

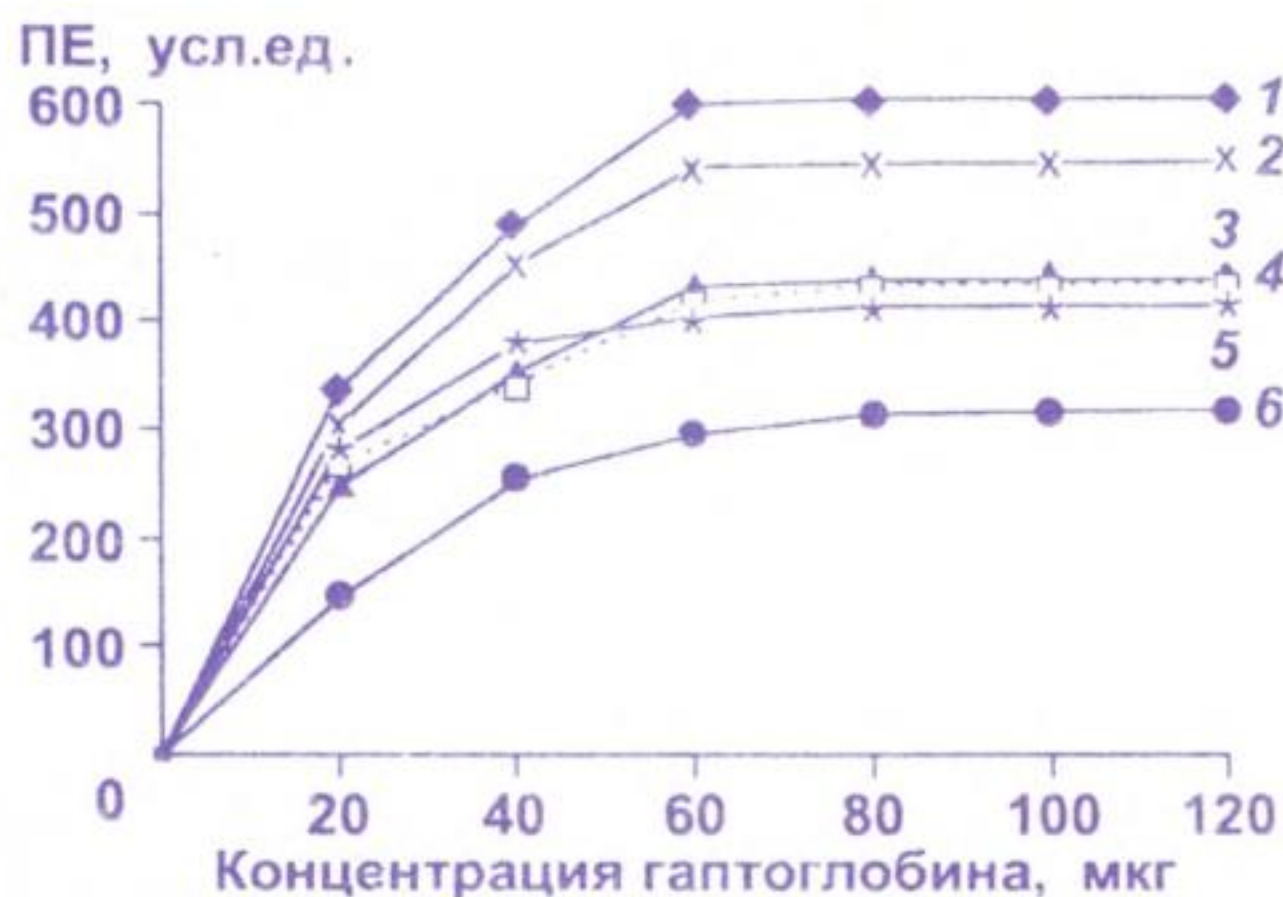
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1998

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



АМИДЫ АЛИФАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ – ЭФФЕКТИВНЫЕ КРИО-
ПРОТЕКТОРЫ. I. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕ-
НИЙ РЯДА АМИДОВ *Т.П.Липник*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГАПТОГЛОБИНА
В УСЛОВИЯХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ *А.Ю.Никольченко,
А.К.Гулевский*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРИОЭКСТРАКТОВ ЭМБРИО-
НАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ *Н.П.Суббота, П.П.Пашинский, Е.Д.Розанова*

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.Blagoj (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

З

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

1998

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Парченко Т. А. Химическая модификация чувствительности эритроцитов к гиперосмотическому стрессу и литическому действию пчелиного яда	3
Кратенко Р. И. Определение кинетических параметров серотониновых рецепторов первого типа радиолигандным методом	8
Караченцев Ю. І. Аутоімунні тиреопатії та низькі температури	11
Андреева Е. К., Ромоданова Э. А., Дюбко Т. С., Гаташ С. В., Гаврик В. А. Влияние режимов замораживания на спектральные свойства растворов фибриногена	18
Линник Т. П. Амиды алифатических кислот — эффективные криопротекторы. I. Физико-химические свойства соединений ряда амидов	21
Никольченко А. Ю., Гулевский А. К. Структурно-функциональные свойства гаптоглобина в условиях криоконсервирования	28

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Суббота Н. П., Пашинский П. П., Розанова Е. Д. Биологические свойства криоэкстрактов эмбриональных тканей	35
Мельник Э. С. Осмотически индуцированные потоки хлорид-аниона и протона в контроле температурного воздействия на эритроциты	42
Гальченко С. Е., Мамонтова А. В., Тыньныка Л. Н., Сандомирский Б. П. Влияние криоконсервирования на интенсивность дыхания фрагментов ксеноорганов	45
Грищенко В. И., Петрушко М. П., Пиняев В. И., Терпячая И. В., Луцкая Л. И., Чуб Н. Н., Крамар М. И., Юрченко Г. Г. Использование спермы, хранившейся в условиях гипотермии, для реинсеминации неоплодотворенных ооцитов в программе ЭКО	48
Загнойко В. И. Регулирующее действие биологически активных веществ, входящих в состав мочи гибернирующих сусликов <i>S. undulatus</i> , на скорость метаболизма у белых мышей	52
Бондаренко Т. П., Геращенко А. В., Кирюшина И. И. Влияние димексида и экстрактов гипофиза на гормональную активность клеток культуры коры надпочечников новорожденных поросят	55

КРИОМЕДИЦИНА

Капельянец А. С., Мигунова Р. К. Устройство препарирования тканей для электронной микроскопии по методу замораживания-замещения	58
---	----

Зац Б. П., Капрелянц А. С., Воронов М. В., Резников В. И. Метод холодовой рефлексотерапии при комплексном лечении больных с явлениями локальных мышечных гипертонусов	60
Велигоцкий Н. Н., Дубенко В. В., Гамм Т. И., Башура Г. С., Велигоцкий А. Н., Бугаков И. Е. Активная хирургическая тактика лечения раневой инфекции у больных сахарным диабетом	63

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

Хакл Е. В., Корнилова С. В., Ссловьева А. С., Зинченко А. В., Благой Ю. П. Переход ДНК в компактное состояние при связывании с ионами меди в растворах криопротекторов	67
--	----

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

Parchenko T. A. Chemical modification of the red cell susceptibility to hyperosmotic stress and lytic action of the bee venom	3
Kratenko R. I. Determination of the kinetic parameters of serotonin receptors of the first type with a radioligand method	8
Karachentsev Yu. I. Autoimmune thyropathies and low temperatures	11
Andreyeva E. K., Romodanova E. A., Dyubko T. S., Gatash S. V., Gavrik V. A. Action of the modes of freezing on the spectral properties of the fibrinogen solutions	18
Linnik T. P. Lipids of the aliphatic acids are effective cryoprotectants. I. Physical-chemical properties of the compounds out of the amid series	21
Nikolchenko A. Yu., Gulevsky A. K. The structural and functional properties of haptoglobin in the presence of cryopreserve	28

CRYOCONSERVATION OF BIOSYSTEMS

Subbota N. P., Pashinsky P. P., Rozanova E. D. Biological properties of cryoextracts out of the embryonic tissues	35
Melnik E. S. Osmotically induced flows of chloride-anion and proton in the temperature control over red cells	42
Galchenko S. E., Mamontova A. V., Tynynyka L. N., Sandomirsky B. P. Cryopreservation effect on the intensity of xenoorgan respiration fragments	45
Grischenko V. I., Petrushko M. P., Pinyagov V. I., Terpyachaya I. V., Lutsкая L. I., Chub N. N., Kramar M. I., Yurchenko G. G. Application of spermatozoa, stored under hypothermic conditions, for re-insemination of the unfertilized oocytes in the ECF programme	48
Zagnoiko V. I. Regulating action of the biologically active substances, comprising the urea of the hibernating ground squirrels <i>C. undulatus</i> , on the rate of metabolism in white mice	52
Bondarenko T. P., Geraschenko A. V., Kiryushina I. I. Effect of dimexide and hypophysial extracts on the hormonal activity of the adrenal gland culture cells of the newborn pigs	55

CRYOMEDICINE

Kaprelyants A. S., Migunova R. K. A device for tissue preparation for electron microscopic study using a method of freeze-substitution	58
Zats B. P., Kaprelyants A. S., Voronov V. V., Reznikov V. I. Cold reflexotherapy method at complex treatment of patients with phenomena of local muscular hypertonus	60
Veligotsky N. N., Dubenko V. V., Tamm T. I., Bashura G. S., Veligotsky A. N., Bugakov I. E. Active surgical treating tactics of wound infection in patients with diabetes mellitus	63

BRIEF COMMUNICATION

Khakl E. V., Kornilova S. V., Solovyeva A. S., Zinchenko A. V., Blagoy Yu. P. DNA transition into compact state when binding with copper ions in cryoprotectant solutions	67
---	----

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 Е. Д. Пазыч

Компьютерный набор и верстка: И. Г. Пятигорская

Подп. в печ. 25. 08. 98. Формат 70x103/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 6,8. 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.

**ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ЭРИТРОЦИТОВ К ГИПЕРОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ
И ЛИТИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ ПЧЕЛИНОГО ЯДА**

Исследовано влияние некоторых модификаторов цитоскелета на чувствительность эритроцитов к температурному и осмотическому воздействию, а также к литическому действию пчелиного яда. Установлено, что хлорпромазин повышает устойчивость эритроцитов, модифицированных как геминном, так и температурой 50 °С к действию гиперосмотического стресса при 37 °С. Получены сходные результаты о чувствительности модифицированных эритроцитов при гипертоническом (0 °С) и яд-индуцированном гемолизе.

Факторами, нарушающими структуру и функции биологических мембран при снижении температуры, являются высокие концентрации солей, которые образуются при вымораживании свободной воды. Предварительная частичная дегидратация [2], действие катионного амфипатического соединения хлорпромазина (ХПМ) [5] повышают устойчивость эритроцитов к гиперосмотическому шоку. В то же время известно, что формирование мембранных дефектов в этих условиях во многом зависит от степени модификации белков цитоскелета и липидного бислоя мембраны. Поэтому главной задачей нашего исследования явилось изучение сочетанного влияния ХПМ и некоторых модификаторов цитоскелета на устойчивость эритроцитов к действию гиперосмотического стресса, развивающегося при переносе клеток в 4,0 М раствор NaCl. В сравнительном аспекте было изучено влияние модификаторов цитоскелета на чувствительность эритроцитов к литическому действию пчелиного яда (ПЯ). Это позволит установить общие и отличительные особенности реактивности модифицированных клеток при повреждениях эндогенного (гипертонический шок) и экзогенного (яд-индуцированный лизис) характера.

Эритроциты человека отмывали от плазмы и других форменных элементов крови в десяти объемах физиологического раствора (150 mM NaCl, 10 mM натрий-фосфата, *pH* 7,4) 3-кратным центрифугированием (3 мин, 3 000g) и хранили в виде плотного осадка при 0 °С. Все среды готовили на 10 mM натрий-фосфатном буфере, *pH* 7,4. Для изучения влияния гипертонического стресса эритроциты помещали в среды с различным содержанием NaCl при заданной температуре (0 и 37 °С) на 2 мин и из каждой пробы переносили в 1,0 мл 4,0 М раствора NaCl при той же температуре на 5 мин (конечный гематокрит 0,4%). После этого целые клетки осаждали центрифугированием. Количество гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически на длине волны 543 нм. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу в присутствии Тритона X-100 (0,1%). Хлорпромазин находился только в лизирующей среде (4,0 М NaCl). Модификацию клеток геминном (20%-й гематокрит) проводили в среде, содержащей 90 mM KCl, 45 mM NaCl, 44 mM сахарозы, 10 mM натрий-фосфата (*pH* 7,4). Гемин добавляли в концентрации 300 мкМ и инкубировали 10 мин при 37 °С [9]. Тепловую обработку клеток осуществляли в течение 10 мин при 49 °С.

Динамику яд-индуцированного гемолиза изучали спектрофотометрически на длине волны 720 нм [3]. В кювету объемом 2 мл помещали такое количест-

во суспензии эритроцитов, при котором начальная величина оптического пропускания (ОП) соответствовала бы значению 0,12–0,13. При этом концентрация клеток была равна $1 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл [3]. Скорость гемолиза вычисляли как тангенс угла наклона зависимости ОП от времени. Поскольку ОП в выбранном диапазоне прямо пропорционально концентрации клеток, измеряемая скорость его уменьшения пропорциональна скорости гемолиза эритроцитов [6]. Были использованы хлорпромазин фирмы "Calbiochem" (США), остальные реактивы квалификации х.ч. и ч.д.а. Эксперименты проводили при комнатной температуре (22–24 °С).

Известно, что предварительная частичная дегидратация в определенных условиях [2], а также дополнительная обработка хлорпромазином (при 37 °С) [5] способствуют повышению устойчивости эритроцитов к действию гиперконцентрированных солевых растворов. При этом происходит модификация комплекса мембрана–цитоскелет. В эксперименте использовали специфический модификатор гемин, который свободно проникает через липидный бислой мембраны эритроцитов и связывается с белком полосы 4.1, актином, спектрином с нисходящей аффинностью в указанном ряду, нарушая при этом взаимодействие белков цитоскелета. На рис. 1 и 2 показано влияние гемина (кривая 2) на уровень гемолиза эритроцитов при переносе их в 4,0 М NaCl после предварительной дегидратации в растворах NaCl с меньшим содержанием электролита (0,15–1,0 М). При температурном режиме $0 \rightarrow 0$ °С в правой части кривой 2 наблюдается защитное влияние гемина, который снижает уровень гемолиза на 35% (рис. 1, а). ХПМ в лизирующей среде повышает лизис клеток во всем концентрационном диапазоне NaCl (рис. 1, б). В то же время при температурном режиме $37 \rightarrow 37$ °С модифицированные клетки становятся более устойчивыми к действию гиперосмотического стресса по сравнению с контролем (рис. 2, кривая 1) во всем концентрационном интервале NaCl, а в присутствии ХПМ отмечается значительное падение чувствительности таких клеток к действию высоких концентраций солей (кривая 2 практически параллельна оси абсцисс). Так как первичным сайтом взаимодействия гемина с цитоскелетом является белок полосы 4.1, наблюдаемый эффект связан прежде

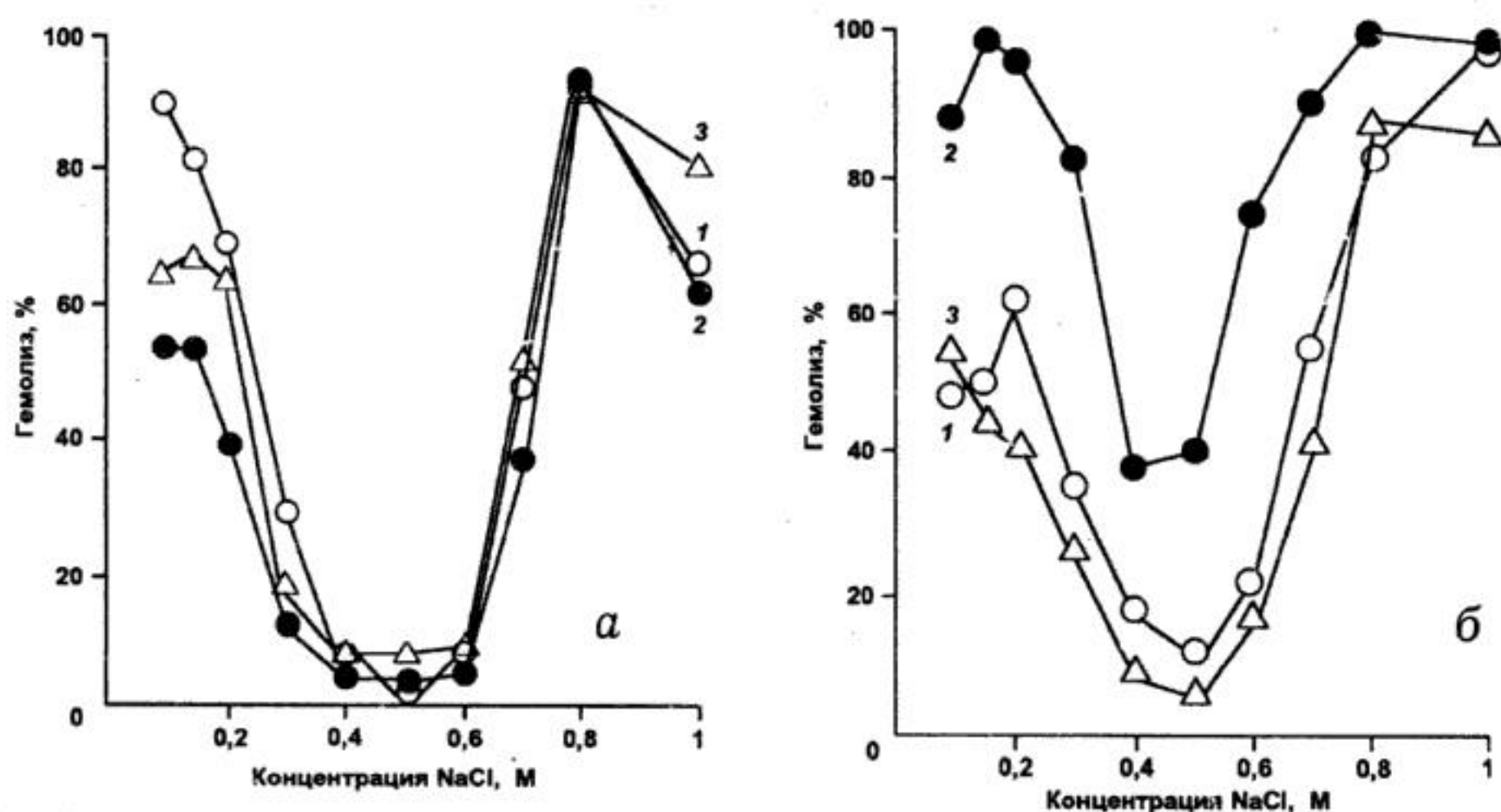


Рис. 1. Влияние модификаторов цитоскелета на уровень гемолиза эритроцитов при переносе в 4,0 М NaCl после предварительной дегидратации. Температура 0 °С: а — контроль; б — ХПМ ($6,0 \cdot 10^{-5}$ М). 1 — немодифицированные клетки; 2 — гемин; 3 — инкубированные клетки при 49 °С

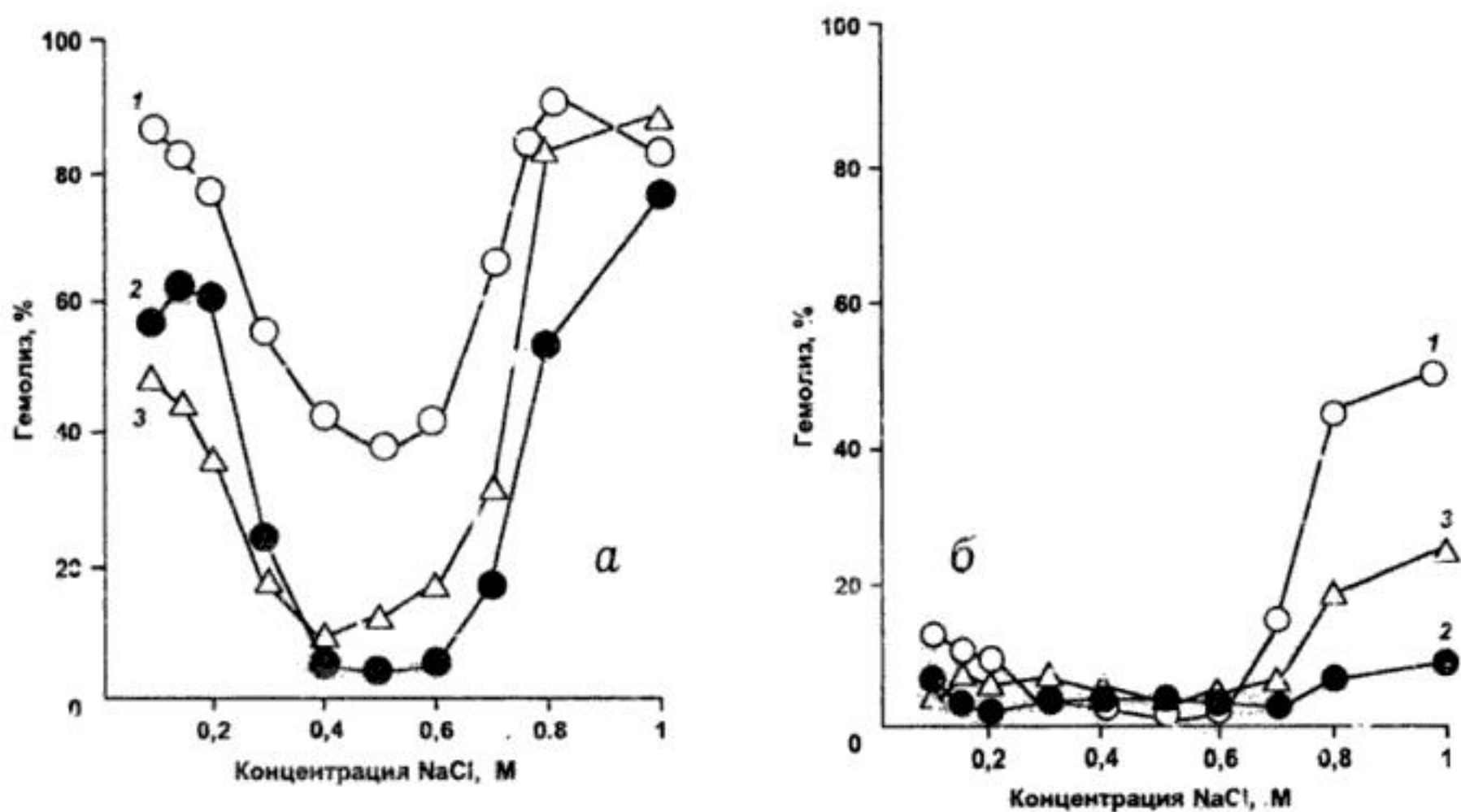


Рис. 2. Влияние модификаторов цитоскелета на уровень гемолиза эритроцитов при переносе в 4,0 М NaCl после предварительной дегидратации. Температура 37 °С: *а* — контроль; *б* — ХПМ ($7,75 \cdot 10^{-5}$ М). 1 — немодифицированные клетки; 2 — гемин; 3 — инкубированные клетки при 49 °С.

всего с модификацией участков, в которых цитоскелет крепится с помощью данного белка. При этом нарушается нативная конформация белка полосы 4.1, а также актина и спектрина и, следовательно, ослабляется взаимодействие между компонентами мембраны, что, по-видимому, способствует повышению устойчивости эритроцитов к действию гиперосмотического стресса.

Так как ХПМ является положительно заряженным амфипатическим соединением и распределяется на границе раздела “цитоскелет–мембрана”, мы модифицировали состояние белков цитоскелета, инкубируя эритроциты при 49 °С, что сопровождалось денатурацией спектрина. При температурном режиме 0 → 0 °С в правой части кривой 3 наблюдается защитное влияние преинкубации клеток при 49 °С, что уменьшает гемолиз на 25% (рис. 1, *а*), при этом наличие ХПМ в лизирующей среде существенно не влияет на устойчивость эритроцитов к гиперосмотическому стрессу (рис. 1, *б*). В то же время хорошо видно, что при температурном режиме 37 → 37 °С клетки, подвергнутые предварительной тепловой обработке, более устойчивы к гипертоническому воздействию (рис. 2, *а*) по сравнению с немодифицированными. Это относится к правой части кривой 3. ХПМ значительно снижает чувствительность эритроцитов к действию высоких концентраций солей (рис. 2, *б*).

Полученные данные свидетельствуют о том, что состояние цитоскелетных белков в значительной степени определяет чувствительность эритроцитов к переносу в 4,0 М NaCl, особенно при 37 °С. Реализация защитного действия ХПМ также зависит от состояния периферической белковой сети. Протектирующий эффект ХПМ в условиях гиперосмотического шока при переносе эритроцитов в 4,0 М NaCl при 37 °С может быть обусловлен его способностью ослаблять связь между мембранными липидами или белками цитоскелета и его действием на подвижность мембранных липидов и погруженных в липидный матрикс белков, т.е. на факторы, оказывающие влияние на формирование и зрелость трансмембранных дефектов [7]. В обоих случаях время жизни дефектов, возникших в мембране при стрессовом воздействии, будет уменьшаться либо вследствие уменьшения стабилизирующего влияния белков

цитоскелета на образовавшийся дефект, либо в результате его быстрой “репарации”. Таким образом, при 37 °С наблюдается синергизм в действии ХПМ и модификаторов цитоскелета.

Повышение чувствительности эритроцитов к действию гиперосмотического стресса при 0 °С в присутствии ХПМ связано с тем, что при охлаждении и повышении осмолярности в мембране происходит фазовое разделение липидов и формируются микродомены с различной текучестью. В то же время известно, что ХПМ распределяется в мембрану с достаточно высоким коэффициентом распределения, причем его сродство к липидам в жидкокристаллическом состоянии значительно выше, чем к липидам, находящимся в состоянии геля [1]. Поэтому при низкой температуре ХПМ преимущественно включается в жидкокристаллические домены эритроцитарной мембраны в высоких локальных концентрациях, что, вероятно, лежит в основе дестабилизации мембраны и повышения чувствительности клеток к гиперосмотическому стрессу в 4,0 М NaCl (рис. 1, б, 2, б).

Влияние модификаторов цитоскелета на скорость гемолиза эритроцитов, индуцированного пчелиным ядом (ПЯ), мкг/мл

Модификаторы	Скорость гемолиза	
	ПЯ (контроль)	ПЯ + 25 мкМ ХПМ
Немодифицированные клетки, [ПЯ] = 2,5	3,8 ± 0,6	—
Гемин, [ПЯ] = 0,5	27,1 ± 2,4	94,3 ± 3,3
49 °С, [ПЯ] = 2,5	5,7 ± 0,6	0,62 ± 0,1

Примечание: $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Из данных таблицы видно, что модификация периферических белков существенно влияет на гемолиз эритроцитов, индуцированный пчелиным ядом. Так, в результате преинкубации клеток при 49 °С скорость гемолиза увеличивается в 2 раза, а при обработке эритроцитов гемин — почти в 8 раз, причем концентрация ПЯ, используемая в этом случае, была в 5 раз меньше, чем в других экспериментах. Как известно, главный литический компонент пчелиного яда мелиттин обладает способностью увеличивать проницаемость липидных везикул или формировать ионные каналы в плоских липидных бислоях [8]. Имеются данные, что мелиттин оказывает свой литический эффект на эритроциты за счет преимущественного взаимодействия с белковыми компонентами их мембран [3, 4]. Предполагают [4], что мелиттин-индуцированный гемолиз обусловлен взаимодействием пептида с рецептором, регулирующим лизис. Мембранные белки могут выполнять роль модуляторов взаимодействия мелиттина с теми участками мембран, в которых в конечном итоге образуются литические поры. Полученные результаты свидетельствуют о том, что связь на участке спектрин — белок полосы 4.1 — белок полосы 3 или спектрин — белок полосы 4.1 — фосфатидилсерин играет важную роль в обеспечении устойчивости эритроцитов к яд-индуцированному гемолизу. При этом нельзя исключить и дестабилизирующего действия гемина на липидный бислой мембраны, которое в настоящее время детально не изучено. Важной является роль спектрина в обеспечении гемолитической чувствительности эритроцитов к пчелиному яду. В то же время действие ХПМ на яд-индуцированный гемолиз во всех случаях различно: для контрольных и преинкубированных при 49 °С клеток это вещество служит сильным ингибитором, для эритроцитов, обработанных гемин, — сильным активатором.

Таким образом, отмечается очевидное сходство результатов, полученных при яд-индуцированном и гипертоническом гемолизе (0 °С) для эритроцитов с модифицированными белками цитоскелета, но не для контрольных. Клетки,

обработанные геминем и преинкубированные при 49 °С, более чувствительны к действию гиперосмотического стресса (рис. 1, а) и пчелиного яда (таблица) по сравнению с контрольными, в то время как присутствие ХПМ в этих случаях существенно повышает чувствительность гемин-обработанных эритроцитов, а клетки, подвергнутые тепловой обработке, делает менее чувствительными. Наличие сходных реакций в поведении модифицированных эритроцитов может свидетельствовать о сходстве механизмов развития клеточного ответа при повреждениях эндогенного (гиперосмотический лизис) и экзогенного (яд-индуцированный лизис) характера, однако в настоящее время не существует достаточных экспериментальных и литературных данных, позволяющих объяснить наблюдаемый эффект.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробей А.В. Исследование структурных перестроек эритроцитарных мембран, индуцированных действием температуры и анестетиков: Автореф. дис.... канд. биол. наук. – Минск, 1978. – 24 с.
2. Поздняков В. В., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А. Осмолярность среды как принцип устойчивости к замораживанию // Физико-химическое и биологическое действие криопротекторов. — Киев. Наук. думка, 1990. – С. 124–130.
3. Руденко С. В., Нипот Е. Е., Павлюк О. М. Влияние ионов Zn на гемолиз эритроцитов, индуцированный мелиттином // Биохимия. – 1995. – 60, № 5. – С. 723–733.
4. Руденко С. В., Семенченко А. Ю. Изменение объема эритроцитов и спектра мембранных белков, индуцированное мелиттином, фосфолипидом А₂ и пчелиным ядом // Биохимия. – 1995. – 60, № 5. – С. 734–745.
5. 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.
6. Ibanez A., Granath R. The pH dependence of the hemolytic potency of bile salts // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – 1027, № 2. – P. 199–204.
7. Lieber M. R., Lange Y., Weinstein R. S., Steck T. L. Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem. – 1984. – 259, № 14. – P. 9225–9234.
8. Portlock S. H., Clague M. I., Cherry R. I. Leakage of internal markers from erythrocytes and lipid vesicles induced by melittin, gramicidin S and alamethicin: a comparative study // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – 1030, № 1. – P. 1–10.
9. Shalvai N., Avissar N., Rabizadeh E., Shalvai M. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // Biochem. Internat. – 1986. – 13, № 3. – P. 467–477.

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

Поступила 13.03.98

Т. О. ПАРЧЕНКО

ХІМІЧНА МОДИФІКАЦІЯ ЧУТЛИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ДО ГІПЕРОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ ТА ЛІТИЧНОЇ ДІЇ БДЖОЛИНОЇ ОТРУТИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Досліджено вплив деяких модифікаторів цитоскелету на чутливість еритроцитів до температурної та осмотичної дії, а також літичної дії бджолиної отрути. Хлорпромазин підвищує стійкість еритроцитів, модифікованих як геміном, так і температурою 50 °С, до дії гіперосмотичного стресу при 37 °С. Одержано подібні результати про чутливість модифікованих еритроцитів при гіпертонічному гемолізі (0 °С) і гемолізі, спричиненому бджолиною отрутою.

T. A. PARCHENKO

CHEMICAL MODIFICATION OF THE RED CELL SUSCEPTIBILITY TO HYPEROSMOTIC STRESS AND LYTIC ACTION OF THE BEE VENOM

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

There was studied the action of some modifying cytoskeletal agents on the susceptibility of red cells to the temperature and osmotic exposures as well as to the lytic action of the bee venom. Chlorpromazine was found to increase the resistance of red cells, modified both by hemin and temperature of 50 °C, to the action of hyperosmotic stress at 37 °C. Similar results were obtained as to the susceptibility of the modified red cells during the venom-induced and hypertonic hemolysis (at 0 °C).

Р.И.Кратенко

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СЕРОТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПЕРВОГО ТИПА РАДИОЛИГАНДНЫМ МЕТОДОМ

Разработан простой и эффективный метод определения параметров связывания ^3H -серотонина с синапсосомами головного мозга крыс. С помощью этого метода определены кинетические параметры серотониновых рецепторов первого типа.

В последнее время большое внимание ученых привлекает проблема изучения серотонинергических механизмов головного мозга [6, 7]. Особенно перспективным в этой области может быть исследование одного из звеньев серотонинергической медиации — серотониновых рецепторов: изучение их конформации, липидного и белкового микроокружений, связывания с лигандами, влияния различных модуляторов на это связывание [6].

В 1979 году Peroutka S.J. и Snyder S.H. [14] идентифицировали на мембранах мозга крыс два участка связывания серотонинергических лигандов, одни участки метились ^3H -серотонином (серотониновые рецепторы первого типа), другие выявляли аффинитет к ^3H -спироперидолу (серотониновые рецепторы второго типа). В последующем были дополнительно выделены серотониновые рецепторы третьего типа [1, 3, 4].

В качестве методического подхода для исследования кинетических параметров рецепторов используется довольно эффективный радиолигандный метод [6, 14]: связывание меченых по тритию лигандов с мембранными структурами, содержащими рецепторы, которые включают следующие этапы: получение гомогената мембран, инкубация с меченым лигандом, выделение комплекса “лиганд-рецептор” и определение радиоактивности на бета-счетчике.

Основные методические трудности заключаются в выделении комплекса “лиганд-рецептор” из среды инкубации и очищение его от несвязавшейся метки. Некоторые авторы использовали многократное центрифугирование с последующей отмывкой комплекса [5] или осаждение комплекса на разного рода фильтрах [2].

