

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Рєпін Микола Васильович

УДК: 57.043:611.018.5.36.018.1.086.3:591.543.42

СТРУКТУРНІ ПЕРЕБУДОВИ В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ В УМОВАХ
ГІПОТЕРМІЇ, ПРИРОДНОГО ГІПОБІОЗУ ТА ЗАМОРОЖУВАННЯ

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Харків–2013

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий консультант:

лауреат держпремій України і СРСР, доктор медичних наук, професор
Юрченко Тетяна Миколаївна, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, завідувач відділу кріоморфології, м. Харків.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор **Розанов Леонід Федорович**,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, головний
науковий співробітник відділу низькотемпературного консервування,
м. Харків.

доктор біологічних наук, професор **Кнігавко Володимир Гілярієвич**,
Харківський національний медичний університет МОЗ України, завідувач
кафедри медичної та біологічної фізики і медичної інформатики, м. Харків.

доктор медичних наук, професор **Шепітько Володимир Іванович**,
ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія» завідувач кафедри
гістології, цитології та ембріології, м. Полтава.

Захист відбудеться «02» липня 2013 р. о 13–30 годині на засіданні
спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем
кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул.
Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «28» травня 2013 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА



Гордієнко Є.О.

РОБОТИ

Актуальність теми. Сучасний етап розвитку біології характеризується значними досягненнями у вивченні закономірностей організації і функціонування клітини. Одним з основних напрямів досліджень є з'ясування ролі клітинних і молекулярних механізмів в адаптації систем різного рівня організації до зовнішніх умов, які змінюються, у тому числі і до охолодження.

Незважаючи на багаточисельні кріобіологічні дослідження, механізм дії охолодження і пов'язані з ним чинники, які впливають на біологічні об'єкти, повністю не вивчений. Це обумовлено відсутністю адекватної інформації про динаміку і характер розвитку морфологічних і ультраструктурних змін у клітинах, підданих температурній дії, хоча слід зазначити, що аналізу функціональних характеристик клітин в умовах охолодження приділяється значно більше уваги [Кравченко Л.П., 2001; Green С., 2001; Петренко А.Ю., 2010, 2011].

Накопичені в останні три десятиліття відомості щодо температуро-залежних перебудов в клітинах та їх мембранах дозволяють стверджувати, що стан більшості клітин при охолодженні від фізіологічних температур до 15–20°C є оборотним, а функція клітин істотно не змінюється. Проте такі дії на клітини в області позитивних температур, як швидке зниження температури (температурний шок) або тривале знаходження біооб'єктів в області білянульових температур (гіпотермічне зберігання), слід розглядати як один з важливих чинників пошкодження.

Унікальним прикладом розвитку температурної адаптації організму є здатність гетеротермних тварин занурюватися в стан гіпобіозу, який супроводжується природним зниженням температури тіла [Калабухов Н.И., 1985; Carey H.V., 2003; Мельнічук С.Д., 2007]. Такий механізм сформувався в ході еволюції і свідчить про великі компенсаторні можливості біологічних систем. Це визначило інтерес до природного гіпобіозу з точки зору використання результатів його досліджень при штучній гіпотермії та в медицині.

Методи гіпотермії широко використовуються в різних галузях біології і медицини. Відомо, що зниження температури призводить не лише до уповільнення загального метаболізму, але і до підвищення стійкості різних біологічних об'єктів до дії багатьох несприятливих чинників і, перш за все, до тканинної і клітинної гіпоксії та процесів аутолізу [Green С., 2003; Мельнічук С.Д., 2007]. Гіпотермію слід розглядати не лише як спосіб короткострокового збереження біооб'єктів різного рівня організації, але й як найважливіший етап адаптації такої складно організованої системи як орган, до низькотемпературного консервування і його подальшої реабілітації після розморожування.

Значна кількість робіт, які присвячені з'ясуванню механізму адаптації пойкило- і гетеротермних організмів, стосується вивчення якісного і кількісного складу ліпідів, функціонування мембранозв'язаних ферментів і білкових комплексів, «тригерів сплячки», що забезпечують збереження функціональної активності клітин при знижених температурах [Игнатьев Д.А., 1986, 1995, 2005; Storey K.B., 2010]. У морфологічних роботах в основному подано опис стану ультраструктури клітин і тканин у циклі гібернації. Порівняльні дослідження температурозалежних змін ультраструктури клітин гетеротермів у різних фазах сплячки і гомойотермів, а також при тривалій гіпотермічній дії *in vitro* не проводилися. У літературі відсутні

дані щодо водного обміну в клітинах зимосплячих. Проте відомо, що під час сплячки в організмі тварини практично зберігається іонний баланс, продовжується утилізація продуктів життєдіяльності, тобто відбуваються процеси на тлі значного зниження основного метаболізму, які вимагають підтримки певного рівня водного обміну. В зв'язку з цим питання про роль проникності мембрани для води в забезпеченні швидкого включення всіх систем клітини і організму в цілому при переході із сплячки в активний стан має досить велике значення.

Важливим аспектом вивчення процесів холодової адаптації клітини є дослідження плазматичних мембран як одного з найбільш кріолабільних компонентів клітини [Белоус А. М., 1982]. В процесі охолодження або кріоконсервування при дії багатьох фізико-хімічних чинників плазматичні мембрани схильні до структурних перебудов, що передбачає їх участь в адаптивних реакціях.

Вивчення структурних перебудов в еритроцитах і ядровмісних клітинах в умовах температурної дії показало, що спостережувана зміна форми і деформація плазматичної мембрани, перебудови у внутрішньоклітинному об'ємі вказують на участь у цих процесах не лише ліпідного бішару та інтегральних білків мембрани, але й іонного складу та цитоскелетної сітки, стан якої за допомогою білок-білкових взаємодій контролює форму і об'єм клітин [Репин Н.В., 1991; Wong P., 1999, 2004; Van Dort Y.M., 2001; Repin N.V., 2008, 2009]. Результати дослідження останніх років свідчать про участь в мембранних перебудовах цитозольних і цитоскелетних структур, які електростатично взаємодіють з інтегральними компонентами мембрани [Chu H., Low P. S., 2006]. Це вказує на можливу роль слабких зв'язків у формуванні реакцій клітин на екстремальні дії.

Таким чином, аналіз даних літератури встановив, що більшість досліджень спрямована на з'ясування різних аспектів функціонального статусу біологічних об'єктів на етапах зниження температури і гіпотермічного зберігання, тоді як їх морфологічні і особливо ультраструктурні характеристики в умовах зміни функції практично не вивчалися. Крім того, аналіз даних літератури дозволив виділити температурний і іонно-осмотичний чинники дії на біологічні об'єкти, які призводять до структурних перебудов в клітинах та їх мембранах. Ушкоджувальна дія цих факторів пов'язана безпосередньо з рядом ключових проблем кріобіології, що і з'явилося предметом наших досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у рамках планових тем НДР ІПКіК НАН України у відділі кріоморфології за темами: «Вивчити морфологічні аспекти реакції біологічних об'єктів різних рівнів організації, а також модельних систем на штучний і природний гіпобіоз» (№ держреєстрації 01944005299, 1991–1995 рр.); «Дослідження механізмів холодової толерантності при природній і штучній адаптації клітин» (№ держреєстрації 0100U004237; 1996–2000 рр.); «Дослідити структурно-метаболічний і функціональний стан клітин фетоплацентарного комплексу після кріоконсервування і гіпотермічного зберігання» (№ держреєстрації 0206U002786; 2001–2005 рр.); «Вивчити механізм регенераційних процесів шляхом дослідження структурних і деяких метаболічних показників організму експериментальних тварин після трансплантації плаценти в умовах атеросклерозу» (№ держреєстрації 0106U002170; 2006–2010 рр.)

Мета і задачі дослідження. Встановити закономірності і особливості структурних перебудов у біологічних об'єктах різного рівня організації в умовах гіпотермії, природного гіпобіозу і дії низьких температур.

Задачі дослідження.

1. Визначити морфологічний стан еритроцитів людини, їх осмотичну стійкість і ступінь пошкодження в залежності від іонної сили і рН середовища еквілібрації, а також тривалості гіпотермічного зберігання.

2. На основі проведених досліджень структурних перебудов в мембрані еритроцитів визначити механізм везикулоутворення.

3. Вивчити реакцію мембран еритроцитів гетеро- і гомойотермних організмів на температурну дію ($4 \div 37^{\circ}\text{C}$), а також з'ясувати спільність та відмінність структурних змін в клітинах та їх мембранах.

4. Методом ЯМР спектроскопії дослідити водну дифузійну проникність мембран еритроцитів гетеротермних тварин і людини, характер її температурної залежності і величину енергії активації, а також вплив на них «тригера сплячки» – пептиду м.м. 1–10 кДа.

5. Розробити методичний підхід для оцінки значення коефіцієнта проникності мембрани клітин для води при негативних температурах на підставі дослідження процесів внутрішньоклітинної кристалізації і зневоднення еритроцитів на етапі температурної зупинки ($-20 \div -30^{\circ}\text{C}$) при двохступінчастому заморожуванні.

6. Оцінити рівень морфологічного збереження клітин печінки щурів та гетеротермних тварин при гіпотермічному зберіганні її фрагментів у рідкому середовищі та вологій камері.

7. З'ясувати послідовність і закономірності зміни ультраструктури внутрішньоклітинних органел при тривалому гіпотермічному зберіганні ізольованих і у складі фрагментів печінки гепатоцитів.

8. Дослідити вплив короткострокового (1 година) і тривалого (24 години) гіпотермічного зберігання ізольованої печінки щурів у середовищах, які містять сахарозу або маніт, з різними значеннями рН, у стандартному середовищі UW, а також після нормотермічної реперфузії на стан її клітин.

9. Обґрунтувати переваги використання слабкоелектролітних середовищ із зниженим значенням рН для гіпотермічного зберігання тканин і органів.

Об'єкт дослідження. Молекулярно-клітинні закономірності і механізми структурної адаптації біологічних об'єктів при гіпотермії і природному гіпобіозі.

Предмет дослідження. Структурно-функціональні перебудови в біооб'єктах різного рівня організації при варіюванні температури і складу середовища експозиції в умовах гіпотермії, природного гіпобіозу і заморожуванні.

Методи дослідження. Трансмісійна (ТЕМ) і растрова (РЕМ) електронна мікроскопія, електронно-мікроскопічний метод заморожування-сколювання, оптична мікроскопія, ЕПР спінових зондів, ЯМР спектроскопія, морфометричний аналіз, проточна цитофлуориметрія, спектрофотометрія.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження впливу середовищ різного складу, іонної сили і значень рН на структурно-функціональний стан біологічних об'єктів різного рівня організації (клітина–орган). Показано, що слабкоелектролітні середовища із зниженим

значенням рН забезпечують високий рівень збереження ультраструктури і макроергів клітин.

У роботі вперше показано, що визначальна роль в механізмі спікулоутворення належить скороченню і ущільненню цитоскелета еритроцита. Новими є дані про механізм спікуло- і везикулоутворення при сфероехіноцитарній трансформації еритроцитів, що дозволили пояснити причини стійкості сфероехіноцитарної форми до гіпотонії. Найбільш стійкою до дії досліджуваних чинників середовища була ехіноцитарна форма еритроцитів.

Вперше виявлено явище розпушування структури примембранного шару (глікокаліксу) і його відшаровування від мембрани еритроцитів між 10 і 14-ю добою гіпотермічного зберігання (ГЗ) у середовищах з нейтральним значенням рН і після 7 діб – з лужним.

За допомогою електронно-мікроскопічного методу заморожування-сколювання вперше проведено порівняльне дослідження і отримано нові дані щодо процесу зневоднення еритроцитів людини і гетеротермів на етапі температурної зупинки (-20°C – -30°C) та оцінено значення коефіцієнта проникності мембрани для води при цих температурах.

Встановлено, що еритроцити гетеротермів на відміну від гомойотермів мають вищу проникність мембрани для води і меншу енергію активації цього процесу, а час водного дифузійного обміну мембрани еритроцитів сплячої тварини на порядок менше, ніж еритроцитів людини в інтервалі температур 6°C – 38°C . Вперше визначено вплив «тригера сплячки» – білка м. м. 1–10 кДа, на параметри проникності мембрани еритроцитів людини для води.

Вперше проведено порівняльне дослідження морфофункціонального і ультраструктурного стану клітин печінки у складі цілісного ізольованого і перфузованого органа, який зберігався різні терміни при 4°C в середовищах низької іонної сили на основі сахарози і маніту при нейтральних і кислих значеннях рН, в середовищі UW, а також після етапу нормотермічної реперфузії. Виявлено високий (аналогічний середовищу UW – загальноновизнаний стандарт) рівень збереження морфологічних і біохімічних характеристик органа, що свідчить про перспективність слабкоелектролітних середовищ із зниженим значенням рН для гіпотермічного зберігання органів.

В результаті дослідження визначена послідовність пошкодження і деградації органел клітин печінки в процесі тривалого гіпотермічного зберігання. Вперше показано, що на відміну від гомойотермних організмів, у яких виражені зміни клітин спостерігалися вже до 18–24 годин зберігання, клітини, взяті у гетеротермних тварин у стані активності та пробудження, зберігали відносно стійку ультраструктуру до 24–48 годин, а у тварин у стані сплячки – до 4-х діб ГЗ.

Практичне значення. Експериментально встановлений високий рівень збереження морфологічних і біохімічних характеристик ізольованої печінки дозволив обґрунтувати доцільність застосування розчинів низької іонної сили із зниженим значенням рН на основі маніту для гіпотермічної перфузії і зберігання органів, а також як середовища для зберігання клітин і їх підготовки до низькотемпературного консервування. Встановлені під час експериментальних досліджень чисельні значення діаметра спікул, розмірів везикул, які відокремилися,

а також зміни площі поверхні під час сфероехіноцитарної трансформації еритроцитів можуть бути використані для побудови теоретичних моделей даного процесу. Отримані експериментальні дані можуть знайти застосування при розробці нових і удосконалення існуючих способів низькотемпературного консервування біологічних об'єктів різного рівня організації.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійним закінченим дослідженням. Автору дисертаційної роботи належать вибір теми, визначення мети і завдань досліджень, методологічних основ її виконання. Претендентом особисто отримано експериментальні дані у всіх розділах досліджень, проведено їх статистичну обробку. Автором роботи самостійно проаналізовано отримані результати і сформульовано висновки. У спільних наукових роботах і публікаціях особистий вклад претендента полягає в наступному: визначенні мети і завдань проведення експериментів, безпосередньому проведенні електронно-мікроскопічних досліджень і аналізі результатів, формулюванні висновків (роботи [1–6, 8, 10–14, 33]), розробці методичного підходу і технічного забезпечення методу заморожування-сколювання (роботи [9, 32]), проведенні електронно-мікроскопічних експериментів, узагальненні результатів і визначенні механізму спікулоутворення (роботи [18, 23, 30]), у формулюванні ідеї і методології постановки експериментів, безпосередньому проведенні мікроскопічних досліджень, обробці і узагальненні отриманих даних (роботи [7, 15–17, 19–22, 24–29, 31])

Автору роботи безпосередньо належить ряд розробок, технічних нововведень і впроваджень, завдяки яким було можливо адаптувати класичні електронно-мікроскопічні методи для вирішення завдань кріобіології: розроблений і виготовлений пристрій для низькотемпературного методу заморожування-сколювання [А.с. (СРСР) № 1157597]; система виміру і регулювання температури (до -196°C) на основі високоточного кварцового двохчастотного автогенераторного перетворювача температури ДАП ТЦ-05 [Репин Н.В., 2001]. Упроваджені спільно з АТ "Selmi" система знімання і аналізу зображення САЗ - 01А (для електронного мікроскопу ПЕМ-125-К); спільно з ВКФ «SEO Image Lab» (м. Суми) – сертифікована система цифрового виведення зображення на монітор комп'ютера і програма його обробки (для РЕММА-101А).

