальнейшем увеличении содержания 1,2-ПД состоя-

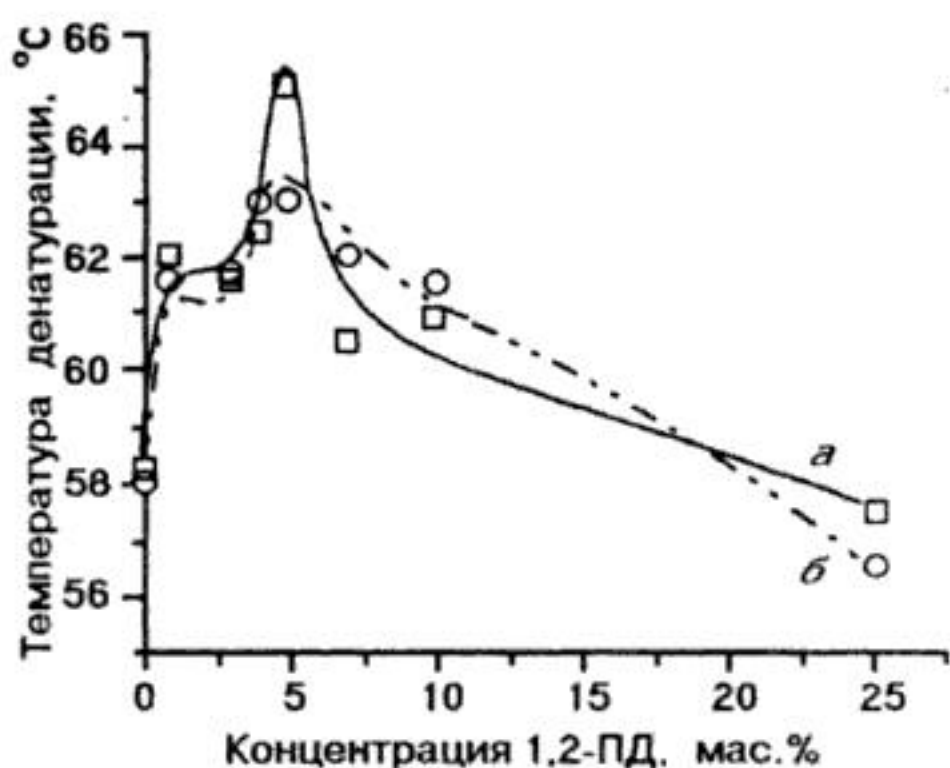


Рис. 2. Зависимость температуры основного максимума теплопоглощения растворов БСА от содержания 1,2-ПД в среде: а — образцы не подвергали охлаждению-нагреву; б — после охлаждения-нагрева

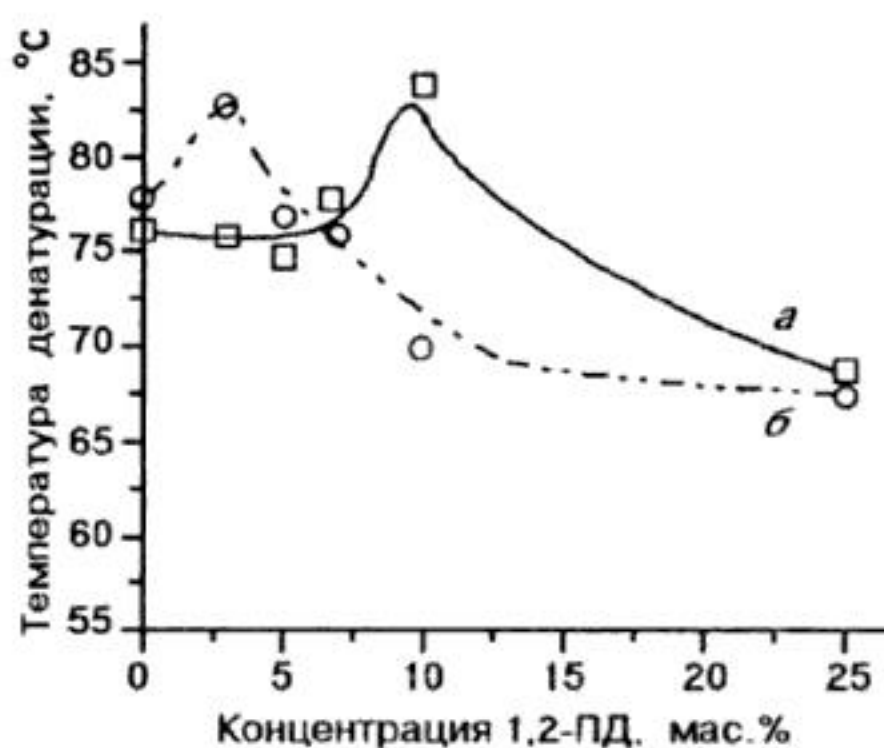


Рис. 3. Зависимость температуры минорного максимума теплопоглощения растворов БСА от содержания 1,2-ПД в среде: а — образцы не подвергали охлаждению-нагреву; б — после охлаждения-нагрева

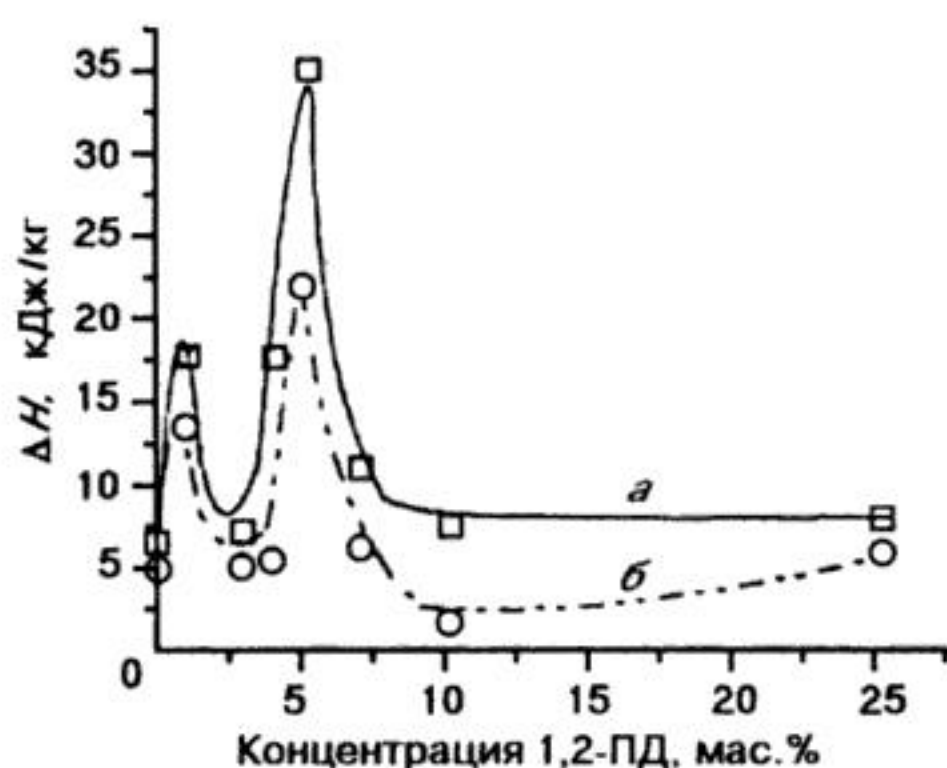


Рис. 4. Зависимость энтальпии денатурации (ΔH) растворов БСА от содержания 1,2-ПД в среде: *a* — образцы не подвергали охлаждению-нагреву; *b* — после охлаждения-нагрева

ры перехода спираль-клубок для всех структурных доменов белковой молекулы, из чего можно сделать вывод о стабилизирующем действии данного криопротектора. При дальнейшем увеличении концентрации растворителя температура денатурации значительно падала для высокотемпературного домена и незначительно изменялась для низкотемпературных кооперативных единиц, следовательно, высокотемпературный домен является более чувствительным к действию увеличивающейся концентрации 1,2-ПД. Процесс быстрого охлаждения-нагрева практически не изменяет тенденцию влияния данного криопротектора на раствор БСА, однако обнаруженные эффекты выражены в меньшей степени. Вывод о стабилизирующем действии малых концентраций 1,2-ПД (до 10 мас. %) подтверждает также вид зависимости теплового эффекта денатурации от концентрации криопротектора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белова А. Б., Можаяев В. В., Левашов А. В. и др. Взаимосвязь физико-химических характеристик органических растворителей с их денатурирующей способностью по отношению к белкам // Биохимия. — 1991. — 56, № 4. — С. 1923–1938.
2. Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология. — 1994. — Киев: Наук. думка. — 430 с.
3. Дузу П. Криобиохимия. — 1980. — М: Мир. — С. 283.
4. Казицына С. Ю., Сочава И. В. Проявление структурных переходов бычьего сывороточного альбумина в сканирующей калориметрии // Биофизика. — 1990. — 35, № 2. — С. 212–215.
5. Ковригин Е. Л., Потехин С. А. Микрокалориметрическое исследование влияния диметилсульфоксида на тепловую денатурацию лизоцима // Биофизика. — 1996. — 41. — № 6. — С. 1201–1206.
6. Окулов В. И. Применение спектрофотометрии в ультрафиолете для исследования белков // Успехи биологической химии. — М: Наука. — 1971. — 12. — С. 28–61.
7. Степура И. И., Лапина Е. А., Чайковская Н. А. Исследование тепловой денатурации сывороточного альбумина человека в водно-спиртовых и водно-солевых растворах в присутствии органических лигандов // Молекулярная биология. — 1991. — 25, № 2. — С. 337–347.
8. Тиктопуло Е. И., Привалов П. Л., Борисенко С. Н., Троцкий Г. В. Микрокалориметрическое исследование доменной организации сывороточного альбумина // Молекулярная биология. — 1985. — 19, № 4. — С. 1072–1078.
9. Franks F. Biophysics and biochemistry at low temperatures. — 1985. — Cambridge. — 210 p.
10. Franks F. Characterization of proteins. — 1988. — Cambridge. — 561 p.

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

Поступила 01.04.97

О. В. ЗІНЧЕНКО, О. С. СОЛОВЙОВА

ВПЛИВ 1,2-ПРОПАНДИОЛУ НА ТЕПЛОВУ ДЕНАТУРАЦІЮ БИЧАЧОГО СИРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Досліджено процес теплової денатурації бичачого сироваткового альбуміну (БСА) як у нативному стані, так і в присутності 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) у діапазоні концентрацій 0–25 мас. %, а також після охолодження (-196°C) методом диференціальної адіабатичної скануючої мікрокалориметрії. Показано, що доменна структура молекули БСА зберігається у всьому дослідженому діапазоні концентрацій 1,2-ПД. В області малих концентрацій (до 10 мас. %) спостерігається стабілізуюча дія даного кріопротектора. Подальше збільшення вмісту кріопротектора в середовищі не викликає істотних змін у стані білкової молекули. Високотемпературний домен більш чутливий до дії зростаючої концентрації 1,2-ПД на відміну від низькотемпературних кооперативних одиниць. Залежності теплофізичних параметрів БСА від концентрації 1,2-ПД до та після охолодження-нагрівання симбатні, проте після дії низьких температур їх значення декілька нижчі.

A. V. ZINCHENKO, A. S. SOLOVYEVA

ACTION OF 1,2-PROPANEDIOL ON THERMAL DENATURATION OF BOVINE SERUM ALBUMIN

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

The authors investigated the process of thermal denaturation of bovine serum albumin (BSA) both in the native state and in the presence of 1,2-propanediol (1,2-PD) in the range of concentrations of 0–25 mass%, as well as after cooling down to -196°C , using a method of differential scanning microcalorimetry. The research conducted shows that the domain structure of the BSA molecule is maintained within the whole range of the 1,2-PD concentrations under study. In the range of low concentrations (up to 10 mass%) there is observed a stabilizing action of the given cryoprotectant. A further rise in the content of the cryoprotectant in the medium does not result in any significant changes in the state of the protein molecule. In contrast to low-temperature cooperative units, a high-temperature domain is more susceptible to the action of the ever increasing concentration of 1,2-PD. The dependencies of the BSA thermal-physical parameters on the 1,2-PD concentration prior to and after cooling-heating are of symbatic nature, however, following the action of low temperatures their values are lowered.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 547.42:577.175.5:57.043

Е.И. Легач, В.А. Чуйко, И.М. Бондарева

ВЛИЯНИЕ ДИМЕКСИДА И ПРОПАНДИОЛА НА ОСВОБОЖДЕНИЕ КОРТИЗОЛА СРЕЗАМИ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ ТКАНИ И ЕЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ДЕЙСТВИЮ СТИМУЛЯТОРОВ

Изучалось влияние криопротекторов (димексида и 1,2-пропандиола) на высвобождение кортизола клетками коры надпочечников новорожденных поросят и половозрелых свиней. Обнаружены отличия секреции гормонов в условиях инкубации адренокортикальной ткани как с растворами криопротекторов различных концентраций, так и при добавлении специфических стимуляторов стероидогенеза.

В целях выбора криопротектора для низкотемпературной консервации коры надпочечников нами было исследовано влияние димексида (ДМСО) и 1,2-пропандиола на освобождение кортизола срезами адренокортикальной ткани и чувствительность данного процесса к действию вытяжек гипофиза и синтетического аналога АКТГ — синактена. Выбор димексида и 1,2-пропандиола в качестве криопротекторов был обусловлен наличием у них криопротекторных свойств в отношении целого ряда биологических объектов, в том

числе эндокринных тканей: щитовидной железы [1], β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы [2] и др.

Объектом исследования являлась адренокортикальная ткань быков, новорожденных и половозрелых свиней. Срезы адренокортикальной ткани толщиной 0,1 мм помещались на фильтр специального устройства, представляющего собой проточный сосуд, через который со скоростью 1 мл/мин осуществлялась перфузия срезов. Первые 3 мл перфузата отбрасывались как, возможно, содержащие поврежденные клетки и обрывки ткани. Последующие 10 мл перфузата, содержащие освобожденный в среду кортизол, отбирались для проведения гормональных исследований. Для определения содержания кортизола использовался флюориметрический метод, позволяющий определять общее содержание 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) [3]. В опытах по изучению действия вытяжек гипофиза добавление этих препаратов производилось непосредственно в среду инкубации. Гомогенаты гипофиза приготавливались путем измельчения ткани до однородной массы и последующей ее фильтрации. В гомогенате определяли содержание белка по Лоури.

Т а б л и ц а 1

Влияние димексида на содержание 11-ОКС в среде инкубации адренокортикальной ткани половозрелых свиней (нмоль/л · мг ткани)

Условия эксперимента	Содержание кортизола, нмоль/л · мг ткани					
	Контроль (без гипофиза)	Вытяжка гипофиза, мл				
		0,05	0,1	0,25	0,5	1,0
Интakтная ткань	20,73 ± 1,21	32,45 ± 1,15*	29,42 ± 1,01*	25,46 ± 1,27	23,28 ± 1,32	22,61 ± 1,06
Инкубация: 1% р-р димексида	21,43 ± 1,56	32,96 ± 1,24*	28,89 ± 1,05*	25,09 ± 1,65	24,13 ± 1,15	23,92 ± 1,18
5% р-р димексида	19,72 ± 1,21	28,59 ± 1,46*	25,78 ± 1,01*	23,46 ± 1,12	21,61 ± 1,10	21,04 ± 1,15
10% р-р димексида	19,06 ± 1,24	29,01 ± 1,03*	26,25 ± 1,19*	23,34 ± 1,83	22,15 ± 1,10	21,37 ± 1,05

Примечание. * — различия достоверны по сравнению с контролем, $P < 0,05$.

Как следует из табл. 1, содержание 11-ОКС в среде инкубации половозрелой свиньи составляет $20,73 \pm 1,21$ нмоль/л · мг ткани; 30-мин инкубация с 1, 5 и 10%-м растворами димексида не изменяла уровень 11-ОКС, присутствующих в среде инкубации.

Добавление вытяжек (гомогенатов) гипофиза (0,05–1,0 мл) в среду инкубации оказывает стимулирующий эффект (статистически достоверно) только при использовании 0,05 и 0,1 мл добавок вытяжек гипофиза в концентрации 10%, но не 0,25, 0,5 и 1,0 мл. Эта закономерность сохраняется и при инкубации адренокортикальной ткани с 1, 5 и 10%-м растворами димексида. При этом более выраженный эффект обнаруживается при использовании минимальной дозы вытяжки гипофиза — 0,05 мл. На основании данных таблицы следует заключить, что инкубация коры надпочечников с 1, 5 и 10%-м димексидом не изменяет содержания 11-ОКС в среде инкубации и не блокирует стимулирующий эффект гомогената гипофиза (только в объеме 0,05 мл) на адренокортикальную ткань.

Базальный уровень 11-ОКС в контроле среды коры надпочечников новорожденных поросят составлял $33,07 \pm 1,05$ нмоль/л · мг ткани (табл. 2). По-

сле добавления синтетического аналога АКТГ — синактена (0,2 ЕД/мл) уровень 11-ОКС увеличился практически вдвое и составлял $58,55 \pm 1,04$ нмоль/л·мг ткани; 30-мин инкубация с криопротекторами: 1, 5 и 10%-м растворами димексида; 5 и 10%-м растворами 1,2-пропандиола не приводила к изменению базального уровня содержания 11-ОКС в среде (статистически недостоверно).