Однако комплекс “лиганд-рецептор” имеет довольно короткий “срок жизни” (до нескольких десятков минут [6]), после чего диссоциирует. Поэтому при многократном повторном центрифугировании часть меченого лиганда, отщепившегося от рецептора, может удаляться с супернатантом. При работе с фильтрами имеются другие недостатки: пористость фильтра — величина нерегулируемая, в связи с чем неизбежны потери комплексов, размер которых меньше, чем диаметр поры [6, 9].

Принимая за основу методику [9], мы предлагаем средой разделения использовать смесь эфиров ортофталевой кислоты (дибутилфталата и динонилфталата, плотность равна $1,013 \text{ г/см}^3$ при 20°C) в таком соотношении, чтобы плотность этой смеси была выше, чем плотность среды инкубации, но ниже, чем осадка.

Таким образом, при центрифугировании комплекс “лиганд-рецептор”, проходя через смесь фильтров, осаждается на дне пробирки Эппендорфа, а несвязавшаяся метка остается в супернатанте.

Сопоставление результатов радиорецепторного анализа, проведенного по методике с использованием смеси масел традиционным методом (применение стекловолокнистых фильтров для отделения комплекса “лиганд-рецептор”), осуществлено на трехмесячных крысах-самцах линии Вистар.

Животных декапитировали, выделяли мозг и препарировали его на льду. Для экспериментов отбирали регионы мозга с наибольшим количеством серотониновых рецепторов первого типа [1, 4]: области вентрального, дорсального гиппокампа, миндалевидного комплекса и стриатума. При разделении мозга на структуры руководствовались атласом De Groot [10].

Радиорецепторный анализ проводили на грубой синапсосомальной фракции [11]. С этой целью свежую ткань мозга гомогенизировали в 50 объемах холодного буфера (50 мМоль трис-НСl, pH 7,4). Образцы инкубировали при 37 °С в течение 10 мин для удаления эндогенного лиганда (серотонина) и центрифугировали при 20 000g в течение 30 мин с последующей промывкой.

В пробирки Эппендорфа вносили смесь дибутилфталата и дионилфталата в количестве 100 мкл и инкубационную среду, содержащую меченый по тритию серотонин (^3H -5-НТ с удельной активностью 8 мКи/моль, производство AMERSHAM, Англия), с диапазоном концентраций от 2,0 до 40,0 нМ. Затем добавляли аликвоты грубых мембран, гомогенизированных в инкубационной среде, которая изготовлялась на буфере (50 мМоль трис-НСl, pH 7,5) с добавлением аскорбиновой кислоты (0,1%), 4 мМоль СаСl, 10 мкМоль паргиллина (ингибитора MAO) и 10 мкМоль амитриптилина (ингибитора обратного захвата медиатора). Инкубация проб проходила в течение 10 мин при 37 °С. Для определения неспецифического связывания реакцию проводили в присутствии немеченого серотонина (серотонина креатин сульфата, производство AMERSHAM, Англия), конечная концентрация которого составляла 40 мкМоль.

После инкубации образцы помещали на 15 мин на лед для остановки реакции, а затем центрифугировали на миницентрифуге при 12 000g в течение 5 мин. Осадок растворяли в 0,1 н НСООН и добавляли по 7 мл сцинтиляционной жидкости ЖС-8. Радиоактивность проб измеряли на счетчике СБС-2. Уровень специфического связывания составлял около 45% от общего. Кинетические параметры рецепторов — константу диссоциации (K_d) и максимальное количество связывающих мест (M_{max}) — определяли согласно описанию Скэтчарда с применением машинной обработки результатов.

Связывание ^3H -5-НТ описывалось по двуцентральной модели и для доказательства наличия высоко- и низкоаффинного пулов серотониновых рецепторов первого типа были рассчитаны величины коэффициента Хилла.

При исследовании грубой синапсосомальной фракции структур головного мозга крыс были получены результаты, приведенные в таблице.

Параметры связывания ^3H -серотонина (^3H -5-НТ) с серотониновыми рецепторами первого типа структур головного мозга крыс

Структуры головного мозга	K_d , нМ		B_{max} , фмоль/мг	
	высокоаффинный пул	низкоаффинный пул	высокоаффинный пул	низкоаффинный пул
Гиппокамп вентральный	$4,75 \pm 0,27$	$9,66 \pm 0,52$	$154 \pm 9,52$	$151 \pm 9,44$
Гиппокамп дорсальный	$3,69 \pm 0,07$	$7,42 \pm 0,15$	$263 \pm 9,08$	$261 \pm 8,92$
Миндалины	$4,11 \pm 0,09$	$8,29 \pm 0,18$	$225 \pm 18,8$	$223 \pm 18,5$
Стриатум	$1,47 \pm 0,12$	$3,04 \pm 0,24$	$227 \pm 9,67$	$208 \pm 7,41$

Абсолютные значения результатов вполне сопоставимы с данными авторов [12], в работах которых приводятся аналогичные константы диссоциации и количества мест связывания ^3H -5-НТ с синапсосомами коры, гиппокампа, полосатого тела головного мозга крыс.

Сохраняется тенденция относительно сродства к селективному лиганду и количества серотониновых рецепторов первого типа вентрального, дорсального гиппокампа и миндалевидного комплекса [2].

Связывание ^3H -5-HT, приведенное в этих работах, удовлетворяет одноцентральной модели, что соответствует однородности пула серотониновых рецепторов первого типа.

Вместе с тем необходимо отметить, что серотониновые рецепторы первого типа являются гетерогенной группой. В частности, И. И. Абрамец при идентификации серотониновых рецепторов первого типа использовал спироперидол, который двухфазно ингибировал связывание ^3H -серотонина с мембранами мозга крыс [1]. Участки связывания, из которых ^3H -5-HT вытеснялся наномолярными концентрациями спироперидола, определялись как серотониновые рецепторы типа 1A, а микромолярными — серотониновые рецепторы типа 1B.

Согласно данным D. L. Nelson и соавт. [13], в головном мозге крыс существуют множественные участки, связывающие серотонин в наномолярных концентрациях. О множественности этого типа рецепторов свидетельствует также фармакологический анализ поведенческих эффектов серотонина [8].

Поскольку в вышеперечисленных работах для выделения комплекса "лиганд-рецептор" авторы использовали стекловолоконистые фильтры, то расхождение результатов при идентификации пулов серотониновых рецепторов первого типа можно объяснить различным диаметром пор фильтров и, как следствие, потерей комплексов, размеры которых меньше, чем диаметр пор.

Таким образом, полученные результаты подтверждаются данными литературы, что говорит о достаточной точности предложенного метода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамец И. И. Типы центральных серотониновых рецепторов, их функциональная роль и участие в действии психофармакологических средств // Фармакология и токсикология. — 1990. — Т. 53, № 3. — С. 70–75.
2. Гопкалов В. Г. Серотониновые рецепторы первого типа у крыс с различным уровнем аудиогенной возбудимости головного мозга: Биологически активные вещества и регуляция функций мозга // Сб. науч. трудов. — Харьков, 1990. — С. 46–48.
3. Корнеев А. Я. Радиолигандный анализ и функциональная гетерогенность 5-HT₂- и 5-HT₃-рецепторов // Нейрохимия. — 1989. — Т. 8, № 4. — С. 111–134.
4. Корнеев А. Я. Радиолигандный анализ и функциональная гетерогенность 5-HT₁-рецепторов // Нейрохимия. — 1990. — Т. 9, № 1. — С. 125–140.
5. Мясоедов В. В. Характеристика альфа-адренорецепторов у крыс с различной аудиогенной возбудимостью головного мозга: Биологически активные вещества и регуляция функций мозга // Сб. науч. трудов. — Харьков, 1990. — С. 42–46.
6. Сергеев П. В., Шимановский Н. Л. Рецепторы физиологически активных веществ. — М.: Медицина, 1987. — 400 с.
7. Сергиенко Н. Г., Грищенко В. И., Логинова Г. А. Биогенные моноамины и возбудимость головного мозга. — Киев: Наук. думка. — 1992. — 148 с.
8. Barrett R. J., Blackhear M. A., Sanders-Bush E. Discrimination stimulus properties of 1-5-Hydroxytryptophan: behavioral evidence for multiple serotonin-receptors // Psychopharmacology. — 1982. — V. 76. — P. 29–35.
9. Booth A. G., Olaniyan R., Vanderpuye O. A. // Placenta. — 1980. — № 1. — P. 327–333.
10. De Groot J. The rat forebrain in stereotaxis coordinates. — 1959. — 48 p.
11. De Robertis E. Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region // Science. — 1967. — 156, № 4. — P. 907–914.
12. Leysen J. E. Serotonin receptors in brain tissues properties and identification of various ^3H -ligand binding sites *in vitro* // J. Physiol. (Paris). — 1981. — V. 77. — P. 351–362.
13. Nelson D. L., Pedigo N. W., Yamamyra H. A. Multiple H-5-hydroxytryptamine binding sites in rat brain // J. Physiol. (Paris). — 1981. — V. 77. — P. 369–372.
14. Peroutka S. J., Lebovitz R. M., Snyder S. H. Serotonin receptor binding sites affected differentially by guanine nucleotides // Mol. Pharmacol. — 1981. — V. 16. — P. 700–708.

Р. І. КРАТЕНКО

ВИЗНАЧЕННЯ КІНЕТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ СЕРОТОНІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ ПЕРШОГО ТИПУ РАДІОЛІГАНДНИМ МЕТОДОМ

Харківський державний медичний університет

Розроблено простий та ефективний метод визначення параметрів зв'язування ^3H -серотоніну з синаптосомами головного мозку щурів. За допомогою цього методу визначені кінетичні параметри серотонінових рецепторів першого типу.

R. I. KRATENKO

DETERMINATION OF THE KINETIC PARAMETERS OF SEROTONIN RECEPTORS OF THE FIRST TYPE WITH A RADIOLIGAND METHOD

Kharkov State Medical University

There was developed a simple and effective method for determining the parameters of binding of ^3H -serotonin with the synaptosomes of the rat brain. The kinetic parameters of the serotonin receptors of the first type were determined with the help of this method.

УДК 612.44-592:615-441-02:616.441-089.87:617-089.843

Ю.І.Караченцал

АУТОІМУННІ ТИРЕОПАТІЇ ТА НИЗЬКІ ТЕМПЕРАТУРИ

Узагальнено погляди на проблему аутоімуних тиреопатій. Дано сучасні уявлення про патогенетичні механізми їх розвитку, особливості еволюції лікування. Описано умови фізіологічної та патофізіологічної дії низьких температур на рівнях організму та клітин. Наведено дані про патогенетичність та ефективність локальної кріодеструкції щитовидної залози як методу лікування аутоімуного тиреоїдиту.

Найбільш актуальними проблемами клінічної ендокринології є профілактика, діагностика і лікування захворювань щитовидної залози (ЩЗ).

Аутоімунні тиреопатії — група найчастіших захворювань ЩЗ, які з позицій етіології є “продуктом” взаємодії біологічних, соціальних та середовищних факторів, а з позицій патогенезу — наслідком специфічного аутоімуного процесу.

В останні 10 років захворюваність на аутоімуний тиреоїдит (АІТ) зросла більше, ніж у 10 разів [6]. За даними І.Д.Левіта на підставі аутопсійних досліджень доведено, що частота АІТ серед населення складає 2–3% [13].

У теперішній час АІТ складає до 46% усієї тиреоїдної патології. Жінки хворіють у 15–20 разів більше чоловіків, переважно у віці 30–50 років. Але АІТ спостерігається також у дітей і літніх людей.

Зростання кількості аутоімуних захворювань ЩЗ загострює і онкологічні аспекти проблеми, бо наявність АІТ у 75 разів підвищує ризик виникнення злоякісних лімфопроліферативних захворювань [23], а регенераційно-проліферативні диспластичні зміни ресструються у 48,4% хворих [28]. У зв'язку з цим необхідно розробити ефективні методи імунотерапії і різні методи симптоматичного лікування процесів адаптації [16].

Вважається, що при АІТ базисним є розлад гуморального механізму імунітету, тобто продукція антитіл до тиреоїдних антигенів, проте ініціальну патогенетичну роль відіграє дефіцит Т-супресорів, який відкриває можливості включення клону “заборонених” В-лімфоцитів, що виробляють аутоантитіла.

При уродженому або набутому дефекті активності Т-супресорів “заборонені” клони лімфоцитів “заселяють” ЩЗ і взаємодіють з органоспецифічними антигенами безпосередньо або через клітини-хелпери. Внаслідок цього до процесу залучаються В-лімфоцити, які продукують антитіла. Тиреоїдний епітелій ушкоджується, тканина ЩЗ інфільтрується лімфоцитами. На цій

підставі АІТ розглядають не як гіперфункцію імунної системи, а як її дисфункцію у зв'язку з недостатністю регуляторних механізмів, порушенням системи імунного контролю в організмі. АІТ — класичний варіант полігенного синдрому з успадкованою схильністю, при якій аутоімунна атака фолікулярних структур ЩЗ детермінується взаємодією успадковано-генетичних та ендогенних провокуючих факторів.

Складним аспектом АІТ є його лікування. Найбільш розповсюджені методи лікування АІТ — медикаментозний та хірургічний — мають ряд недоліків.

Медикаментозний метод включає замісну гормональну терапію, прийом глюкокортикоїдів як імунодепресантів, використання імуномодуляторів:

Замісна гормональна терапія потребує довготривалого та безперервного прийому препаратів. Вона не впливає радикально на ланки патогенезу АІТ. Під впливом тироксину активується більше 100 ферментних систем, зростає інтенсивність синтезу білка. Проте бурхливий неспецифічний характер активації навряд чи може привести до швидкої та довготривалої спеціалізації функцій імунокомпетентних клітин. Відомо про резистентність організму до тиреоїдних гормонів, непереносимість їх через алергію [4]. До того ж використання замісної терапії може призвести до порушень регенерації фолікулярного епітелія, зниження компенсаторних можливостей ЩЗ [9].

Катаболічна дія глюкокортикоїдів на структуру лімфоїдної тканини [2] та зміна при цьому процесів імуногенезу (гальмування темпів синтезу антитіл, зниження титру комплементу та пригнічуючий вплив на запальні процеси) припускають доцільність їх використання у терапії АІТ [30]. Але застосування глюкокортикоїдів також має багато обмежень та недоліків. Використання різних методичних підходів до вживання імуномодуляторів (інтенсивний плазмаферез, прийом тималіну тощо) має короткочасний позитивний патогенетичний вплив — імунотропний ефект при монотерапії зберігається тільки 1–3 місяця [3,21].

Хірургічний спосіб лікування АІТ, який полягає в резекції усієї або деякої частини залози, нерідко неефективний і навіть небезпечний через можливі ускладнення. Це пов'язано з розвитком гіпотиреозів (до 85%) при тотальних тиреоїдектоміях та псевдорецидивів при парціальних.

Еволюція поглядів на патогенез АІТ закономірно звузила показання до хірургічного лікування АІТ: виникнення симптомів механічного стискання органів ший гіперплазованою, фіброзно-зміненою тиреоїдною тканиною або сонографічні та цитологічні ознаки тиреоїдної метаплазії. Таким чином, наведені факти свідчать про необхідність перегляду існуючих точок зору на корисність застосування традиційних методів лікування [5] та пошуку нових, більш ефективних, патогенетичних методів. Деякі вчені віддають перевагу фізичним методам впливу на організм і його системи з метою модуляції їх функціонального стану (лазерне опромінення, високочастотні струми, ультразвуковий вплив, низькі температури). Що стосується низьких температур, то з давніх часів охолодження всього тіла або його частин використовували при лікуванні запальних процесів, ран, кровотечі, больових синдромів тощо.

При визначенні поняття “низька температура” виникають значні труднощі, тому що фізіологічне визначення холоду є умовним. Виділяють три основних напрямки застосування холоду для лікування: 1) кріодеструкція, яка використовується для руйнування тканин, переважно пухлинного походження, що досягається охолодженням їх до температури нижче рівня кріотривкості; 2) стимулююча дія холоду за рахунок зниження температури до зна-

чень, близьких до порогу кріотривкості тканин людини; 3) зменшення інтенсивності обмінних процесів при гіпотермічному рівні охолодження.

Види і ступені виразності можливих реакцій біологічних систем на локальне охолодження залежать від температурно-часових параметрів. Критичні для загибелі клітин у складі організму температури приблизно відповідають інтервалу $-15 \div -20$ °C, хоча значення критичної температури специфічне для різних типів тканин внаслідок різної чутливості клітин до кріодії. Прикладом цього є дані О.І.Пачеса [19], який пропонує “свій” інтервал критичних температур: від -5 до -50 °C. Температура нижче -50 °C не приводить до підвищення летальності, тому що у клітинах заморожується вся або майже вся рідина, і такі фактори, як майже повна відсутність рідинної фази і низька температура, поєднуються, уповільнюючи несприятливі хімічні реакції. Автор наводить цікаві для клініцистів дані: при подальшому зниженні температури виживаність клітин знову починає зростати, досягаючи, наприклад, для ракових клітин приблизно 15% при -100 °C, тобто, складаючи приблизно стільки ж, скільки при охолодженні до -20 °C [12]. Виживаність клітин цього типу знову падає до нуля лише при температурі -140 °C.

Аналіз даних літератури дозволяє зробити узагальнюючий висновок, що в більшості випадків задовільні характеристики режимів локального руйнування біологічної тканини можуть бути отримані шляхом використання азотного температурного рівня ($-180 \div -196$ °C) [10]. Важливе значення при застосуванні у кріомедицині таких температур має швидкість заморожування.

Позаклітинна кристалізація та дегідратація клітин при повільному охолодженні є одним з факторів кріопшкодження. Дуже швидке охолодження супроводжується утворенням дрібних кристалів льоду, які під час повільного відігрівання після аплікації рекристалізуються, перевищуючи початкові розміри, та руйнують тим самим клітину.

Вимерзання води у процесі охолодження призводить до росту концентрації електролітів у навколишньому середовищі, дуже негативно впливаючи на стабільність ліпідобілкових комплексів мембран клітин: утворюються зони дефектів у плазматичній мембрані і внаслідок цього позаклітинні іони потрапляють до клітини. Збільшення розмірів кристалів води викликає значні зміни *pH* середовища, а також порушення міжмолекулярних зв'язків у рідинній фазі мікроканалів. Це значить, що тканини з більшим вмістом інтерстиціальної рідини повинні мати знижену кріостійкість [20]. Досить докладно вивчена і реакція судинного русла на холод. У загальних рисах вона зводиться до того, що безпосередньо після відігрівання замороженої області відбувається повне або часткове відновлення кровотоку і збільшення просвіту судин. Однак через деякий час виникають стази крові, агрегація формених елементів і тромбоутворення.

Незворотна закупорка судин обумовлює порушення процесів обміну в тканині та наступне поглиблення деструктивних змін. Вказані гемореологічні зміни відіграють вирішальну роль у формуванні ішемічного некрозу. Погіршення суспензійної стабільності крові і збільшення агрегації її формених елементів призводять до стазу крові та її руйнування. Це негативно позначається на транспортній функції крові, що поглиблює явища тканинної гіпоксії.

Штучна ішемізація тканин перед кріовпливом зменшує деструктивний ефект заморожування [8]. У зв'язку з цим можливо припустити, що штучне надмірне наповнення кров'ю тканин буде сприяти посиленню в них деструктивних процесів при кріовпливі.

Як видно, загибель клітинних елементів тканини обумовлена ушкодженням температурних режимів і супровідними їх судинними змінами. Патогенез некротизації і регенерації тканин під впливом їх температур обумовлений комплексом структурно-функціональних змін в осередку пошкодження та в усьому організмі.

Необхідно відзначити, що формальне вивчення тільки морфологічних характеристик клітин і окремих клітинних структур може призвести до викривлення результатів [12], оскільки існує суттєва різниця між заморожуванням ізольованих клітин *in vitro* та клітин у складі тканин *in vivo*. Ця різниця полягає в тому, що клітини в тканинах розташовані на різних відстанях від робочої поверхні кріозонду і тому підвладні дії режимів охолодження та відігрівання, які відрізняються. Тим часом після кріодії на будь-які тканини і в організмі в цілому розвиваються процеси, які можна розглядати і як адаптаційно-приспосувальні реакції.

Адаптація є поняттям, яке відноситься, як правило, до всього організму [1]. Усі біологічні системи мають адаптаційні властивості, які розвивались у процесі еволюції і спадково закріплені. Будь-який вид адаптації створюється на основі принципів гомеостазу. У зв'язку з цим механізм адаптаційних кріозалежних процесів (перш за все імуностимулюючих і репараційних) можна розглядати з точки зору "тканинної терапії", яка спрямована на відновлення і тимчасове заміщення функцій.

Можливо, початковим ініціюючим фактором "тканинної терапії" після локальної кріодеструкції є розвиток температурного шоку і руйнування плазматичної мембрани та її внутрішньоклітинних структур. Природно, що це призводить до вивільнення біологічно активних речовин, які є антигенною масою.

У 70-і роки був описаний так званий ішемічний токсин [17]: Вважалося, що в ішемізованій тканині виникають і накопичуються токсичні речовини, які викликають порушення гомеостазу і включення відповідних адаптаційних процесів в організмі. На думку авторів, ішемічний токсин — це низькомолекулярні токсичні речовини (з молекулярною вагою приблизно 12 000), поява яких пов'язана з інтенсивним білковим розпадом. Вміст цього токсину в міжклітинному перфузаті тим більший, чим більша інтенсивність ушкоджуючого фактора (але з часом його активність падає). Чи не є це основою сучасної концепції тканинної терапії?

В останні роки принципи тканинної терапії знайшли подальший розвиток і нове трактування. Так, В. І. Грищенко та співавт. [20] вказують на те, що внаслідок кріовпливу відбувається всмоктування продуктів розпаду тканин із зон некрозу і дистрофічних змін. Це має імуностимулюючий ефект, поліпшує репаративну регенерацію. Таким чином, наявний ще один альтернативний механізм, який пояснює позитивний вплив на організм локальної кріодеструкції.

Методи низькотемпературного впливу використовуються в онкології, дерматології, ЛОР-практиці тощо. В ендокринології кріометоди застосовуються лише при лікуванні пухлин гіпофізу, захворювань підшлункової залози, для пригнічення функції надниркових залоз.

В окремих роботах щодо вивчення реакції ендокринної системи на вплив холоду відзначено, що первинна реакція організму на охолодження полягає у виділенні щитовидною залозою гормонів внаслідок активізації гіпоталамусу за рахунок нервової стимуляції, яка виникає у зв'язку з дією охолодженої крові, що потрапляє в гіпоталамус. У результаті збільшується секреція серо-

тоніну та соматостатину [25]. Відзначається, що під впливом заморожування підвищуються здатність ЩЗ органіфікувати йодіди, базальна активність аденілатциклази, чутливість системи, яка досліджується, до фториду, у той час як мембранний комплекс гормонорецептор-аденілатциклаза зберігається після вказаного впливу в незмінному вигляді [7]. Таким чином, ЩЗ людини та тварин характеризується певною кріостійкістю.

Вивчення впливу низьких температур на імунні реакції організму показує, що навіть одноразова локальна кріоаплікація тканини призводить до появи аутоантитіл, титр яких зростає на 7–10-у добу, після чого швидко знижується. Багаторазовий кріовплив викликає більш раннє та більш інтенсивне утворення антитіл з високим ступенем видової та тканинної специфікації [24].

Інтенсивність відповідної реакції гуморального типу на кріовплив залежить від багатьох факторів і кріочутливості тканини, часу, глибини проморожування, рівня імунореактивності організму. При кріовпливі поряд з реакцією гуморального типу розвивається виразна клітинна імунна реакція, навіть після одноразової локальної кріоаплікації, коли гуморальна реакція ще не спостерігається.

Динаміка змін кількості Т- і В-лімфоцитів після кріовпливу не завжди буває однотипною. У деяких дослідженнях на фоні зростання кількості Т-клітин вміст В-клітин не змінювався або знижувався [11]. У незначній кількості випадків після кріовпливу короткочасно зменшується вміст Т- і В-клітин з подальшим його швидким нарощуванням.

Ті чи інші реакції організму у відповідь на кріовплив обумовлені, мабуть, співвідношенням клітинних та гуморальних реакцій. Вважається, що лікувальний імунокорегуючий ефект від кріовпливу відмічається у тих випадках, коли індукуються реакції клітинного Т-залежного імунітету або ці реакції превалюють над гуморальними, або гуморальна відповідь проявляється у вигляді продукції цитотоксичних антитіл.

Механізм імунокорегуючої дії кріовпливу полягає в тому, що масивне звільнення тканинно-специфічних антигенів індукує продукцію цитотоксичних лімфоцитів і антитіл [11]. Надмірне надходження антигена не тільки обумовлює підвищену продукцію антитіл, але й призводить до інактивації антитіл відповідно до їх утворення. Антигени вивільняються з тканин і клітин у результаті розриву або порушення проникності клітинних мембран. Можливо, має місце холодова денатурація білка, яка надає йому нової імуногенної якості. Кількість і характер антигенів, які виникають під впливом кріодеструкції, залежать від глибини проморожування, кількості процедур, якості тканини, на що, безперечно, впливають характер місцевого запального процесу у прилеглих тканинах, ступінь розвитку місцевої капілярної мережі, лімфатичних судин.

Як відомо, ЩЗ у анатомічному відношенні є найбільш лімфо- та гемотропним органом в організмі людини [22]. Але до останнього часу ЩЗ у кріобіологічному аспекті розглядалася лише з позиції консервування для подальшої трансплантації [15]. Встановлено, наприклад, що в процесі трирічного зберігання кріоконсервованих клітин ЩЗ синтезуюча активність білка та вміст в них функціонально-активної індивідуальної матричної рибонуклеїнової кислоти для синтезу тиреоглобуліну не змінюються. Проте роботи, що стосуються методу кріодеструкції при тиреопатіях, повністю відсутні. Застосування цього методу було б ефективним при рецидивах захворювань ЩЗ, коли спостерігаються значний спаєчний процес, проростання капсули зоба в оточуючі тканини, наявність пошкодження зворотних нервів під час попереднього



You have either reached a page that is unavailable for viewing or reached your viewing limit for this book.

15. *Македонская В.А., Лях И.А., Пушкарь Н.С.* Эффект трансплантации криоконсервированной щитовидной железы при различных формах гипотериоза // Современные проблемы клинической эндокринологии: Тез. докл. науч.-практ. конф., посвященной 25-летию новой клиники Укр. НИИ фармакотерапии эндокринных заболеваний. Харьков, 25 июня 1993 г. – Харьков, 1993. – С. 38–39.
16. *Метод лікування аутоімунного тиреоїдиту за допомогою інтраопераційного кровопливу на щитовидну залозу / Ю. І. Караченцев, І. В. Гопкалова, І. О. Лях та ін.* // Інформ. лист; Укр. НДІ фармакотерапії ендокринних захворювань; М-во охорони здоров'я України. – Київ, 1997. – 2 с.
17. *Оксман Т.М., Далин М.В.* Ишемический токсин // Докл. АН СССР. – 1971. – Т. 199, № 4. – С. 980–983.
18. *Пат. 17493 А UA, МКВ⁶ А61 В 17/36.* Спосіб лікування аутоімунного тиреоїдиту / Ю. Караченцев, В. Натаров, І. Гопкалова, І. Лях, Укр. НДІ фармакотерапії ендокринних захворювань (UA). – № 95083944; Заяв. 28.08.95; Опубл. 06.05.97; Пріоритет 23.01.93, Бюл. № 5. – 4 с.
19. *Пачес А.И.* Итоги и перспективы криогенного метода лечения опухолей головы и шеи // Криохирurgia. – 1979. – Вып. 3. – С. 21–23.
20. *Практическая криомедицина / Под ред. В.И. Грищенко, Б.П. Сандомирского.* – Киев: Здоров'я, 1987. – 245 с.
21. *Рафибеков Д.С., Калинин А.П.* Аутоиммунный тиреоидит / Под ред. Х.С. Березова. – Бишкек: Изд-во Кирг. гос. мед. академии. – 1996. – 158 с.
22. *Серпуховитин С.Ю., Казеев К.Н., Бухман А.И.* К оценке некоторых важнейших методов диагностики состояния щитовидной железы и ее лимфатических путей // Здравоохранение (Кишинев). – 1979. – № 3. – С. 10–25.
23. *Цыб А.Ф., Поверный А.М.* Вероятные причины заболеваний щитовидной железы у пострадавших в результате Чернобыльской аварии // Тез. докл. радиологического съезда. Пушино, апрель 1993 г. – Пушино, 1993. – С. 1086.
24. *Ablin J.R.* An Appreciation and Realization of the Concept of Cryoimmunology // Percutaneous Prostate Cryoablation / G. M. Onik et al. (Eds.). – Quality Medical Publishing, Inc., St. Louis, 1995. – P. 136–154.
25. *Fregly H.T.* Activity of hypothalamic pituitary thyroid axis during exposure to cold // Pharmacol and other. – 1989. – Vol. 4, № 1–2. – P. 85–142.
26. *Mazur P.* The freezing biological systems // Cryobiology. – 1970. – 16, № 8. – P. 939–949.
27. *The low temperatures and laser therapy for immunorehabilitation of autoimmune thyroiditis patients / Ju. Karachenzev, I. Gopcalova, J. Liach et al.* // International Journal on Immunorehabilitation. – 1997. – № 4. – P. 104.
28. *Williams E.D.* Malignant Lymphoma of the thyroid // J. Clin. Endocrinol. Metabol. – 1981. – Vol. 10, № 2. – P. 384–389.

Укр. НДІ фармакотерапії ендокринних захворювань,
м. Харків

Надійшла 04.05.98

Ю. И. КАРАЧЕНЦЕВ

АУТОИММУННЫЕ ТИРЕОПАТИИ И НИЗКИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

Украинский НИИ фармакотерапии эндокринных заболеваний, г. Харьков

Обобщены взгляды на проблему аутоиммунных тиреопатий. Даны современные представления о патогенетических механизмах их развития, особенностях эволюции лечения. Описаны условия физиологического и патофизиологического действия низких температур на уровнях организма и клеток. Приведены данные о патогенетичности и эффективности криодеструкции щитовидной железы как метода лечения аутоиммунного тиреоидита.

YU. I. KARACHENTSEV

AUTOIMMUNE THYROPATHIES AND LOW TEMPERATURES

Ukrainian Scientific-Research Institute of Pharmacotherapy of Endocrine Diseases, Kharkov

The opinions as to the problem of the autoimmune thyropathies are summarized. There are presented current notions of the pathogenic mechanisms of their development, distinguishing features of the evolution of therapy. The conditions of the physiological and pathophysiological action of low temperatures at the levels of the organism and cells are described. The data on the pathogenetic features and efficiency of cryodestruction of the thyroid gland as a method of treatment of the autoimmune thyroiditis are submitted.

Е.К.Андреева, Э.А.Ромоданова, Т.С.Дюбко, С.В.Гаташ, В.А.Гаврик

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ ФИБРИНОГЕНА

Исследование спектральных свойств собственных хромофоров фибриногена и флуоресцентного зонда 4-диметиламинохалкона (ДМХ) показало, что скорость охлаждения растворов белка влияет на изменение его макроструктуры.

Проблемы криоконсервации крови определяют интерес к структурным изменениям белков плазмы крови при охлаждении. Фибриноген, являясь одним из самых крупных по размеру белков плазмы крови, известен гетерогенностью своих форм [1, 12]. Ряд публикаций [3, 7] посвящен конформационным изменениям фибриногена (обратимым и необратимым) в области положительных значений температуры.

Меньше исследовано изменение макроструктуры под влиянием низких температур [10]. В настоящем сообщении приведены результаты изучения влияния глубокого охлаждения (до 77 К) на спектральные свойства фибриногена, выделенного из плазмы крови человека.

Концентрация растворов фибриногена составляла 2 мг/мл. Степень его очистки (94%) определялась по количеству белка, который осаждался тромбином. В работе использовали фибриноген и тромбин-препараты Харьковской областной станции переливания крови. Образцы охлаждали с двумя различными скоростями изменения температуры (°С/мин): $V_1 = 5$ и $V_2 = 1$ [6]. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре "Hitachi-3210", а спектры флуоресценции — на спектрофотометре "Hitachi F4010" при возбуждении светом с длинами волн 280, 296 и 305 нм.

Фибриноген относится к белкам с коротковолновым положением спектра поглощения ($\lambda_{\max} = 338$ нм). После действия низких температур положение максимума не изменяется, но в длинноволновой части спектра появляется новая, "аномальная" полоса, характерная для белков с гидрофобным микроокружением хромофоров [11, 13]. Это может быть связано с изменением электростатического взаимодействия триптофанилов с соседними ионогенными группами или диэлектрических свойств микроокружения [2]. Более чувствительными к таким изменениям являются спектры флуоресценции, особенно двухволновой параметр B [4]. Изменения этого параметра коррелируют с изменением положения спектра флуоресценции, но определяются более точно. В работе определялись параметры A и B как отношения интенсивностей на коротко- и длинноволновых участках спектра флуоресценции при возбуждении светом 296 и 280 нм [8]:

$$A = (I_{320}/I_{365})_{296}, B = (I_{320}/I_{365})_{280}, \Delta = B - A,$$

где I_{320} и I_{365} — интенсивности при 320 и 365 нм соответственно. Для контрольного образца и разных скоростей замораживания V_1 и V_2 величины параметров приведены в табл. 1.

