

4

ISSN 0233-7673

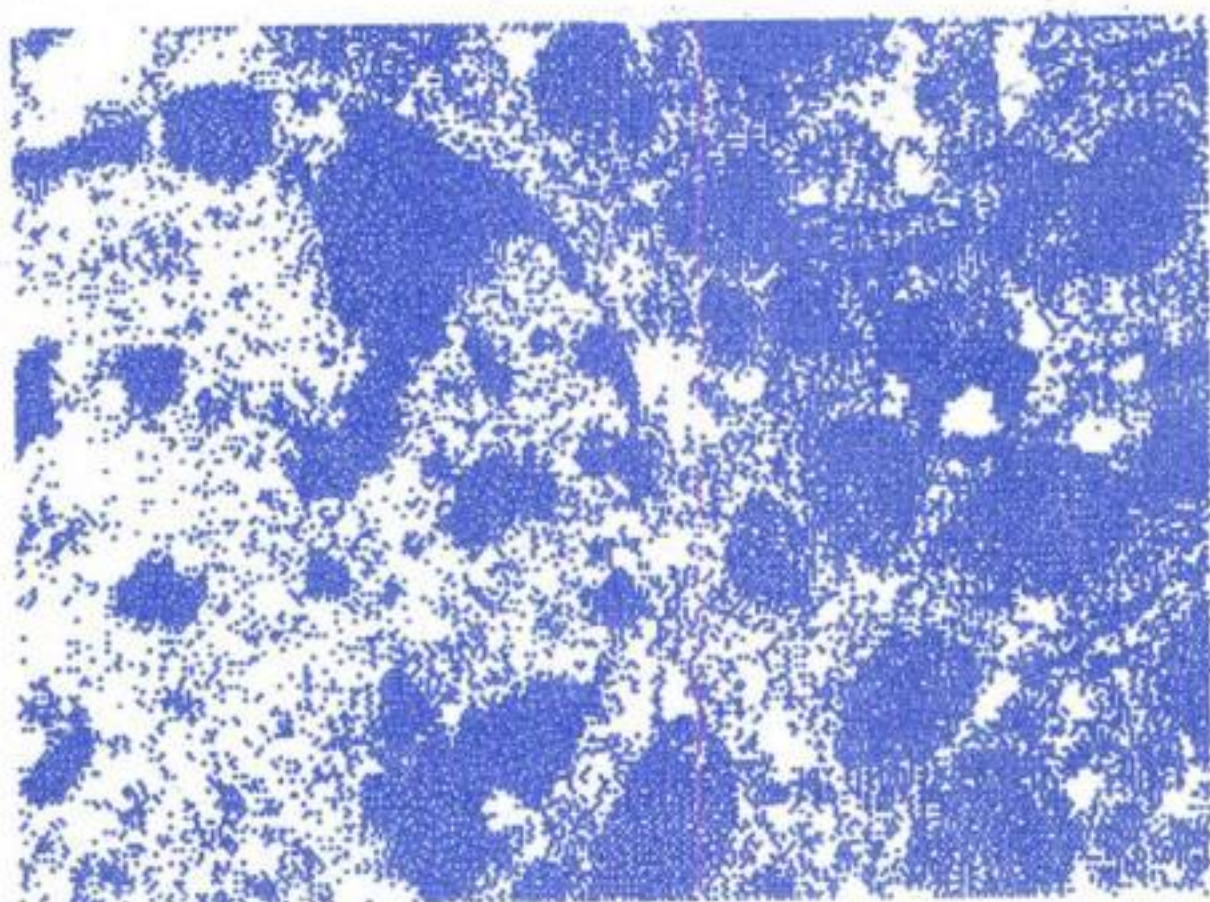
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1994

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



О ВОЗМОЖНОМ УЧАСТИИ ПОЛИФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛЬНОГО ЦИКЛА В РЕГУЛЯЦИИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ *А.М.Белоус, О.А.Семенченко*

НОРАДРЕНЕРГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС ПОСЛЕ ДВУКРАТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ *В.В.Ломако, Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, А.В.Шило, И.И.Ломакин*

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРАТАЦИИ И СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ ДНК ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ *М.А.Семенов, Т.В.Больбух, А.А.Красницкая, В.Я.Малеев*

Главный редактор В.И.Грищенко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Editor-in-Chief V.I.Grishchenko

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

4

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1994

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Белоус А.М., Семенченко О.А.* О возможном участии полифосфатидилинозитольного цикла в регуляции структурно-функционального состояния белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии 3
- Ломако В.В., Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Шило А.В., Ломакин И.И.* Норадренергические процессы в гипоталамусе крыс после двукратного воздействия краниocereбральной гипотермии 11
- Семенов М.А., Больбух Т.В., Краснищкая А.А., Малеев В.Я.* Исследование гидратации и структурного состояния ДНК человека при длительном хранении 17
- Терещенко О.С., Гулевский А.К., Загнойко В.И.* Проявление жаропонижающего и противовоспалительного эффекта в действии низкомолекулярных фракций 1–10 кД, выделенных из тканей зимнеспящих и холодоадаптированных животных 23
- Говоруха Т.П., Козлова В.Ф., Репин Н.В.* Морфологические изменения в печени сусликов при естественном гипобиозе 27
- Пателарос С.В.* Исследование катион-зависимого лизиса регидратированных эритроцитов крови человека 31
- Мяделец О.Д.* Клеточные реакции в подкожных лимфоузлах при воздействии на организм белых крыс глубокой гипотермии разной продолжительности и в постгипотермическом периоде 38

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Гучок В.М., Воротилин А.М., Луговой В.И., Шраго М.И.* Лечебная эффективность эритроцитов, криоконсервированных под защитой препарата "Пропандиосахароль" 44
- Шраго М.И.* О новых направлениях в работе банков крови 48

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Грищенко В.И., Петрушко М.П., Чуб Н.Н.* Морфофункциональные и цитогенетические особенности эмбрионов мышей после эквilibрации с растворами криопротекторов 51
- Мартыненко А.А.* Абсорбция растворов 1,2-пропандиола и натрия хлорида семядолями фасоли в связи с вопросами криопротекции 53
- Погорелова Г.В., Жегунов Г.Ф.* Исследование изоферментного спектра Cu, Zn-супероксиддисмутазы зимнеспящих млекопитающих *Citellus undulatus* в динамике зимней спячки 53
- Весич Т.Л.* Некоторые особенности реабилитирующего действия лазерного облучения на нативные и перенесшие криоконсервирование спермии человека 54

ХРОНИКА

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1994

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Belous A.M., Semenchuk O.A.</i> On the possible involvement of the polyphosphatidyl inositol cycle into the regulation of the structure functional state of the cytoskeletal proteins during temperature-osmotic exposure	3
<i>Lomako V.V., Babiychuk G.A., Marchenko V.S., Shilo A.V., Lomakin I.I.</i> Noradrenergic processes in rat hypothalamus after repeated craniocerebral treatment	11
<i>Semenov M.A., Balbukh T.V. Krasnitskaya A.A., Maleyev V.Ya.</i> A study of hydration and structural state of human DNA during long-term storage	17
<i>Tereschenko O.S., Gulevsky A.K., Zagnoiko V.I.</i> Antipyretic and antiinflammatory effect of the low-molecular fractions of 1-10 kD, isolated from the tissues of the hibernating and cold-adapted animals	23
<i>Govorukha T.P., Kozlova V.F., Repin N.V.</i> Morphological alterations in the liver during natural hypobiosis	27
<i>Patelaros S.V.</i> A study of cation-dependent lysis of the human blood rehydrated RBC	31
<i>Myadelets O.D.</i> Cell response in subcutaneous lymphatic nodes after exposing the organism of the white rat to profound hypothermic treatment of various duration and in the posthypertonic period	38

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

<i>Guchok V.M., Vorotilin A.M., Lougovoy V.I., Shrago M.I.</i> Therapeutic efficiency of RBC, cryopreserved under protection of a «Propane diosaccharole» preparation	44
<i>Shrago M.I.</i> Basic trends in blood banks operation	48

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Grischenko V.I., Petrushko M.P., Chub N.N.</i> Morpho-functional and cytogenetic peculiarities of murine embryos following equilibration with cryoprotective solutions	51
<i>Martynenko A.A.</i> Absorption of solutions of 1,2-propanediol and sodium chloride by string bean seeds with respect to cryoprotection	53
<i>Pogorelova G.V., Zhegunov G.F.</i> A study of isoenzymatic spectra of Cu, Zn-superoxide dismutase in hibernating mammals <i>Citellus undulatus</i> in the time course of hibernation	53
<i>Vesich T.L.</i> Some aspects of the rehabilitating action of laser emission on native and cryopreserved human spermatozoa	54

CURRENT EVENTS

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

Научный редактор *В.И.Луговой*
Редактор *Л.А.Рябинина*
Компьютерный набор и верстка: *Л.А.Рябинина, А.М.Шаталов*

Подп. в печ. 09.11.94 Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.
Тираж 400 экз. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

А.М.Белоус, О.А.Семенченко

**О ВОЗМОЖНОМ УЧАСТИИ
ПОЛИФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛЬНОГО ЦИКЛА В
РЕГУЛЯЦИИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО
СОСТОЯНИЯ БЕЛКОВ ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ
ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

На основании обзора данных литературы и собственных исследований сделана попытка проанализировать роль и влияние продуктов деградации полифосфатидилинозитольных липидов на перестройку белков цитоскелета клеток при осмотическом и особенно при температурном воздействии. Являясь вторичными мессенджерами, фосфорилированные производные инозитольных фосфолипидов активно контролируют процессы поли- и деполимеризации актиновых и тубулиновых белков и, тем самым, регулируют стабильность клеток при воздействии различных экстремальных факторов. Вопрос о роли этих химически активных веществ применительно к проблемам криобиологии до настоящего времени не анализировался в специальной литературе.

Белковый цитоскелет играет важную роль в стабилизации клеток к воздействию различных экстремальных факторов [4, 15], в том числе низкой температуры и осмотически активных веществ [2]. Регуляция полимерного состояния белков цитоскелета и степень их ассоциации с мембранными структурами клетки регулируется несколькими системами контроля: ионотранспортирующими, вторичными мессенджерами (сAMP, сGMP, Ca^{2+}), продуктами распада арахидоновой кислоты (лейкотриены, простагландины) и PIP-циклом сигнализации (DG, FA, IP₃ и др.).

В настоящее время имеется информация об участии этих систем контроля в осмотической регуляции объема и формы клеток [10, 11], однако практически мало известно о роли указанных выше систем в перестройке структурно-функционального состояния белков цитоскелета, особенно при изменении тоничности эквilibрационных растворов и температуры.

В данном сообщении выдвигается гипотеза, согласно которой продукты распада PIP-липидов являются активными участниками процессов, ведущих к изменению состояния цитоскелетной сети при изменении осмотичности среды и температуры.

Вопрос об участии PIP-цикла в ответной реакции клетки и, в частности, регуляции состояния белков цитоскелета, при осмотических и особенно температурных воздействиях остается открытым, так как в научной литературе сведения по этому вопросу отсутствуют.

В последние годы неоднократно подчеркивалось [5, 8], что продукты распада фосфолипидов выступают в роли вторичных мессенджеров, обеспечивающих механизм проведения специфического трансмембранного сигнала в клетку под влиянием различного рода стрессовых воздействий.

PIP являются типичными фосфолипидами клеточных мембран и локализованы преимущественно во внутреннем липидном монослое. Из всех PIP плазматическая мембрана содержит 60% PIP₂ и 45% PI. Остальное количество инозитольных фосфолипидов рассеяно в цитомембранах внутриклеточных

Примечание. В работе приняты следующие сокращения: PIP – полифосфатидилинозиты; PIP₂ – фосфатидилинозит-4-5-дифосфат; PI₁ – фосфатидилинозит-4-монофосфат; PI – фосфоинозиты; IP₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат; IP₄ – инозитол-1,4,5-тетрафосфат; FA – фосфатидная кислота; DG – диацилглицерин; Ca^{2+} – ионизированный; АКЭ – асцитные клетки карциомы Эрлиха; с-AMP, с-GMP – циклический аденозин и гуанозинфосфаты соответственно.



Сейчас определено, что характерная особенность PIP — их способность превращаться под влиянием фосфолипазы С и Д [1] в PIP_2 , который является источником продуктов, обладающих сигнальной функцией в клетке. Под влиянием внешнего сигнала PIP_2 гидролизуется с образованием двух мембранно-клеточных медиаторов: локализованного в мембране липофильного DG и водорастворимого IP_3 , поступающего в цитозоль из немитохондриальных депо. Согласно существующим представлениям внешний сигнал активирует фосфодиэстеразу, которая гидролизует PIP_2 на DG и IP_3 . Последние в дальнейшем подвергаются химическим превращениям и в конечном счете восстанавливаются снова в присутствии ATP и GTP до PIP_2 (рис. 1). Как видно из схемы, ионы Li^+ блокируют превращение IP_1 в свободный инозитол, необходимый для

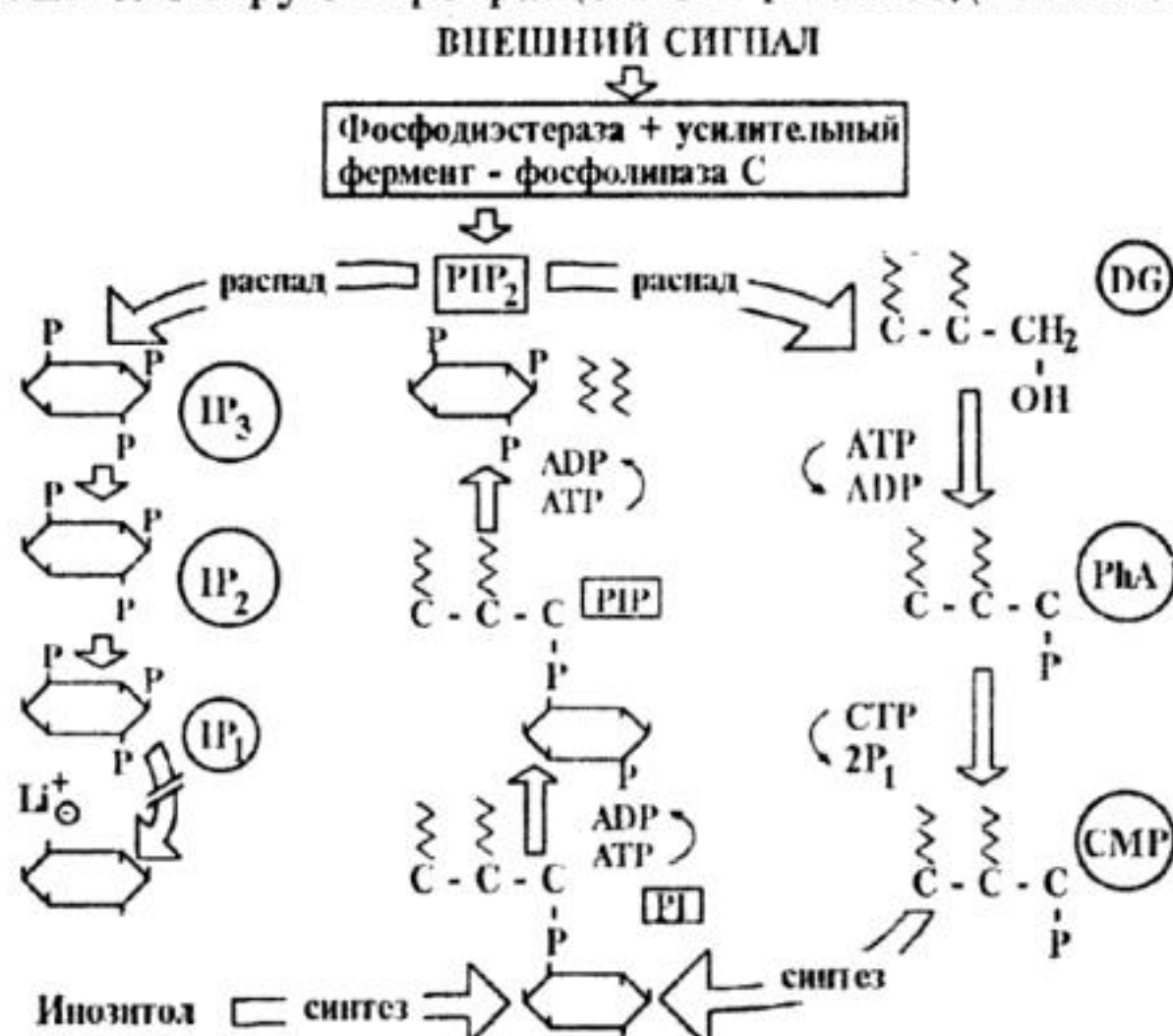


Рис. 1. Общая схема цикла фосфолипидов, содержащих инозитол: DG – диацилглицерол; CTP – цитидилтрифосфат; CMP – цитидилмонофосфат; PhA – фосфатидная кислота; PI – фосфатидилинозитол; IP₃, IP₂, IP₁ – инозитол три-, ди- и монофосфат; PIP₂ – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат

В последнее время открыт еще один активный инозитольный мессенджер — IP_4 , образующийся в результате фосфорилирования IP_3 специфической киназой. Оказалось, что IP_4 усиливает Ca^{2+} -мобилизирующий эффект IP_3 и кальциевую проницаемость мембраны как за счет открытия Ca^{2+} -каналов, так и активации Ca^{2+} -АТФ-азы [27]. По мнению [13] внутриклеточный IP_3 может непосредственно контролировать ионную проницаемость рецепторных доменов на поверхности мембраны и, таким образом, регулировать цитозольную концентрацию $[Ca_i^{2+}]_{in}$. Роль IP_3 заключается не только в аспекте его Ca^{2+} -мобилизирующей способности, но и стимуляции Ca^{2+} -зависимых фосфолипаз, GTP-зависимых G-белков и различных протеинкиназ [20]. В результате активации фосфолипазы C образующийся IP_3 поступает в цитоплазму и индуцирует освобождение $[Ca_i^{2+}]_{dep}$. Мобилизация Ca^{2+} под влиянием IP_3 происходит в рамках определенного цикла, который протекает по вероятной схеме, обсуждаемой в работе [36]. После повышения уровня Ca^{2+} активируется фосфолипаза C, в результате чего уровень этого катиона достигает

определенного критического уровня (10^{-5} М), по достижении которого функция PI- и PIP₂-киназ подавляется, что приводит к ограничению доступности PIP₂-продуктов фосфолипазе C. В результате этого снижается образование IP₃ и мобилизация Ca²⁺ из депо. В дальнейшем, за счет функционирования Ca²⁺-насоса и Ca²⁺/H⁺ антипорта, уровень внутриклеточного кальция нормализуется.

Установлено, что IP₃ подвергается дальнейшему распаду, в результате чего в клетках накапливается в различных концентрациях моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и гексафосфатные производные инозина, которые также выступают в роли вторичных мессенджеров при передаче химических сигналов в клетке [20].

Как видно, метаболизм фосфоинозитов имеет важное значение в регуляции функции кальциевых каналов в клетках, поскольку IP₃ способен освободить до 30–50% Ca²⁺ из немитохондриального пула. Установлено, что для осуществления освобождения депонированного Ca²⁺ [23] IP₃ связывается с белком мембран ЭПР, который является одновременно для него и рецептором, и каналом выхода Ca²⁺ из депо в цитозоль. В результате связывания IP₃ с рецептором, Ca²⁺-канал, как правило, активизируется [32], и Ca²⁺ поступает в цитоплазму. Кальций-мобилизирующие IP₃-зависимые рецепторы могут активизироваться в результате их фосфорилирования cAMP-зависимой протеинкиназой, протеинкиназой C, Ca²⁺-кальмодулинзависимой протеинкиназой-2, а также под влиянием нуклеотидов и Ca_i²⁺. Ингибиторами указанных выше рецепторов является гепарин и рН [34]. По данным [6, 7] рецептор-зависимый вход Ca²⁺ в клетки регулируется также Na⁺/H⁺ обменом, и при его ингибировании амилоридом, АТР-индуцированный вход Ca²⁺ подавляется.

Прямые доказательства роли IP₃ в мобилизации Ca²⁺ были получены в опытах на различных клетках (панкреатические, гепатоциты и др.), которые инкубировали в присутствии физиологических концентраций этого инозитольного мессенджера [24]. Во всех случаях добавление IP₃ сопровождалось мобилизацией Ca²⁺ из немитохондриальных депо.

Метаболиты PIP₂, кроме кальций мобилизирующей функции, обладают способностью модулировать активность “минорных” белков цитозоля, влияющих на состояние цитоскелетной сети. В качестве примера можно привести данные авторов [37], которые исследовали гельзолин, участвующий при формировании тройного комплекса с актином в присутствии кальция. Удаление Ca²⁺ вызывает диссоциацию и образование двойного комплекса. Гельзолин является важным белком, так как он регулирует полимеризацию актина, то есть, он вовлечен в регуляцию перехода актина в состояние мономер – полимер и, таким образом, в контролирование цитоскелетной архитектуры. Недавние работы подтвердили [28, 37], что PIP₂ связывается с гельзолином и регулирует гельзолин-актин взаимодействие. Дальнейшее изучение действия PI на свойства белков гельзолина [29], ингибирующих полимеризацию G-актина (или активирующих деполимеризацию F-актина), показало, что PI₁ и PIP₂ в виде везикул, полученных УЗ-обработкой липидов, в водном растворе активно взаимодействуют с гельзолином и почти полностью подавляют его действие на актин. Взаимодействие гельзолина с PI ослабляется либо полностью подавляется при модификации PI профилином, неомицином, детергентом или сфингомиелином и холестерином [29]. Положительное влияние 5 мкМ IP₃ на состояние F-актина обнаружено в пермеабилizированных амебах [22]. При добавлении к амебам указанного выше количества IP₃ в течение 15 с количество полимеризованного актина в клетке значительно возрастало.

Участие PIP в ответной реакции клеток на осмотическое воздействие до конца не выяснено. Имеются единичные работы, показывающие, что продукты распада PI принимают участие в подобного рода стрессовых воздействиях. Например, в работе [21] изучали природу механизма адаптаций галоустойчи-

вой зеленой водоросли *D. Salina* к осмотическому стрессу и установили, что при сдвиге осмолярности раствора NaCl с 1,7 до 0,85 М содержание PIP_2 и PI_1 в растении резко снижается. Подобные данные получены при изучении процесса набухания гепатоцитов крысы в растворах NaCl. При изменении объема клетки концентрация $[\text{Ca}_i^{2+}]_{in}$ в клетках увеличивалась вдвое, IP_3 – на 50–90% и cAMP – на 20–50% [16]. Набухание других типов клеток (например, клеток АКЭ) под влиянием растворов электролитов сопровождается уменьшением содержания PIP_2 в мембранах с параллельным увеличением концентрации IP_3 и IP_4 в цитозоле. При этом происходила мобилизация Ca_i^{2+} из депо, что вызывало активацию K^+ (Ca^{2+})-каналов, регулирующих объемные параметры клеток [25]. По данным [10], при осмотическом сжатии эритроцитов крысы также изменяется метаболизм PIP_2 , что выражается в повышении включения ^{32}P в эту фракцию мембранных липидов. При сжатии гепатоцитов крысы этанолом по измерению с помощью ФУРА-2 внутриклеточная концен-

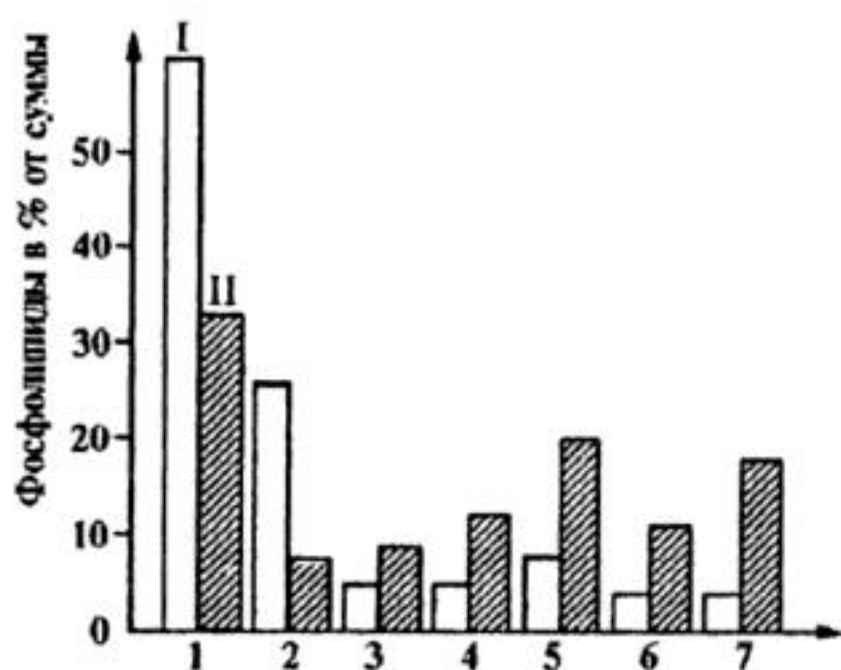


Рис. 2. Влияние 0,5 М сахарозы на изменение относительных пропорций основных фракций фосфолипидов изолированных гепатоцитов (контроль – 0,25 М сахароза; опыт – 0,5 М сахароза при 4 °С); I – контроль, II – опыт: 1 – фосфатидилхолин, 2 – фосфатидилэтаноламин, 3 – лизофосфатидилхолин, 4 – сфингомиелин, 5 – фосфатидилинозит, 6 – фосфатидилсерин, 7 – кардиолипин

трация Ca_i^{2+} и IP_3 повышается [35].

В предварительных экспериментах нами обнаружено, что инкубация гепатоцитов крысы при 4 °С в растворе 0,5 М сахарозы приводит к сжатию клеток, сопровождающемуся изменением фосфолипидного состава и, в частности, кажущимся увеличением содержания фосфатидилинозита (рис. 2). Как видно из рисунка, в гепатоцитах крыс при указанных выше условиях опыта уменьшается почти вдвое количество фосфатидилхолина и фатидилэтаноламина при тенденции к увеличению содержания фосфотидилсерина и кардиолипина. Механизмы обнаруженных изменений остаются неясными и подлежат дальнейшему изучению.

Полагают, что при сжатии клетки ведущим звеном в механизме мобилизации указанных выше вторичных мессенджеров является активация фосфолипазы и изменение объемных параметров клетки. Поскольку при сжатии эритроцитов крысы активируется транспорт Na^+ и K^+ , по мнению [9], обмен PIP_2 вовлечен в стимуляцию Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта и Na^+/K^+ -обмена, что подтверждается в опытах с нагрузкой клеток Li^+ , который ингибирует фосфатазу инозитолмонофосфата [18] и, тем самым, резко снижает вызванную сжатием активацию указанной выше котранспортной системы. На этом основании считают [12], что продукты распада PIP_2 вовлечены в активацию Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта и Na^+/K^+ -обмена при осмотическом воздействии на клетки.

Имеются сведения, что при активации PI-пути передачи сигнала индуцируется синтез cGMP. Очевидно, какие-то продукты гидролиза PI стимулируют гуанилатциклазу и, следовательно, формирование cGMP. Однако неясно, в каких конкретно метаболических процессах используется cGMP. Известно, что этот циклический нуклеотид активирует протеинкиназу G, которая фосфорилирует отдельные цитозольные и мембранные белки, функция которых точно не установлена. Существуют экспериментальные наблюдения [3] показывающие, что при снижении концентрации GMP открываются новые каналы в сетчатке глаза непосредственно без промежуточной стадии, связанной с активацией протеинкиназы. По данным [9], GMP, наоборот, ингибирует

активируемый сжатием фуросемид-чувствительный вход Na^+ в других типах клеток. При этом внутриклеточная концентрация cGMP снижается в два раза. Поэтому считают, что данный мессенджер участвует в объемной регуляции клеток поскольку влияет на Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорт.

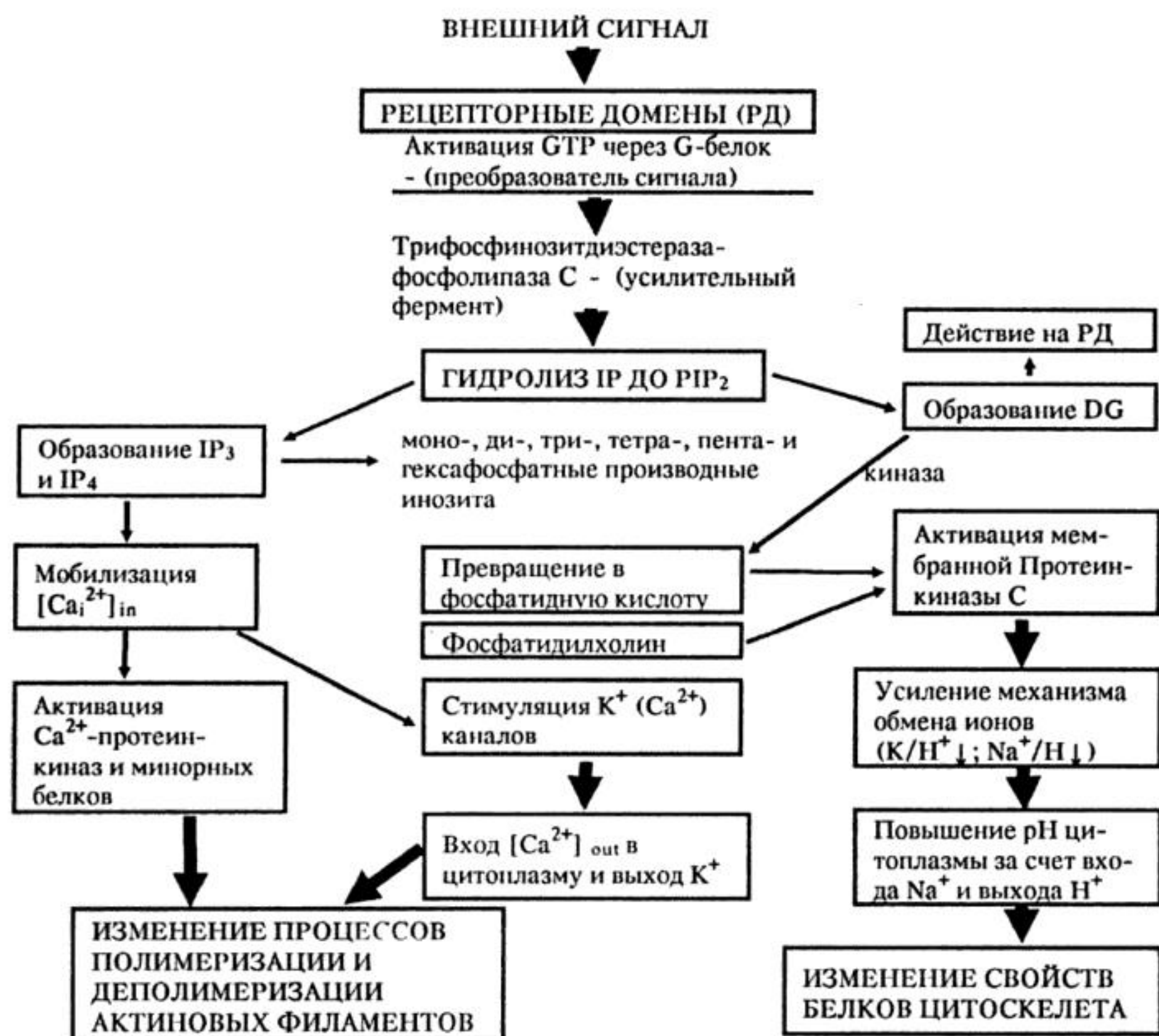


Рис. 3. Общая схема активации полифосфатидилинозитольного цикла

Общая схема активации PI-цикла в клетке показывает (рис. 3), что появление вторичных мессенджеров IP_3 , IP_4 и DG вызывают достаточно сложный каскад метаболических процессов, влияющих на мобилизацию Ca_i^{2+} из внутриклеточных депо, которые оказывают сильное влияние на полимерное состояние белков цитоскелета.

Одним из важных следствий мобилизации Ca^{2+} является активирование $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов, которые являются базовыми регуляторами объема клетки при воздействии осмотически активных соединений (электролитов и неэлектролитов). Существует мнение [13], что с обменом PI в клетке связана функция биохимического контроля процесса фосфорилирования рецепторных доменов, которые могут функционировать как ионные каналы. Поскольку PI являются высоко полярными фосфолипидами, они способны также влиять на физические свойства мембраны и Ca^{2+} -связывающие центры рецепторных молекул.

Сейчас хорошо известно, что DG также относят к классу вторичных мессенджеров. Значение этого соединения состоит в том, что оно активирует протеинкиназу C, которая катализирует фосфорилирование белков, регулирующих ионный транспорт (Na^+ , K^+ , H^+) в клетке через плазматические мембраны. Предполагают [12], что протеинкиназа C может быть вовлечена в механизм объемзависимой активации K^+/H^+ и Na^+/H^+ -обмена в клетках. В

результате такой активации Na^+ начинает проникать внутрь клетки, а H^+ – выходить, что сдвигает величину внутриклеточного pH [17]. Естественно, что подобного рода перераспределение ионов в клетке может оказывать влияние на состояние белков цитоскелетной сети.