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на наступних наукових форумах: конференціях «Криогенные методы в электронной микроскопии» (Пушино, Росія, 1985, 1986); Міжнародній конференції "Досягнення і перспективи розвитку кріобіології і кріомедицини" (Харків, 1988); Всесоюзній конференції "Структурная динамика биологических мембран и ее роль в регуляции фотобиологических и рецепторных процессов" (Мінськ, Білорусь, 1988); IV Республіканській конференції з електронної мікроскопії «Электронная микроскопия и современная технология» (Кишинів, Молдова, 1990); VII Міжнародному симпозіумі "Проблеми низькотемпературної консервації клітин, тканин і органів" (Берлін, Німеччина, 1991); II Міжнародній конференції "Успіхи сучасної кріобіології" (Харків, 1992); XIV конференції з електронної мікроскопії (Чорноголовка, Росія, 1992); конференції "Нові додатки морфометрії і математичного моделювання в медико-біологічних дослідженнях" (Харків, 1990); I з'їзд Українського товариства кріобіології і кріомедицини (Харків, 1995); VI

Міжнародній конференції по тканинним банкам (Единбург, Велика Британія, 1997); 28, 30, 31, 33, 36 Міжнародних нарадах по кріобіології «Сруо» (Левен, Бельгія, 1991; Атланта, США, 1993; Кіото, Японія, 1994; Індіанаполіс, США, 1996; Марсель, Франція, 1999); 3-у з'їзді Білоруського товариства фотобіологів і біофізиків «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем» (Мінськ, Білорусь, 1998); II Національному конгресі АГЕТ України «Актуальні питання морфології» (Луганськ, 1998); 3-у Всеросійському симпозиумі (з міжнародною участю) «Физиологические механизмы природных адаптаций» (Іваново, Росія, 1999); I–IV з'їздах Українського біофізичного товариства (Київ, 1994; Харків, 1998; Львів, 2002; Донецьк, 2006); 15–17 конгресах «Meetings of the European Association for Red Cell Research» (Мюртен, Швейцарія, 2005; Оксфорд, Велика Британія, 2007; Мілан, Італія, 2009); Науково-технічній конференції «Актуальні питання теоретичної і прикладної фізики і біофізики» (Севастополь, 2006); науковій конференції «Гіпобіоз – фундаментальні та прикладні аспекти» (Київ, 2007); науковій конференції «Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия» (Пушино, Росія, 2008); науковій конференції «Нові кріотехнології для вирішення фундаментальних і прикладних завдань медицини» (Харків, 2008); XXI з'їзді Фізіологічного товариства ім. І. П. Павлова (Москва–Калуга, Росія, 2010); Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми кріобіології і кріомедицини» (Харків, 2012).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 32 статей, у тому числі у провідних вітчизняних (22) і зарубіжних (5) журналах, 5 – в тематичних збірках і 30 тез доповідей на конференціях. Результати дисертації опубліковані у главах 2-х колективних монографій.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, глави «Матеріал і методи дослідження»; 7 глав власних досліджень (267 стор.), заключної частини, висновків, списку цитованої літератури. Робота викладена на 355 сторінках і містить 103 фото- і 41 графічний рисунок, 7 таблиць, 4 схеми.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ.

У вступі обґрунтовано актуальність теми, зв'язок роботи з науковими програмами і темами, сформульовано мету і задачі дослідження, показано новизну і практичне значення отриманих результатів, а також особистий внесок претендента в опублікованих із співавторами роботах, наведено відомості про апробацію результатів.

У главі 1 представлено аналітичний огляд експериментальних і теоретичних даних літератури, які стосуються сучасних уявлень про механізми пошкодження біологічних об'єктів різного рівня організації в процесі гіпотермічного зберігання, а також результати розробок і підбору середовищ зберігання, що забезпечують максимальне збереження і тривале зберігання.

У главі 2 «Матеріали і методи дослідження» подана загальна характеристика об'єктів, методів і матеріалу дослідження. Для адекватного вирішення поставлених задач у роботі використано біологічні об'єкти різного рівня організації: еритроцити зимосплячих ховрахів *Citellus undulatus* та щурів, еритроцити кордової та донорської крові людини; ізольовані гепатоцити; фрагменти печінки і ізольована печінка щурів; фрагменти печінки зимосплячих ховрахів і плаценти людини.

Еритроцити людини виділяли з цільної донорської крові групи А (II), яка доставлялася з Харківської обласної станції переливання крові, еритроцити кордової крові виділяли з цільної пуповинної крові, отриманої при нормальних пологах з інформованої згоди здорових породіль у пологовому будинку № 5 м. Харкова.

Плазму і формені елементи крові видаляли центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 5 хв. Осад еритроцитів тричі відмивали в чотирикратному об'ємі фосфатно-сольового буфера (ФСБ), який містив 20 мМ Na-фосфатного буфера (ФБ); 130 мМ NaCl; 5,6 мМ глюкози, рН 7,2, далі ресуспендували в ФСБ рівного об'єму. Гематокрит визначали в капілярах на мікроцентрифузі МГЦ-8 (СРСР). Гіпотермічне зберігання еритроцитів проводили в холодильнику при 4°C.

Експерименти з використанням матеріалу тваринного походження проводили відповідно до положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних і інших наукових цілях" (Страсбург, 1985 р.), а також «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених I, II Національними конгресами з біоетики (Київ, 2001, 2007 р.).

Стан еритроцитів в зоні температур термоденатурації спектрину досліджували після їх нагріву у водному термостаті (точність стабілізації – $\pm 0,5^\circ\text{C}$) протягом 15 хв при 46, 48, 49, 50 і 51°C . Далі еритроцити в співвідношенні 1:1 (за об'ємом) змішували з 2,0 % розчином глютарового альдегіду на ФБ, температура якого була однаковою з температурою клітин.

Для ГЗ фрагменти печінки і плаценти об'ємом $0,5\text{ см}^3$ поміщали у вологу камеру (50 см^3) або живильне середовище 199 (50 мл) при 4°C і зберігали при цій температурі протягом 6, 12, 24, 48, 72 годин і 6 діб. Після закінчення кожного терміну зберігання зразки тканини препарували для електронно-мікроскопічного (ЕМ) дослідження.

Для перфузії та ГЗ використовували цілу печінку наркотизованих лабораторних безпородних щурів-самців (200–250 г). Печінку тварин перфузували *in situ* консервуючим розчином (4°C ; 50 мл) через портальну вену з використанням перистальтичного насоса (швидкість 2,5–3,0 мл/хв/гр, перфузійний тиск у вені – 12 мм. рт. ст.). Після відмивання печінки від крові та її насичення відповідним консервуючим розчином в портальну вену вводили і фіксували катетер діаметром 1,4 мм. Печінку з катетером зберігали в консервуючому розчині при 4°C протягом 1 і 24 годин. Після ГЗ печінку реперфузували 60 хв мінімальним сольовим розчином Кребса-Рингера-бикарбонату (рН 7,4; 37°C), до якого додатково додавали 10 мМ розчину NEPES і 5 мМ глюкози. Активність ферментів (ЛДГ, АсАТ, АлАТ) визначали в перфузаті за допомогою готових наборів фірми «Sigma» (США), як кількість ферменту, яка каталізує утворення 1 мкмоль/л НАДН за хвилину, в 150 мл перфузату. Для морфологічного дослідження використовували фрагменти печінки після 1- та 24-годинного її зберігання, а також після реперфузії органу.

Електронно-мікроскопічні дослідження проводили за загальноприйнятою методикою [Уикли Б., 1975] з використанням фіксаторів і епоксидних смол фірми «Fluka» (США). Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікротомах УМТП-4 і УМТП-7 (АТ «Selmi», м. Суми), контрастували ураніацетатом і цитратом свинцю. Ультраструктуру клітин і тканин досліджували при прискорюючій напрузі 75 кВ в

електронному мікроскопі ПЕМ-125K (АТ «Selmi», м. Суми), який мав систему аналізу зображення СА3-01А (АТ «Selmi», м. Суми) з використанням високочутливої CCD камери DX-2 і пакета програм обробки зображення фірми «КАРРА» (Німеччина).

Морфологічний аналіз тканини печінки проводили на напівтонких зрізах товщиною 0,5 мкм, які фарбували метиленовим синім і толуїдиновим синім і досліджували в оптичному мікроскопі ЛЮАМ-МП-4 («ЛМО», СРСР) з цифровою відеокамерою Panasonic WV-CP 470 (Японія).

Процеси внутрішньоклітинного кристалоутворення при двохступінчастому заморожуванні, ультраструктуру мембран еритроцитів, а також температурозалежну зміну характеру розподілу внутрішньомембранних частинок (ВМЧ) досліджували електронно-мікроскопічним методом заморожування-сколювання з використанням розробленої і виготовленої нами установки [А.с. (СРСР) № 1157597; Репин Н.В., 2001].

Морфологічний стан еритроцитів при ГЗ у середовищах із різним складом і рН, механізм спікулоутворення досліджували методами електронної мікроскопії: растрової (РЕМ), трансмісійної (ТЕМ) і заморожування-сколювання.

Для оцінки стану глікокаліксу еритроцитів у середовищах із різним складом і при ГЗ використовували контрастування рутенійовим червоним («Aldrich», США), який специфічно зв'язується з сіаловими кислотами мембран [Гайер Г., 1974].

Стан мембранних ліпідів, а також ступінь зневоднення еритроцитів на етапі ізотермічної витримки при двохступінчастому заморожуванні вивчали методом ЕПР спінових зондів [Repin N.V., 2009]. У роботі застосовували жирно-кислотний зонд – амід пальмітинової кислоти, спін-мічений в зоні полярної голівки («Aldrich», США) та водорозчинний зонд 1-оксил-2,2,6,6–тетраметил–4-оксопіперидин – ТЕМПОН («Aldrich», США) у комбінації з розширюючим агентом фериціанідом калію, який не проникає в інтактні еритроцити. Спектри реєстрували на ЕПР-спектрометрі ER-100Д «Bruker» (Німеччина) з термостатуючим пристроєм ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). За спектрами ЕПР визначали інтенсивності компонент (I_0 , $I_{-/+}$), а також ширину центральної компоненти (ΔH_0 , G). За співвідношенням $I_0/I_{-/+}$ визначали параметр рухливості зонда, який характеризує в'язкість його мікрооточення. Кількість зонда в клітині оцінювали за параметром $I_0(\Delta H_0)^2$.

Водну дифузійну проникність мембран еритроцитів гомойо- та гетеротермних тварин досліджували методом ЯМР. Час спін-спінової релаксації визначали за двоімпульсною методикою [Conlon T., 1978], використовуючи релаксометр ЯМР на частоті 15,9 МГц [Шейкин В.И., 1984].

Осмотичну стійкість клітин визначали шляхом перенесення 100 мкл клітин із середовищ інкубації в 1мл розчину NaCl (90 і 140 мОсмоль), який містить 20 ммоль/л ФБ, рН 7,2 при 37°C . Осмолярність гіпотонічних середовищ контролювали осмометром ОМКА-Щ-01 (СРСР).

Для аналізу ступеня гетерогенності популяції еритроцитів використовували проточний цитофлуориметр FACS Calibur («BD, Bioscience», США) з одночасною роздільною фіксацією малокутового і прямого світлорозсіяння (параметр FSC, який характеризує форму клітин – співвідношення двох проекцій). Дані обробляли програмою Win MDI 2.8.

Стан мембранних білків вивчали методом власної білкової флуоресценції при довжині хвилі збудження 296 нм (триптофанова флуоресценція). Реєстрацію спектрів флуоресценції розбавленої суспензії тіней еритроцитів проводили на спектрофлуориметрі «Hitachi» MPF-2A (Японія). Температурну залежність флуоресценції визначали за допомогою термостатованої ($\pm 1^\circ\text{C}$) кювети.

Кислотний гемоліз (HCl-гемоліз) еритроцитів проводили, як описано в роботі [Терсков И., 1957] з температурною модифікацією ($5\text{--}40^\circ\text{C}$) [Repina S., 2008] за допомогою термостатованої комірки. Кінетику HCl-гемолізу визначали по зміні оптичної щільності при 700 нм у часі на спектрофотометрі Pye Unicam SP 8000 (Велика Британія).

Концентрацію йонів K^+ у надосаді суспензії еритроцитів (20% гематокрит) вимірювали за допомогою йономера «Мультитест ИПЛ-113» НВП «Семико» (Росія). Електроди «ЭЛИС-121К» калібрувалися розчинами KCl ($10^{-5}\text{--}10^{-1}$ моль/л) перед кожним циклом виміру.

Використанні у роботі реагенти відповідали маркам «ч.д.а.» або «х.ч.».

Отримані результати статистично обробляли за методом Стюдента-Фішера [Закс Л., 1976]. Для розрахунків використали програму комп'ютерного аналізу даних Excel-2003.

У главі 3 представлено обґрунтування використання методу заморожування-сколювання в кріобіологічних дослідженнях, проведено аналіз природи ВМЧ, а також показано, що інформативними параметрами оцінки реорганізації мембран на ультраструктурному рівні є щільність і розподіл ВМЧ між внутрішньою – Рґ, і зовнішньою – Еґ, поверхніями мембрани, характер проходження площини сколювання в мембрані та її цілісність. На прикладі еритроцитів показано різні варіанти реакції їх мембрани на деякі екстремальні дії.

Відмічено, що визначення температурозалежних змін ультраструктури мембран, які відбуваються при дії холоду, є інформативним методичним підходом і досить добре ідентифікується методами електронної мікроскопії і, зокрема, заморожування-сколювання.

Досліджено також вплив порушення цілісності цитоскелета (термоденатурація спектрину) на характер трансформації еритроцитів щура, кордової і донорської крові людини і на ультраструктуру мембрани клітин.

Показано, що вже при 48°C по периферії більшості дискоцитів утворювався хвилеподібний рельєф, вигини якого з підвищенням температури ставали більш вираженими, а їх кількість збільшувалася. При $49\text{--}50^\circ\text{C}$ еритроцити щура трансформувалися в сфероєхіноцити з великою кількістю мембранних спікул (0,2–0,5 мкм). В області температур $50\text{--}51^\circ\text{C}$ відбувалися практично повне відшаровування спікул від еритроцитів і формування везикул, а також сфероподібного (4,5–5 мкм) остову.

В еритроцитах донорської і кордової крові людини при 49 і 50°C спостерігалася формування поперечних перетяжок, які приводили до фрагментації клітин та появи великих (до 3–4 мкм) і дрібних (до 1,5 мкм) в діаметрі везикул. Більш виражена фрагментація і менша термостійкість еритроцитів кордової крові можуть бути пов'язані з їх більшою гетерогенністю: діаметр дискоцитів коливався з 6,7 до 11 мкм при середньому значенні 8,8 мкм, тоді як середній діаметр

еритроцитів дорослої людини і щура складав 7,3 і 6,5 мкм, відповідно.

Незважаючи на значимі порушення морфології самої клітини, величина гемолізу була незначною і складала 4–4,5 % для еритроцитів донора і кордової крові людини і 5–5,3 % – для еритроцитів щура.

Показано, що охолодження до 4°C еритроцитів з денатурованим спектрином приводило до характерної агрегації ВМЧ у вигляді безперервної мережі (рис. 1, а), яка фактично «повторювала» структуру мембранного скелета (рис. 1, б). Це свідчить про посилення взаємодії білка смуги 3 з молекулами спектрину в цих умовах [Repin N.V., 2008].

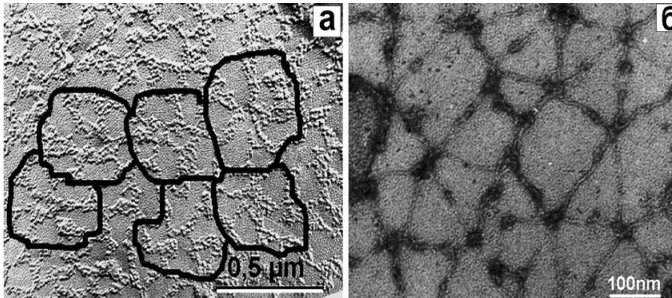


Рис.1. Ультраструктура мембрани і цитоскелету еритроцита:
а – характерна агрегація ВМЧ у мембрані еритроциту у вигляді безперервної мережі після нагріву до 50°C (15 хв) і охолодження до 4°C; розподіл ВМЧ вздовж спектринових ниток; б – мембранна скелетна мережа [Liu Shih-Chun, 1990].

Таким чином, порушення нативної взаємодії цитоскелет-мембрана позбавляло еритроцити структурної адаптації до температурного впливу.

У главі 4 представлено результати дослідження морфології еритроцитів, їх цілісності і осмотичної стійкості при моделюванні граничних фізіологічних умов (іонної сили і рН середовища) для різних термінів гіпотермічного зберігання. Досліджено процес і запропонована модель формування спікул і везикуляції.

Еритроцити, відмиті від плазми і формених елементів крові (20%-й гематокрит), змішували з середовищем експозиції у співвідношенні 1:10 і зберігали протягом 30 хв при кімнатній температурі, 2 годин та 1–21-ї доби при 4°C у середовищах різного складу: електролітні – середовище 1 (130 мМ NaCl; рН 5,4; 7,2; 8,6) і середовище 2 (130 мМ KCl; рН 5,4; 7,2; 8,6); слабкоелектролітні – середовище 3 (260 мМ маніту; рН 5,4; 7,2; 8,6) і середовище 4 (260 мМ сахарози; рН 5,4; 7,2; 8,6). Всі досліджувані середовища містили 20 мМ ФБ.