Параметр B для контрольного образца равен 0,95, что соответствует величине диэлектрической постоянной ϵ' микроокружения триптофанилов 60 [4]. Это зона плавного изменения B . Действие низких температур приводит к увеличению B , что указывает на уменьшение диэлектрической постоянной микроокружения триптофанилов. После замораживания увеличивается также параметр A . Однонаправленное изменение A и B приводит к тому, что Δ не

меняется и для всех образцов составляет величину, равную 0,13. Такое высокое значение Δ указывает на существенный вклад тирозилов в спектр флуоресценции фибриногена, а соотношение вкладов остатков триптофана и тирозина после замораживания-оттаивания не меняется. Однако наблюдается резкое уменьшение интенсивности флуоресценции $I_{\max}$, что по сравнению с контрольным образцом при возбуждении светом с длинами волн 280, 296 и 305 нм для образца, охлажденного со скоростью V_1 , составляет 27, 57 и 53% соответственно, а для образца, охлажденного со скоростью V_2 , — 35, 50 и 59%. При смене длины волны возбуждающего света с $\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм на $\lambda_{\text{ex}} = 305$ нм для контрольного образца положение максимума спектра флуоресценции не меняется и остается при 343 нм. После действия низких температур наблюдается “красный” сдвиг спектра флуоресценции, наиболее выраженный для образца, охлажденного со скоростью V_1 . Такой эффект может быть связан с изменением состояния диссоциирующих групп или диэлектрической проницаемости микроокружения индольного кольца [9]. Влияние низких температур приводит к изменению формы спектра флуоресценции, возбуждаемого длинноволновым светом 305 нм: появляется новая полоса, что видно из результатов, приведенных на рисунке.

Появление новой полосы флуоресценции объясняют сдвигом перехода ${}^1L_R$, очень чувствительного к изменению микроокружения индольного кольца [2].

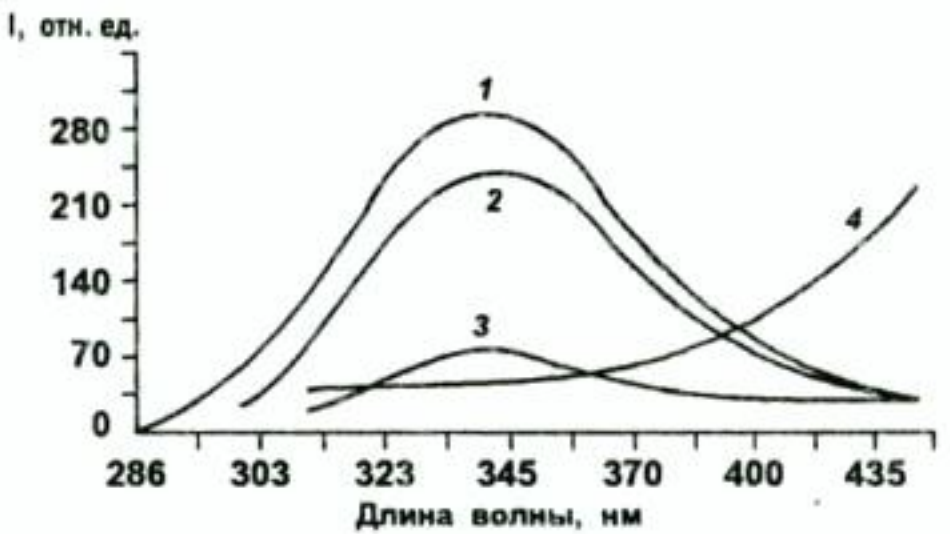
Для выявления изменений макроструктуры был использован флуоресцентный зонд 4-диметиламинохалкон. По спектрам поглощения и флуоресценции ДМХ можно оценить диэлектрическую постоянную центров связывания зонда в пределах 18–20 ($Z = 76 - 66$). Действие низких температур вызывает “синий” сдвиг спектров поглощения ($\lambda_{\max \text{ absorb}}$) и “красный” сдвиг спектров флуоресценции ($\lambda_{\max \text{ fluor}}$) ДМХ, что приводит к увеличению стоксова сдвига ($\Delta\lambda_{\max}$).

Увеличение стоксова сдвига обычно связывают с увеличением времени жизни возбужденного состояния зонда в среде с высокой диэлектрической постоянной и низкой вязкостью [5]. Но коротковолновый сдвиг $\lambda_{\max \text{ absorb}}$, наблюдаемый после охлаждения (табл. 2), характерен для более гидрофобного окружения зонда. Следовательно, можно сделать вывод об уменьшении вязкости или увеличении подвижности в микроокружении зонда.

Т а б л и ц а 1

Значения двухволновых параметров для спектров флуоресценции растворов фибриногена

Образец	<i>B</i>	<i>A</i>	Δ
Контроль	0,95	0,82	0,13
V_1	1,01	0,87	0,13
V_2	1,00	0,87	0,13



Спектр флуоресценции раствора фибриногена, возбуждаемого светом 305 нм: 1 — контрольный образец; 2 — после замораживания в режиме V_1 (5 °C/мин); 3 — после замораживания в режиме V_2 (1 °C/мин); 4 — отношение интенсивностей спектров $(I_1/I_2) \cdot 200$, где I_1 и I_2 — интенсивности для режимов V_1 и V_2 соответственно

Т а б л и ц а 2

Параметры спектров ДМХ в растворах нативного и подвергнутого замораживанию фибриногена

Образец	$\lambda_{\max \text{ absorb}}$, нм	$\lambda_{\max \text{ fluor}}$, нм	$\Delta\lambda_{\max}$, нм	$I_{\max}$, отн.ед.	I_{485}/I_{542} , отн.ед.
Контроль	418,4	531,9	113,3	374	0,45
V_1	415,6	535,9	120,3	271	0,47
V_2	414,9	535,9	121,0	253	0,48

Часть молекулы ДМХ между гетероатомами, ответственная за перераспределение электронной плотности при поглощении, может оказаться в разном химическом окружении. Это определяет гетерогенность центров связывания и проявляется в изменении формы спектра. Для оценки изменения формы спектра флуоресценции вычислялось отношение интенсивностей I_{485}/I_{542} , которое принимало значения 0,45; 0,47; 0,48 для контрольного и охлажденных со скоростями V_1 и V_2 образцов соответственно. Такое изменение указывает на относительное уменьшение длинноволновой (полярной) компоненты спектра флуоресценции ДМХ.

Можно сделать вывод, что гидрофобность центров связывания зонда после охлаждения растворов белка увеличивается, в то время как интенсивность флуоресценции падает.

Уменьшение интенсивности флуоресценции можно объяснить двумя причинами: уменьшением числа центров (после охлаждения "поверхность" белковой молекулы становится более гидрофильной) или проявлением тушащих механизмов (возможность образования водородных связей) при взаимодействии ДМХ с белковой молекулой.

Проведенные эксперименты позволяют сделать вывод, что глубокое охлаждение фибриногена вызывает необратимые изменения его макроструктуры, которые зависят от режима охлаждения. После охлаждения изменяется состояние хромофоров белка: триптофаны находятся в более гидрофобном окружении и создаются благоприятные условия для механизмов, тушащих их флуоресценцию. Изменяются "поверхностные" свойства белка; центры, связывающие ДМХ, оказываются более погруженными в гидрофобную часть молекулы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варецька Т.В. Мікрогетерогенність структури фібрिनотену. Кріофібрінотен // Укр. біохім. журн. – 1960. – Т. 32, № 1. – С. 13–24.
2. Демченко А.П. Ультрафіолетова спектрофотометрія і структура білків. – Київ: Наук. думка, 1981. – 208 с.
3. Зима В.Л., Медвідь Л.В., Варецька Т.В., Коваль В.Г. Флуоресцентні дослідження температурних переходів у фібрінотені та його фрагментах // Доп. АН УРСР. – 1979. – Сер. Б, № 5. – С. 377–379.
4. Зима В.Л., Драган А.І., Богач Р.Г. Флуоресценція і температурно-пертурбаційні диференціальні спектри триптофану у гідрофобному оточенні // Доп. АН УРСР. – 1979. – Сер. Б, № 11. – С. 1016–1019.
5. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
6. Пат. 1802700 МКЛ 5 А61D19/61. Установка для замораживания эмбрионов /Ф. И. Осташко, Н. Д. Безуглый, Е. Г. Валигура, Л. В. Горбунов. Приоритет 29.03.91.
7. Привалов П.А. Энергетика структуры белковых молекул // Биофизика. – 1985. – Т. 30. – Вып. 4. – С. 722–733.
8. Туроверов К.К., Щелчков Б.В. Исследование тепловой денатурации белков с помощью двухволнового метода регистрации изменения спектра их ультрафиолетовой флуоресценции // Биофизика. – 1970. – Т. 15, № 6. – С. 965–972.
9. Черницкий Е.А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке. – Минск: Наука и техника, 1972. – 277 с.
10. Andreeva H.K., Romodanova E.A., Dyubko T.S., Rubina A.V. Freeze-thawing effect on the fibrinogen structure at its solution // 34th Annual Meeting Soc. Cryobiology, 103. – Barcelona, June, 1997. – P. 32.
11. Elodi P., Lokatos S. The anomalous absorption of triptophan // Eur. J. Biochem. – 1973. – V. 36, № 1. – P. 45–52.
12. Ronon Edelmiro, Vila Vistudes, Asnar Justi. Human fibrinogen geterogencity. A study of limited fibrinogen degradations // Chim. acta. – 1989. – V. 184, № 1. – P. 7–17.
13. Strickland E.H., Billups C. Oscillator strength of the 'L_a and 'L_b absorption bands of tryptophan and several other indoles // Biopolymers. – 1973. – V. 12, № 9. – P. 1989–1995.

Харьк. гос. ун-т

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

Поступила 13.03.98

О. К. АНДРЕЄВА, Е. О. РОМОДАНОВА, Т. С. ДЮБКО, С. В. ГАТАШ, В. О. ГАВРИК
**ВПЛИВ РЕЖИМІВ ЗАМОРОЖУВАННЯ НА СПЕКТРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ
РОЗЧИНІВ ФІБРИНОГЕНУ**

Харківський державний університет
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Дослідження спектральних властивостей власних хромофорів фібриногену та флуоресцентного зонду 4-диметиламінохалкону (ДМХ) показало, що швидкість охолодження розчинів білка впливає на зміни його макроструктури.

E. K. ANDREYEVA, E. A. ROMODANOVA, T. S. DYUBKO, S. V. GATASH, V. A. GAVRIK
**ACTION OF THE MODES OF FREEZING ON THE SPECTRAL PROPERTIES
OF THE FIBRINOGEN SOLUTIONS**

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

A study of the spectral properties of the intrinsic chromophores of the protein and fluorescent probe 4-dimethyl aminochalcone (DMC) has shown that the rate of cooling of the solutions affects the changes in the fibrinogen macrostructure.

УДК 57.043:66.095.11

Т.П.Линник

**АМИДЫ АЛИФАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ — ЭФФЕКТИВНЫЕ
КРИОПРОТЕКТОРЫ. I. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
СОЕДИНЕНИЙ РЯДА АМИДОВ**

Представлен анализ литературных данных и собственных исследований структуры и физико-химических свойств соединений ряда амидов. Рассмотрены особенности взаимодействия амидов с водой, а также фазовые диаграммы состояния. Показано, что амиды алифатических кислот обладают сочетанием физико-химических свойств, необходимых для проявления эффективной криозащитной активности, и относятся к перспективным криопротекторам.

Амиды алифатических кислот относятся к одним из немногих классов химических соединений, структура и физико-химические свойства которых дают основание считать их эффективными криопротекторами [18, 22, 28]. Поэтому еще в 50-е годы вещества этого класса были испытаны на криопротекторную активность в отношении ряда биологических объектов [30]. К 70-м годам амиды прочно заняли место среди криопротекторов и по классификации Кагowa А.М. [30] были отнесены к эффективным эндоцеллюлярным криозащитным агентам. Но тем не менее интерес к амидам на долгие годы угас, возможно, причина этого — известные к тому времени данные о токсичности амидов на организменном уровне [8].

В настоящее время амиды низкомолекулярных алифатических кислот снова привлекли внимание кріобіологов и успешно применяются в практике криоконсервирования и как основные криопротекторы при криоконсервации спермы птиц [18, 31] (например, N,N-диметилацетамид (N,N-ДМАЦ), N,N-диметилформамид (N,N-ДМФА)), и как добавки в сложных криозащитных средах (часто в витрифицирующих растворах) [27].

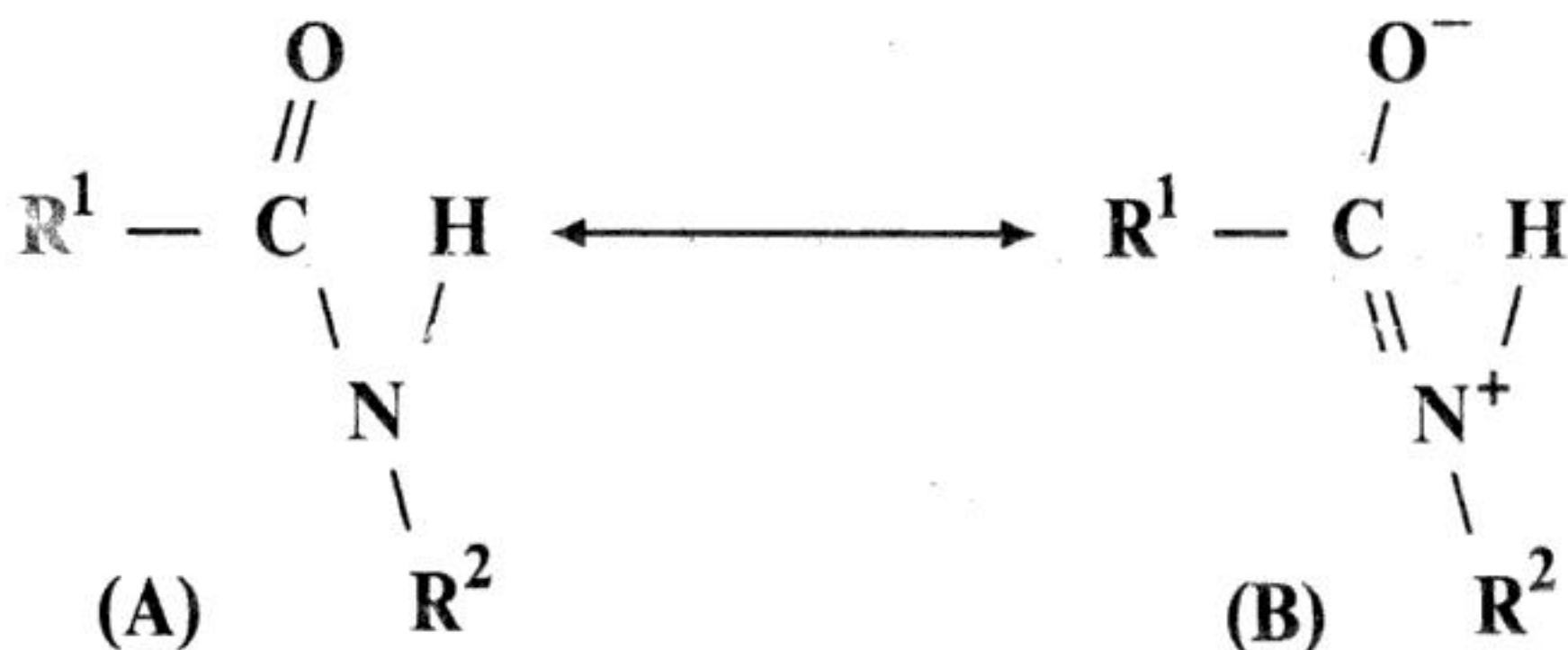
Поэтому целесообразно проанализировать литературные данные и наши собственные исследования о структуре и физико-химических свойствах данного класса соединений, а также их криопротекторной активности.

Известно [17], что реакцию биологического объекта на охлаждение, замораживание и оттаивание определяют состояние и свойства воды в нем: степень и количество связанной воды, осмолярные и термодинамические

свойства, динамика роста и размеры кристаллов льда при кристаллизации и рекристаллизации, характер связей воды с компонентами клеток и окружающей средой. Добавление криопротектора в среду вызывает изменение состояния и свойств воды, и чем сильнее взаимодействие криопротектора с водой, тем значительнее эти изменения. Можно выделить следующие основные факторы, определяющие характер воздействия криопротектора на воду: электрические свойства молекулы (заряд, дипольный момент, поляризуемость); число электродонорных и электронакцепторных центров; размер и форма углеводородной части молекулы; относительное расположение полярных групп в молекуле, их конформация, свобода вращения.

Многие физико-химические свойства амидов могут быть поняты с точки зрения делокализации неподеленной пары электронов азота на π -электроны карбонильной группы. Этот эффект приводит к тому, что связь $C(O)-N$ до некоторой степени имеет свойство двойной, возникает 1,3-диполь, в котором азот обладает частично положительным, а кислород — частично отрицательным зарядом. Планарная природа амидной группы и существование конфигурационных изомеров являются следствием частично неперекрываемого характера связи. Биполярное строение обуславливает донорно-акцепторные свойства амидной группы, проявляющиеся в кислотно-основных взаимодействиях, в склонности к комплексообразованию, а также в тенденции к образованию частичных связей между собой (самоассоциация) и к ассоциации с многими другими функциональными группами. Описаны три типа межмолекулярных ассоциатов амидов [7, 24]: димеры и полимеры, образованные за счет водородной связи карбонильного кислорода и водорода амидной группы, а также диполь-дипольные димеры. Первые два типа образуют первичные (формамид, ацетамид) и вторичные (N-метилформамид, N-метилацетамид) амиды, возникновение третьего типа ассоциатов, вероятно, ограничено третичными амидами (N,N-ДМАЦ, N,N-ДМФА).

В структуре амидов имеются две особенности: 1) существование двух резонансных форм:



в кристаллическом состоянии более вероятен вклад структуры (B); 2) наличие конфигурационных цис- и трансизомеров, возникающих из-за отсутствия свободного вращения вокруг связи $C(O)-N$. По сравнению с вращением вокруг обычной двойной связи вращательный барьер для амидов значительно ниже (88 кДж/моль — для N,N-ДМФА и 75 кДж/моль — для N,N-ДМАЦ, для олефинов — около 167 кДж/моль) и, следовательно, период вращения короче (около 0,1 с). Наличие изомеров становится химически значимым только при низких температурах. Отсутствие свободного вращения вокруг связи $C(O)-N$

должно приводить к значительному вкладу стерических эффектов заместителей атомов водорода амидной группы, что существенно сказывается на свойствах производных амидов.

Незамещенные амиды (формаид, ацетаид) рассматривают как слабые амфотерные соединения, поскольку в определенных условиях они ведут себя как слабые основания или как очень слабые кислоты [24]. В соответствии с их кислотно-основными свойствами амиды действуют как доноры или как акцепторы протона при образовании водородных связей. В таблице представлено количество водородных связей, которое может реализоваться в амидах, для сравнения приведены данные для диметилсульфоксида (ДМСО). Как видно из таблицы, число водородных связей не коррелирует с криопротекторной активностью соединений, лучшие криопротекторы исследуемого ряда имеют меньшее количество возможных водородных связей.

Количество водородных связей, которое может реализоваться в амидах

Вещество	Число протоно-акцепторных центров	Число донорно-акцепторных центров	Число Н-связей
Формаид	3	2	5
Ацетаид	3	2	5
N-метилформаид	3	1	4
N-метилацетаид	3	1	4
N,N-диметилформаид	3	—	3
N,N-диметилацетаид	3	—	3
N,N-диэтилацетаид	3	—	3
ДМСО	4 + 1	—	2 + 1

Вероятно, все объясняется разницей энергии водородных связей, образованных протоно-акцепторными и донорно-акцепторными центрами молекул, хотя единое мнение на этот счет отсутствует [7, 10]. Как считают авторы [12], основной вклад в образование водородных связей амидов с водой обусловлен главным образом карбонильным атомом кислорода, а не группой N–H, и энергия взаимодействия молекулы воды с карбонильной группой больше, чем с амидной. Приведенные в литературе значения энергии Н-связи амидов с водой [2, 7] значительно отличаются, но выявлено, что энергия связи воды с N-замещенными и N,N-замещенными амидами превышает значение энергии водородной связи вода–вода. В то время как сопоставление величин энергии Н-связи (ΔH) для воды, формаида, ацетаида и их водных растворов [9, 26] показывает, что они близки друг другу и составляют около 3,7 ккал/моль, т.е. в растворах незамещенных амидов образуются водородные связи амид–вода, практически эквивалентные по энергии вода–вода.

Результаты исследования взаимодействия амидов с водой [1, 2, 16] вызывают особый интерес, так как отмечается ряд отличий от других классов соединений. Системам вода–амиды присущи следующие особенности: при последовательном замещении атомов водорода в аминогруппе амида на алкильные радикалы эффект смешения с водой становится более экзотермичным (например, возрастает в ряду формаид > N-этилформаид > N,N-диэтилформаид). Подобная тенденция не свойственна другим классам соединений, в которых обычно наблюдается уменьшение экзотермического эффекта с возрастанием размера углеводородного радикала. Установлено также, что при смешении формаида с водой $dH^E/dT < 0$, т.е. экзотермический эффект увеличивается с температурой, в то время как в системе вода–N-диэтилформаид $dH^E/dT > 0$, т.е. убывает с температу-

рой [2]. Отмеченные необычные особенности смешения амидов с водой связывают с уменьшением степени самоассоциации в жидких амидах по мере замещения атомов водорода аминогруппы, затрата энергии на разрушение ассоциатов уменьшается, параллельно возрастает роль экзотермического взаимодействия амид-вода. Особенность растворения ацетамида в воде, сопровождающегося сильным эндотермическим эффектом [4], можно объяснить следующим образом: теплота растворения включает теплоту плавления вещества, т.е. $\Delta H_p = \Delta H_{пл} + \Delta H_{смеш}$. Так как в данном случае $\Delta H_{пл}$ требует огромной затраты энергии (температура плавления ацетамида равна 82,3 °С), она не в состоянии компенсироваться теплотой смешения ацетамида с водой ($\Delta H_{смеш}$).

Предметом дискуссии является также вопрос о характере гидратации N,N-алкильных замещенных амидов. При наличии двух-трех алкильных радикалов в относительно малой по размерам молекуле амида должна иметь место преимущественно гидрофобная гидратация, особым образом стабилизирующая структуру воды, что естественно вызывает интерес к амидам как к потенциальным криопротекторам. Действительно в ряде работ [2, 14, 25] показано наличие гидрофобной гидратации, проявляемой производными амидов, при этом с увеличением размера алкильных радикалов способность к гидрофобной гидратации увеличивается. Отмечается, что усиление взаимодействия вода-вода существенно проявляется только в области малых концентраций амидов (до $X = 0,25$ мольн.доли) [25]. При повышении концентрации данный эффект сменяется разрушением квазиклатратных образований. И все же вопрос о способности замещенных амидов к образованию клатратных структур вокруг алкильных радикалов не получил однозначного решения. По мнению Franks F. [29], амиды не дают клатратов из-за способности их молекул к образованию двух водородных связей с водой через карбонильный кислород. Кесслер Ю.М., Шахпоронов М.И. и др. [13, 25] считают, что это не является убедительной причиной, поскольку известны соединения, способные к образованию водородных связей с водой, но клатраты, устойчивые ниже своей температуры плавления, образуют [13, 14, 16]. Шахпоронов М.И. с соавт. [25] предполагают существование клатратных структур в водном растворе N,N-ДМФА в области малых концентраций при $X_2 = 0,1$ мольн.доли клатратное образование следующего состава: $A \cdot 7^{2/3}H_2O$, при $X_2 = 0,25$ мольн.доли — $A \cdot 5^{3/4}H_2O$. Кесслер Ю.М. с соавт. [14] связывают способность молекул образовывать структуру клатратного типа с донорным числом (ДЧ) вещества. Высказывается мнение, что полярные электродонорные молекулы с гидрофобными группами (типа замещенных амидов) дают клатраты только при низких значениях ДЧ. Так как N,N-ДМФА и N,N-ДМАЦ имеют сравнительно высокие значения донорного числа — 26,6 и 27,8 соответственно, соединения клатратного типа в их водных растворах отсутствуют. Однако такой подход к данному вопросу также не совсем убедительный, соединение гексаметилфосфортриамид (ГМФТ) образует клатраты [5, 21], но донорное число ГМФТ равно 38,8 (т.е. достаточно высокое), и, кроме того, ГМФТ дает две водородные связи через фосфорильный кислород.

В работах [4, 11, 13] детально изучены диаграммы состояния некоторых систем вода-амиды. Такого рода исследованиям в криобиологии придается большое значение, так как фазовые диаграммы плавления бинарных систем криопротектор-вода позволяют решить вопросы как теоретического, так и практического плана при оптимизации методов криоконсервирования [28]. Изучена система вода-формамид, отмечено, что переохлаждения практически

не наблюдается [11]. Причиной этого считают отсутствие в смесях H_2O -формамид преобладания каких-либо определенных ассоциатов. При любом X_2 в жидкой фазе есть образования, облегчающие кристаллизацию. Диаграмма плавкости системы вода-ацетамид обнаруживает малоустойчивое соединение $AC \cdot 3H_2O$, переохлаждение наблюдается только при малых концентрациях ацетамида до $X_2 = 0,2$ мольн.доли.

Система H_2O -N,N-ДМФА [13] склонна к переохлаждению. Зависимость температуры кристаллизации от X_2 показывает, что вплоть до первой эвтектики в жидкой фазе стабилизируется структура, соответствующая структуре кристаллизующейся фазы. Установлено образование устойчивого соединения N,N-ДМФА $\cdot 3H_2O$ ($X_2 = 0,225$ мольн.доли; $T_{пл} = 225,3$ К). Первая эвтектика E_1 при $X_2 = 0,225$ мольн.доли и температуре 223,15 К, вторая эвтектика E_2 при $X_2 = 0,660$ мольн.доли и температуре 144,55 К.

Авторы [3] исследовали диаграмму состояния H_2O -N,N-ДМАЦ, которая имеет более сложный характер. Отмечают, что в системе H_2O -N,N-ДМАЦ ярко выражена склонность к переохлаждению. Показано образование двух устойчивых соединений: N,N-ДМАЦ $\cdot 3H_2O$ при $X_2 = 0,25$ мольн.доли с $T_{пл} = 238,2$ К и 2N,N-ДМАЦ $\cdot 3H_2O$ при $X_2 = 0,40$ мольн.доли и $T_{пл} = 242,2$ К. Идентифицированы два неравновесных образования следующего состава: N,N-ДМАЦ $\cdot 2H_2O$ ($X_2 = 0,33$ мольн. доли) и 3N,N-ДМАЦ $\cdot 2H_2O$ ($X_2 = 0,75$ мольн. доли). Исследование фазовых диаграмм состояния соединений ряда амидов показало отсутствие клатратных образований.

В работе [23] приводятся данные диаграммы состояния водной смеси ДМСО, выявлено, что равновесная фазовая диаграмма вода-ДМСО указывает на существование стабильного гидрата ДМСО $\cdot 3H_2O$ (как видим, аналогичные по составу N,N-ДМФА и N,N-ДМАЦ) и двух нестабильных ДМСО $\cdot 2\frac{1}{2}H_2O$ и ДМСО $\cdot \frac{1}{2}H_2O$. Характер диаграмм состояния ДМСО и N,N-ДМАЦ во многом очень похож, это дает основание предполагать одинаковый для них механизм криозащитного действия, значительно отличающийся от механизма других веществ, применяющихся в качестве криопротекторов. Подобие некоторых физико-химических свойств ДМСО и дизамещенных амидов отмечалось неоднократно [6, 12]: полная смешиваемость с водой, прекрасная растворимость при низких температурах, что особенно важно для реализации их криопротекторной активности. Дизамещенные амиды, как и ДМСО, относятся к апротонным биполярным растворителям. При изучении структурных свойств растворов ДМСО и N,N-ДМФА в воде было высказано предположение [6], что в водных растворах этих веществ образуются комплексы определенного состава, которые при низких температурах существуют в относительно широком интервале концентраций. Сопоставление свободных энергий вязкого течения и диэлектрической релаксации позволило сделать вывод о стабилизации структуры воды молекулами ДМСО и N,N-ДМФА в области концентраций до 0,1–0,15 мольн.доли.

Изучены также фазовые диаграммы систем вода-N,N-диэтилформамид и вода-N,N-дипропилацетамид [13], обнаружена исключительная склонность к переходу в стеклообразное состояние. Несмотря на это, данные вещества не могут быть эффективными криопротекторами. Как показано в наших исследованиях [18], амиды с этильными и пропильными радикалами в молекуле оказывают выраженное цитотоксическое действие по отношению ко всем изученным биологическим объектам (спермы птиц, рыб, эритроциты и тромбоциты человека). Повреждающее действие данных веществ по отношению к биологическим объектам однозначно коррелирует с их коэффициентом рас-

пределения в системе неполярная фаза–вода. Введение этильных радикалов в молекулу амида приводит к резкому увеличению их коэффициента распределения в системе масло–вода, а следовательно, к повышенной способности растворять липидные компоненты клеточных мембран, при этом полностью их разрушая.

Поэтому предположение Boutron P., Baudot A. [28] о перспективности N,N-диэтилформамида в качестве криопротектора, высказанное на основании калориметрических исследований его водных растворов, вряд ли подтвердится. Что же касается другого изученного авторами амида (N,N-диметилформамида), их заключение о возможной криозащитной эффективности этого соединения находится в полном согласии с нашими и литературными данными и подтверждено в практике криоконсервирования [18, 30, 31]. Boutron P., Baudot A. [28] представили результаты исследования водных растворов двух амидов методом ДСК при охлаждении и отогреве в диапазоне температур -153 и 0 °C. Термограмма N,N-ДМФА подтвердила существование гидратов [13], последний из них плавится при -48 °C. Определены критические скорости охлаждения ($V_{кр}$) и отогрева ($V_{от}$) для этих веществ, позволяющие избежать кристаллизацию: для N,N-диэтилформамида $V_{кр}$ составляет 300, 75 и 20 °C/мин для 40-, 45- и 50%-й концентрации (в/в) соответственно; критическая скорость отогрева из аморфного состояния $V_{от}$ для N,N-диэтилформамида 10^7 , 900 и 110 °C/мин для 40-, 45- и 50%-й концентрации (в/в). Для N,N-ДМФА $V_{кр} = 500, 35$ и 7 °C/мин, $V_{от} = 3 \cdot 10^{10}$, 295 и 150 °C/мин для 40-, 45- и 50%-х растворов (в/в). По данным авторов, эти два вещества по тенденции к стеклообразованию и стабильности аморфного состояния более эффективны, чем глицерин и этиленгликоль, но менее, чем 1,2-пропандиол и 2,3-бутандиол. По результатам, полученным при отогреве, амиды более эффективны, чем ДМСО, при 45%-й концентрации.

Нами было изучено влияние ряда криопротекторов, в том числе и амидов на процесс кристаллизации воды в модельных системах [19, 20]. Установлено, что амиды, как и другие низкомолекулярные вещества, замедляют скорость роста кристаллов, уменьшают их размеры и существенно снижают скорость укрупнения кристаллов в процессе рекристаллизации.

Амиды алифатических кислот по принятой классификации [30] относятся к эндоцеллюлярным криопротекторам. К сожалению, прямые измерения и количественные данные о проницаемости амидов через мембраны клеток практически отсутствуют. Но косвенные опыты указывают на то, что эти вещества обладают уникальной способностью проникать через клеточную мембрану, существенно снижают или вообще не создают осмотический дисбаланс между вне- и внутриклеточной средой клетки [15, 18], что, очевидно, является следствием биполярности структуры амидов при относительно малых размерах молекул.

Таким образом, своеобразие структуры и сочетание физико-химических свойств соединений ряда амидов позволяют отнести эти вещества к перспективным криопротекторам, возможности которых до настоящего времени полностью не реализованы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоусов В.П., Морачевский А.Г., Панов М.Ю. Тепловые свойства растворов неэлектролитов. – Л.: Химия, 1981. – 264 с.
2. Белоусов В.П., Панов М.Ю. Термодинамика водных растворов неэлектролитов. – Л.: Химия, 1983. – 264 с.

3. Борода Ю.П., Верстаков Е.С., Ястремский П.С., Кесслер Ю.М. Диэлектрическая релаксация в смесях воды с N,N-двухзамещенными амидами. Термодинамика и строение растворов.– Иваново, 1978.– С. 85–90.
4. Бугай П.М., Слынько В.П. Исследование физико-химических свойств двойной системы ацетамид–вода // Журн. физ. химии.– 1971.– 46, № 4.– С. 996–997.
5. Бык С.М., Макогон Ю.Ф., Фомина В.И. Газовые гидраты.– М.: Химия, 1980.– 226 с.
6. Верстаков Е.С., Ястремский П.С., Кесслер Ю.М. и др. Диэлектрические и структурные свойства водных растворов диметилформамида и диметилсульфоксида // Журн. физ. химии.– 1975.– 49, № 6.– С. 1604.
7. Виноградов С. Структурные аспекты водородной связи в аминокислотах, пептидах, белках и модельных системах: Молекулярные взаимодействия.– М.: Мир, 1984.– С. 184–227.
8. Вредные вещества в промышленности / Под ред. Н.В. Лазарева.– Л.: Химия, 1976.– Т. 1.– 590 с.
9. Гончаров В.С., Лященко А.К., Ястремский П.С. Диэлектрические свойства и структура водных растворов ацетамида // Журн. структур. химии, 1976.– 17, № 4.– С. 662–666.
10. Емелин Е.А., Герштейн Л.М. Исследование основных свойств амидных растворителей // Журн. физ. химии.– 1975.– 49, № 7.– С. 1803–1807.
11. Емелин В.П., Кесслер Ю.М., Мишустин А.И. и др. К структуре смесей воды с формамидом // Журн. структур. химии.– 1972.– 13, № 1.– С. 147–148.
12. Зегерс-Эйскенс Т., Эйскенс П. Молекулярные взаимодействия.– М.: Мир, 1986.– 600 с.
13. Кесслер Ю.М., Абакумова Н.А., Вайсман И.Н. Диаграммы плавкости систем H₂O–ДЭФА // Журн. физ. химии.– 1981.– 55, № 10.– С. 2682–2684.
14. Кесслер Ю.М., Абакумова Н.А. Экспериментальное и теоретическое исследование гидрофобных эффектов // Изв. вузов “Химия и хим. технология”.– 1982.– 25, № 2.– С. 162–178.
15. Ландау М.А. Молекулярная природа отдельных физиологических процессов.– М.: Наука, 1985.– 264 с.
16. Лященко А.К., Стунтас П.А. Структурирование воды молекулами неэлектролитов и растворимость неполярных газов // Журн. структур. химии.– 1980.– 21, № 3.– С. 106–111.
17. Лозина-Лозинский Л.К. Общие вопросы криобиологии // Криобиология.– 1985.– Вып. 1.– С. 13–19.
18. Линник Т.П. Зависимость криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств: Автореф. дис...канд.биол.наук.– Харьков, 1986.– 19 с.
19. Новиков А.Н., Кулешова Л.Г., Линник Т.П. Механизм роста кристаллов льда в сложных биологических системах // Биофизика.– 1991.– 36, № 1.– С. 122–127.
20. Новиков А.Н., Пичугин Ю.И., Линник Т.П. Влияние криопротекторов и ряда органических добавок на процесс рекристаллизации льда в модельных системах // Пробл. криобиологии.– 1992.– № 2.– С. 20–23.
21. Пчелин В.А. Гидрофобные взаимодействия в дисперсных системах.– М.: Знание, 1976.– №5.– 64 с.
22. Пичугин Ю.И. Итоги и перспективы поиска новых эндоцеллюлярных криопротекторов // Пробл. криобиологии.– 1993.– № 2.– С. 3–10.
23. Франкс Ф. Вода и водные растворы при температурах ниже 0 °С.– Киев: Наук.думка, 1985.– 338 с.
24. Чаллис Б.С., Чаллис Дж.А. Амиды и родственные соединения: Общая органическая химия.– М.: Химия, 1983.– Т. 4.– С. 388–424.
25. Шахпоронов М.И., Райхе Б., Лапина Л.В. Строение жидкого ДМФА и его растворов в воде // Физика и физико-химия жидкостей.– 1973.– Вып. 2.– С. 89–117.
26. Ястремский П.С., Верстаков Е.С., Кесслер Ю.М. и др. Диэлектрические и структурные свойства смесей воды с формамидом // Журн. физ. химии.– 1975.– 49, № 11.– С. 2950–2953.
27. Armitage W.J. Survival of corneal endothelium following exposure to a vitrification solution // Cryobiology.–1989.– 26, № 4.– P. 318–327.
28. Boutron P., Baudot A. Calorimetric study of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide.– Ref. 34th Annual Meeting of the society for cryobiology.– 1997.– P. 30.
29. Franks F. The properties of aqueous solutions of non-electrolytes in physico-chemical processes in mixed aqueous solvents.–London: Neimann educational books, 1967.–P. 50.
30. Karow A.M. Cryopreservation: pharmacological considerations // Organ preservation for transplantation.– Boston: Little, Brown and Company, 1974.– P. 86–107.
31. Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T., Tur B. Cryopreservation of poultry semen // Brit.Poultry Sc.– 1995.– 36.– P. 805–811.