Таким образом, в некоторых типах клеток при их осмотическом сжатии под влиянием продуктов распада PIP_2 активизируется Na^+/H^+ -обмен, вызывающий смещение pH_{in}, что влияет на состояние актиновых филаментов. Согласно данным [30], при ингибировании Na^+/H^+ -обменника амилоридом в тромбоцитах человека усиливается активация протеинкиназы C. Эффект еще более увеличивается при снижении величины внутриклеточной pH под влиянием нигерецина и пропионата. Соответственно этому усиливается продукция DG и резко активируется распад PIP_2 с параллельным ингибированием его ресинтеза.

Вместе с тем роль PIP_2 -цикла в объемной регуляции транспорта ионов остается во многом неясной. Например, при осмотическом сжатии лимфоцитов концентрация IP_3 в цитоплазме и уровень PIP_2 в мембране не изменяются [25]. Липофильный DG и продукты его биотрансформации, так же как и IP_3 , могут оказывать опосредованное действие на состояние белков цитоскелета. Как известно, в цикле биотрансформации DG под влиянием киназ образуется фосфатидная кислота, которая обладает Ca^{2+} -ионоформными свойствами [26]. Образовавшаяся при этом FA под действием фосфогидролазы превращается в DG, который в дальнейшем подвергается ацетилированию с последующим образованием триацилглицерина, не обладающего мессенджерными свойствами. Поэтому фосфатидной кислоте также придется функция вторичного мессенджера, так как ей принадлежит важная роль в регуляции концентрации Ca^{2+} в клетке. Более того, FA, действующая как Ca^{2+} -ионофор, изменяет структуру липидного бислоя мембран, способствуя формированию ТМД, поскольку она как и любой другой кислый фосфолипид (фосфатидилсерин, кардиолипин) легко подвергается фазовым превращениям из ламеллярной в кольцевидную гексагональную фазу, что облегчает формирование ионных каналов, в том числе и для Ca_{out}^{2+} . Действительно, при инкубации клеток с FA концентрация $[\text{Ca}_{in}^{2+}]_{in}$ увеличивается [8].

Увеличение концентрации DG в мембранах сопровождается смещением мембранного потенциала, что изменяет упаковку и размеры рецепторных доменов [14], которые участвуют в канальной ионной проницаемости. При этом возможны структурные переходы рецепторных доменов и превращение Na^+ -канала в кальциевый, поскольку при этом изменяется его поперечное сечение. Выяснилось, что DG как липофильное соединение в присутствии пальмитиновой кислоты *in vitro* способен формировать супрамолекулярный комплекс с α -актинином, весьма подобный актиновым микрофиламентам [19]. На этом основании считают, что α -актинин, по всей видимости, участвует в повышении силы связывания цитоскелетных элементов к клеточным мембранам. Суммируя представленный материал, можно с большой долей вероятности утверждать, что исследование PIP -цикла в клетке является важным для изучения механизмов криоповреждений клеток, поскольку его активация сопряжена с мобилизацией Ca_{in}^{2+} , который оказывает сильное влияние на полимерное состояние белков цитоскелета, при его повышении в цитозоле с $10^{-7} - 10^{-8}$ до 10^{-5} М, то есть является сигналом, модифицирующим взаимодействие актина с другими белками цитозоля и, в конечном итоге, к растворению его до состояния золя. И, наоборот, в отсутствие $[\text{Ca}_{in}^{2+}]_{in}$ активируется функция “минорных” белковых цитозольных регуляторов (α -актинин, виллин, фимбрин, филламин, винкулин и др.), способствующих сшиванию актиновых филаментов и превращению их в напряженную гелевую сеть. Однако до настоящего времени отсутствуют конкретные экспериментальные данные о механизмах участия

этой сигнальной системы в перестройке белков цитоскелета и мембранных структур клеток при низкотемпературных и осмотических воздействиях на биообъекты.

Таким образом, основной эффект действия продуктов распада PIP_2 заключается в мобилизации Ca^{2+} , что вызывает немедленную перестройку актиновых филаментов и микротрубочек в состояние зоя и ослабление связей с плазматической мембраной клеток. Поэтому весьма заманчивой является идея о возможности разработки искусственного пути управления функцией PIP_2 как кальций-мобилизирующего модулятора с целью сохранения устойчивого состояния трехмерной сети цитоскелета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабенко Н.Л., Никитин В.Н. Пути образования DG и фосфатидной кислоты в ядрах клеток печени белых крыс // Докл. АН СССР. – 1990. – 313, №2. – С. 479–482.
2. Белоус А.М. Роль регуляторных систем, модулирующих состояние белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии // Криобиол. – 1992. – №4. – С. 3–14.
3. Берридж М.Дж. Молекулярные основы внутриклеточной коммуникации // В мире науки (Scientific American). – 1985. – №12. – С. 98–109.
4. Вебер К., Осборн М. Молекулы клеточного матрикса. // В мире науки (Scientific American). – 1985. – №12. – С. 62–77.
5. Евстигнеева Р.П. Структурно-функциональные исследования липидов биологических мембран // V Всесоюз. биохимич. съезд: Тез. докл., М.: Б.и., 1985, – 1. – 169 с.
6. Зинченко В.П., Гуновская А.С., Дяттерева О.В. и др. Изменение внутриклеточного pH и Ca^{++} в клетках асцитной карциномы Эрлиха при действии АТФ // Внутриклеточная сигнализация. – М.: Наука, – 1988. – С. 159–165.
7. Зинченко В.П., Ким Ю.А., Никифоров Е.Л. Участие митохондрий в генерации Ca^{++} сигнала АТФ – рецептором клеток асцитной карциномы Эрлиха // Библ. мембр. – 1991. – 8, №10. – С. 1228–1230.
8. Левицкий Д.О. Кальций и биологические мембраны. – М.: Высш. школа, 1990. – 123 с.
9. Орлов С.Н., Гурло Т.Г. Механизмы активации транспорта ионов при изменении объема клетки // Цитология. – 1991. – 33, №11. – С. 101–110.
10. Орлов С.Н., Покудин Н.И., Котелевцев Ю.В. и др. О механизме индукции ионного транспорта при сжатии эритроцитов // Внутриклеточная сигнализация. – М.: Наука, – 1988. – С. 118–126.
11. Орлов С.Н., Покудин Н.И., Ряжский Г.Г. и др. О механизмах регуляции транспорта ионов через плазматическую мембрану при уменьшении объема клетки // Биологические мембраны. – 1988. – 5, №10. – С. 1030–1041.
12. Орлов С.Н., Скрыбин Г.А., Котелевцев С.В., Козлов Ю.П. Транспорт одновалентных ионов в эритроцитах карпа: механизм и регуляция // Биол. мембраны. – 1989. – 6, №12. – С. 1261–1277.
13. Талако С.А. Фосфатидилинозиты как биохимические модуляторы процесса формирования рецепторных доменов // Биохимия. – 1992. – 11. – С. 1733–1744.
14. Талако С.А. Циклические нуклеотиды и инозиттрифосфат как биохимические модуляторы проницаемости ионных каналов рецепторных доменов // Биохимия. – 1993. – 58, №1. – С. 81–87.
15. Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. – М.: Мир. – 1987. – 117 с.
16. Baquet A., Meifer A.J., Hue L. Hepatocyte swelling increases IP_3 Ca^{2+} and cAMP concentration but antagonizes phosphorylase activation by Ca^{2+} dependent hormones // FEBS-Lett. – 1991. – 278, №1. – P. 103–108.
17. Berridge M.J. Inositol lipids and intracellular communication // Table ronde Roussel Uclaf, Paris Febr., 16–17, 1987, №58: Polyphosphoinosit. Cell. Biol. Paris, 1987. – P. 8–9.
18. Berridge M.J., Irvine R.F. Inositol phosphates and cell signalling // Nature. – 1989. – 341. – P. 197–205.
19. Burn P., Burger M.M. Cytoskeleton membrane interactions: is there a lipid involvement // Biol. Chem. Hoppe – Seyler. – 1985, – 366, – №9. – 774 p.
20. Caft K.J., Hanyady L., Balia T. Second messengers derived from inositol lipids // J. Bioenerg. and Biomembr. – 1991. – 23, №1. – P. 7–27.
21. Einspahr K.J., Peeler T.C., Thompson G.A. Metabolism of IP in response to osmotic stress in Dunaliella saline // Biol. Role Plant Lipids: Proc. 8th Int. Symp. Budapest July 25–28 1988, – Budapest, 1989. – P. 543–544.
22. Euroze-Finner G., Newele P. Dictyostelium discoideum. Inositol, 1, 4, 5-triphosphate and calcium stimulate actin polymerization in Dictyostelium discoidem // J. Cell. Sci. – 1986. – 82, №1. – P. 41–51.
23. Ferris C.D., Haganir R.L., Supattapone S., Snyder S.N. Purified inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles // Nature. – 1989. – 342. – P. 87–89.

24. Garrahan P.J. Calcium and cell function // The Ca^{2+} Pump of Plasma Membranes. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 1986. — P. 21–43.
25. Grinstein S., Rothstein A. Mechanism of regulation of Na^+/H^+ exchanger // J. Membr. Biol. — 1989. — 90. — P. 1–12.
26. Hokin L.E. Receptors and phosphoinositide-generated second messengers // Ann. Rev. Biochem. — 1985. — 54. — P. 205–235.
27. Irvine R.F., Letcher A.I., Heslop I.P., Berridge M.J. The inositol tris/tetrakisphosphate pathway — demonstration of $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 3-kinase activity in animal tissue // Nature. — 1986. — 320, №6063. — P. 631–634.
28. Janmey P.A., Stossel Th.P. Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol-4,5 bisphate // Nature. — 1987. — 325, №6102. — P. 362–364.
29. Janmey P.A., Stossel Th.P. Gelsolin polyphosphoinositide interaction. Full expression of a gelsolin inhibiting function PI in vesicular form and inactivation by dilution, aggregation or masking of the inositol head group // J. Biol. Chem. — 1989. — 264, №9. — P. 4825–4831.
30. Luzzatto Guido, Kroll Michael H., Zavoico George B. et al. Regulation on the PI cycle by Na^+/H^+ exchange and intracellular pH in human platelets // Biochim. and Biophys. Acta Lipids and Lipid Metab. — 1991. — 1084, №1. — P. 78–86.
31. Majerus P.W. Structure and function of phosphatidyl inositol metabolizing enzymes: (Pap) 20th Annu. Meet. Keystone Symp. Mol. and Cell Biol. Jan. 24 – Febr. 3, 1991 // J. Cell Biochem. — 1991. — Suppl. 15 c. — 105 p.
32. Mignery G.A., Sudhof T.C. The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol 1, 4, 5-receptor // Nature. — 1989. — 342. — P. 192–195.
33. Nahas N., Plantavid M., Marico G. et al. Association of PI-kinase activities with the cytoskeleton in human platelets // FEBS-Lett. — 1989. — 246, №1–2. — P. 30–34.
34. Pietrobon P., Di Virgilio F., Pozzan T. Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells // Eur. J. Biochem. — 1990. — 193. — P. 599–622.
35. Reinlib L., Akinshola E., Potter J. et al. Ethanol-induced increases (Ca^{2+}) in and IP_3 in rat hepatocytes // Biochem. and Biophys. Res. Commun. — 1990. — 173, №3. — P. 774–780.
36. Kamada Tosbiaki, Muto Shoshi Ca^{2+} regulation of phosphatidyl inositol turnover in the plasma membrane of tobacco suspension culture cells // Biochim. et biophys. acta Mol. Cell Res. — 1991. — 1093, №1. — P. 72–79.
37. Way M., Tooch J., Pope B., Weeds A. Regulation of actin filament assembly and cytoskeletal structure by capping proteins // Struct. and Funct. of the Cytoskeleton Ed. BA. F Rousset Collogne INSERM / John Libbey Eurotext Ltd. — 1988. — 171. — P. 401–413.

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

Поступила 28.06.93

А.М. БІЛОУС, О.А. СЕМЕНЧЕНКО

ПРО МОЖЛИВІСТЬ УЧАСТІ ПОЛІФОСФАТИДИЛІНОЗИТНОГО ЦИКЛУ В РЕГУЛЯЦІЇ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ БІЛКІВ ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧНОМУ ВПЛИВІ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

На підставі огляду даних літератури і власних досліджень зроблена спроба проаналізувати роль і вплив продуктів деградації поліфосфатидилінозитольних ліпідів на перебудову білків цитоскелета клітин при осмотичному і особливо при температурному впливі. Як вторинний месенджер, фосфориловані вихідні інозитольні фосфоліпіди активно контролюють процеси полі- і деполімеризації актинових і тубулінових білків і тим самим регулюють стабільність клітин при впливі різноманітних екстремальних факторів. Питання про роль цих хімічно активних речовин стосовно проблем криобіології до цього часу у спеціальній літературі не аналізувалось.

A.M. BELOUS, O.A. SEMENCHENKO

ON THE POSSIBLE INVOLVEMENT OF THE POLYPHOSPHATIDYL INOSITOL CYCLE INTO THE REGULATION OF THE STRUCTURE-FUNCTIONAL STATE OF THE CYTOSKELETAL PROTEINS DURING TEMPERATURE-OSMOTIC EXPOSURE

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

On the basis of the literature review and experimental results an attempt has been made to analyze the role and effect of the products of degradation of the polyphosphatidyl inositol lipids on the re-

structuring of the cytoskeletal proteins during osmotic and, in particular, temperature exposure. Phosphorylated derivatives of the inositol phospholipids, being the secondary messengers, actively supervise the processes of poly- and depolymerization of the actin and tubulin proteins, thus regulating cell resistance to the action of various unfavorable factors. Until now the question on the role of these chemically active substances in conformity to cryobiology has not yet received proper attention in special literature.

УДК 612.826.4:57.043

**В.В.Ломако, Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, А.В.Шило,
И.И.Ломакин**

НОРАДРЕНЕРГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС ПОСЛЕ ДВУКРАТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

Исследованы влияние двукратного воздействия краниocereбральной гипотермии (КЦГ) (ректальная температура 32 и 35 °С) на содержание норадреналина (НА) в тканях гипоталамуса, надпочечников и крови, процессы секреции и проницаемости ³H-НА через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) гипоталамуса у интактных крыс и крыс с экспериментальным истощением катехоламиновых депо инъекциями резерпина. Анализ экспериментальных данных показал, что КЦГ 32 °С снижает уровень НА в ткани гипоталамуса, что компенсируется повышенной проницаемостью ГЭБ для этого нейромедиатора и способствует сохранению секреции НА на исходном уровне.

В условиях гипотермии многие системы организма переходят в новое функциональное состояние, поэтому точное знание процессов, протекающих в центральной нервной системе (ЦНС) в этих условиях, является необходимым для практического применения краниocereбральной гипотермии (КЦГ) и позволяет расширить понимание роли температурного фактора в деятельности регуляторных систем организма. При КЦГ несомненна особая роль норадренергической функциональной системы гипоталамуса, которая опосредует стрессовый ответ организма и участвует в специфических терморегуляторных процессах. Поскольку в процессе лечения врачи все чаще сталкиваются с необходимостью решать вопрос о целесообразности повторных сеансов охлаждения [5, 10], актуальной становится задача прогнозирования эффективности процедуры при многократном ее применении.

Целью работы является изучение влияния двукратного воздействия различных режимов КЦГ (до ректальной температуры 35 и 32 °С, IКЦГ и IIКЦГ) на нейромедиаторные процессы высвобождения норадреналина (НА), его проницаемость через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и содержание в гипоталамусе.

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г. КЦГ осуществляли на установке для программного охлаждения. Повторный сеанс КЦГ проводили через 24 ч после первого. В ходе экспериментов измеряли температуру в коре головного мозга, в среднем ухе (что соответствует температуре гипоталамуса), в прямой кишке при помощи электронного термометра термисторами СТЗ–18. Для блокирования рефлекторных терморегуляторных реакций организма животных наркотизировали внутривенными инъекциями смеси тиопентала натрия и оксибутирата натрия из расчета 30 мг/кг и 100 мг/кг массы соответственно. Истощение катехоламиновых депо у животных вызывали однократным введением резерпина из расчета 0,5 мг/кг массы за 18 ч до начала опытов. С этой целью использовали рауседил, содержащий 1 мл 0,25%-го раствора резерпина. Содержание НА в тканях определяли триоксииндоловым флуоресцентным методом [8]. Секрецию и проницаемость ГЭБ гипоталамуса для ³H-НА изучали радиоизотопным методом *in vivo* с помощью push-pull канюли и *ex vivo* на переживающих срезах

гипоталамуса [3, 4]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили традиционными методами.

Было показано, что изменение содержания НА в ткани гипоталамуса при одно- и двукратной КЦГ 35 °С носит сходный характер: сразу после воздействия наблюдается снижение уровня НА, а через 24 ч содержание моноамина достигает исходных значений (рис. 1).

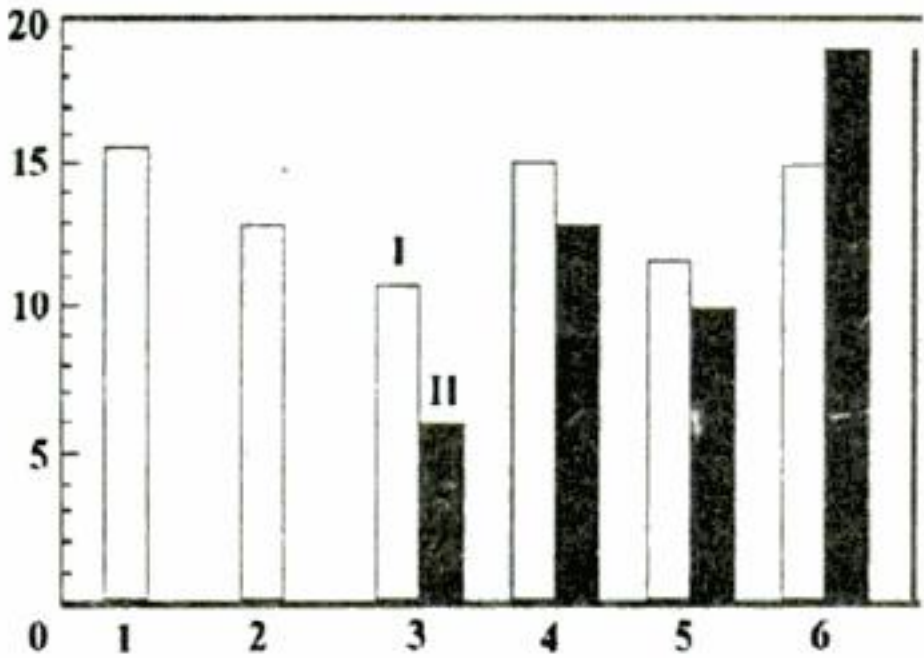


Рис. 1. Содержание норадреналина в ткани гипоталамуса крыс после двукратного воздействия КЦГ, нг/г: 1- исходный уровень, 2- наркоз, 3- I-КЦГ, 4- через 24 ч после I-КЦГ, 5- II-КЦГ, 6- через 24 ч после II-КЦГ; I-КЦГ 35 °С, II-КЦГ 32 °С

Причина этих изменений, возможно, связана либо со снижением активности процессов обмена катехоламинов в ткани головного мозга, либо наоборот, с повышением функциональной активности норадренергической системы. Поэтому в следующей серии экспериментов мы исследовали состояние процессов высвобождения НА нервными окончаниями гипоталамуса при двукратной гипотермии.

При изучении влияния охлаждения *ex vivo* на процессы высвобождения ³Н-НА на переживающих срезах гипоталамуса, взятых у крыс после двукратного воздействия КЦГ 35 °С, было отмечено усиленное К⁺-индуцированное высвобождение ³Н-НА, превышающее на 100–150% исходный уровень (табл. 1), которое было характерно только для переднего гипоталамуса (ПГТ), так как сходных изменений на срезах заднего гипоталамуса (ЗГТ) не выявлено. Отмеченные факты хорошо согласуются с данными экспериментов при охлаждении *in vivo*. В этом случае происходит усиление высвобождения ³Н-НА в ПГТ, сравнимое по величине с результатами при суперфузии гипоталамуса раствором Кребса-Рингера с повышенной концентрацией ионов К⁺ (60 мМ). При II-КЦГ 35 °С также наблюдается усиление высвобождения НА, однако процесс менее выражен, чем при первом сеансе гипотермии (табл. 1). Таким образом, можно предположить, что наблюдаемое снижение содержания НА в ткани гипоталамуса при поверхностном режиме КЦГ вызвано не понижением метаболизма, а усилением секреции НА в ПГТ.

Таблица 1

Действие двукратной КЦГ на К⁺-индуцированную секрецию ³Н-НА переживающими срезами гипоталамуса крыс

Условия эксперимента	Уровень секреции ³ Н-НА			
	КЦГ 35 °С		КЦГ 32 °С	
	ПГТ	ЗГТ	ПГТ	ЗГТ
Исходные данные	2,05±0,15	1,75±0,15	–	–
Действие наркоза	1,48±0,24*	1,53±0,09	–	–
I-КЦГ	4,92±0,67*	1,64±0,19	3,13±0,09*	1,49±0,21
24 ч I-КЦГ	1,51±0,30	1,53±0,10	1,61±0,50	1,52±0,18
II-КЦГ	3,61±0,42*	1,59±0,21	2,69±0,30*	1,71±0,20

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с исходными данными, *p* < 0,05.

Для выяснения причин, вызывающих увеличение высвобождения НА, нами изучено действие охлаждения *in vitro*. Показано, что суперфузия в растворе Кребса-Рингера при 35 °С увеличивает К⁺-индуцированное высвобождение НА, но в 2 раза меньшее, чем при охлаждении *in vivo*, а при темпе-

ратуре среды инкубации 20 °С происходит снижение высвобождения (табл. 2). Эти результаты хорошо согласуются с данными по изучению процессов высвобождения НА изолированными синапсами гипоталамуса [1]. Таким образом, описанное выше усиление высвобождения НА в ПГТ при КЦГ 35 °С, возможно, объяснимо не только непосредственным действием охлаждения на

секрецию нейромедиаторов, а какими-то межнейрональными взаимоотношениями. Особенности этих процессов изучены при углублении КЦГ до 32 °С. После ИКЦГ 32 °С высвобождение в ПГТ снижено по сравнению с КЦГ 35 °С, однако остается еще довольно высоким по сравнению с нормотермией. В ЗГТ отмечено более выраженное снижение высвобождения, чем при КЦГ 35 °С (табл. 1). Возникает вопрос: является ли снижение процессов высвобождения НА следствием понижения метаболизма и функциональной активности норадренергической системы гипоталамуса? В этой связи мы исследовали влияние КЦГ 32 °С на содержание НА в ткани гипоталамуса.

После ИКЦГ 32 °С отмечено значительное снижение уровня НА в гипоталамусе — до 30% от исходного значения (рис. 1), что, вероятно, можно объяснить с позиции гипотезы об участии моноаминов в терморегуляторных процессах. Это предположение согласуется с результатами, показавшими, что охлаждение, вплоть до снижения температуры тела до 32 °С, сопровождается усилением секреции НА в ПГТ и это связано с интенсификацией процессов теплопродукции (табл. 1). Через 24 ч после ИКЦГ 32 °С уровень НА повышался, что составило 80% исходной величины (рис. 1). Повторное охлаждение вновь вызывает снижение данного показателя, однако не такое выраженное, как при первичном воздействии, по-видимому, “уровень затрат” существенно отличается. Дальнейшее наблюдение показало, что спустя 24 ч после ИКЦГ 32 °С уровень НА в ткани гипоталамуса даже превышает исходное значение (рис. 1). По-видимому, одной из возможных причин сохранения достаточного уровня секреции при пониженном содержании НА в динамике КЦГ и значительном повышении уровня НА в гипоталамусе спустя сутки после повторной КЦГ 32 °С, наряду с усилением обменных процессов, может быть увеличение проницаемости ГЭБ для этого нейромедиатора.

В наших работах [6] ранее было показано, что существует определенный температурный уровень КЦГ, когда ГЭБ значительно проницаем для катехоламинов, и он находится в пределах температуры тела 34–30 °С. Однако процесс проницаемости ГЭБ для НА более выражен при КЦГ 32 °С и в ЗГТ заметно выше, чем в ПГТ (рис. 2). Через 24 ч происходит некоторое увеличение проницаемости ГЭБ, но теперь в ПГТ и ЗГТ уровень проницаемости одинаков. После ИКЦГ 32 °С проницаемость ГЭБ практически в 2 раза увеличена по сравнению с ИКЦГ, а через 24 ч, наоборот, в 2 раза ниже, чем в этот же срок наблюдения после ИКЦГ 32 °С (рис. 2). И это хорошо согласуется с результатами изучения процессов высвобождения и динамики содержания НА в гипоталамусе.

Т а б л и ц а 2

Влияние охлаждения *in vitro* на К⁺-индуцированную секрецию ³H-НА переживающими срезами гипоталамуса крыс

Температура раствора для перфузии, °С	Уровень секреции ³ H-НА, % от контроля (37 °С)
37	100
35	140,0±3,1*
30	86,1±2,8*
20	76,9±1,6*
15	74,3±1,9*
10	88,5±1,6*

Примечание. * — сравнение с 37 °С, $p < 0,05$.

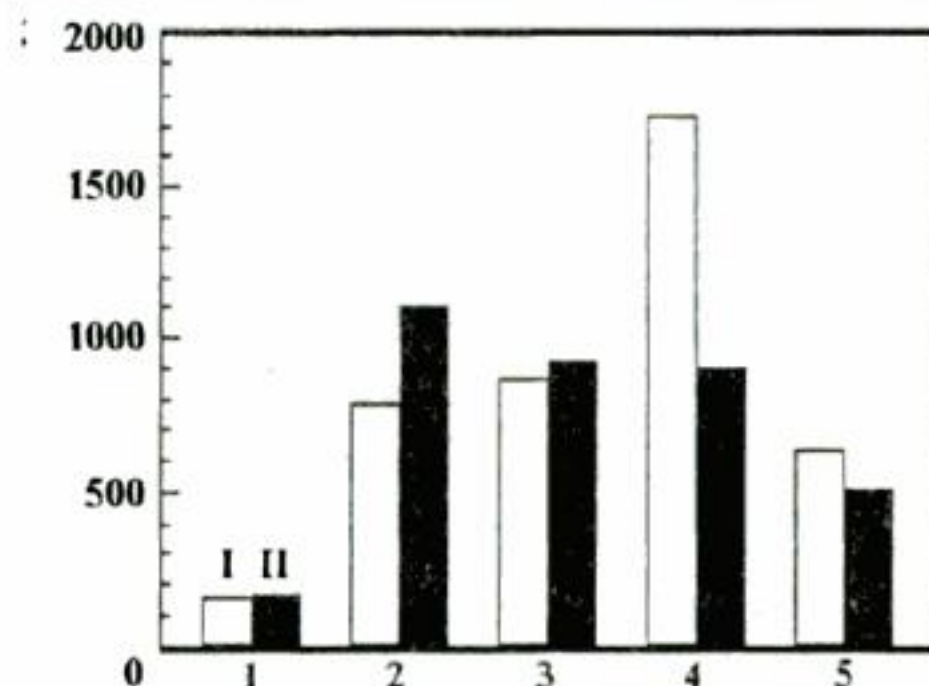


Рис. 2. Влияние двукратного воздействия КЦГ 32 °С на уровень проницаемости ГЭБ для ³H-НА в гипоталамусе: 1 — действие наркоза, 2 — ИКЦГ, 3 — через 24 ч после ИКЦГ, 4 — ИКЦГ, 5 — через 24 ч после ИКЦГ; I — передний и II — задний гипоталамус

Возможное поступление в ЦНС катехоламинов из циркулирующей крови может существенно изменять функциональное состояние головного мозга [2]. Некоторые исследователи отмечали, что проницаемость ГЭБ зависит и от уровня вещества в крови [2, 3, 7]. Поэтому необходимо проследить динамику изменения концентрации НА в крови при двукратной КЦГ 32 °С. Так, после ІКЦГ уровень изучаемого НА в крови повышается, спустя 24 ч после воздействия концентрация его снижена почти в 2 раза. При ІІКЦГ уровень моноамина остается низким, но через 24 ч после нее концентрация НА в крови даже превышает исходный уровень ($p < 0,05$) (рис. 3).

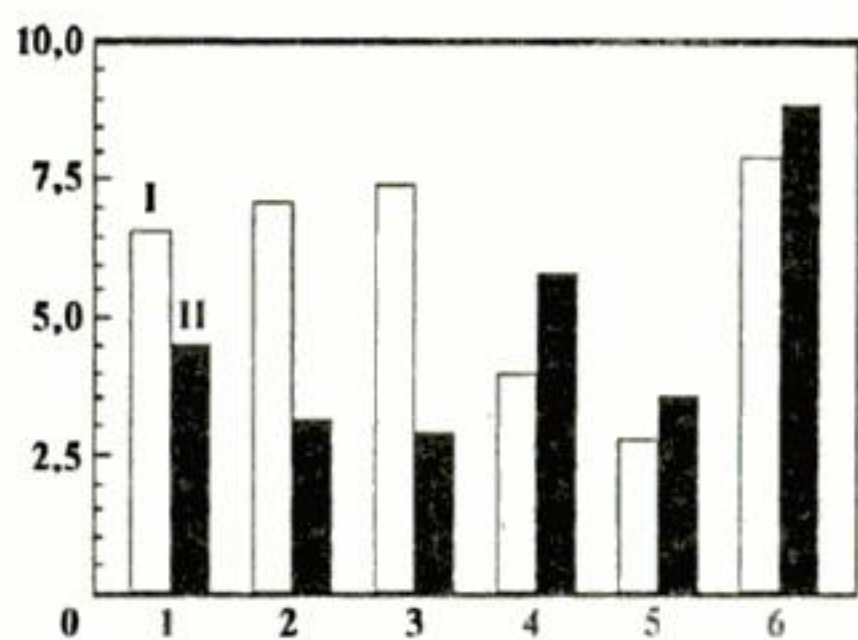


Рис. 3. Содержание норадреналина в крови (нмоль/л) и ткани надпочечников (нг/г) крыс после двукратного воздействия КЦГ 32 °С: 1 – исходный уровень, 2 – наркоз, 3 – ІКЦГ, 4 – через 24 ч после ІКЦГ, 5 – ІІКЦГ, 6 – через 24 ч после ІІКЦГ; I – в крови, II – в надпочечниках

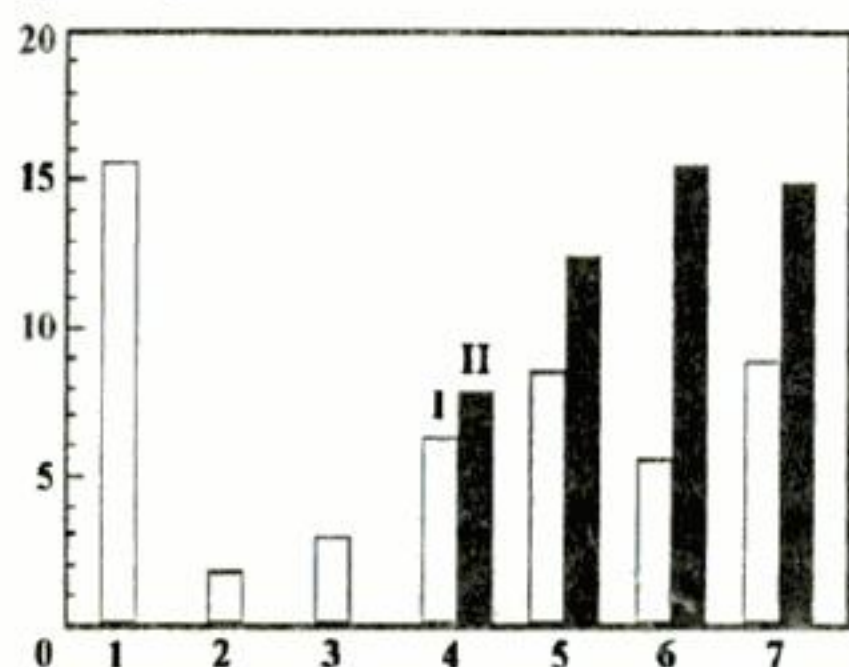


Рис. 4. Содержание норадреналина в ткани гипоталамуса крыс после двукратного воздействия КЦГ на фоне истощения катехоламиновых депо инъекциями резерпина, нг/г: 1 – исходный уровень, 2 – через 18 ч после введения резерпина, 3 – наркоз, 4 – ІКЦГ, 5 – через 24 ч после ІКЦГ, 6 – ІІКЦГ, 7 – через 24 ч после ІІКЦГ; I – КЦГ 35 °С, II – КЦГ 32 °С

Известно, что основная роль в поддержании баланса НА в крови принадлежит норадреналинсинтезирующим клеткам коры надпочечников. Поэтому мы исследовали содержание НА в ткани надпочечников крыс. При этом одно- и двукратная КЦГ 32 °С влияют на уровень НА сходным образом: снижают содержание НА в ткани надпочечников до уровня контроля на действие наркоза, но через 24 ч наблюдается увеличение концентрации НА. Однако следует отметить, что этот процесс значительно более выражен после ІІКЦГ (рис. 3).