Т а б л и ц а 2

Влияние криопротекторов на содержание 11-ОКС в среде инкубации коры надпочечников новорожденных поросят (нмоль/л·мг ткани)

Условия эксперимента	Содержание 11-ОКС, нмоль/л·мг ткани	
	Базальный уровень	Стимуляция синактеном, 0,2 ЕД/мл
Интактная ткань	$33,09 \pm 1,05$	$58,55 \pm 1,04^*$
Инкубация:		
1% р-р димексида	$33,02 \pm 1,99$	$58,08 \pm 2,39^*$
5% р-р димексида	$32,49 \pm 2,02$	$57,75 \pm 2,24^*$
10% р-р димексида	$31,39 \pm 2,14$	$65,35 \pm 2,08^*$
1% р-р 1,2-пропандиола	$32,04 \pm 2,53$	$54,13 \pm 2,31^*$
5% р-р 1,2-пропандиола	$30,86 \pm 1,82$	$53,74 \pm 2,16^*$
10% р-р 1,2-пропандиола	$31,27 \pm 1,58$	$56,87 \pm 2,05^*$

Примечание. * — различия достоверны по отношению к базальной активности, $P < 0,05$.

Добавление специфического стимулятора синактена (0,2 ЕД/мл) в среду инкубации приводит к увеличению содержания 11-ОКС в инкубационной среде (табл. 2), что указывает на стимулирующий эффект данного препарата. Содержание 11-ОКС после инкубации адренокортикальной ткани в растворах, содержащих 1, 5% димексида и 1, 5, 10% 1,2-пропандиола в условиях добавления стимулятора было $53,74 \pm 2,31 - 58,68 \pm 2,39$ нмоль/л·мг ткани. Таким образом, можно предположить, что растворы криопротекторов в используемых концентрациях 1, 5, 10%-го димексида и 1, 5, 10%-го 1,2-пропандиола не оказывают ингибирующего влияния на рецепторный аппарат адренокортикальных клеток, которые после добавления специфического стимулятора — синактена, выполняют секреторную функцию и способствуют увеличению содержания 11-ОКС в среде инкубации.

Содержание 11-ОКС в инкубационных растворах после добавления синактена у новорожденных поросят было достоверно выше, чем в инкубационных растворах с добавлением синактена у половозрелых свиней. Однако базальный уровень секреции 11-ОКС у новорожденных поросят недостоверно отличается от содержания 11-ОКС в инкубационном растворе адренокортикальной ткани половозрелых свиней после добавления синактена.

Изучалось также влияние криопротекторов на содержание 11-ОКС в среде инкубации коры надпочечников половозрелой свиньи после добавления синактена. Установлено, что базальный уровень кортизола в инкубационной среде коры надпочечников после инкубации с растворами криопротекторов статистически недостоверно отличается от контроля и составляет $20,24 \pm 1,24 - 23,59 \pm 1,21$ нмоль/л·мг ткани. Добавление синактена (0,2 ЕД/мл) приводит к повышению содержания 11-ОКС в инкубационной среде (30-мин экспозиция) коры надпочечников половозрелой свиньи (табл. 3), что свидетельствует о сохранении стимулирующего действия синактена на адренокортикальную ткань.

Влияние криопротекторов на содержание 11-ОКС в среде инкубации коры надпочечников половозрелой свиньи (нмоль/л · мг ткани)

Условия эксперимента	Содержание 11-ОКС	нмоль/л · мг ткани
	Базальный уровень	Стимуляция синактеном, 0,2 ЕД/мл
Интактная ткань	22,37 ± 1,24	39,72 ± 1,15*
Инкубация:		
1% р-р димексида	23,56 ± 1,49	41,54 ± 1,03*
5% р-р димексида	21,72 ± 1,21	35,28 ± 1,32*
10% р-р димексида	21,03 ± 1,01	36,42 ± 1,15*
1% р-р 1,2-пропандиола	22,43 ± 1,56	42,61 ± 1,06*
5% р-р 1,2-пропандиола	23,59 ± 1,64	40,74 ± 1,81*
10% р-р 1,2-пропандиола	20,24 ± 1,24	35,46 ± 1,27*

Примечание. * — различия достоверны по отношению к базальной активности, $P < 0,05$.

Из данных табл. 3 следует, что при добавлении в среду инкубации криопротекторов димексида (1, 5 и 10%) и пропандиола (1, 5 и 10%) содержание 11-ОКС в ней не изменяется. Включение в состав инкубационной среды с указанными выше криопротекторами не влияет на чувствительность адренокортикальной ткани к действию синактена: во всех случаях данный препарат вызывал увеличение уровня 11-ОКС в среде инкубации.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что содержание 11-ОКС в среде инкубации адренокортикальной ткани в норме отражает гормонопродуцирующую и секреторную активность клеток надпочечников, поскольку при добавлении ее физиологического стимулятора (вытяжка гипофиза или синтетического аналога АКТГ — синактена) выделение 11-ОКС в среду инкубации возрастает у новорожденных поросят на 52,3%, у половозрелых свиней на 48,2%. Инкубация адренокортикальной ткани новорожденных поросят в растворах криопротекторов позволила установить отсутствие изменений в содержании 11-ОКС в среде инкубации адренокортикальной ткани при сохранении ее чувствительности к стимулирующему эффекту синактена и вытяжек гипофиза. При этом показано, что стимулирующее действие вытяжек гипофиза проявляется при использовании 0,05 и 0,1 мл вытяжки. Инкубация коры надпочечников половозрелой свиньи в растворах 1, 5 и 10%-го растворов пропандиола не влияет на содержание 11-ОКС в среде и не блокирует проявление стимулирующего эффекта синактена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чуйко В. А., Утевский А. М. Биохимия криоконсервированной щитовидной железы. — Киев: Наук. думка, 1985. — 236 с.
2. Грищенко В. И., Чуйко В. А., Пушкарь Н. С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов. — Киев: Наук. думка, 1993. — 242 с.
3. Резников А. Г. Унифицированный флюориметрический метод определения неконъюгированных 11-ОКС (гидрокортизона и кортикостерона) в плазме крови // Методы определения гормонов. — Киев: Наук. думка, 1980. — С. 255-258.

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

Поступила 19.08.97

Є. І. ЛЕГАЧ, В. А. ЧУЙКО, І. М. БОНДАРЕВА

ВПЛИВ ДИМЕКСИДУ І ПРОПАНДІОЛУ НА ВИВІЛЬНЕННЯ КОРТИЗОЛУ ЗРІЗАМИ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЇ ТКАНИНИ І ЇЇ ЧУТЛИВІСТЬ ДО ДІЇ СТИМУЛЯТОРІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Вивчали вплив кріопротекторів (димексиду і 1,2-пропандіолу) на вивільнення кортизолу клітинами кори наднирок новонароджених поросят і статевозрілих свиней. Виявлені відмінності секреції гормонів в умовах інкубації адренокортикальної тканини як з розчинами кріопротекторів різних концентрацій, так і при доданні специфічних стимуляторів стероїдогенезу.

E. I. LEGACH, V. A. CHUIKO, I. M. BONDAREVA

EFFECT OF DIMEXIDE AND PROPANEDIOL ON RELEASE OF HYDROCORTISONE BY SLICES OF ADRENOCORTICAL TISSUE, AND ITS SUSCEPTIBILITY TO THE ACTION OF STIMULATORS

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

The authors investigated the action of cryoprotectants (dimexide and 1,2-propanediol) on the release of hydrocortisone by the cells of the adrenal glands of newborn and mature pigs. They found the differences in secretion of hormones when incubating the adrenocortical gland both with solutions of cryoprotectants of various concentrations, and upon addition of specific stimulators of steroidogenesis.

УДК 57.043

Е.Ф.Копейка, В.В.Черепанов, Б.Б.Дзюба

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ АТФ И КРЕАТИНФОСФАТА В СПЕРМЕ КАРПА (*CYPRINUS CARPIO*) ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Ферментативным методом исследованы динамика содержания АТФ и креатинфосфата (КФ) в активированной сперме карпа (*Cyprinus carpio*) в контроле, после разбавления криозащитной средой и замораживания-отогрева, а также содержание этих метаболитов в оттаянной сперме до и после аэрации. Установлено нарушение процессов образования АТФ и КФ на разных этапах криоконсервации. 15-минутная аэрация размороженной спермы приводит к увеличению содержания КФ в сперме до активации и увеличению ее оплодотворяющей способности.

Основной функцией спермиев является доставка генетического материала к яйцеклетке [4]. При этом расходуется АТФ, ответственная за подвижность спермиев осетровых [1], карповых и других рыб [6, 10]. Известно также, что на подвижность спермиев человека сильное влияние оказывает КФ [7]. Но его роль в подвижности спермиев рыб еще не изучена. Несмотря на значимость макроэргических соединений в реализации одной из основных функций спермиев, в работах по криоконсервации спермиев рыб практически отсутствует описание возможных изменений в содержании АТФ и КФ на разных этапах процесса. Авторы в основном ограничиваются констатацией факта потери подвижности частью спермиев и описанием повреждений различных структур — головки, шейки и жгутика [5]. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение динамики АТФ и КФ в активированной сперме карпа после различных этапов криоконсервации.

В работе использовали икру и сперму карпа (*Cyprinus carpio*) от инъектированных гипофизом производителей массой 3–4 кг. Осеменение осуществляли “сухим” способом, добавляя к 1 кг икры 5 мл нативной или 20 мл криоконсервированной спермы. Размороженную сперму активировали, одновременно добавляя к икре раствор 50 мМ NaCl в соотношении 1:1. Качест-

во спермы до и после замораживания определяли в активированной сперме визуально под микроскопом при увеличении $\times 200$ по отношению количества клеток, движущихся прямолинейно, поступательно к общему количеству клеток в поле зрения микроскопа и выражали в процентах. Для активации к 50 мкл спермы добавляли 1 мл 50 мМ раствора NaCl. Замораживание-отогрев проводили по методу Е. Ф. Копейки [2] с небольшими изменениями — в криозащитную среду не вводили яичный желток для исключения ошибок в определении макроэргических веществ.

Изучение содержания макроэргических соединений проводили в хлорнокислых экстрактах образцов спермы, которые получали добавляя к 0,5 мл нативной или разбавленной криозащитной средой спермы при 5 °С равный объем 10%-й HClO_4 . Экстракт интенсивно размешивали и погружали в жидкий азот. После размораживания ампулы с экстрактом центрифугировали на холоде 5 мин при 1 000g. Супернатант нейтрализовали 2 М КОН до pH 7,0 и помещали на 15 мин в ледяную баню, а в осадке определяли белок по методу Лоури в модификации Миллера. После инкубации супернатант центрифугировали 5 мин при 1 000g и использовали для определения содержания АТФ и КФ.

Содержание АТФ и КФ определяли ферментативным методом по накоплению НАДФН в системе сопряженных ферментативных реакций в одной кювете, последовательно добавляя следующие ферменты: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФДГ), гексокиназу (ГК) + глюкозу и креатинфосфокиназу (КФК). Определение проводили в следующей среде: 100 мМ *Трис*-HCl, pH 7; 4,1 мМ ЭДТА; 2 мМ MgCl_2 ; 4 мМ НАДФ; 25 ед/мл Г6ФДГ; 5 ед/мл ГК; 0,5 ед/мл КФК [3]. Уровень содержания НАДФН регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Количество АТФ и КФ в пробе выражали в нмоль/мг белка. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента – Фишера и методом парных сравнений с использованием компьютерных программ.

После инкубации клеток в защитной среде было отмечено достоверное увеличение количества АТФ в сравнении с контролем (рис. 1), что, вероятно, может быть объяснено уменьшением количества клеток в суспензии и улучшением их обеспеченности кислородом [8]. Но в размороженной сперме

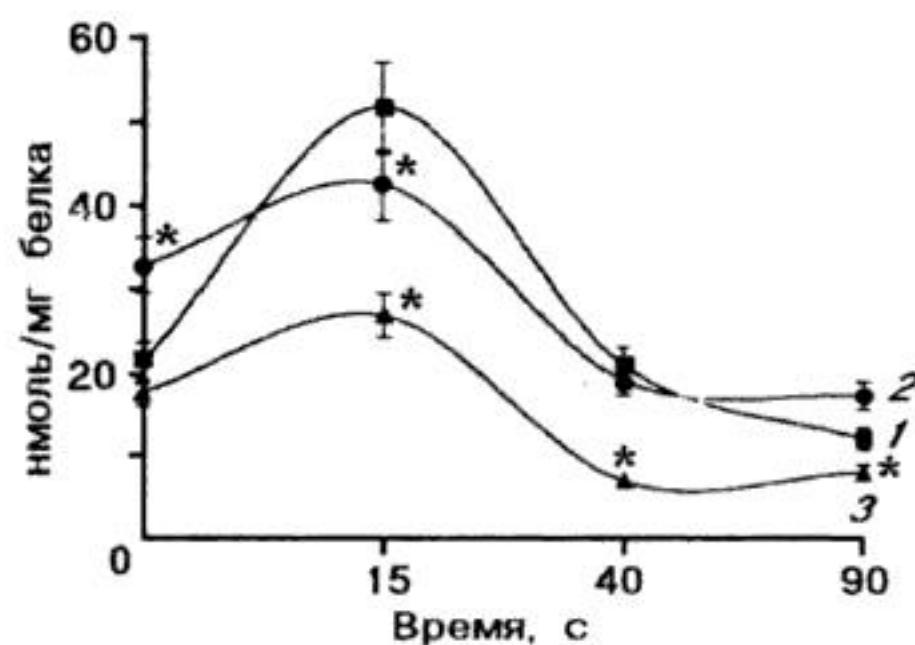


Рис. 1. Изменение содержания АТФ в движущихся сперматозоидах карпа в контроле, после эквilibрации с криозащитной средой и после оттаивания (нмоль/мг белка). * — достоверные различия по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$, $n = 5$. 1 — контроль, 2 — эквilibрация, 3 — оттаивание

количество АТФ перед активацией было достоверно ниже, чем в норме и сперме, разбавленной криозащитной средой. Такое падение содержания АТФ, вероятно, может происходить после фазовых переходов липидов мембран в период медленного охлаждения спермы до точки кристаллизации.

При изучении динамики содержания макроэргических фосфатов в сперме было обнаружено, что в период движения сперматозоидов происходят значительные изменения этих величин. Так, отмечалось достоверное увеличение содержания АТФ к 15-й с движения, после чего происходило снижение этой величины. Однако в работе [9] не

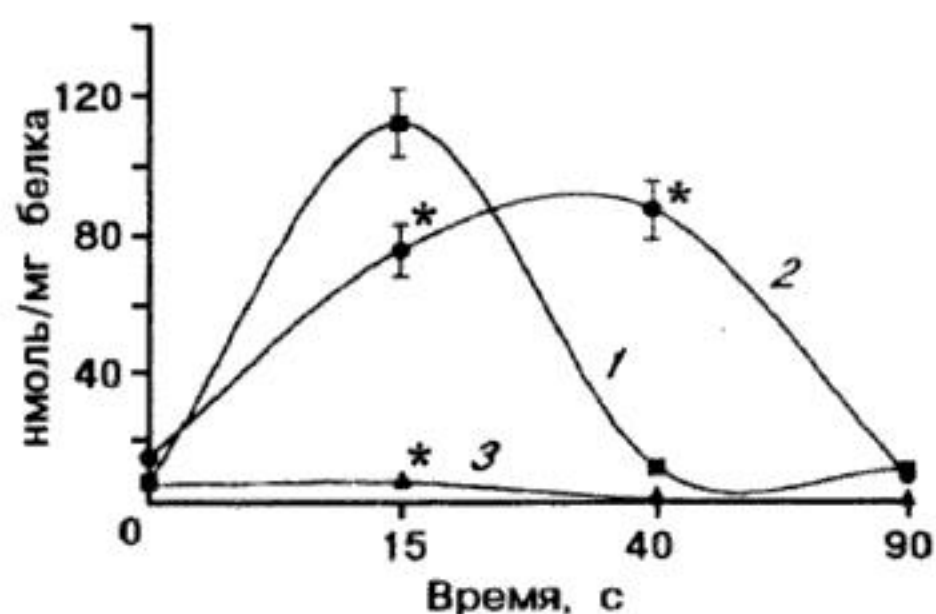


Рис. 2. Содержание креатинфосфата в движущихся спермиях карпа в контроле, после эквilibрации с криозащитной средой и после оттаивания (нмоль/мг белка). * — достоверные различия по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$, $n = 5$. 1 — контроль, 2 — эквilibрация, 3 — оттаивание

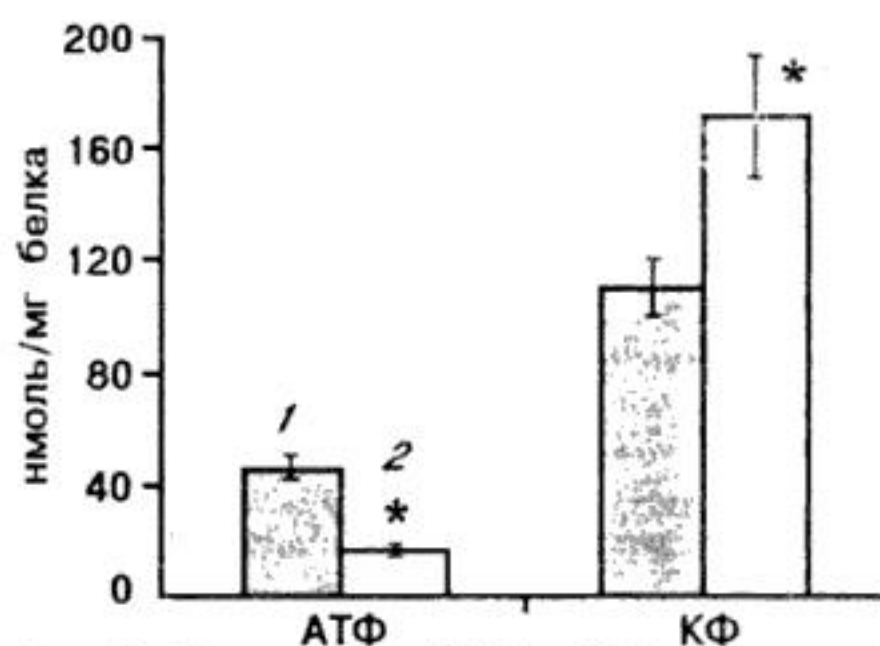


Рис. 3. Содержание АТФ и КФ в оттаянной сперме карпа до и после аэрации (нмоль/мг белка): 1 — до аэрации (контроль), 2 — после аэрации, * — достоверные различия по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$, $n = 5$

было установлено увеличения количества АТФ, вероятно, потому, что авторы определяли ее содержание только через 30 с после активации спермы, тогда как нами уже отмечалось падение содержания АТФ до исходного уровня. На основании этих результатов авторы [9, 10] считают, что у спермиев карпов после активации отсутствует дыхание. Но обнаруженное нами увеличение количества АТФ, вероятно, логично было объяснить, как и в случае со спермой осетровых [1], интенсификацией дыхания спермиев в период их активации. В период движения происходит активное расходование АТФ за счет работы жгутикового аппарата, что в дальнейшем приводит к снижению общего уровня содержания АТФ.