Варіювання складу середовища і значень рН при 30-хвилинній експозиції показало, що в електролітних середовищах (рис. 2, а–в) при рН 7,2 еритроцити зберігали форму двоввігнутого диска з діаметром 6,6–7,0 мкм, а при рН 5,4 вони набували слаборозвиненої стоматоцитарної форми з діаметром клітин 5,8–6,2 мкм. При лужних значеннях рН еритроцити приймали форму сплюснених дисків з середнім діаметром 6,8–7,1 мкм (рис. 2, в). Значна зміна форми клітин після 30-хвилинної експозиції відбувалася в слабкоелектролітних середовищах при рН 8,6, в яких спостерігалася трансформація в ехіноцити (рис. 2, ж), а заміна ФБ на трис-буфер викликала більш інтенсивну зміну форми (рис. 2, г, з).

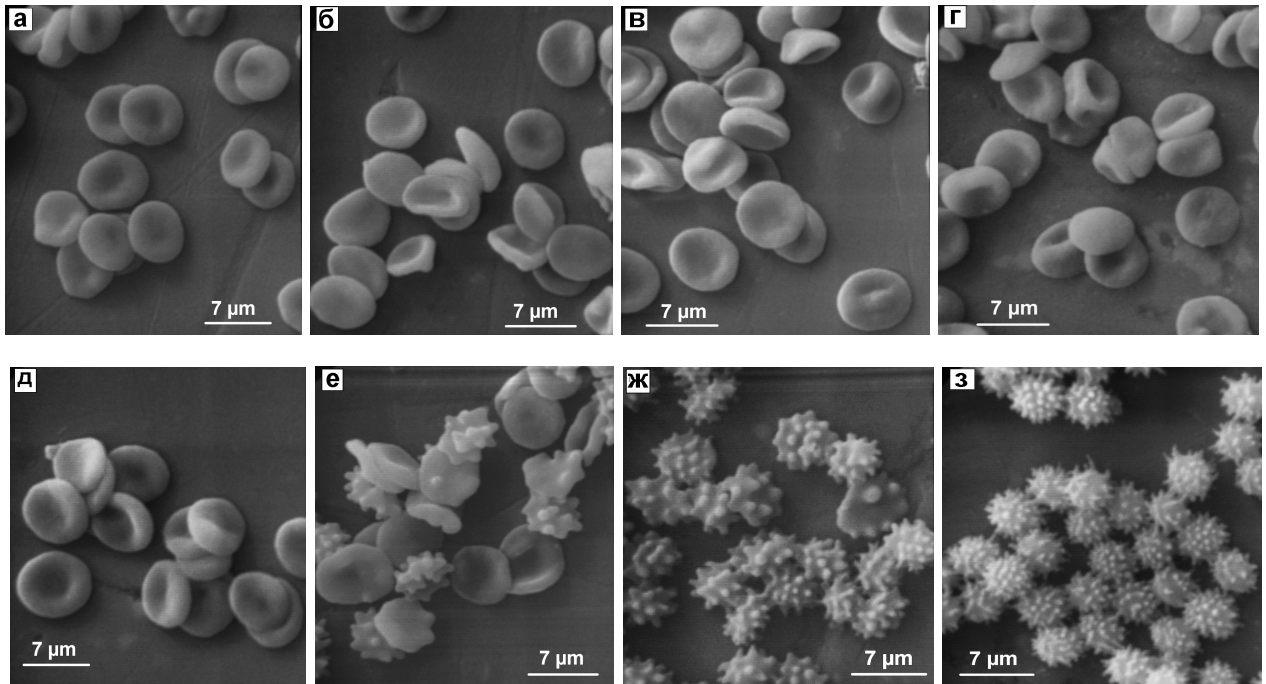


Рис. 2. Морфологічний стан еритроцитів після 30-хвилинної експозиції при 20°C в середовищах з різним складом і значенням рН: а–в – середовище 1 (рН 5,4; 7,2; 8,6); д–ж – середовище 3 (рН 5,4; 7,2; 8,6); г, з – натрій- і манітвміщуючі середовища на трис-буфері, рН 8,6.

Аналогічний характер розподілу клітин за формою був отриманий методом проточної цитофлуориметрії (параметр FSC) для обох типів середовищ і усіх значень рН (рис. 3). Нівелювання другого максимуму на FSC-гістограмі у середовищах 3 і 4 при лужних рН (рис. 3, б гістограми 3 і 6, стрілки) свідчило про зближення розмірів двох проекцій клітини, що характерно для її сферичної форми.

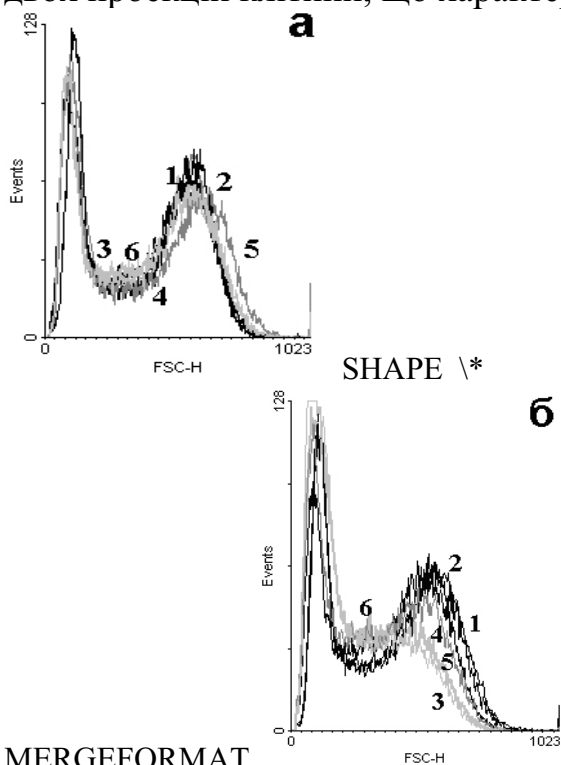


Рис. 3. Розподіл еритроцитів за FSC-параметром після 30-хвилинної експозиції при 20°C в різних середовищах для трьох значень рН: 5,4 (гістограми 1 і 4); 7,2 (гістограми 2 і 5); 8,6 (гістограми 3 і 6): а – електролітні середовища (NaCl – гістограми 1, 2, 3; KCl – 4, 5, 6); б – слабкоелектролітні середовища (маніт – гістограми 1, 2, 3; сахароза – 4, 5, 6).

Аналіз морфології (індекс форми) і осмотичної стійкості клітини виявив взаємозв'язок між цими характеристиками: максимальна зміна форми (ехіноцит), яка відмічена у еритроцитів у середовищах з низькою іонною силою при рН 8,6 (рис. 4, а), відповідає максимуму осмотичної стійкості (рис. 4, б). У електролітних середовищах при рН 5,4 клітини характеризувалися зниженою осмотичною стійкістю.

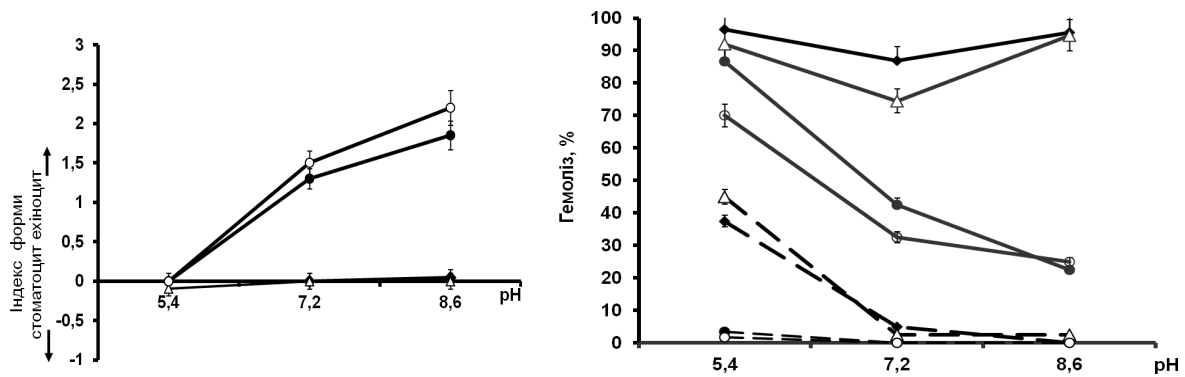


Рис. 4. Індекс форми (а) і осмотична резистентність еритроцитів в розчинах 90 (безперервна лінія) і 140 мОсмоль (пунктирна лінія) гіпотонічних середовищах NaCl (б) після 30-хвилинної інкубації в середовищах з різним складом і значенням рН: —◆— середовище 1 (NaCl); —Δ— середовище 2 (KCl); —●— середовище 3 (маніт); —○— середовище 4 (сахароза).

Отже, чинник іонної сили середовища був значимий при лужних значеннях рН: збереження дискоїдної форми в електролітних середовищах і утворення ехіноцитів в слабкоелектролітних. Середовище експозиції з кислим рН не впливало суттєво на форму клітин, проте спостерігалось зниження їх стійкості до гіпотонії. Ехіноцити мали підвищену стійкість до дії осмотичного чинника.

Для з'ясування механізмів пошкодження клітин в умовах тривалого ГЗ у середовищах з різною іонною силою і значенням рН ми досліджували морфологію еритроцитів, ультраструктуру їх мембрани, стан глікокалікса і осмотичну стійкість клітин.

В процесі ГЗ виявлено виражені зміни форми клітин залежно від складу і рН середовища експозиції. При кислому значенні рН у середовищах 1, 3 та 4 після 7-ї доби ГЗ спостерігалася гетерогенна популяція клітин – дискоцитів і ехіноцитів (рис. 5, в), тоді як в середовищі 2 практично всі клітини набували слаборозвинені

стоматоцитарні форми (рис. 5, а). При нейтральних значеннях рН в обох типах середовищ після 7-ї доби ГЗ 90% клітин мали форму ехіноцитів.

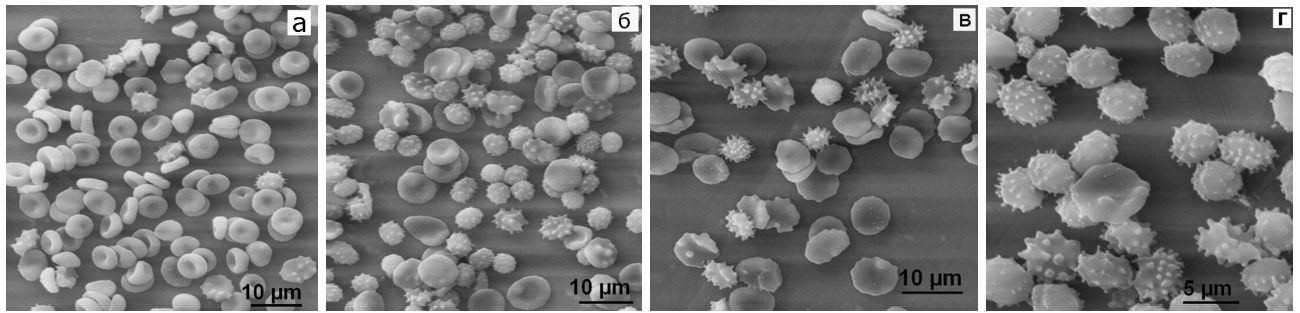


Рис. 5. Морфологічний стан еритроцитів після 7-ї доби ГЗ в середовищах при різних значеннях рН: а, б – середовище 2 (рН 5,4 і 8,6 відповідно); в, г – середовище 3 (рН 5,4 і 8,6 відповідно).

При лужному значенні рН у середовищах 1 і 2 спостерігалось утворення гетерогенної популяції клітин зі сплюснених дискоїдних форм і сфероехіноцитів (рис. 5, б), тоді як у середовищах 3 та 4 відмічена односпрямована зміна форми клітин з утворенням сфероехіноцитів (рис. 5, г). Після 7-ї доби ГЗ при лужних значеннях рН у всіх середовищах утворюються мікровезикули.

При збільшенні термінів ГЗ до 14- і 21-ї доби (рис. 6) в середовищах 1 і 2 спостерігалися наступні зміни: при рН 5,4 – пошкодження частини клітин (про що свідчило збільшення гемолізу), а при рН 8,6 – тенденція до їх злипання (рис. 6, б). У середовищах 3 і 4 при рН 5,4 більшість клітин складали ехіноцити і дискоехіноцити. При нейтральних і лужних значеннях рН в середовищах обох видів після 21-ї доби зберігання домінували сфероехіноцити (рис. 6, в, г).

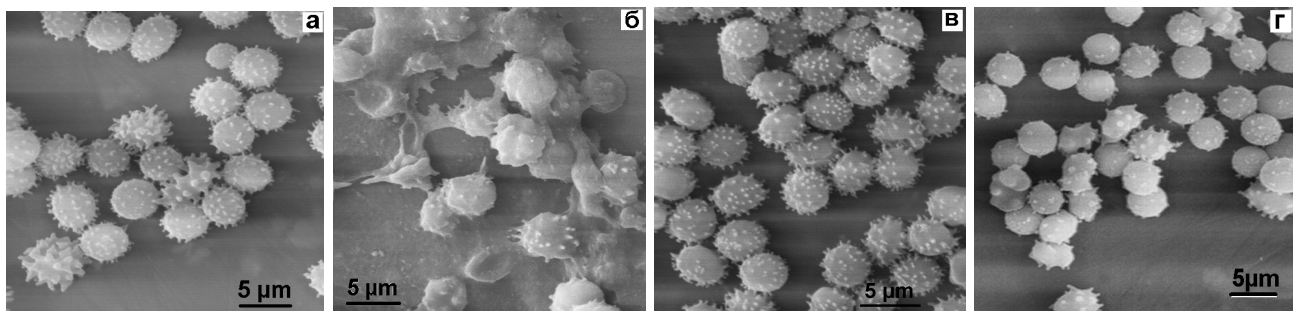


Рис. 6. Морфологічний стан еритроцитів після 14- (а) і 21-ї (б–г) доби ГЗ: а – середовище 1 (рН 8,6); б – середовище 2 (рН 8,6); в, г – середовище 3 (рН 7,2 і 8,6 відповідно).

Однотипність і практично повний збіг усіх п'яти гістограм розподілу клітин (проточна цитофлуориметрія, криві 1–5) при кислих (рис. 7, а) і лужних (рис. 7, в) значеннях рН в процесі зберігання свідчать про стійке збереження форми клітин в цих умовах протягом 7 діб (рис. 7, а, в) або про динаміку її зміни (рис. 7, б), що добре узгоджується з даними РЕМ (див. рис. 5 і 6).

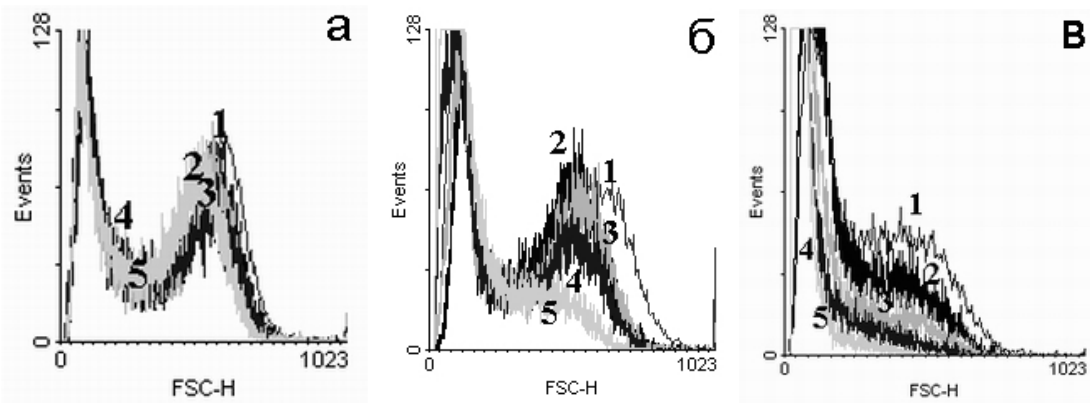


Рис.7. Розподіл еритроцитів за FSC-параметром при ГЗ в середовищах 2 і 3:
а, б – середовище 2 (рН 5,4 і 8,6); в – середовище 3 (рН 8,6). Цифрами позначені: 1 – контроль; 2 – 2 години; 3 – 2 доби; 4 – 5 діб; 5 – 7 діб ГЗ.