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

Поступила 26.02.98

Т. П. ЛІННИК

АМИДЫ АЛИФАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ — ЭФФЕКТИВНЫЕ КРИОПРОТЕКТОРЫ. I. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СПОЛУК РЯДУ АМИДОВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Подано аналіз літературних даних і власних досліджень структури і фізико-хімічних властивостей сполук ряду амідів. Розглянуто особливості взаємодії амідів з водою, а також фазові діаграми стану. Показано, що амиди аліфатичних кислот здатні поєднувати фізико-хімічні властивості, необхідні для прояву ефективної кріозахисної активності, і відносяться до перспективних кріопротекторів.

T. P. LINNIK

LIPIDS OF THE ALIPHATIC ACIDS ARE EFFECTIVE CRYOPROTECTANTS. I. PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES OF THE COMPOUNDS OUT OF THE AMID SERIES

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

The report deals with the analysis of the reported and the author's own data on the study of the structure and physical-chemical properties of the compounds out of the amid series. The distinguishing features of the interaction of amides with water, and phase diagrams of the states were studied. The amides of the aliphatic acids were shown to possess combined physical-chemical properties, which are required for manifestation of the effective cryoprotective activity, thus belonging to promising cryoprotectants.

УДК 57.043:577.112.856

А.Ю.Никольченко, А.К.Гулевский

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГАПТОГЛОБИНА В УСЛОВИЯХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Методами электрофореза в полиакриламидном геле и определения пероксидазной активности гаптоглобин-гемоглобинового комплекса исследовали влияние замораживания-оттаивания и длительного хранения сыворотки крови при температуре -196°C на сохранность структурно-функциональных свойств гаптоглобина. Установлено, что воздействие низких температур приводит к нарушениям структурно-функциональных свойств гаптоглобина, степень выраженности которых зависит как от самого процесса замораживания-оттаивания и его циклов, так и от длительности низкотемпературного хранения. Естественное окружение оказывает стабилизирующее влияние на гаптоглобин. Применение криопротекторов предотвращает структурные и значительно уменьшает функциональные изменения гаптоглобина при низкотемпературном хранении. Отмечена лучшая степень сохранности его структурно-функциональных свойств при использовании ПЭГ-400 в 15%-й концентрации.

Действие низких и сверхнизких температур на биополимеры представляет большой интерес для кріобіології. В [14, 15] было отмечено, что гликопротеиды рыб, адаптированных к холоду, относятся к достаточно криорезистентным белкам. Однако до настоящего времени нельзя утверждать, что гликопротеиды любой природы являются криорезистентными, так как отсутствует достаточное количество данных относительно гликопротеидов другой природы, в частности, теплокровных животных, неадаптированных к холоду.

Удобным объектом для такого исследования является гаптоглобин (Hr) сыворотки крови человека, который выполняет в организме важные функции, например, связывание гемоглобина (Hb) и сохранение железа гема [4]. В связи с этим целью настоящей работы было исследование криорезистентности данного гликопротеида при воздействии повреждающих факторов низких температур.

Структурно-функциональные свойства Hр исследовали как в составе сыворотки донорской крови человека, так и изолированного в водной и водно-солевой среде, содержащей 1 М NaCl и 0,1 М NaH_2PO_4 (рН 7,4). Гаптоглобин выделяли по методу Успенской и соавторов [10].

Гаптоглобин человека, имеющий три генетически обусловленные фенотипа, циркулирует в крови как ряд полимеров разной молекулярной массы [12], что отражается на картинах электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 1), который проводился по методу Маурера в модификации Колба и Камышникова [6].

Для криоконсервирования были отобраны образцы сыворотки, в которых до замораживания на электрофорезе, что являлось контролем, четко выявлялись нормальные картины расположения полос для фенотипов Hр1-1, Hр2-1 и Hр2-2. Погружением проб сыворотки донорской крови человека в жидкий азот проводили замораживание. Отогрев осуществляли на водяной бане при температуре 40–42 °С.

После замораживания и различных сроков низкотемпературного хранения сыворотки в электрофоретических картинах Hр произошли изменения, выражающиеся в увеличении числа полос и ослаблении яркости некоторых первоначальных полос (рис. 1). Было выявлено влияние циклов замораживания-оттаивания на степень деполимеризации Hр. При увеличении количества циклов наблюдалась более выраженная картина деполимеризации. Молекулы фенотипа Hр2-2 показали несколько большую криорезистентность, чем молекулы двух других фенотипов.

На структурную сохранность Hр влияет как само замораживание-оттаивание, так и продолжительность низкотемпературного хранения. С увеличением времени хранения уменьшалась интенсивность первоначальных полос и возрастало количество новых полос. При этом также наблюдалась некоторая разница в криорезистентности гаптоглобина в зависимости от фенотипа этого белка. Быстрее деполимеризовался Hр1-1. Самым устойчивым в структурном отношении оказался Hр2-2.

Известно [3, 4, 9, 12], что единицей полимеризации молекулы Hр человека является димер $\alpha\beta$. Анализируя данные литературы, можно представить молекулы разных фенотипов гаптоглобина формулами: Hр1-1 — $(\alpha^1\beta)_2$, Hр2-1 — $(\alpha^1\beta)_2(\alpha^2\beta)_n$, а Hр2-2 — $(\alpha^2\beta)_n$. Причем на электрофорезе все компоненты Hр2-1 принимают последовательность согласно электрофоретической подвижности в сторону анода: $(\alpha^1\beta)_2$; $(\alpha^1\beta)_2(\alpha^2\beta)_2$; $(\alpha^1\beta)_2(\alpha^2\beta)_3$... Аналогично этому Hр2-2 является группой полимеров, обладающей молекулярной структурой $(\alpha^2\beta)_3$; $(\alpha^2\beta)_4$... Медленные компоненты Hр2-1 движутся несколько быстрее медленных компонентов Hр2-2. Это может быть обусловлено тем, что в полипептидах Hр2-1 присутствуют звенья $(\alpha^1\beta)_2$ [3], которые отсутствуют в Hр2-2. К β -цепи присоединяются углеводные остатки изучаемого гликопротеида, что может также влиять на электрофоретическую подвижность этих компонентов [9].

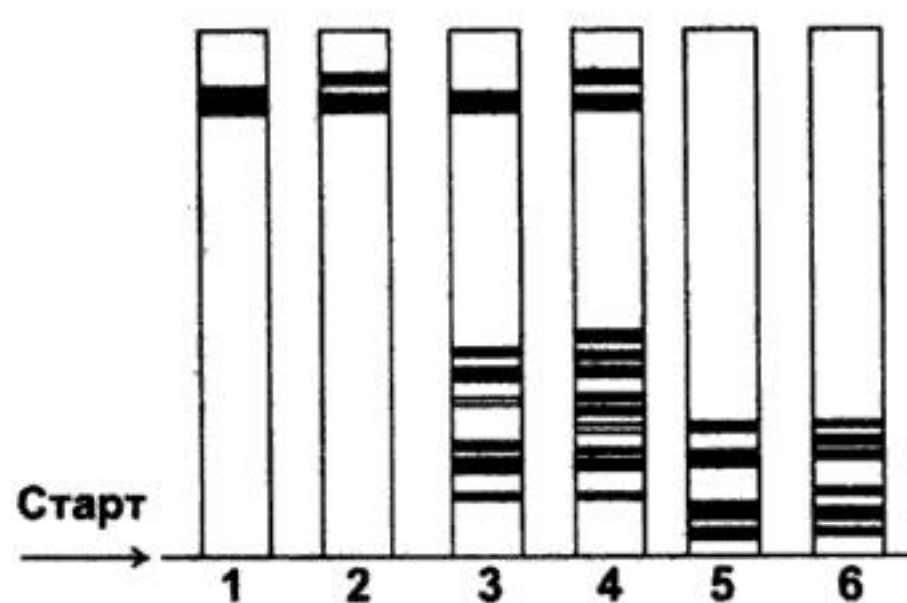


Рис. 1. Электрофоретические фракции гаптоглобина: 1, 3, 5 — нормальные фенотипы Hр1-1, Hр2-1 и Hр2-2 соответственно; 2, 4, 6 — фенотипы Hр1-1, Hр2-1 и Hр2-2 соответственно после низкотемпературного воздействия

В [8] отмечается, что окисление углеводных компонентов ферментов приводит к потере их активности в условиях широкого диапазона изменения водного потенциала системы. Углеводные остатки в какой-то мере удерживают воду и тем самым предохраняют молекулу ферментов от повреждающего действия дегидратации. Вполне вероятно, что повреждающие факторы низких температур негативно влияют на углеводный компонент β -цепей молекулы гаптоглобина, дестабилизируя тем самым и белковую часть этого гликопротеида [13]. Однако этот фактор, скорее всего, не является единственным в криоповреждении молекулы гаптоглобина.

По данным электрофоретического анализа в диссоциирующих условиях [3] в молекуле гаптоглобина человека существуют S-S связи между всеми полипептидными цепями. Известно [9], что полипептид $hp1\alpha$ имеет три полуцистеиновых остатка, из них два образуют внутрицепочечную дисульфидную связь в нативной конфигурации, а $hp2\alpha$ имеет шесть полуцистеиновых остатков, четыре из которых также используются в двух внутренних связях. Полипептид $hp\beta$ обладает пятью полуцистеиновыми остатками. Следовательно, после образования одной межцепочечной дисульфидной связи с β -цепью у $hp1\alpha$ валентности исчерпываются, а у $hp2\alpha$ остается при этом одна свободная SH-группа, которая и может образовывать дисульфидную связь с аналогичной SH-группой другого $\alpha^2\beta$ -димера или тетрамера $(\alpha^2\beta)_2$. Такого рода бивалентность дублированной α -цепи полипептида $hp2\alpha$ и обеспечивает возможность полимеризации у Hр2-1 и Hр2-2.

Таким образом, полимеры, в состав которых входят $hp2\alpha$ -цепи, имеют соединения с двумя дисульфидными мостиками между цепями, а звенья полимеров, в которые входит пептид $hp1\alpha$, соединяются одной дисульфидной связью. Этим, вероятно, объясняется тот факт, что наиболее подвержена деполимеризации молекула Hр1-1, состоящая только из полипептидов $hp1\alpha$, и четыре цепи этой молекулы соединяются друг с другом одним дисульфидным мостиком. В состав молекулы Hр2-1 входят как $hp1\alpha$ -, так и $hp2\alpha$ -цепи, поэтому этот тип молекулы также существенно подвержен деполимеризации. Как бы быстрые, так и медленные компоненты Hр2-1 имеют в своем составе тетрамер $(\alpha^1\beta)_2$, который, вероятно, деполимеризуется в первую очередь. Молекулы Hр2-2 состоят только из полипептидов $hp2\alpha$ [3], в результате чего эти молекулы наиболее устойчивы к факторам, вызывающим разъединения полипептидных цепей, и структурные изменения в них происходят при более длительном или сильном воздействии повреждающих факторов, чем в молекулах первых двух фенотипов.

По-видимому, негативное влияние повреждающих факторов при воздействии низких температур приводило к разрыву в некоторых субъединицах S-S связей, поэтому $(\alpha\beta)$ -димеры отошли от некоторых олигомерных комплексов Hр, что нашло свое отражение на картинах электрофореза.

Модификацию SH групп и S-S связей можно рассматривать как один из возможных биохимических механизмов повреждения макромолекул, который реализуется не при первичном воздействии на них кратковременного цикла замораживания-оттаивания, а является следствием вторичных молекулярных изменений, возникающих на этапе низкотемпературного хранения соответствующих белковых растворов [7].

Для более подробного выяснения характера структурных изменений Hр был проведен модельный опыт. Выделенный из сыворотки крови Hр подвергался замораживанию в водно-солевом растворе, содержащем 1 М NaCl и 0,1 М NaH_2PO_4 . Электрофоретическая картина Hр изменялась только при

замораживании его в солевом растворе. Причем количество и расположение полос совпадало с картинами электрофореза при замораживании гаптоглобина в составе сыворотки крови, что исключало наличие “межвидовой” молекулярной гибридизации. После многократного режима замораживания-оттаивания в водно-солевой среде ширина и яркость некоторых полос, характерных для нормальных фенотипов Нр, уменьшалась, но увеличивалась яркость новых полос.

Электрофорез проб, подвергавшихся замораживанию в указанной среде и двухнедельному хранению при температуре -196°C , выявил наличие диссоциации молекул Нр у всех исследованных проб вне зависимости от фенотипа этого белка. Вероятно, умеренная (по сравнению с модельным опытом) деполимеризация молекул Нр при замораживании сыворотки связана с тем, что естественное окружение оказывает стабилизирующее влияние на этот гликопротеид.

Для выяснения степени функциональной криолабильности Нр было принято определение пероксидазной активности (ПА) комплекса гаптоглобина с гемоглобином (Нр-Нв), так как известно, что этот комплекс проявляет значительно более высокую активность, чем свободный Нв при идентичной концентрации гема [9]. Использовали очищенный препарат гемоглобина фирмы “Reanal” (Венгрия). Гаптоглобин выделяли из сыворотки крови после ее замораживания-оттаивания и хранения в течение одного месяца, шести, двенадцати и двадцати четырех месяцев при температуре -196°C . ПА комплекса определяли по методу Андреевой и соавт. [1] в условных пероксидазных единицах (ПЕ). В качестве контроля использовали комплекс Нр-Нв, в котором гаптоглобин был выделен из свежей сыворотки крови, не подвергавшейся замораживанию. Активность 50 мкг применявшегося Нв составляла около 20 ПЕ, а в комплексе с Нр она возрастала до 600 ПЕ, что считалось контролем.

По-видимому [2], Нр резко изменяет пероксидазную активность Нв, оказывая конформационный эффект на глобиновую часть. Новое расположение цепей Нв в комплексе с Нр, очевидно, способствует реализации именно тех связей атома железа и пропионил-карбоксильных групп протопорфиринового кольца с аминокислотными остатками, которые необходимы для максимального проявления пероксидазных свойств гема [9].

В представленных экспериментах 60 мкг Нр связывали 50 мкг Нв, что соответствует образованию эквимольного комплекса. В норме ПА не зависела от фенотипа Нр.

Как видно из рис. 2, ПА комплекса значительно снижается после процесса замораживания-оттаивания гаптоглобина. В дальнейшем она также снижается в зависимости от продолжительности низкотемпературного хранения. Влияние циклов замораживания-оттаивания дополнительно снижает ПА комплекса. При трехкратном цикле она снижается почти в шесть раз (до

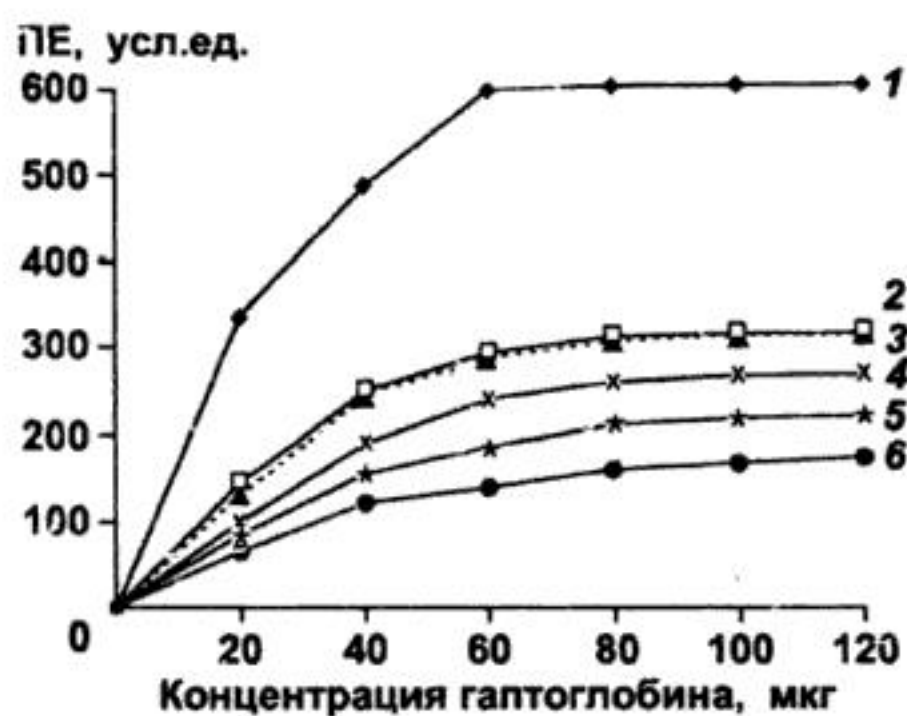


Рис. 2. Пероксидазная активность комплекса Нр-Нв после замораживания-оттаивания и разных сроков хранения гаптоглобина без криопротекторов при температуре -196°C : 1 — контроль; 2 — после замораживания-оттаивания. После разных сроков хранения (мес.): 3 — один; 4 — шесть; 5 — двенадцать; 6 — двадцать четыре

100 ПЕ). При добавлении 60 мкг Нр активность составила 292 ПЕ. После хранения Нр в жидком азоте в течение месяца активность комплекса почти не изменилась. Дальнейшее уменьшение ПА комплекса наблюдалось после полугодового, годового и двухгодичного хранения Нр в жидком азоте (240, 192 и 140 ПЕ соответственно).

При добавлении возрастающего количества Нр в раствор Нв пероксидазная активность увеличивается за счет образования комплекса Нр-Нв, обладающего значительной по сравнению с гемоглобином активностью. Когда исчерпана гемоглобин связывающая активность гаптоглобина, увеличения ПА не наблюдается [1]. Из рис. 2 видно, что добавление 60 мкг Нр к постоянным 50 мкг Нв, в отличие от контроля, не приводило к образованию эквимольного комплекса, и ПА продолжала расти. Для полностью насыщенного комплекса требовалось в два раза больше Нр, подвергавшегося криовоздействию (до 120 мкг), чем нативного Нр в контроле.

Известно, что комплексообразование Нр с Нв и активация пероксидазных свойств Нв не связаны неразрывно [9]. Возможна частичная денатурация Нр, выражающаяся в уменьшении способности активировать пероксидазное действие Нв при нормальной способности связывать его.

В наших экспериментах снижение пероксидазной активности обусловлено двумя факторами. Во-первых, структурные перестройки молекул Нр в результате криоконсервирования, очевидно, привели к неспособности модифицировать глобиновую часть, что обусловило значительно меньшую пероксидазную активность, чем в норме. Во-вторых, часть молекул Нр после криовоздействия теряет способность связываться с Нв, о чем свидетельствует то, что для образования эквимольного комплекса требуется большее количество Нр, подвергавшегося криовоздействию, чем свежего незамороженного Нр.

В ходе эксперимента выяснилось, что после длительного (до двух лет) хранения Нр при -196°C комплекс с молекулами Нр фенотипа Нр2-2 проявляет незначительно большую ПА, чем с молекулами других фенотипов, комплексы с Нр2-1 и Нр1-1 — почти одинаковую активность, немного меньшую, чем с Нр1-1. Указанные данные позволяют предположить, что филогенетически новый удвоенный полипептид *hp2 α* [9] придает белку большую криорезистентность по сравнению с Нр, содержащим *hp1 α* .

Для защиты Нр от воздействия низких температур были использованы такие криопротекторы (КП), как глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО) и полиэтиленгликоли (ПЭГ) с молекулярной массой 400 и 1 000 соответственно в концентрациях от 5 до 20%. В малых концентрациях (до 5%) указанные КП незначительно предохраняют Нр от структурных изменений. В концентрации от 10% и выше глицерин и ПЭГ-400 полностью предотвращали деполимеризацию гаптоглобина, а ДМСО — в концентрации 7,5%. Однако после двух лет хранения с ДМСО на электрофореze фенотипов Нр1-1 и Нр2-1 появлялись дополнительные полосы. Пробы, хранившиеся под защитой ПЭГ-1000 в 10- и 15%-й концентрации, не подвергались деполимеризации при низкотемпературном хранении до 6 месяцев. При более длительном хранении на электрофореграммах появлялись дополнительные полосы. Причем молекулы фенотипа Нр2-2 проявляли несколько большую криорезистентность.

Применение указанных КП позволяло также предотвращать структурные изменения Нр при замораживании изолированного гаптоглобина в водно-солевой среде и хранении его при температуре -196°C в течение месяца.

Среди используемых концентраций криопротекторов при замораживании Нр в составе сыворотки лучше всего предохраняют от падения ПА комплекса

следующие: 15%-й ПЭГ-400, 10–15%-й глицерин, 7,5%-й ДМСО, 10%-й ПЭГ-1000. На рис. 3 показана зависимость пероксидазной активности комплекса Нр-Нв от КП, в присутствии которых замораживалась сыворотка крови, содержащая Нр. Лучшая сохранность функциональных свойств обнаружилась при использовании ПЭГ-400. Удовлетворительные результаты были получены при замораживании проб с глицерином. Несколько худший защитный эффект оказывали ДМСО и ПЭГ-1000. С увеличением продолжительности низкотемпературного хранения пероксидазная активность комплекса снижалась, что происходило в значительно меньшей степени, чем после замораживания сыворотки без КП.

В присутствии КП после длительного низкотемпературного хранения (более 6-ти месяцев) часть молекул Нр теряла способность связывать Нв. Однако в этом случае в отличие от криоконсервирования без КП для образования эквимольного комплекса требовалось от 80 до 100 мкг Нр и наблюдалось меньшее увеличение ПА. Это указывает на значительно меньшую степень деструктивных изменений Нр, хранившегося в присутствии КП, чем без них при низкотемпературном воздействии.

Для того чтобы количественно охарактеризовать степень потери гаптоглобином функции связывания Нв, было рассчитано, на сколько условных ПЕ повышается активность комплекса после различных сроков замораживания с оптимальными концентрациями исследуемых криопротекторов при добавлении концентраций Нр больших, чем эквимольная. Найденную разницу переводили в проценты, принимая за 100% максимальную ПА, когда при добавлении избыточного количества Нр активность комплекса перестает повышаться. Найденные процентные значения потери Нр способности связывать Нв представлены в таблице.

Потеря гаптоглобином способности связывать гемоглобин, %

Сроки замораживания	Без криопротекторов	ДМСО (7,5%-й)	Глицерин (10%-й)	ПЭГ-400 (15%-й)	ПЭГ-1000 (10%-й)
Замораживание-оттаивание	6,7	3,4	1,2	0,8	2
1 мес.	8,0	5,2	3,4	1,9	3
6 мес.	9,4	5,4	3,6	2,9	3
12 мес.	15,1	7,0	4,0	2,4	5,5
24 мес.	18,6	9,8	4,4	3,4	6,2

После одного цикла замораживания-оттаивания сыворотки без КП 6,7% молекул Нр потеряли способность связывать Нв. На степень потери функциональных свойств влияет длительность низкотемпературного хранения. Из данных таблицы видно, что при длительном хранении сыворотки без КП (до двух лет) существенная часть Нр молекул (до 20%) теряет способность образовывать комплекс с Нв. Наилучшая сохранность Нр достигается под защитой

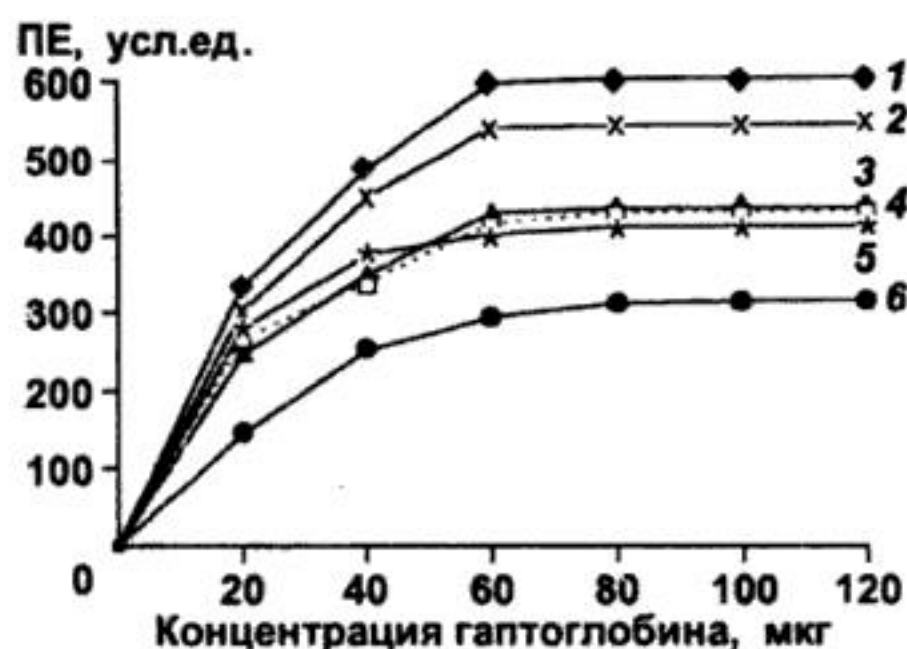


Рис. 3. Пероксидазная активность комплекса Нр-Нв после замораживания-оттаивания сыворотки, содержащей Нр. 1 — контроль; в присутствии различных криопротекторов: 2 — ПЭГ-400; 3 — глицерин; 4 — ДМСО; 5 — ПЭГ-1000

ПЭГ-400. ДМСО обладает наименьшей способностью среди использованных КП предотвращать потерю функции Нр связывать Нв.

Как известно [8, 11], дегидратация макромолекул вследствие вымораживания воды может быть причиной не только конформационных изменений белковых структур, но и химической модификации их в результате усиления межмолекулярных взаимодействий при концентрировании компонентов раствора. В основе же защитного действия КП [5] лежит способность их вызывать изменения колигативных свойств растворов, в частности, связывать свободную воду и снижать эффективные концентрации солей при фазовом переходе растворителя, благодаря чему концентрирование солей и сдвиги рН раствора в процессе вымораживания воды не достигают критических значений, при которых происходит нарушение структурной организации белков. Этим, можно полагать, объясняется ингибирующее влияние указанных КП на деполимеризацию Нр.

Полученные данные позволяют установить следующее:

- воздействие низких температур приводит к нарушениям структурно-функциональных свойств Нр, степень выраженности которых зависит как от самого процесса замораживания-оттаивания и его циклов, так и от длительности низкотемпературного хранения;
- главными из этих нарушений являются деполимеризация молекулы Нр в результате разрыва межцепочечных дисульфидных связей и потеря способности Нр молекулы связывать Нв;
- умеренная (по сравнению с модельным опытом) деполимеризация молекул Нр при замораживании сыворотки связана с тем, что естественное окружение оказывает стабилизирующее влияние на этот гликопротеид;
- удвоенный полипептид *hp2α* сообщает белку большую криорезистентность по сравнению с Нр, содержащим *hp1α*;
- применение КП при замораживании сыворотки, содержащей Нр, позволяло предотвращать структурные и значительно уменьшать функциональные изменения Нр при низкотемпературном хранении.
- отмечена лучшая степень сохранности структурно-функциональных свойств Нр при использовании ПЭГ-400 в 15%-й концентрации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева А.П., Белостоцкий В.М., Розенберг Г.Я. Сравнительное изучение пероксидазной активности комплексов мет- и оксигемоглобина с гаптоглобином // Вопросы мед. химии. – 1973. – Т. 19. Вып. 4. – С. 378–381.
2. Андреева А.П., Белостоцкий В.М., Розенберг Г.Я. Отсутствие влияния видовой специфичности гаптоглобина на пероксидазные свойства гаптоглобин-гемоглобиновых комплексов // Докл. АН СССР. – 1973. – 208, № 5. – С. 1226–1227.
3. Бейсембаева Р.У. Гаптоглобин: структура, свойства и роль в организме позвоночных // Успехи совр. биол. – 1984. – Т. 98. Вып. 3(6). – С. 409–425.
4. Бейсембаева Р.У. Гаптоглобин и его клиническое значение // Клин. мед. – 1986. – № 1. – С. 13–16.
5. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 430 с.
6. Колб В.Г., Камышиков В.С. Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – 336 с.
7. Луговой В.И. Механизмы повреждающего действия замораживания на растворимые и мембраносвязанные ферменты: Дис... докт. биол. наук. – Харьков. – 1985. – 360 с.
8. Луговой В.И. Влияние низких температур на растворимые ферменты // Итоги науки и техники. – ВИНТИ. Сер. Биофизика. – 1978. – Т. 9. – С. 53–79.
9. Успенская В.Д. Гаптоглобин, строение и функция связывания гемоглобина // Успехи современной биологии. – 1971. – Т. 71. Вып. 1. – С. 43–65.
10. Успенская В.Д., Плескова М.В., Неделяева М.И. Метод выделения больших количеств гаптоглобина из крови собак // Вопросы мед. химии. – 1968. – Т. 14, № 3. – С. 324–329.
11. Хенох М.А., Першина В.П. Образование гибридных ферментов под влиянием глубокого охлаждения // Кробиология и криомедицина. – 1980. – Вып. 7. – С. 98–101.

12. Янагаси Тосиоки и др. Биохимия наследственности: Пер. с япон. – М.: Медицина, 1979. – 312 с.
13. Crowe J.H., Carpenter J.F., Crowe L.M. Application of the preferential exclusion mechanism to preservation of proteins and phospholipid bilayers // *Cryobiology*. – 1989. – 26, № 6. – P. 535–536.
14. Fink A.L. Enzyme-catalysed reaction in unfrozen, noncellular systems at subzero temperatures // In: *Proteins at Low Temperatures*. – American Chemical Society. – Washington, D.S. – 1979. – P. 35–54.
15. Ilder D.R., Freeman H.C. Stability to freezing of steroid binding proteins in fish plasma // *Comp. Biochem. And Physiol.* – 1973. – 44, № 1. – P. 179–183.

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

Поступила 15.12.97

А. Ю. НИКОЛЬЧЕНКО, О. К. ГУЛЕВСЬКИЙ

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ГАПТОГЛОБІНУ В УМОВАХ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Методами електрофорезу у поліакриламідному гелі і визначення пероксидазної активності гаптоглобін-гемоглобінового комплексу досліджували вплив заморожування-розморожування та довготривалого зберігання сироватки крові при температурі -196°C на збереження структурно-функціональних властивостей гаптоглобіну. Встановлено, що дія низьких температур приводить до порушень структурно-функціональних властивостей гаптоглобіну, ступінь відбиття яких залежить як безпосередньо від процесу заморожування-розморожування та його циклів, так і від терміну низькотемпературного зберігання. Природне оточення має стабілізуючий вплив на гаптоглобін. Використання криопротекторів запобігає структурні та значно зменшує функціональні зміни гаптоглобіну при низькотемпературному зберіганні. Відзначена краща ступінь зберігання структурно-функціональних властивостей гаптоглобіну при використанні ПЕГ-400 у 15%-й концентрації.

A. YU. NIKOLCHENKO, A. K. GULEVSKY

THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF HAPTOGLOBIN IN THE PRESENCE OF CRYOPRESERVE

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

The effect of freezing-thawing and long-term storage to -196°C of the blood serum on the safety of structural and functional properties of haptoglobin have been studied by method electrophoresis in polyacrilamid gel and by definition of peroxydase complex. It has been found that the effect of low temperature are leading to breakage of structural and functional properties of haptoglobin and its degree depends upon cycles of freezing-thawing and duration of the long-term storage. Natural surrounds effect on haptoglobin as a stabilizer. The use of cryoprotectants prevents structural changes of haptoglobin and decreases functional changes of haptoglobin by low temperature storage. The best safety degree of structural and functional properties of haptoglobin by using of 15% concentration of PEG-400.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 611.013: 57.043

Н.П.Суббота, П.П.Пашинский, Е.Д.Розанова

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРИОЭКСТРАКТОВ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Исследованы качественный состав и влияние биодобавок криоэкстрактов из тканей эмбриона человека 8–12 недель внутриутробного развития (тотальный препарат эмбриона, криоэкстракты печени и мозга, криоэкстракт хориона) на морфофункциональные параметры гепатоцитов, хранящихся при гипотермических температурах.