Таким образом, значительное увеличение проницаемости ГЭБ для изучаемого нейромедиатора, возможно, обеспечивает достаточную концентрацию НА в ткани гипоталамуса и необходимый уровень секреции НА нейронами гипоталамуса, близкий по значению к исходным величинам. Однако эти процессы могут быть реализованы путем усиления синтеза НА. Поэтому мы проследили некоторые стороны функционирования норадренергической системы (проницаемость ГЭБ, содержание НА в ткани гипоталамуса, надпочечниках и крови) при экспериментальном истощении катехоламиновых депо инъекциями резерпина. Резерпин блокирует или извращает реакции систем на холодовое воздействие, при этом отсутствует характерная для гипотермии и универсальная для стрессорных состояний реакция симпатoadреналовой системы, которая проявляется в истощении запасов НА в ткани гипоталамуса, надпочечников.

Динамика изменения уровня НА в ткани гипоталамуса крыс в условиях “резерпинового истощения” катехоламиновых депо после ІКЦГ имела тенденцию к увеличению, хотя и были отличия, которые зависели от глубины охлаждения организма (рис. 4). ІІКЦГ 35 °С, несмотря на достоверное снижение уровня НА непосредственно после воздействия, вызывала повышение его через 24 ч наблюдения. ІІКЦГ 32 °С приводила к устойчивому повышению уров-

ня НА в ткани гипоталамуса крыс с “резерпиновым истощением”; сходная тенденция отмечена и в последующие 24 ч (рис. 4). Показано, что резерпин значительно снижает уровень НА в крови. ИКЦГ, напротив, заметно повышает его уровень. После ИКЦГ 32 °С уровень НА в крови значительно возрастает и даже превышает исходный уровень, через 24 ч изменения менее выражены (рис. 5). Отмечено, что КЦГ 32 °С значительно увеличивает возможности НА-секретирующих клеток надпочечников. Через 24 ч после ИКЦГ уровень НА повышается, но ИКЦГ 32 °С повышает концентрацию моноамина более чем в 2 раза по сравнению с исходным значением, а при сравнении с уровнем введения резерпина содержание НА после ИКЦГ 32 °С возрастает более чем в 9 раз (рис. 5). Следует заметить, что введение резерпина не оказывало какого-либо заметного влияния на процесс проницаемости ГЭБ для изучаемого моноамина. Отмеченная ранее динамика в соотношении уровней проницаемости для изученных областей гипоталамуса сохранилась и у группы животных с экспериментальным истощением катехоламиновых депо.

Несмотря на резерпиновое угнетение активности норадренергических нейронов мозга за счет интранейронального высвобождения и опустошения моноаминов в тканях в условиях двукратного применения КЦГ отсутствует характерная для резерпина реакция, проявляющаяся в истощении запасов НА. Эта особенность более выражена при КЦГ 32 °С и усиливается при повторном охлаждении. Следовательно, развивающаяся в процессе КЦГ норадренергическая активация в значительной мере обеспечивается за счет выраженного повышения проницаемости ГЭБ, что, возможно, является одним из компенсаторных процессов в гипоталамусе в ответ на гипотермическое воздействие.

Отмеченная закономерность может сохраняться и при некоторых патологических состояниях, например при депрессии, так как известно, что резерпиновое истощение катехоламиновых депо часто используют как модель “экспериментальной депрессии”.

Таким образом, КЦГ вносит существенные коррективы в деятельность норадренергической функциональной системы гипоталамуса, играющей важную роль в регуляции уровня активности ЦНС. Поэтому можно предположить, что механизм действия КЦГ при ряде хронических заболеваний заключается в десинхронизации ритмической активности ЦНС, в разрушении устойчивого патологического состояния и создании благоприятных условий для нормализации функций.

В этой связи оставалась непонятной причина стойкого лечебного эффекта при повторных (через 24 ч) сеансах охлаждения больных с хроническими заболеваниями ЦНС [5, 10]. Проанализировав наши данные, мы пришли к заключению, что приблизительно через сутки после КЦГ происходят повторные изменения в активности головного мозга, формируется приспособительная функциональная система, которая подготавливает организм к аналогичному воздействию по типу “реакции ожидания” [9]. Реакция «ожидания» гипотермии на нейрохимическом уровне, по-видимому, заключается в формировании комплекса условий, обеспечивающих сохранение через 24 ч после КЦГ норадреналина в крови и гипоталамусе на достаточном уровне, близком к исходно-

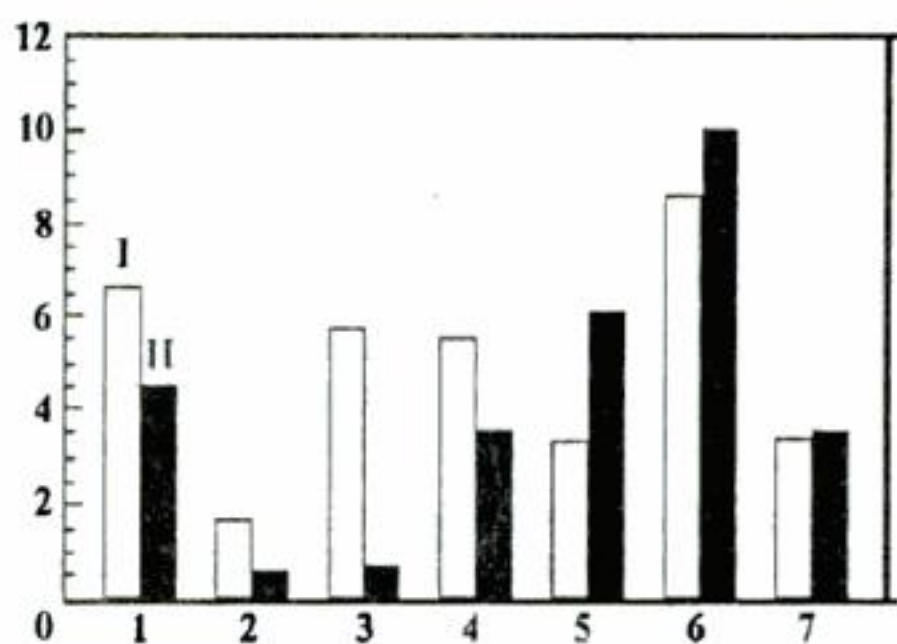


Рис. 5. Содержание норадреналина в крови (нмоль/л) и ткани надпочечников (нг/г) крыс после двукратного воздействия КЦГ 32 °С на фоне истощения катехоламиновых депо инъекциями резерпина: 1 – исходный уровень, 2 – через 18 ч после введения резерпина, 3 – наркоз, 4 – ИКЦГ, 5 – через 24 ч после ИКЦГ, 6 – ИКЦГ, 7 – через 24 ч после ИКЦГ; I – в крови, II – в надпочечниках

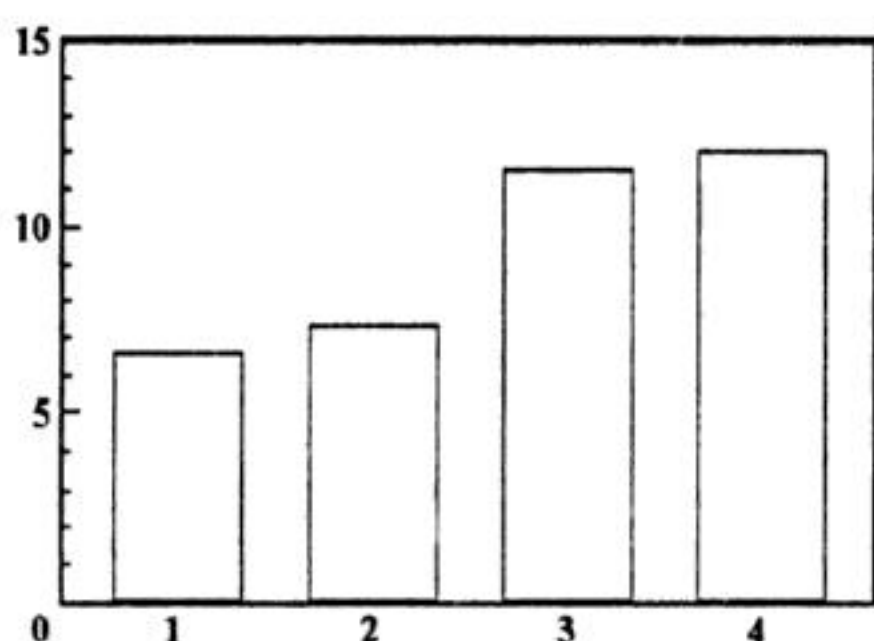


Рис. 6. Продолжительность плавания крыс в ледяной воде (около 0 °С) после однократного воздействия КЦГ 32 °С, мин: 1 – контроль, 2 – наркоз, 3 – через 24 ч после КЦГ, 4 – через 48 ч после КЦГ

добны ответу на первичное воздействие гипотермии, однако создается впечатление, что система реагирует более экономно и специфично. Примером могут служить эксперименты, в результате которых установлено, что однократная КЦГ 32 °С повышает устойчивость крыс к повторному острому охлаждению и эффект (длительность плавания в ледяной воде) наиболее выражен спустя 24 ч после применения КЦГ 32 °С и сохраняется через 48 ч наблюдения (рис. 6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабийчук Г.А., Шифман М.И. Нейрохимические процессы в центральной нервной системе при гипотермии. – Киев: Наук. думка, 1989. – 152 с.
2. Белова Т.И., Петрова Н.В., Юнсон Ю. Регуляция функции гематоэнцефалического барьера при эмоциональном стрессе // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1986. – № 4. – С. 395.
3. Бредбери М. Концепция гематоэнцефалического барьера. – М.: Медицина, 1983. – 480 с.
4. Годухин О.В., Жарикова А.Д. Push-pull канюля для локальной перфузии головного мозга с одновременной регистрацией электрической активности // Физиол. журн. СССР им. Сеченова. – 1979. – 65, № 1. – С. 141–143.
5. Ломакин И.И. Применение краниocereбральной гипотермии для купирования эндогенной депрессии // Нейрохимические процессы в центральной нервной системе при гипотермии. – Киев: Наук. думка, 1989. – С. 103–127.
6. Ломако В.В. Норадренергические процессы в гипоталамусе крыс после гипотермических воздействий: Автореф. дис. ... к.б.н. – Харьков, 1992. – 16 с.
7. Марьянович А.Т., Поляков Е.Л. Нейропептиды и гематоэнцефалический барьер // Успехи физиол. наук. – 1991. – 22, № 2. – С. 33–51.
8. Резников А.Г. Методы определения гормонов. – Киев: Наук. думка, 1980. – С. 345–346.
9. Реушкин В.Н. Механизмы адаптации в биоритмологическом аспекте // Вестник АМН СССР. – 1981. – № 12. – С. 50–54.
10. Таранская А.Д., Сосин И.К., Бабийчук Г.А. и др. Дифференцированное применение краниocereбральной гипотермии в комплексном лечении наркоманий и делириозных состояний различного генеза // Метод. рекомен. МЗ УССР. – Харьков, 1987. – 22 с.

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

Поступила 24.12.93

В.В.ЛОМАКО, Г.О.БАБІЙЧУК, В.С.МАРЧЕНКО, О.В.ШИЛО, І.І.ЛОМАКІН

НОРАДРЕНЕРГІЧНІ ПРОЦЕСИ В ГІПОТАЛАМУСІ ЩУРІВ ПІСЛЯ ДВО- РАЗОВОГО ВПЛИВУ КРАНІОЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ГІПОТЕРМІЇ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м.Харків

Досліджено вплив дворазової дії краниocereбральної гіпотермії (КЦГ) (ректальна температура 32 і 35 °С) на рівень норадреналіна (НА) у тканинах гіпоталамусу, надниркових залоз і крові, процеси секреції і проникненості ³H-НА через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) гіпоталамусу у інтактних щурів та щурів з експериментальним виснаженням катехоламінових депо ін'єкціями резерпину. Аналіз експериментальних даних показав, що КЦГ 32 °С знижує рівень НА у тканині

гіпоталамусу, що компенсується підвищеною проникністю ГСБ для цього нейромедіатора і сприяє збереженню секреції НА на початковому рівні.

V.V.LOMAKO, G.A.BABIYCHUK, V.S.MARCHENKO, A.V.SHILO, I.I.LOMAKIN

NORADRENERGIC PROCESSES IN RAT HYPOTHALAMUS AFTER REPEATED CRANIOCEREBRAL HYPOTHERMIC TREATMENT

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

The given research deals with studying the effect of the repeated craniocerebral hypothermic treatment (CCH) (rectal temperatures are 32 and 35 °C) on the content of norepinephrine (NE) in the tissues of hypothalamus, adrenal glands and blood, processes of secretion and permeability of 3H-NE through the hypothalamic blood-brain barrier (BBB) in intact rats and rats with the reserpine- induced depletion of catecholamine stores. The analysis of the experimental data has shown that CCH of 32 °C reduces the level of NE in the hypothalamic tissue, which is compensated for by an increased BBB permeability to this neuromediator, thus facilitating the maintenance of the NE secretion at the original level.

УДК 577.323.425

**М.А.Семенов, Т.В.Больбух, А.А.Красницкая,
В.Я.Малеев**

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРАТАЦИИ И СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ ДНК ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ

Методами ИК-спектроскопии и пьезогравиетрии проведено сравнительное исследование гидратации и структуры свежеприготовленных образцов ДНК из плаценты человека и образцов после длительного хранения в замороженном трис-буфере, рН=8,0 в присутствии ЭДТА. Найденно, что длительное хранение не повлияло на водосорбционные свойства ДНК, степень ее гидратации и структурные состояния. Показано, что консервирующее действие использованного буферного раствора связано с тем, что ОН- и С=О-группы атомов триса и ЭДТА заменяют молекулы воды в структуре ДНК и взаимодействуют с гидратно-активными группами ДНК, стабилизируют ее спиральную структуру. На основе изученных молекулярных механизмов взаимодействия в системе ДНК-вода-трис-ЭДТА предложен способ сохранения нативного состояния ДНК человека.

В связи с проведением международной программы по расшифровке генома человека стало актуальным нахождение оптимальных условий длительного хранения ДНК человека в нативном состоянии. Обычно для этой цели используются буферные системы с определенными значениями рН при низких температурах [6]. Контроль нативного состояния конформации ДНК осуществляется различными физическими и молекулярно-биологическими методами.

Вполне очевидно, что консервирующее действие на нуклеиновую кислоту оказывают компоненты буфера и низкие температуры. Ранее нами было проведено исследование влияния низких температур (до 80 К) на тимусную ДНК [2] в системе ДНК-вода. Обнаруженное уменьшение размеров желобков ДНК имело полностью обратимый характер. При этом до настоящего времени, насколько нам известно, не изучались молекулярные механизмы взаимодействия нуклеиновых кислот с компонентами буферных систем при криоконсервации в условиях низких температур. Выяснение этих механизмов позволило бы прогнозировать и давать рекомендации с целью выбора оптимальных условий длительного хранения ДНК и ее фрагментов в нативном состоянии.

Целью настоящей работы явилось исследование молекулярных механизмов взаимодействия в системе ДНК-вода-ЭДТА-трис, структурного состояния ДНК из плаценты человека и ее гидратной оболочки при длительном хранении в условиях низких температур. Изучение проводилось методом

сравнительного анализа весьма чувствительных к изменению структуры гидратационных и ИК-спектроскопических параметров свежеприготовленных образцов ДНК и ДНК, хранившейся в течение 8 мес в замороженных при -20°C растворах буфера с 10 мМ триса и 1 мМ ЭДТА при pH 8. Концентрация ДНК в буфере составляла 0,2% по отношению к ее сухой массе.

ИК-спектроскопические и пьезограмметрические исследования ДНК проводили в пленках при различных относительных влажностях (ОВ). Пленки готовили путем медленного испарения воды при 4°C из раствора ДНК, помещенного на подложки из флюорита, германия и кварца. Подложку располагали строго горизонтально на специальном столике. ИК-спектры измеряли с помощью ранее разработанной герметичной и термостатированной кюветы с окошками из флюорита или германия [4].

Полное высушивание пленки достигалось откачкой кюветы до вакуума 10^{-3} торр с использованием азотной вымораживающей ловушки. Увлажнение пленок в парах воды производили с помощью набора насыщенных растворов солей [4].

ИК-спектры в области $700\text{--}3800\text{ см}^{-1}$ регистрировали двулучевым спектрофотометром UR-20, снабженным специально разработанным германиевым фильтром, предохраняющем пленки ДНК от разогревания глобаром.

Изотермы гидратации ДНК, трис-HCl и ЭДТА, представляющие зависимости числа сорбированных молекул воды на моль вещества (n) или грамм вещества от ОВ, были получены с помощью пьезограмметрической установки, описанной ранее в работе [1]. Строили зависимости спектральных параметров полос поглощения (частот ν , интенсивностей R) от найденных значений n . Интенсивность определяли как $R = D_i / D_{\text{сух}}$, где D и $D_{\text{сух}}$ оптические плотности в максимуме полосы поглощения при i -й и нулевой ОВ соответственно.

ДНК из плаценты человека получали с помощью модифицированного детергентного метода [5], который, как известно, позволяет сохранить максимальную молекулярную массу при достаточной степени очистки от белка, РНК и полисахаридов. В работе использовалась ДНК с молекулярной массой 10^7 Д. В полученных препаратах, как показал анализ, присутствовало белка 0,8–0,9%, РНК – 0,9–1,1%. Гипохромный эффект при $\lambda = 260$ нм составлял 38–40%.

УФ-гипохромизм. После размораживания буферного раствора ДНК, хранившейся при -20°C в течение 8 мес, ДНК была осаждена этиловым спиртом и растворена в 0,01 М растворе NaCl. Дальнейшая очистка от триса и ЭДТА проведена диализом против 0,01 М раствора NaCl. УФ-гипохромизм при $\lambda = 260$ нм определялся путем снятия УФ-спектра нативной и денатурированной теплом ДНК. Значение гипохромизма оказалось равным 37–38%, что совпадает в пределах ошибки измерения с соответствующей величиной для свежеприготовленных образцов ДНК. Таким образом, длительное хранение ДНК из плаценты человека в замороженном буферном растворе триса с ЭДТА не привело к изменению ее спиральной структуры.

Изотермы гидратации. Сорбционная способность нуклеиновых кислот зависит от конформационного состояния [8], поэтому сведения о структурном состоянии ДНК могут быть получены из анализа изотерм гидратации. На рис. 1 представлены изотермы гидратации свежеприготовленной ДНК, ЭДТА, триса и смеси ДНК-ЭДТА-трис-HCl, полученной путем выпаривания воды из вышеназванного буферного раствора. В смеси содержалось 55,8% ДНК, 33,8% триса и 10,4% ЭДТА от общей сухой массы. Трис (гидрокси-метил-аминометан) – $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$ и ЭДТА (этилен-диамин-тетрауксусная кислота, динатриевая соль) – $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ представляют собой многоатомные молекулы, в структуру которых входят гидрофильные группы (ОН, С=О, О-Na), определяющие сорбционную способность этих веществ. Из зави-

симостей видно, что сорбция воды изучаемыми образцами различна: у «чистой» ДНК она наибольшая, до 80% ОВ, трис практически не сорбирует воду и только при активности воды, достаточной для разрушения кристаллической структуры, сорбция воды трисом скачкообразно увеличивается. Сорбция воды на ЭДТА, по сравнению с трисом, высокая (рис. 1) и, по-видимому, она связана с тем, что это вещество находится в аморфном состоянии, которое в отличие от кристаллического состояния обеспечивает доступность воды к гидрофильным группам $C=O$ и $O-Na$. Сорбция воды на смеси значительно ниже, чем на свежеприготовленной ДНК. Полагая, что сорбция смеси — аддитивная величина и учитывая собственную сорбцию триса и ЭДТА, мы получили сорбцию ДНК, которая приведена на рис. 1, кривая 6 в виде зависимости числа молей воды на моль нуклеотида. Такая же зависимость, т.е. изотерма гидратации, представлена для свежеприготовленной ДНК (кривая 5). На рис. 1 показано, что с учетом ошибки ($\Delta n = \pm 0,2$) изотермы гидратации совпадают. Это свидетельствует о том, что по параметру сорбции, как и в случае УФ-гипохромизма, заметных изменений вторичной структуры ДНК, хранившейся в буферном растворе с ЭДТА, не произошло.

ИК-спектры ДНК. Из-за сильного поглощения воды получение ИК-спектров ДНК в водных растворах затруднено. Поэтому измеряют спектры в тонких пленках с малым содержанием воды, в которых структура ДНК адекватна структуре ДНК в растворе. При этом используются спектральные области, в которых отсутствует поглощение легкой и тяжелой воды. Другая трудность, которую нам удалось преодолеть, заключается в том, что в смеси содержалось достаточно большое количество триса и ЭДТА и поэтому необходимо было получить, кроме спектров ДНК, спектры пленок триса и ЭДТА. Оказалось, что в области $900-1800\text{ см}^{-1}$ эти вещества имеют сильные полосы поглощения, перекрывающие почти всю область поглощения азотистых оснований и сахарофосфатной цепи ДНК. И только в недегидрированной форме ЭДТА и трис имеют узкие «окна» прозрачности в области $900-1250\text{ см}^{-1}$ и $1680-1750\text{ см}^{-1}$, где лежат полосы поглощения 1055 см^{-1} , 1224 см^{-1} и 1711 см^{-1} , характеризующие структурное состояние ДНК. Это обстоятельство позволило получить достаточно надежную информацию о гидратации и конформации ДНК в смеси.

На рис. 2 (а, б) представлены спектры пленок свежеприготовленной ДНК и пленок ДНК, приготовленных из буферного раствора при различных значениях ОВ в области поглощения сахарофосфатной цепи ($900-1300\text{ см}^{-1}$) и азотистых оснований ($1550-1750\text{ см}^{-1}$). Можно видеть, что спектры этих образцов ДНК, особенно для сухих пленок, существенно отличаются. Рассмотрим подробно зависимости от n спектральных параметров для надежно измеренных и интерпретированных полос поглощения ДНК. На рис. 3 представлены такие зависимости для некоторых полос поглощения сахарофосфатной цепи и азотистых оснований.

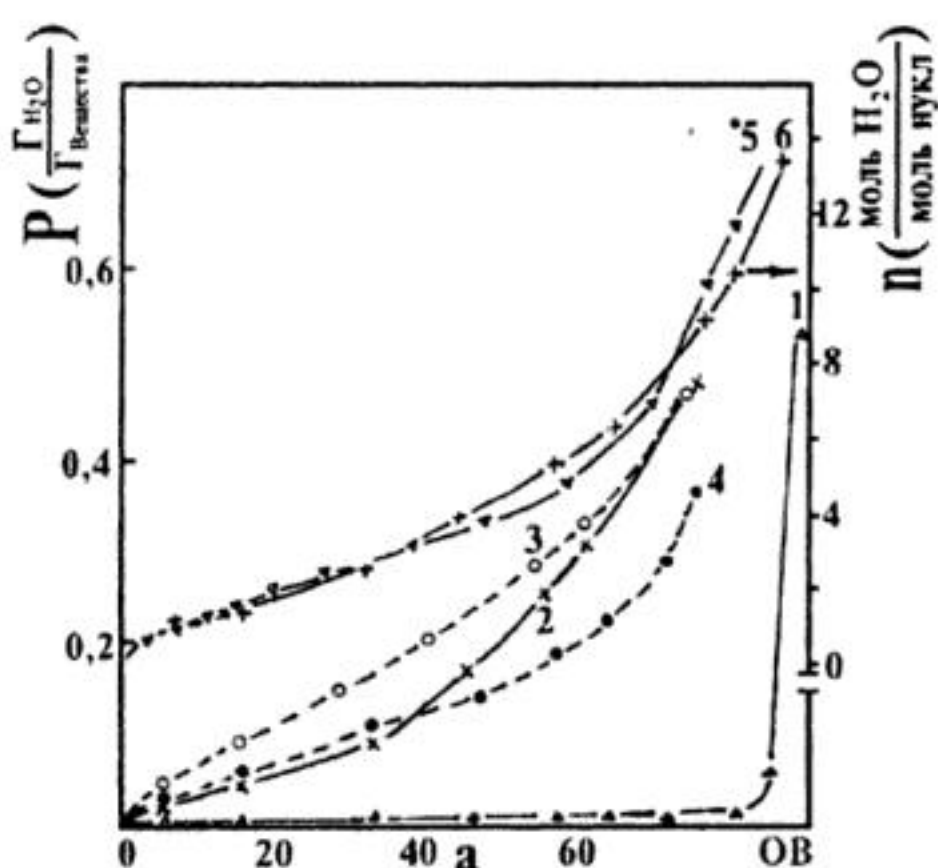


Рис. 1. Изотермы гидратации: P — зависимости сорбции воды в граммах на 1 грамм вещества от ОВ для триса — 1, ЭДТА — 2, свежеприготовленной ДНК из плаценты человека — 3, той же ДНК с трисом и ЭДТА — 4; n — зависимости числа сорбированных молекул воды от ОВ для свежеприготовленной ДНК из плаценты человека — 5 и той же ДНК из смеси — 6

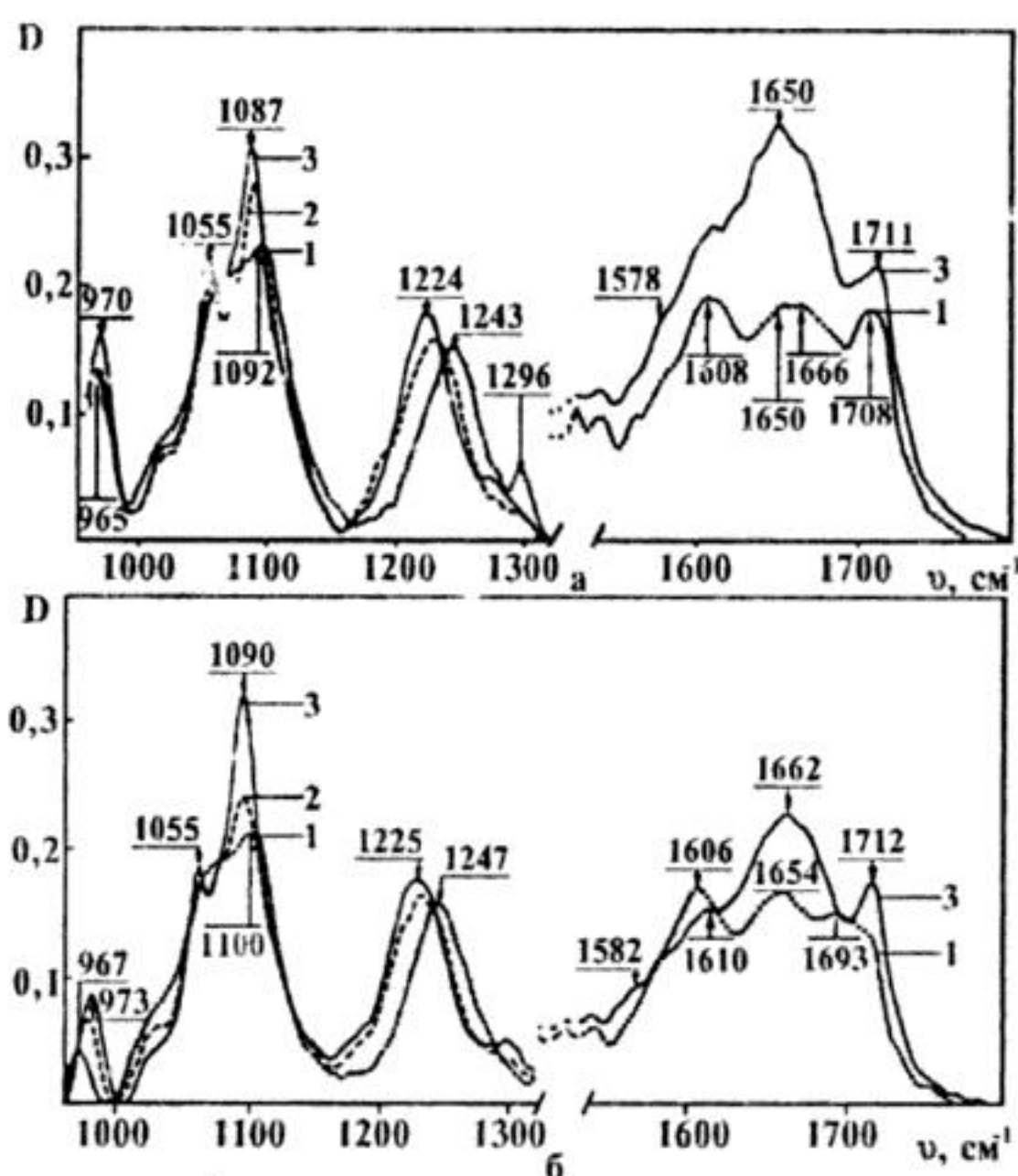


Рис. 2. ИК-спектры пленок свежеприготовленной ДНК из плаценты человека (а) и той же ДНК с трисом и ЭДТА (б) при различных относительных влажностях: 1 – 0 %, 2 – 44 %, 3 – 76 %

на 3 см^{-1} , чем для “чистой” ДНК.

Замена молекул воды на активные группы триса и ЭДТА должна сказаться и на степени гидратации фосфатных групп ДНК. Из приведенных зависимостей параметров ν и R от n видно (рис. 3, а), что ДНК в присутствии буферных компонентов гидратируется меньше на $n=6$ молекул воды по сравнению с “чистой” ДНК.

Подобный эффект замены молекул воды ранее наблюдался при изучении системы ДНК-вода-инозитол [9]. Взаимодействие ДНК с ОН-группами инозитола привело к стабилизации спиральной структуры ДНК. Такое же влияние наблюдается и в системе ДНК-трис-ЭДТА. Как видно из рис. 2, а, в спектре сухой смеси сохраняются полосы поглощения дезоксирибозы 1055 см^{-1} и азотистых оснований 1708 см^{-1} , характерные для спиральной структуры ДНК [3]. На рис. 4 представлены типичные зависимости спектральных параметров (ν и R) от n для этих полос. По сравнению с “чистой” ДНК интенсивность полос с ростом сорбции воды до $n=6$ для ДНК в смеси увеличивается незначительно. Частота полосы 1055 см^{-1} дезоксирибозы практически не изменилась и только частота полосы 1708 см^{-1} азотистых оснований возросла на 4 см^{-1} . Эти данные свидетельствуют о том, что в дегидратированном состоянии ДНК в смеси с трисом и ЭДТА находится в спиральной конформации, а сорбция шести молекул воды привела к дальнейшей стабилизации В-формы, поскольку частота антисимметричного колебания фосфата, характерная для этой конформации, уменьшилась до $\nu_{as}=1224 \text{ см}$ (рис. 2, а).

Дополнительные сведения о структурном состоянии “чистой” ДНК и ДНК в смеси нами получены из низкочастотных спектров, измеренных при содержании в пленках $n>10$ молекул воды в области поглощения $700\text{--}870 \text{ см}^{-1}$. В обоих образцах была обнаружена полоса поглощения $\nu=837 \text{ см}^{-1}$, которая, как известно [7], характерна для В-формы ДНК.

Из рис. 3 и 4 по насыщению спектральных параметров ν и R от n полос поглощения фосфатов, азотистых оснований и других полос поглощения мож-

Прежде всего отметим, что частоты симметричных ν_s и антисимметричных колебаний фосфата PO_2^- для сухих пленок “чистой” свежеприготовленной ДНК и ДНК с трисом и ЭДТА отличаются соответственно на 8 и 4 см^{-1} . Это связано с тем, что, по-видимому, ОН-группы триса и С=О-группы ЭДТА взаимодействуют с PO_2^- -группами ДНК, что и приводит к понижению частот валентного колебания фосфатов. Об этом также свидетельствует уменьшение интенсивности R (до 20%) при увеличении n или ОВ этих полос ДНК в смеси по сравнению с “чистой” ДНК (рис. 3, а). Заметное влияние на фосфаты ДНК эти группы оказывают и при высоких ОВ, поскольку частота ν_s ДНК в смеси при $n>6$ ниже

но отметить, что степень гидратации ДНК в смеси и свежеприготовленной ДНК соответственно равны $n=7$ и $n=12$ молекул воды на нуклеотид. Эти данные свидетельствуют о том, что часть гидратно активных групп ДНК в смеси вступила во взаимодействие с ОН и С=О-группами триса и ЭДТА. Добавление в такую смесь всего лишь 6 молекул воды оказалось достаточным для формирования гидратной оболочки, определяющей нативное состояние В-формы ДНК.