Однією з найважливіших складових мембрани є її глікокалікс. Встановлено, що в нормі і після нетривалих термінів зберігання структура глікокалікса є безперервним примембранним шаром, а до 10–14-ї доби ГЗ на поверхні еритроцита залишалися лише його фрагменти або їх не було зовсім. Агрегація і злипання клітин, які спостерігалися при більш тривалих термінах ГЗ, можуть бути пов'язані з тим фактом, що вже після 6 діб зберігання значно зменшується щільність заряду мембрани еритроцитів та їх електрофоретична рухливість [Godin Ch., 1997].

Максимум «ехіноцитарності», який відмічений у еритроцитів після 7-ми діб ГЗ в усіх середовищах з низькою іонною силою при рН 8,6 та 7,2 відповідає мінімуму пошкодження і максимуму осмотичної стійкості. Мінімальна стійкість клітин у кислих середовищах при відносному збереженні їх форми, на наш погляд, пов'язана з підвищенням внутрішньоклітинного осмотичного тиску за рахунок входу іонів H^+ і блокування виходу іонів K^+ і Cl^- [Gedde M., 1997; Wong P., 2005]. Кореляція між концентрацією внутрішньоклітинного хлору і зміною форми при зміні рН клітини відмічена раніше [Gedde M., Huestis H., 1997; Gimsa J., Ried C., 1995; Richter S., 1997]. Аналіз динаміки виходу іонів K^+ з еритроцитів у процесі ГЗ довів, що більш швидша втрата K^+ відбувалася в слабкоелектролітних середовищах і при рН 8,6 (рис. 8).

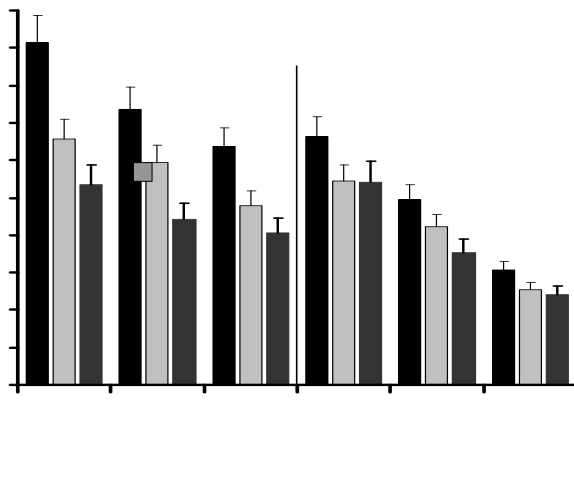
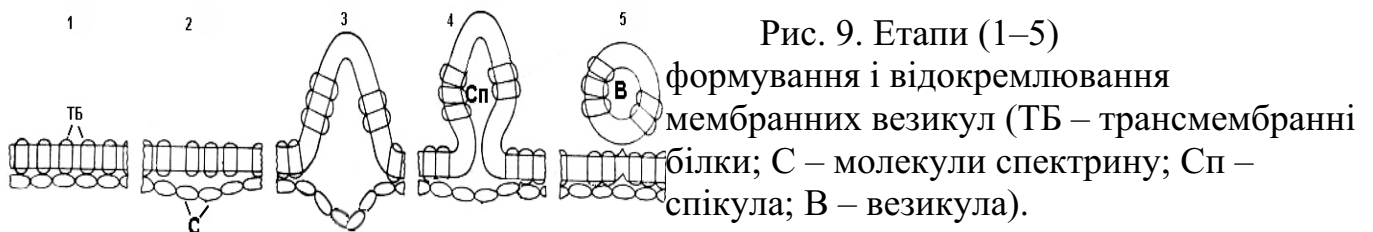


Рис. 8. Вміст калію в еритроцитах при тривалому ГЗ (□ – 1 доба; ▨ – 7 діб; ■ – 14 діб) в електролітних і слабкоелектролітних середовищах з різним значенням рН.

Дослідження механізмів формування спікул і відшаровування везикул від поверхні еритроцита при його сфероехіноцитарній трансформації показали, що «мікрозбурення», які виникали на початковому етапі у вигляді невеликих піднесень з позитивною кривизною на поверхні еритроцита, свідчили про локальне відшаровування цитоскелета від мембрани, яке, найімовірніше, викликане скороченням спектринової мережі. Розміри вказаних піднесень (200–250 нм) приблизно відповідають розміру елементарної комірки цитоскелета [Козлов М.М., 1986; Sheetz M.P., 1983] і на нашу думку, потенційно можуть бути ділянками подальшого формування спікул. При цьому в структурі мембрани спостерігалася незначна зміна розподілу трансмембранних білків (слабка агрегація ВМЧ і зменшення їх щільності на вершині виросту). Зазначене вище свідчить про появу в мембрані структурно нестабільних ділянок.

Нами розглянуто декілька етапів формування і відриву спікул від клітинної поверхні (рис. 9). Виникаючи на поверхні клітин у вигляді конусоподібного піднесення, спікули подовжуються, залишаючись при цьому стійкою формою мембранних виростів. При подальшому впливі ехіноцитогенного чинника збільшується кількість спікул і змінюється їх геометрія. Для ехіноцитів III і IV ступенів кренування середній діаметр спікул складав 435 ± 43 та 257 ± 37 нм; везикул, що відокремлювалися, – 495 ± 87 та 348 ± 65 нм відповідно; спікул у місцях їх потоншення – 137 ± 25 нм.



Таким чином, показано, що при експозиції клітин в середовищах з різним складом і значенням рН, їх ГЗ, тобто діях, які трансформують клітину в сфероехіноцити, існують загальні закономірності формування спікул і везикул. Отримані результати вказують на те, що морфологічні зміни (модифікація форми клітин, утворення мембранних везикул і втрата клітиною глікокалікса, часткова втрата і агрегація трансмембранних білків), які відбуваються за різних умов ГЗ еритроцитів, безпосередньо пов'язані зі змінами стану цитоскелет-мембранного комплексу.

У главі 5 представлено результати порівняльного дослідження ультраструктури і температурозалежних змін мембран еритроцитів гомойо- і гетеротермних ссавців, а також структурних перебудов у мембранах еритроцитів та їх кислотної резистентності при тривалому ГЗ. Ми використовували еритроцит як модель клітинної системи для вивчення молекулярних і ультраструктурних мембранних механізмів температурної адаптації. Ховрахи в сезон гібернації (грудень–лютий) знаходилися в станах глибокої сплячки – ГС (ректальна температура $2-6^{\circ}\text{C}$), пробудження – ПС ($33-36^{\circ}\text{C}$) і міжбаутної активності – АС ($36-37^{\circ}\text{C}$).

Мембрани еритроцитів ховраха в АС (рис. 10, а) і мембрани еритроцитів гомойотермів (людина, шур) мали схожу ультраструктуру: рівномірно гладку поверхню, хаотичний розподіл ВМЧ і приблизну відповідність чисельних значень їх щільності (2383 ± 197 і 1094 ± 91 частинок в 1 мкм^2 на внутрішній – PF, і зовнішній – EF, поверхнях відповідно, рис. 11).

Характерні мікрозбурення на PF-поверхні у вигляді «горбистості» (100–200 нм), слабка агрегація ВМЧ із зменшенням локальної щільності частинок на «горбах» і чисельне відхилення проходження площини сколювання є властивостями типової ультраструктури мембрани еритроцитів сплячої тварини (рис. 10, б). Середні значення щільності ВМЧ склали 2824 ± 210 і 750 ± 68 частинок в 1 мкм^2 на PF- і EF-поверхнях відповідно.

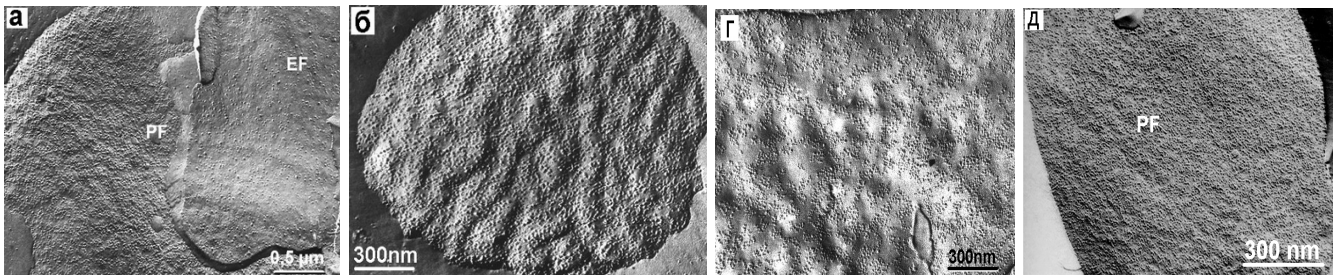


Рис. 10. Ультраструктура мембран еритроцитів ховраха в АС (а) і ГС (б – г). Відмінність в розподілу ВМЧ і морфології PF-поверхні мембран у ГС (б–г) в залежності від температури (б – 4°C ; в – 15°C ; а, г – 37°C).

У ховрахів при ПС мембрана еритроцитів характеризувалася деякою «нестійкістю»: залежно від температури дослідження вона набувала риси, властиві для ультраструктури мембран еритроцитів сплячої (ПС– 12°C) або активної (ПС– 35°C) тварини, що виявлялося і в щільності ВМЧ (рис. 11).

Ультраструктурне дослідження мембран еритроцитів ховраха у ГС, кріофіксованих від 4, 12, 15, 20 і 35°C (моделювання «пробудження» *in vitro*), показали, що при нагріві еритроцитів до температур не вище 15°C їх мембрана зберігала ознаки морфології мембран ховрахів у ГС, а при нагріві до 35 – 37°C мембрана була такою ж, як у ховрахів у АС при тій же температурі. Для мембрани ховрахів при ГС «особливою температурною областю» була температура 15°C , при якій спостерігалася значна агрегація ВМЧ.

При відносно незмінній сумарній щільності частинок відбувається її перерозподіл між PF- і EF-поверхнями мембрани еритроцита залежно від стану тварини (рис. 11). Це свідчить про зміну характеру міжмолекулярних взаємодій в цитоскелет-мембранному комплексі: збільшення щільності ВМЧ на PF-поверхні, прилеглій до цитозолу, вказує на посилення взаємодії трансмембранних білків і цитоскелета еритроцитів у сплячої тварини.

Електрофоретичний аналіз білкового складу мембран еритроцитів ховрахів для трьох станів показав його якісну схожість з мембранами гомойотермів, проте кількісна оцінка свідчить, що в еритроцитах при ГС виявляється більше пов'язаних з мембраною цитоскелетних і цитозольних білків – спектрину, білка смуги 4.1, білка

смуги 8 (у 1,5 рази) і гемоглобіну (у 4,5 рази) і менше гліколітичного ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази.

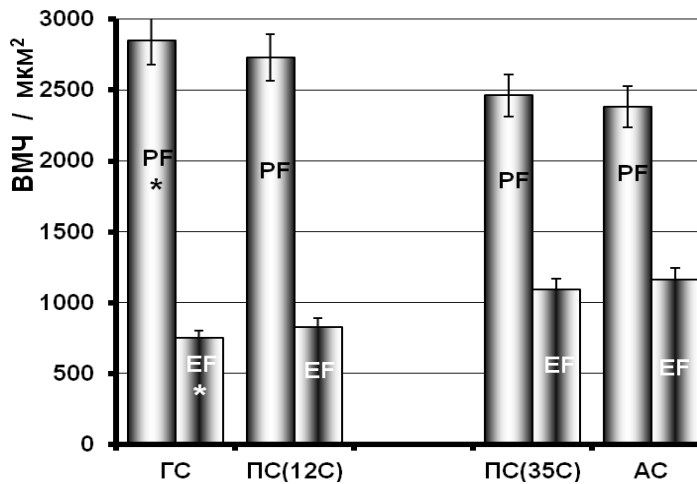


Рис. 11. Гістограма розподілу щільності ВМЧ на PF- і EF-поверхнях мембран еритроцитів ховрахів для ГС, ПС, АС ($n=10$, $p < 0,05$); * – достовірна відмінність у порівнянні з АС і ПС (35°C).

Підтвердженням модифікації цитоскелет-мембранних взаємодій можуть бути дані дослідження динамічного стану вільних ліпідів і власної триптофаної флуоресценції мембранних білків (рис. 12). Мембрана еритроцитів тварин при ГС характеризувалася підвищеною в порівнянні з АС мікров'язкістю ліпідів. Час кореляції обертальної рухливості спін-міченого в зоні полярної голівки амідів пальмітинової кислоти в 1,5 рази більше в еритроцитах ховрахів у ГС у порівнянні з еритроцитами тварин при АС і людини в діапазоні температур від 4 до 30°C . При $35\text{--}37^{\circ}\text{C}$ відмінності нівелювалися. Нижче $15\text{--}13^{\circ}\text{C}$ в обох станах ховрахів відмічена зміна енергії активації з різким загальмовуванням обертальної рухливості зонда, більш вираженим у активної тварини (рис. 12, а, стрілка). Варто відзначити, що стан ліпідів еритроцитів активного ховраха і людини розрізняється лише при температурах нижче вказаних.

Аналіз спектрів білкової флуоресценції дозволив встановити, що на відміну від еритроцитів ховрахів у АС, ПС і еритроцитів людини, для яких значення $\lambda_{\text{макс}}$ практично не залежало від температури в діапазоні $2\text{--}40^{\circ}\text{C}$ і складало в середньому $337\text{--}338\text{ нм}$ (рис. 12, б), для ГС при температурах нижче $15\text{--}20^{\circ}\text{C}$ спостерігалася короткохвильове значення $\lambda_{\text{макс}}$ ($325\text{--}327\text{ нм}$), що свідчить про більшу гідрофобність мікрооточення триптофанів. Вище $15\text{--}20^{\circ}\text{C}$ відбувався довгохвильовий зсув спектру, що вказує на зниження гідрофобності мікрооточення триптофанів мембранних білків, вочевидь у результаті розпушування останніх, і при $35\text{--}37^{\circ}\text{C}$ стан білків еритроцитів ховрахів при ГС «наближався» до такого при АС (рис. 12, б).

Дані з мікров'язкості бішару і стану білків еритроцитів ховрахів у стані сплячки вказують на те, що в інтервалі $4\text{--}37^{\circ}\text{C}$ є температурна область (біля 15°C), в

якій відбувається різка зміна енергії активації обертальної рухливості жирнокислотного зонда, стану мікрооточення триптофанових залишків мембранних білків (рис.12, стрілки) в такому мікрооточенні мембрани. При цих температурах спостерігалися довгі $\lambda_{\text{макс}}$ триптофанової флуоресценції мембранозв'язаних білків, тобто розгальмування оточення білкових триптофанових залишків, різке зниження мікрров'язкості в полярній області ліпідного бішару і перерозподіл ВМЧ, що може пояснюватися зміною прикріпленості спектрину при 15°C [Johnson R., 1978].

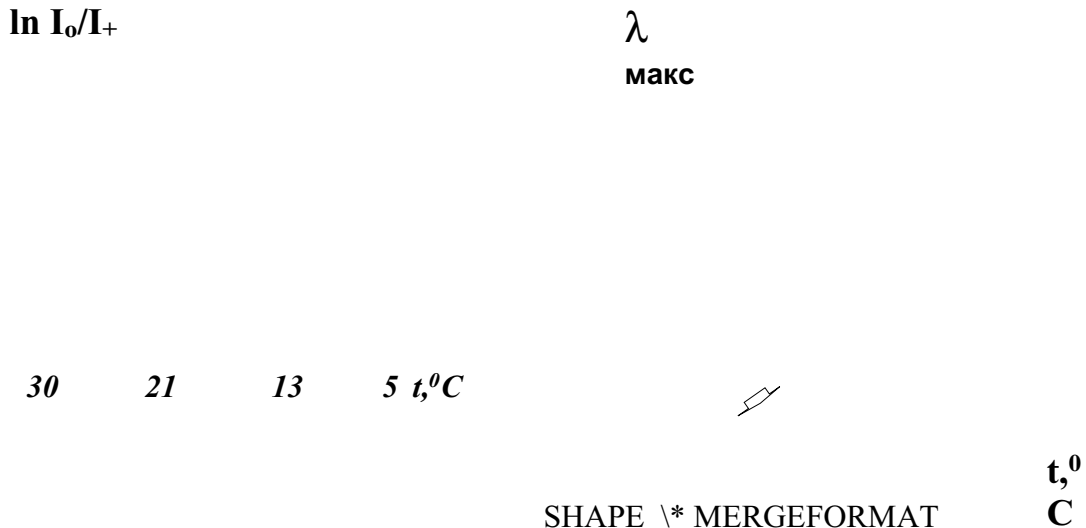


Рис. 12. Ареніусові залежності параметра рухливості жирнокислотного зонда (а) і температурні залежності $\lambda_{\text{макс}}$ триптофанової флуоресценції мембранозв'язаних білків (б) в мембранах еритроцитів ховрахів в сплячому (— □ —) і активному (— ● —) станах і людини (— Δ —).