Исследования, проведенные в области криоэмбриологии, свидетельствуют о том, что лишь на определенных этапах внутриутробного развития эмбриональным клеткам и тканям присущи свойства, которые могут быть использованы в практической криобиологии [1–3, 7]. К ним, в частности, относятся

выраженная устойчивость к гипоксии за счёт энергетически более древнего пути окисления субстратов — гликолиза; содержание и продуцирование большого количества различных биоактивных веществ (белки, пептиды); высокая активность тимидинкиназы и ДНК-полимеразы, обусловленная выполнением эмбриональной печенью гемопоетической функции; высокая антиокислительная активность и приспособляемость к неблагоприятным изменениям окружающей среды.

Изложенное выше послужило предпосылкой для изучения биологических свойств и механизма действия различного вида тканевых препаратов, выделенных из органов эмбрионов человека. Анализ научной литературы позволяет предположить, что эмбриональные препараты могут быть эффективными биогенными стимуляторами, пролонгирующими сохранение морфофункциональных параметров переживающих или консервируемых тканей и клеток, а также восстанавливающими их метаболизм при ряде патологических процессов в организме.

Исследования были разделены на два этапа: на первом изучали качественный состав препаратов, полученных из эмбриональных тканей; на втором исследовали влияние биопрепаратов *in vitro* на сохранность морфофункциональных свойств изолированных клеток печени при гипотермическом хранении ($2 \div 4^\circ\text{C}$).

Эксперименты проведены на 68 крысах-самцах линии Вистар. Модельной системой служила суспензия гепатоцитов крысы с жизнеспособностью 90%, полученная коллагеназным методом. Суспензию хранили на льду при гипотермической температуре ($2 \div 4^\circ\text{C}$) в течение 0–24–48 и 72 часов. Проведено пять серий экспериментов:

- 1 — хранение в стандартной среде выделения (СВ), контроль;
- 2 — хранение в СВ + тотальный эмбриональный препарат (ТЭП);
- 3 — хранение в СВ + криоэкстракт печени эмбриона (КП);
- 4 — хранение в СВ + криоэкстракт мозга эмбриона (КМ);
- 5 — хранение в СВ + криоэкстракт хориона (КХ).

Криоэкстракты готовили по методу Н. П. Субботы и др. [6] из эмбриональных тканей человека, полученных в результате абортов ранних сроков (8–12 недель внутриутробного развития).

Для качественной оценки полученных криоэкстрактов проводили колоночную хроматографию на сефадексе G-100. Концентрацию белка рассчитывали по спектрам поглощения в ультрафиолетовой области по методу J. Morgis [8], концентрацию нуклеотидов — по методу А. Спирина [5]. Морфологическую сохранность суспензии клеток — жизнеспособность (ЖС) — исследовали традиционным методом по окраске с суправитальным красителем трипановым синим. Способность гепатоцитов включать меченые предшественники в суммарные белки оценивалась по включению ^{14}C -лейцина, а состояние биоэнергетических параметров — по накоплению потенциал-зависимого флуоресцентного зонда-катиона ДСМ [4]. Конечная концентрация ДСМ в инкубационном растворе составляла 12 мкМ. Время эквilibрации — 15 мин. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре “Hitachi” MPF-2A (Япония) в кюветах объёмом 3,0 мл при возбуждении длиной волны 465 нм в среде 0,01 М трис-НСl.

Статистическая обработка данных проведена по методу Фишера–Стьюдента. Суммарное содержание белков и нуклеотидов в различных препаратах приведено в табл. 1.

Содержание белков и нуклеотидов в биопрепаратах из органов эмбриона человека ($n = 5$)

Исследуемый параметр	Вид препарата			
	ТЭП	КМ	КП	КХ
Концентрация белка, мг/мл	$0,53 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,004$	$0,39 \pm 0,01$	$1,2 \pm 0,08$
Концентрация нуклеотидов, мкг/мл	$75,6 \pm 5,2$	$42,2 \pm 4,1$	$15,0 \pm 1,0$	$36,8 \pm 3,6$

Примечание. P между образцами $< 0,05$.

Как следует из таблицы, максимальное содержание протеинов характерно для препарата КХ. Препарат ТЭП выделяется высоким содержанием нуклеотидов, а препарат КП — низким.

На рис. 1 и 2 представлены результаты хроматографии образцов. Во всех исследованных препаратах присутствуют белки с молекулярной массой 150 000 и выше (рис. 1). Содержание этой фракции составляет от 15–18 (образцы ТЭП и КХ) до 36% (образец КМ). На хроматограммах всех препаратов наблюдаются небольшие максимумы также и в области низкомолекулярных пептидов (мол. масса 6 000 и ниже) — от 1 до 6% от общего содержания белка. Помимо этого каждому образцу свойственны свои максимумы.

Образец ТЭП характеризуется интенсивным максимумом в области молекулярных масс 100 000–70 000 (57%). Этот препарат содержит в основном белки с высокой молекулярной массой.

Наибольшее количество максимумов на хроматограмме (150 000 — 36%; 100–70 000 — 27%; 30–40 000 — 12%; 15–20 000 — 4% и 4–6 000 — 6%) имеет препарат КМ. В образце КП, как и в ТЭП, основная часть белков представлена высокомолекулярными фракциями и имеется максимум в области 15–20 000 (7%). Биопрепарат КХ включает в основном белки со средней и малой молекулярной массой: основной максимум находится в области молекулярных масс 30–40 000 (26%), а также 15–20 000 (17%).

По содержанию нуклеотидов исследованные препараты, как и по содержанию пептидов, отличаются друг от друга. Во всех образцах присутствует фракция, содержащая высокомолекулярные нуклеотиды (с мол. массой 150 000 и выше). Она составляет для всех образцов 12–20%.

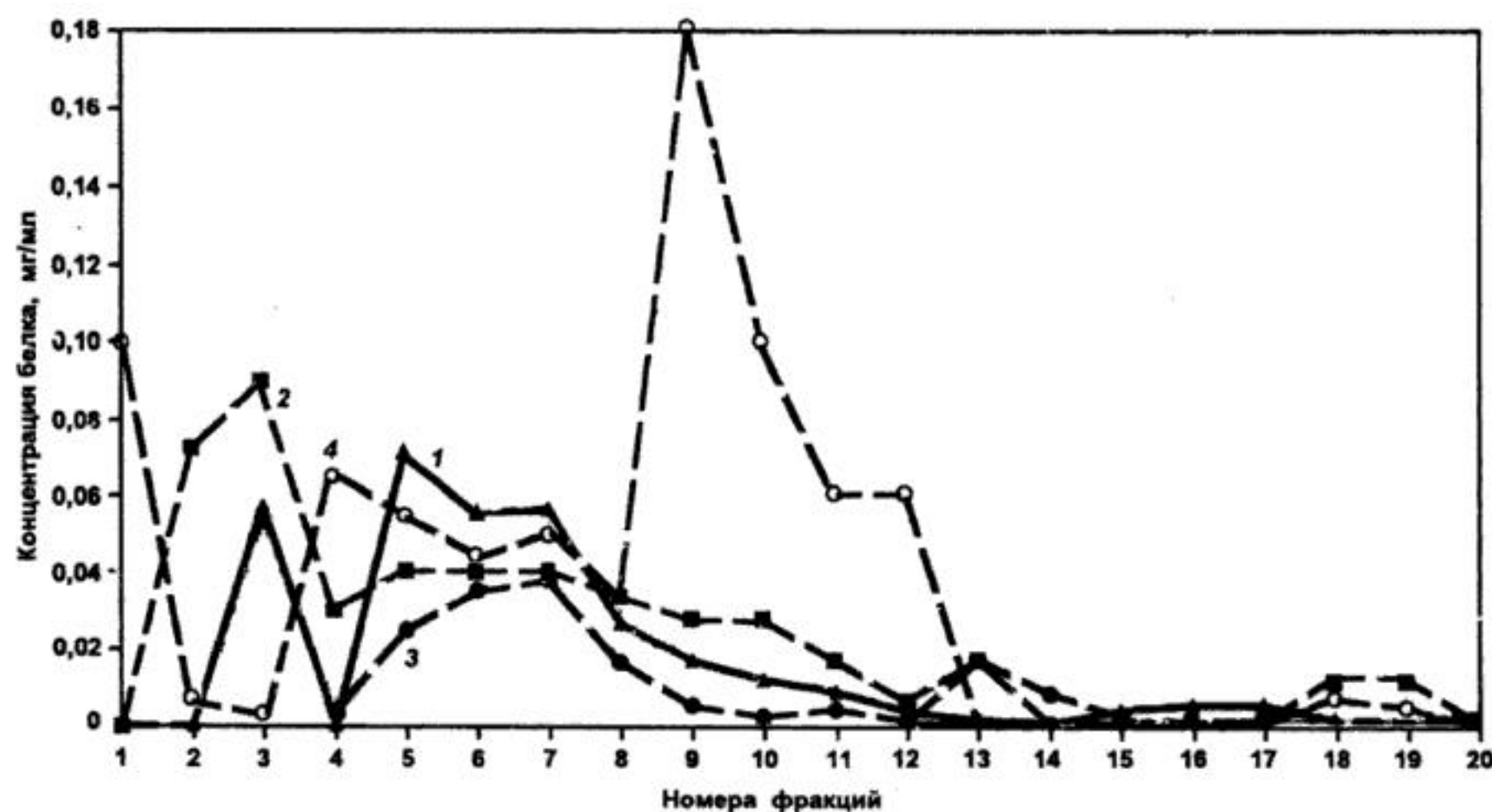


Рис. 1. Концентрация белка в биопрепаратах эмбриональных тканей: 1 — ТЭП; 2 — КМ; 3 — КП; 4 — КХ

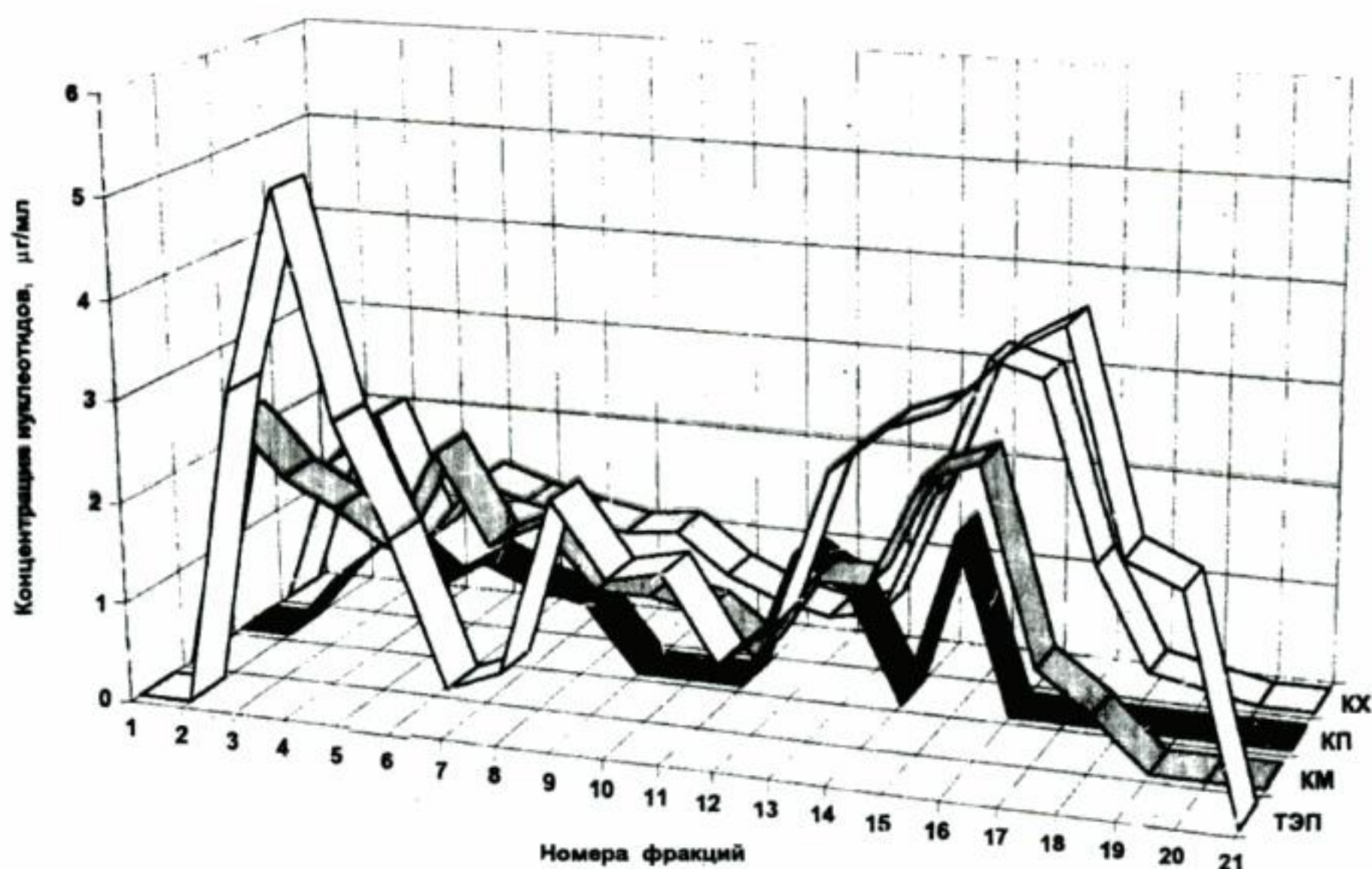


Рис. 2. Концентрация нуклеотидов в биопрепаратах из эмбриональных тканей

Для образцов ТЭП, КМ и КХ характерно содержание значительного количества низкомолекулярных нуклеотидов с молекулярной массой 4 000 и меньше: ТЭП — 34, КМ — 21, КХ — 36%. Образец ТЭП, кроме указанных двух максимумов, имеет на хроматограмме максимум в области молекулярных масс ~40 000–30 000В (13%).

В препарате КМ нуклеотиды по молекулярным массам распределены наиболее равномерно. В образце КП следует отметить абсолютное отсутствие низкомолекулярных (с мол. массой 6 000) нуклеотидов и достаточно высокое содержание нуклеотидов с молекулярной массой 20–10 000 (47%).

Результаты, характеризующие морфофункциональные параметры гепатоцитов при гипотермическом хранении, представлены в табл. 2. Как следует из таблицы, их жизнеспособность в процессе хранения снижалась. При использовании СВ способность гепатоцитов исключать трипановый синий снижалась через 24–48 и 72 ч на 10, 15 и 30% соответственно. В целом динамика жизнеспособности зависела от вида присутствующей биологической добавки в среде. Через 24 ч гипотермического хранения суспензии гепатоцитов вид присутствующей в среде добавки практически не влиял на способность клеток исключать краситель. Увеличение сроков хранения суспензии до 48 ч в СВ приводит к дальнейшему снижению их жизнеспособности: остаётся 65% жизнеспособных клеток, а к 72 ч — 35%. Судя по показателям с трипановым синим, через 72 ч хранения эффективны были среды, содержащие биодобавки в виде ТЭП и КП (75 и 60% соответственно). Сходная динамика снижения жизнеспособности клеток при хранении до 48 ч также была отмечена для этих сред. Хранение гепатоцитов в среде, содержащей биодобавку в виде КМ, было менее эффективно.

Показатели по окраске с ТС не позволяют в полной мере выявить различия в структурно-функциональном состоянии клеток, внесенные присутствием препаратов. Исходя из этого, мы использовали тест, требующий для вы-

полнения функции согласованной работы ряда систем. Таким тестом является способность клеток синтезировать белок.

Т а б л и ц а 2

Динамика включения меченых аминокислот (имп/мин ЖС_{кл}) в суммарные белки и жизнеспособности (ЖС, %) гепатоцитов при гипотермическом хранении в средах с добавками биосубстратов (*n* = 7)

Среда хранения	Время хранения, ч							
	0		24		48		72	
	А	В	А	В	А	В	А	В
Контрольная среда (1)	48 068 ± 200	90	38 090 ± 160	80	24 037 ± 160	65	18 500 ± 160	35
Среда (1) + ТЭП	48 430 ± 220	92	40 504 ± 180	74	39 230 ± 130	75	26 184 ± 145	75
Среда (1) + КП	48 500 ± 210	94	39 600 ± 180	75	39 500 ± 184	75	25 600 ± 150	60
Среда (1) + КМ	48 100 ± 210	90	32 300 ± 150	70	28 000 ± 166	65	18 000 ± 140	50
Среда (1) + КХ	48 070 ± 215	88	40 070 ± 168	75	40 420 ± 140	75	22 270 ± 160	55

Примечание. *P* между показателями А и между показателями В в 0 ч по сравнению с 24, 48, 72 ч < 0,05

Показано (табл. 2), что через 24 ч включение аминокислоты в контрольной среде снижалось на 21%, в средах с добавками ТЭП, КП, КМ и КХ — на 14, 18, 37 и 14,5% соответственно. Через 48 ч хранения способность к синтезу белка была максимальной в среде с добавкой КХ. Исследованный параметр снижался в ряду использованных сред с КХ, КП = ТЭП, КМ, СВ (84, 81 = 81, 58, 50% соответственно) по сравнению с показателями в 0 ч, т.е. в условиях нашего эксперимента через 48 ч хранения суспензии при температуре 2–4 °С оптимальными были среды, содержащие в качестве добавки КХ, ТЭП или КП. Следует отметить, что при использовании этих сред включение аминокислот в суммарные белки сохраняется практически на уровне показателей, полученных при 24-часовом хранении в аналогичных условиях. Среда, содержащая КМ, была менее эффективной как при 24-часовом, так и 48-часовом хранении. Включение аминокислот было на 26% ниже, чем в среде с добавкой, например КХ. Увеличение сроков хранения суспензии в среде с КМ до 72 ч свидетельствовало о том, что в этом временном интервале способность к синтезу белка у гепатоцитов была такой же, как при хранении их в контрольной среде: в среднем 37,5% от показаний в свежевыделенной суспензии. Эффективность сред с добавками ТЭП и КП также была практически одинаковой: 54 и 51,5% клеток суспензии были способны включать аминокислоту в суммарные белки. Значения показателей, полученных при хранении в среде с добавкой КХ, были ниже (46,3% от показателей в 0 ч), чем при использовании в качестве добавок ТЭП или КП.

Таким образом, в присутствии добавок ТЭП, КП или КХ основное снижение способности гепатоцитов к синтезу белка происходит через 48 ч гипотермического хранения. При использовании в качестве добавок КМ наиболее выраженное снижение способности гепатоцитов к синтезу белка происходит через 24 ч гипотермического хранения.

Сравнивая эффективность использованных биодобавок, следует отметить, что при 72-часовом хранении наиболее эффективной оказалась среда с добавками в виде КП. Практически сохранялась способность гепатоцитов к синтезу белка и в среде, содержащей добавки в виде ТЭП.

Следовательно, присутствие в среде хранения биодобавок, выделенных из эмбриона или органов эмбриона человека ранних сроков развития (8–12 недель), позволяет пролонгировать способность гепатоцитов синтезировать белок в условиях гипотермического хранения.

Способность эмбриональных субстратов пролонгировать время сохранения структурно-функционального состояния гепатоцитов подтверждается также исследованием их способности к накоплению потенциалзависимого зонда ДСМ.

В условиях нашего эксперимента в буферном растворе при pH 7,4 флуоресцентный краситель имеет: максимум поглощения — 450 нм, максимум флуоресценции — 580 нм и максимум возбуждения — 465 нм. В присутствии клеток печени интенсивность флуоресценции красителя ДСМ резко возрастает и характер спектра изменяется. Связывание ДСМ с мембранами приводит к сдвигу положения максимума флуоресценции красителя до 550 нм. Происходит накопление красителя-катиона в клетках и флуоресценция гепатоцитов возрастает. Кинетика роста интенсивности флуоресценции красителя при этом отражает процесс проникновения его в клетку и связывание с мембранами.

Концентрирование зонда клетками обусловливается трансмембранным потенциалом цитоплазматической и митохондриальной мембран. Ранее показано [7], что величины потенциалов при этом не зависят от присутствия ДСМ. Через 15 мин эквilibрации достигается равновесная концентрация зонда внутри митохондрий, т.е. поток катионов зонда через мембрану практически равен нулю, судя по стабилизации величины флуоресценции. Добавка разобщителя к гепатоцитам приводит к значительному снижению интенсивности флуоресценции ДСМ, что подтверждает чувствительность флуоресценции красителя к изменению энергетического состояния клетки (рис. 3).

В процессе гипотермического хранения гепатоцитов интенсивность флуоресценции потенциалзависимого красителя снижается. Как следует из рис. 3, через 72 ч гипотермического хранения суспензии максимальное накопление ДСМ в гепатоцитах было в среде, содержащей добавку в виде КП.

Увеличение протонной проницаемости митохондриальных мембран и нарушение интактности плазматической мембраны гепатоцитов (снижение способности гепатоцитов исключать ТС) сопровождаются снижением суммарной

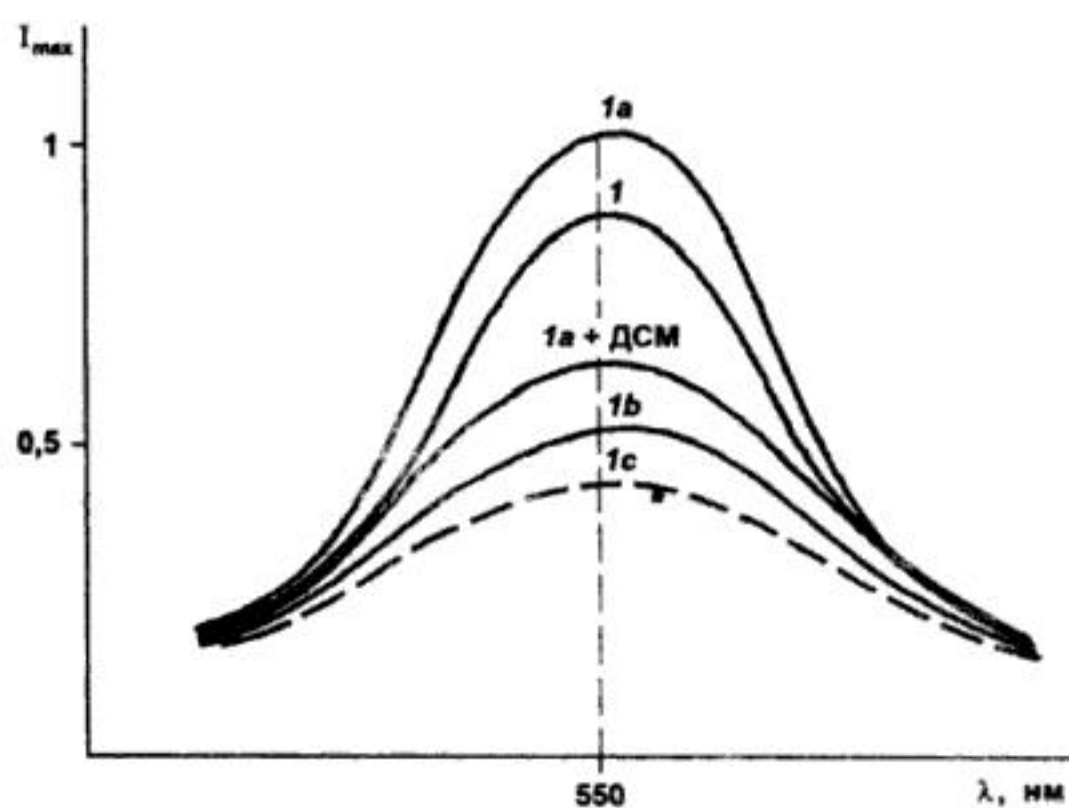


Рис. 3. Влияние гипотермического хранения (72 ч) на флуоресценцию ДСМ в гепатоцитах (1 — СВ + КП — 0 ч; 1a — СВ + КП — 72 ч; 1b — СВ + ДНФ — 0 ч; 1c — СВ + ДСМ — 0 ч)

интенсивности флуоресценции красителя. Это объясняется тем, что при гипотермическом хранении в условиях разобщения дыхания и окислительного фосфорилирования, приводящих к падению трансмембранного потенциала и выходу из митохондрий положительно заряженных ионов, зонд ДСМ (являясь положительно заряженным ионом) значительно меньше накапливается внутри митохондрий, так как мембранный потенциал их резко снижен.

ДСМ — полихроматический потенциалзависимый флуо-

ресцентный краситель. Эти его свойства позволяют одновременно тестировать состояние плазматической мембраны и клеточных компонентов (митохондрий, ядра), а также судить об энергопродуцирующей способности гепатоцитов.

На основании проведенных исследований следует считать, что при гипотермическом хранении гепатоцитов в стандартных средах наиболее оптимальной биодобавкой, позволяющей пролонгировать способность гепатоцитов к синтезу белка и энергопродукции, является препарат КП.

Таким образом, концентрация белков и нуклеотидов в биопрепаратах, полученных методом криоэкстракции из эмбриональных тканей человека 10–12 недель развития, различна.

Общим признаком, объединяющим все исследованные препараты, является наличие на хроматограммах небольших максимумов в области низкомолекулярных пептидов (мол. масса 6 000 и ниже — от 1 до 6%) и максимумов — в области белков с молекулярной массой 150 000 и выше (от 15–18 до 36%).

В образце, выделенном из эмбриональной печени (КП), почти полностью отсутствуют низкомолекулярные нуклеотиды (мол. масса менее 6 000) и содержится большое количество фракции, соответствующей молекулярной массе 20–10 000 (47%).

В условиях гипотермического хранения суспензии гепатоцитов биологические добавки, полученные методом криоэкстракции из эмбриональных тканей человека ранних сроков развития, позволяют значительно пролонгировать способность гепатоцитов к синтезу белка и их энергопродукцию.

Наиболее эффективными биодобавками, позволяющими сохранить исследованные морфофункциональные параметры гепатоцитов через 72 ч гипотермического хранения, являются ТЭП и КП. Общие свойства этих препаратов — содержание в основном высокомолекулярных фракций пептидов и наличие небольших максимумов в области низкомолекулярных пептидов, отличительное — абсолютное отсутствие низкомолекулярных нуклеотидов в препарате КП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова М. А., Полежаев Л. В. Трансплантация эмбриональной замороженной ткани в головной мозг взрослых крыс, интактных и после гипоксии // Докл. АН УССР. — 1983. — 269, № 5. — С. 1206–1209.
2. Блюмкин В. Н., Скалецкий Н. Н., Деревянко В. П. Культура гепатоцитов, полученных из печени эмбрионов человека. Трансплантация и искусственные органы. — М., 1986. — С. 102–105.
3. Гольцев А. Н. и др. Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата // Пробл. криобиологии. — 1996. — № 4. — С. 3–16.
4. Добрецов Г. Е. и др. Флуоресценция 4-*п*-диметиламиностирил-/1-метилпиридиния в живой клетке // Цитология. — 1981. — 23, № 8. — С. 916–922.
5. Стерин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. — 1958. — Т. 23. — С. 652–662.
6. Суббота Н. П., Грищенко В. И., Козюменский В. Ф., Питько В. А. и др. Получение, хранение и применение фрагментов, суспензий и криоэкстракта хориона: Метод. рекомендации. — Харьков, 1996. — 8 с.
7. Суббота Н. П. Функциональное состояние криоконсервированных гепатоцитов человека и животных: Автореф. дис... докт. биол. наук. — Харьков, 1993. — 31 с.
8. Morris J. G. A Biologist's Physical Chemistry. Contemporary Biology Series. Edward Arnold. London. — 1974. — 283 с.

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

Поступила 13.03.98

Н. П. СУБОТА, П. П. ПАШИНСКИЙ, Е. Д. РОЗАНОВА

БИОЛОГИЧНЫЕ СВОЙСТВА КРИОЭКСТРАКТОВ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, м. Харьков

Досліджено якісний склад і вплив біодобавок криоекстрактів з тканин ембріона людини 8–12 тижнів внутрішньоутробного розвитку (тотальний препарат ембріона, криоекстракти печінки та мозку, криоекстракт хоріона) на морфофункціональні параметри гепатоцитів, які зберігаються при гіпотермічних температурах.

N. P. SUBBOTA, P. P. PASHINSKY, E. D. ROZANOVA

BIOLOGICAL PROPERTIES OF CRYOEXTRACTS OUT OF THE EMBRYONIC TISSUES

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

The authors investigated the qualitative composition and action of the bioadditives of the cryoextracts out of the human embryonic tissues, aged 8–12 weeks of the intrauterine development (total preparation of the embryo, cryoextracts of the liver and brain, cryoextract of the chorion), on the morphofunctional parameters of the hepatocytes, being stored at hypothermic temperatures.

УДК 57.043

Э.С.Мельник

ОСМОТИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПОТОКИ ХЛОРИД-АНИОНА И ПРОТОНА В КОНТРОЛЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ

Исследована чувствительность выходящих потоков хлорид-аниона к действию модификаторов ДИДС и гемина в условиях осмотического и температурного воздействия. Установлено, что ингибирующее действие ДИДС зависит от осмолярности среды. Обработка геминем значительно усиливает ингибирующее действие ДИДС.

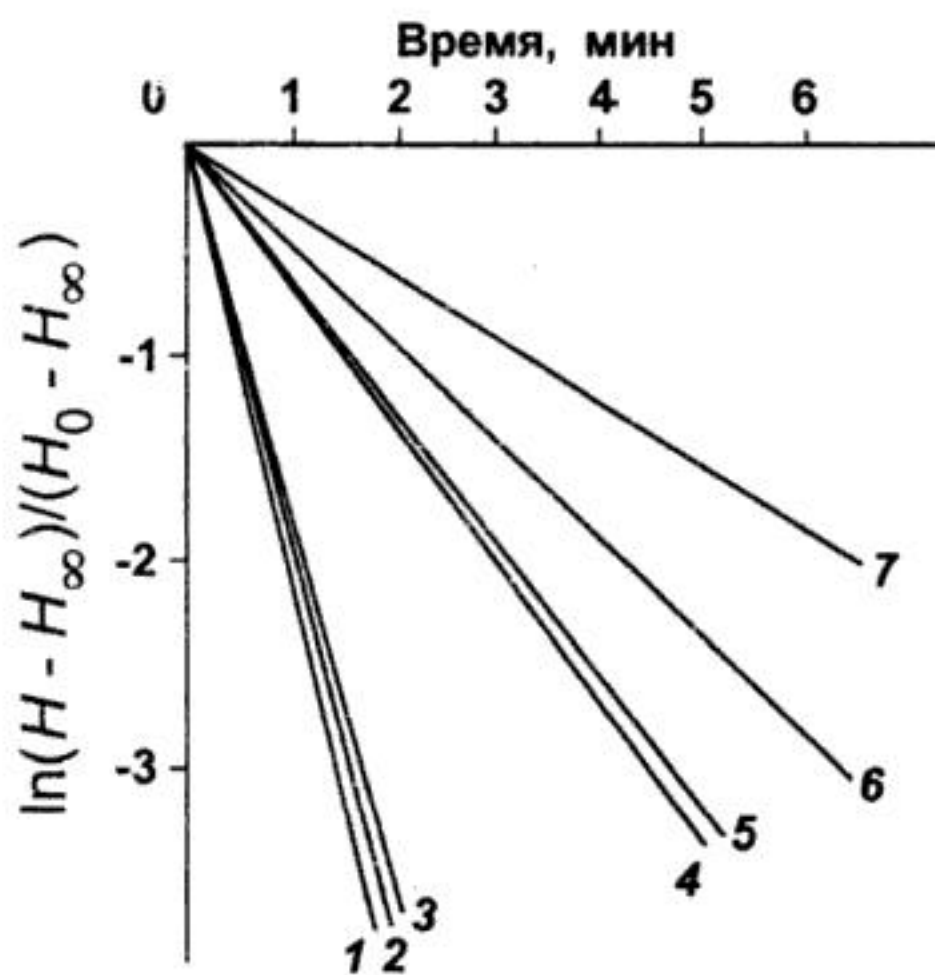
Транспорт анионов — процесс, контролирующий изменение осмотического состояния клетки. Контроль опосредуется влиянием на процессы, регулирующие пассивные потоки катионов [5]. В регуляцию холодовой и осмотической чувствительности эритроцитов в значительной мере вовлекается белок полосы 3, структурные взаимодействия которого с цитоскелетом определяют развитие как холодового, так и гипертонического шока [2]. Значение процессов, связанных с перераспределением анионов при сенсibilизации эритроцитов к холодовому шоку, подтверждают результаты экспериментов, в которых транспорт хлорида блокируется специфическим ингибитором анионного транспорта ДИДС [1,2].

Цель работы — исследовать чувствительность выходящих потоков хлорид-аниона и протона эритроцитов человека в условиях повышенной осмолярности, снижения температуры до 3 °С и действия модификаторов. Одним из модификаторов является ДИДС, который необратимо связывается с белком полосы 3 на внешней стороне эритроцитарной мембраны без значительного внедрения в липидный бислой [6]. В результате ковалентного взаимодействия модифицируются белок-белковые и липид-белковые взаимодействия, отмечается увеличение прочности связи цитоскелета с данным белком [8]. Другим модификатором является гемин, который не использовали при изучении транспортных процессов, однако данные литературы позволили предположить его возможное модифицирующее действие на потоки ионов через мембрану. В частности, известно, что гемин способствует кластеризации белка полосы 3, нарушает подвижность остатков сиаловых кислот [10], снижает взаимодействия скелетных белков [9]. Образование эндогенного гемина

приводит к аутогемолизу эритроцитов, снижению термической и осмотической устойчивости [3]. Указанные модификации при действии гемина и ДИДС могут являться причиной изменения конформационного состояния белка полосы 3 и как следствие изменения процесса транспорта анионов.