Замораживание-отогрев спермы приводит к достоверному снижению в содержании АТФ в рассматриваемые промежутки движения по сравнению с образцами, активированными после преинкубации в криозащитной среде, что, вероятно, можно объяснить как нарушением процессов синтеза АТФ, так и уменьшением общего количества неповрежденных клеток. Криоконсервация приводила к снижению количества поступательно движущихся клеток в нативной сперме с $80 \pm 10\%$ ($n = 7$) до $30 \pm 10\%$ ($n = 7$) после замораживания-отогрева.

Обнаруженные нами в спермиях карпов креатинфосфат (рис. 2) и изменения в его динамике на разных этапах криоконсервации могут свидетельствовать о его важной роли в подвижности спермиев и большой чувствительности этого показателя к действию повреждающих факторов. Отсутствие накопления КФ в активированной после криоконсервации сперме может свидетельствовать о нарушениях в системе энергообеспечения спермиев. Подтверждением этого может быть и факт замеченного нами снижения интенсивности движения спермиев после криоконсервации. Кроме того, спермии после преинкубации в защитной среде движутся более продолжительное время, чем в норме, что также согласуется с полученным нами данными о более медленном накоплении в этой сперме КФ и о связи его с подвижностью спермиев. Особенно четко видна связь КФ с функциональными характеристиками спермиев в эксперименте, где мы продували через сперму воздух в течение 15 мин сразу после размораживания. За это время происходило увеличение КФ ($P < 0,05$) и снижение содержания АТФ ($P < 0,05$) (рис. 3). Оплодотворяющая способность этой спермы (табл.) увеличивалась на 31% ($P < 0,05$) в

сравнении с неаэрированной. Стимуляция кислородом синтеза КФ свидетельствует о возможном сопряжении его с митохондриальным окислительным фосфорилированием.

Влияние аэрации на оплодотворяющую способность спермы карпа, %

Самец, №	Нативная сперма	Замороженная-оттаянная сперма		
		Без аэрации	Аэрация 5 мин	Аэрация 15 мин
1	90,3	21,3	29,8	30,4
2	81,7	29,3	35,4	40,8
3	89,1	8,2	11,4	14,8
4	87,0	7,4	14,1	16,2
5	86,0	29,0	35,0	47,0
6	82,0	26,8	34,0	34,0

Проведенные нами исследования позволили установить, что

1) в период активации движения спермиев карпа наблюдается эффект увеличения содержания АТФ в 2,5 раза в первые 15 с движения;

2) установлено участие КФ в энергообеспечении движения спермы карпа;

3) преинкубация спермы в криозащитной среде приводит к увеличению содержания АТФ, которое до активации движения достоверно отличается от контроля;

4) криоконсервация приводит к изменению динамики макроэргических соединений, выражающемуся в снижении содержания АТФ и КФ в отогретых образцах спермы до и после ее активации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурнашева С. А. Значение процессов фосфорилирования в осуществлении двигательной функции семенной клетки // В кн.: Фосфорилирование и функция. Тр. института экспериментальной медицины АМН СССР – Ленинград, 1960. – С. 231–242.
2. Копейка Е.Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа. – М.: Изд-во ВНИПРХ. 1986. – 9 с.
3. Методы биохимических исследований/ липидный и энергетический обмен. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та. 1982. – 257 с.
4. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. – К.: Урожай. 1968. – 248 с.
5. Скорняков Б. А., Говоруха Т. П., Копейка Е. Ф. Влияние температурного и осмотического шока на ультраструктуру спермиев карпа // Криобиология. – 1986. – № 1. – С. 21–23.
6. Billard R., Cosson J., Crim L.W. Motility of fresh and aged halibut sperm. Aquat. Living Resour. – 1993. – 6, P. 67–75.
7. Hasan Fakih, Neil Maclusky, Alan DeCherney et al. Enhancement of Human sperm motility and velocity in vitro: effects of calcium and creatine phosphate. Fertility and Sterility. – 1986. – vol. 46. – № 5. – P. 938–944.
8. Kopeika E. F., Drokin S. I., Cherepanov V. V., Dzuba B. B. et al. Oxygen and fish spermatozoa cryoresistance// CRYO-97, 34rd Annual Meeting of the Society-for Cryobiology, 8–12 June, Barcelona, Spain, 1997. – P. 66.
9. Perche G., Chauvaud L., Suquet M., Cosson J., Andre F. et al. Evolution des caracteristiques du mouvement et de la teneur en ATP au cours de la periode de mobilite des spermatozoides de carpe et de turbot, poissons teleosteens// C.R. Acad. Agric. Fr. – 1993. – 79. – P. 117–126.
10. Perche G., Jeulin C., Cosson J. et al. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa// J. of Cell Science – 1995. – 108. – P. 747–753.

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

Поступила 12.08.97

Є. Ф. КОПІЙКА, В. В. ЧЕРЕПАНОВ, Б. Б. ДЗЮБА

АНАЛІЗ ВМІСТУ АТФ І КРЕАТИНФОСФАТУ В СПЕРМІ КАРПА (*CYPRINUS CARPIO*) ДО І ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Ферментативним методом досліджена динаміка вмісту АТФ і креатинфосфату (КФ) в активованій спермі карпа (*Cyprinus carpio*) в контролі, після розбавлення кріозахисним середовищем і заморожування-відігрівання, а також у розмороженій спермі до і після аерації. Установлено порушення процесів утворення АТФ і КФ на різних етапах кріоконсервації. 15-хвилинна аерація розмороженої сперми приводить до збільшення вмісту КФ у спермі до активації і до збільшення її запліднюючої здатності.

E. F. KOPEIKA, V. V. CHEREPANOV, B. B. DZUBA

ATP AND CREATINE PHOSPHATE CONTENT ANALYSIS IN CARP SPERM (*CYPRINUS CARPIO*) BEFORE AND AFTER CRYOPRESERVATION

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

ATP and creatine phosphate (CP) content dynamics was studied by enzyme method in activated carp (*Cyprinus carpio*) sperm in the control, after dilution by cryoprotective medium and freeze-thawing, as well as content of these metabolites in thawed sperm before and after aeration. The impairment in ATP and CP formation processes at different cryopreservation stages has been established. 15-min aeration of frozen-thawed sperm resulted in an increase in CP content in sperm before activation and one in its fertilizing ability.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 57.043

Н.П.Суббота, А.Б.Кебкало

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КСЕНОГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХИ

Показана положительная динамика исследованных биохимических параметров в плазме крови и печени крыс с экспериментальной механической желтухой при внутрибрюшинном введении криоконсервированных гепатоцитов

Увеличение количества больных с механической желтухой (МЖ) определяет необходимость поиска новых методов до- и послеоперационной коррекции функции печени, позволяющих предотвратить развитие тяжелого осложнения данной патологии — острой печеночной недостаточности (ОПечН). Одной из основных задач при лечении ОПечН является поддержание функции печени больного в течение “критического” периода [3]. Такой подход обусловлен значительными резервными возможностями печени для восстановления своих жизненно важных функций. По мнению многих исследователей, наиболее перспективным направлением в лечении печеночной недостаточности является использование клеточной терапии, включающей изолированные свежесыворотные [2, 3, 7] и криоконсервированные (–196 °C) ксеногепатоциты [5, 6, 8].

По данным ряда авторов [1, 4], экстракорпоральное подключение криоконсервированных ксеногепатоцитов (ЭПККГ) как метод детоксикации у больных с МЖ более эффективен по сравнению со стандартной гемосорбцией. Это объясняется следующим образом: при гемосорбции происходит сорб-

ция только средне- и низкомолекулярных веществ, поэтому протезирование детоксикационной функции печени осуществляется не в полном объеме, в связи с чем эффект ее недолговременный. ЭПККГ более эффективно, так как функционально активные гепатоциты протезируют специфические функции печени на клеточном и мембранном уровнях — расщепление крупных молекул в лизосомах, биотрансформация и конъюгация эндотоксинов и ксенобиотиков, конъюгация билирубина в гладком эндоплазматическом ретикулуме, синтез белков, ферментов в гранулярном эндоплазматическом ретикулуме.

Целью работы является изучение эффективности восстановительной функции печени при экспериментальной механической желтухе (ЭМЖ) и использовании в качестве лечебного фактора на этапе реабилитации криоконсервированных гепатоцитов (ККГ).

Опыты проведены на 130 крысах-самцах линии Вистар. ЭМЖ моделировалась перевязкой общего желчного протока (ОЖП). Гепатоциты выделяли по методу Н. П. Субботы [6] и замораживали по традиционной программе, используя 10%-й димексид [5]. Восстановительная функция печени на этапе реабилитации оценивалась по ряду биохимических параметров. В сыворотке крови изучали активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), каталазы, а также определяли уровень общего билирубина, холестерина, белка, липидов. В печени животных определяли уровень малонового диальдегида (МДА). Динамика показателей изучалась через 24, 48, 72 ч. ККГ вводили внутривентально в дозе 0,5 мл на 100 г массы тела (1 мл препарата содержит 20 млн. клеток, из них — 75–80% живых) спустя 24 ч после развития ЭМЖ.

Всего было сформировано 6 экспериментальных групп: 1) интактные животные; 2) животные после перевязки ОЖП без снятия лигатуры (с забоем спустя 24, 48, 72 ч с момента лигирования); 3) животные с перевязанным ОЖП и снятием лигатуры спустя 24 ч с момента перевязки (забой через 24, 48, 72 ч после снятия лигатуры); 4) животные с перевязанным ОЖП и снятой через 48 ч лигатурой (забой через 24, 48, 72 ч после снятия лигатуры); 5) животные после введения ККГ (забой через 1, 2, 3 сут после введения ККГ); 6) животные после перевязки ОЖП (снятие лигатуры спустя сутки, леченные ККГ (забой через 24, 48, 72 ч после введения ККГ).

Проведенные исследования свидетельствуют, что перевязка ОЖП приводит к существенным нарушениям гомеостаза животных (табл., рис. 1, 2). Изменения биохимических показателей при этом зависят от времени снятия лигатуры после развития ЭМЖ.

Через сутки после перевязки ОЖП уровень цитолиза (АлАТ) увеличивается в 2,1 раз, через 48 ч — в 2,4 раза, а спустя 72 ч после лигирования ОЖП — в 3,5 раза. Активность АсАТ мало изменяется в течение наблюдения. Значительные изменения (рис. 2) отмечены при исследовании активности ЩФ: холестаз увеличивается в 10,1; 15,6; 21,2 раза соответственно времени перевязки (24, 48 и 72 ч наблюдений). Уровень липоперекисной дисфункции (активность каталазы в сыворотке крови) повышается при этом в 1,4 раза через 24 ч, в 2,1 раза — через 48 ч, в 2,7 раза — через 72 ч. Изменяется также уровень обменных процессов в плазме крови: показатели общего белка снижаются в 1,8 раза (рис. 1). Аналогичные нарушения показаны для печени (табл.). Отмечена выраженная активация антиперекисных систем: уровень МДА в печени в динамике увеличился через 24, 48 и 72 ч наблюдений в 2,0, 2,7 и 3,1 раза соответственно (табл.). Существенные изме-

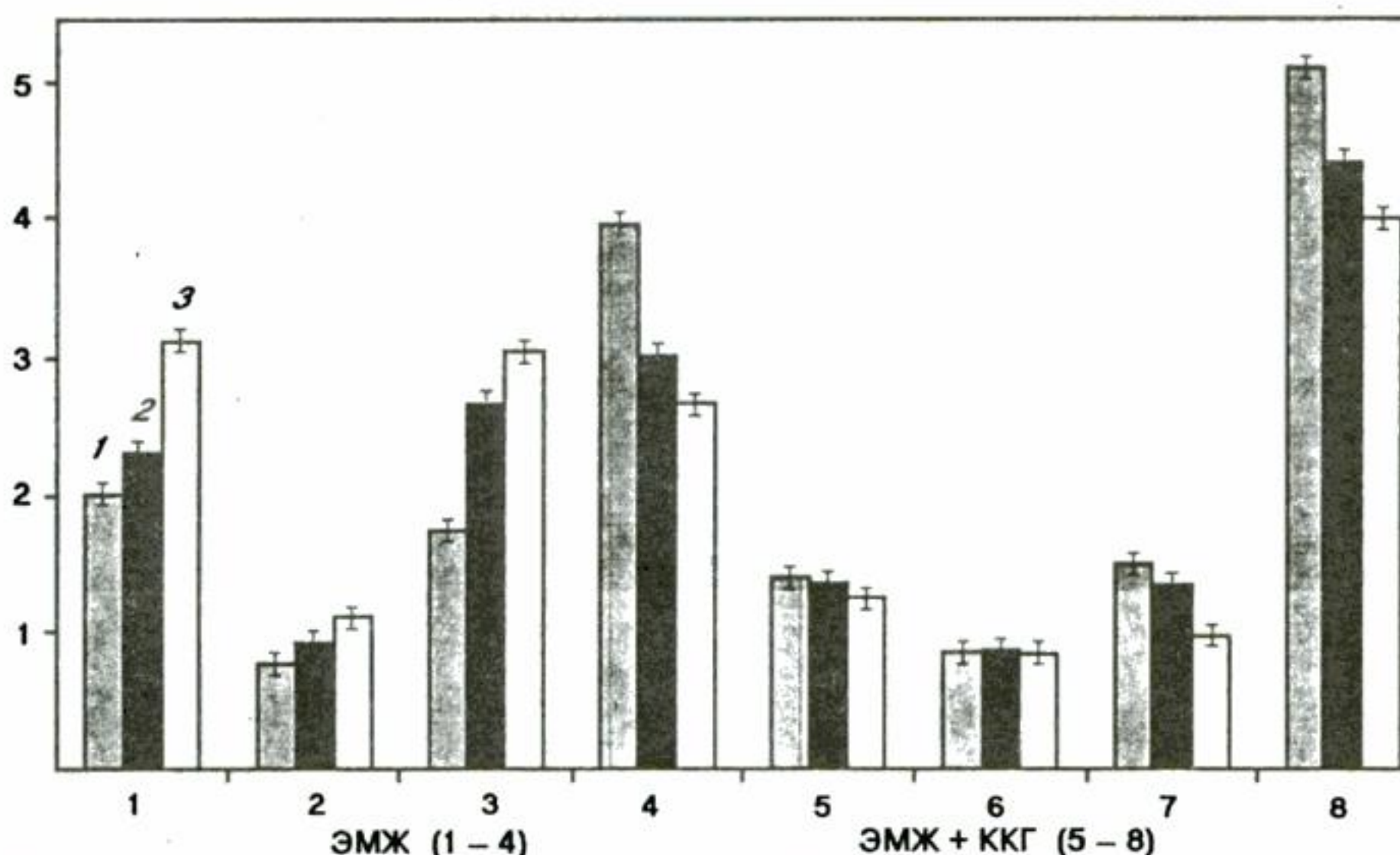


Рис. 1. Активность ферментов плазмы крови крыс при ЭМЖ и после использования в комплексном лечении ККГ: 1 и 5 — АлАт, мкмоль/ч, 37 °С; 2 и 6 — АсАт, мкмоль/ч, 37 °С; 3 и 7 — каталаза, мккат/л; 4 и 8 — белок, мг/%. 1 — 24 ч, 2 — 48 ч, 3 — 72 ч

нения наблюдаются и со стороны пигментного обмена: уровень билирубина и холестерина увеличивается с ростом времени лигирования (рис. 3).