Таким чином, перехід гетеротермної тварини із стану сплячки до активності супроводжується на рівні еритроцитів модифікацією термотропної поведінки мембранних білків і ліпідів, а також перерозподілом і агрегацією ВМЧ, що свідчить про зміну білок-білкових і білок-ліпідних взаємодій в мембрані еритроцитів. Це дозволяє припустити, що своєрідним швидкодіючим «регулювальником» структурно-функціонального стану еритроцитів гібернуючих ссавців є перебудова взаємодії цитоскелет-мембрана, а саме температурозалежна зміна прикріпленості цитоскелетних і цитозольних компонентів до інтегральних компонентів бішару.

З точки зору дії температурного чинника на клітини, умови їх гіпотермічного зберігання і знаходження в організмі сплячої тварини з температурою тіла біля 4°C мають багато спільного. Аналіз стану ультраструктури мембрани, цілісності і кислотної резистентності клітин гетеротермів у стані ГЗ свідчить про тривале збереження їх початкового рівня в процесі ГЗ. Порівняння ступеня збереження еритроцитів гомойо- і гетеротермного організмів при ГЗ виявило значні відмінності цілісності клітин вже після 4–5 доби ГЗ (рис. 13, а).

Зберігання еритроцитів тварин у ГЗ протягом 21-ї доби істотно не впливало на форму кислотної еритрограми (рис. 13, б). Незважаючи на зменшення середнього часу кислотної гемолізу, популяція еритроцитів мала значну (порівнянну з резистентністю клітин в АС в контролі) кислотну резистентність навіть після 21-ї

добі зберігання, що корелювало з високим морфологічним збереженням мембран еритроцитів гіbernатора при ГЗ.

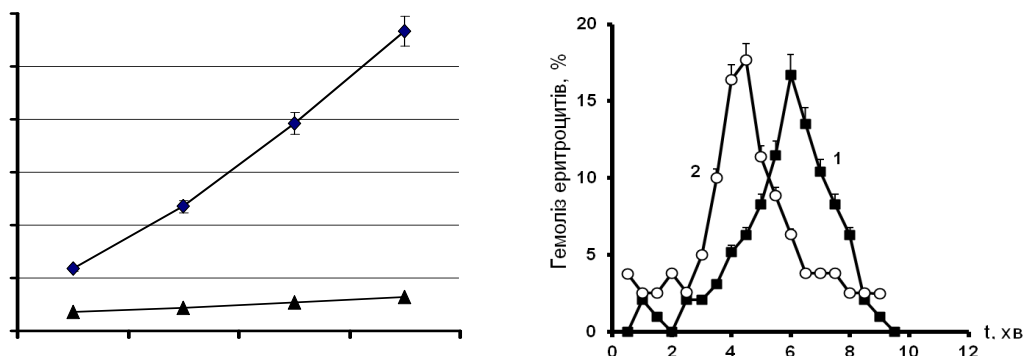


Рис. 13. Вплив ГЗ на гемолітичну і кислотну стійкість еритроцитів: а – ступінь збереження еритроцитів щура (—◆—) і сплячого ховраха (—▲—) при ГЗ; б – розподіл популяції еритроцитів сплячого ховраха за кислотною резистентністю (при 24°C) в нормі (1) і після 21-ї доби ГЗ (2).

Спостережувана нами найбільша кислотна резистентність еритроцитів тварини при ГС та ПС може бути пов'язана з явищем «закиснення» організму в період сплячки і на етапі пробудження і, як наслідок, адаптацією клітин гетеротермів до знижених значень рН.

Таким чином, еритроцити гетеротермної тварини при ГС, ПС і АС у зимовий період мали різну термотропну поведінку мембранних білків, мікров'язкість бішару в зоні полярних голівок ліпідів та її температурну залежність при 4–37°C, ультраструктурну характеристику мембран, а також стійкість еритроцитів до гіпотермічного зберігання і кислотного гемолізу. Ефективним підходом для виявлення відмінностей на клітинному рівні, пов'язаних із зміною фізіології гетеротерма, і порівняно з гомойотермами є дослідження температурних залежностей.

У главі 6 представлено дані дослідження водної дифузійної проникності мембран еритроцитів гетеро- і гомойотермних організмів, виявлено вплив пептиду «тригера сплячки» (1–10 кДа) на водний дифузійний обмін еритроцитів людини, а також оцінено водну проникність мембран еритроцитів людини і ховраха в області негативних температур. Загальноприйнятими параметрами, які характеризують процес дифузійного виходу води з клітини, є величина енергії активації E_a , коефіцієнт проникності мембрани для води L_p і час дифузійного обміну τ , які між собою зв'язані простим співвідношенням: $\tau = V/S L_p \pi_i$, де V і S – об'єм і площа поверхні клітини відповідно, π_i – осмотичний тиск фізіологічного розчину [Гордиенко Е.А., 1988]. Типові графіки Ареніуса, отримані для водного дифузійного обміну еритроцитів ховрахів, представлені на рис. 14.

Для еритроцитів ховраха в АС на графіках Ареніуса виявляються два інтервали температур: 6–10 і 22–30°C, в яких значення енергії активації (табл. 1) істотно відрізняються від даних літератури для гомойотермів, згідно з якими E_a водного обміну для еритроцитів людини складає 44–48 кДж/моль і близьке до

значення E_a для дифузії молекул води через ліпідні бішари [Гордиенко О. И., 1985; Benga G., 1987, 2001].

Рис. 14. Ареніусові залежності часу дифузії води через мембрану еритроцитів ховрахів: а – в АС (дані п'яти вимірів для трьох тварин (1,2,3); б – ГС і ПС (початковий етап – ПС-1, кінцевий – ПС-2).

Знижене значення E_a в інтервалі температур 22–30°C (10 кДж/моль) пов'язують із структурною «нестабільністю» мембрани еритроцитів, викликаною зміною її структурно-функціональних характеристик.

У стані гібернації залежність водного обміну в діапазоні 6–38°C апроксимується практично прямою із слабковираженим зломом в області температур близько 20°C і середніми значеннями E_a (23,3 і 25,4 кДж/моль) для температур більш і менш 20°C відповідно (рис. 14, б; табл. 1).

Таблиця 1

Значення енергії активації E_a водного дифузійного обміну мембран еритроцитів ховрахів при АС, ПС, ГС для різних інтервалів температур

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

Примітка: * – числові значення E_a є результатом вимірів часу водного дифузійного обміну τ для кожного стану тварин ($n=6$), виконаних впродовж 3-х сезонів гібернації.

У тварин у ПС встановлено відмінність характеру температурної залежності τ , яка була пов'язана з температурою тіла тварини при забої. При відносно монотонній залежності в області температур 6–30°C, яка більш характерна для ГС, виявлено різний кут нахилу кривих при 30–38°C.

Чисельні дослідження гіпометаболічного впливу пептидів «тригерів сплячки» на системи різного рівня організації гомойотермних організмів свідчать про широкий спектр їх дії [Игнатъев

Д.А., 1986, 1995, 2005; Storey K.B., 2010]. Нами визначено вплив фракції з м.м. 1–10 кДа та концентрацією 10–5 М на величину τ для еритроцитів донора (рис. 15). Показано, що присутність пептиду в клітинній суспензії призводить до зниження τ еритроцитів в середньому на 25–30 % у температурному інтервалі 6–27°C порівняно з контролем.

Дія пептиду мала дозозалежний характер і найбільшою мірою виявлялася при температурі 10°C у вигляді зникнення зламу на Ареніусовій залежності водного обміну та зниження величини енергії активації. При 22°C у всіх зразках спостерігалася зміна виду залежності у бік зменшення значень E_a . Цей факт добре узгоджується з результатами, отриманими на еритроцитах активного ховраха, для яких в області температур 22–30°C також спостерігалася зниження енергії активації. Додавання до клітин пептиду модифікувало і ультраструктуру мембрани, викликаючи чисельні

відхилення проходження площини сколювання, що характерно для ГС.

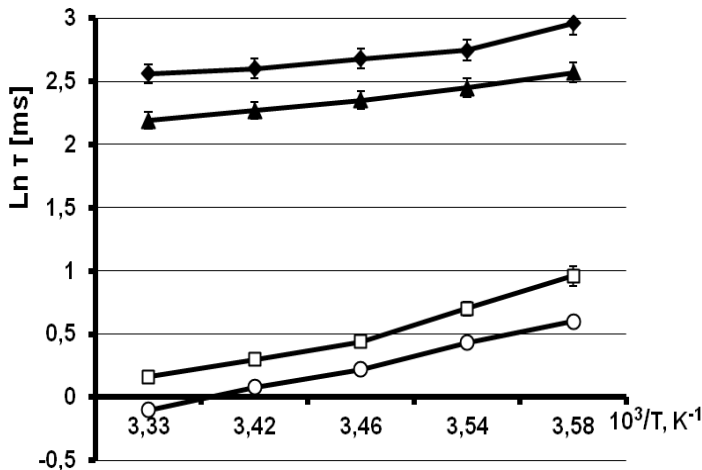
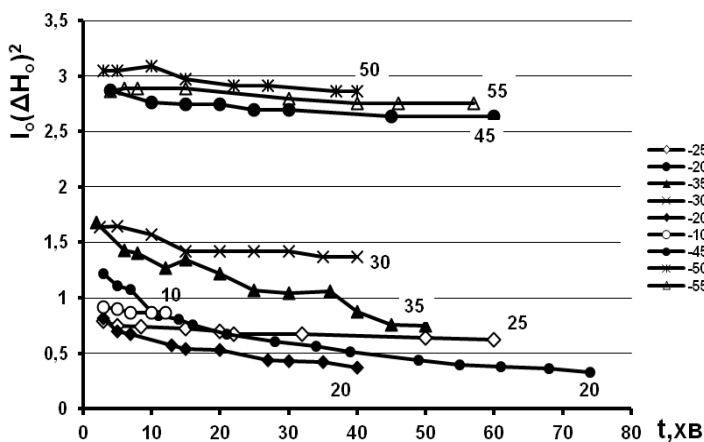


Рис.15. Ареніусові залежності часу водної дифузійної проникності мембрани еритроцитів активного (—□—) і гібернуючого (—○—) ховрахів, а також еритроцитів людини у контролі (—◆—) і в присутності пептиду (—▲—).

Таким чином, для гетеротермних організмів типовий інший характер температурних залежностей τ , ніж для гоміотермних [Гордиенко О.И., 1985; Жиликова Т.А., 1991], а величина τ на порядок (у 7–8 разів) менша, ніж для еритроцитів людини (рис. 15).

Дослідження процесів рекристалізації льоду і зневоднення клітин, які відбуваються на етапі температурної зупинки при двохступінчастому заморожуванні, дозволило оцінити водну проникність мембран еритроцитів людини і гібернуючих ховрахів при негативних температурах [Repin N.V., 2009] з урахуванням теоретичної моделі даного процесу [Гордиенко Е.А., 1994]. Ряд допущень при теоретичній оцінці (форма клітини близька до сферичної; середня кривизна поверхні кристалів позаклітинного льоду набагато більша, ніж внутрішньоклітинного; вода зовні і усередині клітини перебуває в термодинамічній рівновазі з поза- і внутрішньоклітинним льодом відповідно, що принципово не змінює реальну картину) дозволили, знаючи експериментальний час (t) розчинення внутрішньоклітинних кристалів льоду, оцінити коефіцієнт проникності мембрани L_p для води: $L_p \approx R_0 / \delta \Delta t$, де R_0 – радіус клітини δ – коефіцієнт поверхневого натягнення кордону кристал льоду–розплав. Враховуючи, що для еритроцитів людини $R_0 = 6$ м; $\delta = 2 \times 10^{-2}$ н/м²; $t = 2 \times 10^3$ с, отримаємо: $L_p \approx 0,5 \times 10^{-13}$ н–1м³с⁻¹. Аналогічно для еритроцитів ховраха, для яких $R_0 = 3 \times 10^{-6}$ м і $t \approx 6 \times 10^2$ с, отримаємо: $L_p \approx 10^{-13}$ н–1м³с⁻¹. Значення коефіцієнта проникності досить добре узгоджується з даними літератури для проникності ліпідних бішарів, це може бути підтвердженням «ліпідного» характеру проникності мембрани для води в області негативних температур.

Для оцінки процесу зневоднення клітин на етапі температурної експозиції в залежності від її умов (T ; t) нами проаналізовано деякі характеристики спектрів ЕПР водорозчинного спінового



зонда ТЕМПОН, у тому числі параметр $I_0(\Delta H_0)^2$, який свідчить про кількість зонда в клітині, де I_0 и ΔH_0 – амплітуда і ширина центральної компоненти спектра ЕПР відповідно (рис. 16).

Рис. 16. Залежність параметра $I_0(\Delta H_0)^2$ зонда ТЕМПОН в еритроцитах від часу експозиції

для різних температур.

Представлені на рис. 16 залежності вказують на зменшення цього параметра для інтервалу температур $-20 \div -35^{\circ}\text{C}$, що скоріш за все пов'язано з виходом зонду з клітини при її зневодненні. При температурах експозиції нижче -45°C значення $I_0(\Delta H_0)^2$ практично не змінювалося.

Таким чином, запропоновано методичний підхід для оцінки значення коефіцієнта проникності мембрани клітин для води при негативних температурах на підставі дослідження процесів внутрішньоклітинної кристалізації і зневоднення еритроцитів на етапі температурної зупинки ($-20 \div -30^{\circ}\text{C}$) при їх двохступінчастому заморожуванні і у якому тривалість експозиції на етапі зупинки може бути мірою зневоднення клітини.

У главі 7 представлено дані дослідження впливу різних умов тривалого ГЗ (волога камера і рідка фаза – живильне середовище 199) на ультраструктуру ізолюваних гепатоцитів, клітин печінки щурів у складі фрагментів і тканини плаценти. Визначена послідовність деградації клітинних органел у процесі зберігання. Передбачалося, що ГЗ в середовищі 199 дозволить підтримувати енергетичний баланс клітин і уникнути зневоднення клітин граничних шарів фрагментів печінки, яке зазвичай впливає на їх морфологічний статус.

Показано, що ізолювані гепатоцити протягом 24–36 годин ГЗ мали високий рівень збереження ультраструктури. У той же час починаючи з 36 і до 48 години ГЗ у клітинах спостерігалися везикуляція ЕПР і часткова фрагментація крист мітохондрій, розширення перинуклеарного простору і прояснення матриксу ядра, зменшення щільності цитоплазми, зникнення мембранних виростів, тобто зміни ультраструктури, які свідчать про порушення бар'єрної функції мембрани клітини і її гідратацію.

Короткострокове ГЗ (до 24 годин) фрагментів печінки в рідкій фазі забезпечувало вищий, ніж у вологій камері, рівень збереження ультраструктури клітин, що є свідченням оборотності спостережуваних змін. Починаючи з 48 годин аутолітичні процеси в тканині печінки у вологій камері розвивалися повільніше, ніж в рідкій фазі. Пролонгація термінів зберігання до 72 годин і більше приводила до часткової деструкції всіх клітинних компонентів тканини незалежно від умов зберігання.

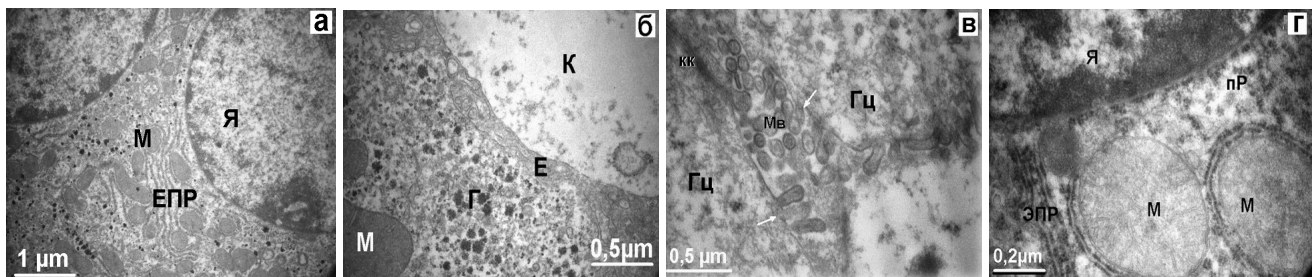


Рис. 17. Ультраструктура фрагмента двоядерного гепатоцита (а) і синусоїдального капіляра (б) після 24 годин ГЗ у середовищі 199; периферичні частини гепатоцитів (Гц), обернені в простір Діссе, (в) і фрагмент гепатоцита в зоні ядра після 48 годин ГЗ у вологій камері (г).