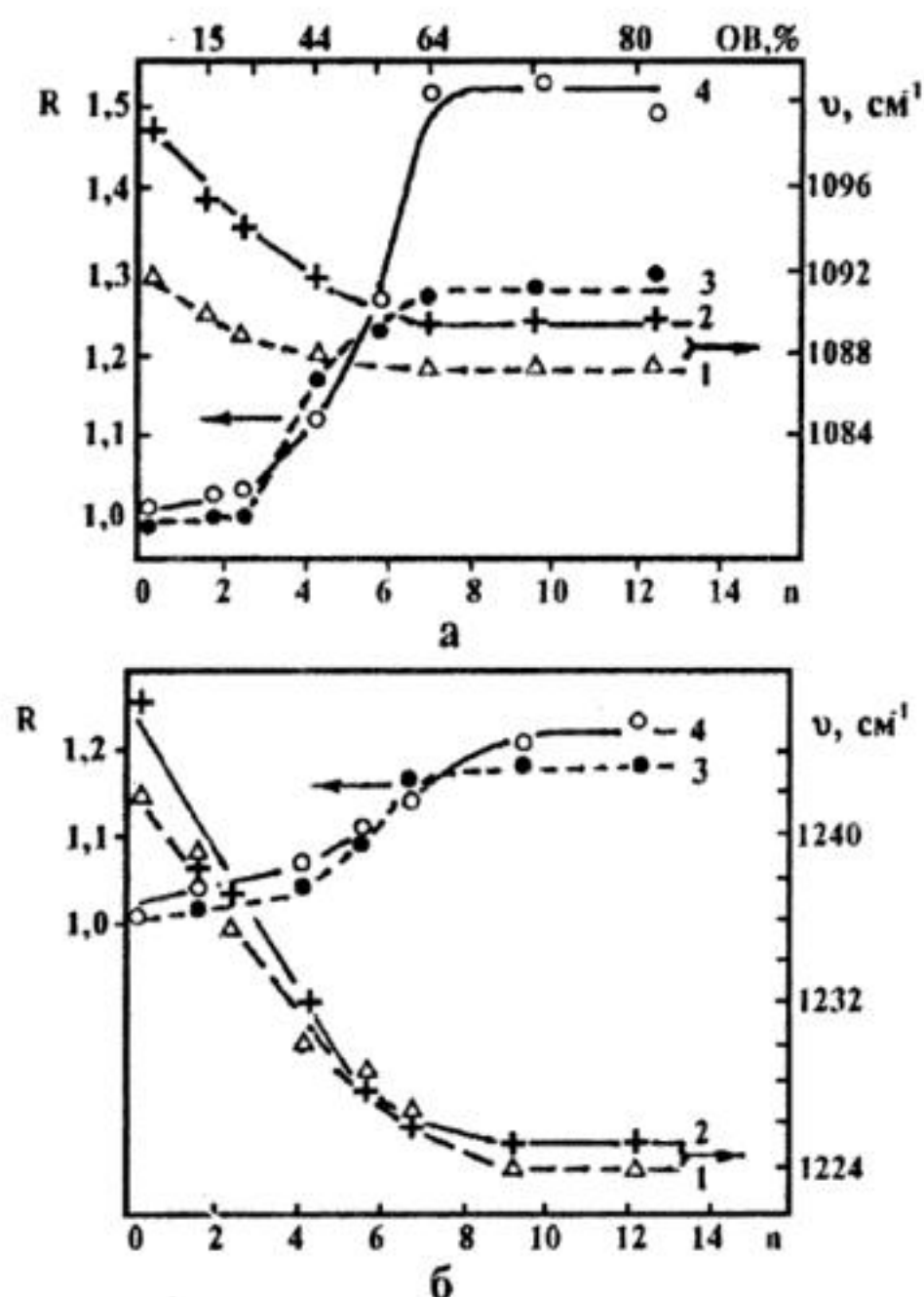


Рис. 3. Зависимости от числа сорбированных молекул воды на нуклеотид n частот ν и интенсивностей R для полос поглощения симметричного (а) и антисимметричного (б) колебаний фосфата свежеприготовленной ДНК из плаценты человека (2, 4) и той же ДНК с трисом и ЭДТА (1, 3)

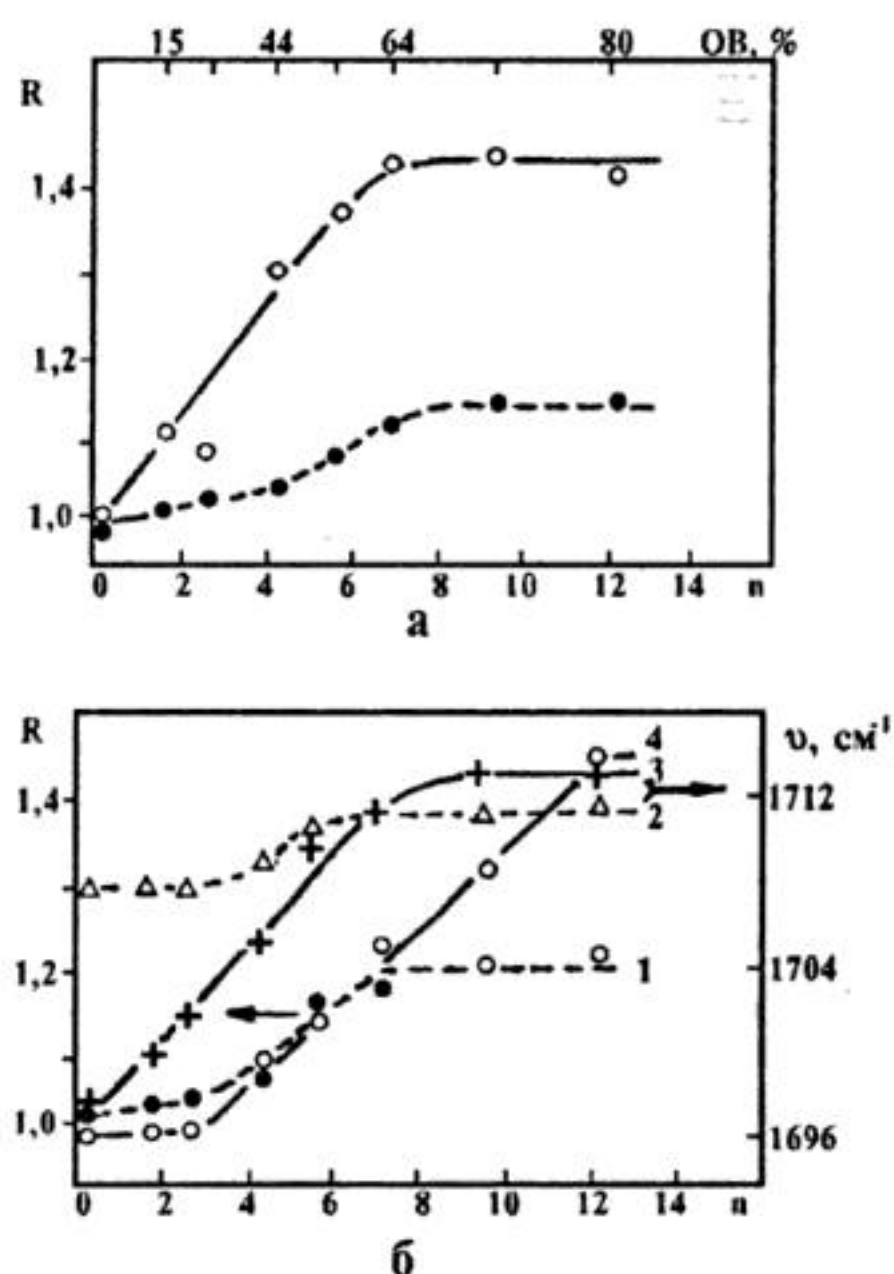


Рис. 4. Зависимости от числа сорбированных молекул воды на нуклеотид n частот ν и интенсивностей R для полос поглощения дезоксирибозы $\nu=1055 \text{ cm}^{-1}$ (а) и азотистых оснований $\nu=1711 \text{ cm}^{-1}$ (б) свежеприготовленной ДНК из плаценты человека (3, 4) и той же ДНК с трисом и ЭДТА (1, 2)

Таким образом, сорбционные свойства и спектроскопические данные показывают, что длительное хранение ДНК из плаценты человека в буферных растворах триса с ЭДТА не оказало влияния на ее структурное состояние. Связано это прежде всего с тем, что атомные группы триса ОН и С=О-группы ЭДТА, вступая во взаимодействие с азотистыми основаниями и фосфатами, предохраняют ДНК от агрегации и других вредных факторов, что способствует сохранению ее нативной спиральной структуры. В этом, по-видимому, состоит консервирующее действие изучаемой буферной системы с ЭДТА.

В заключение отметим, что полученные результаты позволяют нам предложить хранение ДНК как в водных растворах, содержащих трис-НСI и ЭДТА, так и в других условиях [2] сохранения нативного состояния. Как было показано в работе [2], для уменьшения повреждающего действия низких температур на нуклеиновую кислоту, вследствие кристаллизации воды при хранении ДНК в системе ДНК-вода, вода должна быть только связанной (гидратной). Поэтому полная или частичная замена воды в системе ДНК-малое содержание воды такими веществами, как трис и ЭДТА, выполняющими такую же роль в стабилизации структуры ДНК, как и молекулы воды, может быть использована для сохранения нативного состояния ДНК.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Государственного Комитета по науке и технологиям Украины из Государственного фонда фундаментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Больбух Т.В., Семенов М.А. Изотермы гидратации полинуклеотидов // Биофизика. – 1985. – 30. – С. 409–413.
2. Веревкин А.Г., Березняк Е.Г., Семенов М.А., Малеев В.Я. ИК-спектроскопическое изучение влияния низких температур на структуру и гидратацию ДНК // Проблемы криобиологии. – 1991. – № 4. – С. 5–10.
3. Семенов М.А. ИК-спектроскопическое проявление гидратации и конформационного состояния ДНК // Молекулярная генетика и биофизика. – Киев : КГУ, 1984. – С. 25–33.
4. Семенов М.А., Сухоруков Б.И., Малеев В.Я., Шебарщина Л.И. Исследование температурной аномалии воды, сорбированной на ДНК // Биофизика. – 1979. – 30. – С. 210–216.
5. Химия и биохимия нуклеиновых кислот // Под ред. И.Б.Збарского, С.С. Дебабова - Л.: Медицина, 1969. – 429 с.
6. Garrett R.A. A note on storage of soluble nucleohistone // Biochimica et Biophysica acta. – 1971. – 232. – P. 43–47.
7. Nishimura U., Morikawa K., Tsuboi M. The A- and B-forms of DNA spectroscopic difference // Bulletin of Chemical Society of Japan. – 1974. – 47, № 4. – P. 1043–1044.
8. Semenov M.A., Bolbukh T.V. Investigation of conformations depending hydration isotherms of DNA // Studia biophysica. – 1982. – 87, № 213. – P. 227–228.
9. Webb S.J., Dumasia M.D. An infrared study of the influence of growth media and mio-inositol on structural changes in DNA induced by dehydration and ultraviolet light // Can. J. Microbiol. – 1968. – 14. – P. 841–852.

Ин-т радиофизики и электроники АН Украины, г.Харьков

Поступила 14.05.93

М.О.СЕМЕНОВ, Т.В.БОЛЬБУХ, А.О.КРАСНИЦЬКА, В.Я.МАЛЕЄВ

ДОСЛІДЖЕННЯ ГІДРАТАЦІЇ І СТРУКТУРНОГО СТАНУ АНК ЛЮДИНИ ПРИ ТРИВАЛОМУ ЗБЕРІГАННІ

Інститут радіофізики і електроніки НАНУ, м.Харків

Методами ІЧ-спектроскопії та п'єзографіметрії проведено порівняльне дослідження гідратації і структури свіжовиготовлених зразків ДНК із плаценти людини і зразків після тривалого зберігання в замороженому трис-буфері, рН = 8,0 у присутності ЕДТА. Знайдено, що тривале зберігання не вплинуло на водосорбційні властивості ДНК, ступінь її гідратації і структурні стани. Показано, що консервуюча дія використаного буферного розчину зв'язано з тим, що ОН- і С=О-групи атомів трису і ЕДТА замінюють молекули води у структурі ДНК, стабілізують її спіральні структури. На основі вивчених молекулярних механізмів взаємодії в системі ДНК-вода-трис-ЕДТА запропоновано спосіб збереження нативного стану ДНК людини.

M.A.SEMENOV, T.V.BALBUKH, A.A.KRASNITSKAYA, V.YA.MALEYEV

A STUDY OF HYDRATION AND STRUCTURAL STATE OF HUMAN DNA DURING LONG-TERM STORAGE

Institute of Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Using the methods of the IR-spectroscopy and piezoelectric gravimetry we conducted a comparative investigation of the hydration and structure of the freshly prepared samples of DNA from human placenta and the samples, which were stored for a long time in the frozen tris-buffer, pH=8.0, in the presence of EDTA. We found that long-term storage did not affect the water-sorptive properties of DNA, extent of its hydration and structural states. A preserving action of the utilized buffer solution was shown to be related with the fact that OH- and C=O-groups of tris and EDTA atoms substitute water molecules in the DNA structure, thus interacting with the hydrative-active groups of DNA and stabilizing its spiral structure. On the basis of the studied molecular mechanisms of the interactions in the DNA-water-tris-EDTA system we propose a new method of maintenance of the active state of human DNA.

О.С.Терещенко, А.К.Гулевский, В.И.Загнойко**ПРОЯВЛЕНИЕ ЖАРОПОНИЖАЮЩЕГО И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЭФФЕКТА В ДЕЙСТВИИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРАКЦИЙ 1-10 кД, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТКАНЕЙ ЗИМНЕСПЯЩИХ И ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ**

Исследовали жаропонижающую и противовоспалительную активность биологически активных фракций 1–10 кД, выделенных из органов и тканей холодоадаптированных и способных впадать в зимнюю спячку животных. Показано, что фракции 1–10 кД, выделенные из мозга якутской лошади, а также из мозга и кишечника гибернирующего суслика (*Citellus undulatus*) обладают выраженным жаропонижающим и противовоспалительным эффектами в концентрации от 1000 мг/кг до 30 мг/кг. Величина этих эффектов зависит не только от дозы вводимого вещества, но и от времени забора материала (зима или лето).

В настоящее время широко исследуется активность фракций, выделенных из мозга, слизистой оболочки кишечника и других тканей холодоадаптированных и зимнеспящих животных. Показано, что при введении фракций 1–10 кД теплокровным животным они вызывают снижение температуры тела, количества потребляемой пищи, частоты сердцебиения, замедляют поведенческие рефлексы [4, 6, 7, 15]. Было также обнаружено, что фракция 1–10 кД вызывает ингибирование синтеза ДНК в культуре клеток [13], торможение процессов дробления и прохождение последующих стадий развития оплодотворенных яйцеклеток морского ежа [9], влияет на регуляцию транспорта электролитов и воды в почечном канальце [2]. Особо следует отметить, что при введении фракций 1–10 кД млекопитающим наиболее выраженными являются гипометаболический и гипотермический эффекты, что предполагает у нее жаропонижающую и, возможно, противовоспалительную активности.

В связи с вышеизложенным представляло интерес исследовать жаропонижающий и противовоспалительный эффекты биологически активных фракций (1–10 кД), выделенных из органов и тканей холодоадаптированных и способных впадать в зимнюю спячку животных.

В работе использовали: фракцию мозга суслика, находящегося в состоянии спячки (1–10 кД); фракцию (тонкого) кишечника (первичной очистки), а также фракцию мозга якутской лошади (1–10 кД) после забоя животных в зимний и летний сезоны. Фракцию тонкого кишечника сусликов получали по методу Свона [16]. Получение фракций мозга сусликов велось по следующей схеме. Мозг в количестве 237 г гомогенизировали в 1 л 1 М уксусной кислоты в присутствии ингибиторов протеолиза. Гомогенат центрифугировали, супернатант отделяли, осадок регомогенизировали в таком же объеме уксусной кислоты, прогревали 15 мин в кипящей водяной бане и повторно центрифугировали. Супернатанты объединяли и фильтровали через фильтры Amicon PM-10 и Amicon UM-2. После лиофилизации фракцию с диапазоном молекулярной массы 1–10 кД тестировали в предварительных экспериментах по способности вызывать падение температуры у мышей по методике [7]. Забор материала для получения фракций мозга якутской лошади производили зимой (ноябрь–февраль) и летом (июнь) – для контроля. Ткани мозга, получаемые на бойне, замораживали в жидком азоте, гомогенизировали в ацетоне. Ацетоновый гомогенат ткани центрифугировали. Полученный супернатант подвергали последовательной ультрафильтрации через фильтры КАЛИПОР-4 (Эстония) и AMICON-UM-2X. В итоге получали 3 фракции: меньше 1 кД, 1–10 кД и выше 10 кД. Как показали предварительные эксперименты, биологической активностью обладали фракции с молекулярной массой 1–10 кД, которую и использовали в дальнейшей работе.

Жаропонижающей активности фракций судили по их способности ослаблять гипертермическую реакцию у крыс (крысы-самцы линии Вистар, масса – 100–120 г), вызванную внутримышечным введением прокипяченного и подогретого до 37–40 °С молока (0,5 мл на 100 г массы). Температура крыс повышается уже через 1 ч после введения молока с последующим нарастанием и держится на высоком уровне длительное время. При изучении жаропонижающего действия исследуемые соединения обычно вводят животным на фоне максимального повышения температуры тела (в наших экспериментах это было 4,5 ч). Динамику изменения температуры тела крыс регистрировали каждые полчаса или час в течение 3–5 ч. Изменение температуры тела животных проводили в прямой кишке с помощью электротермометра ТЭМП-1.

Противовоспалительную активность изучаемых веществ исследовали на модели острого асептического воспаления, индуцированного каррагенином (“Сигма”, США) [12]. Опыты проводились на белых беспородных мышам-самцам массой 18–20 г. Тестируемые фракции вводили животным (внутрибрюшинно) за 1 ч до субплантарного введения под подушечку задней лапы мыши 1 %-го раствора каррагенина, вызывающего отек лапы. Противовоспалительную (антиэкссудативную) активность изучаемых веществ оценивали по разнице массы воспаленных и невоспаленных конечностей мышей, предварительно ампутированных на уровне тазобедренного сустава [12]. Полученные результаты обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента [5].

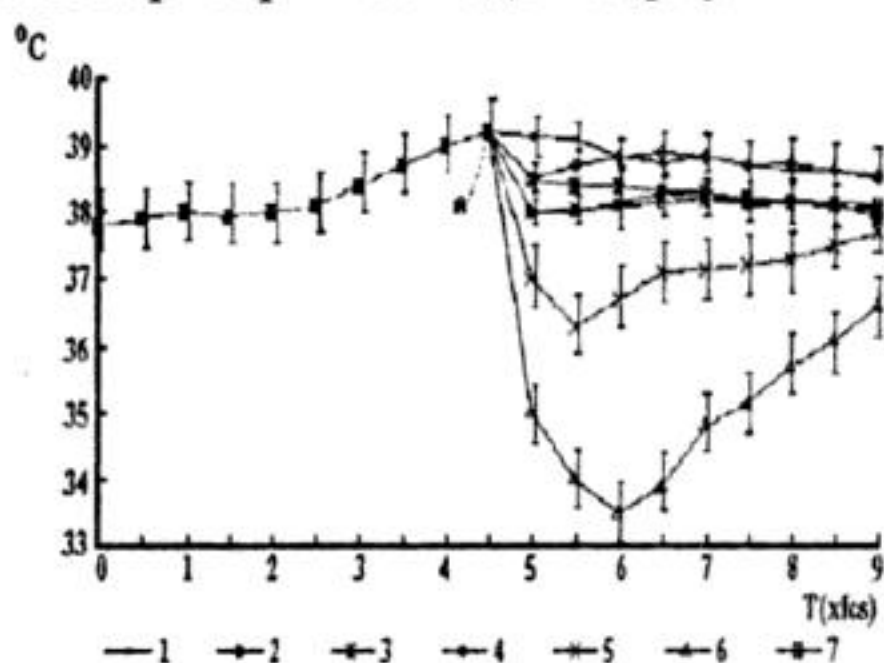


Рис. 1. Жаропонижающая активность фракций 1–1 кД из якутской лошади и якутского суслика *Citellus undulatus*: 1 – контроль, $n=10$, 2 – “зимняя” фракция мозга якутской лошади в дозе 30 мг/кг, $n=7$, 3 – “зимняя” фракция мозга якутской лошади в дозе 100 мг/кг, $n=6$, 4 – “летняя” фракция мозга якутской лошади в дозе 1000 мг/кг, $n=5$, 5 – “зимняя” фракция из кишечника (первичной экстракции) якутского суслика (*Citellus undulatus*) в дозе 1000 мг/кг, $n=5$, 6 – “зимняя” фракция мозга якутской лошади в дозе 1000 мг/кг, $n=5$

повлияло на время восстановления животными исходной температуры к 9-му ч наблюдений. При внутрибрюшинном введении фракции в дозе 100 мг/кг эффект наступил через 30 мин и продолжался в течение 2 ч (рис. 1) с последующим восстановлением исходной температуры к 9-му ч наблюдения. Особо мощный эффект наблюдался при введении фракции в дозе 1000 мг/кг, когда понижение температуры происходило не только до исходной температуры, но и намного ниже. Восстановления до исходной температуры так и не произошло даже к 9-му ч наблюдения. При введении контрольного препарата, в качестве которого использовали аспирин, наблюдалось снижение температуры тела крыс до 38,5 °С через 1–1,5 ч после инъекции (рис. 1). Интересно, что фракция из мозга якутской лошади, выделенная в летний период и вводимая в дозе 1000

На рис. 1 показана динамика жаропонижающей активности биологически активных фракций, выделенных из холодоадаптированных и зимнеящих животных. Видно, что все (без исключения) исследуемые фракции обладают жаропонижающим эффектом в большей или меньшей степени, в зависимости от концентрации, а также от того, в какой сезонный период (зима или лето, была выделена эта фракция.

При внутрибрюшинном введении фракции 1–10 кД из мозга якутской лошади в дозе 30 мг/кг уже через 30 мин регистрировали максимальное понижение повышенной температуры, но этот эффект был кратковременным и уже через 2,5 ч температура у животных была такая же, как и в контроле. Следует отметить, что введение фракции никак не

мг/кг, не обладала таким мощным эффектом, а ее действие было похоже на эффект введения «зимней» фракции в дозе 100 мг/кг. Такая сезонная зависимость действия фракций подтверждается в ранее проведенных исследованиях [2–4, 6–10, 13–15]. Исходя из анализа ранее опубликованных данных [4, 6, 7, 15], можно предположить, что механизм жаропонижающего действия этих фракций связан со снижением метаболических процессов в организме, в результате чего может происходить снижение синтеза вторичных пирогенов, вызывающих повышение температуры тела.

В результате проведенных исследований противовоспалительной активности фракции 1–10 кД органов и тканей из якутского суслика и якутской лошади на модели острого воспаления, вызванного инъекцией каррагинина, установлено, что ее внутрибрюшинное введение понижает развитие отечной реакции у мышей (рис. 2). Так, внутрибрюшинное введение фракций 1–10 кД, выделенной из мозга якутской лошади в зимний период, в дозе 30 мг/кг вызывало уменьшение отека лапы на $48,41 \pm 4,68\%$, по сравнению с контрольной группой животных. Соответственно при введении фракции в дозе 100 мг/кг активность составляла $59,83 \pm 4,92\%$ и при введении фракции в дозе 1000 мг/кг – $77,0 \pm 8,7\%$. Для сравнения, один из наиболее эффективных противовоспалительных препаратов «Вольтарен» в дозе 8 мг/кг обладает противовоспалительным действием $53,7 \pm 9,2\%$ [13]. При внутрибрюшинном введении раствора фракции, выделенной из мозга, наблюдали уменьшение отека на $75,18 \pm 8,24\%$, по сравнению с контролем, а при внутрибрюшинном введении мышам фракции 1–10 кД, выделенной из кишечника (первичной экстракции) якутского суслика, отек снижался на $51,04 \pm 6,74\%$ (рис. 2).

Заслуживает внимания тот факт, что при введении «зимней» фракции 1–10 кД из мозга якутской лошади с увеличением дозы увеличивается антиэкссудативная активность фракции. Важно отметить и то, что фракции 1–10 кД, выделенные из мозга холодоадаптированного животного – якутской лошади и гибернирующего животного – якутского суслика в одних и тех же концентрациях обладают примерно одинаковыми эффектами (рис. 2). Так, фракция 1–10 кД якутской лошади в дозе 1000 мг/кг обладает противовоспалительной активностью $77,01 \pm 8,74\%$, а фракция 1–10 кД, выделенная из мозга якутского суслика (*C. undulatus*) в период зимней спячки, обладает противовоспалительной активностью $75,13 \pm 8,24\%$, что подтверждает и наличие некоего общего активного вещества в организмах этих животных. Следует отметить, что противовоспалительный эффект фракции 1–10 кД имеет сезонную зависимость (зима, лето). Так, если сравнивать противовоспалительный эффект фракции из мозга якутской лошади, выделенной в разное сезонное время (осенне-зимний и летний периоды), при введении одной и той же концентрации (1000 мг/кг) видно (рис. 2), что «зимняя» фракция обладает более выраженным антиэкссудативным эффектом $77,01 \pm 8,74\%$, чем «летняя» – $21,17 \pm 5,46\%$.

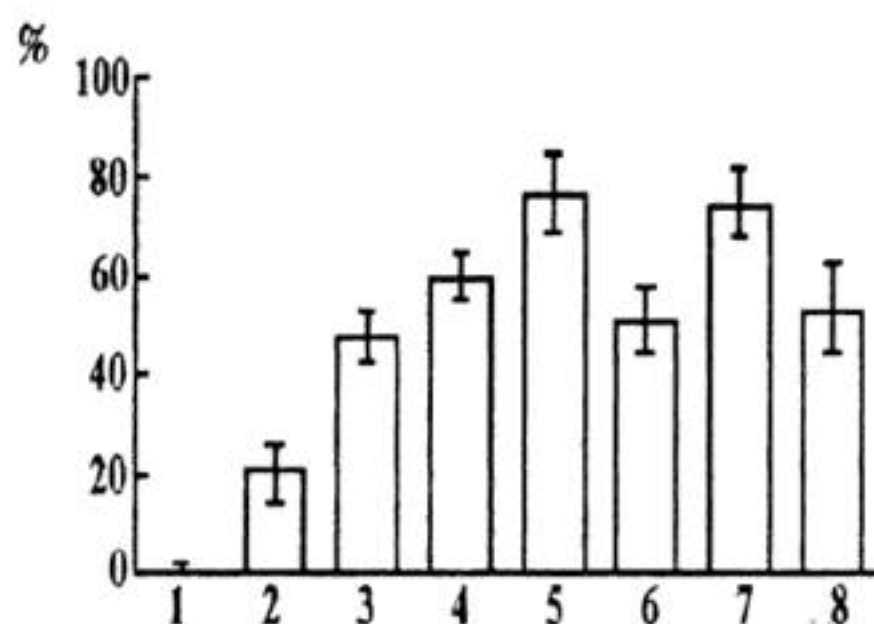


Рис. 2. Антиэкссудативная активность фракций 1–10 кД из якутского суслика *C. undulatus* и якутской лошади: 1 – контроль (без инъекций), $n=20$; 2 – «летняя» фракция мозга якутской лошади в дозе 1000 мг/кг, $n=6$; 3 – «зимняя» фракция мозга якутской лошади в дозе 30 мг/кг, $n=12$; 4 – «зимняя» фракция мозга якутской лошади в дозе 100 мг/кг, $n=8$; 5 – «зимняя» фракция мозга якутской лошади в дозе 1000 мг/кг, $n=6$; 6 – «зимняя» фракция из кишечника (первичной экстракции) якутского суслика *C. undulatus* в дозе 1000 мг/кг, $n=6$; 7 – «зимняя» фракция из мозга якутского суслика *C. undulatus* в дозе 1000 мг/кг, $n=6$; 8 – «вольтарен» в дозе 8 мг/кг, $n=6$

Поскольку механизм действия фракций в настоящее время малоизучен, судить о противовоспалительном механизме действия этих биологически активных фракций пока преждевременно. Можно предположить, что он может быть связан как с влиянием на общий метаболизм в организме [4, 6, 7, 15], так и опосредованно, через влияние на транспорт ионов Ca^{2+} , которые принимают активное участие в процессах регуляции клеточного метаболизма [3] и синтеза гормонов «воспаления», например, простагландинов [1].

Таким образом, фракции 1–10 кД, выделенные из мозга якутской лошади, а также из мозга и кишечника якутского суслика (*Citellus undulatus*) обладают выраженным жаропонижающим и противовоспалительным эффектами. Величина этих эффектов зависит от дозы и времени забора материала (зима или лето). Фракции, выделенные из разных животных (якутская лошадь, якутский суслик), но в один и тот же сезон (зима или лето), вводимые в одинаковой дозе (степень их очистки тоже одинакова) обладают сходными по силе жаропонижающим и противовоспалительным эффектами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варфоломеев С.Д., Мевх А.Т. Простагландины—молекулярные биорегуляторы. — М.: Мир, 1985. — 225 с.
2. Гончаревская О.А., Монин Ю.Г., Крамарова Л.И. и др. Роль низкомолекулярной фракции, выделенной из кишечника гибернирующих сусликов, в регуляции транспорта электролитов и воды в почечном канальце // Докл. АН СССР. — 1988. — 298, N 1. — С. 228–231.
3. Гулевский А.К., Терещенко О.С., Загнойко В.И. Влияние фракции 1–10 кД мозга якутской лошади на кинетические параметры Ca^{2+} транспортирующих систем в везикулах сарколеммы кардиомиоцитов // Бюл. эксп. биол. и мед. — 1992. — N 9. — С. 274–278.
4. Иваницкий Г.Р., Колаева С.Г., Пастухов Ю.Ф. и др. Эффект выраженного снижения метаболизма у теплокровных эндогенными веществами из тканей зимоспящих в состоянии спячки // Докл. АН СССР. — 1982. — 267, N 2. — С. 978–980.
5. Иванов Ю.И., Погорелюк О.Н. Обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах // М.: Медицина, 1990. — 220 с.
6. Игнатъев Д.А., Колаева С.Г., Крамарова Л.И., Кравченко И.И. Гипотермическое влияние на мышечной фракции 1–10 кД тонкой кишки гибернирующего суслика *Citellus undulatus* в условиях гипоксии и гиперкапнии // Журн. эволюц. биохим. и физиол. — 1989. — 25. — С. 318–323.
7. Игнатъев Д.А., Колаева С.Г., Михалева И.И. и др. Результаты тестирования некоторых биологически активных фракций, выделяемых из тканей зимоспящих // Механизмы зимней спячки. — Пушкино: Б.и., 1987. — С. 106–118.
8. Коккоз Ю.М., Накимова О.В., Свиричев В.И. и др. Действие веществ, содержащихся во фракциях мозга и тонкой кишки гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*), на возбудимость миокардных волокон // Механизмы зимней спячки. — Пушкино: Б.и., 1987 — С. 106–118.
9. Колаева С.Г., Крамарова Л.И., Иваницкий Г.Р. и др. Влияние низкомолекулярных фракций, выделенных из мозга и слизистой оболочки кишки сусликов *Citellus undulatus* в состоянии спячки, на оплодотворение яйцеклетки морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* // Докл. АН СССР. — 1984. — 279. — С. 755–757.
10. Сухова Г.С., Игнатъев Д.А., Ахременко А.К. и др. Кардиотропная, гипометаболическая и гипотермическая активность пептидных фракций из тканей зимоспящих и холодоадаптированных животных // Журн. эволюц. биохим. и физиол. — 1990. — N 5. — С. 623–629.
11. Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д. Соотношение антиэкссудативного, анальгетического и жаропонижающего компонентов в действии нестероидных противовоспалительных препаратов // Фармакол. и токсикол. — 1981. — N 5. — С. 49–52.
12. Яковлева Л.В., Зупанец И.А., Дроговоз С.М. и др. Взаимосвязь антиальтеративного и антипролиферативного эффектов индометацина, вольтарена, пироксикама и D-глюкозамина // Фармакол. и токсикол. — 1988. — N 3. — С. 70–72.
13. Amorese P., Swan H., Bamburgh R. Extracts from the brain of hibernating and alert ground squirrels: Effects on cells in culture // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1982. — 79. — P. 6375–6380.
14. Myers R.D., Oeltgen P.R., Spurrier W.A. Hibernation «trigger» injected in brain induces hypothermia and hypophagia in the monkey // Brain. Res. Bull. — 1987. — 7, N 6. — P. 691–695.
15. Swan S., Beinhart F., Carpio D. Schatte Antimetabolic extract from the hibernating ground squirrel *Citellus tridecemlineatus* // Cryobiology. — 1981. — 18, N 6. — P. 598–602.
16. Swan H., Schatte B. Hypometabolic brain peptide from vertebrates capable of torpor // Science. — 1977. — 195. — P. 84–86.

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

Поступила 20.10.93

О.С.ТЕРЕЩЕНКО, О.К.ГУЛЕВСЬКИЙ, В.І.ЗАГНОЙКО

ПРОЯВЛЕНИЯ ЖАРОПОНИЖАЮЩЕГО И ПРОТИЗАПАЛЮВАЛЬНОГО ЭФЕКТА ДЕЙСТВИЯ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРАКЦИЙ 1-10 КД, ВИДЕЛЕННЫХ ИЗ ТКАНИН ЗИМОСПЯЩИХ И ХОЛОДОАДАПТОВАННЫХ ТВАРИН

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини, м. Харків

Досліджували жаропонижачу і протизапалювальну активність біологічно активних фракцій 1-10 кД, виділених із органів і тканин холодоадаптованих і здатних впадати у зимову сплячку тварин. Показано, що фракції 1-10 кД, виділені із мозку якутського коня, а також із мозку і кишечника гібернуючого ховраха (*Citellus undulatus*) мають виразний жаропонижачий і протизапалювальний ефекти у концентрації від 1000 мг/кг до 30 мг/кг. Ефективність знаходиться у залежності не лише від дози введеної речовини, але і від часу, коли взято матеріал (зима або літо).