При оценке данных опыта отмечено, что показатели цитолиза, холестаза, липопероксидации, полученные у животных через 48 и 72 ч после снятия лигатуры, мало отличаются от биохимических показателей, полученных у животных с неснятыми лигатурами на 2-е сут лигирования. Анализ результатов перевязки ОЖП с последующим снятием лигатуры через 48 ч и забоем животных показал зависимость полученных результатов от времени. Проведенные сравнительные биохимические исследования плазмы крови и печени двух групп животных, получавших и не получавших криоконсервированные

ксеногепатоциты, свидетельствуют, что изученные параметры практически не отличаются.

Изучение биохимических показателей сыворотки крови и ткани печени животных, леченных с использованием ККГ на фоне перевязки ОЖП, показало наличие их положительной динамики, приводящей к нормализации обменных процессов (табл., рис. 1 и 2). Так, уровень общего белка достигал нормальных величин на 3-и сут после снятия лигатуры, в

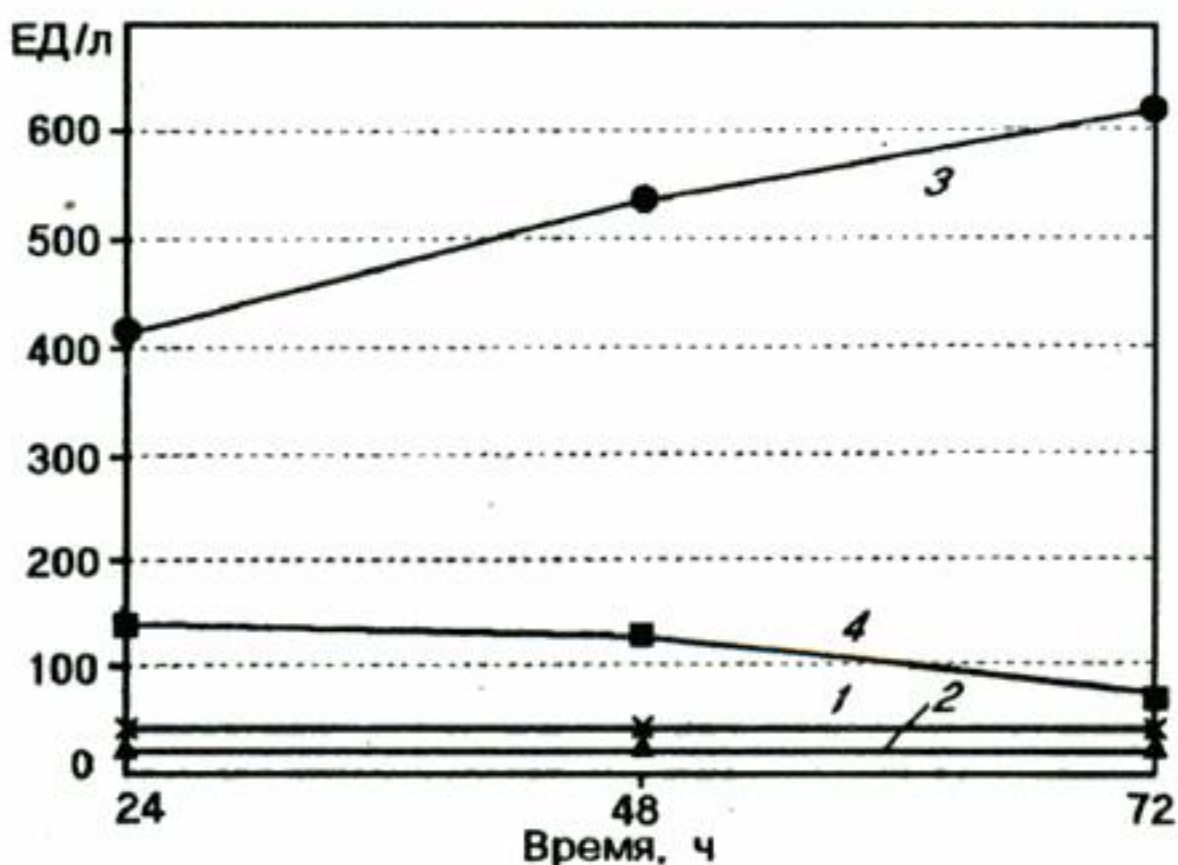


Рис. 2. Динамика показателей ЩФ в плазме крови крыс при различных условиях эксперимента: 1 — контрольная группа, 2 — контрольная группа с введением ККГ, 3 — животные с ЭМЖ, 4 — группа животных с ЭМЖ, леченная с использованием ККГ

то время как у нелеченных животных показатели белкового обмена оставались низкими в течение 72 ч.

Биохимические показатели в печени разных групп животных с ЭМЖ* (n = 13)

№ п/п	Группы животных	Сроки снятия лигатуры после наложения, ч	Сроки забоя животных, ч	СОД, мкмоль/мг б/ч	Каталаза, мкмоль/мг б/ч	Глутатион, мкмоль/мг б/ч	МДА, мкмоль/г
1	Контроль, интактные животные			0,57±0,06	9,97±0,50	2,62±0,18	97,22±5,3
2	Контрольные животные, которым вводились ККГ		24 48 72	0,57±0,05	9,97±0,52	2,62±0,15	97,22±6,0
3	Животные с ЭМЖ		24 48 72	0,34±0,05 0,18±0,02 0,18±0,02	4,44±0,40 3,22±0,40 2,33±0,25	1,67±0,20 1,37±0,15 0,87±0,10	165,73±7,40 207,16±10,0 282,21±10,2
4	Животные с ЭМЖ	24	24 48 72	0,23±0,01 0,29±0,02 0,32±0,02	5,44±0,42 6,34±0,40 7,54±0,45	1,90±0,10 2,37±0,15 2,41±0,15	175,79±8,4 179,84±10,2 162,93±8,0
5	Животные с ЭМЖ	48	24 48 72	0,19±0,02 0,22±0,01 0,26±0,01	3,42±0,30 4,61±0,35 5,99±0,40	1,40±0,08 1,60±0,10 1,83±0,12	207,74±11,2 202,91±10,0 189,91±10,2
6	Животные, которым на фоне ЭМЖ вводили ККГ	24	24 48 72	0,43±0,03 0,40±0,02 0,46±0,25	14,32±0,5 20,87±0,6 14,51±0,5	1,31±0,10 2,11±0,15 1,39±0,10	160,50±8,8 140,13±6,0 105,21±6,0

Примечание. * — достоверность различия (P) между контролем и опытом < 0,05

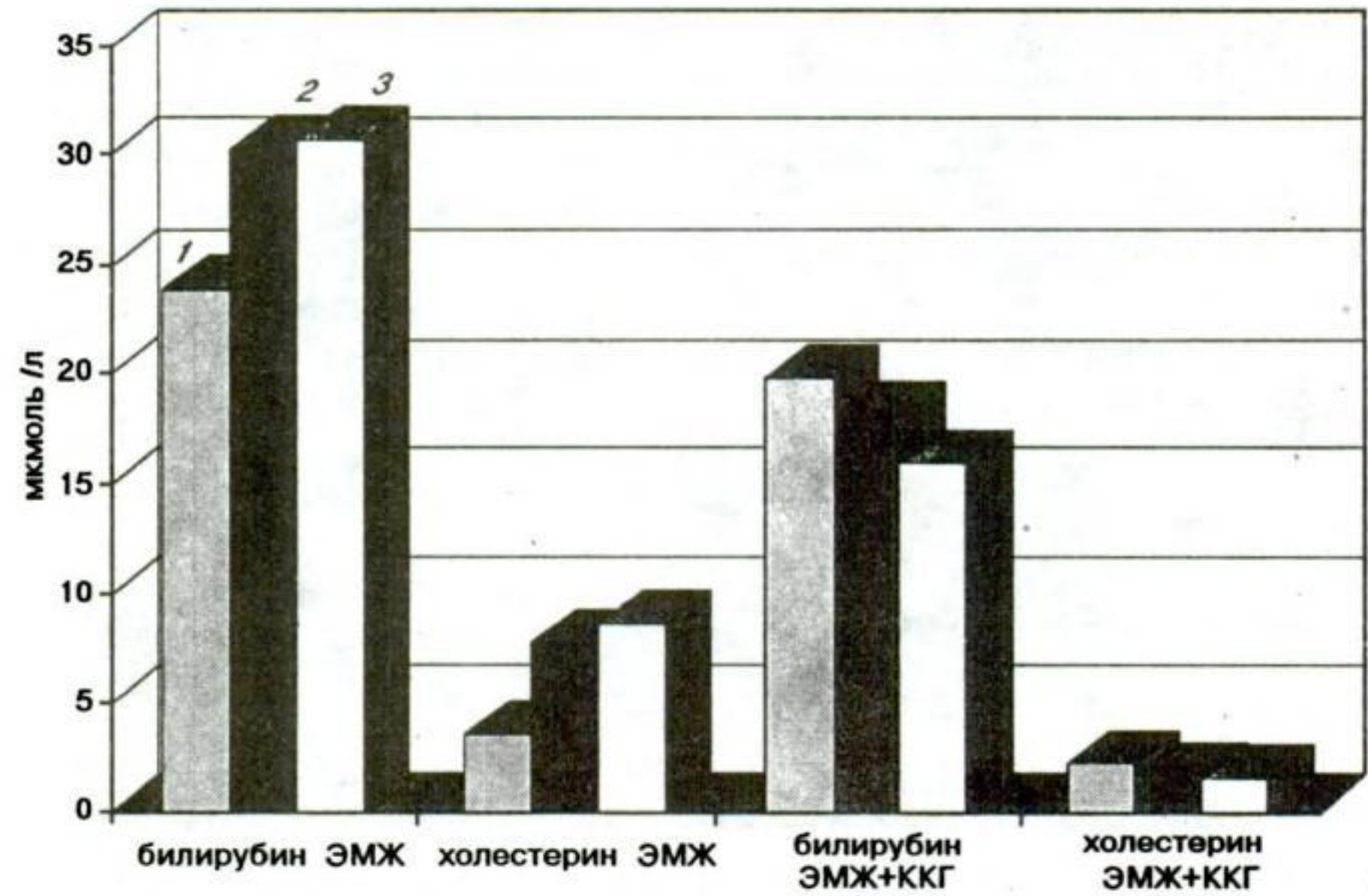


Рис. 3. Динамика общего билирубина и холестерина в группах крыс с ЭМЖ и леченных с использованием ККГ, 1 — 24 ч, 2 — 48 ч, 3 — 72 ч

Исследование динамики влияния ККГ (спустя 48 и 72 ч от введения) на некоторые биохимические параметры в плазме крови, свидетельствующие о функциональном состоянии печени крыс, показало, что отмеченные тенденции сохраняются и для органа. Так, при использовании ККГ уровень АлАТ снижается в 1,4 раза, а интенсивность холестатических проявлений — в 1,5 раза. Аналогичные изменения наблюдаются со стороны пигментного обмена (рис. 3). Подтверждением являются представленные в таблице показатели СОД, каталазы, глутатиона и МДА в печени крыс при различных условиях эксперимента.

Показано, что введение ККГ в указанный период эксперимента оказывает выраженный антиоксидантный и мембраностабилизирующий эффект. Уровень МДА в конце 3-х сут после снятия лигатуры с ОЖП у нелеченных животных был в 2,1 раза выше контрольного, а при использовании ККГ — лишь в 1,2 раза выше нормы (табл.). Следует отметить тот факт, что в группе нелеченных животных прирост МДА сопровождается истощением антиоксидантного потенциала не только гепатоцитов, но и сыворотки крови. Показано, что в группе нелеченных животных активность каталазы на 3-и сут сохраняется повышенной в 1,5 раза по отношению к норме. Применение ККГ позволяет значительно снизить степень поражения антиоксидантных систем организма крыс, нормализовать уровень каталазы (рис. 1). Введение ККГ после снятия лигатуры (на фоне развившейся ЭМЖ) через 24 ч сопровождается снижением активности АлАТ, ЩФ, уровня МДА, нормализацией ряда биохимических показателей. Отмечена положительная динамика со стороны пигментного, белкового и углеводного обменов.

Таким образом, исходя из приведенных экспериментальных данных, можно сделать следующие выводы:

- внутрибрюшинное введение ККГ интактным животным не оказывает существенного влияния на изученные биохимические параметры;
- при ЭМЖ происходят существенные нарушения гомеостаза, о чем свидетельствуют изученные биохимические показатели;
- введение ККГ на фоне ЭМЖ оказывает выраженные антицитолитический, антиоксидантный и мембраностабилизирующий эффекты.
- использование ККГ в комплексном лечении ЭМЖ позволяет в значительной мере ускорить восстановительные процессы в пораженной печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Береснев А. В., Сандомирский Б. П., Тарасов В. П., Велигоцкий А. Н. Технология получения и применения криоконсервированных ксеногепатоцитов для лечения хирургических заболеваний // Использование физических методов в хирургии: Материалы конф. — Харьков, 1991. — С. 6–7.
2. Бруслик В. Г. Гранулы с изолированными клетками печени для детоксикации организма // Сорбционные методы детоксикации и иммунокоррекции в хирургии. — Ташкент, 1984. — С. 241–242.
3. Маргулис М. С., Ерухимов Е. А. Использование изолированных живых гепатоцитов для лечения печеночной недостаточности: Обзор литературы // Хирургия. — 1985. — 3. — С. 150–153.
4. Островерхов Г. Е., Берелавичус В. Ю., Бруслик В. Г. и др. Перитонеальный диализ взвесью аллогенных клеток печени в лечении печеночной недостаточности // Хирургия. — 1979. — 3. — С. 41–46.
5. Суббота Н. П., Белоус А. М. Проблемы криоконсервации гепатоцитов // Криобиология. — 1988. — 3. — С. 21–26.
6. Суббота Н. П. Опыт приоритетных разработок института в области получения и криоконсервирования аллогепатоцитов // Пробл. криобиол. — 1997. — 1–2. — С. 48–54.
7. Makowka L., Rotstein L. E., Falk R. E. et al. Allogeneic and xenogeneic hepatocyte transplantation // Transp. Proc. — 1981. — 13. — 1P12. — P. 855–859.

8. *Rubinsky B., Lee Ch. Y., Bastacky J. et al.* The mechanism of freezing in biological tissue: the liver // *Cryo-Lett.* – 1987. – 78, 6. – P. 370–381.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Киевская мед. академия последипломного образования

Поступила 20.10.97

Н. П. СУБОТА, А. Б. КЕБКАЛО

ВИКОРИСТАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КСЕНОГЕПАТОЦИТІВ ПРИ ЛІКУВАННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МЕХАНІЧНОЇ ЖОВТУХИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків
Київська медична академія післядипломної освіти

Показана позитивна динаміка досліджуваних біохімічних параметрів у плазмі крові і печінці щурів з експериментальною механічною жовтухою при внутрішньо-черевному введенні кріоконсервованих гепатоцитів.

N. P. SUBBOTA, A. B. KEBKALO

APPLICATION OF CRYOPRESERVED XENOHEPATOCYTES IN TREATMENT OF EXPERIMENTAL MECHANICAL JAUNDICE

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

Kiev Medical Academy of Post-Diploma Education

A positive dynamics of the studied biochemical parameters in blood plasma and livers of rats with experimental mechanical jaundice was identified following intraperitoneal injection of cryopreserved hepatocytes.

УДК 616-089.168.1-06-002.3+616.94-08:612.43/47+612.017

С. Д. Шаповал

ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КСЕНОГЕПАТОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ СЕПСИСОМ

Изучена динамика процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной системы (АОС) при сепсисе у 82 больных с гнойно-воспалительными поражениями мягких тканей в возрасте от 18 до 78 лет. Отмечено достоверное увеличение продуктов ПОЛ в сыворотке крови и истощение антиоксидантной защиты как до, так и после оперативного вмешательства. Для коррекции нарушений, наблюдаемых в системе ПОЛ-АОС, рекомендуется применять экстракорпоральное подключение ксеногепатоцитов, которое было эффективным в 84% наблюдений.

Проблема сепсиса и новых подходов в его лечении интенсивно разрабатывается как в нашей стране, так и за рубежом [1, 3, 8]. В последние годы в клинической практике проводится более глубокое изучение роли ПОЛ и антиоксидантной системы (АОС) в патогенезе острых хирургических и гнойно-воспалительных заболеваний [2, 4, 5, 6, 9]. Однако сообщения о характере изменений ПОЛ и АОС, коррекции их нарушений при сепсисе, причиной которого являются гнойно-воспалительные процессы мягких тканей, единичны [7].