Для тканини плаценти характерні приблизно ті ж часові рамки високого ступеня збереження ультраструктури. Встановлено, що при ГЗ нативної і кріоконсервованої плаценти людини найбільш чутливою ланкою в субепітеліальному шарі на початковому (до 24 годин) етапі дії гіпотермії була капілярна мережа ворсин хоріона, що проявлялося наростанням ознак реактивності ендотелію. Строма ворсин меншою мірою піддавалась пошкодженню в порівнянні з

епітелієм через наявність в ній неклітинних елементів. Збільшення термінів ГЗ тканини плаценти до 2 діб приводило до вакуолізації і порушення цілісності клітин амніотичного епітелію, локального розширення базальної мембрани амніона, десквамації синцитіального шару і розпушуванню строми ворсин, а також до злипання ворсин хоріона, що свідчило про незворотність даних змін. Цикл заморожування-відігрівання у відсутності кріопротектора викликав порушення, які не сумісні зі збереженням життєздатності практично всіх елементів структури плаценти. Цей факт може бути використаний для отримання кріоекстрактів плаценти.

Таким чином, для ізольованих гепатоцитів, клітин у складі фрагментів печінки та плаценти існують однакові часові межі високого рівня збереження ультраструктури. За ступенем чутливості до дії гіпотермії внутрішньоклітинні органели розподілялися таким чином: мітохондрії > ендоплазматична мережа > ядерний апарат.

В главі 8 представлено результати дослідження ультраструктури і морфофункціонального стану клітин печінки зимосплячих ховрахів в різних фазах природного гіпобіозу і при тривалому гіпотермічному зберіганні її фрагментів. Наші дослідження і дані літератури свідчать про те, що як організм гетеротермів, так і виділені з нього тканини і клітини здатні тривалий час зберігати стійкість до ряду несприятливих чинників, у тому числі до знижених температур [Гаврилюк А. Т., 1983, Рєпин Н.В., 2008].

Проведені електронно-мікроскопічне дослідження і морфометричний аналіз гепатоцитів печінки ховрахів у трьох фізіологічних станах у період гібернації дозволили виявити відмінності ультраструктури клітин сплячої тварини від клітин тварин, які знаходяться в АС та ПС (табл. 2).

Таблиця 2

Морфометричні характеристики ультраструктури гепатоцитів ховрахів для різних фізіологічних станів

Морфометричні характеристики, %	Стан		
	АС	ГС	ПС
Об'ємна доля мітохондрій	20,4 ± 1,57	21,45 ± 1,63	19,84 ± 1,25
Об'ємна доля глікогену	1,91 ± 0,17	3,37 ± 0,21*	1,49 ± 0,11
Об'ємна доля шорсткого ЕПР	2,93 ± 0,23	3,87 ± 0,16*	2,91 ± 0,17
Об'ємна доля гладкого ЕПР	1,17 ± 0,13	2,41 ± 0,19*	1,48 ± 0,14

Примітка: * – достовірно у порівнянні з АС і ПС ($p < 0,05$).

У гепатоцитах сплячої тварини відносний об'єм глікогену майже в 2 рази перевищував цей показник у тварин в АС і ПС. Природно передбачити, що феномен накопичення глікогену в печінці пов'язаний з підтримкою життєво важливих функцій в стані тривалого заціпеніння і забезпеченням можливості епізодичного пробудження від сплячки. Про це свідчило значне зниження його об'єму відразу після пробудження. Збільшення об'ємних долей і збереження відносно високого співвідношення між шорстким і гладким ЕПР в стані глибокої сплячки свідчать про збереження високої потенційної можливості протікання синтетичних процесів у клітинах гібернаторів [Жегунов Г.Ф., 1988, 1993]. Для тварин у ГС у порівнянні з АС характерні наявність вираженого лізосомального апарату, великої кількості ліпідних крапель, а також значне ущільнення структури тканини печінки, що було результатом її зневоднення.

Нами проведена оцінка геометричних параметрів (S – площа; P – периметр; l_1 , l_2 – максимальний і мінімальний розміри відповідно, а також S/P – відношення площі до периметра) внутрішньоклітинних органел гепатоцитів для трьох станів тварин. Представлені на рис. 18 гістограми морфометричного аналізу компонентів ультраструктури гепатоцитів добре корелюють із спостережуваними якісними відмінностями в ультраструктурі цих клітин. Зокрема, збільшення долі конденсованого хроматину і підвищення щільності каріоплазми свідчили про зниження активності ядерного апарату, що є проявом реакції клітин на різні екстремальні дії [Шкурूपий В.Р., 1989; Покровский А. А., 1977]. Збереження у тварин в ПС розмірів ділянок гетерохроматину ядра на тому ж рівні, що і у тварини в ГС, свідчило про меншу значимість процесів, які

відбуваються в ядрі, ніж у цитоплазмі, при пробудженні і на перших етапах активності.

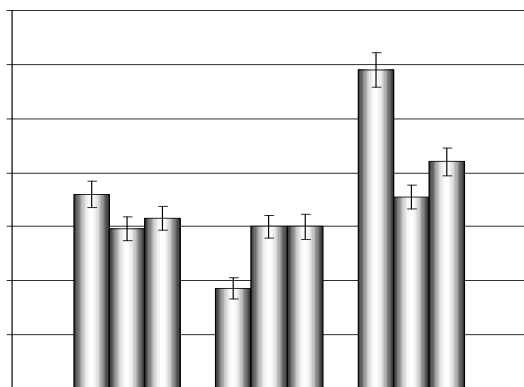


Рис. 18. Значення середньої площі мітохондрій (1), ділянок гетерохроматину ядра (2) і ЕПР (3) гепатоцитів ховрахів в АС, ГС, ПС.

Враховуючи, що при сплячці на тканини тварин впливає гіпоксія, ми проаналізували активність окислювально-відновлювальних

ферментів, які беруть участь у внутрішньоклітинних обмінних процесах у цитоплазмі і мітохондріях гепатоцитів тварин, при різних фізіологічних станах (табл. 3).

Таблиця 3

Активність окислювально-відновлювальних ферментів в умовних оптичних одиницях у клітинах печінки зимових ховрахів

Ферменти	Стан		
	АС	ГС	ПС
СДГ	89,3±1,03	74,3±1,37*	66,5±1,54*
ЛДГ	116,3±2,15	110,4±1,65	99,9±1,89*
α-ГФДГ	82,0±1,98	60,1±1,91*	91,1±2,22*
НАД	55,2±1,44	60,2±1,90	54,5±1,83
НАДФ	54,7±0,90	81,5±1,48*	60,9±1,74

Примітка: * – достовірна відмінність активності ферментів у порівнянні з іншими станами тварини ($p < 0,05$).

За результатами проведених морфологічних досліджень встановлено, що в гепатоцитах ховрахів у стані гібернації не виявлено будь-яких специфічних клітинних перебудов або структур, властивих саме стану сплячки. Проте, в сукупності зазначені відмінності (достовірне збільшення об'ємної долі гетерохроматину ядра, жирових включень і глікогену, зменшення середнього розміру мітохондрій при відповідному достовірному збільшенні їх кількості, поява великої кількості лізосомоподібних структур і часткова деструкція сітчастого апарату) створюють характерну саме для цього стану картину ультраструктури клітин, що підтверджується і даними щодо активності ферментних систем.

Структура клітин печінки гетеротермів при підготовці до сплячки і в стані сплячки зазнає ряд якісних і кількісних змін, які забезпечують можливість їх тривалого перебування і функціонування при гіпотермічних температурах. У зв'язку з цим, актуальним є питання про те, яким чином клітини гіbernаторів, адаптовані *in vivo* до гіпотермічних температур, реагуватимуть *in vitro* на тривале зберігання при 40С. Ми вивчили структурні перетворення клітин печінки зимосплячих ховрахів у трьох станах – ГС, ПС і АС, при ГЗ її фрагментів протягом від 6 годин до 10 діб.

До 24 години зберігання печінки тварин в усіх станах спостерігався високий ступінь збереження її структури. Проте після 4 діб зберігання для ультраструктури гепатоцитів ховрахів характерне якісне і кількісне наростання змін, найбільш виражених у тварин в АС і ПС (рис. 19). Для мітохондрій характерне збільшення площі в порівнянні з контролем, що підтверджує їх набрякання. У той же час дво- і трикратне зменшення середньої площі ЕПР свідчить про його фрагментацію і везикуляцію. Максимальний розмір ділянок гетерохроматину на 4-ту добу

зберігання визначався в гепатоцитах печінки активних тварин.

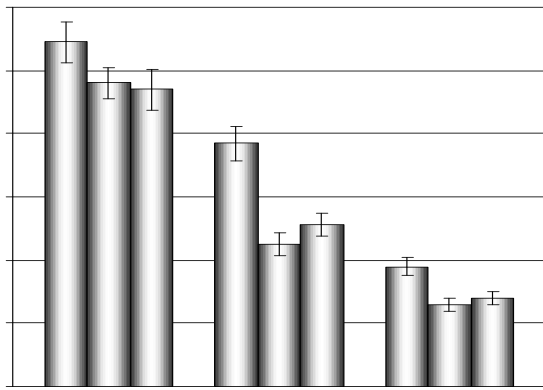


Рис 19. Значення середньої площі мітохондрій (1), ділянок гетерохроматину ядра (2) і ЕПР (3) гепатоцитів ховрахів для АС, ГС, ПС після 4 діб зберігання.

При більш тривалих термінах ГЗ в тканині печінки тварин у ГС спостерігалися втрата чіткості межі між гепатоцитами, нерівномірна щільність і поява початкових ознак вакуолізації

цитоплазми, а також зміна форми ядра, що свідчило про істотну внутрішньоклітинну деструкцію, яка значною мірою пов'язана з вирівнюванням осмотичних градієнтів і, як наслідок, набряканням клітин.

Таким чином, на відміну від клітин гомойотермних організмів, у яких виражені зміни спостерігалися після 24 годин ГЗ, клітини гетеротермів зберігали відносно стійку ультраструктуру протягом більш тривалих термінів зберігання: до 48 годин у тварин в АС та ПС і до 4 діб у ГС. За ступенем стійкості до ГЗ внутрішньоклітинні органели розташовувалися таким чином: мітохондрії $\leq$ ендоплазматичний ретикулум $<$ ядерний апарат.

В главі 9 представлено результати порівняльного аналізу морфологічного стану ізолюваної і перфузованої (4°C) печінки щурів після ГЗ протягом 1 і 24 годин у середовищах, які містили сахарозу (СС), маніт (МС, рН 5,4) і в середовищі UW, а також після її нормотермічної реперфузії (НТРП). Відповідно до викладеного вище (див. гл. 4), ГЗ еритроцитів в слабкоелектролітних середовищах із зниженим значенням рН, викликаючи незначне набрякання клітин, забезпечувало проте високий рівень збереження їх форми, а також практично повне її відновлення при перенесенні клітин у фізіологічні умови. Цей факт свідчить про можливість використання середовищ із зниженою кислотністю для короткострокового гіпотермічного зберігання ізолюваної печінки.

Аналіз морфологічного стану різних ділянок печінки показав, що короткострокове (1-годинне) ГЗ ізолюваної печінки у трьох середовищах зберігало на досить високому рівні її біохімічні і основні морфологічні характеристики: трабекулярну будову печінкових часточок, ультраструктуру гепатоцитів і ендотелію синусоїдів. Стінки центральної вени і судин зони триад, а також сполучнотканинні прошарки мали лише незначне розпушування і вакуолізацію. У СС в деяких клітинах спостерігалися дифузна гомогенізація мітохондрій та їх агрегація в конгломерати.

Нормотермічна реперфузія печінки після 1 години ГЗ в СС істотно не впливала на структуру клітин печінкової паренхіми, тоді як в мікроциркуляторному руслі органа відбувалися значні реактивні зміни.

Після 24 годин ГЗ печінки в СС та подальшої НТРП відмічено збільшення структурних пошкоджень гепатоцитів і синусоїдальних клітин. Незважаючи на збереження балочної структури печінкової часточки, гетерогенність форми і зміни ультраструктури гепатоцитів були більш виражені. У деяких гепатоцитах зміни мали дистрофічний характер, який виявлявся в порізаному контурі ядра, наявності в цитоплазмі не лише просвітлень, але й великої кількості крупних вакуолей. Нормотермічна реперфузія після 24 годин ГЗ призводила до значного погіршення ультраструктури всіх клітинних компонентів тканини печінки, що дає підставу вважати цей строк критичним для зберігання цілого органа в СС. Збільшення структурних пошкоджень клітин в умовах гіпотермії і реперфузії є віддзеркаленням біохімічних порушень, які виникають в клітинах. Рівень звільнення ряду цитоплазматичних ферментів є індексом, що характеризує цілісність клітинних мембран і залежить від ступеня пошкодження клітин.

Аналіз елімінації цитозольних ферментів у розчин НТРП показав, що 24-годинне ГЗ ізольованої печінки шурів в СС приводить до збільшення активності ферментів ЛДГ і АсАТ майже в 2 рази, а АЛАТ – в 4 рази в порівнянні з 1-годинним зберіганням органа в таких же умовах (табл. 4).

Таблиця 4

Активність цитоплазматичних ферментів у перфузаті після ГЗ печінки в СС

Фермент	1 година ГЗ	24 години ГЗ
АсАТ	$3,4 \pm 0,3$	$7,3 \pm 1,6^*$
АЛАТ	$1,9 \pm 0,3$	$7,9 \pm 1,0^*$
ЛДГ	$18,1 \pm 2,1$	$30,1 \pm 3,6^*$

Примітка: * – достовірно в порівнянні з 1-годинним зберіганням, ($p < 0,05$)

У середовищах UW і МС після 1 години ГЗ і подальшої НТРП також спостерігалися збереження синусоїдів і трабекулярної будови печінкових часточок, цілісність гепатоцитів. Ознаки аутолітичних пошкоджень клітин були відсутні. Лише у місцях сильного розширення синусоїдів виявлялася незначна зміна балочної структури. Глікоген, в значній кількості присутній у гепатоцитах в МС, був практично відсутній в них при зберіганні в UW. У просторі Діссе спостерігався нормальний розподіл мікроворсинок в середовищі UW, тоді як в МС їх було значно менше і вони були коротші.

Після 24 годин ГЗ ізольованої печінки в МС і UW та НТРП збільшувалися структурні пошкодження гепатоцитів і клітин синусоїдів у порівнянні з реперфузією після 1 години ГЗ.

Для даних середовищ на відміну від СС в ультраструктурі клітин не спостерігалися значне збільшення долі конденсованого хроматину, надмірне набрякання, гомогенізація мітохондрій і дезорганізація їх крист, фрагментація, вакуолізація і розширення цистерн ЕПР – ознак, які зазвичай пов'язують із зниженням активності і порушенням ядерного апарату і клітини в цілому. Ряд відмінностей (структура ЕПР, рівень глікогену, число мікроворсинок і т. п.) структури тканини печінки після 1 і 24 годин ГЗ в МС і UW та подальшої НТРП, на наш погляд, в значній мірі визначались рН середовища зберігання.

Таким чином, пролонгація до 24 годин ГЗ печінки приводить до більш виражених змін в структурі всіх клітинних компонентів тканини, що унеможливорює (обмежує) їх репарацію на етапі реперфузії і є критичним терміном для відновлення їх функцій після НТРП.

ВИСНОВКИ

У дисертації на основі теоретичного і експериментального моделювання із залученням електронно-мікроскопічних методів і оптичної мікроскопії, а також біофізичних методів проведено комплексне дослідження структурно-функціонального стану об'єктів різного рівня організації (мембрана–клітина–тканина–орган) гомойо- і гетеротермних організмів в інтервалі температур 4–38°C, при тривалому гіпотермічному зберіганні в середовищах із різним складом і значенням рН та заморожуванні. Експериментально (на морфологічному рівні) обґрунтована ефективність використання розчинів низької іонної сили з манітолом і зниженим значенням рН для перфузії органів і як основи середовищ для зберігання клітин.

1. Встановлено взаємозв'язок між морфологічним станом еритроцитів людини, їх осмотичною стійкістю і ступенем пошкодження залежно від фізико-хімічних характеристик середовища експозиції та при гіпотермічному зберіганні. В процесі ГЗ (1–21 доба) ступінь пошкодження еритроцитів в слабкоелектролітних середовищах достовірно нижчий, а їх осмотична стійкість вища в порівнянні з електролітними. Незалежно від іонної сили середовища при кислих значеннях рН спостерігалися максимальне збереження форми і мінімальна осмотична стійкість еритроцитів. Найбільш стійкою до дії чинників середовища була ехіноцитарна форма клітин. Встановлено, що між 10 і 14-ю добою зберігання відбувалися розпушування структури глікокаліксу і його відшарування від мембрани.