В работе использовали эритроциты донорской крови, отмытые раствором, содержащим 150 мМ NaCl, 10 мМ фосфата (pH 7,4). Эритроциты (20%-й гематокрит) обрабатывали гемином в среде, содержащей (мМ): 90 — KCl, 45 — NaCl, 44 — сахарозы, 10 — фосфата (pH 7,4). Гемин добавляли в концентрации 300 мкМ и инкубировали 10 мин при 37 °С [9]. После обработки эритроциты отмывали средой инкубации. При проведении опытов ДИДС (4,4'-диизоцианостильбен-2,2'-дисульфат) в концентрации 2 мкМ добавляли в среду. Динамику перераспределения анионов хлора в среде с низкой ионной силой исследовали в термостатируемой ячейке объемом 2,5 мл с pH -электродом. Запись изменений pH суспензии эритроцитов производили на самописце Эндим (ГДР).

Исследование транспорта хлорид-аниона, сопряженного с движением протона в нативных эритроцитах, показывает, что скорость закисления суспензии эритроцитов оказывается независимой от осмолярности. Так, введение суспензии эритроцитов в 0,86 М раствор сахарозы не приводит к изменению скорости закисления по сравнению с изотоническим раствором сахарозы как при 37 (рисунок, прямые 1, 2), так и при 3 °С (прямые 4, 5). В то же время использование ингибитора анионного транспорта ДИДС выявляет существенную зависимость скорости закисления суспензии эритроцитов от осмолярности. Как видно из данных таблицы, ингибирование ДИДС потоков хлорид-аниона в нативных эритроцитах в гипертоническом растворе сахарозы при 37 °С почти в два раза выше, чем в изотонической среде. Снижение температуры до 3 °С значительно уменьшает эту разницу в ингибировании. Большая степень ингибирования выхода аниона хлора при гипертоническом воздействии, вероятно, связана с большей доступностью ингибитора к связывающим сайтам. Это может происходить как в результате изменения структуры поверхности клетки [1], так и в результате усиления электростатического взаимодействия заряженных участков мембранных белков при повышении осмолярности среды [4]. В свою очередь снижение температуры в изотонических средах приводит к изменению формы эритроцитов [7], делая связывающие сайты более доступными для ДИДС, что выражается в значительном усилении ингибирования выхода хлорид-аниона (таблица). В то же время снижение температуры при высоком осмотическом воздействии не вызывает значительного изменения формы эритроцитов [1], вследствие чего доступность для связывания ДИДС остается на том же уровне.



Влияние обработки гемином на выход хлорид-аниона в раствор сахарозы: 1, 2 — контроль в 0,3 и 0,86 М сахарозе при 37 °С; 3 — гемин в 0,3 и 0,86 М сахарозе при 37 °С; 4, 5 — контроль в 0,3 и 0,86 М сахарозе при 3 °С; 6 — гемин в 0,3 М сахарозе при 3 °С; 7 — гемин в 0,86 М сахарозе при 3 °С

Обработка эритроцитов геминном приводит к эхиноцитозу и полной утрате таких клеток способности изменять свою форму при повышении осмолярности среды [2], что позволяет в какой-то мере оценить влияние электростатических взаимодействий в транспорте хлорид-аниона, не связанных с изменением формы клеток. Исследование выхода хлорид-аниона в обработанных геминном эритроцитах при 37 °С не выявляет различий в скорости закисления по сравнению с нативными эритроцитами как в изотоническом растворе сахарозы, так и в гипертоническом (рисунок, прямая 3). Добавление ДИДС в этих условиях вызывает значительно большее ингибирование выхода хлора по отношению к нативным эритроцитам (таблица). Вероятно, обработка геминном эритроцитов приводит к появлению дополнительных положительно заряженных сайтов для связывания отрицательно заряженных молекул ДИДС. При-

Ингибирование ДИДС эритроцитов, %

Среда (сахароза), М	Температура, °С	Эритроциты	
		нативные	геминные
0,3	37	27	46
0,86	37	52	79
0,3	3	42	73
0,86	3	57	90

чем повышение осмолярности и связанное с этим перераспределение электростатических взаимодействий в анионном переносчике остается главным фактором для связывания ДИДС, так как скорость закисления снижается на 79%, в то время как в изотонической среде на 46% (таблица).

Снижение температуры в ячейке до 3 °С приводит к тому, что скорость закисления суспензии эритроцитов, обработанных геминном, значительно снижается по сравнению с контрольными. В изотоническом растворе сахарозы скорость закисления снижается на 18 (рисунок, прямая 6), а в гипертоническом — на 42% (прямая 7). Вероятно, снижение температуры в гемин-обработанных эритроцитах приводит к перераспределению анионсвязывающих сайтов у входа в канал на внутренней поверхности мембраны. Данный эффект требует дополнительных исследований. Добавление ДИДС к суспензии обработанных геминном эритроцитов при 3 °С значительно замедляет скорость закисления суспензии, достигая 90% ингибирования выхода хлорид-аниона в гипертоническом растворе сахарозы (таблица). Усиление ингибирующего действия ДИДС в этих условиях может быть следствием суммации воздействий температуры и осмолярности среды на гемин-обработанные эритроциты.

Таким образом, ингибирующее действие ДИДС в нативных эритроцитах существенно зависит от осмолярности среды, причем снижение температуры до 3 °С ослабляет эту зависимость. Обработка геминном значительно усиливает ингибирование ДИДС, которое также оказывается зависимым и от повышения осмолярности и от температуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис. ...д-ра биол. наук.— Харьков, 1988.— 30 с.
2. Рамазанов В.В. Вплив осмотичного стресу та модифікаторів цитоскелета на розвиток холодового та гіпертонічного шоку еритроцитів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.— Харків, 1994.— 14 с.
3. Ямайкина И.В., Черницкий Е.А. Гемолиз эритроцитов человека геминном. Роль гемина в аутогемолизе эритроцитов // Биофизика.— 1994.— 39, № 4.— С. 691–694.
4. D'Aviva Hunes M. A spin label study of erythrocyte membranes during simulation of freezing // J. Membrane Biol.— 1981.— 60, № 2.— P. 155–163.
5. Ellory J.C., Hall A.C., Amess J.A. Passive potassium transport in human red cells // Biomed. Biochim. Acta.— 1987.— № 2–3.— P. 531–536.
6. Falke J.J., Chan S.I. Molecular mechanisms of band 3 inhibitors // Biochemistry.— 1986.— 25, № 24.— P. 7888–7906.
7. Glaser R., Fujii T., Muller P., Tamura E., Herrmann A. Erythrocyte shape dynamics — influence of electrolyte conditions and membrane potential // Biomed. Biochim. Acta.— 1987.— 46, № 2–3.— P. 327.

8. Hsu L., Morrison H. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components // *Arc. Biochem. Biophys.*— 1983.—227, № 1.— P. 31–38.
9. Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // *Biochem. Internat.*— 1986.— 13, № 3.— P. 467–477.
10. Wyse J. W., Butterfield D. A. Interaction of hemin with erythrocyte membranes: alterations in the physical state of the major sialoglycoprotein // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1989.— 979, № 1.— P. 121–126.

Харьк. гос. ун-т

Поступила 13.03.98

Е. С. МЕЛЬНИК

ОСМОТИЧНО ІНДУКОВАНІ ПОТОКИ ХЛОРИД-АНІОНА ТА ПРОТОНА В КОНТРОЛІ ТЕМПЕРАТУРНОГО ВПЛИВУ НА ЕРИТРОЦИТИ

Харківський державний університет

Досліджена чутливість вихідного потоку хлорид-аніона до дії модифікаторів ДІДС та геміну в умовах осмотичного та температурного впливу. Виявлено, що інгібруюча дія ДІДС залежить від осмолярності середовища. Обробка геміном значно посилює інгібруючу дію ДІДС.

E. S. MELNIK

OSMOTICALLY INDUCED FLOWS OF CHLORIDE-ANION AND PROTON IN THE TEMPERATURE CONTROL OVER RED CELLS

Kharkov State University

The author studied the susceptibility of the outflows of chloride-anion to the action of the modifying agents DIDS and hemin during osmotic and temperature exposure. The inhibiting action of DIDS was found to depend on the osmolarity of the medium. Treatment with hemin considerably increases the inhibiting action of DIDS.

УДК 615.361.36.014.43:615.361.41.014.43

С.Е.Гальченко, А.В.Мамонтова, Л.Н.Тыныныка, Б.П.Сандомирский

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ДЫХАНИЯ ФРАГМЕНТОВ КСЕНООРГАНОВ

Изучали сохранность эндогенного дыхания фрагментов печени новорожденных и половозрелых свиней и фрагментов селезенки половозрелых животных в зависимости от скоростей охлаждения. Криопротекторы ПЭО-400, ПЭО-1500, глицерин, ДМСО в 10-20%-х концентрациях использовали как кризащитные растворы. Показано, что ПЭО-400 и ПЭО-1500 позволяют получить сохранность дыхания после криоконсервирования на уровне, близком к контрольному, при медленных скоростях охлаждения. Отмечено наличие второго максимума сохранности дыхания в области больших скоростей охлаждения.

Успешное использование фрагментов ксеноорганов и полученных из них суспензий клеток в контурах для экстракорпоральной гемоперфузии требует создания достаточных запасов этих биологических материалов в низкотемпературном банке [2, 4].

Известно, что сохранность криоконсервируемого биоматериала значительно зависит от применяемого криопротектора, его концентрации и скорости охлаждения [5]. В работе изучали влияние скорости охлаждения на интенсивность эндогенного дыхания фрагментов печени свиней, поросят и селезенки свиней в зависимости от концентрации криопротекторов ПЭО-400, ПЭО-1500, глицерина и ДМСО.

Органы животных получали в операционной вивария ИПКиК НАН Украины или на мясокомбинате и доставляли для дальнейшего использования в изотермическом сосуде со льдом. Обработку материала проводили при температуре около 0 °С. Органы измельчали на фрагменты размером около 1 мм и три раза отмывали в десятикратном объеме физиологического раствора. После этого к полученным фрагментам добавляли растворы криопротекторов

на среде 199 в соотношении 1:1. При этом конечная концентрация криопротекторов составляла 10 и 20%. Материал замораживали с помощью замораживателя УОП-6 или устройства для замораживания биологических объектов [3]. Отогревали на водяной бане при 40 °С. Отмывку от криопротектора про-

Т а б л и ц а 1

Интенсивность дыхания фрагментов печени новорожденных поросят (нмоль O_2 /мин· мг) в зависимости от концентрации криопротекторов и скорости охлаждения

Криопротектор	Контроль	Скорость охлаждения, °С/мин					
		1	10	100	1 000	8 000	80 000
Физиологический раствор	0,61 ± 0,05	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,03
ПЭО-400 20%-й	0,51 ± 0,06	0,48 ± 0,04*	0,31 ± 0,03	0,28 ± 0,02	0,45 ± 0,03*	0,48 ± 0,02*	0,48 ± 0,04*
ПЭО-400 10%-й	0,55 ± 0,05	0,47 ± 0,03*	0,29 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,43 ± 0,02	0,44 ± 0,04	0,47 ± 0,05*
ПЭО-1500 20%-й	0,56 ± 0,04	0,48 ± 0,03*	0,31 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,46 ± 0,03	0,47 ± 0,05	0,49 ± 0,04*
ПЭО-1500 10%-й	0,58 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,28 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,42 ± 0,03	0,43 ± 0,04	0,45 ± 0,01*
ДМСО 20%-й	0,58 ± 0,04	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,35 ± 0,03	0,38 ± 0,04*
ДМСО 10%-й	0,60 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,05	0,34 ± 0,02
Глицерин 20%-й	0,56 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,27 ± 0,02
Глицерин 10%-й	0,56 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,28 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,28 ± 0,03

*Различие недостоверно по сравнению с контролем, $P > 0,05$.

Т а б л и ц а 2

Интенсивность дыхания фрагментов печени взрослых животных (нмоль O_2 /мин· мг) в зависимости от концентрации криопротекторов и скорости охлаждения

Криопротектор	Контроль	Скорость охлаждения, °С/мин					
		1	10	100	1 000	8 000	80 000
Физиологический раствор	0,53 ± 0,05	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,01
ПЭО-400 20%-й	0,47 ± 0,04	0,44 ± 0,03*	0,27 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,35 ± 0,03*	0,40 ± 0,04*
ПЭО-400 10%-й	0,48 ± 0,05	0,44 ± 0,03*	0,24 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,35 ± 0,04
ПЭО-1500 20%-й	0,49 ± 0,05	0,42 ± 0,02*	0,26 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,31 ± 0,02	0,34 ± 0,02*	0,38 ± 0,04*
ПЭО-1500 10%-й	0,51 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,33 ± 0,01
ДМСО 20%-й	0,54 ± 0,06	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,10	0,26 ± 0,03	0,30 ± 0,03
ДМСО 10%-й	0,53 ± 0,05	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,30 ± 0,02
Глицерин 20%-й	0,53 ± 0,05	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,03
Глицерин 10%-й	0,53 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,01

*Различие недостоверно по сравнению с контролем, $P > 0,05$.

Т а б л и ц а 3

Интенсивность дыхания фрагментов селезенки половозрелых свиней (нмоль O_2 /мин·мг) в зависимости от концентрации криопротекторов и скорости охлаждения

Криопротектор	Контроль	Скорость охлаждения, °C/мин					
		1	10	100	1 000	8 000	80 000
Физиологический раствор	0,38 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
ПЭО-400 20%-й	0,35 ± 0,02	0,33 ± 0,03*	0,32 ± 0,03*	0,08 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,20 ± 0,02
ПЭО-400 10%-й	0,34 ± 0,03	0,34 ± 0,03*	0,31 ± 0,03*	0,24 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,15 ± 0,01
ПЭО-1500 20%-й	0,37 ± 0,04	0,33 ± 0,03*	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01
ПЭО-1500 10%-й	0,36 ± 0,02	0,30 ± 0,02*	0,22 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01
ДМСО 20%-й	0,31 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,01
ДМСО 10%-й	0,30 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Глицерин 20%-й	0,32 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Глицерин 10%-й	0,34 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01

*Различие недостоверно по сравнению с контролем, $P > 0,05$.

водили сахарозными средами. Интенсивность эндогенного дыхания фрагментов определяли полярографическим методом.

Интенсивность дыхания фрагментов печени новорожденных и половозрелых животных является важным тестом для определения сохранности жизнеспособности ткани. Для разработки технологии их криоконсервирования необходимо знать влияние различных режимов охлаждения на этот показатель.

Как видно из табл. 1–3, более эффективными криопротекторами являются ПЭО-400 и ПЭО-1500.

При использовании больших скоростей охлаждения отмечается наличие второго максимума сохранности, как и для некоторых других биологических объектов [1]. Однако для фрагментов печени этот максимум сдвинут в область более высоких скоростей по сравнению с фрагментами селезенки. При этом сохранность фрагментов печени выше, чем селезенки.

Также можно отметить более высокую интенсивность дыхания фрагментов печени новорожденных поросят по сравнению с фрагментами половозрелых свиней. Это, очевидно, объясняется тем, что печень новорожденных поросят находится в стадии роста и интенсивного метаболизма гепатоцитов.

Применение ПЭО-400 и ПЭО-1500 в качестве криопротекторов позволяет сохранить интенсивность эндогенного дыхания при криоконсервировании фрагментов печени и селезенки на уровне, близком к контролю при медленных скоростях охлаждения. Необходимо продолжить исследования по выяснению влияния режимов криоконсервирования на другие показатели сохранности ткани и ее функциональной активности с привлечением других методов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гальченко С.Е. Особенности криоконсервирования биологических объектов с применением больших скоростей охлаждения: Автореф. дис... канд. биол. наук. – Харьков, 1990. – 17 с.
2. Маргулис М.С., Кузнецов К.А., Ерухимов Е.А. и др. Применение гемоперфузии через взвесь фрагментов селезенки для лечения септических состояний в эксперименте и клинике // Вестн. хирургии им. И.И.Грекова. – 1990. – Т. 144, № 5. – С. 85–87.
3. Пат. РФ № 1655426 А 01N/00. Устройство для замораживания биологических объектов / В.И.Грищенко, В.Ф.Тарасов, С.Е.Гальченко и др. Заявл. 18.04.85 № 3875501. Оpubл. 15.06.91 № 22.
4. Сафаров С.Ю., Тюшина Г.К., Прохоров В.Я. Новый способ детоксикации организма в эксперименте // Пат. физиол. – 1993. – 3. – С. 30–34.
5. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др. Криоконсервирование клеточных суспензий // Киев: Наук. думка. – 1983. – 240 с.

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

Поступила 18.05.97

С. Е. ГАЛЬЧЕНКО, А. В. МАМОНТОВА, Л. М. ТИНИНИКА, Б. П. САНДОМИРСЬКИЙ

ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ДИХАННЯ ФРАГМЕНТІВ КСЕНООРГАНІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчали збереження ендogenous дихання фрагментів печінки статевозрілих та новонароджених свиней і фрагментів селезінки статевозрілих тварин у залежності від швидкостей охолодження. Кріопротектори ПЕО-400, ПЕО-1500, гліцерин та ДМСО у 10-20%-х концентраціях використовували як кріозахисні речовини. Показано, що розчини ПЕО-400 і ПЕО-1500 дозволяють отримати рівень ендogenous дихання, близький до контрольного, при повільних швидкостях охолодження. Виявлена наявність другого максимуму активності ендogenous дихання в зоні великих швидкостей охолодження.

S. E. GALCHENKO, A. V. MAMONTOVA, L. N. TYNINYKA, B. P. SANDOMIRSKY

CRYOPRESERVATION EFFECT ON THE INTENSITY OF XENOORGAN RESPIRATION FRAGMENTS

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

The integrity of endogenous respiration of liver fragments of new born and mature pigs, and spleen fragments of mature animals depending on cooling rates has been studied. Cryoprotectants PEO-400, PEO-1500, glycerol, DMSO in 10–20% concentrations were used as cryoprotective solutions. It has been shown that PEO-400 and PEO-1500 allow to obtain the respiration integrity after cryopreservation at the level close to control one, at slow cooling rates. The presence of the second maximum in the respiration integrity is noted in the field of high cooling rates.

УДК 618.177-089.888.11.618.11

**В.И.Грищенко, М.П.Петрушко, В.И.Пиняев, И.В.Терпячая,
Л.И.Луцкая, Н.Н.Чуб, М.И.Крамар, Г.Г.Юрченко**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕРМЫ, ХРАНИВШЕЙСЯ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ, ДЛЯ РЕИНСЕМИНАЦИИ НЕОПЛОДОТВОРЕННЫХ ООЦИТОВ В ПРОГРАММЕ ЭКО

Проведено исследование по изучению оплодотворяемости, дробления и частоты наступления беременности после повторной инсеминации неоплодотворенных ооцитов спермой мужа, хранившейся в условиях гипотермии. Приводится клинический случай беременности после переноса в полость матки эмбрионов, полученных в результате реинсеминации. Проведенные исследования дают основание считать, что использование данного метода позволит увеличить результативность программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

В результате научных исследований предложены эффективные методы криоконсервирования спермиев человека, на базе которых уже созданы крио-

банки мужских репродуктивных клеток. Однако в некоторых случаях появляется необходимость в кратковременном хранении спермиев.

Для успешного проведения программы ЭКО используются: грамотно подобранные схемы индукции суперовуляции и определение времени аспирации фолликулов, точная оценка степени зрелости яйцеклеток и установление момента их инсеминации, улучшение условий культивирования и техники переноса эмбрионов. Несмотря на оптимизацию каждого этапа, не всегда удается добиться высокой фертилизации яйцеклеток. По данным многих исследователей в условиях *in vitro* от 10 до 50% ооцитов не оплодотворяются [6].

В литературе встречаются сообщения о положительных [5] и отрицательных [7] попытках реинсеминировать неоплодотворенные ооциты, для этого часто используют нативную сперму мужа либо сперму донора [9].

Цель настоящего исследования — изучение возможности фертилизации, дробления, а также частоты наступления беременности после повторной инсеминации неоплодотворенных ооцитов спермой мужа, хранившейся в условиях гипотермии в программе ЭКО.

Материалом для исследования служили сперма и ооциты пациентов, участвующих в программе ЭКО. Морфологические и функциональные свойства спермиев определяли путем микроскопического исследования в камере Маклера при увеличении $\times 240$.

Образец, обогащенный подвижными спермиями, готовили методом *swim up* [4]. После проведения инсеминации *in vitro* пластиковую центрифужную пробирку с находящимся в ней спермоконцентратом тщательно закупоривали и помещали в герметично закрытый эксикатор, который устанавливали в холодильную камеру с температурой 10 °С. Образец находился в условиях гипотермии 20–24 ч.

Перед реинсеминацией спермоконцентрат перемещали из холодильной камеры в CO₂-инкубатор с постоянными режимами (температура — 37 °С, влажность — 90%, содержание CO₂ — 5%), инкубировали 5 мин, после чего проводили анализ сохранности спермиев, учитывая концентрацию сперматозоидов и их кинетику. При наличии достаточного количества подвижных и активно-подвижных спермиев производили реинсеминацию ооцитов, для чего в лунку с ооцитами добавляли аликвоту активно-подвижных спермиев.

Повторно инсеминированные ооциты исследовали на наличие фертилизации через 20–24 ч. Эмбриоперенос осуществляли через 24–48 ч после реинсеминации по стандартной методике.

Нами была проведена реинсеминация 98 ооцитов в 20 циклах ЭКО. Индукцию овуляции осуществляли с использованием человеческого менопаузального гонадотропина и фолликулостимулирующего гормона. Мониторинг фолликулов, аспирацию ооцитов, инкубацию, инсеминацию и технику культивирования проводили по общепринятым протоколам программы ЭКО [2, 4].

Средний показатель спермограммы 20 эякулятов, которые хранили в условиях гипотермии, следующий: объем — 2 мл, концентрация спермиев — 38 млн/мл, отношение активно-подвижных и подвижных спермиев к общему количеству спермиев в эякуляте — 33%.

После выделения активно-подвижной фракции показатели кинезисграммы изменились: концентрация — 30 млн/мл, количество подвижных и активно-подвижных форм — 72,8%. При 24-часовом хранении в условиях гипотермии и 10-минутном культивировании в среде Menezo B2 показатели кинезисграммы стали следующие: концентрация — 15 млн/мл, отношение активно-подвижных и подвижных спермиев к их общему количеству — 86,8%.

Из 98 реинсеминированных ооцитов 54 были охарактеризованы как зрелые, 23 — зрелые с плотной лучистой короной, 21 — перезрелые. Оплодотворились 23 (23,5%) клетки. Из них дальнейшее развитие в культуре до стадии 4–8 бласто-

меров продолжили 20 эмбрионов, что составило 86,9%. Все они были перенесены женщинам в полость матки. Было диагностировано 2 беременности.

В [5–9] имеются сообщения о неспособности реинсеминированных ооцитов к имплантации. Поэтому мы хотим особо отметить случай наступления беременности у пациентки после подсадки 2 эмбрионов, полученных в результате реинсеминации зрелых ооцитов спермой, хранившейся в условиях гипотермии.

Пациентка С в возрасте 25 лет обратилась в Центр репродукции и генетики Харькова по поводу бесплодия. В анамнезе пациентки двухсторонняя трубэктомия, разрыв правого кистозно-измененного яичника. Была проведена противовоспалительная терапия. Диагноз: вторичное бесплодие.

Данные спермограммы мужа: объем эякулята — 3 мл, $pH = 7,5$, разжижение — 20 мин. Количество спермиев в эякуляте — 40 млн. Кинезисграмма: активно-подвижных сперматозоидов — нет, подвижных — 50%, местно-качающихся — 40%, неподвижных — 10%. Агглютинаты отсутствуют. Круглоклеточность повышенная: 7–8 в поле зрения. Диагноз: астеноспермия.

Пациенты были приняты на программу экстракорпорального оплодотворения. Индукция суперовуляции была проведена с использованием пергонала ("Serono"). Рост фолликулов исследовали морфометрически. Аспирация ооцитов была проведена на 12-й день цикла. Из аспирата получено 10 клеток высокой степени зрелости, причем 6 клеток — зрелые и 4 — перезрелые. Инсеминация была проведена через 3 и 4 ч после предварительного инкубирования яйцеклеток. Однако через 18 ч после инсеминирования оплодотворение отсутствовало во всех клетках. Немедленно провели реинсеминацию ооцитов спермой, хранившейся в условиях гипотермии. Через 24 ч после реинсеминации нами был осуществлен эмбриоперенос 2-х эмбрионов, находящихся на стадии 2-х бластомеров.

На 14-е сутки была диагностирована беременность по качественному показателю в моче хорионического гонадотропина. На 4-й неделе беременность была подтверждена данными УЗИ (рисунок). Родились 2 мальчика весом 2 500 и 2 700 г.

Исследования, проведенные в [1], позволили выяснить морфологические и функциональные состояния спермиев человека в результате хранения в условиях гипотермии.



Беременность 4 недели после переноса эмбрионов, полученных в результате повторной инсеминации спермой, хранившейся в условиях гипотермии в программе ЭКО

Результаты представленного исследования расширяют возможности использования гипотермического хранения спермиев в практической медицине, а именно для реинсеминации неоплодотворенных ооцитов. В [5–9] описываются попытки реинсеминировать такие клетки, однако в доступной литературе не встречалось сообщений о наступлении беременности после переноса эмбрионов, полученных в результате реинсеминации неоплодотворенных ооцитов.

Применение метода хранения спермиев в условиях гипотермии имеет определенные достоинства,

так как не требует дорогостоящей аппаратуры, спермии сохраняют способность к фертилизации в среде культивирования, что не предусматривает введения криопротектора либо других соединений, требующих дальнейшей отмывки. Кроме того, этот метод позволяет использовать эякуляты с пониженными качественными характеристиками.

Данный метод может быть использован в технологии ЭКО для реинсеминации неоплодотворенных ооцитов, вероятность наступления беременности при этом составляет 10%. Мы считаем, что даже при такой малой вероятности наступления беременности после реинсеминации неоплодотворенных ооцитов необходимо обязательно проводить данную процедуру с тем, чтобы дать шанс еще одной супружеской паре обрести желанного ребенка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крамар М. И. Влияние гипотермии на морфофункциональные свойства спермиев человека: Автореф. дис.... канд. биол. наук. – Харьков, 1992. – 16 с.
2. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы. – М.: Мир, 1990. – 406 с.
3. Чуб Н. Н., Терпячая И. В., Пиняев В. И., Луцкая Л. И. Изучение пенетрационной и оплодотворяющей способности спермиев человека, хранившихся в условиях гипотермии: Сб. науч. трудов симпозиума с международным участием. – Киев, 23–24 мая 1995. – С. 184–186.
4. Элдер К., Эйвери С., Миллз К. IVF. Лабораторные процедуры – М., 1990. – 23 с.
5. Pampiglione J., Mills C., Campbell S. et al. The clinical outcome of reinsemination of human oocytes, fertilized *in vitro* // F. S. – 1990. – V. 53. – P. 306–310.
6. Plachot M., de Grouchy J., Junca et al. Chromosome analysis of human oocytes and embryos: does delayed fertilization increase chromosome imbalance // Hum. Repr. – 1988. – V. 3. – P. 125–127.
7. Rafael Z., Kopf G. S., Blasco L., Tureck R. W. Fertilization and cleavage reinsemination of human oocytes *in vitro* // F. S. – 1986. – V. 45. – P. 58–62.
8. Trounson A., Webb J. Fertilization of human oocytes following reinsemination *in vitro* // F. S. – 1987. – V. 48. – P. 617–623.
9. Veeck L. L., Wortham J., Witrmeyes et al. Vmaturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization // F. S. – 1983. – V. 39. – P. 594.

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

Поступила 30.03.98

В. І. ГРИЩЕНКО, М. П. ПЕТРУШКО, В. І. ПІНЯЄВ, І. В. ТЕРПЯЧА, Л. І. ЛУЦЬКА, Н. М. ЧУБ,
М. І. КРАМАР, Г. Г. ЮРЧЕНКО

ВИКОРИСТАННЯ СПЕРМИ, ЩО ЗБЕРІГАЛАСЯ В УМОВАХ ГІПОТЕРМІЇ, ДЛЯ РЕІНСЕМІНАЦІЇ НЕЗАПЛІДНЕНИХ ООЦИТІВ У ПРОГРАМІ ЕКЗ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Проведено дослідження щодо вивчення запліднення, дроблення та частоти виникнення вагітності після повторної інсеминації незапліднених ооцитів спермою чоловіка, що зберігалася за умовами гіпотермії. Наводиться клінічний випадок вагітності після перенесення в порожнину матки ембріонів, які утворилися в результаті реінсеминації. Проведені дослідження дають змогу вважати, що використання даного методу дозволить збільшити результативність програми екстракорпорального запліднення (ЕКЗ).

V. I. GRISCHENKO, M. P. PETRUSHKO, V. I. PINYAEV, I. V. TERPYACHAYA, L. I. LUTSKAYA,
N. N. CHUB, M. I. KRAMAR, G. G. YURCHENKO

APPLICATION OF SPERMATOZOA, STORED UNDER HYPOTHERMIC CONDITIONS, FOR RE-INSEMINATION OF THE UNFERTILIZED OOCYTES IN THE ECF PROGRAMME

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

The authors studied the fertilization, cleavage and frequency of pregnancy occurrence following a repeated insemination of the unfertilized oocytes with the husband's spermatozoa, which were stored under hypothermic conditions. There is reported a clinical case of pregnancy following transfer into the uterine cavity of the embryos, harvested due to re-insemination. The investigations conducted make it possible to conclude that application of the given method will make it possible to increase the efficiency of the extracorporal fertilization (ECF) programme.

РЕГУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ МОЧИ ГИБЕРНИРУЮЩИХ СУСЛИКОВ *C.UNDULATUS*, НА СКОРОСТЬ МЕТАБОЛИЗМА У БЕЛЫХ МЫШЕЙ

Белым мышам внутрибрюшинно вводилась моча сусликов *C.undulatus*, забранная из мочевого пузыря после их декапитации в разные дни баута. Отмечено, что максимальным ингибирующим эффектом на температуру тела мышей обладает моча сусликов, взятая сразу после их пробуждения от спячки.

В [4] показано, что инъекция мышам плазмы крови, взятой у гибернирующих сусликов *C.undulatus*, существенно влияет на уровень метаболизма у животных в зависимости от периода взятия проб. Одним из возможных путей периодической инактивации “триггера” или “триггеров спячки” во время краткосрочных пробуждений зимнеспящих может быть экскреция в мочу биологически активных молекул и вывод их таким образом из организма [6]. В [9] было показано, что внутривенное введение “летним” сусликам мочи данного вида животных, забранной зимой во время спровоцированных пробуждений, вызывает достаточно глубокую гибернацию. Этот эффект не обладал видовой специфичностью, так как моча гибернирующих летучих мышей [5] или черного медведя также вводила “летних” сусликов в состояние спячки. Задача данной работы — оценить этот эффект на незимнеспящих животных.

Опыты проводились на белых беспородных мышах-самцах весом 20–25 г. Моча сусликов инъектировалась внутрибрюшинно в дозе 0,6 мл на 25 г веса мыши. Гипотермический эффект оценивался по изменению температуры тела животных T_t , которая измерялась ректально введением датчика электротермометра ТЭМП-60 в ободочную кишку мыши на глубину 3,5 см. Зимой (январь-февраль) моча забиралась из мочевого пузыря после декапитации сусликов в состоянии спячки на 1-, 6-, 9- и 15-й дни баута и сразу после пробуждения. Весной (апрель), когда наблюдались последние бауты перед окончанием зимней спячки, моча забиралась на 3-й день баута, сразу после пробуждения, через одну и две недели после окончательного пробуждения. У “летних” активных животных забор мочи осуществлялся в августе, инъекция мышам — не позднее 30 мин после забора.

Результаты наших опытов на белых мышах, которым внутрибрюшинно вводилась моча сусликов *C.undulatus*, забранная из мочевого пузыря после их декапитации в разные дни баута, приведены на рис. 1. Как видим, проявляется некоторая не очень выраженная тенденция увеличения гипотермического эффекта со временем нахождения сусликов в состоянии спячки, однако несравненно более выраженным эффектом обладала моча, забранная сразу после спровоцированного пробуждения животных. В этом случае T_t мышей понижалась в среднем более, чем на 9 °С, и только примерно через 4 часа после инъекции мыши возвращались в субнормальное состояние.