Целью исследования были изучение основных показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы при сепсисе у больных с гнойно-воспалительными процессами мягких тканей до и после хирургического лечения и коррекция выявленных нарушений с помощью экстракорпорального подключения криоконсервированных ксеногепатоцитов (ЭПККГ) на 7–10 сут после операции.

В работе использованы гепатоциты, выделенные коллагеназным методом из печени новорожденных поросят и криоконсервированные в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков) под ру-

ководством докт. биол. наук Н. П. Субботы [7]. Для экстракорпорального подключения использовали криоконсервированные гепатоциты с жизнеспособностью не менее 75%, определенной по окраске с трипановым синим.

Обследовано в динамике 82 больных сепсисом в возрасте от 18 до 78 лет (47 мужчин, 35 женщин). Наиболее частой причиной гнойной хирургической инфекции у обследуемых больных были флегмоны мягких тканей (93,9% наблюдений). Состояние процессов ПОЛ оценивалось на основании изучения первичных и вторичных продуктов: диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, шиффовых оснований. Диеновые конъюгаты определяли по методу В. Б. Гаврилова, 1988. Гидроперекиси липидов (ГПЛ) экстрагировали из сыворотки смесью гептан-изопропиловый спирт. В качестве ингибитора свободнорадикального окисления липидов при взятии крови использовали ЭДТА (1 мг/мл). Результаты измерений выражали в относительных единицах оптической плотности на 1 мл сыворотки крови. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли в реакции с 2-тиобарбитуловой кислотой по образованию окрашенного триметинового комплекса. Полученные данные рассчитывали на 1 мл сыворотки (Я. И. Андреева и др., 1988) и выражали в мкмоль/л. Шиффовые основания (ШО) определяли на спектрофлуориметре (A. S. Csallamy, K. J. Ayar, 1976) в условных единицах. Результаты сопоставлялись с уровнем общих липидов (ОЛ) в сыворотке крови, которые определялись с использованием стандартных наборов реактивов производства фирмы "Lacken" (Чехия). Оптическую плотность окрашенного комплекса измеряли на спектрофотометре, результат выражали в г/л.

О состоянии антиокислительных механизмов судили по уровню витаминов А, Е и С, активности каталазы (КТ), медьсодержащего белка церулоплазмина (ЦП). Витамины А и Е определяли по методу Thompson и соавт., 1973 в модификации Р. Г. Черноускене и соавт., 1988, витамин С — методом S. C. Farmer, A. F. Abt, 1936 в модификации Т. И. Лариной и соавт., 1987. Результаты выражались в мкмоль/л; активность каталазы — методом М. А. Королук и соавт., 1988 — в мкат/л; церулоплазмин — унифицированным методом Ревика в модификации С. В. Бестужева и В. Г. Колба, 1976 — в мкмоль/л. Результаты исследований обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия Фишера-Стьюдента и корреляционного анализа.

Исследования проведены до и после хирургического лечения (на 7-е, 10–14-е сут) и перед выпиской. Полученные результаты представлены в таблице.

Установлено, что у больных сепсисом уже при поступлении имеется значительная активация реакции пероксидации, которая, несмотря на проведенное оперативное лечение, продолжает усугубляться, достигая своих максимальных величин к 7-м сут послеоперационного периода. Клинически эти изменения соответствуют пику заболевания. В период стабилизации болезни, на 10–14-е сут отмечалось отчетливое снижение интенсивности реакций ПОЛ ($P < 0,01$). К моменту выписки, несмотря на клиническое выздоровление, гидроперекиси нормализовались лишь в 6,1% наблюдений.

Количество общих липидов было значительно снижено как при поступлении, так и в период максимального проявления патологии ($P < 0,001$). К моменту стабилизации заболевания количество ОЛ в 2,1 раза было ниже контрольных величин, что свидетельствует о значительном нарушении клеточного метаболизма и резком снижении функциональной активности лей-

коцитов. Изучение вторичных продуктов пероксидации — МДА и ШО показало, что накопление их увеличивается вплоть до момента стабилизации заболевания и медленно уменьшается по мере выздоровления, оставаясь достоверно ($P < 0,001$) выше нормы при выписке. Интенсивное снижение концентрации продуктов ПОЛ (часто ниже нормальных величин), происходящее в течение 1–2 сут, свидетельствует о глубоких необратимых деструктивных процессах в биологических мембранах и наблюдалось при развитии бактериального шока и летальном исходе. Антиоксидантная система обеспечивает постоянство низкого уровня свободных радикалов в клетке. Несостоятельность АОС, даже кратковременная, вызывает существенные сдвиги в гомеостатических процессах, о чем свидетельствуют данные, приведенные в таблице.

Показатели ПОЛ и АОС у больных сепсисом ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа ($n = 27$)	Величина показателя			
		перед операцией ($n = 82$)	7-е сутки ($n = 73$)	10–14-е сутки ($n = 64$)	25–26-е сутки ($n = 53$)
ГПЛ-233	$3,51 \pm 0,24$	$6,27 \pm 0,73$	$8,52 \pm 1,32$	$5,46 \pm 0,68$	$4,21 \pm 0,32$
ГПЛ-233 на 1 мг/л	$1,03 \pm 0,02$	$2,28 \pm 0,24$	$2,47 \pm 0,21$	$2,17 \pm 0,43$	$1,08 \pm 0,14$
ГПЛ-273	$0,65 \pm 0,07$	$1,58 \pm 0,42$	$1,78 \pm 0,53$	$1,53 \pm 0,32$	$0,76 \pm 0,16$
ОЛ	$6,64 \pm 0,41$	$4,24 \pm 0,52$	$3,63 \pm 0,41$	$3,19 \pm 0,39$	$3,93 \pm 0,32$
МДА	$10,45 \pm 0,42$	$18,57 \pm 0,54$	$26,22 \pm 1,33$	$15,43 \pm 1,03$	$12,54 \pm 0,43$
ШО	$7,20 \pm 0,82$	$15,47 \pm 1,73$	$22,39 \pm 1,45$	$11,56 \pm 0,62$	$9,32 \pm 0,87$
КТ	$26,66 \pm 1,91$	$14,72 \pm 1,74$	$16,65 \pm 1,09$	$17,36 \pm 1,41$	$22,64 \pm 0,89$
Вит. С	$83,46 \pm 3,18$	$46,21 \pm 2,48$	$48,76 \pm 2,33$	$63,34 \pm 3,12$	$74,32 \pm 2,23$
Вит. А	$2,39 \pm 0,16$	$1,87 \pm 0,43$	$1,84 \pm 0,21$	$1,86 \pm 0,22$	$2,36 \pm 0,16$
Вит. Е	$18,79 \pm 0,73$	$15,35 \pm 0,48$	$13,34 \pm 0,64$	$15,66 \pm 0,54$	$18,56 \pm 0,76$
ЦП	$1,24 \pm 0,05$	$2,21 \pm 0,24$	$2,28 \pm 0,49$	$2,11 \pm 0,65$	$1,39 \pm 0,16$

Таким образом, сравнительные результаты исследования системы ПОЛ – АОС и оценки ее функционального состояния у больных сепсисом свидетельствуют об угнетении активности антиоксидантной системы и интенсификации у них переоисления липидов. Эти изменения служат патогенетической основой многочисленных осложнений и требуют проведения специальных коррекционных лечебных и профилактических мероприятий.

Для коррекции выявленных нарушений в системе ПОЛ – АОС были использованы в обычных лечебных дозах: токоферола ацетат, эссенциале, си-репар, трентал, пентиллин, пентоксифиллин (в таблице — контрольная группа). Участвуя в поддержании структурно-функциональной устойчивости клеточных мембран, эти препараты обеспечивают высокий уровень клеточных органелл, ферментов клеток и организма в целом.

Отмечено, что при применении медикаментозных корректоров в разгар болезни на интенсивность реакций ПОЛ влияло несущественно. В динамике мембранотропной терапии к моменту стабилизации заболевания отмечалось достоверное ($P < 0,01$) снижение концентрации первичных и вторичных продуктов ПОЛ, но недостаточное для полной нормализации указанных параметров. Более значительное снижение интенсивности реакций ПОЛ отмечено у больных, для лечения которых использовали мембраностабилизирующие средства одновременно с экстракорпоральными методами детоксикации

(гемосорбция, плазмаферез, криоконсервированные ксеногепатоциты — ЭПККГ и т.п.). Однако при применении гемосорбции и плазмафереза наиболее частым осложнением являлся эффект Бартрина (эффект 1-х сут), когда в связи с уменьшением вязкости крови и гиперкоагуляционного синдрома происходил массивный выход из гнойного очага микроорганизмов и их токсинов, что повышало тяжесть интоксикации вплоть до септического шока. По нашим данным, ЭПККГ таким эффектом не обладает.

После осуществления одного сеанса ЭПККГ на следующие сутки отмечены достоверное ($P < 0,001$) снижение первичных и вторичных продуктов ПОЛ и активация АОС. К моменту стабилизации заболевания (на 10–14-е сут) прослеживалась отчетливая тенденция к нормализации исследуемых показателей, а при выписке больных из стационара показатели ПОЛ – АОС не отличались от контрольных величин ($P < 0,05$). Клиническая эффективность метода составила 84%, в 16% наблюдений она оказалась низкой из-за недостаточности санации первичного очага.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что развитие сепсиса у больных с гнойно-воспалительными процессами мягких тканей во многом зависит от конкретного состояния свободнорадикального окисления липидов, выступающих в роли регуляторного механизма воспалительной реакции, изменяющего проницаемость клеточных мембран на тканевом, клеточном и организменном уровнях. ЭПККГ является эффективным методом коррекции выявленных нарушений в системе ПОЛ – АОС и может быть рекомендовано в системе комплексного лечения сепсиса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куйбида А. И., Бех Н. Д., Колесник Л. М. и др. Комплексная интенсивная терапия сепсиса // Конференция анестезиологов и реаниматологов Украины. – Запорожье, 1992. – С. 157.
2. Лынев С. Н., Туманян С. В., Алекперов Н. В. и др. Регуляция липидов при гнойно-септических заболеваниях // Хирургия. – 1990. – 6. – С. 55–59.
3. Малиновский Н. Н., Решетников Е. А., Шипилов Г. Ф. и др. Иммунотерапия хирургического сепсиса // Хирургия. – 1997. – 1. – С. 4–8.
4. Москаленко В. З., Веселый С. В., Турсунова Ю. Д. и др. Динамика индукторов стресса, показателей перекисного окисления липидов и компонентов антиоксидантной системы у детей с острыми хирургическими заболеваниями органов брюшной полости // Клін. хірургія. – 1996. – 7. – С. 29–32.
5. Подільчак М. Д., Макар Д. А., Огоновський В. К., Кордоба Б. М. Перекисне окислення ліпідів та активність пероксидази сироватки крові у хворих з гнійно-запальними ураженнями // Клін. хірургія. – 1995. – 2. – С. 11–12.
6. Светухин А. М., Карлов В. К., Жуков А. Д. Ключевые вопросы патогенеза сепсиса // Хирургия. – 1992. – 7–8. – С. 8–13.
7. Суббота Н. П. Опыт приоритетных разработок института в области получения и криоконсервирования аллогепатоцитов // Пробл. криобиол. – 1997. – 1–2. – С. 48–54.
8. Farthmann E. H., Schoffel U. Pathophysiologie der Sepsis // Chirurg. Gastroenterol. – 1994. – Bd. 1. – S. 8–13.
9. Inthorn D., Steitz H. O. Intensivmedizinische überwachung bei sepsis // Chirurg. Gastroenterol. – 1994. – Bd. 1. – S. 52–57.

Запорожский ин-т усовершенствования врачей

Поступила 29.09.97

С. Д. ШАПОВАЛ

ЗАСТОСУВАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КСЕНОГЕПАТОЦИТІВ У ХВОРИХ СЕПСИСОМ

Запорізький інститут удосконалення лікарів

Вивчена динаміка процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантної системи (АОС) при сепсисі у 82 хворих з гнійно-запальними ураженнями м'яких тканин у віці від 18 до 78 років. Відмічено достовірне збільшення продуктів ПОЛ у сироватці крові та виснаження антиок-

сидантного захисту як до, так і після оперативного втручання. Для корекції порушень, які спостерігаються в системі ПОЛ-АОС, рекомендується застосовувати екстракорпоральне підключення ксеногепатоцитів, яке було ефективним у 84% спостережень.

S. D. SHAPOVAL

APPLICATION OF CRYOPRESERVED XENOHEPATOCYTES IN SEPTIC PATIENTS

Zaporozhie Institute for Advanced Training of Physicians

There was studied the dynamics of the processes of lipid peroxidation (LPO) and antioxidative system (AOS) during sepsis in 82 patients (aged 18-78) with pyoinflammatory injuries to soft tissues. A significant increase in the LPO products in blood serum and depletion of the antioxidative defense both prior to and after the operative intervention were reported. To correct the disorders, identified in a LPO-AOS system, the authors recommend to apply extracorporeal usage of xenohepatocytes, medicamentous realization of which was effective in 84% of cases.

УДК 618.177.-08:615.832.9

Н.Ю.Спиженко

ЛЕЧЕНИЕ ПАТОЛОГИИ ШЕЙКИ МАТКИ МЕТОДОМ КРИОДЕСТРУКЦИИ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ КОНДОМТЕРАПИЕЙ ПРИ БЕСПЛОДИИ

Разработан метод лечения "шеечного" бесплодия, связанного с наличием антиспермальных факторов в слизи цервикального канала матки. Обследованы 78 женщин, страдающих бесплодием; у 56 из них были обнаружены антиспермальные антитела в секрете шейки на фоне патологии шейки матки. Показано, что применение криодеструкции патологического очага на шейке матки с последующей кондомтерапией приводит к возникновению или значительному снижению титра антиспермальных антител у пациенток и ведет к возникновению беременности у 30,6% из них.

Проблема бесплодия в семье относится к наиболее актуальным медико-социальным аспектам охраны здоровья. Бесплодный брак является одним из факторов, оказывающих неблагоприятное влияние на уровень рождаемости и прирост населения, что весьма важно в условиях значительного снижения рождаемости на Украине [1]. В последние годы значительное внимание уделяется иммунному фактору бесплодия, частота которого среди всех причин нарушения репродуктивной функции составляет 10–12% [4]. Согласно данным литературы, ведущее значение в развитии иммунного бесплодия играет шеечный фактор, т.е. функциональное состояние шейки матки и слизи цервикального канала [6, 7], наличие антиспермальных антител в секретах женских половых органов [3, 8]. Патология шейки матки является одним из наиболее частых гинекологических заболеваний [2]. Роль иммунного фактора при указанной патологии и, в частности, при бесплодии не изучена.

Целью работы явилось выявление распространенности иммунных нарушений у женщин, страдающих бесплодием, связи данной патологии с заболеваниями шейки матки, а также разработка метода коррекции указанных расстройств.

Под нашим наблюдением в течение 2 лет находилось 78 бесплодных супружеских пар. Контрольную группу составили 30 супружеских пар с сохраненной репродуктивной функцией, обратившихся для выбора метода контрацепции (1-я группа). Среди 78 бесплодных женщин у 22 не наблюдалось патологических изменений шейки матки (2-я группа), у 56 — обнаружены доброкачественные и предраковые заболевания шейки матки (3-я группа).

После исключения неиммунных факторов бесплодия производилось исследование антиспермальных спермоиммобилизирующих антител (СИАТ)

по Изоджиму [5]. СИАТ не определялись в цервикальной слизи здоровых фертильных женщин 1-й группы. При бесплодии неясного генеза у пациенток 2-й группы антиспермальные антитела определялись в 63,6% случаев. При сочетании бесплодия с патологией шейки матки (3-я группа) СИАТ выявлены у 82,1% больных ($p < 0,05$). При этом следует учесть, что у пациенток 3-й группы, наряду с ростом частоты выявляемости СИАТ, обнаружено достоверное возрастание их концентрации ($p < 0,01$).

Нами проведено лечение патологии шейки матки методом криодеструкции с индивидуальной программой криовоздействия для каждой пациентки. Индивидуальный контроль за параметрами криовоздействия возможен только при использовании базовой криогенной аппаратуры с автоматизированным управлением. Данным требованиям отвечает установка "Криоэлектроника-4". Конструктивные особенности аппарата позволяют выбрать температуру в пределах от 0 до -196°C , установить необходимое время криовоздействия и быстро заморозить патологические ткани, что дает возможность получить необходимую зону крионекроза. При этом значительно укорачивается длительность болевых ощущений у пациенток во время проведения процедуры, которые значительны при увеличении экспозиции криовоздействия [D. M. Harper, 1994]. К преимуществам аппарата относится также прилагаемый комплект сменных аппликаторов различной формы. Их можно условно разделить на 3 класса: повторяющие форму шейки матки с заходом в цервикальный канал для деструкции поражений по всей поверхности органа, цилиндрические разных размеров, предназначенные для криодеструкции островковых поражений, и различной конусной формы, применяемые для крионизации. Возможность выбора формы аппликатора позволяет осуществить криовоздействие в пределах здоровых тканей, облегчает подход к патологическому очагу, что значительно повышает эффективность лечения. Для лечения легкой и умеренной форм дисплазии применялось однократное замораживание патологически измененных тканей до температуры $-125 \div -150^{\circ}\text{C}$ со скоростью охлаждения рабочей части аппликатора $75-100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Замораживание продолжали до расширения фронта льда примерно на 3–5 мм за пределы очага дисплазии, что соответствует температуре ниже -20°C на границе пораженной области.