2. В ході сфероехіноцитарної трансформації при ГЗ еритроцит в результаті відшарування везикул втрачав до 30 % мембранної поверхні. Для ехіноцитів III і IV ступенів кренування діаметр спікул складав 435 ± 43 і 257 ± 37 нм, а розмір везикул, які відокремилися, – 495 ± 87 і 348 ± 65 нм відповідно. Діаметр спікул в місцях їх потоншення в середньому дорівнював 137 ± 25 нм; кількість спікул на поверхні сфероехіноцитів складала 35–89 на одну клітину і в середньому – 60 спікул.

3. Максимум втрати внутрішньоклітинного K^+ спостерігався протягом першої доби ГЗ еритроцитів за всіх експериментальних умов, за винятком натрієвого середовища з рН 5,4, для якого відзначався високий (92%) відносно контролю рівень вмісту внутрішньоклітинного K^+ . У слабкоелектролітних середовищах спостерігалася більш динамічна втрата внутрішньоклітинного K^+ . Вихід K^+ з еритроцитів та їх форма безпосередньо не корелювали між собою, оскільки форма клітин протягом 1-ї доби відповідала контролю, за винятком слабкоелектролітних середовищ при рН 8,6

4. Зниження температури еритроцитів із порушенням спектрином (термоденатурація) до $4^\circ C$ викликає необоротні зміни їх морфології, які виявляються у везикуляції і фрагментації. Спостережуваний при цьому розподіл ВМЧ у вигляді безперервної мережі (аналогічно спектриновій мережі цитоскелета) свідчить про посилення спорідненості трансмембранних білків і молекул термоденатурованого спектрину. Встановлено загальні закономірності процесу везикуляції еритроцитів, викликаного тривалим ГЗ і гіпертермією.

5. Перехід гетеротермів із стану активності до гібернації супроводжується термоіндукованими короткохвильовим зсувом спектра флуоресценції білків мембран еритроцитів (на 10–12 нм), підвищенням в 1,5 рази параметра мікрров'язкості бішару в зоні полярних голівок ліпідів, зміною морфології і перерозподілом ВМЧ, а також підвищенням стійкості еритроцитів до тривалого гіпотермічного зберігання і кислотного гемолізу. Особливою областю температур для еритроцитів сплячої тварини є $15\text{--}20^\circ C$; підвищення температури клітин до $37^\circ C$ наближає досліджені параметри мембрани до значень, характерних для тварини в активному стані. Ефективним підходом для виявлення відмінностей, пов'язаних із зміною фізіології гетеротермів, і порівняно з гомойотермами, виявилися дослідження температурних залежностей.

6. Вперше встановлено час водного дифузійного обміну (τ) мембран еритроцитів гетеротермів і показано, що Ареніусова залежність τ для мембран еритроцитів ховраха в сплячому стані, на відміну від гомойотермних організмів, має вигляд прямої, а величина τ на порядок (у 7–8 разів) менша, ніж у еритроцитів людини. Значення енергії активації процесу перенесення молекул води через мембрану еритроцитів ховрахів не перевищують 30 кДж/моль в інтервалі температур $6\text{--}38^\circ C$.

7. Вперше показано, що додавання до еритроцитів людини пептиду «тригера сплячки» з м.м. 1–10 кДа модифікує структуру їх мембрани і призводить до зменшення часу водного дифузійного обміну. Найбільший ефект зниження τ (на 25–30 %) спостерігався в температурному інтервалі $6\text{--}27^\circ C$ при кінцевій концентрації розчину пептиду 6×10^{-7} М. У присутності менших (3×10^{-7} М) і більших (5×10^{-6} М) концентрацій ефект зниження τ дорівнював 18–20 і 6–8 % відповідно. За ступенем проникності мембрани для води еритроцити людини (Л) і гетеротермів у трьох фізіологічних станах розподілилися таким чином: ГС > ПС > АС > Л.

8. Вперше проведено морфологічне дослідження процесів рекристалізації внутрішньоклітинного льоду і зневоднення еритроцитів людини і гетеротермів на етапі температурної зупинки ($-20\text{--}-30^\circ C$) і оцінено коефіцієнт проникності їх мембрани для води в області негативних температур, значення якого дорівнює $0,5 \times 10^{-13} \text{н--} 1 \text{м}^3 \text{с}^{-1}$ для еритроцитів донора і $10\text{--}13 \text{н--} 1 \text{м}^3 \text{с}^{-1}$ для еритроцитів зимосплячих ховрахів.

9. Експериментально обґрунтовано, що ГЗ фрагментів печінки в рідкій фазі (живильне середовище) забезпечує вищий, в порівнянні з вологою камерою, рівень морфологічного збереження клітин. Це дозволяє рекомендувати даний спосіб для короткострокового (1–24 години) зберігання фрагментів тканини і органа. Стан ультраструктури клітин свідчить про оборотність спостережуваних змін. При ГЗ протягом 24–48 годин у вологій камері зміни в тканині печінки протікали повільніше, ніж в рідкій фазі. Пролонгація термінів зберігання до 72 годин призводила

до часткової деструкції всіх клітинних компонентів тканини, незалежно від умов зберігання. По мірі стійкості до дії гіпотермії внутрішньоклітинні органели гепатоцитів гомойотермних організмів розподілилися таким чином: мітохондрії < ендоплазматична мережа < ядерний апарат.

10. Порівняльне дослідження тканин різного структурно-функціонального стану та походження показало, що як для ізольованих гепатоцитів, так і для клітин у складі фрагментів печінки та плаценти існують приблизно однакові (24 години) часові рамки високого рівня збереження ультраструктури та послідовності і закономірності зміни ультраструктури внутрішньоклітинних органел при тривалому гіпотермічному зберіганні.

11. Морфометричний і електронно-мікроскопічний аналіз гепатоцитів зимосплячих ховрахів виявили істотні відмінності ультраструктури клітин тварини при ГС на відміну від АС і ПС: зростання в 1,6 рази об'ємної долі гетерохроматину ядра та в 2 і 2,4 рази – глікогену і жирових включень; зменшення середнього розміру мітохондрій при відповідному достовірному збільшенні їх кількості, а також поява більшої кількості лізосомоподібних структур і часткова деструкція сітчастого апарату. Відмічені структурні зміни корелюють з даними щодо активності ключових ферментів у печінці сплячих тварин: спостерігалось достовірне (в 1,22 і 1,37 рази) зниження активності СДГ і α -ГФДГ і зростання (в 1,15 і 1,48 рази) активності НАДФ-, НАД-ферментів.

12. Встановлено, що клітини печінки гетеротермів при ГЗ мали високий рівень збереження ультраструктури до 48 годин у тварин в АС та ПС і до 4 діб у ГС на відміну від клітин гомойотермних організмів, у яких виражені зміни спостерігалися після 24 годин гіпотермічного зберігання. За ступенем стійкості до дії гіпотермії внутрішньоклітинні органели гепатоцитів гетеротермів розподілилися таким чином: мітохондрії < ендоплазматична мережа < ядерний апарат.

13. Вперше показано, що короткострокове (1 година) гіпотермічне зберігання ізольованої печінки у слабкоелектролітних із зниженим значенням рН середовищах і подальша нормотермічна реперфузія (НТРП) забезпечують високий (аналогічний середовищу UW) рівень збереження морфологічних і біохімічних характеристик органа, що свідчить про перспективність використання даних середовищ для ГЗ. Показано, що 24-годинне зберігання в даних середовищах є критичним терміном відновлення функції печінки після НТРП.

Список опублікованих праць за темою дисертації

1. Репин Н. В. Ультраструктурные и динамические характеристики мембран эритроцитов. Влияние физиологического состояния и температуры / Н. В. Репин, С. В. Репина // Цитология. – 1990. – Т. 32, № 11. – С. 1094–1098.
2. Репин Н. В. Ультраструктура мембран эритроцитов зимоспящих сусликов при различных физиологических состояниях и температурах / Н. В. Репин, С. В. Репина // Влияние охлаждения на биологические объекты: Сб. науч. труд. – Харьков, 1990. – С. 125–130.
3. Репин Н. В. Влияние температуры и физиологического состояния суслика на ультраструктуру мембран эритроцита / Н. В. Репин, С. В. Репина // Протокриобиологические процессы у организмов: Сб. науч. труд. – Якутск, 1990. – С. 125–134.
4. Репин Н. В. Ультраструктура гепатоцитов зимоспящего суслика в состоянии гибернации, пробуждения и бодрствования / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха // Прикладные и фундаментальные проблемы криобиологии: Сб. науч. трудов. – Харьков, 1993. – С. 39–43.
5. Козлова В. Ф. Морфофункциональное состояние печени при естественном гипобиозе / В. Ф. Козлова, Т. П. Говоруха, Н. В. Репин // Пробл. криобиол. – 1994. – № 4. – С. 27–31.
6. Репин Н. В. Водная диффузионная проницаемость мембран эритроцитов зимоспящих сусликов *Citellus undulatus* / Н. В. Репин, В. И. Шейкин // Пробл. криобиол. – 1996. – № 1. – С. 41–46.
7. Особенности морфофункционального состояния организма гетеротермных животных в цикле гибернация–пробуждение / В. Ф. Козлова, Т. Н. Юрченко, Н. В. Репин, М. И. Щетинский // Пробл. криобиол. – 1998. – № 2. – С. 32–38.

8. Repin N. V. Erythrocyte membrane skeleton: a putative participator of adaptive cellular response to temperature variation / N. V. Repin, S. V. Repina // *J. Cell. Mol. Biol. Letters*. – 1998. – V. 3, № 2. – P. 196–197.
9. Кварцевый термопреобразователь ДАП.ТЦ-05 для устройств регулирования температуры / Н. В. Репин, В. Ф. Солодовник, С. В. Репина, М. И. Чебан // *Пробл. криобиол.* – 2001. – № 4. – С. 52–55.
10. Морфологические изменения ткани плаценты после ее гипотермического хранения / Н. В. Репин, О. М. Цупиков, Т. П. Говоруха, Т. Н. Юрченко // *Пробл. криобиол.* – 2002. – № 2. – С. 30–33.
11. Влияние длительности хранения ткани плаценты при +4 0С на ультраструктуру ворсинчатого хориона / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха, О. М. Цупиков, Т. Н. Юрченко // *Пробл. криобиол.* – 2002. – № 4. – С. 80–85.
12. Репин Н. В. Характер трансформации формы эритроцитов при их охлаждении *in vivo* и *in vitro* / Н. В. Репин // *Актуальные проблемы медицины и биологии: Сб. научн. трудов.* – Киев, 2004. – № 1. – С. 190–194.
13. Динамика ультраструктурных изменений клеток печени при различных условиях длительного гипотермического хранения ее фрагментов / Н. В. Репин, Л. Н. Марченко, Т. П. Говоруха, Т. Н. Юрченко // *Світ медицини та біології.* – 2005. – № 3. – С. 60–64.
14. Репин Н. В. Структурные перестройки в клетках и их мембранах при длительном гипотермическом хранении / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха // *Пробл. криобиол.* – 2005. – Т. 15, № 4. – С. 630–635.
15. Говоруха Т. П. Структурные изменения деконсервированной плаценты при гипотермическом хранении / Т. П. Говоруха, Л. Н. Марченко, Н. В. Репин // *Пробл. криобиол.* – 2006. – Т. 16, № 2. – С. 176–181.
16. Морфологические и биохимические признаки повреждения печени при гипотермическом хранении в сахарозо-содержащем растворе / Н. В. Репин, Е. Н. Ткачева, О. А. Семенченко, Л. Н. Марченко, А. Ю. Петренко // *Експериментальна і клінічна медицина.* – 2006. – № 3. – С. 51–56.
17. Кирошка В. В. Морфологические изменения эритроцитов при действии адреналина и 1,2-пропандиола / В. В. Кирошка, Н. В. Репин, В. К. Дворцовой // *Український журнал гематології та трансфузіології.* – 2008. – № 1. – С. 32–36.
18. Repin N. V. Temperature-induced transformation of mammalian red blood cells during hyperthermia / N. V. Repin, E. N. Bobrova, S. V. Repina // *J. Bioelectrochem.* – 2008. – V. 73. – P. 101–105.
19. Репин Н. В. Влияние длительности гипотермического хранения на ультраструктуру гепатоцитов сусликов при зимней спячке. Из гибернации в гипотермию / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха, Л. Н. Марченко // *Науковий вісник НАУ.* – 2008. – № 126. – С. 108–112.
20. Repina S. V. Peculiarities of RBCs resistance to acid hemolysis in hibernating mammals / S. V. Repina, N. V. Repin // *J. Bioelectrochem.* – 2008. – V. 73. – P. 106–109.
21. Репина С. В. О клеточных механизмах регуляции природного гипобиоза / С. В. Репина, О. А. Нардид, Н. В. Репин // *Науковий вісник НАУ.* – 2008. – № 126. – С. 113–119.
22. Репин Н. В. Значение факторов среды хранения в обеспечении устойчивости эритроцитов к длительной гипотермии / Н. В. Репин, В. В. Кирошка // *Биофизика живой клетки.* – 2008. – Т. 9. – С. 108–109.
23. Репин Н. В. Анализ морфологии эритроцитов и их устойчивости в зависимости от pH и ионной силы среды в условиях гипотермического хранения / Н. В. Репин, В. В. Кирошка, О. И. Головкин // *Пробл. криобиол.* – 2009. – Т. 19, № 1. – С. 10–17.
24. Репин Н. В. Морфология изолированной печени крыс после нормотермической реперфузии и гипотермического хранения в средах различного состава / Н. В. Репин // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2009. – Вип. 2. – С. 183–188.
25. Репин Н. В. Характер трансформации формы эритроцитов в зависимости от ионной силы и pH среды экспозиции / Н. В. Репин, В. В. Кирошка // *Український журнал гематології та*

трансфузіології. – 2009. – № 2. – С. 27–31.

26.Боброва Е.Н. Влияние ряда проникающих криопротекторов на морфологическое состояние эритроцитов кордовой крови/ Е.Н. Боброва, Н.В. Репин, А.В. Зинченко // Вісник проблем біології і медицини. –2009. – Вип. 3. – С. 113–119

27.Repin N. V. To the question about two-step rapid freezing method. Estimation of aqueous membrane permeability in erythrocytes at temperature exposure stage / N. V. Repin // CryoLetters. – 2009. – № 4. – P. 251–261.

28.Репин Н. В. Структурно–функциональное состояние печени гетеротерма *Citellus undulatus* в различных фазах зимней спячки / Н. В. Репин // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип. 1. – С. 32–35.

29.Плацента: криоконсервирование, структура, свойства и перспективы клинического применения / Под общей редакцией В.И.Грищенко, Т.Н. Юрченко. – Х: СПД ФЛ Бровин А.В.– 2011.– 292 с.

30.Репин Н. В., Юрченко Т. Н. Роль факторов среды и длительности экспозиции при 4°C в сохранении формы эритроцитов и их мембраны. Механизм везикулообразования / Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / под ред. А. Н. Гольцева. – Харьков, 2012.– С. 165–206.

31. Репин Н.В., Юрченко Т.Н. Достижения криобиологии в решении задач долгосрочного хранения клеток и тканей / Криотерапия: безопасные технологии применения: сборник научных работ // Под общ. ред. проф. О.А. Панченко. – Киев: КВИЦ, 2012. – С. 146–153.

32.А.с. 1157597 МКИ G 01N 1\06. Устройство для скалывания биологических объектов в вакууме /Н.В. Репин, А. Вайсман, Б.А.Скорняков, В.П.Храмцов (СССР).– № 3674913; заявл. 13.12.83; опуб. 22.01.85, БИ.- ¹ 9.- С.154.: ил.

33.Изучение процессов кристаллообразования в клетках при изотермическом выдерживании / Н.В. Репин, Т.Н. Юрченко, Б.А. Скорняков, В.И. Страна // Криогенные методы в элетронной микроскопии: Тез. докл. Всесоюз. симп.– Пущино, 1985.– С. 89–93.

34.Репин Н. В. Электронно-микроскопическое исследование гепатоцитов зимоспящих сусликов после гипотермического хранения / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха // Электронная микроскопия и современная технология: IV Респуб. конф. по электронной микроскопии: тез. докл. – Кишинев, 1990. – С. 137.

35.Репин Н. В. Ультраструктурные изменения в мембранах эритроцитов гомойо- и гетеротермных организмов при длительном гипотермическом хранении / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха // Электронная микроскопия и современная технология: IV Респуб. конф. по электронной микроскопии: тез. докл. – Кишинев, 1990. – С. 150.

