4

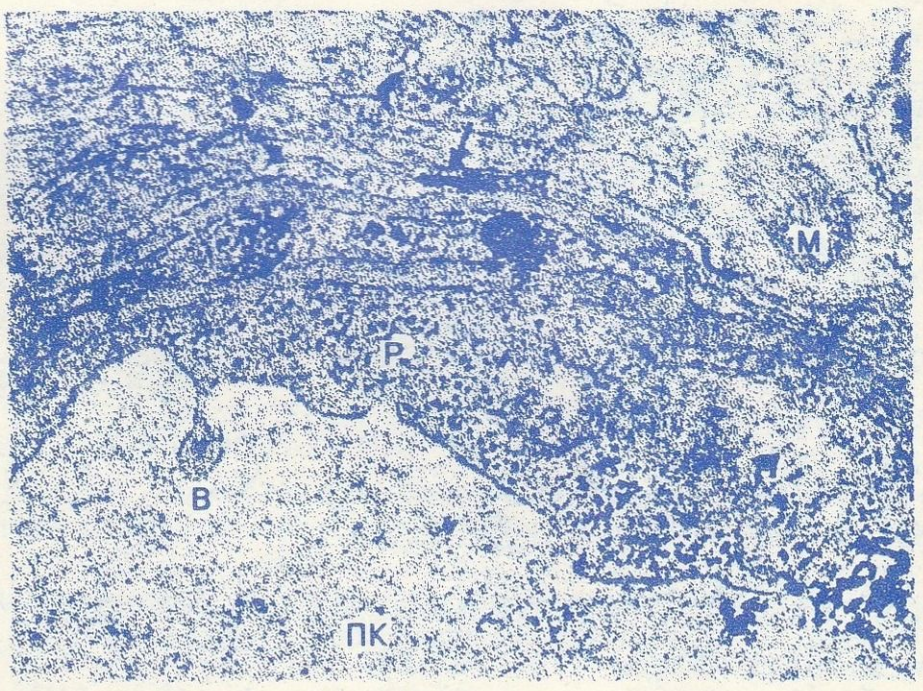
ISSN 0233–7673

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-СВЯЗАННЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПРИСУТСТВИИ НЕКОТОРЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ *Нардид О.А., Дюбко Т.С., Зинченко А.В., Соловьева А.С.*

4

1997

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

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

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

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

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

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 37
Копейка Е. Ф., Черепанов В. В., Дзюба Б. Б. Анализ содержания АТФ и креатинфосфата в сперме карпа (*Cyprinus carpio*) до и после криоконсервации 41

КРИОМЕДИЦИНА

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

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

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

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1997

УДК 577.1:57.043:611-018.51

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, *pH* 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 нестабильности (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 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).

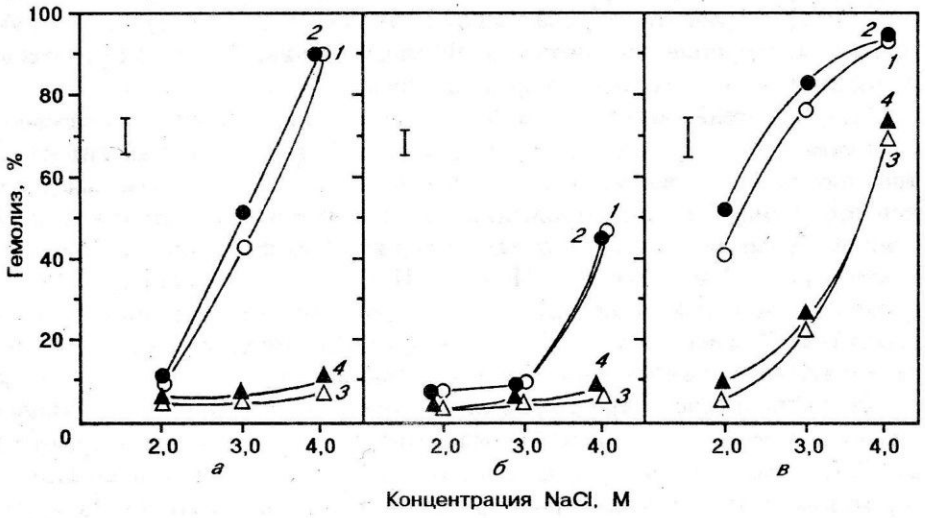


Рис. 1. Уровень гемолиза эритроцитов, перенесенных в солевые гиперосмотические среды после предварительной инкубации в 0,15 М (*а*), 0,45 М (*б*) и 0,70 М (*в*) NaCl при 37 °С в присутствии трифторперазина ($3{,}0 \cdot 10^{-5}$ М) и без него: *1*, *2* — контроль; *3*, *4* — трифторперазин. Время инкубации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

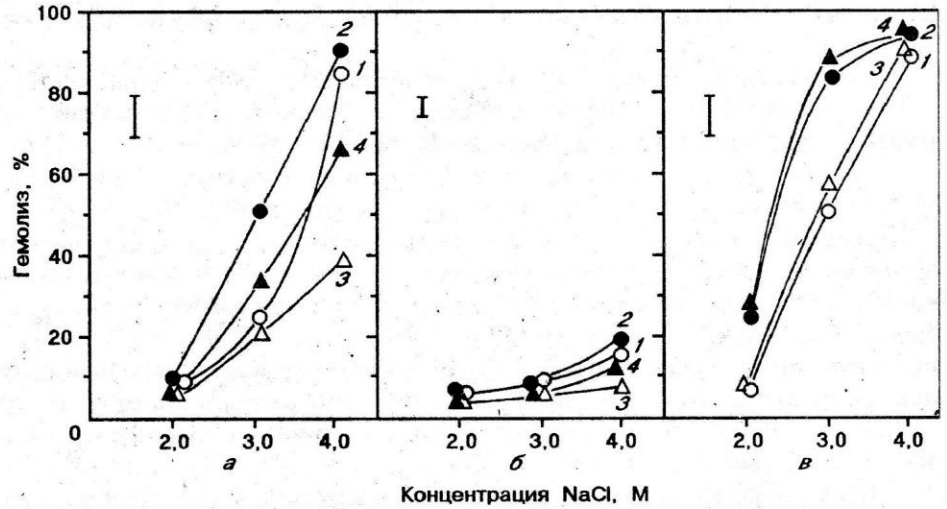


Рис. 2. Уровень гемолиза эритроцитов, перенесенных в солевые гиперосмотические среды после предварительной инкубации в 0,15 М (*а*), 0,45 М (*б*) и 0,70 М (*в*) NaCl при 0 °С в присутствии трифторперазина (10^{-5} М) и без него: *1*, *2* — контроль; *3*, *4* — трифторперазин. Время инкубации в гиперосмотических 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 холодового 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 NaCl протекция эритроцитов в присутствии трифторперазина выражена в значительно меньшей степени (≈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, контролирующие 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 °С) 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 °С уже сформировавшаяся трансмембранная пора характеризуется низкой способностью к замыканию, поэтому увеличивается время ее жизни. Вероятно, по этой причине при 0 °С 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 амфипатов // 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: effekt 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 кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Вивчався зв'язок між гіперосмотичним пошкодженням еритроцитів при 37 і 0 °С 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 °С, 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 Nanional 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-ПРОПАНДИОЛА 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 °С) 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 °С.

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