O.S.TERESHENKO, A.K.GULEVSKY, V.I.ZAGNOIKO

ANTIPYRETIC AND ANTIINFLAMMATORY ACTION OF THE LOW MOLECULAR FRACTIONS OF 1-10 kD, ISOLATED FROM THE TISSUES OF THE HIBERNATING AND COLD-ADAPTED ANIMALS

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

We have studied antipyretic and antiinflammatory activity of the biologically active fractions of 1-10 kD, isolated from the organs and tissues of the cold-adapted and hibernation-capable animals. Fractions of 1-10 kD, isolated from the brain of Yakut horse and intestine of the hibernating ground squirrels *Citellus undulatus*, have been shown to possess a manifested antipyretic and antiinflammatory action when take in the concentrations of 1,000 mg/kg +/- 30 mg/kg. The strength of these action depends not only on the dose of the material being injected, but on the season of its collection as well (in summer or in winter). The degree of its purification is also very important.

УДК 591.543.42.436

Т.П.Говоруха, В.Ф.Козлова, Н.В.Репин

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ СУСЛИКОВ ПРИ ЕСТЕСТВЕННОМ ГИПОБИОЗЕ

Представлены макро- микро- и электронно-микроскопическая характеристики структур печени гетеротермных животных, находящихся в различных стадиях зимней спячки. Показано развитие морфофункциональных перестроек клеток органа, обеспечивающих его адаптивные процессы в цикле гибернация-пробуждение животного.

В ходе эволюции у млекопитающих выработалось несколько механизмов адаптации к холоду, характеризующихся или активацией термогенеза и большими энергозатратами у гомойотермов, или естественным снижением температуры тела у зимнеспящих животных. В первом случае создание искусственной гипотермии путем выключения термогенеза вызывается с помощью введения фармакологических препаратов. Поиск новых природных средств для получения управляемых гипометаболических состояний организма представляет важный научный и практический интерес, как и изучение самого феномена зимней спячки млекопитающих. Уникальной моделью для этого служат зимние суслики на различных этапах спячки, суточные колебания температуры тела которых могут достигать 30 °С.

В литературе в большей мере освещены физиологические особенности и биохимическое функционирование различных систем организма зимнеспящих [2, 5, 8]. Показано, что при впадении в зимнюю спячку у животных происходит подавление уровня основного метаболизма с преимущественным ингибированием АТФ потребляющих процессов, хотя активность ряда биохимических реакций сохраняется на достаточно высоком уровне. Придается боль-

шое значение липидному обмену веществ [4, 5]. Характерным для гибернирующих млекопитающих является наличие тканевой биохимической адаптации к действию низких температур, а также лабильность обменных процессов от их минимума до гиперактивации при пробуждении [1, 8]. Морфологические перестройки клеток, тканей и органов в системе организма мало изучены [3, 6, 7].

В работе предпринята попытка выяснить, существуют ли различия в структуре печени зимнеявляющегося суслика, находящегося в трех физиологических состояниях — гибернации, пробуждения и бодрствования. Эксперименты проведены на половозрелых якутских длиннохвостых сусликах (*Citellus undulatus*), находящихся в зимнее время (январь-февраль) в различных состояниях гибернации: спящие (РТ 4–6 °С), просыпающиеся и активные (РТ 35–37 °С). Объектом исследования служили фрагменты печени.

После декапитации и патологоанатомического вскрытия у животных извлекалась печень, кусочки которой фиксировали в 10%-м растворе формалина для гистологического и гистохимического исследования. Материал обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в целлоидин-парафин. Окраска срезов толщиной 5–7 мкм проводилась гематоксилином Эрлиха и эозином. Ставилась сочетанная реакция по определению комплекса полисахаридных соединений по Моури. Гликозаминогликаны в структурах выявляли альциановым синим, гликопротеины — реактивом Шиффа. Фосфолипиды идентифицировали суданом черным "В", нейтральные жиры — суданом III и IV. Просмотр препаратов осуществляли на микроскопе МБР-3. Проведен учет количества полиплоидных и митотически делящихся гепатоцитов (в %). Цифровой материал подвергали статистической обработке по методу Стьюдента-Фишера.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки печени фиксировали в 2%-м растворе глутаральдегида и постфиксировали в 1%-м растворе OsO_4 . После фиксации образцы обезживали ацетоном восходящей концентрации и пропитывали смесью эпон-аралдит, а затем полимеризовали при 60 °С. Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца по Рейнольдсу. Ультраструктуру гепатоцитов исследовали с помощью электронного микроскопа ЭМВ-100 БР при ускоряющем напряжении 75 кВ.

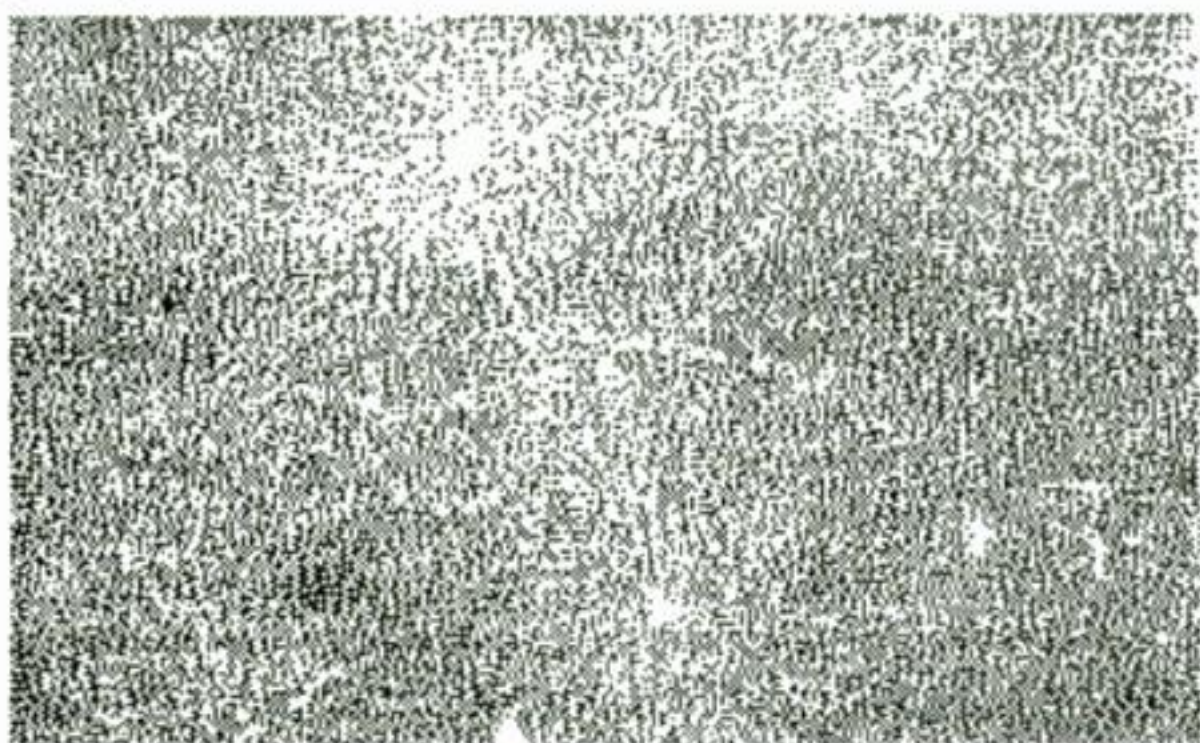


Рис. 1. Уплотнение ткани печени спящего суслика. Гематоксин и эозин. X 60

сосудов и капилляров, интенсивно окрашивающихся реактивом Шиффа и суданом черным "В", что идентифицирует наличие в них гликопротеинов и фосфолипидов. Богата фосфолипидами также и депонированная кровь (мембраны эритроцитов). Паренхима печени слегка обезжжена. Она представлена относительно однородными, уплотненными, темными гепатоцитами с гиперхромными ядрами. Клетки содержат значительное количество гликогена и следы

В результате макро- и микроскопического исследования установлено, что печень спящих сусликов отличается депонированием крови в воротных венах и печеночных артериях, а также в синусоидных капиллярах, располагающихся в зонах триад. Центральные вены и прилежащие к ним синусоиды почти не содержат крови. Наблюдается утолщение стенок портальных

нейтральных жиров. Функционально активными являются стромальные элементы органа, однако разрастаний соединительной ткани в печени не наблюдается, ее небольшие прослойки встречаются только в зоне триад (рис. 1).

По данным электронно-микроскопического исследования, гепатоциты спящего животного характеризуются полигональной формой, ограничены четкой плазмолеммой. Ядра имеют округлую форму и ровный контур. Гетерохроматин в виде различных скоплений определяется вблизи ядрышка и ядерной мембраны, повышая плотность кариоплазмы. В цитоплазме зернистая эндоплазматическая сеть представлена узкими канальцами. Многочисленные округлые митохондрии имеют мелкогранулярный матрикс (рис. 2). Внутренний сетчатый аппарат располагается вблизи ядра и состоит из уплотненных цистерн, а также мелких везикул. В цитоплазме обнаруживается большое количество липидных капель и лизосом.

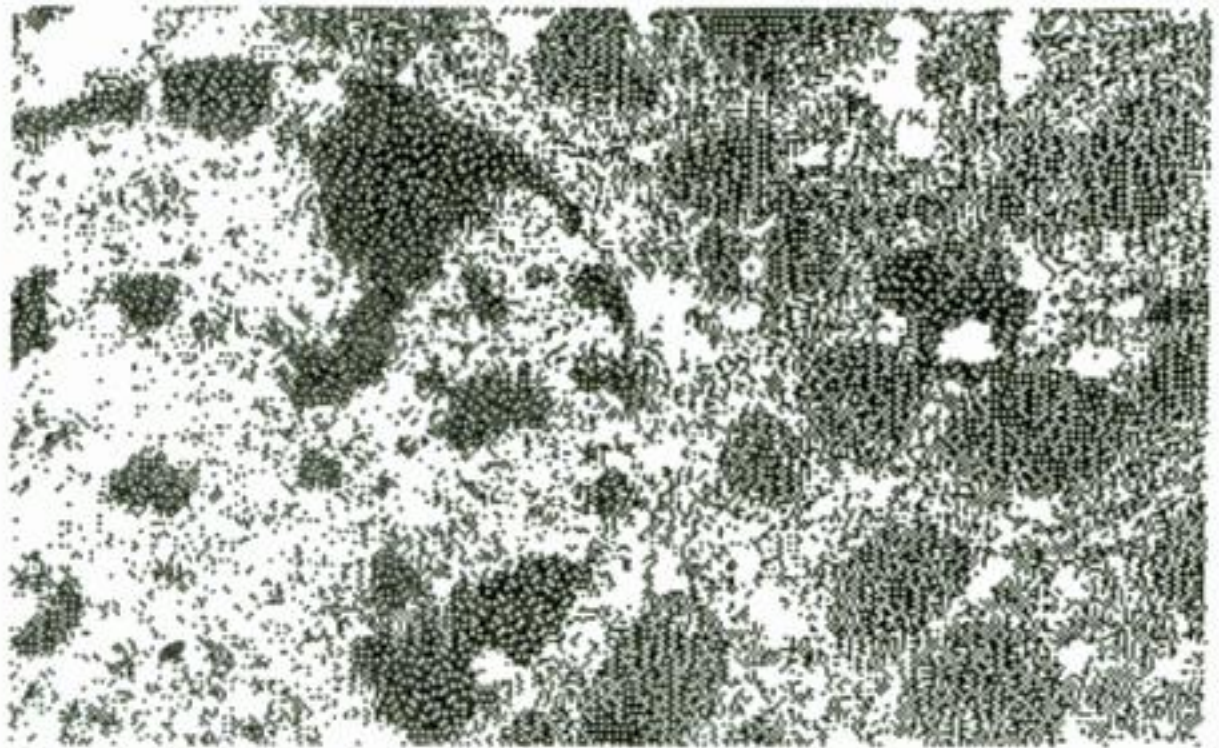


Рис. 2. Ультраструктура фрагмента гепатоцита спящего суслика: митохондрии с мелкогранулярным матриксом, окруженные узкими канальцами эндоплазматической сети. X 17200

После пробуждения печень сусликов характеризуется относительным оводнением и дистрофией тканей, а также резкой гиперактивацией всех протекающих процессов. Кровеносные сосуды равномерно кровенаполнены, их стенки разрыхлены, эндотелий набухший. В соединительнотканной основе органа, в портальных зонах отмечается уменьшение содержания липидов и гликопротеинов и появление гликозамингликанов, играющих важную роль в поддержании водно-солевого гомеостаза. Округлены и увеличены в размерах Купферовы клетки, в некоторых случаях они содержат фагоцитозные пузырьки и превращаются в свободные макрофаги.

Вариабельностью морфофункционального состояния отличается паренхима печени. В ней обнаруживается полимофный состав гепатоцитов от гипертрофированных, активно функционирующих клеток до дистрофически измененных и погибающих. Наряду с двуядерными определяется до 20% одноядерных гигантских полиплоидных клеток с ги-



Рис. 3. Жировая дистрофия печени суслика после пробуждения. Гематоксилин и эозин. X 60

перхромными ядрами, плотно упакованными глыбками гетерохроматина. Встречаются митотически делящиеся гепатоциты ($0,9 \pm 0,2\%$). Но самый показательный морфологический ориентир для печени описываемых экспериментальных животных — появление гепатоцитов в различных стадиях жирового перерождения, разбросанных диффузно в паренхиме или располагающихся гроздьями преимущественно в зонах триад (рис. 3). Степень выраженности дистрофических изменений в печени у разных индивидуумов различна и коррелирует с потерями клетками гликогена.



Рис. 4. Ультраструктура фрагмента гепатоцита пробуждающегося суслика: митохондрии с просветленным матриксом; расширенные каналцы эндоплазматической сети. X 16900

матин обнаруживается в виде крупных глыбок по всей нуклеоплазме. Глобулярно-фибриллярная структура ядрышек не изменяется. В цитоплазме зернистая эндоплазматическая сеть в виде узких каналцев хаотично располагается по всей клетке или в непосредственной близости от митохондрий. Отдельные гепатоциты имеют расширенные каналцы эндоплазматической сети (рис. 4). Изредка в таких клетках обнаруживаются митохондрии с просветленным матриксом. Большинство же митохондрий — с отчетливо выраженными кристами, мелкогранулярным матриксом средней электронной плотности. В цитоплазме гепатоцитов определяются скопления липидных включений, формирующие своеобразные поля.

Печень активных сусликов умеренно кровенаполнена. Она представлена относительно однородным клеточным составом паренхимы, где преобладают эозинофильные гепатоциты с округлыми светлыми ядрами и равномерно распределенным хроматином и ядрышками. В зонах триад располагаются темные гликогеносодержащие гепатоциты с гиперхромными ядрами. В реактивном состоянии находятся эндотелиоциты синусоидов и Купферовы клетки. Для ультраструктуры цитоплазмы гепатоцитов активных сусликов не отмечено качественных различий по сравнению с цитоплазмой гепатоцитов спящих животных.



Рис. 5. Гипертрофия и дистрофия клеток печени суслика после пробуждения. Гематоксилин и эозин. X 60

понирующих сосудов, обезвоживанием тканей и реактивностью стромальных элементов, а также большим объемом гликопротеинов и липидов. Увеличивается доля конденсированного хроматина и жировых включений в цитоплазме гепатоцитов, уменьшается средний размер митохондрий при достоверном возрастании их количества, происходит частичная везикуляция сетчатого аппа-

Электронно-микроскопические исследования также свидетельствуют о гетерогенности структуры цитоплазмы и ядра. Значительная часть гепатоцитов с округлым ядром, в котором мелкодисперстный хроматин рассеян по всей нуклеоплазме, а глыбчатые скопления его наблюдаются только вблизи ядрышка и ядерной мембраны. В то же время в части клеток конденсированный хро-

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что морфофункциональное состояние печени длиннохвостых сусликов, находящихся в стадии гibernации, в отличие от активных животных, характеризуется ситуационной перестройкой кровообращения, появлением большого количества капилляров “закрытого типа” и полнокровием де-

рата. В период пробуждения животного в морфофункциональном состоянии печени отмечены гиперактивация процессов кровообращения, гипертрофия и дистрофия клеток паренхимы, распад гликопротеиновых и липидных комплексов. В гепатоцитах наблюдается гетерогенность структуры цитоплазмы и ядра (рис. 5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гогидзе Е.А., Жегунов Г.Ф. Особенности обмена белков у зимоспящих животных // II Межд. конф. "Успехи современной криобиологии": Тез. докл. – Харьков: Б. и., 1992. – С. 41, 42.
2. Гулевский А.К., Загнойко В.И. Некоторые молекулярные и клеточные механизмы холодовых адаптаций // II Межд. конф. "Успехи современной криобиологии": Тез. докл. – Харьков: Б. и., 1992. – С. 49.
3. Загоруйко Г.Е. Кинетика структурных изменений миокарда сусликов в процессе их пробуждения во время зимней спячки // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 2. – С. 3–12.
4. Механизмы зимней спячки. – Пушино: ПНЦ ИБК АН СССР, 1987. – 206 с.
5. Механизмы зимней спячки: Тез. докл. Всесоюз. симпоз. – Махачкала: Б. и., 1990. – 147 с.
6. Репина С.В., Репин Н.В. Структурные перестройки в эритроцитах зимоспящих сусликов // II Межд. конф. "Успехи современной криобиологии": Тез. докл. – Харьков: Б. и., 1992. – С. 149–150.
7. Филлюшина Е.Е., Адонина Л.В. Сезонные особенности ультраструктурной организации печени гибернантов и активных зимой животных // Механизмы природных гипометаболических состояний. – Пушино: ПНЦ ИБК АН СССР, 1991. – С. 58–66.
8. Эмирбеков Э.Э., Львова С.П. Биохимические особенности зимоспящих животных // II Межд. конф. "Успехи современной криобиологии": Тез. докл. – Харьков: Б. и., 1992. – С. 207–208.

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

Поступила 19.01.94

Т.П.ГОВОРУХА, В.П.КОЗЛОВА, М.В.РЕПІН

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ХОВРАХІВ ПІД ЧАС ПРИРОДНОГО ГІПОБІОЗА

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м.Харків

Подана макро-, мікро- і електронно-мікроскопічна характеристика структур печінки гетеротермних тварин, що знаходяться у різних стадіях зимової сплячки. Показано розвиток морфофункціональних перебудов клітин органу, котрі забезпечують його адаптивні процеси у циклі гібернація-пробудження тварини.

T.P.GOVORUKHA, V.F.KOZLOVA, N.V.REPIN

MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN THE LIVER DURING NATURAL HYPOBIOSIS

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

The given report deals with the macro-, micro- and electron-microscopic characteristics of the structures of the liver of hibernating heterothermic animals. The development of the morpho-functional re-arrangements of the cells of the organ has been shown, which provide for the occurrence of the adaptive processes in the hibernation-arousal cycle of the animal.

УДК 611.018.51:57.043

С.В.Пателарос

ИССЛЕДОВАНИЕ КАТИОН-ЗАВИСИМОГО ЛИЗИСА РЕГИДРАТИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Исследуется влияние дивалентных катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} на лизис эритроцитов, регидратированных в электролитных и неэлектролитных изотонических средах, после предварительной инкубации в условиях гипертонии. Ионы Ca^{2+} и Zn^{2+} могут как активировать, так и ингибировать постгипертонический лизис эритроцитов. Наиболее сильный ингибирующий эффект оказывают ионы Zn^{2+} , а ионы Mg^{2+} не влияют на гемолиз клеток. Модулирование постгипертонического лизиса дивалентными катионами является результатом их взаимодействия с мембранными

ми сайтами, регулирующими количество или размеры гемолитических пор и обладающими по отношению к катионам различной специфичностью и аффинностью. Активация мембранных сайтов происходит в стадии регидратации клеток в изотонической среде, а не в условиях гипертонической инкубации.

Постгипертонический лизис (ПЛ) эритроцитов наблюдается при переносе их из гипертонических в изотонические электролитные и неэлектролитные среды и является одним из главных факторов криоповреждения клеток при низкотемпературном консервировании [1, 8, 10]. ПЛ представляет собой специфическое и малоисследованное повреждение клетки, связанное с избыточной потерей внутриклеточной воды и изменениями физико-химических свойств цитоплазмы. В настоящее время молекулярные механизмы повреждения эритроцитов при регидратации и дегидратации остаются неизвестными. С другой стороны, показано, что дивалентные катионы Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} оказывают стабилизирующее влияние на мембрану при ее взаимодействии с различными гемолитическими агентами, такими как вирус Сендай, α -токсин, мелиттин или тритон X-100, где они ингибируют гемолиз, индуцированный этими агентами [2-5, 9].

Целью настоящего исследования было выяснение меры влияния дивалентных катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} на лизис эритроцитов, дегидратированных в электролитных и неэлектролитных гипертонических средах, и в последствии регидратированных в изотонических средах с высокой и низкой ионной силой.

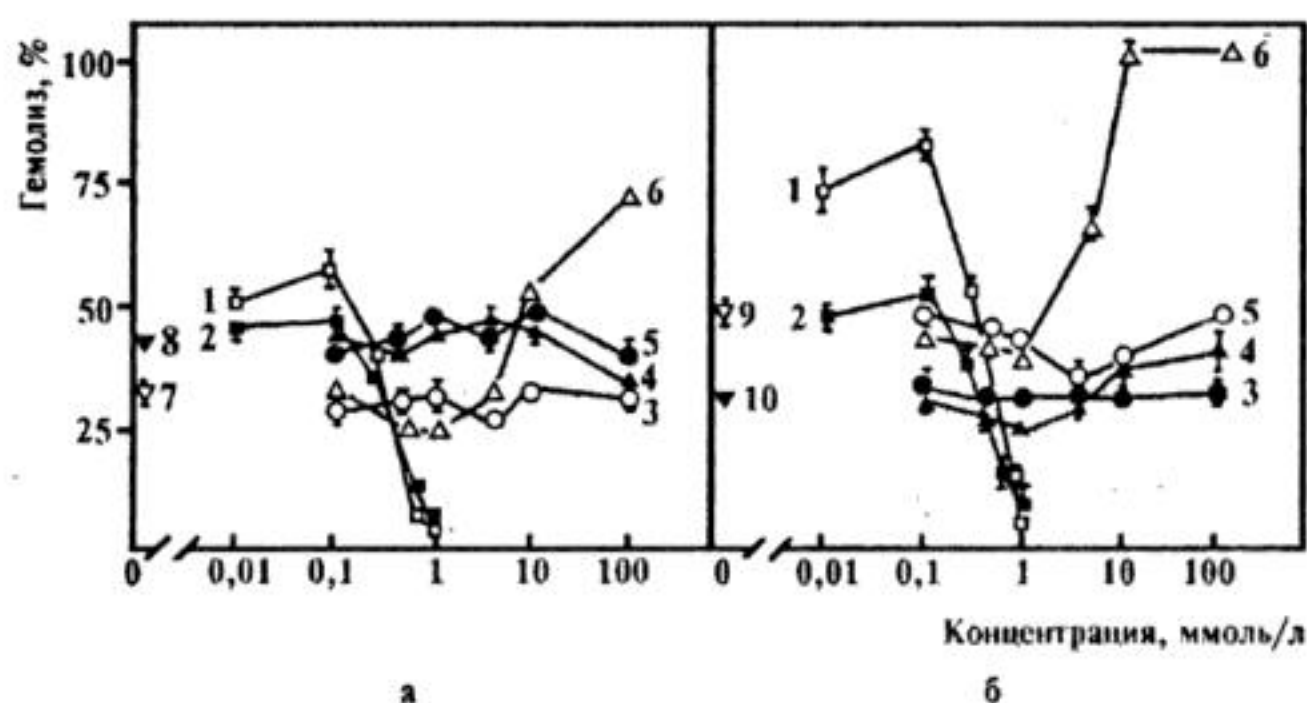


Рис. 1. Влияние дивалентных катионов Mg^{2+} (1, 3), Ca^{2+} (2, 4) и Zn^{2+} (5, 6) на гемолиз эритроцитов, регидратированных в изотонических средах NaCl (а) и сахарозы (б) в присутствии ионов после 15 мин инкубации при 37 °С в гипертонических растворах 1,5 М NaCl (3, 4, 7) и 1,2 М сахарозы (5, 6, 8); 7, 8 (а), 9, 10 (б) — уровень лизиса при регидратации клеток в средах без катионов

В работе использованы донорские эритроциты второй группы (А), заготовленные на консерванте Глюгидир со сроком хранения не более 5 дней. Клетки трижды подвергались отмывке физиологическим раствором (150 мМ NaCl, 20 мМ *трис*-HCl, pH 7,4) с центрифугированием (3000 об/мин, 3 мин) и удалением надосадочной жидкости. В дальнейшем 100 мкл полученного осадка инкубировались в 0,9 мл гипертонических сред 1,5 NaCl или 1,2 М сахарозы, приготовленных на 5 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), при температуре 37 °С в течение 15 мин. В тех же условиях клетки обрабатывались ионами Ca^{2+} (100 мМ) и Zn^{2+} (0,1; 1 мМ) и дополнительно ионами Zn^{2+} в сочетании или в отсутствие ионофора А 23187 (5 мкМ). После гипертонической инкубации 10 мкл суспензии при комнатной температуре 20–22 °С переносились в 1 мл изотонических сред, содержащих дивалентные катионы Ca^{2+} , Mg^{2+} (0,1–100 мМ) и Zn^{2+} (0,01–1 мМ), а через 5 мин подвергались центрифугированию (3000 об/мин, 2 мин) и в надосадочной жидкости спектрофотометрическим методом на длине волны 415 нм определялся уровень свободного гемоглобина по отношению к 100-процентному лизису такого же количества клеток, индуцированному тритоном X-100 (1%). В работе был использован ЭДТА (10 мкМ; 0,01–1 мМ), который добавлялся в среду регидратации до и после внесения туда клеток.

На рис. 1, а, б представлены данные о влиянии различных концентраций дивалентных катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} на уровень лизиса эритроцитов, инкубированных в гипертонических средах NaCl и сахарозы, и перенесенных в изотонические среды различного состава. Видно, что уровень гемолиза зависит от состава среды дегидратации, а также от состава среды регидратации, в частности, от присутствия в ней дивалентных катионов. В низких концентрациях 0,1 мМ ионы Zn^{2+} активируют ПЛ, но при увеличении концентрации Zn^{2+} до 1 мМ наблюдается практически полное его ингибирование. Наиболее отчетливо фазы активирования и ингибирования ионами Zn^{2+} выражены в случае сахарозной среды дегидратации. Для гипертонической среды NaCl ингибирующее действие Zn^{2+} практически совпадает с таковым для сахарозы. Ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} не оказывают существенного влияния на уровень ПЛ, если клетки дегидратировались в гипертоническом растворе NaCl, однако в концентрации 100 мМ проявляют слабый ингибирующий эффект по сравнению с ионами Zn^{2+} . При дегидратации в неэлектролитной среде присутствие ионов Mg^{2+} также не оказывало влияния на уровень ПЛ, в то время как увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в регидратационной среде в концентрации более 5 мМ приводило к его активации. Отмеченные закономерности активирования и ингибирования ПЛ дивалентными катионами сохраняются для электролитных и неэлектролитных сред регидратации — различие между ними состоит в величине гемолиза, который также зависит и от состава дегидратирующих сред.

Таким образом, дивалентные катионы, находящиеся в среде регидратации, могут модулировать характер ПЛ, активируя или ингибируя его. Поскольку уровень лизиса в гипертонических условиях инкубации незначителен [2], можно сделать вывод о том, что гемолитические поры рождаются на этапе регидратации клеток. Это подтверждается фактом возрастания проницаемости мембраны для ионов Na^+ и сахарозы непосредственно на этапе восстановления объема клеток в условиях регидратации, предварительно инкубированных в гипертонической среде [6]. На основе этих данных можно предположить, что указанные катионы, как и в случае лизиса, индуцированного гемолитическими агентами [2–5, 9], взаимодействуют с различными компонентами (сайтами) клеточной мембраны, регулирующими размер или количество гемолитических пор, формирующихся при регидратации клеток.

Результаты исследований показывают, что ионы Ca^{2+} и Zn^{2+} при определенных концентрациях активируют ПЛ, причем концентрация ионов Zn^{2+} (0,1 мМ), требуемая для активации, намного меньше соответствующей концентрации ионов Ca^{2+} (>5 мМ). Другие катионы Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , холин при их введении в среду регидратации либо не влияют (Mg^{2+}), либо активируют ПЛ (Na^+ , K^+ , холин) [13–15].

Отличительной особенностью ПЛ, по сравнению с лизисом, вызванным действием гемолитических агентов [2–5, 9], является его способность активироваться катионами Zn^{2+} (0,1 мМ) и Ca^{2+} (>5 мМ), если последние входят в состав изотонической среды. Указанная активация схожим образом проявляется как в электролитной, так и неэлектролитной средах, т. е. не зависит от ионной силы. Хотя концентрация ионов Ca^{2+} , необходимая для проявления активирующего эффекта, является достаточно высокой, их действие не объясняется экранирующим эффектом, поскольку только инкубация эритроцитов в гипертонической среде, в присутствии ионов Ca^{2+} , приводит к исчезновению активирующего влияния Ca^{2+} и Zn^{2+} на ПЛ (рис. 4). Кроме того, концентрация ионов Zn^{2+} , при которой наблюдается эффект активации ПЛ, намного меньше, чем для Ca^{2+} (рис. 1, а, б).

Данные, полученные в ряде других работ, показывают, что дивалентные и многовалентные катионы ингибируют лизис, вызванный действием экзогенных агентов различной природы [2–5, 9]. Однако для модельных липидных

систем (липосом), сделанных из эритроцитарных мембран, явление активации лизиса дивалентными катионами не обнаружено [11]. Можно предположить, что для проявления активирующих свойств катионов Ca^{2+} и Zn^{2+} необходим белковый компонент эритроцитарной мембраны. На это указывает тот факт, что ингибирование лизиса в липидных системах требует в 10–100 раз большей концентрации Zn^{2+} , чем в случае эритроцитов [7, 11]. Различие в концентрациях ионов Ca^{2+} и Zn^{2+} , необходимых для проявления активирующего или блокирующего эффектов, указывает на различную аффинность и специфичность мембранных сайтов к указанным катионам. Для того, чтобы оценить обратимость связывания дивалентных катионов с сайтами, ионы Zn^{2+} , обладающее одновременно активирующим и блокирующим эффектом, вводились в среду регидратации в комбинации с хелатором катионов ЭДТА.

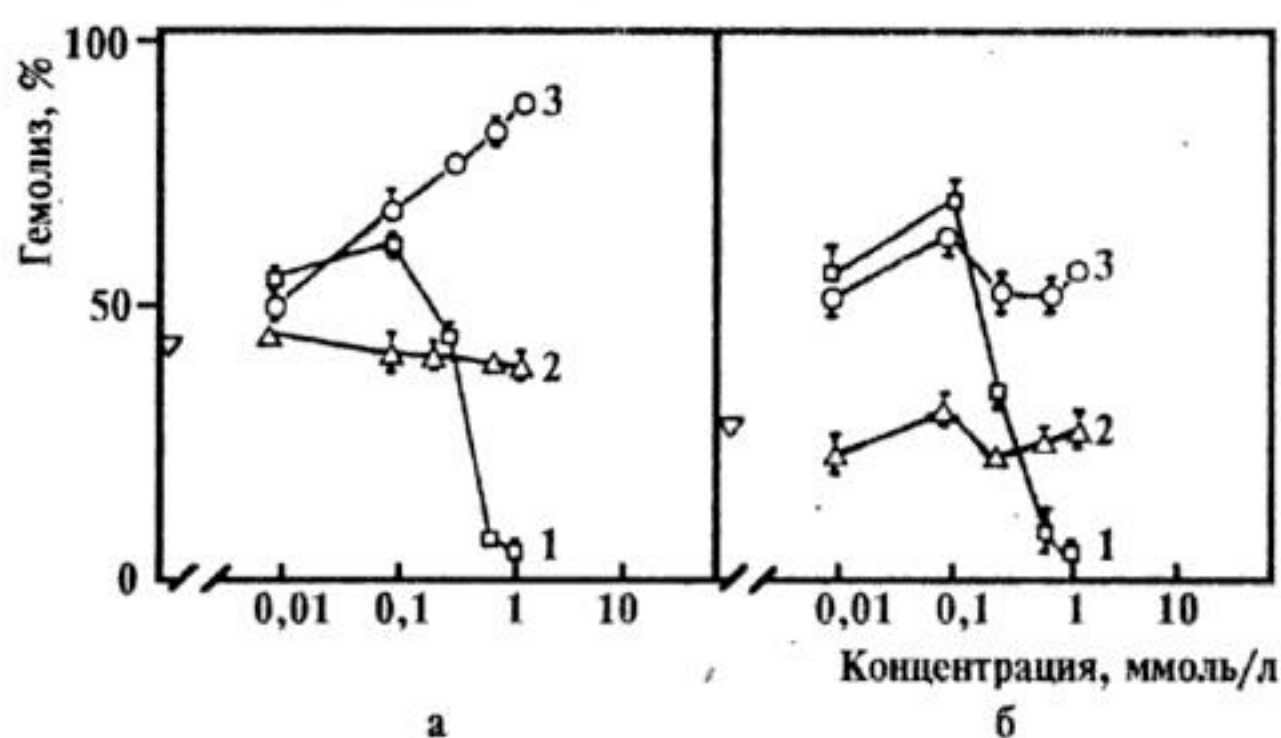


Рис. 2. Влияние ионов Zn^{2+} и ЭДТА на гемолиз эритроцитов, инкубированных 15 мин в 1,2 М растворе сахарозы при 37 °С и регидратированных в изотонических средах NaCl (а) и сахарозы (б), содержащих ионы Zn^{2+} (3), эквимольную смесь ионов Zn^{2+} и ЭДТА (1) или когда эквимольное количество ЭДТА было добавлено через 1 мин после введения клеток в среду регидратации (2)

Из данных, представленных на рис. 2, видно, что как в электролитной, так и в неэлектролитной среде регидратации эквимольная смесь ионов Zn^{2+} и ЭДТА устраняет полностью как активирующее, так и ингибирующее действие ионов Zn^{2+} . Если же эквимольные количества ЭДТА добавляются к клеткам через 1 мин после их помещения в изотонические среды, содержащие ионы Zn^{2+} , ингибирующее действие ионов устраняется и происходит активация гемолиза. Последний результат можно интерпретировать как способность ЭДТА удалять Zn^{2+} из соответствующих сайтов (блокирующих) и активировать гемолиз. При этом можно предположить, что константа связывания ($\log K$) ионов Zn^{2+} с активирующими сайтами больше, чем с блокирующими, поскольку активирующее действие ионов Zn^{2+} сохраняется и после введения ЭДТА. Таким образом, видно, что блокирование ПЛ ионами Zn^{2+} представляет собой обратимый процесс. Аналогичная закономерность характерна для активации и блокирования дефектов мембран, индуцированных мелиттином и вирусом Сендай, в случае которых удаление дивалентных катионов с помощью ЭДТА или отмывки эритроцитов также приводит к активации гемолиза и утечке катионов [2–5, 9].