Не менее интересные, на наш взгляд, данные получены и весной в период, непосредственно предшествующий окончательному выходу сусликов из зимней спячки. Моча сусликов *C.undulatus*, еще находившихся в это время в состоянии глубокой гибернации с T_t около 6 °С, дала существенно меньший эффект по сравнению с таковой в зимний период (рис. 2). Моча же, забранная у сусликов сразу после выхода из состояния спячки, и в этом случае имела повышенную гипотермическую активность, которая постепенно снижалась в

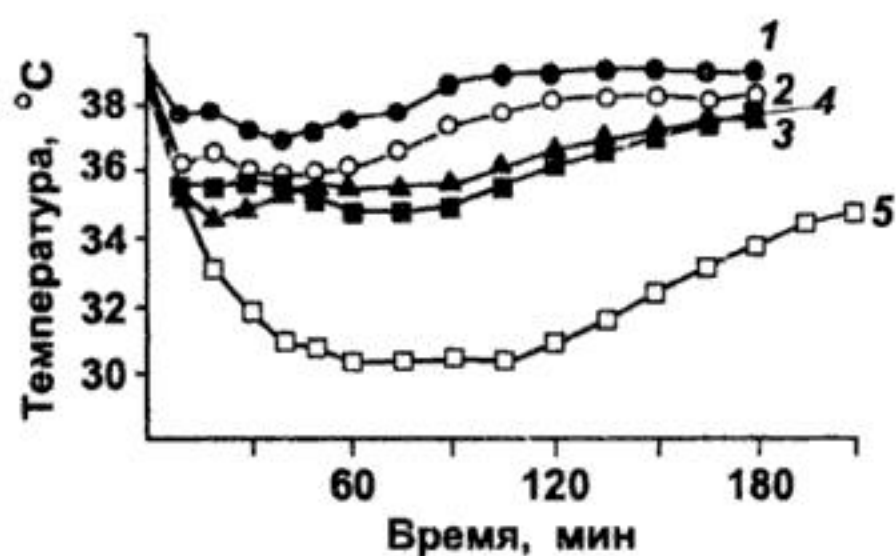


Рис. 1. Гипотермическое влияние на белых мышей внутрибрюшинной инъекции мочи якутских сусликов (0,6 мл на 25 г веса), забранной в 1-, 6-, 9- и 15-й дни баута и во время зимнего пробуждения (кривые 1, 2, 3, 4 и 5 соответственно). По оси абсцисс — время после инъекции, по оси ординат — ректальная температура

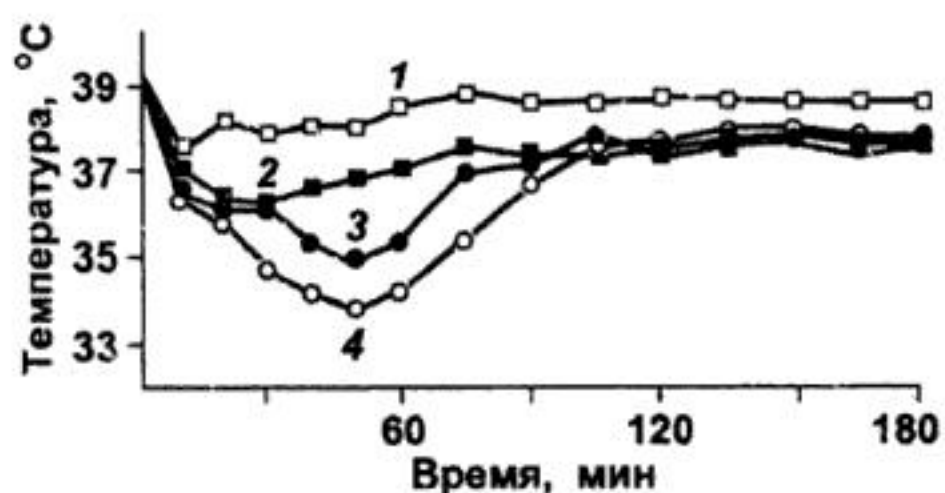


Рис. 2. Гипотермическое влияние на белых мышей внутрибрюшинной инъекции мочи якутских сусликов (0,6 мл на 25 г веса), забранной в весенний период в состоянии глубокой гибернации (1), сразу после пробуждения (2), через одну (3) и две (4) недели после пробуждения. Другие обозначения те же, что и на рис. 1.

течение 2–3-х недель после окончательного их пробуждения. Моча “летних” сусликов, вводимая мышам в контрольных опытах, не обнаружила ингибирующей активности.

Итак, в отличие от плазмы крови, ингибирующий фактор которой наиболее выражен при вхождении в новый баут и постепенно инактивируется перед очередным пробуждением, ингибирующая активность мочи сусликов, напротив, несколько увеличивается со временем нахождения в состоянии гибернации, максимальный же эффект наблюдается сразу после пробуждения животных.

Существует предположение, что относительно низкомолекулярный “триггер” продуцируется в мозге зимнеспящих и, проникая в общее кровяное русло через ГЭБ, связывается с альбуминовым носителем, чем и объясняют наличие специфической активности как в низкой (менее 5 кД), так и более высокомолекулярной (около 70 кД) фракции крови зимнеспящих [8]. Способностью “триггера” проникать через ГЭБ, по-видимому, могут быть объяснены и многие эффекты, наблюдавшиеся при его периферическом введении обычным теплокровным, длительность и разнообразие которых трудно объяснить без участия центральных структур (гипотермия, снижение уровня метаболизма, брадикардия, анорексия, снижение функции почек и др.) [2, 8, 11].

Зависимость эффективности и направленности физиологического действия биологически активных фракций от момента их выделения из тканей зимнеспящих в течение баута пока мало исследована. Отсутствие конкретных сведений по данному вопросу, конечно, затрудняет тестирование и идентификацию новых веществ, однако не это обстоятельство, по нашему мнению, является основной причиной неудачных попыток выделения в чистом виде “триггера спячки”. Маловероятно само существование “триггера” в виде одного “чистого” вещества, способного обеспечивать глубокие и согласованные перестройки поведения, физиологических функций и обменных процессов организма при вхождении в гипобиоз. Более вероятен здесь совместный эффект специфического “коктейля” веществ, различающихся как по “мишеням”, так и по времени своего воздействия. Так, дыхание и кровообращение, например, периодически активируются при краткосрочных пробуждениях от спячки [1, 3, 7], в то время как пищеварительная система истинных зимнеспящих полностью “отключена” на весь гетеротермный период [3, 7]. Протекание спячки контролируется центральной нервной системой [10], однако различные структуры мозга функционируют при этом с разной степенью активности: гиппокамп

или гипоталамус, например, даже в состоянии глубокой гибернации выполняют свои "сторожевые" и регуляторные функции, биоэлектрическая же активность неокортекса в это время полностью подавлена.

Выявленные нами изменения ингибирующей активности мочи сусликов, по-видимому, отражают общие закономерности продуцирования и инактивации биологически активных веществ в тканях зимне спящих в течение баута. Для идентификации же отдельных составляющих "триггера спячки" и уточнения их специфической роли в механизмах гибернации необходимы дальнейшие более детальные исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ануфриев А. И., Ахременко А. К., Слепцов М. К. Изменение массы внутренних органов и картины крови у длиннохвостого суслика (*Citellus undulatus* Pallas) в течение спячки: Фауна и экология млекопитающих Якутии. – Якутск, 1985. – С. 89–97.
2. Иваницкий Г. Р., Колаева С. Г., Пастухов Ю. Ф. и др. Эффект выраженного снижения метаболизма у теплокровных эндогенными веществами из тканей зимне спящих в состоянии спячки // Докл. АН СССР. – 1982. – Т. 267, № 4. – С. 978–980.
3. Калабухов Н. И. Спячка млекопитающих как сочетание энергетического баланса организма и естественного отбора: Эволюционные аспекты гипобиоза и зимней спячки. – Л.: Наука, 1986. – С. 6–17.
4. Кругман И. И., Игнатъев Д. А., Котелевская С. М. Гипотермический эффект фракций сыворотки крови сусликов (*Citellus undulatus*) у гомеотермов: Механизм зимней спячки. – Пушкино, 1987. – С. 118–126.
5. Bruce D. S., Tugby M. L., Pearson P. J. Summer hibernation induced in ground squirrels (*Citellus tridecemlineatus*) by urine or plasma from hibernating bats (*Myotis lucifugus* or *eptesicus fuscus*) // Cryobiology. – 1984. – 21. – P. 371–374.
6. Daw A. R., Spurrier W. A. The blood-borne "trigger" for natural mammalian hibernation in the 13-lined ground squirrel and woodchuck // Cryobiology. – 1972. – 9. – P. 163–172.
7. Lyman C., Chotfield P. Physiology of hibernation in mammals // Physiol. Rev. – 1955. – 35. – P. 403–447.
8. Oeltgen P. R., Walsh J. W., Hamann S. R. et al. Hibernation "trigger" opioid-like inhibitory action in brain function of the monkey // Pharmac. Biochem. Behav. – 1982. – 17, № 6. – P. 1271–1274.
9. Rosser S. P., Bruce D. S. Induction of summer hibernation in the 13-lined ground squirrel *Citellus tridecemlineatus* // Cryobiology. – 1978. – 15. – P. 113–116.
10. South F. E., House W. A. Energy metabolism in hibernation // Mammalian hibernation. – 1967. – 3. – P. 305–324.
11. Swan H., Schatte C. L. Antimetabolic extract from the brain of the hibernating ground squirrel *Citellus tridecemlineatus* // Science. – 1977. – 195. – P. 84–85.

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

Поступила 5.03.98

В. І. ЗАГНОЙКО

РЕГУЛЮЮЧА ДІЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН, ЯКІ ВХОДЯТЬ ДО СКЛАДУ СЕЧІ ГІБЕРНУЮЧИХ ХОВРАХІВ *C. UNDULATUS*, НА СТАН МЕТАБОЛІЗМУ У БІЛИХ МИШЕЙ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Білим мишам внутрішньоочеревинно вводилась сеча ховрахів *C. undulatus*, що була взята із сечового міхура після їх декапітації у різні дні баута. Відзначено, що максимальний інгібіруючий ефект на температуру тіла мишей виявляє сеча ховрахів, яка взята одразу після їх пробудження від сплячки.

V. I. ZAGNO'KO

REGULATING ACTION OF THE BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, COMPRISING THE UREA OF THE HIBERNATING GROUND SQUIRRELS *C. UNDULATUS*, ON THE RATE OF METABOLISM IN WHITE MICE

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

White mice were intraperitoneally injected with the urea of the ground squirrels *C. undulatus*, collected from the urinary bladder following their decapitation at various days of the bout. It was reported that the maximum inhibiting action on the temperature of the body of the mouse was characteristic of the urea of the ground squirrels, collected just after their arousal

Т.П.Бондаренко, А.В.Геращенко, И.И.Кирюшина**ВЛИЯНИЕ ДИМЕКСИДА И ЭКСТРАКТОВ ГИПОФИЗА
НА ГОРМОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ
КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ**

Исследовано влияние димексида и гомогенатов гипофиза на секреторную функцию клеток культуры коры надпочечников новорожденных поросят. Установлено, что клетки в различные сроки культивирования сохраняют функцию секреции гормонов с максимумом секреции на 5-е сутки. Димексид в 10%-й концентрации угнетает секрецию кортизола, а в 3–5%-й — стимулирует.

Широкое применение при лечении многих хронических заболеваний глюкокортикоидов привело к развитию у значительной части больных вторичной надпочечниковой недостаточности и возникновению осложнений за счет побочных эффектов глюкокортикоидов и необходимости увеличения дозы гормонов, оказывающей лечебный эффект.

В настоящее время приоритетным направлением в лечении различных форм эндокринной недостаточности является метод трансплантации активно секреторных клеточных культур соответствующих желез внутренней секреции [1].

Аллотрансплантация клеток культур из надпочечников взрослых людей мало эффективна. Аутооттрансплантация имеет ограниченный круг применения. Наибольшее распространение получила ксенотрансплантация культуры клеток коры надпочечников новорожденных поросят [2, 3]. Однако и данный способ лечения имеет ограниченное применение, так как для каждого пациента надо выращивать культуру и сразу же ее трансплантировать. Данную проблему можно решить, создав запасы криоконсервированных образцов. При этом первостепенной задачей является подбор криопротекторов и их концентраций, которые бы не угнетали гормональной активности клеточных культур и обеспечивали защиту клеток от повреждающего действия низких температур.

Целью данного исследования явилось исследование влияния проникающего криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) на секреторную активность (по выбросу кортизола) клеток надпочечников новорожденных поросят при инкубации в средах, содержащих различные концентрации криопротекторов, а в отдельных случаях суспензию клеток гипофиза новорожденных поросят.

Новорожденных поросят забивали гильотинированием. При экстирпации надпочечников соблюдали строгие правила асептики и антисептики. После удаления надпочечники помещали в охлажденный физиологический раствор, ножницами измельчали на фрагменты размерами до 0,5–1 мм, отмывали от крови раствором Хенкса или средой 199. Во всех случаях готовили 30%-е гомогенаты клеток надпочечников и 20%-е — гипофиза. Криопротектор — димексид (фармакопейная форма ДМСО) готовили на физиологическом растворе. Обработку клеток криопротектором проводили при 37 °С при конечной концентрации криопротектора 3, 5 и 10%.

После инкубации с криопротектором все образцы центрифугировали, надосадки анализировали на кортизол, который определяли радиобизотопным методом при использовании тест-системы [5, 6]. Во всех образцах определяли белок [4].

Культура клеток коры надпочечников считается пригодной для трансплантации через 5–7 дней культивирования [2]. Определение белка в культуре клеток коры надпочечников в различные сроки культивирования показало увеличение количества белка в единице объема культуральной среды (рис. 1), что

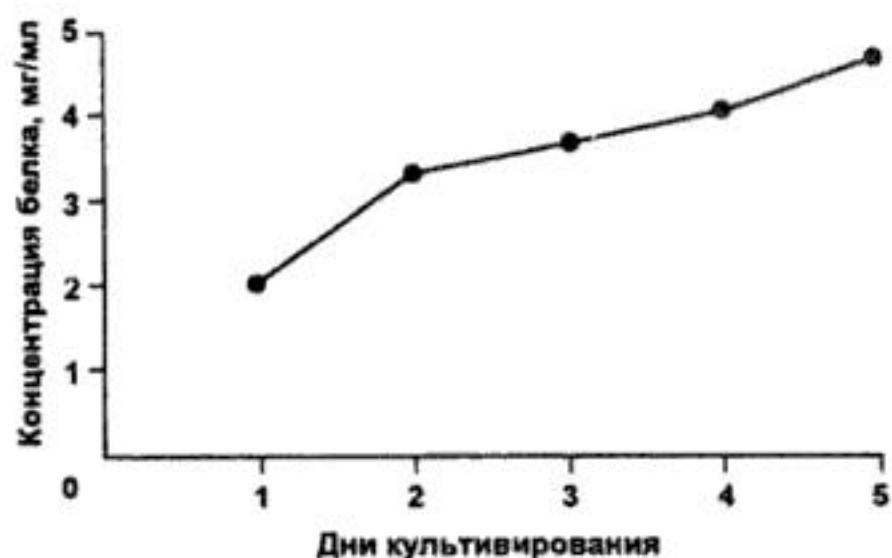


Рис. 1. Динамика накопления белка в суспензионной культуре клеток коры надпочечников новорожденных поросят

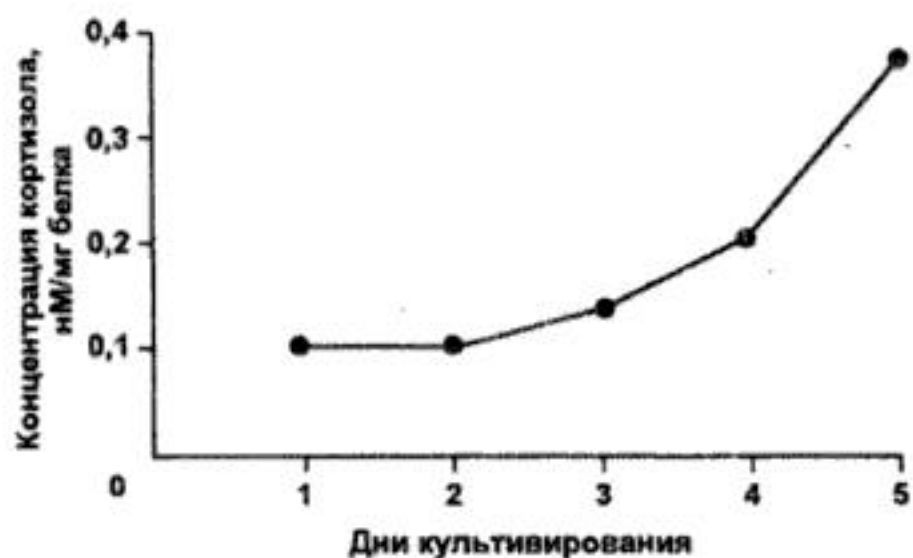


Рис. 2. Динамика синтеза кортизола культурой клеток коры надпочечников новорожденных поросят. Условия: клетки инкубировали 15 мин при 37 °С, кортизол измеряли в среде культивирования

свидетельствовало об увеличении числа клеток, а следовательно, о том, что мы имеем дело с растущей культурой.

Для функциональных характеристик данной культуры определяли количество кортизола — основного глюкокортикоида данных клеток, вышедшего из клеток в надосадочную жидкость за 15 мин инкубации при 37 °С на водяной бане в среде без криопротектора и в присутствии ДМСО в различных концентрациях.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, в первые трое суток культивирования клетки вырабатывали примерно одинаковое количество кортизола, начиная с 4-х суток отмечалось увеличение синтеза кортизола и клетки при инкубации выделяли в окружающую среду большее количество гормона. При этом максимум выброса кортизола отмечался на 5-е сутки. После 5-х суток культивирования увеличение синтетических процессов выработки гормона не наблюдалось (данные не представлены). Это послужило основой вывода, что для трансплантации следует использовать 5-суточные культуры.

Обработка клеток культуры криопротектором показала, что 3–5%-е концентрации димексида способствуют при 15-минутной инкубации при 37 °С увеличению выхода кортизола в окружающую среду (рис. 3, кривая 1), в то время как повышение его концентрации до 10% приводит к угнетению выработки кортизола. При обработке клеток экстрактами гипофиза (рис. 3, кривая 2) на фоне присутствия димексида дало аналогичную картину как и в

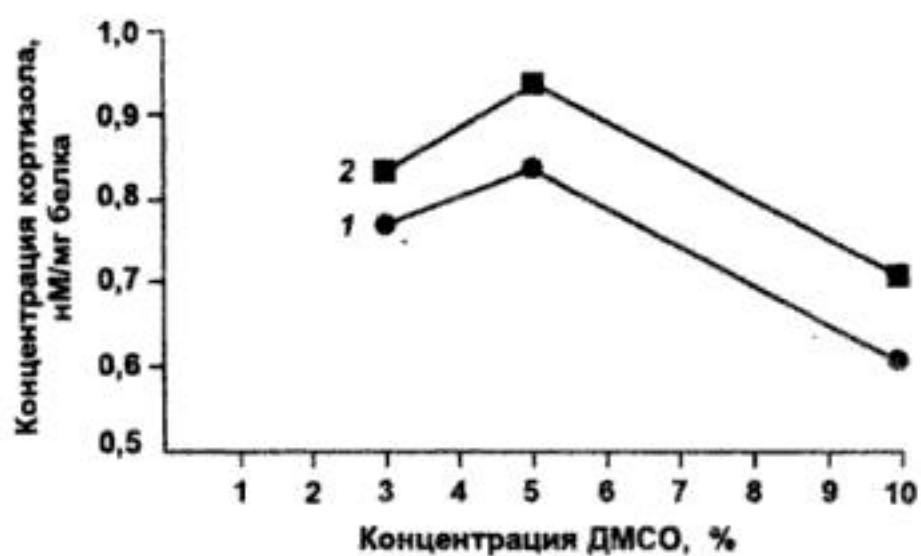


Рис. 3. Уровень кортизола, экскретируемого клетками, обработанными ДМСО и гомогенатом гипофиза. Условия: клетки инкубировали 15 мин при 37 °С, кортизол измеряли в среде культивирования. 1 — ДМСО; 2 — ДМСО + гомогенат гипофиза

случае обработки только криопротектором (кривая 1). Различие состояло в увеличении амплитуды ответа (сдвиг вверх по оси ординат). Эти данные еще раз подтверждали, что функциональная активность клеток культуры сохраняется, так как клетки реагировали на экстракты гипофиза, который на уровне организма контролирует обработку глюкокортикоидов. Это особенно хорошо видно, если за 100% принять уровень кортизола в надосадочной жидкости, вышедшего из клеток за 15 мин инкубации (таблица).

Из представленных данных следует, что обработка клеток культуры

коры надпочечников новорожденных поросят гомогенатами надпочечников увеличивала выход кортизола в среду инкубации на 13%. При этом следует отметить, что на введение криопротектора клетки реагировали более активно. Так, инкубация при 3%-й концентрации димексида способствовала увеличе-

нию кортизола в надосадочной жидкости на 17%, а при 5%-й — на 28%. Такая же картина сохранялась и при обработке клеток гомогенатами гипофиза. Увеличение концентрации димексида до 10% снижало выход кортизола на 9 и 7% соответственно при отсутствии и наличии гомогенатов гипофиза.

Полученные результаты дают возможность заключить, что клетки культуры сохраняют максимум гормональной активности на 5-е сутки культивирования. Клетки реагируют на введение криопротекторов различным выбросом кортизола в окружающую среду. Для условий замораживания, по всей видимости, приемлемой является 5%-я концентрация димексида. Однако это требует дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лечение хронического гипокортицизма методом трансплантации культуры клеток коры надпочечных желез: Метод. рекомендации. — Киев, 1990. — 22 с.
2. Тронько Н.Д., Богданов Т.И., Турчин И.С. Ультраструктурная характеристика органных культур надпочечников новорожденных поросят // Пробл. эндокринологии. — 1988. — № 5. — С. 65–69.
3. Турчин И.С. Проблема трансплантации культур клеток и тканей залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // Ендокринологія. — 1996. — Т. 1, № 2. — С. 6–13.
4. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal Biochem. — 1976. — 72. — P. 248–256.
5. Gray S.M., Seth J., Beckett G.J. Comparison of separation methods in the I-radioimmunoassay of serum cortisol // Ann.Clin.Biochem. — 1983. — 20. — P. 321–326.
6. Walker S.W., Lighly E.R.T., Milner S.W., Williams B.C. Catecholamine stimulation of cortisol secretion by 3-day primary cultures of purified zona fasciculata/reticularis cells isolated from bovine adrenal cortex // Mol.Sell Endocrinol. — 1988. — 57. — P. 139–147.

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

Поступила 18.11.97

Т. П. БОНДАРЕНКО, Г. В. ГЕРАЩЕНКО, І. І. КІРЮШИНА

ВПЛИВ ДИМЕКСИДУ І ЕКСТРАКТІВ ГІПОФІЗА НА ГОРМОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ КЛІТИН КУЛЬТУРИ КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Досліджено вплив димексиду та гомогенатів гіпофіза на секреторну функцію клітин культури надниркових залоз новонароджених поросят. Встановлено, що клітини в різні строки культивування зберігають функцію секреції гормонів з максимумом секреції на п'яту добу. Димексид у 10%-й концентрації пригнічує секрецію кортизолу, а у 3–5%-й — стимулює.

T. P. BONDARENKO, A. V. GERASCHENKO, I. I. KIRYUSHINA

EFFECT OF DIMEXIDE AND HYPOPHYSIAL EXTRACTS ON THE HORMONAL ACTIVITY OF THE ADRENAL GLAND CULTURE CELLS OF THE NEWBORN PIGS

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

There was studied the effect of dimexide and hypophysial homogenates on the secretory function of adrenal gland culture cells of the newborn pigs. It was found that the at various terms of culturing the cells maintain the function of hormone secretion with the maximum of secretion by the 5th day. Dimexide in a 10%-concentration inhibits secretion of cortisone, while its 5%-concentration stimulates it.

А.С.Капрельянц, Р.К.Мигунова

УСТРОЙСТВО ПРЕПАРИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ ДЛЯ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ПО МЕТОДУ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ЗАМЕЩЕНИЯ

Приводятся новая конструкция и принцип работы устройства для препарирования тканей по методу замораживания-замещения с целью дальнейшего ультраструктурного анализа клеток и визуализации кристаллов льда в замороженном состоянии.

В современной клеточной биологии для изучения тонкой структуры и состава различных клеток и тканей широко используются криометоды препарирования различных биологических объектов, в том числе и метод замораживания-замещения. Впервые данный метод был предложен Фернандес-Мораном и Бюлливантом [5]. Основу метода составляет явление “растворения” (замещения) кристаллов льда в замороженной ткани средой замещения. При этом в большинстве исследований используется криофиксация объекта, сущность которой сводится к мгновенной остановке всех метаболических процессов и стабилизации структурных элементов клетки в результате сверхбыстрого охлаждения [3, 4, 6]. Затем замороженный объект помещают в охлажденные замещающие среды: этанол, ацетон и др. Эти среды при двухсторонней диффузии обеспечивают замещение (растворение) клеточного льда замещающей жидкостью (ЗЖ). Обычно к ЗЖ добавляют соли тяжелых металлов (OsO_4 и др.), которые делают его контрастным по отношению к пучку электронов и устойчивым при повышении температур после замещения [1, 8].

На мировом рынке было выпущено различными фирмами несколько приборов для препарирования тканей методом замораживания-замещения [2, 4, 7]. Наибольшее распространение получили устройства фирм Бальцерс (Лихтенштейн) и Райхерт (Германия). Так, фирма Reichert-Jung выпустила прибор KS-80 (система Edelmann) для криогидратации замороженных объектов при температуре ниже -80°C . Он состоит из сосуда Дьюара с жидким азотом и металлической камеры для замещения. В нижней части камеры находятся 3 одинаковых отверстия, в них наливают замещающую жидкость и вносят контейнеры с замороженными биообъектами. Температура фиксируется термодатчиками и поддерживается автоматически.

В отделе криоцитологии и количественной морфологии ИПКиК НАНУ (руководитель отдела д-р биол. наук, профессор А.С. Капрельянц) была разработана новая конструкция прибора, обеспечивающего реализацию метода замораживания-замещения для ультраструктурных исследований. Прибор выполнен в виде компактного настольного устройства, включающего криогенную и электронную части. Криогенная часть состоит из специальной криокамеры, расположенной в верхней части сосуда Дьюара. Криокамера (рисунок) содержит цилиндрический корпус (1), центральный канал (2) и расположенные вокруг него цилиндрические емкости (3), соединенные верхними (4) и нижними (5) каналами с центральным каналом. Перфорированные контейнеры (6) с замороженными биообъектами крепятся на металлической сетке (7). Побудитель потока замещающей среды (8) соединен с электродвигателем. Одной из основных частей системы является хладопровод (9), нижняя часть которого находится в жидком азоте. Хладопровод охлаждает замещающую

жидкость, которая омывает его поверхность внутри криокамеры. Для контроля температуры ЗЖ в одну из емкостей вводят термодатчик (10).

Данная конструкция криокамеры в емкостях с биообъектами создает ламинарные потоки ЗЖ. Перфорированные контейнеры, размещенные по одному в емкостях, обеспечивают идентичные условия промывания биологических объектов.

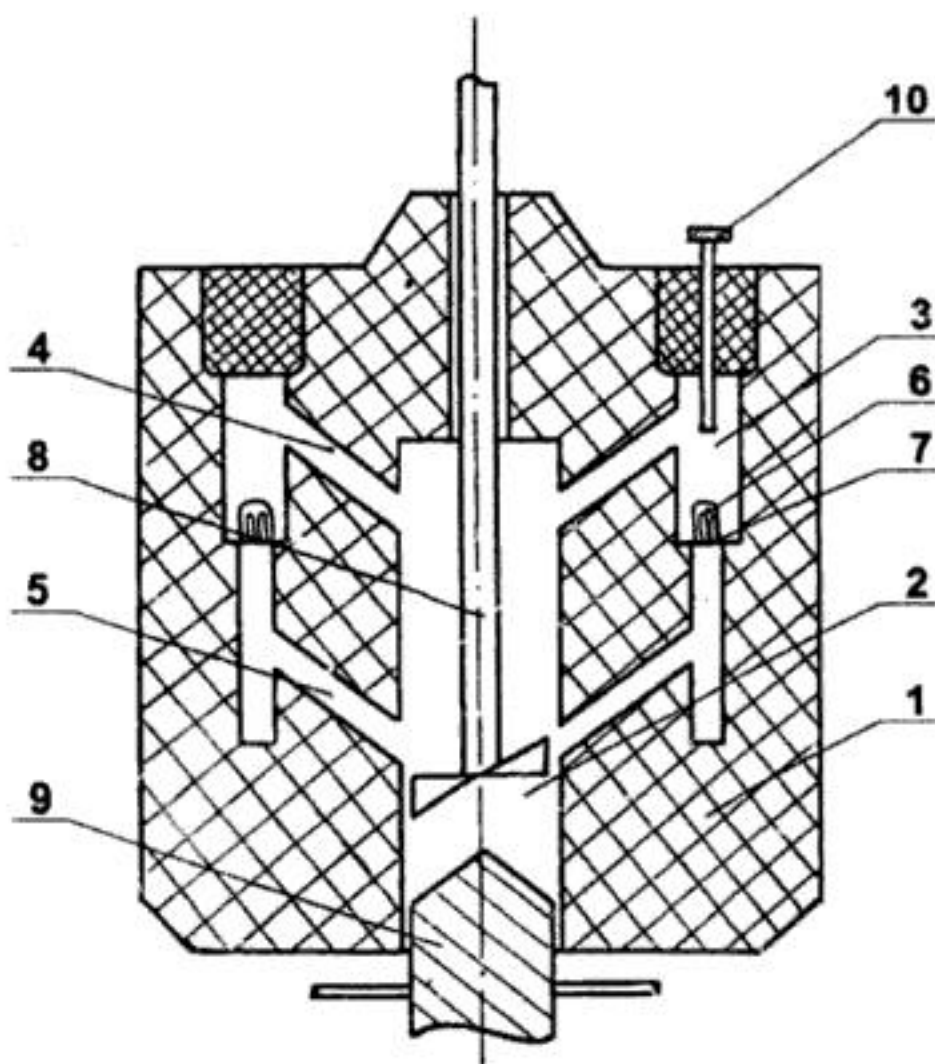
Электронная часть устройства состоит из блока управления, обеспечивающего поддержание заданных температурных и временных режимов и управление частотой вращения побудителя потока среды. Диапазон стабилизации рабочих температур — от +20 до -120 °С. Имеется цифровая индикация текущего значения температуры. По истечении заданного времени замещения осуществляется автоматический переход на режим отогрева объектов до комнатной температуры.

Принцип работы данного устройства заключается в том, что при вращении побудителя потока среды в центральном канале происходит циркуляция замещающей лед среды между центральным каналом, где она охлаждается поверхностью хладопровода, и емкостями с контейнерами по нижним и верхним каналам. С помощью конической поверхности хладопровода ЗЖ направляется в нижние каналы, расположенные к ней под углом. ЗЖ, проникая через мембрану клеток, замещает находящиеся в клетке кристаллы льда. Идентичность условий замещения, ламинарность потока ЗЖ обуславливают идентичность обработки нескольких объектов, размещенных в криокамере, снижают вероятность возникновения артефактов и ускоряют процесс замещения.

Использование данного прибора в ультраструктурных исследованиях биологических тканей показало стабильность его работы и способствовало получению информации о реальной структуре объектов, лишенных артефактов, свойственных традиционным методам химической фиксации, и позволяет проводить визуализацию внутриклеточных кристаллов льда в замороженных объектах [9].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Капрельянц А.С., Марченко Л.Н., Матяш И.П. Ультраструктурный анализ методом замораживания-замещения деструкции ткани печени при локальном замораживании // Криобиология. — 1986. — № 3. — С. 86–89.
2. Капрельянц А.С. Метод замораживания-замещения и его техническое обеспечение // Электронная микроскопия и современная технология: Тез. докл. IV Респ. конф. — Кишинев, 1990. — С. 61.
3. Пушкарь Н.С., Капрельянц А.С., Панков Е.Я. Ультраструктура клеток при низких температурах. — Киев: Наук. думка, 1978. — 140 с.
4. Пушкарь Н.С., Капрельянц А.С. Введение в электронно-микроскопическую технику для медико-биологических исследований. — Киев: Наук. думка, 1982. — 189 с.
5. Bullivant S. Freeze-substitution and supportive techniques // Lab. Invest. — 1965. — 14. — № 5. — P. 1178–1195.
6. Dempsey G., Bullivant S. A copper block method for freezing non-cryoprotected tissue to produce ice-crystal-free regions for electron microscopy. I. Evaluation using freeze-substitution // J. Microscopy. — 1976. — 106. — № 3. — P. 251–260.



Криокамера устройства для замораживания-замещения

7. *Sitte H.* Instruments for cryofixation, cryoultramicrotomy, cryosubstitution for biomedical TEM // SEM. – 1984. – № 8. – P. 2–10.
8. *Thirise M., Moor H.* Improved structural preservation of cells and tissue by freeze-substitution electron microscopy // J. Cell Biol. – 1980. – 22. – № 1. – P. 611.
9. *Kaprelyants A.S., Kaprelyants A.A., Reylan A.N., Migunova R.K.* Morphometrical ultrastructural studies of the rat's hepatocytes under cooling // Inter. Congr. "Microscopy & Microanalysis'97": Abstr. Repts. – USA. – 1997. – P. 245.

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

Поступила 28.01.98

О. С. КАПРЕЛЬЯНЦ, Р. К. МИГУНОВА

ПРИСТРІЙ ПРЕПАРУВАННЯ ТКАНИН ДЛЯ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ ЗА МЕТОДОМ ЗАМОРОЖУВАННЯ-ЗАМІЩЕННЯ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Даються нова конструкція і принцип роботи пристрою для препарування тканин за методом заморожування-заміщення з метою подальшого ультраструктурного аналізу клітин і візуалізації кристалів льоду в замороженому стані.

A. S. KAPRELYANTS, R. K. MIGUNOVA

A DEVICE FOR TISSUE PREPARATION FOR ELECTRON MICROSCOPIC STUDY USING A METHOD OF FREEZE-SUBSTITUTION

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

The report describes the new design and operating principle of the device for tissue preparation using a freeze-substitution method with the aim of subsequent ultrastructural analysis of the cells and visualization of ice crystals in the frozen state.

УДК 615.832.9 + 615.814.1

Б.П.Зац, А.С.Капсельянц, М.В.Воронов, В.И.Резников

МЕТОД ХОЛОДОВОЙ РЕФЛЕКСОТЕРАПИИ ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С ЯВЛЕНИЯМИ ЛОКАЛЬНЫХ МЫШЕЧНЫХ ГИПЕРТОНУСОВ

Проводилось рефлексотерапевтическое лечение стационарных больных с явлениями локальных мышечных гипертонусов предложенным авторами методом, сочетающим корпоральную поверхностную иглотерапию и холодовое воздействие. Положительная динамика в состоянии больных проявлялась в уменьшении симптомов основного заболевания.

В практике врача-рефлексотерапевта при лечении больных различной нозологии часто приходится устранять локальные мышечные гипертонусы (ЛМГ), которые проявляются в болезненных мышечных уплотнениях [3]. Природу этого явления часто связывают с миозитом и фиброзными процессами. Происхождение ЛМГ ставится в зависимость от имеющихся заболеваний и образа жизни пациента [3, 4]. Опыт лечения различных заболеваний, патогенетическим звеном которых являются ЛМГ, определил позицию, согласно которой мануальная терапия и рефлексотерапия [3–5] — обоснованные и эффективные способы лечения. Восстановление нормальной функции мышцы связано с устранением гипертонуса. С этой целью используются различные методы рефлексотерапии — классическая акупунктура, акупрессура, цзю-терапия, электропунктура, поверхностная иглотерапия, лазеропунктура, суджок-терапия и др. В настоящей работе предлагается метод лечения, сочетающий преимущества классических способов рефлексотерапии и холодной поверхностной иглотерапии (крио-ПИТ).