Для лечения тяжелых форм дисплазии использовали двухмоментное замораживание. Температура криоаппликатора при этом снижалась до $-150 \div -170^{\circ}\text{C}$. Между двумя замораживаниями шейку матки осматривали с помощью кольпоскопа для определения неохваченной части поражения. Островковые поражения эпителия шейки матки замораживали по участкам, используя аппликатор нужной формы.

При наличии на шейке матки ретенционных кист их необходимо непосредственно перед криодеструкцией вскрыть скальпелем на глубину от 1 до 2 см и стерильным ватным тампоном удалить содержимое кист. Полость кисты при этом спадается, и к месту поражения плотно прикладывается аппликатор необходимой формы. Температура наконечника снижается до $-140 \div -160^{\circ}\text{C}$, экспозиция составляет 1 мин.

Через 12 недель после криохирургического лечения определяли в цервикальном секрете концентрацию антиспермальных антител. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности предложенного нами способа лечения. После криодеструкции антиспермальные антитела определялись

только у 2 ($10,5 \pm 7,0\%$) из 19 пациенток 2-й группы и у 3 ($5,8 \pm 4,2\%$) из 52 пациенток 3-й группы, что достоверно ниже, чем до лечения ($p < 0,001$). Следует отметить, что в случае присутствия антиспермальных антител в слизи цервикальной слизи их концентрация не превышала 1:8 во второй и 1:18 в третьей группах больных.

Полученные результаты исследования позволили разработать метод лечения "шеечного" бесплодия, связанного с наличием антиспермальных антител в слизи цервикального канала. Метод заключается в криодеструкции патологического очага на шейке матки с помощью аппарата "Криоэлектроника-4" и последующей кондомтерапией в течение 6–9 мес.

В продолжение 2 лет после лечения мы наблюдали 16 супружеских пар из 2-й группы и 46 — из 3-й. Беременность наступила у 5 (31,2%) и у 14 (30,4%) женщин из соответствующих групп. Всего наблюдалось 62 пары с бесплодием, беременность наступила у 19, что составляет 30,6%. Тем женщинам, у которых бесплодие не излечилось данным методом, рекомендована искусственная инсеминация.

Среди забеременевших женщин оплодотворение произошло через 2–3 мес после начала половой жизни без презерватива у 5, через 3–4 мес — у 10, через 5–6 мес — у 3, через 7–8 мес — у 1-й. У большинства женщин беременность протекала без осложнений. У 3 пациенток отмечена угроза прерывания беременности: в 7–8 недель у 1, в 12–13 — у 1, в 24–25 — у 1, ранние гестозы — у 4, поздние гестозы — у 2, анемия беременных — у 5. У 15 женщин беременность завершилась своевременными родами, все родили живых доношенных детей. У 2 пациенток произошли преждевременные роды, один недоношенный ребенок массой 1 800 г умер в результате пневмопатии. У 2 пациенток произошел самопроизвольный аборт в сроки 8–9 и 12–13 недель.

Таким образом, у бесплодных женщин с наличием антиспермальных антител в цервикальном канале криохирургический метод лечения позволил устранить или снизить их титр более чем у 90% пациенток. Беременность наступила у 30,6% из них, что свидетельствует о высокой эффективности этого метода в сочетании с кондомтерапией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вовк І. Б., Летиція ван дер Перк. Проблеми планування сім'ї в Україні // Педіатрія, акушерство та гінекологія. — 1995. — 2. — С. 33–35.
2. Запорожан В. М., Безпоясна В. В., Мостовий В. В. Комплексне кріохірургічне поєднано з КВЧ-впливом лікування гіперпластичних процесів шийки матки // Педіатрія, акушерство та гінекологія. — 1996. — 3. — С. 48–50.
3. Bielfeld P., Mettler L. Immunologischbedingte Sterilität unter Berücksichtigung weiblicher und männlicher Faktoren // Gynäkologie. — 1990. — Bd. 14, 3. — S. 145–150.
4. Frendl G. Antikörper und Sterilität // Gynäkol. Prax. — 1990. — Bd. 14, 3. — S. 479–488.
5. Isojima S. // Arch. Androl. — 1989. — 23, 3. — P. 185–199.
6. Litshgin M. Zervix Faktor // Ther. Umschau. — 1987. — Bd. 44, 5. — S. 358–368.
7. Quereux C., Desrochas A., Wahl P. Les glaires hostiles et insuffisantes // Gynecologie. — 1987. — 33, 1. — P. 28–33.
8. Shulman S. Sperm antibody laboratory, fertility antibody diagnostics // Immunology of Reproduction. — International Symposium. — Kiev, 1996. — P. 3.

Киевский национальный мед. ун-т им. А. Богомольца

Поступила 10.09.97

Н. Ю. СПІЖЕНКО

ЛІКУВАННЯ ПАТОЛОГІЇ ШИЙКИ МАТКИ МЕТОДОМ КРІОДЕСТРУКЦІЇ З НАСТУПНОЮ КОНДОМТЕРАПІЄЮ

Київський національний медичний університет ім. О.Богомольця

Розроблений метод лікування шийкової безплідності, пов'язаної з наявністю антиспермальних факторів у слизоті цервікального каналу матки. Обстежені 78 жінок, які страждають безплідністю; у 56 з них було виявлено наявність антиспермальних антитіл у шийковому секреті на фоні патології шийки матки. Показано, що застосування кріодеструкції патологічного вогнища на шийці матки з наступною кондомтерапією приводить до зникнення або значного зниження титру антиспермальних антитіл у пацієнток і веде до виникнення вагітності у 30,6% з них.

N. YU. SPIZHENKO

TREATMENT OF A PATHOLOGY OF THE NECK OF THE UTERUS USING CRYODESTRUCTION FOLLOWED BY A CONDOM THERAPY

Kiev National Medical University named by A. Bogomolets

The author developed a method of treatment of the uterine infertility, related to the availability of the antispermal factors in the mucus of the uterine cervical channel. Seventy-eight female patients, suffering from infertility, were examined; in 56 patients out of them the availability of the antispermal antibodies was identified in the secretion of the neck, accompanied by a pathology of the neck of the uterus. Application of cryodestruction of a pathological focus in the neck of the uterus with subsequent condom therapy was shown to result in the development of or significant reduction in the titer of the antispermal antibodies in female patients, thus facilitating pregnancy occurrence in 30.6% of them.

УДК 617.582-089.873-06-084

О.Б.Зарицький

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГІЧНЕ ТА КЛІНІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ КРІОХІРУРГІЧНИХ СПОСОБІВ ПОПЕРЕДЖЕННЯ УСКЛАДНЕНЬ ПРИ АМПУТАЦІЇ СТЕГНА

Представлено топографо-анатомічні (53 трупи людей), експериментальні (130 білих щурів і 50 собак) і клінічні (40 хворих) дані по вивченню причин виникнення больового синдрому при різних методах обробки нервів і їх стан у культі в різні строки (до 12 років після ампутації стегна). Виявлені осередки невриту і розростання сполученої тканини, яка стискає нервові волокна в культі, при виконанні традиційних способів ампутації дозволили зрозуміти механізм травмування нервових стовбурів і розробити ефективний метод профілактики пов'язаних з цим ускладнень. Запропонований спосіб ампутації стегна дозволяє зменшити кількість хворих з больовим синдромом на 59,4 %.

Робота ґрунтується на секційних дослідженнях 53 трупів людей, експериментальних — на 130 білих щурах та 50 собаках, а також історіях хвороби 40 хворих, які перенесли 44 ампутації в хірургічних відділеннях Донецького обласного лікувально-клінічного об'єднання за 1983–1993 рр.

Розробка способу ампутації стегна з пошаровим розтином тканин, одноразовою обробкою судинно-нервових пучків по ходу розрізу з використанням рідинного азоту та нових інструментів для невротомії, анатомічні та експериментальні дослідження проводились на кафедрі оперативної хірургії з топографічною анатомією Донецького державного медичного університету.

За даними наших анатомічних досліджень виявлено варіантні особливості судинно-нервових пучків стегна, врахування яких можуть допомогти хірургам в атравматичній обробці, що особливо важливо при пошаровій ампутації стегна без використання жгута та ретрактора. Так, у 2-х випадках стегова вена знаходилась не в судинній лакуні, а під глибоким листком особистої фасції. Медіально в судинній лакуні розташовувалась лише стегова артерія, що могло привести до серйозної помилки хірурга в умовах обмеженого опе-

ративного доступу. Глибока артерія стегна не завжди відходила від стегнової артерії; у 4 випадках — від поверхневої клубової над пупартовою зв'язкою, у 7 випадках — на рівні зв'язки.

Нами вперше виявлена цікава закономірність (підтверджена статистично), коли при низькому рівні утворення глибокої стегнової артерії (нижче 5,5 см від пупартової зв'язки) огинаючі стегнову кістку артерії формувались із стегнової артерії; якщо глибока стегнова артерія відходила вище рівня 4,5 см донизу від пупартової зв'язки, 98,1 % огинаючі артерії відходили від неї.

При дослідженні особливостей будови гунтерова каналу перш за все звернула на себе увагу та обставина, що передньою його стінкою не завжди була апоневротична пластинка, яка в 21 випадку була повністю відсутня, а на її місці розташовувалась щільна жирова клітковина, ще у 12 випадках вона була присутня лише фрагментарно.

Нами з'ясовано, що схований нерв єдиним стовбуром залишав канал разом з низхідними колінними судинами лише у 19 випадках, ще у 7 випадках — на 0,5–0,8 см нижче судин. Частіше схований нерв у каналі поділявся на дві (78 випадків) чи три гілки (2 спостереження), одна з них залишала канал паралельно судинам, а інші — значно нижче. Причому у 18 випадках — нижче нижнього отвору каналу.

Підчас аналізу наших функціональних досліджень виявилось, що у процесі виконання ампутації у щурів при розтинанні шкіри скальпелем амплітуда коливальної реакції (АКР) збільшилась у середньому на 27,9 %, а її частота (Ч) перебільшувала попередню на 15,5 %. У собак при цьому виявлено ще більше зростання АКР (45 %) та частоти (20 %).

При розтинанні шкіри запропонованим нами скальпелем із зйомним побутовим лезом АКР збільшилась у середньому у щурів на 3 %, у собак — на 1 %. Частота зменшилась у щурів на 5 %, у собак — на 1 %.

При перетинанні м'язів скальпелем чи ампутаційним ножом АКР у щурів збільшилась на 43 %, у собак — на 58 %. Частота зросла у щурів на 109 %, у собак — на 114 %.

Розтинання м'язів запропонованим скальпелем суттєво зменшувало травматичність цього етапу операції. Так, АКР у порівнянні з попереднім рівнем у щурів зросла тільки на 15 %, у собак — на 6,5 %. Частота збільшилась на 31 % у щурів і на 37 % у собак.

При перетинанні нервів скальпелем АКР збільшилась у щурів на 93 %, у собак — на 138 %, а частота зросла відповідно на 71 та 31 %. Тривалість півхвилі відповіді (ТПВ) була у щурів 3,76, у собак — 3,86. Реакція відповіді при використанні скальпеля практично не мала латентного періоду (ЛП). У щурів він становив 0,6, у собак — 0,87.

Про ще більшу травму свідчили дані, отримані при перетинанні нервів ножицями. Так, АКР у собак зросла на 278 %, частота — на 275 %. ТПВ при цьому була максимальною (6,2). Латентний період становив 0,4.

Значно менша травма наносилась при невротомії за допомогою леза безпечної бритви та запропонованих невротомів після попередньої обробки нерва рідинним азотом. При використанні леза у щурів АКР зросла лише на 15 %, частота — на 5 %. При утинанні нервів запропонованими невротомами АКР зросла на 7 %, частота — на 4 %. ТПВ, встановлена при використанні леза, — 1,2, невротомів — 0,39, латентний період збільшився відповідно до 2,1 і 4,2.

Аналогічні дані отримані в експерименті на собаках. При перетинанні нервів лезом чи невротомами АКР збільшилась тільки на 4%, частота — на 2,5%, ТПВ становила 0,8, ЛП був максимальним (4,1).

Запис біопотенціалів мозку у щурів та собак через 1, 3, 5, 10, 30 діб після ампутації стегна не виявив яких-небудь частотно-амплітудних та фазних змін у порівнянні з даними, що отримані до операції. Це не дозволило нам підтвердити думку про існування центру патологічної активності в корі головного мозку, що може призводити до фантомних болей.

Таким чином, функціональні дослідження з записом біопотенціалів мозку показали, що при перетинанні нервів скальпелем та ножицями АКР та частота у порівнянні з початковими значно збільшувались. Тривалість півхвилі відповіді в 4–7 разів перебільшувала аналогічні параметри при перетинанні нервів лезом безпечної бритви та невротомами після їх обробки рідинним азотом. Реакція відповіді при використанні скальпеля практично не мала латентного періоду. При утинанні нервів лезом безпечної бритви він збільшувався, а запропонованим способом був найдовшим. Все це може об'єктивно свідчити про те, що до найбільшої травми призводить перетинання нервів ножицями та скальпелем, до найменшої — запропонованими інструментами після попередньої обробки нерва рідинним азотом.

При аналізі нашого гістологічного матеріалу в перші 10–12 діб після операції на кінці усічених нервів виявлено набрякання та розрихлення пучків нейрофібрил, розпад мієлінових оболонок. Судини епіневрію розширені, переповнені кров'ю. Навкруги відзначалась помірна лейкоцитарна інфільтрація. Ці зміни прослідковались на протязі 5–6 мм після перетинання нервів запропонованим нами способом і на протязі 2–2,5 см після використання скальпеля. Причому в останньому випадку прояви запалення більш суттєві, кількість пошкоджених нейрофібрил та елементів їх розпаду значно більша, що свідчить про більш грубу механічну травму.

У контрольній групі досліджень при використанні ампутаційного ножа надриви поверхневого епіневрію, крововилив та ознаки запалення виявлялися на протязі 4–5 см від кінця усіченого нерва.

Через три місяці після ампутації у кінцевому відрізку нерва на протязі 5–6 мм при перетинанні його лезом та невротомом після обробки рідинним азотом зустрічались окремі волокна, що розпадаються. У сполучнотканинних оболонках нерва, особливо в ендоневрії, виявлялися незначна кількість лімфоцитів і гістіоцитів, продукти розпаду мієлінової оболонки та аксонів, а в клітинах ендоневрію були помітні дрібні крапельки жиру. Разом з дегенерацією нервових волокон виявлялись і атрофічні зміни. Товща мієлінової оболонки і аксона місцями частково зменшуються. При перетинанні нервів скальпелем ці зміни прослідковались на протязі 2–3 см, а також більш інтенсивне розростання сполучної тканини з окремими скупченнями лімфоцитів та гістіоцитів.

При виконанні ампутації за класичною методою з розтинанням м'язів та судинно-нервових пучків ампутаційним ножом, як і в ранні строки, в області надривів поверхневого епіневрію по ходу нервів у культі виявлялись залишкові ознаки запалення та розростання сполучної тканини, яка стискає нервові пучки.

Через рік після ампутації з перетинанням нервів лезом та невротомами після обробки їх рідинним азотом судини періневрію переповнені гемоцита-

ми, розширені. Мало місце пристінне стояння лейкоцитів. Стінка гемосудин дуже прониклива, завдяки чому волокнистий компонент епі- та періневрію набрякає. У сполучній тканині зустрічались зони запалення. Клітинні елементи судинної стінки потерпали значних змін: порушувалась форма ядер, виявлялись перінуклеарний набряк, вакуолізація цитоплазми. У нервових провідниках були наявні незначні дегенеративно-деструктивні зміни. В окремих волокнах чітко виявлялись тонотенети. У набряклих ділянках з'являлись вакуолі різних розмірів. Частина з них спорожнювалась, завдяки чому провідники мали узурований вигляд.

Ці зміни спостерігались на протязі до 6 мм від невроми. Ця зона подовжувалась до 3 см при перетинанні нервів скальпелем і до 4–5,5 см при використанні ампутаційного ножа. Тут відзначалось розростання сполучної тканини, що затискала нервові волокна, які були звиті та атрофічні.

Через 3 роки після ампутації з перетинанням нервів лезом чи невротомом знаходились невроми світло-сірого кольору, щільної консистенції, що перебільшували розмір нервового стовбура в 1,5–2 рази. У них виявлялось розростання волокнистої сполучної тканини, яка місцями перероджувалась у жиріву. Судини місцями облітеровані, в їх стінці відзначались мезенхімальна дистрофія, прояви васкуліту. Досить часто у сполучній тканині судинної стінки проявлялись ознаки мукоїдного набряку колагенових волокон, окремі з них підпадали деструкції.