36.Repin N. V. Ultrastructural changes in RBC membranes of hetero- and homiothermal organisms under long-term hypothermal storage / N. V. Repin, T.P. Govorukha // Society for cryobiology 28-th annual Meeting: Abstracts. – Leuven, 1991. – P. 94.

37.Репин Н. В. Ультраструктура клеток зимоспящих сусликов при длительном гипотермическом хранении / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха // Успехи современной криобиологии: II Междунар. конф.: тез. докл. – Харьков, 1992. – С. 156.

38.Репин Н. В. Ультраструктурные и функциональные особенности мембран эритроцитов зимоспящих сусликов / Н. В. Репин, В. В. Шейкин // XIV конф. по электронной микроскопии: тез. докл. – Черноголовка, 1992. – С. 158.

39.Репин Н. В. Структурные перестройки в эритроцитах зимоспящих сусликов / Н. В. Репин, С. В. Репина // Успехи современной криобиологии: II Междунар. конф.: тез. докл. – Харьков, 1992. – С. 157.

40.Repin N. V. Role of skeletal Proteins in RBC membrane response to temperature treatment / N. V. Repin, S. V. Repina // Society for cryobiology 30th annual meeting: Abstr. – Atlanta, 1993. – P. 144.

41.Repin N. V. Water diffuse permeability of red blood cell membranes of hibernating ground squirrels: structure and function / N. V. Repin, S. V. Repina, V. I. Sheykin // Society for cryobiology 31th annual meeting: Abstracts. – Kyoto, 1994. – P. 31.

- 42.Репін М. В. Температурозалежні морфологічні та функціональні особливості мембран еритроцитів зимосплячих ховрахів / М. В. Репін, Т. П. Говоруха, В. І. Шейкін // 1 з'їзд Українського біофізичного товариства: тези. – Київ, 1994. – С. 197.
- 43.Репин Н. В. Особенности проницаемости для воды мембран эритроцитов зимоспящих сусликов *Citellus undulatus* / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха, Е. А. Крылова // 1 з'їзд Українського товариства кріобіології і кріомедицини: Сб. науч. пр. – Харків, 1995. – С. 210–211.
- 44.Repin N. V. Effect of "hibernation triggers" peptides on aqueous diffusive exchange of donor's erythrocytes / N. V. Repin, T. N. Ynrchenko, T. P. Govorukha et al // "Cryo-96" Society for cryobiology 33th annual meeting: Abstracts. – Indianapolis, 1996. – P. 136.
- 45.Repin N. V. Structural rearrangments peculiarities in erythrocytes membranes of homoio- and heterothermic animals during temperature decrease / N. V. Repin, S. V. Repina, M. I. Schetinsky // 5 th International Conference on Tissue Banking: Abstracts. – Berlin, 1996. – P.38.
- 46.Водная диффузионная проницаемость мембран эритроцитов гомойо- и гетеротермных организмов. Связь структуры и функции / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха, В. Ф. Козлова, Т. Н. Юрченко // Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем: 3 съезд Белорус. Общества фотобиологов и биофиз.: тез. докл. – Минск, 1998. – С. 143.
- 47.Репін М. В. Деякі особливості проникності для води мембран еритроцитів зимосплячих ховрахів / М. В. Репін, С. В. Репіна // II з'їзд Українського біофізичного товариства: тези допов. – Харків, 1998. – С. 196.
- 48.Структурно-функциональная характеристика клеток, тканей и органов гетеротермов в различные фазы баутов / Т. Н. Юрченко, В.Ф. Козлова, Н. В. Репин, Т.П. Говоруха, Е.П. Жуликова // Актуальні питання морфології: II Національн. конгр. АГЕТ України: тез. доп. – Луганск, 1998. – С. 269–270.
- 49.Структурные перестройки и проницаемость для воды мембран эритроцитов зимоспящих сусликов *Citellus undulates* / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха, В. Ф. Козлова, Т. Н. Юрченко // Физиологические механизмы природных адаптаций: Междунар. симп.: тез. докл. – Иваново, 1999. – С. 132.
- 50.Repin N. V. The structural changes in cells and tissues under hypothermic storage / N. V. Repin, T. P. Govorukha, V. F. Kozlova // 36th Ann. Meeting of the society for Cryobiology "Cryo – 99": Abstracts – Marseille, 1999. – P. 166.
- 51.Репин Н. В. Структурные перестройки и проницаемость для воды мембран эритроцитов зимнеспящих сусликов *Citellus undulates* / Н. В. Репин, Т. П. Говоруха, Т. Н. Юрченко // Пробл. кріобіол. – 2001. – № 3. – С. 25.
- 52.Repin N. V. Formation of erythrocyte adaptive reactions is this one more function of membrane skeleton? / N. V. Repin, S. V. Repina // III з'їзд УБФТ, 8-11 жовтня 2002 р.: тези доп. – Львів, 2002. – С. 90.
- 53.Repina S. V. The structural rearrangements in erythrocyte membrane: adaptive function of membrane skeleton / S. V. Repina, N. V. Repin // 15th Meeting of the European Association for Red Cell Research, 21-25 April 2005: Abstracts. – Murten, Switzerland, 2005. – P. 73.
- 54.Repin N. V. Water membrane permeability during a rapid two-step cell freezing / N. V. Repin, S. V. Repina // 15th Meeting of the European Association for Red Cell Research, 21-25 April 2005: Abstracts. – Murten, Switzerland, 2005. – P. 74.
- 55.Репин Н. В. Термоиндуцированная трансформация эритроцитов млекопитающих в условиях гипертермии / Н. В. Репин, Е. Н. Боброва // IV з'їзд Українського біофізичного товариства: тези допов. – Донецк, 2006. – С. 86–87.
- 56.Repin N. V. Temperature-induced transformation of mammalian red blood cells during hyperthermia / N. V. Repin, E. N. Bobrova, S. V. Repina // 16th Meeting of the European Association for Red Cell Research, 16-19 March 2007: Abstracts. – Oxford, England, 2007. – P. 23.

57. Kiroshka V. Morphological changes in human red blood cells in vitro under the action of epinephrine and 1,2-propanediol / V. Kiroshka, N. Repin, V. Dvortsevoy // 16th Meeting of the European Association for Red Cell Research, 16-19 March 2007: Abstracts. – Oxford, England, 2007. – P. 6.
58. Repina S. V. Peculiarities of RBCs resistance to acid hemolysis in hibernating mammals / S. V. Repina, N. V. Repin // 16th Meeting of the European Association for Red Cell Research, 16-19 March 2007: Abstr. – Oxford, England, 2007. – P. 24.
59. Репин Н. В. Морфофункциональное состояние эритроцитов при длительном гипотермическом хранении в зависимости от pH и ионной силы / Н. В. Репин, В. В. Кирошка // Пробл. криобиол. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 179.
60. Repin N. V. Morphological response of red blood cells to hypothermal storage medium ionic composition and pH / N. V. Repin, V. V. Kiroshka // 17th Meeting of the European Association for Red Cell Research, April 2009: Abstracts. – Milan, Italy, 2009. – P. 72
61. Осмотична резистентність еритроцитів залежно від pH та іонного складу середовища експозиції / О. Головки, В. Кирошка, Н. Репин, В. Дворцевой // «Молодь і поступ біології»: міжнар. конф.: тез. доп. – 2009. – С. 243–244.
62. Изменение формы эритроцитов как адаптация к физико-химическим параметрам внешней среды / О. И. Головки, В. В. Кирошка, Н. В. Репин, В. К. Дворцевой // XXI съезд Физиологич. Общ. имени И. П. Павлова Тез. докл. 19-25 сентября 2010 г. Москва – Калуга. – 2010. – С. 148–149.
63. Репин Н. В. Морфологическое состояние изолированной печени крыс после гипотермического хранения в слабозлектролитных средах и нормотермической реперфузии // Пробл. криобиол. – 2012. – Т. 22 № 3. – С. 334.

АНОТАЦІЯ

Репін М. В. Структурні перебудови в біологічних об'єктах в умовах гіпотермії, природного гіпобіозу та заморожування. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2013.

У роботі досліджено структурно-функціональний стан біооб'єктів різного рівня організації гомойо- і гетеротермних організмів в інтервалі температур 4–38°C, при тривалому гіпотермічному зберіганні в середовищах із різним складом і значенням pH та заморожуванні. На підставі даних вивчення модифікації форми клітин, змін в структурі їх мембран за різних умов збереження еритроцитів запропоновано механізм везикулоутворення. Вперше виявлено, що час водного дифузійного обміну (τ) мембран еритроцитів гетеротермів на порядок (у 7–8 разів) менше, ніж у еритроцитів людини. Додавання до еритроцитів людини «тригера сплячки» – пептиду 1–10 кДа модифікує структуру їх мембрани і призводить до зменшення τ на 25–30% у інтервалі 6–27°C. Запропоновано модель і методичний підхід для оцінки значення коефіцієнта проникності мембрани клітин для води при негативних температурах (–20÷–30°C).

Перехід гетеротермної тварини із стану активності до сплячки супроводжується в еритроцитах модифікацією термотропної поведінки мембранних білків і ліпідів, ультраструктури мембрани, а також перерозподілом і агрегацією ВМЧ, що свідчить про зміну білок-білкових і білок-ліпідних взаємодій. Особливою областю температур для еритроцитів сплячої тварини є 15–20°C. Для гепатоцитів у цих же умовах характерні збільшення об'ємної долі гетерохроматину, жирових включень і глікогену, зменшення розміру мітохондрій при відповідному збільшенні їх кількості, поява великої кількості лізосомоподібних структур. Встановлено, що клітини гетеротермних тварин зберігали відносно стійку ультраструктуру до 4-х діб гіпотермічного зберігання на відміну від гомейотермних організмів, у яких виражені зміни клітин спостерігалися вже до 24 годин. Показано, що для ізольованих гепатоцитів і клітин у складі фрагментів печінки та плаценти існують приблизно однакові (24 години) часові межі високого рівня збереження ультраструктури, а також загальні закономірності зміни їх ультраструктури при тривалому гіпотермічному зберіганні. Доведено, що короткострокове гіпотермічне зберігання ізольованої печінки у слабкоелектролітних середовищах із зниженим значенням pH і подальша нормотермічна реперфузія забезпечують високий (аналогічний середовищу UW) рівень збереження

морфологічних і біохімічних характеристик органа.

Ключові слова: гіпотермія, гіпобіоз, мембрана, ультраструктура біологічних об'єктів, морфометрія, температурна залежність, кристалізація, водна проникність.

АННОТАЦИЯ

Репин Н. В. Структурные перестройки в биологических объектах в условиях гипотермии, естественного гипобיוза и замораживания. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков. – 2013.

В работе проведено комплексное исследование структурно-функционального состояния объектов разного уровня организации (мембрана–клетка–ткань–орган) гомойо- и гетеротермных организмов в интервале температур 4–38°C, при длительном гипотермическом хранении в средах с разными составом и значением pH. Полученные результаты указывают на то, что такие морфологические изменения эритроцитов как модификация формы клеток, образование мембранных везикул и потеря клеткой гликокаликса, частичная потеря и агрегация трансмембранных белков, происходящие при разных условиях хранения клеток, непосредственно связаны с изменениями состояния цитоскелет-мембранного комплекса. Предложен механизм везикулообразования

Переход гетеротермов из состояния активности к гибернации сопровождается термотропным изменением состояния микроокружения триптофановых остатков мембранных белков – коротковолновым сдвигом спектра флуоресценции (на 10–12 нм), повышением в 1,5 раза параметра микровязкости бислоя в зоне полярных головок липидов, изменением морфологии и перераспределением ВМЧ в мембране, что указывает на изменение белок-белковых и белок-липидных взаимодействий, а также повышением стойкости эритроцитов к длительному гипотермическому хранению и кислотному гемолизу. Для гепатоцитов в этих же условиях характерно увеличение объемной доли гетерохроматина, жировых включений и гликогена, уменьшение размера митохондрий при соответствующем возрастании их количества, появление большого числа лизосомоподобных структур. Особой областью температур для эритроцитов спящего животного является 15–20°C. При 37°C исследованные параметры мембраны приближаются к значениям, характерным для животного в активном состоянии.

Предложены модель и методический подход для исследования процессов вне- и внутриклеточной кристаллизации и обезвоживания клеток на этапе температурной остановки (–20÷–30°C) при их двухступенчатом замораживании. Для эритроцитов человека и сусликов оценены численные значения коэффициента проницаемости мембраны для воды L_p при отрицательных температурах: $0,5 \times 10^{-13} \text{ н-м}^3 \text{ с}^{-1}$ и $10^{-13} \text{ н-м}^3 \text{ с}^{-1}$, соответственно. Показано, что время водного диффузионного обмена (τ) мембран эритроцитов гетеротермов на порядок (в 7–8 раз) меньше, чем у эритроцитов человека. Добавление к эритроцитам человека «триггера спячки» пептида 1–10 кДа модифицирует структуру мембраны и приводит к снижению τ . Максимальное снижение τ в интервале 6–27°C составляло 25–30%.

Установлено, что клетки гетеротермов сохраняли относительно устойчивую ультраструктуру до 48 часов у животных в активном и пробуждающемся состоянии и до 4 суток у спящих, в отличие от клеток гомойотермных организмов, у которых выраженные изменения наблюдались после 24 часов хранения. По степени чувствительности к действию гипотермии внутриклеточные органеллы изолированных гепатоцитов и в составе ткани распределялись таким образом: митохондрии > эндоплазматическая сеть > ядерный аппарат. Показано, что существуют примерно одинаковые (24 часа) временные рамки высокой степени сохранности ультраструктуры, а также последовательность и закономерность ее изменения при длительном гипотермическом хранении как для изолированных гепатоцитов, так и для клеток в составе фрагментов печени и плаценты.

На модели изолированной печени крысы показано, что краткосрочное (1 час) гипотермическое хранение в слабоелектролитных средах со сниженным значением pH и

последующая нормотермическая реперфузия (НТПП) обеспечивают высокий (аналогичный среде UW) уровень сохранения морфологических и биохимических характеристик органа, что свидетельствует о перспективности использования данных сред для ГХ. В то же время 24-часовое хранение в данных средах является критическим сроком возобновления функции печени после НТПП.

Ключевые слова: гипотермия, гипобиоз, мембрана, ультраструктура биологических объектов, морфометрия, температурная зависимость, водная проницаемость, кристаллизация.

ANNOTATION

Repin M.V. Structural re-arrangements in biological objects under conditions of hypothermia, natural hypobiosis and freezing. - Manuscript.

Dissertation for the doctor of biological science degree in specialty 03.0019 – cryobiology. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, 2013.

In the work structural and functional state of the objects of different organization level of homoio- and heterothermic organisms within 4–38°C temperature interval, during lasting hypothermic storage in the media of various compositions and pH values and freezing were studied. On the basis of the data of studying the modification of cell shape, changes in the structure of their membranes during different conditions for preserving the erythrocytes the mechanism of vesicle formation was proposed. It has been firstly revealed that the time of aqueous diffusive exchange (τ) of heterotherms erythrocyte membranes by one order (in 7–8 times) lower than for human erythrocytes. Adding to human erythrocytes of peptide “hibernation trigger” 1–10 kDa modifies the structure of their membrane and leads to τ lowering by 25–30% within 6–27°C interval. The model and methodical approach to estimate the values of permeability coefficient of cell membrane for water at negative temperatures (–20 ÷ –30°C) were proposed.

Transition of heterothermic animals from the state of activity to hibernation is accompanied in erythrocytes with the modification of thermotropic behavior of membrane proteins and lipids, membrane ultrastructure, as well as re-distribution and aggregation of intramembrane particles that testifies to the change in protein-protein and protein-lipid interactions. The featured temperature range for erythrocytes of hibernating animal is 15–20°C. For hepatocytes there are characteristic the increase in the volume share of heterochromatin, fat inclusions and glycogen, decrease in the mitochondria dimensions during corresponding rise in their number, appearance of a big number of lysosome-like structures. Under these conditions, the cells of heterothermic animals have been established to preserve quite a stable ultrastructure up to 4 days in contrast to homoeothermic organisms, in which the manifested changes of cells were observed even to 24hrs of hypothermic storage. It has been shown that for isolated hepatocytes and the cells as components of liver fragments and placenta there are nearly similar (24hrs) the time limits of high level of ultrastructure preservation as well as the regularities of ultrastructure change during long-term hypothermic storage. Short-term hypothermic storage of isolated liver in slightly electrolyte media with pH reduced values and further normotermic reperfusion has been proved to provide a high (similar to UW medium) preservation rate of morphological and biochemical characteristics of an organ.

Key words: hypothermia, hypobiosis, membrane, ultrastructure of biological objects, morphometry, temperature dependence, crystallization, aqueous permeability