Работы [4, 7] посвящены использованию эффекта влияния холода на биологически активные точки. В 1986 году было сформулировано название этого направления — криопунктура. Однако криопунктура в рефлексотерапии еще не нашла широкого применения [7]. В то же время в дошедшем до нас каноне по китайской народной медицине “Хуанди нэй-цзин”, составленном в 5–3 веках до н.э., содержится упоминание о поверхностной иглотерапии (ПИТ) [5]. В течение многих веков менялись конструкции устройств для ПИТ [2, 5, 8]. В 1958 году итальянец Пьетро Орландини сконструировал зубчатое колесико, с успехом используемое и сегодня для лечения многих заболеваний [2].

Предлагаемому методу холодовой рефлексотерапии характерны следующие особенности:

- 1) сочетание холодового и акупрессурного воздействия;
- 2) применение нового устройства для механического и холодового воздействия;
- 3) использование прерывистого вибрационного крио-ПИТ с непрерывным акупрессурным воздействием с помощью устройства Орландини;
- 4) вовлечение значительных поверхностей тела в зону воздействия;
- 5) индивидуальный подход в дозировании степени воздействия на пациентов.

Методические особенности использования холодовой рефлексотерапии связаны с интенсивностью раздражающих факторов: механического и температурного.

Степень интенсивности механического воздействия процедуры определяется величиной, формой и расположением контактных поверхностей, ударной силой устройства, зависящей от материала, из которого устройство изготовлено, напряжения кисти врача, разности температур холодагента и тела пациента, последовательности действий врача и продолжительности процедуры. Точная дозировка степени раздражения зависит от равномерности, частоты и силы ударов. Степень кожной реакции зависит и от индивидуальных особенностей организма [5, 7]. ПИТ обладает анальгетическим и антиспастическим действиями [7], способностью увеличивать уровень кровотока в определенной метамере [7], создает возможность влияния на обширные зоны тела [5], оказывает позитивное воздействие на общее состояние организма, снимая у пациента чувства страха, внутреннего напряжения, скованности [5].

Температурный фактор определяет интенсивность ответа организма и включение некоторых физиологических механизмов. Известно, что локальное криовоздействие обладает самостоятельными анальгетическими, антиспастическими свойствами, противовоспалительным, тонизирующим действиями [1, 4]; улучшает гемодинамику, повышает устойчивость тканей и органов к ишемии и гипоксии [1]; стабилизирует вегетативно-метаболические процессы; оптимизирует реакции кожного анализатора, что выражается в появлении ощущений бодрости, свежести, исчезновении либо уменьшении чувства усталости [4, 7], а также активизирует общие защитно-приспособительные реакции [1].

Активирующее влияние контрастных процедур на процессы кровообращения в ряде органов и систем позволяет использовать их как один из патогенетических методов лечения умеренных нарушений кровообращения при различных заболеваниях [6]. Систематическое чередование мышечной релаксации и тонизации во время проведения контрастных процедур вызывает физиологическую тренировку подвижности основных нервных процессов вследствие наличия механизма обратной связи между мускулатурой и ЦНС, улучшает состояние ЦНС. Адекватно подобранные контрастные процедуры, улучшая процессы обмена, гормональный фон и функциональное состояние

основных физиологических систем организма, также способствуют снижению массы тела [6].

Клиническая апробация предложенной методики была проведена при комплексном лечении больных двух экспериментально-клинических нозологических групп с явлениями ЛМГ на базе отделения немедикаментозных методов лечения лечебно-профилактического комплекса "Занки" МЗ Украины с февраля 1996 по октябрь 1997 года. В рамках клинического исследования метод крио-ПИТ использовался в лечении двух групп больных:

1) люмбалгией как синдромом остеохондроза поясничного отдела позвоночника;

2) гипертонической болезнью II стадии.

В качестве контроля фиксировались результаты лечения 2 групп больных тех же нозологий без применения рефлексотерапии. Количество больных контрольных групп было равно количеству их в экспериментально-клинических группах. В клиническом исследовании всего участвовало 20 больных.

В результате проведения курса рефлексотерапевтического лечения с использованием метода крио-ПИТ было выявлено, что улучшение состояния пациентов наступало с 1 по 12 сутки после начала лечения. Оно заключалось:

1) в уменьшении выраженности ЛМГ до уровня I–II степени;

2) уменьшении выраженности симптоматики основного заболевания. При люмбалгии наблюдалось купирование болевого синдрома, восстановление физической работоспособности; при гипертонической болезни II стадии — стабилизация артериального давления (АД) на уровне "рабочего" АД пациентов, либо несколько ниже, а также исчезновение головной боли;

3) исчезновении либо уменьшении жалоб общего характера: снижении утомляемости, исчезновении раздражительности, улучшении координации движений;

4) улучшении показателей вегетативного тонуса по Р. М. Баевскому [1].

В контрольной группе больных люмбалгией улучшение состояния больных наступало с 10 по 22 сутки с момента начала лечения, гипертонической болезнью II стадии — с 15 по 20 сутки со времени начала лечения у 60% больных, а у 40% больных на момент выписки улучшение было выражено без стабилизации АД. У больных контрольных групп не наблюдалось уменьшения степени ЛМГ.

Необходимо также отметить, что при использовании устройства крио-ПИТ остаются неповрежденными эпидермис и прилегающие ткани, что особенно важно при профилактике инфекционных заболеваний, а также в отношении лиц, плохо переносящих боль, у которых даже незначительная эмоциональная перегрузка при введении иглы может вызвать осложнения [5]. Важно, что использование крио-ПИТ позволяет снизить количество назначаемых больным анальгетических и спазмолитических средств.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения предложенного метода холодовой рефлексотерапии в комплексном лечении больных с явлениями локального мышечного гипертонуса при люмбалгии и гипертонической болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ведеев Д. Ф., Ломакин И. И., Бабийчук Г. А. Применение метода локальной гипотермии в амбулаторной практике: Лечебная гипотермия / Сб. науч. тр. — Харьков, 1992. — С. 59–63.
2. Вогралик В. Г. Основы китайского лечебного метода Чжень-Цзю. — Горьк. кн. изд-во, 1961. — С. 196.
3. Иваницhev Г. А. Болезненные мышечные уплотнения. — Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1990. — С. 3–8.

4. Исаев Ю. А. Сегментарно-рефлекторный и точечный массаж в клинической практике. – Киев: Здоров'я, 1993. – С. 18–19, 121–123, 140–147.
5. Клименко Л. М. Руководство по поверхностному иглоукалыванию. – М.: Прометей, 1990. – 76 с.
6. Курортология и физиотерапия: Руководство / Под ред. проф. В. М. Боголюбова. – М.: Медицина, 1985. – Т. 1. – С. 41–49, 66–72, 81–84, 261–264.
7. Самосюк И. З., Лысенюк В. П. Акупрессура. Энциклопедия. – Киев–Москва: Укр. энциклопедия им. М. П. Бажана, "АСТ-Пресс", 1994. – С. 186–192, 194.
8. Чжу-Лянь. Руководство по современной чжень-цзю терапии. Иглоукалывание и прижигание. – Спб: Комета, 1992. – С. 118.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
Лечебно-профилактический комплекс "Занки"
МЗ Украины, Харьк. обл.

Поступила 31.07.97

Б. П. ЗАЦ, О. С. КАПРЕЛЬЯНЦ, М. В. ВОРОНОВ, В. І. РЕЗНИКОВ

МЕТОД ХОЛОДОВОЇ РЕФЛЕКСОТЕРАПІЇ ПРИ КОМПЛЕКСНОМУ ЛІКУВАННІ ХВОРИХ З ЯВИЩАМИ ЛОКАЛЬНИХ М'ЯЗОВИХ ГІПЕРТОНУСІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків
Лікувально-профілактичний комплекс "Занки" МОЗ України, Харк. обл.

Проводилося рефлексотерапевтичне лікування стаціонарних хворих з явищами локальних м'язових гіпертонусів запропонованим авторами методом, який поєднує корпоральну поверхневу іглотерапію і холодний вплив. Позитивна динаміка в стані хворих виявлялась у зменшенні симптомів основного захворювання.

B. P. ZATS, A. S. KAPRELYANTS, V. V. VORONOV, V. I. REZNIKOV

COLD REFLEXOTHERAPY METHOD AT COMPLEX TREATMENT OF PATIENTS WITH PHENOMENA OF LOCAL MUSCULAR HYPERTONUSES

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov
Medical and preventive complex "Zanki", Ministry of Public Health of the Ukraine, Kharkov region

Reflexotherapeutic treatment of in-patient persons with the phenomena of local muscular hypertonus (LMH) was accomplished according to the method proposed by the authors, it combines corporal surface acupuncture (CSA) and cold effect. Positive dynamics in the state of patients manifested in a decreasing of main disease signs.

УДК 617-001.4: 616.379-008.64

**Н.Н.Велигоцкий, В.В.Дубенко, Т.И.Тамм, Г.С.Башура,
А.Н.Велигоцкий, И.Е.Бугаков**

АКТИВНАЯ ХИРУРГИЧЕСКАЯ ТАКТИКА ЛЕЧЕНИЯ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Лечение больных сахарным диабетом с гнойно-некротическими заболеваниями мягких тканей осуществлено по принципам активной хирургической тактики. С целью предупреждения послеоперационных нагноений проводилось активное дренирование раны, дополненное местным применением пенных аэрозольных препаратов, которые предназначены для использования в первой фазе раневого процесса. Итоги сравнительного анализа результатов лечения предложенным методом доказывают, что сочетание активного дренирования раны с местным применением пенных аэрозолей после радикальной санации очага гнойно-некротической деструкции позволяет стабилизировать процесс заживления, эффективно подавляет раневую микрофлору и надежно предупреждает развитие местного воспаления. Хирургическое лечение больных этой категории должно проводиться в условиях обязательного адекватного антидиабетического лечения и коррекции нарушений в системе гомеостаза.

Лечение раневой инфекции у лиц, страдающих сахарным диабетом, является важной хирургической проблемой, так как частота возникновения гнойных осложнений у больных этой категории значительно выше, чем у других нозологических групп.

Сочетание проточного дренирования с программированным введением в защиту рану современных антибактериальных препаратов — один из способов успешного предупреждения гнойных осложнений. В этом отношении перспективно использование в первой фазе раневого процесса комбинированных пенных аэрозолей “Дисксизоль”, “Цимезоль” и аэрозоля с сульфатом гентамицина, обладающих длительным гиперосмотическим эффектом и способностью к пролонгированному выделению из пенной основы препарата антибактериальных веществ (например, диоксидина — из “Дисксизоля”, циминаля и димексида — из “Цимезоля”). Кроме того, пена аэрозоля максимально заполняет полость раны и проникает в зоны некроза, предупреждает развитие инфекции в микробно загрязненной ране, препятствует депонированию и размножению микрофлоры в гнойном очаге, делает возможной активизацию факторов сопротивляемости организма. Положительное влияние на локальную микроциркуляцию и стимуляцию местного иммунитета в ране оказывает кратковременный гипотермический эффект, которым обладают перечисленные аэрозоли. Он обусловлен испарением входящего в их состав хлорона-12 и субъективно ощущается больными как легкое чувство жжения в ране после введения в нее препарата (в течение 5–10 мин).

Нами изучена клиническая эффективность использования пенных аэрозолей в комплексе активного предупреждения раневой инфекции у больных сахарным диабетом после хирургического лечения различных гнойно-некротических заболеваний мягких тканей.

Под наблюдением находились 123 больных сахарным диабетом от 54 до 83 лет. Деструктивные процессы были представлены абсцессом (20,4%) и флегмоной (14,6%) мягких тканей, диабетической гангреной нижних конечностей (50,4%); к прочим заболеваниям (14,6%) отнесены абсцедирующий фурункул, нагноение кисты копчика, послеоперационной раны и атеромы. Тяжелое течение сахарного диабета выявлено у 56,1% больных, средней тяжести — у 22,8% и легкое — у 21,1%. Все больные были распределены на две группы сравнения, сопоставимые по количеству, полу, возрасту, локализации и распространенности патологического процесса, а также по объему оперативного лечения.

В исследуемые группы не вошли больные, у которых в послеоперационный период течение гнойно-воспалительного процесса осложнилось сепсисом или гнойно-резорбтивной лихорадкой, что требовало проведения массивной антибактериальной терапии, а также умершие в результате гнойно-септических осложнений на фоне нарастающей полиорганной недостаточности или острой декомпенсации сердечно-легочной деятельности.

Хирургическое лечение больных начиналось после предварительной оценки тяжести течения сахарного диабета и его достаточной компенсации, терапевтической коррекции выявленных нарушений и сопутствующих заболеваний. Также проводилась профилактика столбняка и газовой инфекции. Всем больным после операции продолжали проводить тщательную коррекцию гипергликемии и волемических нарушений, а также дезинтоксикационное, противовоспалительное и общеукрепляющее лечение, физиотерапевтические процедуры.

Эффективность лечения оценивали по клинико-морфологической картине течения раневого процесса, срокам заживления раны и случаям нагноения, результатам анализов крови и бактериологического контроля в динамике. Исследования проводились по общепринятым методам.

Во время хирургической обработки гнойник радикально рассекали или по возможности иссекали, выполняли максимальную некрэктомию и тщательную санацию операционного поля. Рану продольно дренировали через контрапертуры перфорированной силиконовой трубкой для проточного промывания. Если условия для одномоментного зашивания раны отсутствовали, то до наложения первично-отсроченных или ранних вторичных швов лечение проводили под повязкой с применением у больных основной группы одного из пенных аэрозолей. В группе сравнения использовали для этих целей водорастворимые мази ("Левасин", "Левомеколь" и 5%-ю диоксицилиновую мазь). Больным с гангреной по показаниям выполняли ампутацию конечности выше уровня поражения. При формировании культи рану тоже дренировали перфорированной силиконовой трубкой. В послеоперационный период в основной группе больных перед введением в рану аэрозоля ее промывали 0,5 л стерильного физиологического раствора, содержащего 1% перекиси водорода, с целью аэрации закрытой швами раны и придания промывной жидкости детергентных свойств. В группе сравнения проточное дренирование осуществляли фракционным способом с использованием 1–2,5 л стерильного водного раствора фурацилина (1:5 000).

В обеих группах операция закончена одномоментным зашиванием раны у 69 больных, наложением первично-отсроченных швов — у 21 и ранних вторичных — у 33. Бактериологическое исследование материала из иссеченного некротического секвестра у 44,7% больных выявило золотистый стафилококк в монокультуре и в 35,8% — стафилококк в ассоциации с протеем и синегнойной палочкой. В ассоциациях доминирующая Грам-отрицательная микрофлора (19,5%) была представлена культурами протей, синегнойной палочки и клебсиеллы. Уровень бактериального поражения гнойно-некротического очага существенно превышал "критический". После радикального иссечения гнойника микробная обсемененность стенок раны составила от 10^2 до 10^5 бактериальных тел в 1 г ткани. После его рассечения и некрэктомии внутритканевое содержание микрофлоры было на 2–3 порядка выше "критического" уровня.

В основной группе больных на фоне применения пенных аэрозолей уже на 3–4-е сутки после операции раны практически очищались от гнойно-некротического детрита, исчезали боли, признаки местного воспаления и интоксикации. При лечении ран под повязкой и применении аэрозолей после этапных некрэктомий период очищения раны составил 5–6 суток. В эти сроки отмечались активное развитие сочных грануляций, заметный регресс перифокального отека мягких тканей, купировались симптомы местного и общего воспаления, нормализовалась температура тела. Клинически отмечался переход фазы очищения в регенераторную. Это подтверждено цитологическими исследованиями в динамике методом раневых отпечатков [3]. В цитограммах этого периода зарегистрированы уменьшение нейтрофильной (до 55–70%) и повышение макрофагальной (до 4–5%) фракций; клеточный компонент был представлен также лимфоцитами (2–5%), фибробластами (0,3%), полибластами (14–18%). Определялись отдельные скопления молодого плоского эпителия. Немногочисленные микробные клетки находились в состоянии завершеного фагоцитоза. Бактериальная обсемененность стенок раны в эти сроки составила $(6,7 \pm 0,6) \cdot 10^2$ микробных тел в 1 г ткани. В этих условиях накладывали ранние вторичные швы.

В основной группе всем больным на 5–6-е сутки после наложения швов по показаниям удаляли дренажи. К этому периоду в посевах раневого отделяемого рост микрофлоры не наблюдался, а в цитограммах отмечена активная

полибластная реакция. Раны во всех случаях зажили полностью с образованием линейного рубца.

Подобная динамика клинического течения раневого процесса наблюдалась и у больных группы сравнения, но на 3–4 суток позже. У 4-х пациентов этой группы на 5-е сутки после операции раны нагноились, поэтому дальнейшее лечение ран осуществлялось под повязкой. В этих случаях доминирующими возбудителями выявлены золотистый стафилококк, протей и синегнойная палочка.

У больных с гнойниками мягких тканей морфологическое изучение интраоперационного материала (метод исследования — световая микроскопия, окраска препаратов гематоксилин-эозином) выявило некроз структурных слоев кожи и подкожной основы. В толще некротических масс — обилие микробных скоплений. Выделялись зоны микрососудистых изменений в виде деструкции, выраженных и умеренных нарушений.

В основной группе на 3-е сутки после наложения швов в цитограммах участки некроза определялись в виде узкой прерывистой полоски с выраженной макрофагальной и лейкоцитарной реакцией в демаркационном слое. Развитие грануляционной ткани было очаговым, равномерно выполняющим раневой дефект. На 5-е сутки зона некроза отсутствовала, обильно разрасталась грануляционная ткань с умеренной лейкоцитарной инфильтрацией, регрессировал отек межуточной ткани, краевая эпителизация была отчетливой. Обильный сосудистый рост сопровождался выраженной эндотелиальной пролиферацией с плазматической реакцией вокруг сосудов. На 7-е сутки в инфильтратах грануляционной ткани преобладали клетки лимфоидного, макрофагального и тучного ряда. Нейтрофильная реакция была выражена минимально. Обильная фибробластная пролиферация сопровождалась редукцией соединительно-тканного вещества. Капиллярные анастомозы соединяли края раны. В группе сравнения подобные процессы наблюдались на 3–4 суток позже.

Таким образом, применение комбинированных осмотически активных пенных аэрозолей в комплексе активного лечения и профилактики нагноений у больных сахарным диабетом позволяет эффективно подавлять рост микрофлоры, надежно предупреждать развитие местного воспаления и обеспечивать тем самым неосложненное течение первой фазы раневого процесса. Это дает обоснованный повод рекомендовать пенные аэрозоли к широкому использованию для успешной профилактики и лечения раневой инфекции у больных сахарным диабетом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башура Г. С., Яремчук А. А., Кошелев Ю. А. и др. Технология лекарственных аэрозольных форм. — Бийск, 1997. — 352 с.
2. Газетов Б. М., Калинин А. П. Хирургическое заболевание у больных сахарным диабетом. — М.: Медицина, 1991. — 256 с.
3. Покровская М. П., Макаров М. С. Цитологические исследования раневого экссудата как показатель заживления ран. — М.: Медгиз, 1942. — 42 с.

Харьк. ин-т усовершенствования врачей

Поступила 21.05.98

М. М. ВЕЛИГОЦЬКИЙ, В. В. ДУБЕНКО, Т. І. ТАММ, Г. С. БАШУРА, О. М. ВЕЛИГОЦЬКИЙ, І. Є. БУГАКОВ

АКТИВНА ХІРУРГІЧНА ТАКТИКА ЛІКУВАННЯ РАНОВОЇ ІНФЕКЦІЇ У ХВОРИХ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Харківський інститут удосконалення лікарів

Лікування хворих цукровим діабетом з гнійно-некротичними захворюваннями м'яких тканин здійснено за принципами активної хірургічної тактики. Для попередження післяопераційних

нагноєнь виконувалось активне дренивання рани, яке доповнювалось місцевим використанням пінних аерозольних препаратів, призначених для застосування в першій фазі ранового процесу. Підсумки порівняльного аналізу результатів лікування запропонованим методом доводять, що поєднання активного дренивання рани з місцевим застосуванням пінних аерозолів після радикальної санації осередку гнійно-некротичної деструкції дозволяє стабілізувати процес загоєння, ефективно приглушує ранову мікрофлору і надійно запобігає розвиток місцевого запалення. Хірургічне лікування хворих цієї категорії повинно проводитися в умовах обов'язкового адекватного антидіабетичного лікування і корекції порушень у системі гомеостазу.

N. N. VELIGOTSKY, V. V. DUBENKO, T. I. TAMM, G. S. BASHURA, A. N. VELIGOTSKY, I. E. BUGAKOV

ACTIVE SURGICAL TREATING TACTICS OF WOUND INFECTION IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

Kharkov advanced training institute for doctors

Treatment of patients with Diabetes mellitus with pyo-necrotic diseases of soft tissues was accomplished according to the principles of an active surgical tactics. To prevent postoperational suppurations an active wound drainage, accompanied by a local application of foam aerosol preparations, designated for the usage in the first phase of wound process was conducted. The results of comparative analysis of treatment by the method proposed testify to the fact that the combination of active wound drainage with a local application of foam aerosols after radical sanation of the focus of pyo-necrotic destruction permits to stabilize heading process, effectively suppresses wound microflora and reliably prevents the development of a local inflammation. Surgical treatment of patients of this category should be carried out under conditions of compulsory adequate antidiabetic treatment and correction of disorders in homeostasis system.

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.323.23:547.422

Е.В.Хакл, С.В.Корнилова, А.С.Соловьева, А.В.Зинченко, Ю.П.Благой

ПЕРЕХОД ДНК В КОМПАКТНОЕ СОСТОЯНИЕ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ИОНАМИ МЕДИ В РАСТВОРАХ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Широкое использование многих одно- и многоатомных спиртов в качестве криопротекторов поставило задачу исследовать влияние таких соединений на взаимодействие ионов металлов с ДНК. В [3] было показано, что при взаимодействии ДНК с ионами Cu^{2+} в водном растворе ДНК переходит в компактное состояние, причем этот процесс носит резко кооперативный характер. Результаты [4] свидетельствуют о том, что связывание ионов Cu^{2+} с ДНК сильно зависит от полярности растворителя, причем константы связывания и кооперативность возрастают при добавлении к раствору ДНК менее полярных, чем вода, растворителей (неэлектролитов). В большинстве работ при изучении влияния различных неэлектролитов на полимеры и клеточные структуры делается вывод об опосредованном действии неэлектролитов путем изменения активности воды. Чтобы выяснить, как добавки различных неэлектролитов влияют на структуру воды (в частности, на подвижность молекул воды), мы провели измерение диэлектрических параметров водных растворов неэлектролитов.

Диэлектromетрические параметры (действительной и мнимой частей диэлектрической проницаемости $\epsilon^* = \epsilon' + i\epsilon''$) систем какодилатный буфер- Cu^{2+} -неэлектролит (этанол, пропандиол, глицерин) ($[\text{Cu}^{2+}] = 5 \cdot 10^{-2}$ М, $[\text{Na}^+] = 5 \cdot 10^{-3}$ М) измеряли методом СВЧ-диэлектromетрии (частота 9,2 ГГц ($\lambda = 3$ см)) [2]. Использовались спектрально чистые препараты глицерина и пропандиола ("Sigma"), а также этанол, очищенный двойной перегонкой. Чистота и процентное содержание спиртов контролировались спектрофотометрически и по значениям диэлектрической проницаемости. Для количественной характеристики содержания неэлектролита использовалась объемная концентрация (об.%).

В результате было выяснено: по мере увеличения концентрации спирта величина ϵ' линейно уменьшается, что свидетельствует об уменьшении количества диполей воды, способных к ориентации в электрическом поле заданной частоты, за счет появления связанной воды. На зависимости ϵ'' от концентрации неэлектролита можно выделить два участка: до 10 об.% ϵ'' уменьшается очень слабо, при дальнейшем повышении концентрации спирта $d\epsilon''/dc$ резко увеличивается.

На рис. 1 приведены зависимости нормированной частоты диэлектрической релаксации F_d/F_{d0} для вышеуказанных систем (величина F_d вычислялась по формулам Дебая [2]), где F_{d0} — час-

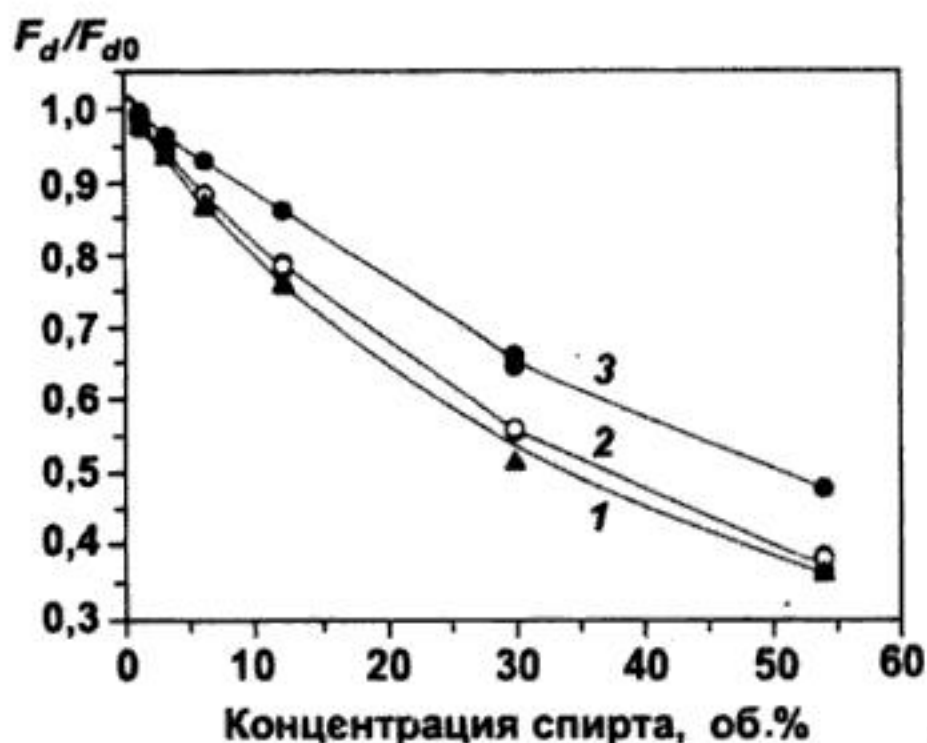


Рис. 1. Зависимости нормированной частоты диэлектрической релаксации F_d/F_{d0} для водно-спиртовых смесей, содержащих этанол (1), пропандиол (2) или глицерин (3). Концентрация ионов Cu^{2+} — $5 \cdot 10^{-2}$ М, Na^+ — $5 \cdot 10^{-3}$ М, температура 25 °С

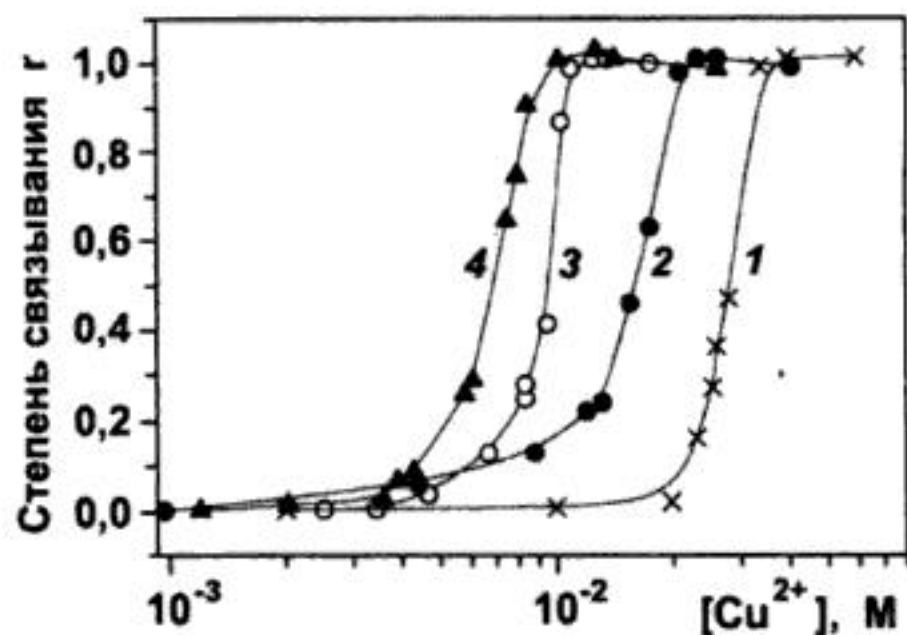


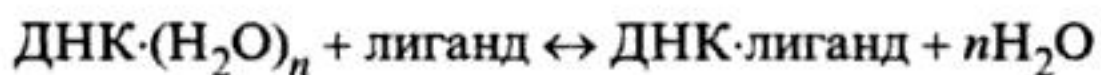
Рис. 2. Зависимости степени связывания ионов Cu^{2+} с фосфатными группами ДНК от полной концентрации ионов Cu^{2+} в растворе для комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} в водном (1) и водно-спиртовых растворах, содержащих 9 об.% глицерина (2), пропандиола (3) или этанола (4). Концентрация ионов Na^+ — $5 \cdot 10^{-3}$ М, ДНК — $(4 \div 5) \cdot 10^{-2}$ М, фосфора — (данные [4])

тота диэлектрической релаксации растворителя (деионизованной воды), содержащего ионы натрия и меди. Мы приводим нормированные величины, так как пренебрежение электропроводящими свойствами растворов на низких частотах, возникающими из-за наличия ионов Na^+ и Cu^{2+} в системе, ведет к занижению абсолютного значения F_d , однако не влияет на вид зависимости для нормированных величин, поскольку концентрации ионов в системе все время сохранялись постоянными [2].

Частота диэлектрической (дипольной) релаксации молекул воды F_d является параметром, характеризующим подвижность молекул воды в поле СВЧ, а следовательно, и степень ее взаимодействия с окружением. Из рис. 1 видно, что с ростом концентрации спиртов величина F_d уменьшается почти по линейному закону. Это говорит об уменьшении подвижности молекул воды в исследуемых растворах по сравнению с чистой водой за счет образования дополнительных водородных связей в объеме растворителя по мере увеличения концентрации неэлектролита. Большая (по сравнению с водно-этанольными и водно-пропандиоловыми смесями) подвижность молекул воды в смесях вода-глицерин может быть связана с микрорасслаиванием глицерина при повышении его объемного содержания в растворе [1].

На рис. 2 приведены зависимости степени связывания ионов Cu^{2+} с фосфатными группами ДНК от полной концентрации ионов меди для комплексов ДНК- Cu^{2+} в водно-спиртовых растворах, содержащих одинаковое (в объемных процентах) количество спирта [4]. Сопоставление данных рис. 1 и 2 показывает, что взаимодействие ионов Cu^{2+} с ДНК в водно-спиртовых растворах с объемной концентрацией спирта 9 об.% зависит от подвижности молекул воды. Чем больше добавка спирта уменьшает подвижность молекул воды по сравнению с чистой водой, тем меньшие концентрации ионов Cu^{2+} необходимы для перевода ДНК в компактное состояние и тем выше константы связывания ионов Cu^{2+} с ДНК.

Уменьшение величины F_d в смесях вода-неэлектролит эквивалентно уменьшению активности воды. Увеличение же степени связывания ионов Cu^{2+} с ДНК при пониженной активности воды упрощенно можно объяснить исходя из принципа Ле Шателье. В водном растворе места связывания на поверхности ДНК контактируют с молекулами воды, поэтому взаимодействие ДНК как с неэлектролитом, так и с ионами меди должно приводить к вытеснению молекул воды. Схематически процесс взаимодействия может быть представлен в виде:



Согласно принципу Ле Шателье при повышении концентрации одного из участвующих в равновесии вещества равновесие смещается в сторону реакции, понижающей концентрацию этого вещества, и наоборот. При понижении активности воды равновесие смещается вправо и реакция будет протекать быстрее.

Таким образом, взаимодействие ионов Cu^{2+} с ДНК зависит от активности воды. Менее полярные растворители увеличивают сродство ионов Cu^{2+} к ДНК. Для спиртов с одинаковой длиной углеродной цепи (глицерин и пропандиол) степень и константа связывания ионов Cu^{2+} возрастают при уменьшении количества ОН-групп.

Авторы выражают благодарность канд. физ.-мат. наук О. Николу (ХГУ) за предоставление возможности и помощь в проведении измерений методом СВЧ-диэлектрметрии. Работа частично финансировалась за счет гранта Международного фонда "Відродження" № PSU072091.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горбунов Б.Э., Козлов В.С., Наберухин Ю.И. Исследование водных растворов неэлектролитов методами колебательной спектроскопии. II. Микрорасслаивание при средних концентрациях // Журн. структур. химии.– 1975.– Т. 16, № 5.– С. 816–825.
2. Жиякова Т.А. Температурозависимые изменения состояния воды в биологических мембранах по данным ЯМР и СВЧ-дieleктрометрии: Дис...канд. биол. наук.– Харьков, 1991.– 161 с.
3. Hackl E. V., Kornilova S. V., Kapinos L. E. et. al. Study of Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} ion binding to DNA in solutions by means of IR-spectroscopy // J. Mol. Struct.– 1997.– 408/409.– P. 229–232.
4. Hackl E. V., Kornilova S. V., Blagoi Yu. P. Cu^{2+} ions interaction with DNA in solutions with different water activity // Pre-ICBIC-8 Okazaki Symposium.– 1997, July 25–26, Okazaki, Japan.– P. 54.

Физико-технический ин-т низких температур им. Б.И.Веркина
НАН Украины, г. Харьков
Ин-т проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
г. Харьков

Поступило 13.01.98

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

3 1998

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. – "Проблемы криобиологии". Издаётся 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 Ukraine

23 Pereyaslavskaya Str., 310015 Kharkov, Ukraine

Tel. (0572) 72-41-43

Fax (0572) 72-00-84

ISSN 0233-7671 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1998. №3. 1-68 ИНДЕКС 70474