Нервові провідники сусідніх стовбурів широко анастомозували між собою, місцями утворюючи клубки. Значна кількість нервових волокон виявлялась в епіневрії. Ядра лемоцитів нервових провідників збільшені в розмірі, поліморфні, вакуолізовані. Серед реактивних змін домінували вияви різкого набрякання осьових циліндрів та оболонок. Останні мали вигляд стрічок, у центрі яких виявлялось розширення насічок мієліну. Приблизно одну восьму частину нервових стовбурів складали Бюнгеровські стрічки. Ці зміни були також у нервових стовбурах на протязі до 5 мм від невром.

При утинанні нервів скальпелем у межах невроми виявлявся потовщений епіневрій. Колагенові волокна його були набряклі, розсунуті тканьювою рідиною. Клітинні елементи збільшені в розмірі, у багатьох з них відбувається перінуклеарний набряк. Стінки гемосудин середнього калібру мали нерівномірну товщину. Нервові волокна в стовбурах мали різноманітний хід, багато провідників анастомозували один з одним. У більшості стовбурів мали місце прояви реактивного характеру: порушення тінкторіальних властивостей та аргентофілія, набряк осевоциліндричної речовини, вакуолізація нейроплазми. У частини нервових волокон виявлялись деструктивно-дистрофічні процеси. Частина їх некротизувалась по коагуляційному типу. У таких стовбурах, крім лізованих провідників, зустрічалась велика кількість спірально-подібних волокон та спіралей Перрончито, а також ковб росту. Останні були підвержені вакуолізації. У місцях загибелі осьових циліндрів накопичувалась велика кількість лемоцитів, що утворювали гліозні вузли. Ці зміни мали місце також у нервових стовбурах на протязі до 2 см від невром.

Через десять років після ампутації при гістологічному дослідженні невром більшість судин епі- та періневрію повністю чи частково облітеровані. У них виявлялись різке потовщення судинної стінки, збільшення кількості ядер ендотеліоцитів та їх набряк з десквамацією. Саркоплазма пінісна, вакуолізована. Колагенові волокна потовщені та розволоknені. Відзначалось різке розростання сполучної тканини з судинами мікроциркуляторного русла.

Здебільш зустрічались потовщені колагенові волокна, у клітковинних елементах спостерігалась значна зернистість. Стінка капілярів була потовщена з набряклим потовщеним та вакуолізованим ендотелієм.

У периферійних частках невроми знаходились остеофіти, які складалися з інтенсивно пофарбованої у рожевий колір міжклітковинної речовини, остеоцитів та остеобластів.

Частка нервових волокон затиснута сполучною тканиною, яка розрослась, що обумовлює різкі функціональні, дегенеративно-дистрофічні та некротичні процеси. У великій кількості виявлялись спіралі Перрончито, ковби росту. Нервові волокна були покручені не тільки у межах невроми, але і на протязі 3 см від неї, що свідчило про перетинання нерва скальпелем. Ці зміни мали місце в нервовому стовбурі і на протязі 5,5 см від невроми. Епіневрій переривався рубцевою тканиною, що вказує на пошкодження оболонки нерва із-за його напруги при перетинанні м'язів та судинно-нервових пучків ампутаційним ножом. Приблизно третина нервових провідників у таких стовбурах була підвержена фрагментації та зернистому розпаду, тому виявлялась велика кількість порожніх шванівських гільз.

Таким чином, проведені гістологічні дослідження виявили закономірну морфологічну перебудову нерва, перетятого при ампутації. Ці зміни залежали від строку та ступеня травми. Остання була значно більшою при перетинанні нерва скальпелем, ніж при використанні побутового леза і невротомів після обробки нерва рідинним азотом.

При аналізі результатів хірургічного лікування хворих, прооперованих традиційними способами (контрольна група), біль у культі після операції виявлявся в 30 випадках. Він з'являвся відразу після втручання у 18 хворих, у першу добу — у 6, через 7 діб — у 3, на 10-й добі — у 2 та через 1,5 місяця — у 1 прооперованого. При подальшому обстеженні біль у культі мав місце в 26 випадках.

Фантомні болі були присутні в 27 випадках, причому дуже сильні — у 6 випадках, у 7 випадках скарг на біль у відсутній кінцівці не було.

При виконанні ампутації за розробленою нами методикою з використанням невротомів больовий синдром мав місце лише у 2 хворих. В інших випадках при спостереженні за хворими до 5 років скарг не було. У всіх хворих проведено успішне протезування, і вони повернулись до активного життя.

Таким чином, проведені дослідження виявили високу ефективність розробленого способу ампутацій з використанням запропонованих невротомів, що дозволяє рекомендувати їх для подальшого впровадження в практику.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белоглазов М. Э., Ракитин В. А. и др. Толерантность к физической нагрузке и содержание стресс-гормонов в крови у инвалидов с постампутационными дефектами нижних конечностей // Ортопедия, травматология и протезирование. — 1991. — № 2. — С.35–39.
2. Волобуев Н. Н., Волобуева А. Н. Способ профилактики фантомного синдрома при ампутациях конечностей // Вестник хирургии. — 1991. — Т.146. — № 3. — С.127.
3. Ваврик Ж. М., Гончар М. Г., Дельцов О. І. та ін. Ампутація кінцівки як наслідок незадовільного лікування облітеруючих захворювань судин нижніх кінцівок // Клиническая хирургия. — 1992. — № 7. — Т.607. — С.19–21.
4. Кейер А. Н. Об ампутациях при травмах конечностей в связи с особенностями протезирования // Ортопедия, травматология и протезирование. — 1991. — № 2. — С.1–6.
5. Кейер А. Н., Миненко А. Б. Сравнительный анализ результатов хирургического лечения болей после ампутации // Ортопедия, травматология и протезирование. — 1991. — № 4. — С.1–5.
6. Санин В. Г., Шевчук В. И. Хирургическая методика формирования функциональных культей нижних конечностей. — М.: Медицина. — 1994. — 12 с.

7. Трубников В. Ф. Травматология и ортопедия. – Киев: Вища школа. – 1986. – 591 с.
8. Шамирзаев Н. Х., Сагдулаев Н. С. Оперативная хирургия. – Ташкент: Изд-во им. Ибн Сины. 1991. – С. 40–87, 137–160.
9. Малышев Ю. Н., Фокин А. А., Зотов С. П. Замораживание остро омертвевшей конечности с целью подготовки больного к ампутации // Хирургия. – 1991. – № 7. – С. 59–63.

Донецкий держ. мед. ун-т

Надійшла 17.10.97

А.Б.ЗАРИЦКИЙ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ КРИОХИРУРГИЧЕСКИХ СПОСОБОВ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ АМПУТАЦИИ БЕДРА

Донецкий государственный медицинский университет

Представлены топографо-анатомические (53 трупа людей), экспериментальные (130 белых крыс и 50 собак) и клинические (40 больных) данные по изучению причин возникновения болевого синдрома при различных методах обработки нервов и их состояние в культе в различные сроки (до 12 лет после ампутации бедра). Выявленные очаги неврита и разрастания соединительной ткани, сдавливающей нервные волокна в культе, при выполнении традиционных способов ампутации позволили понять механизм травмирования нервных стволов и разработать эффективный метод профилактики связанных с этим осложнений. Предложенный способ ампутации бедра позволяет уменьшить число больных с болевым синдромом на 59,4%.

A. B. ZARITSKY

EXPERIMENTAL-MORPHOLOGICAL AND CLINIC SUBSTANTIATION OF CRYOSURGICAL WAYS OF COMPLICATION PREVENTION AT THIGH AMPUTATION

Donetsk State Medical University

The authors presents topographic-anatomical (53 human cadavers), experimental (130 white rats and 50 dogs) and clinical (40 patients) data on the investigation of the reasons for development of the pain syndrome during various methods of treatment of the nerves, and of their state in the stump within various terms (up to 12 years after amputation of the femur). The foci of neuritis and expansion of the connective tissue, squeezing the nervous fibers in the stump, observed during implementation of routine methods of amputations, enabled to understand the mechanism of trauma infliction to the nervous trunks, and to develop an effective method of prevention of thus related complications. A proposed method of amputation of the femur makes it possible to reduce the number of patients with the pain syndrome by 59.4%.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.12.615

В.С.Марченко

К ФРАКТАЛЬНОЙ ГЕОМЕТРИИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОХЛАЖДЕННОГО МОЗГА

Геометрия природных объектов от квантово-механических до биологических и социальных часто имеет фрактальную статистику [1–5] (фракталом можно назвать структуру или процесс, состоящий из частей, которые в каком-то смысле подобны целому и имеют дробную размерность [2, 3]; такие объекты выглядят одинаково в разных масштабах или в различных по длительности интервалах времени [1]).

В ЦНС примером фрактала во фракталах может быть капиллярное “дерево”, вплетенное в нейрональную сеть [1, 2]. Такие вазонейрональные взаимоотношения связаны с активностью гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Поэтому естественно предположить, что структурно-функциональное состояние ГЭБ удобнее описывать в терминах фрактальной геометрии, во всяком случае при гипотермических воздействиях [2].

Фрактальная природа ГЭБ во многом обусловлена тем, что уровень проницаемости барьера при гипотермии может регулироваться “нейрональными газами” NO и CO. Эти монооксиды наряду с чисто сигнальными функциями, несомненно, опосредуют целый ряд фрактальных физиологических процессов типа реверберации, агрегации, вытеснения, перколяции:

1. При охлаждении происходит не только повышение, но и реверберация проницаемости ГЭБ [2], а структура вихрей турбулентности, по-видимому, фрактальна [3].

2. Увеличение синтеза NO и CO способствует процессам агрегации (синаптических везикул, пинацитозных пузырьков [2], моноклеоцитов [6]), а агрегация частиц приводит к возникновению фрактальных кластеров [3].

3. Проведенный нами электронно-микроскопический анализ элементов ГЭБ и нейроглиальных комплексов показал [2], что при гипотермии происходят гидратационно-дегидратационные явления в эндотелиоцитах капилляров мозга и их окружении вплоть до экзо- и эндоцеллюлярных отеков, т.е. активируются процессы взаимовытеснения газов и жидкостей с различной вязкостью. С математической точки зрения вытеснение жидкости газом (например, NO и CO) аналогично кинетике процесса агрегации, который приводит к фрактальным геометриям [3, 5].

4. Наряду с обычной диффузией и активным специфическим переносом прохождение биоактивных веществ через ГЭБ "по следам нейронального газа" сродни движению газа по лабиринту в пористой среде [4]. Такого рода явления принципиально отличаются от диффузии и описываются теорией протекания или перколяции [4]. Процессы перколяции относятся к широкому классу критических явлений, характеризующихся наличием критической точки, в данном случае порогом протекания, когда впервые возникает перколяционный кластер (в достаточно сложных системах его геометрия фрактальна [3]), пронизывающий всю среду, или исчезает последний путь, соединяющий противоположные границы среды. По нашему мнению, порог протекания в первом приближении может быть ассоциирован с порогом проницаемости. Так, при гипотермических воздействиях повышение проницаемости возрастает не монотонно, а характеризуется относительно узкими максимумами (2–5 мин при 120 мин воздействия), только в течение которых системное введение вегетотропных веществ оказывает центральный эффект, т.е. на короткое время открывается путь от кровеносных капилляров до точки центрального приложения нейrogормона. Такого рода обстоятельства сближают понятия порога протекания и порога проницаемости. Различные задачи теории протекания объединяются тем, что макрогеометрия связанных элементов вблизи порога перколяции у них одинакова, как правило, фрактальна [3] и зависит только от размерности среды [4].

Если эти рассуждения верны, то в условиях гипотермических воздействий при повышении проницаемости ГЭБ должна синхронизироваться геометрия всех структурно-функциональных образований головного мозга, способствующих или препятствующих прохождению биоактивных веществ из крови к нервным центрам. Иными словами, следует ожидать, что в условиях предпериода, "накануне" пика проницаемости ГЭБ, возникает особое структурно-функциональное состояние мозга, характеризующееся общностью геометрии, что поддается экспериментальной проверке. Эти предположения были проверены путем расчета фрактальной размерности элементов ГЭБ и его нейроглиального окружения.

Анализ результатов экспериментов показал, что при охлаждении повышение проницаемости ГЭБ происходит периодически и сохраняется 48 ч, причем максимумы повышенной проницаемости отмечаются через 24 ч, каждые 9–10, 3–4 ч, 55–60, 15–20 и 5 мин. Спектрально-корреляционный анализ биоэлектрической активности (БЭА) при этом воздействии выявил доминирование тета- и дельта-ритмов в электроэнцефалограмме (ЭЭГ), усиление сверхмедленной активности секундного и декаминутного диапазонов, а также часовые "качания" квазипостоянного потенциала.

Оба процесса в первом приближении математически хорошо описываются триадной кривой Коха, если ее образующему элементу поставить в соответствие максимумы проницаемости ГЭБ и БЭА, а исходный единичный отрезок (затравку) считать равным 48 ч, в течение которых сохраняются изменение в БЭА и повышенная проницаемость ГЭБ (таблица). Триадная кривая Коха — это один из стандартных примеров фрактальных кривых. Можно предположить, что при ритмических холодовых воздействиях динамика БЭА и проницаемости ГЭБ приобретает одинаковую геометрию, характеризующуюся фрактальной размерностью порядка 1,3, так как размерность самоподобия триадной кривой Коха равна 1,263 [3]. Если это так, то оба процесса могут иметь одинаково организованную структурную основу.

Известно, что в генезе БЭА важная роль принадлежит синаптическим структурам, а проницаемость ГЭБ во многом определяется особенностями эндотелиальных клеток капилляров мозга. Обе структуры (по нашему мнению, удобное приближение) могут рассматриваться как масштабно инвариантные фракталы аналогично тому, как в традиционной морфо- и стереометрии используются гладкие кривые и поверхности. Анализ электронограмм показал, что при повышении проницаемости ГЭБ геометрия ультраструктуры эндотелиальных клеток капилляров мозга и геометрия распределения синаптических пузырьков активных синапсов становятся сходными [2]. Причем, если ультраструктура эндотелия капилляров кажется "более рыхлой", менее упорядоченной, о чем может свидетельствовать увеличение фрактальной размерности D с 1,1 до

1,3, то распределение синаптических пузырьков приобретает большую упорядоченность (Д понижается до 1,3). В малоактивных синапсах Д лежит в пределах 1,7–1,8 (для сравнения размерность кластеров случайно распределенных частиц коллоидного золота, проанализированных с помощью электронного микроскопа, равна $1,7 \pm 0,1$ [3]).

Теоретические и экспериментальные временные параметры максимумов ритмики БЭА и проницаемости ГЭБ при охлаждении

Периоды доминирующих колебаний		
Триадная кривая Коха	БЭА	Проницаемость ГЭБ
48 ч	Сохраняются изменения	Сохраняется повышенная проницаемость
24 ч	То же	Порядка 24 ч
8 ч	То же	Порядка 9–10 ч
2 ч 40 мин	Нерегулярные изменения ПП — 2–3 ч	Порядка 3–4 ч
53 мин	“Часовые качания” ПП — 40–60 мин	55–60 мин
18 мин	Декаминутный ритм — 15–20 мин	Слабо выраженные колебания проницаемости — 15–20 мин
6 мин	Не исследовано	Нерегулярный ритм — 5 мин
2 мин	То же	Не исследовано
39,5 с	То же	То же
13,2 с (0,08 Гц)	Дзета-ритм (0,1–0,15 Гц), 10 с (0,1 Гц)	—
4,4 с (0,23 Гц)	5 с (0,2 Гц)	—
1,5 с (0,68 Гц)	Дельта-ритм (0,5–3 Гц) (1,7–2 с) (0,5–0,6 Гц)	—
0,5 с (2 Гц)	(0,5–1 с) (1–2 Гц)	—
0,16 с (6,3 Гц)	Тета-ритм (4–8 Гц) (0,14–0,17 с) (6–7 Гц)	—

Таким образом, проницаемость ГЭБ повышается, когда “синхронизируется” геометрия эндотелиальных клеток, синапсов, БЭА и динамики проницаемости ГЭБ. Эти структуры и процессы приобретают одинаковую фрактальную размерность — 1,3, т.е., возможно, становятся в равной степени упорядоченными. Для обеспечения и поддержания такого структурно-функционального состояния ЦНС необходимо наличие синхронизирующего механизма или фактора, обеспечивающего процессы общности нейрональной коммуникации. Такой фактор нейрональной пластичности должен обладать свойством быстрой межклеточной диффузии, быть специфическим физиологически активным веществом, а его метаболизм иметь секундную ритмику. По нашему мнению, этим критериям соответствует биоактивный, легко диффундирующий “нейрональный газ” (NO и CO). Дальнейшее изучение фрактальной природы ГЭБ может явиться основой разработки неинвазивных методик оценки динамики проницаемости барьера и общего структурно-функционального состояния охлажденного мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голдберг Э.Л., Рички Д.Р., Уэст Б.Д. Хаос и фракталы в физиологии человека // В мире науки. — 1990. — № 4. — С. 25–32.
2. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Шило А.В. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3. Оксид азота (П) — один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма? // Пробл. криобиол. — 1995. — № 3. — С. 10–19.
3. Федер Е. Фракталы. — М.: Мир, 1991. — 260 с.
4. Эфрос А.Л. Физика и геометрия беспорядка. — М.: Наука, 1982. — 176 с.
5. Macin P., Pynn R., Riste T. The growth of fractal aggregates // Time-dependent effects in disordered materials. — New York: Plenum press, 1987. — P. 45–70.
6. Motterlini R., Higoalga A., Sammut J. et al. A precursor of the nitric oxide donor SJN-1 modulates the stress protein heme oxygenase-1 in rat liver // Biochemical and biophysical research communications. — 1996. — 225, № 448. — P. 167–172.