Разнонаправленное действие катионов, а также зависимость их эффекта от ЭДТА позволяет предположить, что размер и структура гемолитической поры эритроцитов контролируется, по крайней мере, двумя типами сайтов, имеющими сродство к катионам. Один тип сайтов является активирующим и связывание его с катионами стимулирует ПЛ, а другой — ингибирующим, связывание с которым уменьшает размер пор вплоть до прекращения гемолиза. Наличие этих сайтов, обладающих ионной специфичностью и аффинностью, может удовлетворительно описать наблюдаемые закономерности активирования и блокирования ПЛ одними и теми же дивалентными катионами. Ионная специфичность этих сайтов подтверждается тем, что активация ПЛ вызывается только ионами Zn^{2+} или Ca^{2+} . Дивалентные катионы Mg^{2+} , как и многовалентные катионы, не способны связываться с этим типом сайтов и активировать ПЛ. Различная аффинность связи этих катионов доказывается тем, что

для Ca^{2+} нужна в 1000 раз более высокая концентрация по сравнению с ионами Zn^{2+} , чтобы вызвать активирующий эффект. Кроме того, блокировочные сайты обладают высокой аффинностью к катионам Zn^{2+} , так как Zn^{2+} одинаково хорошо блокирует ПЛ независимо от ионной силы среды (рис. 1, а, б).

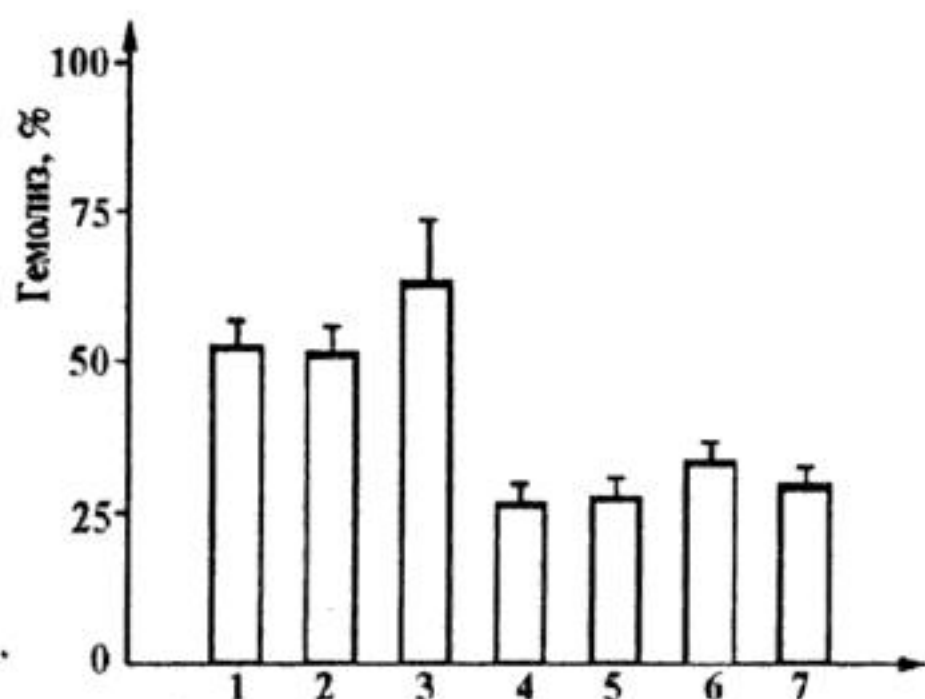


Рис. 3. Влияние обработки эритроцитов ионами Zn^{2+} и Ca^{2+} в гипертоническом растворе 1,2 М сахарозы на уровень гемолиза после регидратации в изотоническом растворе сахарозы: 1 – контроль, 2 – 0,1 мМ Zn^{2+} , 3 – 1 мМ Zn^{2+} , 4 – так же, как и 3, но клетки регидратировались в изотонической среде, содержащей 10 мкМ ЭДТА, 5 – 100 мМ Ca^{2+} , 6 и 7 – так же, как и 5 с тем отличием, что регидратация осуществлялась в изотонической среде, содержащей активирующие концентрации ионов Zn^{2+} (0,1 мМ) и Ca^{2+} (100 мМ) соответственно

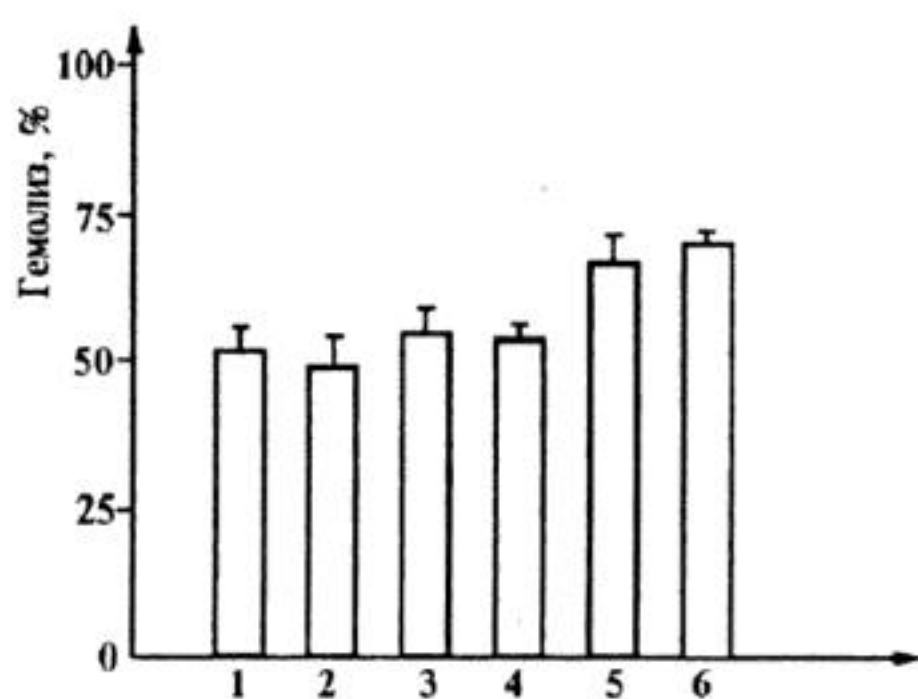


Рис. 4. Влияние катионов Zn^{2+} (0,1; 1 мМ) и ионофора А23187 (5 мкМ) на гемолиз регидратированных эритроцитов. Клетки инкубировались 15 мин в гипертонической сахарозе (1,2 М) при 37 °С в присутствии или в отсутствие А23187 и переносились в изотоническую среду NaCl (0,15 М); 1 – сахароза, 2 – сахароза + А 23187, 3 – сахароза + 0,1 мМ Zn^{2+} , 4 – сахароза + 0,1 мМ Zn^{2+} + А 23187, 5 – сахароза + 1 мМ Zn^{2+} , 6 – сахароза + 1 мМ Zn^{2+} + А 23187

Для определения возможной локализации активирующих и блокирующих сайтов на внутренней и наружной поверхности мембран клетки были обработаны гипертоническим раствором сахарозы в присутствии активирующих и блокирующих концентраций ионов Ca^{2+} и Zn^{2+} (рис. 3). Для той же цели дополнительно в указанных условиях клетки были обработаны дивалентными катионами в присутствии или в отсутствие ионофора А23187, способствующего транспорту катионов внутри клетки (рис. 4) [5]. Можно было предположить, что если сайты, ответственные за активирование или ингибирование ПЛ, локализованы на наружной поверхности мембран или появляются на ней при гипертонической инкубации, обработка клеток соответствующими концентрациями ионов должна привести к усилению соответствующего эффекта.

Данные, приведенные на рис. 3, показывают, что обработка эритроцитов в гипертонической сахарозе в присутствии блокирующих концентраций Zn^{2+} (1 мМ) стимулировала лизис, однако контрольный эксперимент показал, что этот эффект обусловлен остаточным действием иона на этапе регидратации, поскольку 10 мкМ ЭДТА в регидратирующей среде устраняли эффект активации. Аналогично активирующие концентрации ионов Ca^{2+} (100 мМ) не вызывали активации ПЛ, напротив, наблюдалось небольшое снижение гемолиза. Более того, обработка эритроцитов в гипертонической сахарозе ионами Ca^{2+} привела к исчезновению активирующего эффекта обоих ионов при регидратации.

Полученные данные позволяют высказать предположение о возможной локализации сайтов. Тот факт, что введение катионов Ca^{2+} и Zn^{2+} в гипертоническую сахарозную среду не оказало влияния на ПЛ, свидетельствует в пользу того, что активационные сайты, по крайней мере, не экспонированы на наружной поверхности мембран дегидратированных клеток. Полученных данных, однако, недостаточно для того, чтобы сделать определенный вывод об

их локализации внутри клетки. Вышеуказанные факты позволяют, кроме этого, заключить, что и блокировочные сайты не находятся на наружной поверхности мембраны дегидратированной клетки, поскольку ПЛ не блокируется катионами, находящимися в гипертонической среде. При этом можем предположить, что проявление активирующего или ингибирующего эффектов дивалентных катионов в соответствующих концентрациях в условиях изотонии обусловлено экспонированием сайтов на внешнюю поверхность мембраны регидратированных клеток. Для проверки этого предположения эритроциты были обработаны в условиях гипертонии ионами Zn^{2+} (0,1; 1 мМ) в сочетании или в отсутствие ионофора A23187, который способствует транспорту катионов внутри клетки. Данные (рис. 4) показывают, что обработка клеток в условиях гипертонии активирующей концентрацией ионов Zn^{2+} (0,1 мМ) в сочетании или без ионофора не приводит к изменению уровня ПЛ. Кроме того, обработка клеток ингибирующими концентрациями ионов Zn^{2+} (1 мМ) не привела к ингибированию гемолиза в обоих случаях. При этом наблюдаемое увеличение уровня гемолиза связано с остаточным действием иона, как было показано на рис. 3.

Таким образом, в условиях регидратации блокирующий и активирующий эффект ионов проявляется при взаимодействии их с соответствующими сайтами, которые локализуются на внешней поверхности клеточной мембраны. Это утверждение согласуется с данными других авторов, которые показали, что блокирование лизиса порообразующими веществами с помощью дивалентных катионов осуществляется за счет их непосредственного связывания с наружной поверхностью мембран [5]. На основе вышеуказанных результатов можно прийти к выводу о том, что оба типа сайтов, формирующихся в гипертонических условиях, изначально локализованы внутри клеток, а активируются в процессе регидратации эритроцитов, где они экспонированы на внешней поверхности мембраны клеток.

На основании проведенных исследований можно заключить следующее:

- дивалентные катионы Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} , находящиеся в среде регидратации, способны модулировать ПЛ эритроцитов, активируя или ингибируя его в результате взаимодействия с мембранными компонентами (сайтами), регулирующими формирование мембранных дефектов (пор) и обладающими различной аффинностью и специфичностью по отношению к катионам. Среди указанных катионов наиболее ингибирующий эффект на ПЛ оказывают ионы Zn^{2+} независимо от ионной силы среды регидратации;

- катионы Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} способны с разным сродством связываться с блокировочными сайтами. При этом ионы Zn^{2+} обладают большим сродством к активирующим и блокирующим сайтам по сравнению с ионами Ca^{2+} , а ионы Mg^{2+} не взаимодействуют с активирующими сайтами. Таким образом, блокировочные сайты менее ионоспецифичны по сравнению с активирующими;

- оба типа сайтов локализованы в стадии предварительной дегидратации внутри клеток и активируются в процессе регидратации, при которой они экспонируются на внешнюю поверхность эритроцитарной мембраны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Руденко С.В., Бондаренко В.А. Роль изменения объема эритроцитов при постгипертоническом лизисе // Моделирование криобиологических процессов. — Харьков: Б. и., 1988. — С. 55–67.
2. Alder G.M., Arnold W.M., Bashford C.L. et al. Divalent cation-sensitive pores formed by natural and synthetic melittin and by triton X-100 // BBA. — 1991. — 1061. — P. 111–120.
3. Bashford C.L., Alder G.M., Menestrina G. et al. Membrane damage by hemolytic viruses, toxins, complement and other cytotoxic agents // J. Biol. Chem. — 1986. — 261. — P. 9300–9308.
4. Bashford C.L., Alder G.M., Graham S.M. et al. Ion modulation of membrane permeability. Effect of cation on intact cells and on cells and phospholipid bilayer treated with pore-forming agents // J. Membr. Biol. — 1988. — 103. — P. 79–94.

5. *Bashford C.L., Rodrigues L., Pasternak C.A.* Protection of cell against membrane damage by haemolytic agents: divalent cations and protons act at the extracellular side of the plasma membrane // *BBA.* – 1989. – 983. – P. 56–64.
6. *Daw a., Farrant J., Morris G.J.* Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing // *Cryobiology.* – 1973. – 10, № 2. – P. 155–163.
7. *Kaszuba M., Hunt G.R.* Protection against membrane damage: A H-NMR investigation of the effect of Zn and Ca on the permeability of phospholipid vesicles // *Journal of Inorganic Biochemistry.* – 1990. – 40. – P. 217–225.
8. *Mazur R., Rigopoulos N.* Contributions of unfrozen fractions and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate // *Cryobiology.* – 1983. – 20, № 3. – P. 274–290.
9. *Pasternak C.A., Alder G.M., Bashford C.L. et al.* Cell damage by viruses, toxins and complement: common features of pore-formation and its inhibition by Ca // *Biochem. Soc. Symp.* – 1985. – 50. – P. 247–264.
10. *Pegg D.E., Diaper M.P.* On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes // *Biophys. J.* – 1988. – 54, № 3. – P. 471–488.
11. *Portlock H., Clague M.J., Cherry R.J.* Leakage of internal markers from erythrocytes and lipid vesicles induced by melittin, gramicidin S and alamethicin: a comparative study // *BBA.* – 1990. – 1030. – P. 1–10.
12. *Woolgar A.E., Morris G.S.* Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperatures on posthypertonic hemolysis of human red blood cells // *Cryobiology.* – 1973. – 10, № 1. – P. 82–86.
13. *Zade-Oppen A.M.M.* Posthypertonic hemolysis in sodium chloride systems // *Acta Physiol. Scand.* – 1968. – 73, № 4. – P. 341–364.
14. *Zade-Oppen A.M.M.* The effect of monnitol, sucrose, raffinose and dextrane on posthypertonic hemolysis // *Acta Physiol. Scand.* – 1968. – 74, № 1–2. – P. 195–206.
15. *Zade-Oppen A.M.M.* Posthypertonic hemolysis in sucrose systems // *Experientia.* – 1970. – 26, № 9. – P. 1087–1088.

Харьковский гос. ун-т

Поступила 21.01.94

С.В.ПАТЕЛАРОС

ДОСЛІДЖЕННЯ КАТІОН-ЗАЛЕЖНОГО ЛІЗИСУ РЕГІДРАТОВАНИХ ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДИНИ

Харківський державний університет

Досліджується вплив дивалентних катіонів Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} на лізис еритроцитів, регідратованих в електролітних і неелектролітних ізотонічних середовищах, після попередньої інкубації в умовах гіпертонії. Йони Ca^{2+} і Zn^{2+} можуть і активувати і інгибувати постгіпертонічний лізис еритроцитів. Набільш сильний інгибуючий ефект дають йони Zn^{2+} , а йони Mg^{2+} не впливають на гемоліз клітин. Моделювання постгіпертонічного лізису дивалентними катіонами є результатом їх взаємодії з мембранними сайтами, котрі регулюють кількість або розміри гемолітичних пор і мають по відношенню до катіонів різну специфічність і афінність. Активація мембранних сайтів відбувається у стадії регідратації клітин в ізотонічному середовищі а не в умовах гіпертонічної інкубації.

S.V.PATELAROS

STUDY OF CATION-DEPENDENT LYSIS OF THE HUMAN BLOOD REHYDRATED RBC

Kharkov State University, Kharkov

The report deals with the study of the effect of divalent cations Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} upon lysis of red blood cells (RBC), rehydrated in the electrolyte and non-electrolyte media following pre-incubation under hypertonic conditions. Ions Ca^{2+} and Zn^{2+} may both activate and inhibit posthypertonic lysis of RBC. The strongest inhibiting action is exercised by Zn^{2+} ions, while Mg^{2+} ions do not affect cell hemolysis. Modulation of posthypertonic lysis by divalent cations results from their interaction with membrane sites, which regulate the amount and size of hemolytic pores, and which possess different specificity and affinity towards cations. Activation of membrane sites occurs at the stage of cell rehydration in the isotonic medium, and not under conditions of hypertonic incubation.

О.Д. Мяделец**КЛЕТОЧНЫЕ РЕАКЦИИ В ПОДКОЖНЫХ ЛИМФОУЗЛАХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ БЕЛЫХ КРЫС ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ И В ПОСТГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ**

Изучалось влияние 6-, 24- и 48-часовой гипотермии на клеточные реакции надлопаточного лимфоузла белых крыс. Установлено, что в процессе охлаждения и в первые сутки после него в лимфотических узлах снижались митотическая активность, плотность бластов и нарастало количество апоптозных клеток. В мягкотных тяжах уменьшалась плотность плазмоцитов. В корковом и мозговом веществе снижалось содержание тканевых базофилов за счет их разрушения. В более поздние сроки постгипотермического периода указанные сдвиги сменялись увеличением числа клеток. Степень снижения количества изученных клеток и время наступления суперкомпенсации зависели от продолжительности гипотермического воздействия.

Как известно, глубокая гипотермия вызывает образование в организме аутоантигенов и формирование аутоиммунной реакции [9]. Поэтому изучение морфологических изменений в органах иммунной системы при гипотермическом воздействии на организм является актуальной задачей и привлекает внимание исследователей [6, 9, 11 и др.]. Это внимание, очевидно, можно объяснить также тем, что иммунная система ответственна за реализацию реактивных и резистентных свойств организма, а искусственная гипотермия является удобной моделью изменения этих свойств [10]. Несмотря на имеющиеся работы, посвященные исследованию влияния гипотермии на органы иммунной системы, этот вопрос изучен неполно. В частности, отсутствуют исследования, направленные на выяснение зависимости клеточных реакций в лимфоузлах от продолжительности гипотермического воздействия.

Настоящая работа посвящена изучению количественных изменений некоторых клеточных популяций лимфоузла при воздействии на организм белых крыс глубокой пролонгированной гипотермии разной продолжительности.

Эксперименты выполнены на 176 белых крысах обоего пола массой 210–320 г. При моделировании гипотермии за 40 мин до начала охлаждения внутривентриально вводили орнид в дозе 25 мг/кг массы, а за 10 мин – нембутал в дозе 40 мг/кг. При 24- и 48-часовой гипотермии доза орнида была уменьшена до 10 мг/кг. Охлаждение до ректальной температуры 20 °С проводили в морозильной камере либо в ванне со смесью “вода-лед” на полиэтиленовой пленке за период времени около 90 мин со скоростью 1 °С за 4–5 мин. После достижения этой температуры (температура пролонгации) животных помещали в регулируемую термокамеру и выдерживали при этой ректальной температуре 6, 24 и 48 ч. Восстановление температуры осуществлялось либо самостоятельно при температуре воздуха 25 °С (наступало через 5–6 ч после помещения животных в клетку), либо путем согревания животных лампой-рефлектором (24-часовая пролонгация). В серии опытов с 6-часовой пролонгацией декапитацию животных производили в момент достижения температуры пролонгации, сразу после завершения эксперимента, т.е. пролонгации, а также через 6, 12, 24 ч, 3, 7, 14 и 28 сут после пролонгации. В серии экспериментов с 24-часовой пролонгацией крыс забивали сразу после завершения пролонгации, а также через 1, 3 и 7 сут после эксперимента. При 48-часовой гипотермии исследования производили только в момент завершения эксперимента, после отогрева животных. Исследовали также животных, погибавших несколько раньше завершения эксперимента (в интервале 40–48 ч пролонгации). В каждую группу включали от 6 до 10 животных. Контролем служили интактные животные. Надлопаточный лимфоузел фиксировали в жидкости Буэна и заливали в па-

рафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали 1 %-м раствором толуидинового синего в 30 %-м этаноле и азур-2-эозином. В реактивных центрах лимфатических узелков подсчитывали митотическую активность клеток, количество бластов и апоптозных клеток. Эти показатели выражали в процентах по отношению ко всем клеткам реактивного центра. В мягкотных тяжах при помощи морфометрической сетки Автандилова определяли количество плазмоцитов на площади среза 1 мм^2 . Изучение популяции тканевых базофилов (ТБ) проводили отдельно для коркового и мозгового вещества. Вычисляли следующие показатели: количество неразрушенных ТБ на 1 мм^2 площади среза; количество дегранулирующих ТБ (этот показатель выражали в процентах по отношению к предыдущему) число разрушенных ТБ на 1 мм^2 площади среза. Все цифровые данные обрабатывали статистически (критерий *U* Вилкоксона-Манна-Уитни).

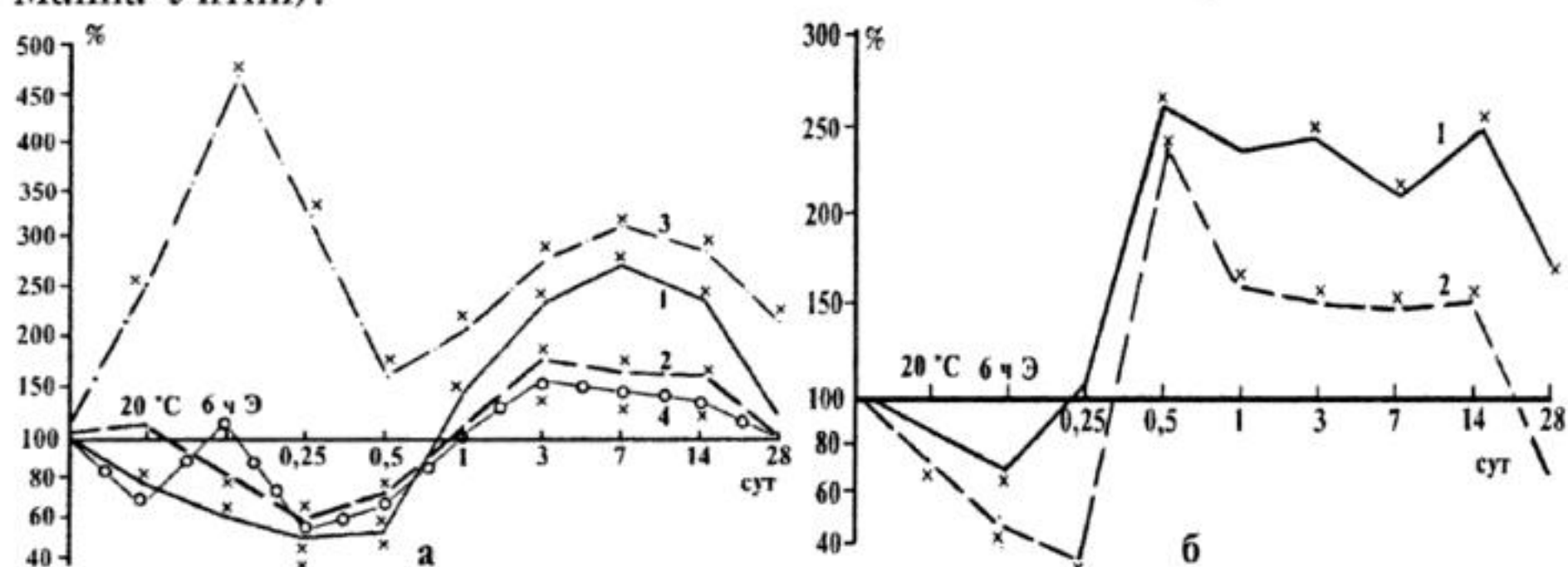


Рис. 1. Изменения в дифферонах В-лимфоцитов (а) и тканевых базофилов (б) при 6-часовой гипотермии и в постгипотермическом периоде: по оси абсцисс – сроки наблюдения; 0 – начало охлаждения; “20 °С” – состояние при достижении температуры пролонгации; “6 ч Э” – состояние после завершения 6-часовой гипотермической экспозиции. По оси ординат – степень изменения показателей по отношению к контролю, принятому за 1000 %

Изменения со стороны изученных клеточных популяций лимфоузла при 6-часовой гипотермической экспозиции приведены на рис. 1, из которого видно, что число митотически делящихся В-лимфоцитов достоверно снижалось в момент достижения температуры пролонгации (20 °С), сразу после завершения пролонгации, а также через 6 и 12 ч после нее. В дальнейшие сроки наблюдения показатель достоверно превышал контрольные значения, нормализуясь к 28-м сут наблюдения. Количество пикнотически измененных (апоптозных) клеток было резко увеличено при достижении температуры пролонгации, в конце ее, а также через 6 ч после завершения эксперимента (рис. 1, 2, а, б). Этот первый пик увеличения числа апоптозных клеток следует расценивать как результат непосредственного повреждающего действия холода на клетки реактивного центра, преобладающими в котором являются клетки дифферона В-лимфоцитов. После существенного снижения (12 ч после эксперимента) наблюдалось повторное увеличение количества апоптозных клеток в реактивных центрах, сохранявшееся до конца наблюдения. Это увеличение, очевидно, могло быть как отсроченным результатом повреждающего действия холода, так и компенсаторным явлением, направленным на предотвращение лавинообразного нарастания количества клеток при нарастании митотической активности, так как известно [1, 8], что митоз и апоптоз являются теми двумя противоположностями, при помощи которых регулируется тканевой гомеостаз. Имевшее в настоящем исследовании место соотношение процессов воспроизводства и гибели клеток приводило к снижению числа бластов в начальные сроки эксперимента и увеличению его в более поздние сроки наблюдения с нормализацией к концу наблюдения (рис. 1). Похожую динамику имело и количество плазмоцитов в мягкотных тяжах (рис. 1). Следует подчеркнуть, что выраженного апоптоза клеток плазмоцитарной линии дифференцировки в

данной серии не наблюдалось ни в начальные, ни в отдаленные сроки наблюдения.

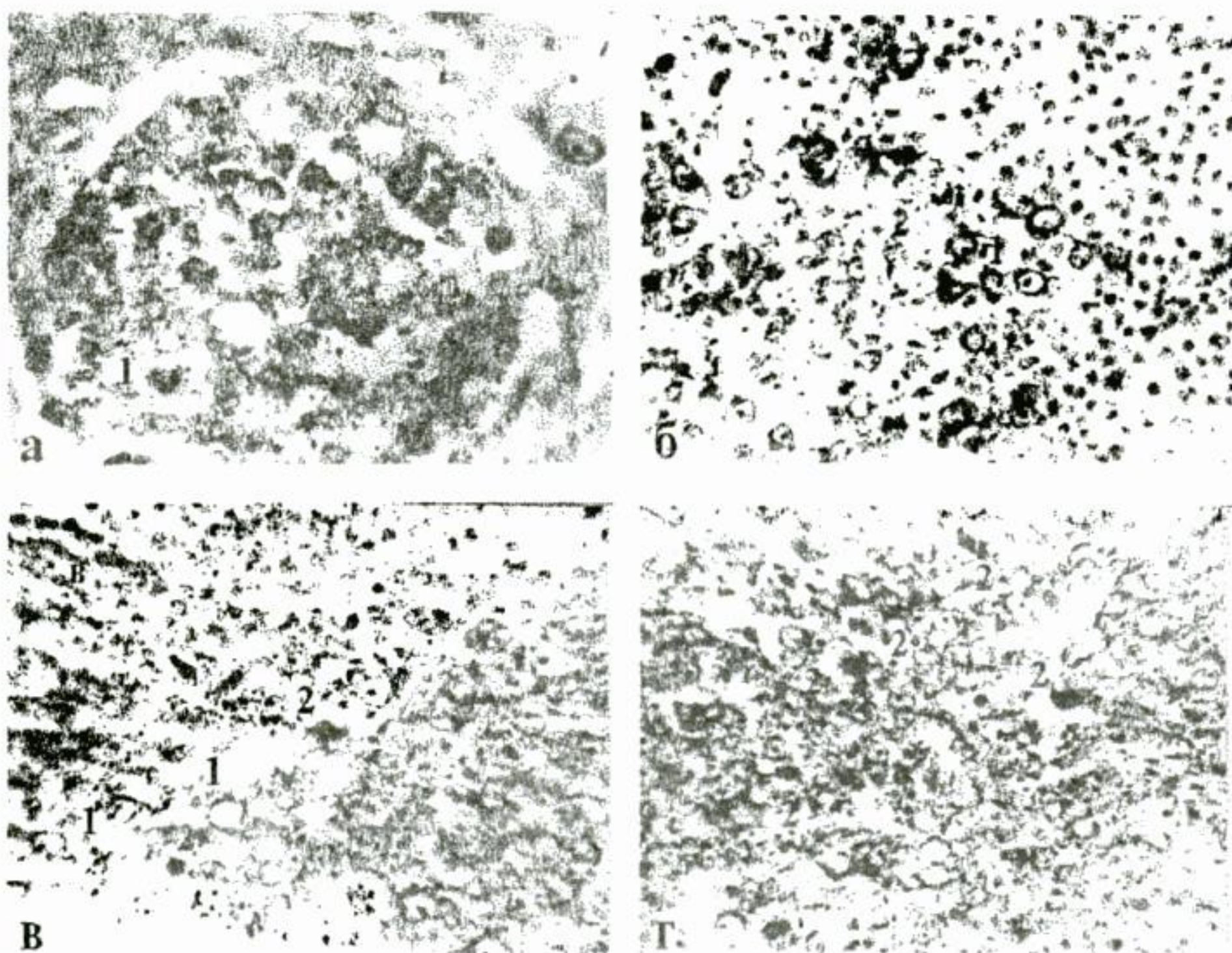


Рис. 2. Клеточные реакции в реактивных центрах лимфатических узлов при гипотермическом воздействии разной продолжительности: *а* – реактивные центры intactных крыс, *б* – увеличение числа апоптозных клеток в реактивных центрах через 6 ч после 6-часовой гипотермии, *в* – резкое увеличение числа апоптозных клеток через 1 сут у крыс, перенесших 24-часовую гипотермию, *г* – тотальное разрушение клеток, массивный апоптоз в зародышевых центрах у крыс, перенесших 48-часовую гипотермию; 1 – бласты; 2 – апоптозные клетки. Азур-П-эозин. $\times 900$

Динамика ТБ при воздействии на организм 6-часовой гипотермии была следующей (рис. 1,б). В корковом веществе численность этих клеток была снижена на глубине охлаждения и сразу после завершения пролонгации, через 6 ч не отличалась от контроля, а в дальнейшие сроки наблюдения, вплоть до 28-х сут, была достоверно увеличена. Количество разрушенных ТБ возрастало на глубине охлаждения, после завершения пролонгации и через 6–12 ч после эксперимента. В дальнейшем такие клетки отсутствовали. Как у контрольных животных, так и у крыс, подвергнутых охлаждению, практически все ТБ в корковом веществе находились в состоянии дегрануляции (рис. 3,б).

В мозговом веществе динамика ТБ была похожей, с той лишь разницей, что восстановление их количества после гипотермического воздействия происходило несколько позже, а последующее увеличение числа было менее выраженным; кроме того, к 28-м сут постгипотермического периода показатель не отличался от контроля. Количество разрушенных клеток увеличивалось в те же, что и в корковом веществе, сроки, а спустя 24 ч после эксперимента и в дальнейшие сроки наблюдения такие клетки отсутствовали. В отличие от коркового, в мозговом веществе в контроле дегрануляции подвергались не все, а только около 80% ТБ. Гипотермическое воздействие вызывало 100%-ю дегрануляцию этих клеток, что сохранялось до конца наблюдения (рис. 3,а,в).