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

Поступило 15.05.97

ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА ГИСТОНОВЫХ И НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДИСПЕРСНЫХ АЗОКРАСИТЕЛЕЙ

Мутагенное и канцерогенное действие ксенобиотиков связано с их способностью нарушать структурно-функциональное состояние генетического аппарата клеток-мишеней на различных уровнях его организации, включая специфические взаимодействия с ДНК, фракциями хроматина и ядерным матриксом [3, 4, 6]. Известно, что генетически активные (канцерогенные) аминоазобензолы, содержащие в структуре молекулы метильные, аминные, ацетильные и гидроксильные группы, способны вступать в специфические взаимодействия не только с ДНК и РНК, но и с ядерными и цитоплазматическими белками, оказывая влияние на их биосинтез [3, 5]. Дисперсные азокрасители (ДАК) для полиэфирных волокон — производные 4-нитро-4'-аминоазобензола — также способны нарушать биосинтез ядерной ДНК (реже РНК) в чувствительных к их воздействию тканях [1, 2], что может привести к нарушению биосинтеза белков, связанного с этими процессами. Влияние ДАК на обмен ядерных белков не изучено, в связи с чем исследования в этом направлении актуальны и имеют важное значение для выяснения молекулярных закономерностей генотоксического действия соединений этого класса.

Поскольку гистоновые и негистоновые белки (ГБ и НГБ) являются важными структурными компонентами хроматинового комплекса, ответственными за регуляцию функциональной активности клеточного генома, исследовались особенности биосинтеза и количественное содержание этих белков в ядрах клеток печени нелинейных белых крыс-самцов при однократном пероральном воздействии дисперсных азокрасителей: Оранжевого 2К (ДО-2К), Рубинового (ДР), Темно-синего 3 (ДТС-3) и Красного 2С (ДК-2С) в дозе 5 г/кг и Красно-коричневого Ж (ДКК-Ж) в дозе 1/2 DL₅₀, а также при хронической ингаляции ДКК-Ж (4 мес; 25,4 и 5,3 мг/м³). Для изучения синтеза белка животным за 1 ч до забоя внутрибрюшинно вводили ¹⁴С-аминокислоты гидролизата белков хлореллы (1 МБк/100 г массы). Животных умерщвляли декапитацией спустя 6, 24 и 48 ч после острого и через 24 ч после хронического воздействия. Интенсивность синтеза белка определяли по уровню удельной радиоактивности (УдРА), измеренной жидкостно-сцинтилляционным методом, концентрацию — по методу Д. Лоури и спектрофотометрически.

В результате выполненных исследований установлено, что в условиях острого опыта через 6–24 ч после воздействия всех ДАК (исключая ДО-2К) наблюдалась индукция биосинтеза ГБ в ядрах клеток печени, судя по УдРА этих белков, превышающей контрольный уровень на 46–88% через 6 ч и на 94–130% спустя сутки. На фоне активации биосинтеза ГБ происходило увеличение их количественного содержания в ткани печени на 29–63% (за исключением ДО-2К). Эти изменения могут свидетельствовать о повышении структуризации хроматинового комплекса, приводящем, по-видимому, к снижению степени ковалентного взаимодействия генотоксикантов с ДНК в составе хроматиновых структур [3], и могут быть оценены как компенсаторно-приспособительные реакции клеток в ответ на повреждение ДНК генетически активными соединениями. Следствием этих повреждений является угнетение активности генома клеток печени, в частности, установленное нами блокирование биосинтеза ДНК. Параллельно отмечалось торможение биосинтеза НГБ в ядрах клеток печени крыс, на что указывало снижение УдРА этих белков на 15–28%, а также повышение содержания НГБ в ткани печени на 68–91%. Торможение биосинтеза НГБ возникает вследствие блокирования генов, ответственных за синтез этих белков, за счет повышения образования комплексов ДНК-ГБ, а возможно, структурных модификаций регуляторных участков в ДНК [3]. Повышение концентрации НГБ может трактоваться как регуляторная реакция клеток.

На 2 этапе исследований через 48 ч после воздействия ДАК отмечалось снижение содержания ГБ на 21–24% (исключая ДР), а также ингибирование их биосинтеза, судя по снижению УдРА белка на 33–46%. Это, по-видимому, связано с предшествующим торможением функциональной активности генома (в частности, ингибированием синтеза ДНК). При этом не исключена возможность повреждения структуры ГБ вследствие ковалентного взаимодействия с ДАК. Через 2 сут после воздействия ДР, ДКК-Ж и ДК-2С уровень биосинтеза НГБ в клетках печени восстанавливался, а при воздействии ДТС-3 и ДО-2К повышался (увеличение УдРА на 17 и 33%). В это же время на фоне воздействия ДР, ДТС-3 и ДК-2С содержание НГБ в печени восстанавливалось, а для ДКК-Ж и ДО-2К было ниже контрольного уровня на 15 и 26% соответственно.

При хроническом воздействии ДКК-Ж в концентрациях 25,4 и 5,3 мг/м³ наблюдались изменения уровня синтеза ГБ, о чем свидетельствовало увеличение УдРА этих белков на 26 и 30% соответственно. Интенсивность синтеза НГБ при этом не изменялась.

Таким образом, изученные ДАК способны оказывать повреждающее действие не только на ДНК, вызывая нарушение ее функций, но и влиять на биосинтез ядерных белков клеток печени (основного органа-мишени), преимущественно ГБ, а также НГБ, формирующих хроматиновый комплекс и ответственных за структурную организацию и регуляцию функциональной активности генетического аппарата. Это может приводить к нарушению функциональной активности клеточного генома, что существенно для развития мутагенного и канцерогенного эффектов. Учет уровня биосинтеза и содержания ГБ и НГБ может служить чувствительным критерием оценки генотоксической активности и прогноза потенциальной канцерогенной опасности азосоединений, близких по химической структуре к изученным ДАК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Палигина И. А., Девейкис Д. Н., Ващук Н. А., Калюжный Г. Л. Выявление генотоксической и мутагенной активности дисперсных азокрасителей с целью их гигиенического нормирования // Медицина труда и промышленная экология. – 1995. – № 5. – С. 12–15.
2. Палигина И. А. Влияние дисперсных азокрасителей на состояние генетического аппарата // Медицина сегодня и завтра: Сб. науч. работ молодых ученых и специалистов. – Харьков, 1996. – С. 241–243.
3. Рубенчик Б. Л. Биохимия канцерогенеза. – Киев.: Здоров'я, 1977. – 172 с.
4. Dipple A. DNA adducts of chemical carcinogens // Carcinogenesis. – 1995. – 16, № 3. – P. 437–441.
5. Hinson J., Roberts D. Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicity: effects on proteins // Annu. Rev. Pharmacol. and Toxicol. – 1992. – 32. – P. 18.
6. Miller J., Miller E. The initiation stage of chemical carcinogenesis: an introductory overview // Prostaglandin and Cancer. Proc. Ist. Int. Conf. – New York, 1982. – P. 81–96.

Харьковский НИИ гигиены труда и профзаболеваний Поступило 08.07.97
UDC 57.043:612.35.014.41

I.V. Shanina and L.P. Kravchenko
METABOLIC PROPERTIES OF ISOLATED RAT HEPATOCYTES
AFTER LONG-TERM STORAGE AT 4 °C

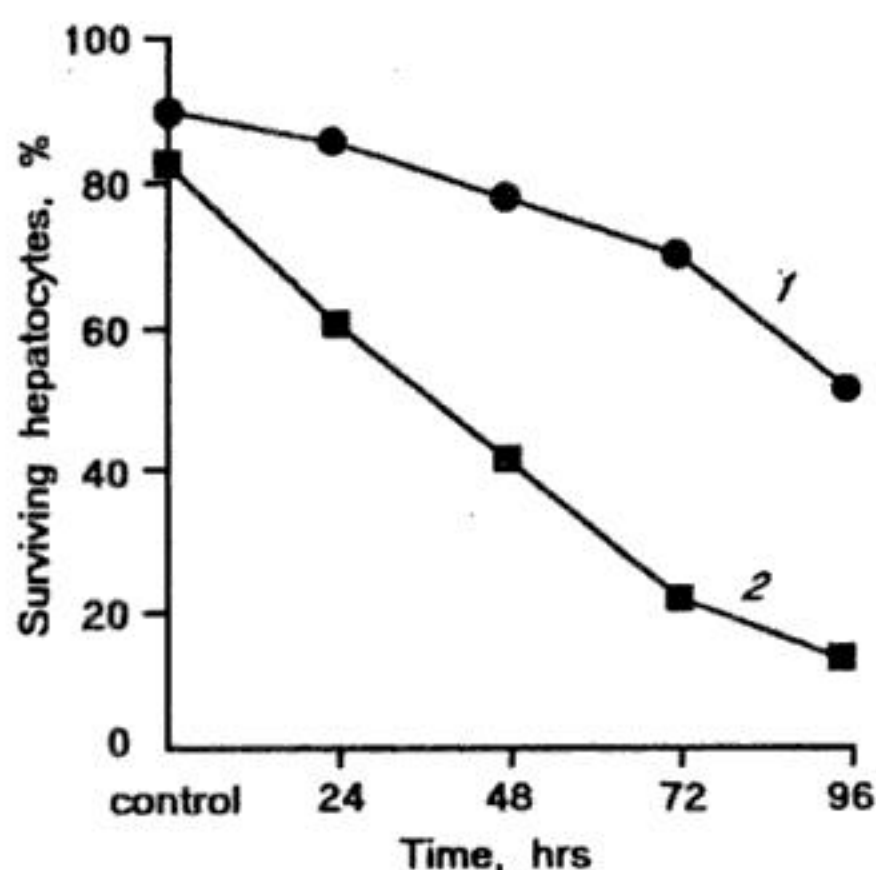
Hepatocytes were isolated from rat liver by the method developed by the authors in a perfusion sucrose medium with 4 mM EDTA. Cell viability was 91 ± 5% as judged by trypan blue exclusion (0,3% W/V). After isolation, hepatocytes were resuspended in sucrose-containing medium (0,25 M sucrose + salt + 1% BSA) and medium 199. The final cell concentration was 3 mln cells/ml (volume 3 ml). Cryoprotectant (PVP, 5% f.c.) and antioxidant (silibor, 1 mg/ml) and glutathione (3 mM) were added into the samples and tested separately. Cells were examined after isolation and after 24-, 48-, 72- and 96-hr storage in a refrigerator at 4 °C.

Intracellular content of ATP (in a neutralized protein-free extract) was determined according to [3]. Lipid peroxidation as assessed by MDA formation in spontaneous and initiated reaction was determined after 30-min incubation of cells in Krebs – Ringer solution at 37 °C [4]. The quality of cells after isolation and hypothermic storage was estimated using normothermic incubation.

T a b l e 1
Metabolic parameters of fresh isolated hepatocytes

After hour incubation at 37 °C			
Parameters	Fresh cells	Sucrose + salt + + BSA	Medium 199
Trypan blue exclusion, %	91±2	90±3	92±2
Extracellular LDG activity, %	15±2	12±1	10±3
Endogenous respiratory rate, nmol of O ₂ /min.mln	17±2	15±3	17±2
ATP content, nmol/mln cells	19±4	33±4	44±4

Values of parameters were expressed as means ±SEM. Statistical significance were determined by Students test. *P* values less then 0,05 were regarded as significant.
Fresh isolated hepatocytes survived the normothermic incubation both in sucrose medium and in medium 199. However, the analysis of the data presented in Table 1 demonstrated that the normothermic incubation of isolated hepatocytes in medium 199 is more favorable for increasing the ATP level. These solutions were also used for hypothermic storage of isolated hepatocytes. Medium 199 has demonstrated a low efficiency in long-term



Viability of hepatocytes at different stage of hypothermal storage

long time the metabolic status of isolated hepatocytes at low positive temperature in comparison with medium 199, which is good for normothermic incubation of biological materials. Sucrose does not penetrate into cells and favors a stable functioning of ATP pump, maintaining the barrier properties of cell membrane and protecting the cell against swelling and further injury [5]. Taking into consideration the fact that after 72-hr storage in sucrose medium at 4 °C isolated hepatocytes continued to damage, it was interested to study the efficiency of protective agents: cryoprotectant (PVP), antioxidant (silibor) and glutathione (all agents were tested separately). The effect of hypothermic storage of rat hepatocytes in the presence of stabilizing agents on MDA formation is presented in Table 3.

storage of hepatocytes at 4 °C. The viability of cells in this medium was 60% after the first 24 hrs of storage, sharply decreasing in further days. There are many vesicles on the plasma membrane of hepatocytes after the first 24 hrs of storage in media 199 at 4 °C. The cells in isotonic sucrose medium maintained 70% viability after 3-day storage and had well defined plasma membranes without any vesicles (Fig.).

The data presented in Table 2 demonstrate that after 72-hr hypothermic storage in isotonic sucrose solution the cells have sufficiently high metabolic parameters as compared to those stored hypothermically in medium 199 for 24 hrs. The normothermic incubation did not result in any changes in metabolic state in the first case. In the second case we observed considerable changes in parameters of isolated hepatocytes after normothermic incubation. Thus, a simple medium, containing isotonic sucrose is able to preserve for a

Table 2

Metabolic parameters of isolated hepatocytes stored for 4 °C before and after incubation

Parameters	Cells in isotonic sucrose solution + salt + BSA		Cells in medium 199	
	Cold storage for 72 hrs	Incubation at 37 °C	Cold storage for 24 hrs	Incubation at 37 °C
Trypan blue exclusion, %	89±3	90±4	70±5	20±6
Endogenous respiratory rate, nmol of O ₂ /min.mln	12±3	15±4	8±2	2±1
ATP content, nmol/mln cells	16±3	23±3	9±2	3±1

Table 3

Level MDA (nmol/mln cells) in isolated hepatocytes in sucrose solution with protective agents after 96 hr storage at 4 °C

Reaction estimation LP	Control	+ Silibor	+ PVP	+ Clutation e
Initial level	0,560±0,12	0,191±0,029*	0,299±0,076*	0,267±0,037*
Spontaneous level LP	0,750±0,061	0,320±0,04*	0,650±0,075**	0,355±0,04*
Ascorbat included level LP	1,600±0,29	0,553±0,12*	1,334±0,26**	1,505±0,27*

After 96-hr storage of isolated hepatocytes at 4 °C we observed that silibor suppressed MDA formation in all studied reactions, glutathione suppressed MDA formation only in the initial and spontaneous reaction, PVP suppressed only the initial level of MDA formation. The isolated hepatocytes stored for 96-hr with silibor after normothermic incubation had normal morphological structure. In the presence of glutathione small vesicles of various configurations appeared on plasma membrane. In the presence of PVP 20% of cells formed large blisters, swelled and included trypan blue. The obtained experimental

data show that controlling the metabolic state of cells in physiological conditions after cold storage is very important for their further survival. The assessment of the initial level of MDA formation is not sufficient for estimating the lipid peroxidation in isolated hepatocytes after prolonged hypothermic storage. The investigation of spontaneous and induced MDA formation in isolated hepatocytes after cold preservation gives objective data on the state of cell antioxidation system.

Thus, it is shown that isolated hepatocytes successfully survive a normothermic incubation after their prolonged cold storage in a sucrose-containing solution with antioxidant - silibor. Hepatocytes also retain their ability to restore adenine nucleotide pool.

We thank Dr. A. Belous, Kharkov, for helpful comments and suggestions.

REFERENCES

1. Fuller B. Transplantation of isolated hepatocytes // *J. of Hepatology*.— 1988.— 7.— P. 368–376.
2. Bilenko M. Ischaemic and reperfusion injury to organs, M.: Meditsina, 1989, 368 pp., in Russian.
3. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of Biochemical methods// Grune and Stratton, N.Y., 1975.
4. Vladimirov U., Archakov P. In: "Lipid peroxidation in biological membranes, Science, 1972, in Russian.
5. Finean D., Kolten R., Mitchell R. Membranes and their function in the cells. M.: Mir, 1977, 200 pp., in Russian.

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

Accepted 27.12.96

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

4¹⁹⁹⁷

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. — "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском языках. Объем 5,6 печ. л., периодичность четыре номера в год. В журнале публикуются фундаментальные и прикладные работы по проблемам охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, их сублимационному высушиванию и созданию криогенной техники. Освещаются вопросы гибернации, холодостойкости животных и растений.

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

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

Subscription orders should be addressed to
Editor-in Chief V.I. Grishchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of the Ukraine
23 Pereyaslavskaya Str., 310015 Kharkov, The Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84

ИНДЕКС 70474
ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1997. №4. 1-68