При 24-часовой гипотермической экспозиции со стороны изученных клеточных популяций происходили изменения, принципиально похожие на таковые при 6-часовом холодном воздействии. Однако степень их выраженности

и продолжительность были иными. Депрессия митотической активности в реактивных центрах сохранялась в течение 3 сут после эксперимента, и лишь через 7 сут отмечалось ее увеличение (таблица). Сразу после завершения 24-часовой экспозиции резко возрастало содержание апоптозных клеток, причем такое увеличение сохранялось до конца наблюдения (табл., рис. 2, в). Число бластных клеток в реактивных центрах было снижено в течение 3 сут постгипотермии, а к 7-м сут оно достоверно увеличивалось. Похожей была динамика плазмоцитов мякотных тяжей (табл.), причем в первые 3 сут наблюдения отмечался усиленный апоптоз клеток этого ряда (рис. 3, г).

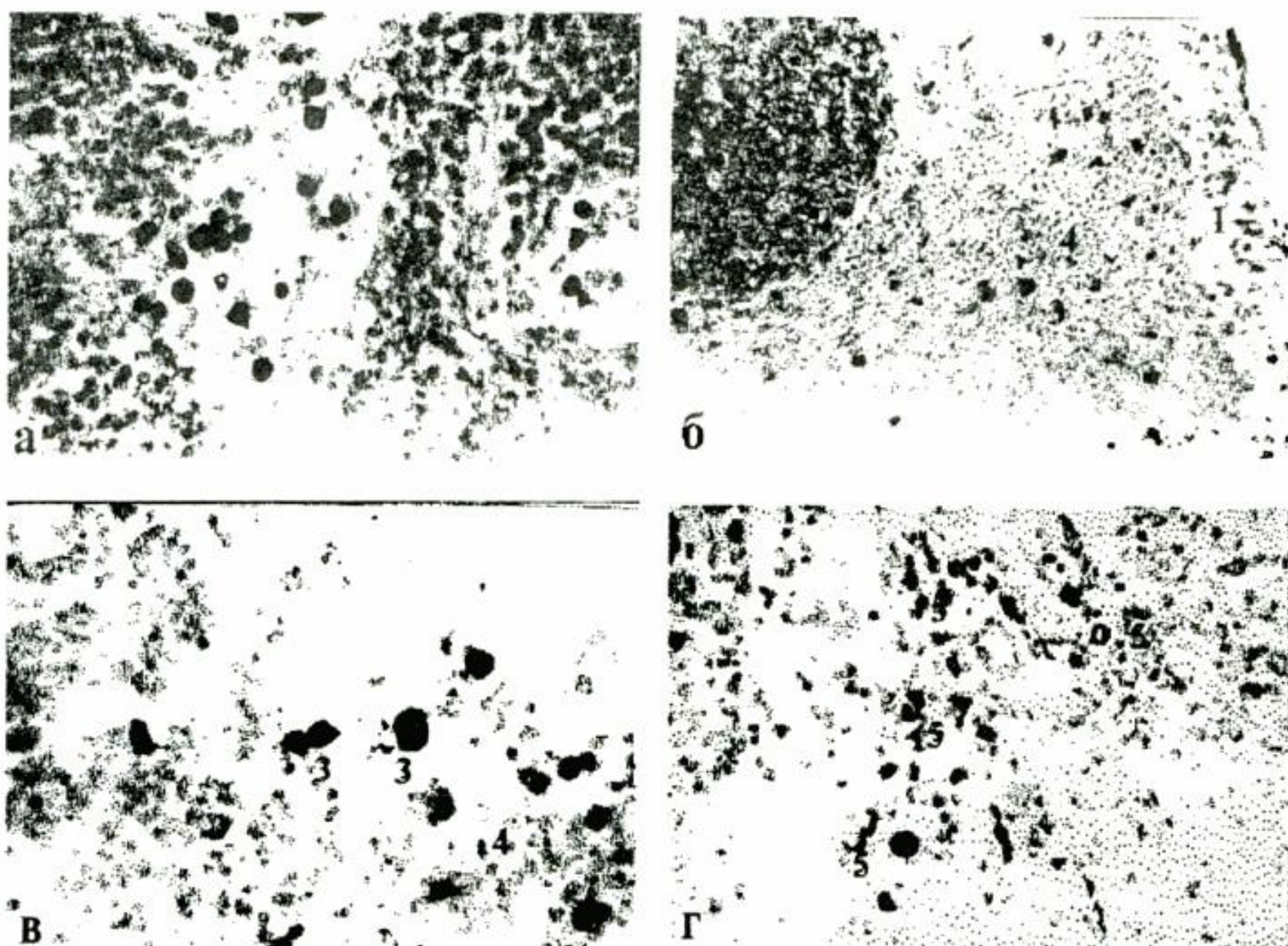


Рис. 3. Изменения со стороны тканевых базофилов лимфоузла при гипотермическом воздействии: а – тканевые базофилы мозгового вещества интактных крыс, б – тканевые базофилы коркового вещества через 12 ч после эксперимента у крыс, перенесших 6-часовую гипотермию. Видны разрушенные и дегранулирующие ТБ, в – увеличение дегрануляции ТБ мозгового вещества у крыс через 6 ч после 6-часовой гипотермии, г – резкое уменьшение количества ТБ, апоптоз плазмоцитов мякотных тяжей у крыс, перенесших 24-часовую гипотермию; 1 – краевой синус, 2 – реактивный центр, 3 – дегранулирующие, 4 – разрушенные ТБ, 5 – апоптоз плазмоцитов. Азур-П-эозин. $\times 200$

Количество ТБ коркового вещества при 24-часовой гипотермии существенно сниженным после завершения гипотермического воздействия, оставалось достоверно снижением через 1 и 3 сут после эксперимента, а через 7 сут после него достоверно превышало контрольные значения (табл.). Во все указанные сроки наблюдения в корковом веществе было увеличено содержание разрушенных ТБ, причем больше всего в момент завершения и через 3 сут после него. Все сохранившиеся неразрушенными ТБ дегранулировали. В мозговом веществе число ТБ снижалось еще в большей степени, чем в корковом (табл., рис. 3, г), причем восстановления их количества не происходило к концу наблюдения (7-е сут). Вместе с тем численность разрушенных клеток здесь была ниже, чем в корковом веществе. Поскольку наиболее вероятной причиной уменьшения числа ТБ в настоящем исследовании могло являться их разрушение, то меньшие показатели количества разрушенных ТБ в мозговом веществе можно, очевидно, объяснить более быстрой, чем в корковом веществе,

деградацией разрушенных частей клеток макрофагами, численность которых в мозговом веществе больше, чем в корковом [5].

Количественные изменения в лимфоузле при воздействии на организм 24-часовой гипотермии и в постгипотермическом периоде

Показатели	Контроль	Сроки наблюдения			
		Состояние после 24-часовой пролонгации	1 сут	3 сут	7 сут
Плазмоциты мягкотных тяжей, тыс.кл./1 мм ²	3,5	3,1*	2,8*	2,8*	4,7**
Митотическая активность в реактивных центрах, %	2,8	0,8**	0,9**	1,0**	3,8**
Число бластов в реактивных центрах, %	3,6	2,9*	2,1*	2,7*	5,7**
Доля апоптозных клеток в узелках, %	1,1	4,9**	4,8**	4,5**	4,9**
Количество ТБ коркового вещества/1 мм ²	59,0	32,3*	31,6**	46,8*	82,2*
Количество ТБ мозгового вещества/1 мм ²	133,0	54,3**	41,3*	49,4*	73,9*

Примечание. *, ** – достоверно по отношению к контролю; * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$.

При продлении гипотермического состояния до 48 ч изменения со стороны изученных клеточных показателей были максимальными. В мягкотных тяжях у забитых сразу после завершения эксперимента животных наблюдалось резкое падение числа плазмоцитов, отмечался их массивный апоптоз. В реактивных центрах митотически делящиеся клетки не встречались. Резко снижалось число бластов и, напротив, возрастало число апоптозов, при этом структура лимфатического узелка практически утрачивалась (рис. 2, з). Количество ТБ в корковом и мозговом веществе резко падало, встречались лишь единичные клетки. Напротив, резко возрастало число разрушенных ТБ. Похожие изменения были обнаружены у животных, погибших до завершения гипотермического воздействия (40–47 ч холодового воздействия).

Таким образом, в результате исследования установлено, что степень морфофункциональных изменений в лимфоузле прямо зависит от продолжительности гипотермического воздействия. Вместе с тем нельзя не отметить, что принцип реагирования клеточных элементов лимфоузла при 6- и 24-часовой гипотермии сходен. Вначале (в ходе эксперимента и в ближайшие часы и сутки после его завершения) наблюдается разрушение клеток, уменьшается интенсивность их воспроизводства. В последующем, при восстановлении и суперкомпенсации процессов клеточной репродукции, отмечается вначале восстановление, а затем и превышение исходного уровня изученных клеток. При увеличении продолжительности холодового воздействия фаза восстановления существенно удлиняется. Описанные изменения достаточно хорошо объясняются с позиций учения о стрессе [3]. В настоящем исследовании, как и при классической стресс-реакции, можно выявить изменения, свойственные стадии тревоги (собственно эксперимент и первые часы после него), напряжения (последующие сроки гипотермического периода) и истощения (48-часовая гипотермия). При этом деструктивные изменения со стороны дифферона В-лимфоцитов, выявленные в данной работе, отражают один из компонентов триады Селье, а именно лимфоцитоллиз. Следует, однако, подчеркнуть некоторые особенности гипотермии как стрессора, о чем указывалось ранее [2]. Такой особенностью является превентивное действие гипотермии в отношении повреждающих эффектов других стрессоров. Так, в предыдущей работе [2] было установлено, что введение животным нембутала и орнида вызывало резкое падение в периферической крови числа лимфоцитов, что является признаком

стресс-реакции [3]. В то же время, на фоне 6-часовой гипотермии эти препараты вызвали гораздо менее выраженное падение числа лимфоцитов. Очевидно, такой особенности гипотермии как стрессора можно объяснить хорошо выраженную обратимость отмеченных морфологических изменений даже при гипотермическом воздействии в 24 ч. Кроме того, даже в этом случае наступает явление своеобразной суперкомпенсации, приводящее к активизации плазмоцитопоза. Очевидно, целесообразность этой реакции продиктована появлением в организме в ответ на холодовое воздействие аутоантигенов и необходимостью развития аутоиммунной реакции [9].

Несмотря на то, что проведенный корреляционный анализ не выявил тесной корреляционной связи между динамикой плазмочитарной реакции и количества ТБ в мозговом веществе, при сопоставлении графиков нельзя не заметить, что восстановлению и увеличению числа бластов в узелках и плазмочитов в мягкотных тяжах предшествовало увеличение числа ТБ в соответствующих зонах лимфоузла. Поэтому нельзя исключить стимулирующего влияния этих клеток на процессы плазмоцитогенеза. Этот вопрос в литературе уже обсуждался, причем одни авторы допускают такую возможность [4], другие ставят ее под сомнение [7]. На основании данного исследования полностью исключить активирующее влияние ТБ на развитие плазмочитарной реакции нельзя, равно как нельзя с уверенностью говорить о его существовании. Тем не менее вопрос этот интересный и требует дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бережков И.В. Апоптоз – управляемая смерть клетки // Арх. анат. – 1990. – 99, № 12. – С. 69–77.
2. Бринкевич В.Н., Мяделец О.Д. Количественные изменения периферической крови при пролонгированной гипотермии // Пробл. криобиол. – 1991. – № 3. – С. 25–38.
3. Горизонтов П.Д., Белоусов О.И., Федорова М.И. Стресс и система крови. – М.: Медицина, 1983. – 324 с.
4. Дурихин К.В. Об участии тучных клеток в образовании антител // Методы физико-химического анализа. – Ростов-на-Дону, 1965. – С. 91–92.
5. Зуфаров К.А., Тухтаев К.Р. Органы иммунной системы. – Ташкент: ФАН, 1989. – 183 с.
6. Исмаилова Л.И., Керхер Н.О. Реакция лимфоузлов на термическое воздействие // 5 конф. Респ. Ср. Азии и Казахстана по пробл. морфол.: Тез. докл., Чолпон-Ата, 1991. – Ч.1. – С. 100–101.
7. Ковалевский Г.В. Очерки иммуноморфологии. – Новосибирск: Наука, 1976. – 266 с.
8. Лушников Е.Ф., Загребин В.И. Апоптоз клетки: морфология, биологическая роль, механизмы развития // Арх. патол. – 1987. – 59, № 2. – С. 84–89.
9. Матюшин И.Ф., Королев Б.А., Ефимов А.В. и др. Иммунологическая реактивность и морфологические изменения в лимфоидных органах и тканях под воздействием гипотермии // Гипотермия в клинике и эксперименте. – Горький: Горьковский мед. ин-т, 1979. – С. 5–11.
10. Сиротинин Н.Н. Эволюция резистентности и реактивности. – М.: Медицина, 1981. – 235 с.
11. Федько Е.Ф., Седова Л.Н., Головина А.Л. Перестройка лимфоузлов в условиях гипотермии // Всесоюз. конф. “Пробл. функциональ. лимфологии”: Тез. докл., Новосибирск: Б.и., 1982. – С. 200–201.

Витебский мед. ин-т, г. Витебск

Поступила 13.07.92

О.Д.МЯДЕЛЕЦЬ

КЛІТИННІ РЕАКЦІЇ У ПІДШКІРНИХ ЛІМФОВУЗЛАХ ПРИ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ БІЛИХ ЩУРІВ ГЛИБОКОЇ ГІПОТЕРМІЇ РОЗНОЇ ТРИВАЛОСТІ

Вітебський медичний інститут, м.Вітебск

Встановлено, що у процесі охолодження і у першу добу після нього у лімфатичних вузлах знижувалась мітотична активність, щільність бластів і наростала кількість апоптозних клітин. У м'якотних тяжах зменшувалась щільність плазмочитів. У корковій і мозковій речовині зменшувалась вміст тканинних базофілів за рахунок їх руйнування. У більш пізніші строки постгіпертонічного періоду вказані зрушення змінювалися збільшенням числа тканин. Ступінь зниження кількості вивчених клітин і час настання суперкомпенсації залежали від тривалості гіпертонічного впливу.

O.D.MYADELETS

CELL RESPONSE IN SUBCUTANEOUS LYMPHATIC NODES AFTER EXPOSING THE ORGANISM OF THE WHITE RAT TO PROFOUND HYPOTHERMIC TREATMENT OF VARIOUS DURATION AND IN THE POSTHYPOTHERMIC PERIOD

Vitebsk Medical Institute, Vitebsk

We studied the effect of 6-, 24- and 48-hour hypothermic treatment on cell responses of the suprascapular lymphatic node of white rats. It was found that in the process of cooling and immediately after it mitotic activity, density of blasts were reduced in lymphatic nodes, while the amount of apoptotic cells increased. The density of plasmocytes was reduced in pulp bands. Cortical and cerebral substance demonstrate a reduction in the content of tissue basophiles due to their destruction. At later terms of the posthypertonic period the said shifts were replaced by a rise in the amount of cells. The extent of the reduction in the amount of the studied cells and the moment of supercompensation occurrence were determined by the duration of the hypothermic treatment.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 57.043:612.111.014.41:547.422

В.М.Гучок, А.М.Воротилин, В.И.Луговой, М.И.Шраго

ЛЕЧЕБНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ПОД ЗАЩИТОЙ ПРЕПАРАТА "ПРОПАНДИОСАХАРОЛЬ"

Представлены исследования эффективности эритроцитов путем подтверждения их функциональной сохранности после размораживания (биологической полноценности) *in vivo*. Проведенная клиническая апробация донорских криоконсервированных эритроцитов показала, что они являются эффективным средством коррекции нарушений циркулирующего эритрона при лечении гемобластозов, острых геморрагических анемий, являющихся следствием кровотечений, хирургических вмешательств, ожоговых травм, и не вызывают каких-либо реакций и осложнений у реципиентов.

В комплексе лечебных мероприятий у больных с анемиями различного происхождения важное место, как известно, занимает гемотрансфузионная компонентная терапия, включающая применение криоконсервированных эритроцитов. В настоящее время в Украине и за рубежом при криоконсервировании эритроцитов наиболее широко используется глицерин [2, 6, 8, 9, 10]. Однако технология замораживания эритроцитов с глицерином весьма трудоемкая и дорогостоящая. Кроме того, глицерин является не безопасным для организма препаратом.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины разработан более простой и экономичный метод криоконсервирования эритроцитов под защитой ограждающего раствора, имеющего следующую пропись: 1,2-пропандиола 370,0 мл, сахарозы 32,0 г, натрия хлористого 6,0 г, воды бидистиллированной для инъекций до 1000 мл [7]. В настоящее время этот криоконсервант разрешен к клиническому применению и промышленному выпуску под названием "Пропандиосахароль" (ПДС). При испытании метода криоконсервирования в условиях низкотемпературного банка нами ранее был подтвержден целый ряд его преимуществ в сравнении с глицериновым способом. В частности, для реабилитации криоконсервированных с ПДС эритроцитов требуется, как правило, 1–2-кратное отмывание клеток в отличие от криоконсервированных с растворами ЦНИИГПК II4-5, где производится 3–4-кратное. После размораживания криоконсервированные с ПДС эритроциты во взвешивающей среде могут храниться при $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 3 сут, не меняя своих морфофункциональных свойств, а криоконсервированные с ЦНИИГПК II4-5 – 1 сут. Потери клеток в процессе криоконсервирования сни-

жены с 15% (при консервировании с раствором ЦНИИГПК П4-5) до 5% (при консервировании с ПДС). По различным показателям 1,2-пропандиол в 2–4 раза менее токсичен, чем глицерин [3].

С целью выявления эффективности эритромаcсы, криоконсервированной под защитой пропандиосахароля, были проведены исследования, подтвердившие функциональную сохранность эритроцитов в кровеносном русле реципиентов. После получения разрешения Фармкомитета МЗ СССР на проведение клинических испытаний криоконсервированных эритроцитов были начаты на I-м этапе исследования по оценке их биологической полноценности. В радиологическом отделении Харьковcкого областного клинического онкодиспансера проведены на 18 больных исследования по посттрансфузионной приживаемости и жизнеспособности криоконсервированных эритроцитов доноров и аутоэритроцитов, не подвергавшихся замораживанию [5].

Подготовку материала проводили следующим образом: размороженные донорские эритроциты и аутоэритроциты смешивали со стерильным хромовокислым натрием (Cr^{51}) в завальцованных пенициллиновых флаконах из расчета 5 мкк на 1 кг массы реципиента. После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре во флакон добавляли 2%-й раствор аскорбиновой кислоты в соотношении 1 к 3 объемам эритроцвеси с целью прекращения метки эритроцитов. Меченую эритромаcсу однократно отмывали физиологическим раствором (в соотношении 1:1). Затем взвешенные в физиологическом растворе клетки в объеме 10 мл стерильным шприцом вводили больному. Образцы для подсчета радиоактивности в объеме 1 мл отбирали через 30 мин, а затем через 1, 2, 3, 7 и 10 сут после трансфузии. Радиоактивность, выраженная числом импульсов в 1 мин от 1 мл крови, подсчитывалась измерителем скорости счета типа К-350 В венгерской радиодиагностической лаборатории "Гамма". Математическую обработку результатов исследования проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Было проведено 12 трансфузий размороженных эритроцитов донорской крови и 6 трансфузий аутоэритроцитов больным с различными злокачественными новообразованиями (Са-молочной железы, губы, языка, гортани, прямой кишки), у которых не было отмечено признаков распада клеток, либо клинически выраженной кровопотери и анемии. Результаты измерений радиоактивностей проб, первоначально полученные в импульсах в минуту, выражали в процентах. Показатели приживаемости клеток в процентах к исходному уровню активности Cr^{51} , подсчитанному в пробах крови больных в первые 30 мин после введения, приведены в таблице.

Приживаемость размороженных донорских эритроцитов и неконсервированных аутоэритроцитов в кровеносном русле больных, % (18 трансфузий)

Количество трансфузий	Эритроциты	Время после введения, сут				
		1	2	3	7	10
12	Донора	82,1±3,85	76,0±3,2	71,5±2,2	68,1±1,1	61,5±1,65
6	Ауто	85,1±4,6	78,2±4,3	70,9±3,4	68,4±2,3	59,7±2,0

Примечание. Уровень различий недостоверен ($P>0,05$).

Наиболее выраженное снижение числа перелитых эритроцитов в кровеносном русле реципиента происходит в 1-е сут после переливания. Консервированные эритроциты оцениваются как функционально полноценные, а метод консервирования хорошим, если первичная потеря эритроцитов из русла в течение первых 24 ч не превышает 20–30% введенных меченых эритроцитов [5]. Полученные данные указывают на хорошую приживаемость эритроцитов в кровеносном русле больных, так как потеря их в 1-е сут после трансфузии криоконсервированных и аутоэритроцитов соответственно составила 17,9 и 14,9%. Таким же образом оценивалось качество аутоэритроцитов и донорских эритроцитов, период полужизни которых составил по 18 сут (норма 18–24 сут). Максимальная же продолжительность жизни как аутоэритроцитов, так и криоконсервированных эритроцитов составила 77 сут, что укладывается в границы нормы равные 75–135 сут [1]. Третьим показателем выживаемости эритроцитов является суточная потеря меченых эритроцитов, выраженная в

процентах, которая в норме составляет 3–5% [1]. У больных этот показатель составил 3,8%. Таким образом, были получены высокие показатели посттрансфузионной приживаемости и жизнеспособности эритроцитов, криоконсервированных по разработанному методу, подтверждающие биологическую полноценность размороженных клеток.

На II-м этапе клиническое изучение криоконсервированных, а затем размороженных и отмытых эритроцитов проводилось нами совместно с Военно-медицинской академией им. С.М.Кирова, г. Ленинград, ЦНИИГПК МЗ СССР, г. Москва, Кировским НИИГПК МЗ РСФСР, НИИ травматологии и ортопедии МЗ Латвийской ССР и Киевским НИИГПК МЗ УССР. Оценку результатов проводили по общепринятым клиническим методам исследования. Показаниями к гемотерапии по патогенетическим признакам заболеваний служили анемии [4]: вызванные кровопотерей (острые постгеморрагические анемии), сопровождающиеся ортопедическими кардиохирургическими операциями, политравмами и др.; при усиленном кроворазрушении, обусловленные остеомиелитом, ложными суставами, термической (ожоговой) травмой с поражением 20–25% поверхности тела; вследствие нарушения кровообразования (гемобластозные анемии, вызванные острым лейкозом и остеомиелофиброзом).

Как правило, переливались эритроциты 4–9 мес хранения. Больным вводились 200–1000 мл (разовая) и 800–1150 мл (курсовая) дозы эритроцитов, криоконсервированных под защитой пропандиосахароля. Скорость введения трансфузионной среды колебалась от 30 до 80 капель в 1 мин. Всего было проведено 860 трансфузий 309 больным в возрасте от 16 до 87 лет. Вводимая взвесь эритроцитов содержала в среднем от 20,9 до 117 мг % свободного гемоглобина и переливалась на протяжении 1–3 сут хранения при 4 °С. Рн эритроцетов колебалась в пределах 6,25–7,01. Во всех случаях трансфузии взвеси эритроцитов, криоконсервированных под защитой пропандиосахароля, хорошо переносились больными, не наблюдалось гемотрансфузионных реакций и осложнений. Содержание билирубина, аланин-трансаминазы, аспарагин-трансаминазы не отличалось от исходных показателей. Концентрации общего белка, альбумина, глобулинов в сыворотке крови больных после трансфузии оставались в пределах нормы. Функция почек не нарушалась. Количество мочевины в сыворотке крови было в пределах нормы. Суточный диурез не изменялся. При клиническом анализе мочи патологии не было выявлено. Показатели центральной гемодинамики оставались в пределах нормы.

При введении криоконсервированных эритроцитов у больных: с острыми геморрагическими анемиями при острой кровопотере достигалась нормализация клеточного состава периферической крови; с усиленным кроворазрушением к концу трансфузии улучшалось самочувствие, появлялось розовое окрашивание губ, лица, ногтевого ложа, нормализовались гемодинамические показатели артериального давления (АД поднималось примерно на 10 мм.рт.ст.), возрастала сила пульсового удара, уменьшалась тахикардия. Уровень исходного гемоглобина до переливания в среднем составлял 92,1 г/л, через сутки — 0,30, при выписке — 0,33. У реципиентов с гемобластозами отмечалось повышение гемоглобина на 16–21 г/л и числа эритроцитов на 0,95–1,00 млн после переливания от 200 до 1000 мл эритроцетов.

Полученные данные позволили сделать следующие выводы:

— эритроциты, криоконсервированные под защитой препарата “Пропандиосахароль”, обладают биологической полноценностью;

— однократные и повторные переливания донорских эритроцитов, криоконсервированных под защитой пропандиосахароля, в дозах от 200 до 1000 мл (разовая) и от 800 до 2250 мл (курсовая) не вызывают каких-либо реакций и осложнений у реципиентов;

— криоконсервированные под защитой ПДС донорские эритроциты являются эффективным средством коррекции нарушений циркулирующего эритрона (анемии) при лечении гемобластозов, острых геморрагических анемий, являющихся следствием кровотечений и хирургических вмешательств, а также при ожоговой травме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Калина В.К. Радиоизотопные исследования сердечно-сосудистой системы и крови // Диагностическое и лечебное применение радиоактивных изотопов. — Киев: Б. и., 1976. — С. 112–121.
2. Виноград-Финкель Ф.П., Гинзбург Ф.Г., Федорова Л.И. Ультрабыстрое замораживание эритроцитов для их долгосрочного хранения // Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. — М.: Б. и., 1967. — С. 322–328.
3. Гучок М.М., Гучок В.М. Сравнительное исследование токсичности некоторых криопротекторов // I Укр. съезд гематол. и трансфузиол.: Тез. докл. — Киев: Б. и., 1980. — С. 176.
4. Кассирский И.В., Алексеев Г.А. Клиническая гематология. — М.: Медицина, 1970. — 800 с.
5. Радиоизотопные методы исследования в гематологии и трансфузиологии (метод. реком.). — Киев: Б. и. 1979. — 18 с.
6. Федорова Л.И. Состояние и перспективы развития методов криоконсервирования леток крови // Гематол. и трансфузиол. — 1983. — 28, № 1. — С. 3–6.
7. А. с. № 888896 СССР, МКИ⁴ А 01 № 1/02. Способ криоконсервирования эритроцитов / А.М.Воротилин, М.М.Гучок, В.А.Моисеев и др. — Оpubл. 15.12.81, Бюл. № 46.
8. Meryman H.T., Hernblower M. Changes in red cells following rapid freezing with extracellular cryoprotective agents // Cryobiology. — 1972. — 9, № 3. — P. 262–267.
9. Sumida L. Transfusion of blood preserved by freezing // Tokyo: Igaku Shoin, Philadelphia: Toronto, 1973. — 92 p.
10. Valri C.R. Simplification of the method for adding and removing glycerol during freeze-preservation of human red blood cells with the high or low glycerol methods. Biomedical modification prior to freezing // Transfusion. — 1975. — 15, № 3. — P. 195–218.

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

Поступила 23.11.93

В.М.ГУЧОК, О.М.ВОРОТИЛІН, В.І.ЛУГОВИЙ, М.І.ШРАГО ЛІКУВАЛЬНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ, КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПІД ЗАХИСТОМ ПРЕПАРАТУ “ПРОПАНДІОСАХАРОЛЬ”

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м.Харків

Подано дослідження ефективності еритроцитів шляхом підтвердження їх функціонального збереження після розморожування (біологічної повноцінності) *in vivo*. Проведена клінічна апробація донорських криоконсервованих еритроцитів показала, що вони є ефективним засобом корекції порушень циркулюючого еритрона при лікуванні гемобластозів, гострих геморагічних анемії, котрі є наслідком кровотеч, хірургічних втручань, опікових травм і не викликають будь-яких реакцій та ускладнень у реципієнтів.

V.M.GUCHOK, A.M.VOROTILIN, V.I.LOUGOVOY, M.I.SHRAGO

THERAPEUTIC EFFICIENCY OF RBC, CRYOPRESERVED UNDER PROTECTION OF A “PROPANE DIOSACCHAROLE” PREPARATION

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

The report deals with the investigations of the efficiency of red blood cells (RBC) by means of supporting their functional integrity after thawing *in vivo*. The conducted clinical trials of the donor cryopreserved RBC have shown that they are the effective means of correction of the impairments in the circulating erythron in the treatment of hematoblastosis, acute hemorrhagic anemias, caused by surgical hemorrhages, surgical interventions, burn traumas, and do not trigger any responses and complications in the patient.

О НОВЫХ НАПРАВЛЕНИЯХ В РАБОТЕ БАНКОВ КРОВИ

Показана необходимость изменений в организации работы банков крови, направленных на снижение частоты развития послетрансфузионных осложнений. Последнее достигается при широком применении в клинической практике аутологичной крови и методов криоконсервирования для создания запасов ее компонентов.

В итоге сравнительного анализа показателей гемотрансфузионной активности в клиниках различного профиля в течение последнего десятилетия выявляется общая тенденция — уменьшение количества переливаний крови и ее компонентов. Среди причин этого явления отмечаются следующие: 1) более четкое определение показаний и противопоказаний к переливанию крови в конкретных клинических ситуациях с учетом состояния гемодинамики, иммунологического статуса, системы свертывания крови, опасности развития синдрома массивных трансфузий, ДВС-синдрома и других осложнений, патогенетически связанных с трансфузией; 2) опасность переноса с перелитой кровью тяжелых заболеваний (ВИЧ-инфекции, различных форм гепатита и др.); 3) возможное развитие послетрансфузионных реакций и осложнений, представляющих серьезную угрозу здоровью алергизированных реципиентов; 4) развитие иммунологической несовместимости в парах “реципиент-донор” в случаях, требующих повторных трансфузий и др. [1, 5].

Оказалась, что принятая в мире общая схема организации учреждений службы крови не только не помогает клиникам решать вопросы, возникающие в их рутинной работе, но в ряде случаев является тормозом при их решении. Кроме того возрастает значение экономической стороны рассматриваемого вопроса: хранение и переработка донорской крови с выделением необходимого компонента является сложным и дорогостоящим технологическим процессом, требующим создания специализированных отделений с соответствующим оснащением и штатом профессионалов. Применение гемопрепаратов повышает стоимость лечения; их использование, разумеется, должно иметь четкие обоснования при минимальном риске для реципиента. Перечисленные моменты послужили причиной пересмотра стратегических положений трансфузиологической медицины.

В подтверждение сказанному приводим некоторые статистические данные, характеризующие трансфузиологическую активность в ведущих клиниках США, работающих на протяжении многих лет по национальной программе банков крови [7]. В США заготавливается около 1,7 млн доз крови в год. Сроки годности эритроцитов для трансфузий составляют 21–35 дней. С 1982 г. применяется пластмассовая тара с улучшенными показателями газовой проницаемости, позволяющая хранить тромбоциты 5–7 дней вместо 3 в прошлом. Количество производимых гемотрансфузий возросло с 64 млн в 1971 г. до 10 млн в 1980 г., из них 4,97 млн составляли переливания цельной крови, 1,35 млн — переливания эритроцитов. В 1980 г. было перелито в клиниках лишь 1,93 порций цельной крови, 8,06 доз эритроцитов. За тот же отрезок времени возросло использование концентрата тромбоцитов с 410 тыс доз в 1971 г. до 2,86 млн доз в 1980 г. Подобным образом изменились и показатели применения свежей замороженной плазмы: с 180 тыс доз в 1971 г. до 1,54 млн доз в 1980 г. Следует отметить нарастание потребления концентрата тромбоцитов и в последующие годы: до 4162909 доз в 1981 г., 4378935 в 1982 г., 4753890 в 1983 г. К сожалению, подобных данных о трансфузиологической активности в лечебных учреждениях Украины и стран СНГ не публиковалось.

Эффективным, доступным и потому перспективным путем снижения опасностей, сопутствующих переливаниям крови, является применение

аутоотрансфузий, при которых вероятность заражения реципиента от донора, как и развитие других осложнений, практически сводится к нулю [2, 3, 4]. Следует напомнить, что идея восполнения кровопотери за счет собственной крови больного не оригинальна и хорошо известна в практической медицине. Самым доступным вариантом аутогемотрансфузии является реинфузия крови — возврат в сосудистое русло больного его же крови, излившейся в полости организма во время травмы, оперативного вмешательства, разрыва внематочной беременности и др. Утилизировать можно полноценную кровь, не несущую опасности бактериального загрязнения. Такие ситуации встречаются в клинической практике, но не являются массовыми и не могут повлиять на объемы заготавливаемой крови.

В последние годы опубликовано большое количество работ, посвященных заготовке аутокрови, ее консервации, получению из нее гемопрепаратов, которые могут служить альтернативой лечебным средствам, изготовленным из донорской крови. Предполагается организация плановой заготовки крови для потенциальных реципиентов. К последним прежде всего относятся контингенты, проходящие подготовку к плановым оперативным вмешательствам, при выполнении которых, как правило, возникает необходимость в гемотрансфузии. Такие пациенты встречаются в клиниках ортопедического профиля, пластической хирургии, кардиохирургии, трансплантации органов, онкологии и др. [7]. Аутокровью целесообразно обеспечить больных некоторыми формами лейкозов, при этом кровь их, заготовленная в стадии клинической и гематологической ремиссии, может храниться и применяться для комплексной терапии при обострении заболевания. По данным [6] в клиниках Мейо удастся обеспечить аутокровью до 75% больных, подвергающихся хирургическим вмешательствам в плановом порядке.

Убедительные данные о целесообразности применения аутокрови в кардиохирургической клинике приведены в обзорной статье [3]. Объем заготавливаемой крови во время подготовки к плановым операциям, как правило, не превышает одной дозы (450 мл), а взятие крови следует производить не позже, чем за 2 ч до назначенной операции. Донором аутокрови может быть практически здоровый человек, не имеющий поражений системы крови. Заготовленная кровь может храниться разрешенный срок в виде цельной либо подвергнуться переработке для выделения необходимых компонентов и получения гемопрепаратов. Разумеется, серьезным препятствием для создания запасов аутокрови является весьма короткий срок ее хранения.

Применение методов криоконсервирования дает возможность преодолеть указанные трудности, обеспечив длительные сроки хранения компонентов аутокрови (эритроцитов, тромбоцитов и др.). Практическое воплощение этих возможностей требует решения ряда организационных вопросов — установления тесных рабочих контактов клиник с учреждениями службы крови. Возможно, что оказалось бы рациональным оснащение отделений переливания крови при крупных больницах оборудованием для хранения клеток крови при умеренно низких температурах, обеспечивающих их морфологическую и функциональную полноценность на протяжении полутора, двух лет — срока, достаточного для больных определенного лечебного стационара. Техническое обслуживание таких низкотемпературных прилавок в больничных отделениях переливания крови не потребовало бы особых расходов. Запас необходимых компонентов аутокрови при такой организации работы отделений переливания крови будет всегда доступен, в соответствии с потребностями больных, находящихся на стационарном лечении.

Следует подчеркнуть возможность заготовки для трансплантации наряду с аутокровью и аутологичного костного мозга, с прямыми показаниями к использованию которого сталкивается современная клиника. Создать необходимые запасы этого ценного биологического материала можно, применив со-

зданные технологии низкотемпературного консервирования, доступные при необходимости отделениям переливания крови крупных многопрофильных больниц. Отметим еще одну возможность, открывающуюся при заготовке аутологичной крови для переливания с последующим криоконсервированием ее компонентов — создаются условия к привлечению к сдаче крови контингента здоровых граждан, которые заблаговременно могут создать для себя запасы необходимых гемопрепаратов и хранить их в банках крови в замороженном состоянии на случай возникновения критических ситуаций (тяжелых травм, массивных кровопотерь, отравлений и др.), в которых аутогемотрансфузия окажется эффективным средством спасения жизни пострадавшего. Такими донорами могут стать группы работающих в условиях возможной опасности здоровью: на атомных электростанциях, ряде химических производств, в воинских частях, имеющих атомное оружие и др. В настоящее время уже накоплен определенный опыт по такому обеспечению собственной кровью и другими клетками участников операций, угрожающих их состоянию здоровья. В качестве примера может служить организация медицинского обслуживания участников кампании “Буря в пустыне” в составе подразделений армии США в Ираке в 1991 г.

В заключение подчеркнем, что в связи с возрастанием в последние годы частоты развития тяжелых послетрансфузионных осложнений актуальными разработками в клинической медицине представляются исследования, направленные на создание методов и приемов, обеспечивающих снижение риска от гемотерапевтических средств. К реальным путям решения этой задачи следует отнести: 1) более широкое применение аутологичной крови и ее компонентов, которые в ряде клинических ситуаций могут явиться альтернативой крови доноров; 2) использование методов криоконсервирования, предоставляющих реальную возможность для создания запасов гемопрепаратов для конкретного больного на случай возникновения потребности в таких средствах. Для осуществления указанных положений необходимо решение ряда организационных вопросов в работе банков крови и тканей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аграненко В.А., Скачилова Н.Н. Гемотрансфузиологические реакции и осложнения. — М.: Медицина, 1986. — 239 с.
2. Лебедев Н.В. Реинфузия крови в неотложной хирургии (Метод. рекоменд. МЗ РСФСР). — 1987. — 15 с.
3. Лыткин М.И., Матвеев С.А. Аутогемотрансфузия в хирургии // Вестн. хирургии им. И.И.Грекова. — 1990. — 4. — С. 141–145.
4. Пащук А.Ю., Згола И.А. Переливание аутологичной крови в ортопедии // Ортопедия, травматология и протезирование. — 1989. — 4. — С. 45–48.
5. Холлан С. Показания к переливанию крови // Терапевт. архив. — 1989. — 7. — С. 113–121.
6. Popovsky M.A., Devine P.A., Taswell H.F. Intraoperative autologous transfusion // Mayo Clin. Proc. — 1985. — 60, № 1, 2. — P. 125–134.
7. Wallas C.H., McCarthy. New frontiers in blood banking. — 1986. — Arlington—Virginia. — 187 p.

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

Поступила 24.11.93

М.Й.ШРАГО

ПРО НОВІ НАПРЯМКИ В РОБОТІ БАНКІВ КРОВІ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАНУ, м.Харків

Показана необхідність змін в організації роботи банків крові, спрямованих на зниження частоти розвитку післятрансфузійних ускладнень. Останнє досягається при широкому застосуванні у клінічній практиці аутологічної крові і методів криоконсервування для створення запасів її компонентів.

BASIC TRENDS IN BLOOD BANKS OPERATION

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

The report stresses the necessity for introducing changes into the organization of the operation of blood banks, aimed the reducing the frequency of posttransfusion complications. The latter is achieved by a wide clinical usage of autologous blood and methods of cryopreservation for piling up stores of its components.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 547.42:591.392:576.316.7:575.224

В.И.Грищенко, М.П.Петрушко, Н.Н.Чуб

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЭКВИЛИБРАЦИИ С РАСТВОРАМИ КРИОПРОТЕКТОРОВ

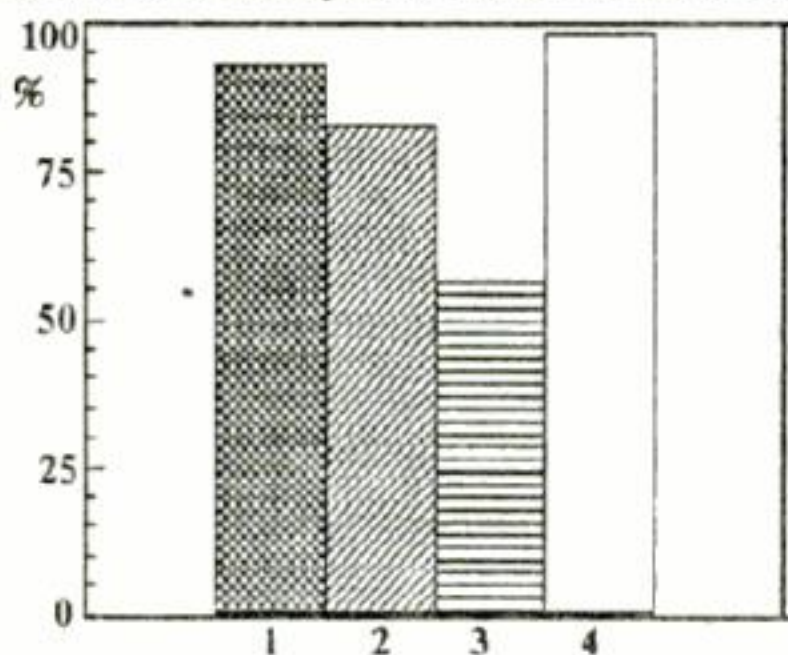
Одним из путей решения проблемы сохранения редких и исчезающих видов растений и животных является создание криобанков. В настоящее время в США, ФРГ, Франции, Канаде и других странах уже созданы банки эмбрионов млекопитающих и человека. Однако сохранение клеток при помощи низких температур влечет за собой еще одну проблему, а именно: в процессе криоконсервирования клетки подвергаются воздействию экстремальных факторов (высокие концентрации криопротекторов, низкие температуры), которые в той или иной мере могут оказывать влияние на генетический аппарат клетки. Суммарные сведения о встречаемости различных типов хромосомных изменений представлены в таблице. На долю триплоидии у мышей, крыс и кроликов приходится почти половина всех хромосомных aberrаций. У человека в абортных плодных пузырях либо материале искусственных абортов доминирует анэуплодия. Долгое время считалось, что при криоконсервировании не происходит накопления мутаций, что обуславливает лучшую сохранность чистых линий животных, чем обычный метод поддержания линий путем их воспроизводства [4, 9]. Под влиянием ионизирующей радиации в эмбрионах, которые хранились при -196°C , не возникали генетические отклонения, в отличие от клеток, которые облучали при нормальной температуре [9]. Однако в последнее время в литературе описаны случаи возникновения нарушения генетического аппарата после криоконсервирования эмбрионов. Обнаружено, что наибольшее количество хромосомных повреждений возникало у ооцитов, находящихся в метафазе 2 мейоза [6]. Показано, что у двухклеточных мышечных эмбрионов, замороженных медленно и сверхбыстро с использованием ДМСО, уровень хромосомных aberrаций, а именно митотических кросинговеров, составил 3,5% [2]. Эти данные отражают влияние сочетания факторов криоконсервирования, т.е. действие низких температур и растворов криопротекторов. Целью нашего исследования было определение влияния криопротекторов на морфофункциональные и цитогенетические особенности мышечных эмбрионов. В экспериментах были использованы мыши линии СВВА. После естественного спаривания и обнаружения копулятивной пробки самок забивали путем дислокации шейных позвонков. Эмбрионы вымывали из яйцеводов утром 3-го дня беременности фосфатно-буферной средой с 20%-й инактивированной сывороткой крови плодов коровы. В качестве криопротекторов использовали 1 М глицерин, 1,5 М ДМСО, 3 М ДМСО. Эквilibрацию эмбрионов с растворами криопротекторов проводили 20 мин при комнатной температуре. О влиянии криопротекторов на морфофункциональное состояние эмбрионов судили по их развитию в культуре до стадии бластоцисты. Эмбрионы, достигшие этой стадии, фиксировали по методу Тарковского для получения цитологических препаратов. Всего было проанализировано 106 клеток на стадии Бластоцисты. Как видно из рисунка, добавление всех растворов криопротекторов в среду при комнатной температуре снижает жизнеспособность и развитие эмбрионов. На-

Соотношения разных типов хромосомных aberrаций на ранних стадиях эмбриогенеза у млекопитающих и человека, приходящихся на 100% aberrаций (по [1])

Хромосомные нарушения	Человек	Мышь	Крыса	Кролик	Свинья
Трисомия	52	17	17	5	75
Полиплоидия	26	47	60	36	
Моносомия	15	5	6	9	25
Мозаицизм	—	15	13	18	—
Другие хромосомные aberrации	7	26	4	18	—

Соотношения разных типов хромосомных aberrаций на ранних стадиях эмбриогенеза у млекопитающих и человека, приходящихся на 100% aberrаций (по [1])

иболее физиологичным является глицерин, после 2-минутной экспозиции с раствором которого развивается 92,9% эмбрионов. После добавления 1,5 М ДМСО дальнейшее развитие *in vitro* наблюдали у 82,6%, в то время как при добавлении 3 М ДМСО – 56,3%. Морфологическое состояние эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, не отличалось от нативных клеток: бластоциста заключена в *zona pellucida*, в центре четко видна бластоцель, бластула выстлана тонким слоем бластомеров и более плотной массой, выступающей в бластоцель. Остальные эмбрионы, эквивилиброванные с раствором 3 М ДМСО, отличались наличием плотных темных участков, агрегацией бластомеров, неправильной ориентацией бластоцели. Анализ фиксированных препаратов, полученных после культивирования эмбрионов, эквивилиброванных с 1,5 и 3 М растворами ДМСО на стадии морулы, показал, что в 17,4 и 43,7% случаев возникает остановка дробления отдельных бластомеров, и количество бластомеров в ранней бластоцисте менее 64 клеток, что не имеет места в контроле. Интересно отметить, что после эквивилибрации с 3 М ДМСО преобладают клетки с бобовидными, амёбовидными ядрами. Базофильность ядер менее выражена, чем в нативных клетках. Возникают трех-, четырех- и мультиполярные митозы, наблюдается отставание хромосом, изменяется митотический индекс. При подсчете числа хромосом в метафазных пластинках было



Жизнеспособность мышиных эмбрионов после эквивилибрации в растворах криопротекторов: 1 – 1 М глицерин, 2 – 1,5 М ДМСО, 3 – 3 М ДМСО, 4 – контроль

обнаружено, что хромосомы нативных эмбрионов имеют четко определенную ориентацию, четкую морфологию, 40 акроцентричных хромосом. Аналогичные метафазные пластинки наблюдали у эмбрионов, развившихся в бластоцисту, после эквивилибрации с 1 М глицерином, 1,5 М ДМСО, однако характеризовались различной степенью выраженности слипания хромосом. Таким образом, после воздействия 3 М ДМСО обнаружены изменение митотического индекса, индукция образования слипшихся хромосом, а также корреляция между плохим качеством по результатам морфологического анализа и наличием этих аберраций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дыбан А.П., Баранов В.С. Цитогенетика развития млекопитающих. – М.: Наука, 1978. – 216 с.
2. Bongso A., Chye N.S., Sathananthan H. et al. Chromosome analysis of two-cell mouse embryos frozen by slow and ultrarapid methods using two different cryoprotectants // *Fert. and Ster.* – 1988. – 49, № 5, P. 908–912.
3. Friedler S., Gindice L., Lamb E. Cryopreservation of embryos and ova // *Fert. and Ster.* – 1988. – 49, № 5. – P. 743–764.
4. Glenister P., Wittingham D., Wood M. Genome cryopreservation: A valuable contribution to mammalian genetic research // *Genet. Res.* – 1990. – 56, № 2–3. – P. 253–258.
5. Glenister P., Wood M., Kirby C., Wittingham D. Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro* // *Gamete Res.* – 1987. – 16. – P. 205.
6. Mohr L., Trounson A. Structural changes associated with freezing of bovine embryos // *Biol. Reprod.* – 1981. – 25. – P. 1009.
7. Shaw I., Kola I., MacFarlane D., Trounson A. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution // *J. Reprod. Fert.* – 1991. – 91. – P. 9–18.
8. Trounson A. Preservation of human eggs and embryos // *Fert. Ster.* – 1966. – 46, № 1. – P. 1–12.
9. Whittingham D., Leibo S., Mazur P. Survival of mouse embryos frozen at -196°C and -269°C // *Science*. – 1972. – № 178. – P. 411–414.

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

Поступило 22.04.94

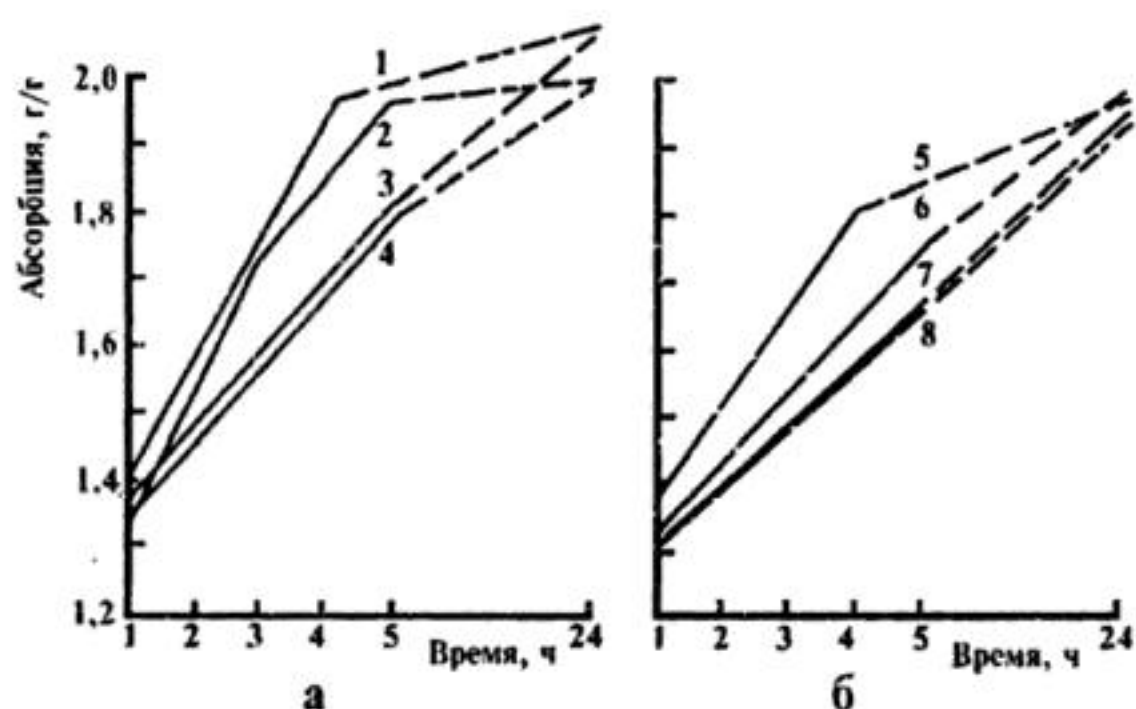
УДК 57.043

А.А. Мартыненко

АБСОРБЦИЯ РАСТВОРОВ 1,2-ПРОПАНДИОЛА И НАТРИЯ ХЛОРИДА СЕМЯДОЛЯМИ ФАСОЛИ В СВЯЗИ С ВОПРОСАМИ КРИОПРОТЕКЦИИ

Для выяснения закономерностей криопротекции важны исследования механизмов переноса веществ в биообъектах. Мы использовали белково-углеводные структуры семядолей фасоли для

изучения абсорбции водных растворов 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и натрия хлорида. Показатели абсорбции определяли путем экспозиции 10 г сухих семядолей в 200 мл раствора при 22–25 °С и выражали величиной относительного увеличения массы материала (г/г – общая масса семядолей с поглощенным раствором / 10). Как показано на рисунке, в растворе 10%-го 1,2-ПД, а также 1%-го NaCl абсорбция осуществляется быстрее, чем в растворе 20%-го 1,2-ПД, а также 2%-го NaCl (рис., 1–4). Более значительное замедление процесса абсорбции наблюдается в условиях сочетания 1,2-ПД и NaCl (рис., 5–8). В растворе, включающем 10% 1,2-ПД и 1% NaCl, показатели абсорбции заметно



Кинетика абсорбции растворов 1,2-пропандиола (а) и натрия хлорида (б) семядолями фасоли: 1- 10%-й 1,2-ПД; 2- 1%-й NaCl; 3- 20%-й 1,2-ПД; 4- 2%-й NaCl; 5- 10%-й 1,2-ПД+1%-й NaCl; 6- 10%-й 1,2-ПД+2%-й NaCl; 7- 20%-й 1,2-ПД+1%-й NaCl; 8- 20%-й 1,2-ПД+2%-й NaCl. Использованы средние величины 3 определений (n = 3).

понижены относительно растворов этих веществ в отдельности (рис., 5, 1, 2), а сочетание 10%-го 1,2-ПД и 2%-го NaCl воздействует на абсорбцию так же, как 2%-й NaCl (рис., 6, 4). Максимальное торможение абсорбции происходит при суммарном воздействии 20%-го 1,2-ПД и 2%-го NaCl (рис., 7, 8), причем различие концентрационного влияния соли утрачивается. Лишенные зародыша семядоли фасоли являются биологическим материалом, включающим 25–30% белков и 70–75% полисахаридов. Этот структурированный материал оказался удачной моделью для рассмотрения применяемых в криобиологии растворов веществ в аспекте их переноса в макроскопический биообъект с возможным отнесением результатов к сложноорганизованным нативным биологическим структурам. На основании приведенных данных можно сделать предварительный вывод о том, что абсорбция криопротекторного раствора белково-углеводными структурами в составе природного макрообъекта происходит с повышенной скоростью при пониженной концентрации растворенных веществ и с пониженной скоростью при повышенной их концентрации. Эта выявленная нами впервые зависимость может иметь существенное криобиологическое значение и поэтому представляет интерес для расширенного изучения с применением различных биообъектов и криобиологических растворов.

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

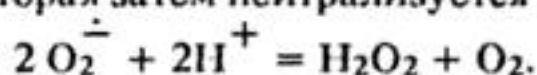
Поступило 25.01.94

1УДК 57.017.3.577.15

Г.В.Погорелова, Г.Ф.Жегунов

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СПЕКТРА Cu, Zn-СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ЗИМНЕСПЯЩИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *CITELLUS UNDULATUS* В ДИНАМИКЕ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ

Известно, что впадение в спячку и спячка характеризуются значительной гипоксией, а пробуждение и возвращение к нормооксии связано с интенсификацией окислительных процессов. Переход от нормооксии к гипоксии при впадении в спячку и, наоборот, – при выходе из нее – сопровождается активацией свободнорадикальных реакций в клетках, усилением процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и накоплением токсичных перекисных продуктов (перекисей жирных кислот, альдегидов, кетонов и прочих продуктов) [11]. Поскольку интенсивность ПОЛ и накопление интермедиатов ПОЛ зависит от активности супероксиддисмутазы (СОД), то представляло интерес исследовать, как адаптируется основное звено антиоксидантной защиты клетки к столь резко меняющимся условиям. Супероксиддисмутаза КФ 1.15.1.11 осуществляет в клетках аэробных организмов уникальную функцию регуляции уровня супероксидных анион-радикалов кислорода – $O_2^{\cdot -}$ [2]. Этот фермент осуществляет рекомбинацию радикалов $O_2^{\cdot -}$ с образованием перекиси водорода, которая затем нейтрализуется каталазой, и триплетного кислорода:



В настоящее время одним из механизмов, способствующих приспособлению и эволюции метаболических систем, считается наличие в клетке набора изоферментов. В связи с этим целью

данной работы явилось изучение изоферментного спектра Cu, Zn-формы СОД у гибернирующих животных на разных этапах баута, а также по сравнению с незимнесящими животными (морские свинки). Опыты проводились на длиннохвостых сусликах *Citellus undulatus* (зимнесящие млекопитающие) и морских свинок *Guinea pig* (незимнесящие млекопитающие). Суслики содержались в условиях холодной камеры при температуре окружающей среды 2–4 °С в зимний период года (ноябрь–февраль). Изоферментный спектр СОД изучали в печени, миокарде и скелетных мышцах. Электрофорез СОД проводили по методу Лэммли с некоторыми модификациями в геле 10%-го акриламида. Электрофореграммы проявляли по специфической активности, как подробно описано в работе [3]. Электрофорез изоферментов СОД в ПААГе показал наличие трех полос активности, соответствующих трем изоформам СОД. Во всех исследованных органах наблюдаются четкие видовые отличия в спектре изоферментов СОД. Как показывают результаты денситометрии, основным изоферментом во всех тканях морских свинок является наименее кислый из них, тогда как у сусликов преобладают более кислые формы СОД, и весь спектр значительно сдвинут вправо, что говорит о существенном отличии ферментов морских свинок и сусликов также по молекулярной массе. Кроме видовых отличий необходимо отметить значительные количественные изменения спектра СОД, которые наблюдаются в различных органах сусликов. Так, во всех изученных физиологических состояниях интенсивность окраски полос значительно выше в печени по сравнению с миокардом и скелетными мышцами. Вероятно, это связано с функциональными особенностями метаболизма печени. При сравнении изозимных спектров СОД из парартов печени сусликов, находящихся в различных физиологических состояниях, не обнаружено качественных отличий, имеют место лишь незначительные количественные различия присутствующих изоформ. В отличие от печени, в миокарде и скелетных мышцах сусликов в зависимости от физиологического состояния наблюдаются и количественные, и качественные изменения. В частности, изозимные спектры мышечной СОД летних и активных сусликов не отличаются. При впадении в спячку исчезает наименее кислая изоформа, которая отсутствует в период гибернации и появляется вновь при пробуждении. Явные отличия наблюдаются также в количественном соотношении пиков активности, причем если в активном состоянии и при впадении в спячку преобладает II-я форма фермента, то при гибернации и пробуждении доминирует наиболее кислый изозим — СОД III. Наиболее значительные изменения при впадении в спячку претерпевает изоферментный спектр СОД миокарда. Так, отличия в распределении изоформ в летнем и активном состоянии носят только количественный характер, при впадении же в спячку резко снижается интенсивность окраски полос, одновременно исчезает III-я форма фермента. Эта картина сохраняется и в гибернирующем состоянии. При пробуждении появляется кислый изозим, но интенсивность окраски полос увеличивается незначительно. Столь существенные количественные и качественные отличия, наблюдаемые в изоферментном спектре СОД миокарда в динамике баута, могут быть связаны со значительными изменениями характера оксигенации и иметь физиологическое значение. Таким образом, можно предположить, что изменения, наблюдаемые в изоферментном спектре СОД в различных физиологических состояниях, направлены на увеличение мощности системы антирадикальной защиты от $O_2^{\cdot -}$ с целью повышения выживаемости в условиях “окислительного стресса”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поберезкина Н.Б., Осинская Л.Ф. Биологическая роль супероксиддисмутаза // Укр. биохим. журнал. – 1989. – 61, № 2. – С. 14–27.
2. McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase // J. Biol. Chem. – 1969. – 244, № 2. – P. 6049–6053.
3. Nishikimi M., Raon A., Jagi K. Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1972. – 46. – P. 849–856.

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

Поступило 24.09.93

УДК 611.013.11+615.361.013.11.014.41.3:615.84.9.19

Т.Л.Весич

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАБИЛИТИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА НАТИВНЫЕ И ПЕРЕНЕСШИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ СПЕРМИИ ЧЕЛОВЕКА

В последние годы интенсивно изучается влияние лазерного излучения на функциональные и метаболические процессы как целостного организма, так и отдельных клеток и клеточных оргanelл. В области репродуктологии лазерные лучи применяют в экспериментальных исследованиях и в клинике с целью стимуляции различных физиологических процессов в организме. Описано

активирующее воздействие лазерного облучения на сперматогенез бесплодных мужчин [3], а также на подвижность спермиев при облучении эякулятов [8]. Стимулирующий эффект гелий-неонового лазера отмечен на сперматозоидах быков при технологии криоконсервирования в гранулах, который проявлялся в повышении количества подвижных спермиев и их терморезистентности [6]. Аналогичные результаты получены нами при воздействии низкоинтенсивного излучения гелий-неонового лазера на замороженные-оттаянные сперматозоиды человека [1], что вызвало необходимость более углубленного исследования процесса реабилитации криоконсервированных клеток под воздействием лазерного облучения. Имеются данные, свидетельствующие о возможной роли каталазы "в качестве акцептора энергии лазерного излучения с длиной волны 632,8 нм" [2]. Установлено повышение скорости фосфорилирования в митохондриях под влиянием каталазы и выдвинута гипотеза об участии каталазы в процессах тканевого дыхания [2]. В связи с этим нами было предпринято исследование активности каталазы и скорости эндогенного дыхания нативной и перенесшей криоконсервирование спермы человека после облучения ее гелий-неоновым лазером. Образцы спермы были получены от здоровых доноров и пациентов с различной степенью олигозооспермии. Криоконсервирование спермы осуществлялось методом, описанным в [4]. Каталазную активность и скорость

потребления кислорода эякулятов определяли по образованию O_2 полярометрически с помощью закрытого электрода Кларка [5, 7], скорость потребления кислорода измеряли полярографически с помощью закрытого электрода Кларка [5]. Было исследовано 67 эякулятов. Каждый нативный и размороженный образец спермы был разделен на две аликвоты, после чего в первой определяли каталазную активность и скорость эндогенного дыхания. Вторую часть подвергали воз-

действию гелий-неонового лазера с длиной волны $\lambda = 632,8$ нм, мощность облучения составляла 6 мВт/см^2 при времени экспозиции 15 мин. После 30-минутной инкубации при комнатной температуре также определяли каталазную активность и скорость эндогенного дыхания. Статистическая обработка результатов исследований производилась методом Стьюдента. Результаты проведенных исследований показали (табл. 1, 2), что активность каталазы и скорость эндогенного дыхания прежде всего зависят от качества как нативного, так и размороженного эякулята. Так, например, каталазная активность нативного эякулята при нормоспермии составляла $(61,79 \pm 1,05) \text{ ед/мл}$, тогда как при олигозооспермии I-II-й степени и олигозооспермии 3-й степени она была равна $(18,2 \pm 0,69) \text{ ед/мл}$ и $(10,45 \pm 0,7) \text{ ед/мл}$ соответственно. Аналогичные результаты были получены при исследовании скорости эндогенного дыхания нативных и криоконсервированных эякулятов человека. Результаты исследования каталазной активности нативных и криоконсервированных спермиев человека до и после облучения гелий-неоновым лазером свидетельствуют об активирующем действии об-

лучения на активность фермента. Если до облучения активность каталазы нативного нормоспермического эякулята равнялась $(61,79 \pm 1,05) \text{ ед/мл}$, то после воздействия лазером она составляла $(66,65 \pm 1,51) \text{ ед/мл}$. Значительной разницы в степени увеличения активности каталазы между эякулятами с нормоспермией и с олигозооспермией, и при сравнении нативных и замороженных-оттаянных эякулятов не было обнаружено. Отмечено также активирующее действие лучей гелий-неонового лазера на скорость эндогенного дыхания нативных и криоконсервированных спермиев. Различия в каталазной активности и скорости эндогенного дыхания нативных и перенесших криоконсервирование спермиев человека до и после лазерного облучения достоверны ($p < 0,05$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о стимулирующем действии низкоинтенсивного излучения гелий-неонового лазера на каталазную активность и скорость эндогенного дыхания

Т а б л и ц а 1
Влияние лазерного облучения (6 мВт/см^2) на каталазную активность (ед/мл) и скорость эндогенного дыхания (платом 0/мин/мл эякулята) нативных эякулятов

Характеристики спермы	Каталазная активность		Скорость эндогенного дыхания	
	до облучения	после облучения	до облучения	после облучения
Нормоспермия, $n=8$	$61,79 \pm 1,05$	$66,65 \pm 1,51$	$3,93 \pm 0,05$	$4,50 \pm 0,043$
Олигозооспермия I-II-й степени, $n=12$	$18,20 \pm 0,69$	$21,47 \pm 0,51$	$2,29 \pm 0,012$	$2,41 \pm 0,02$
Олигозооспермия III-й степени, $n=12$	$10,45 \pm 0,70$	$12,50 \pm 0,75$	$1,37 \pm 0,033$	$2,30 \pm 0,029$

Т а б л и ц а 2
Влияние лазерного облучения (6 мВт/см^2) на каталазную активность (ед/мл) и скорость эндогенного дыхания (платом 0/мин/мл) замороженных-оттаянных эякулятов

Характеристики спермы	Каталазная активность		Скорость эндогенного дыхания	
	до облучения	после облучения	до облучения	после облучения
Нормоспермия, $n=9$	$26,5 \pm 0,88$	$28,93 \pm 0,86$	$3,15 \pm 0,01$	$4,43 \pm 0,015$
Олигозооспермия I-II-й степени, $n=14$	$17,56 \pm 1,02$	$21,20 \pm 1,11$	$2,18 \pm 0,028$	$2,54 \pm 0,031$
Олигозооспермия III-й степени, $n=12$	$9,55 \pm 1,34$	$12,34 \pm 0,88$	$1,12 \pm 0,013$	$1,56 \pm 0,017$

лучения на активность фермента. Если до облучения активность каталазы нативного нормоспермического эякулята равнялась $(61,79 \pm 1,05) \text{ ед/мл}$, то после воздействия лазером она составляла $(66,65 \pm 1,51) \text{ ед/мл}$. Значительной разницы в степени увеличения активности каталазы между эякулятами с нормоспермией и с олигозооспермией, и при сравнении нативных и замороженных-оттаянных эякулятов не было обнаружено. Отмечено также активирующее действие лучей гелий-неонового лазера на скорость эндогенного дыхания нативных и криоконсервированных спермиев. Различия в каталазной активности и скорости эндогенного дыхания нативных и перенесших криоконсервирование спермиев человека до и после лазерного облучения достоверны ($p < 0,05$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о стимулирующем действии низкоинтенсивного излучения гелий-неонового лазера на каталазную активность и скорость эндогенного дыхания

нативных и перенесших криоконсервирование спермиев человека. Наблюдаемое в наших исследованиях усиление биоэнергетических процессов, возможно, оказывает активирующее воздействие на подвижность спермиев и их переживаемость, обнаруженные в предыдущем эксперименте [1].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Весич Т.Л., Крамар М.И. Изучение действия лазерного облучения на нативные и перенесшие криоконсервирование спермии человека // Криобиология. – 1994. – № 2. – С. 55–56.
2. Зубкова С.М., Соколова З.А., Попов В.И., Лапун И.Б. К анализу некоторых сторон механизма действия излучения гелий-неонового лазера // Вопр. курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. – 1983. – № 6. – С. 25–29.
3. Ковалев Е.В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на сперматогенез у мужчин // Вопр. курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. – 1990. – № 5. – С. 33–36.
4. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А. Некоторые аспекты криоконсервации эмбрионов и спермы // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 2. – С. 29–37.
5. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / Под ред. Г.М.Франка. – М.: Наука, 1973. – 320 с.
6. Николов И., Георгиев С. Влияние на лазерното излъчване върху семенна течност от бици при технологията за криоконсервации // Животновъдни науки. – 1986. – 23, № 11. – С. 3–7.
7. Jeulin C., Soufir J.C., Weder P. et al. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma // Gamete Research. – 1989. – 24. – P. 185–196.
8. Sato H., Landthaler M., Haina D., Schill W.-B. The effects of laser light on sperm motility and velocity in vitro // Andrologia. – 1984. – 16, № 1. – P. 23–25.

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

Поступило 22.04.94

ХРОНИКА

На 1-м Учредительном съезде криобиологов и криомедиков Украины, состоявшемся 12 мая 1994 г. в г. Харькове (в Институте проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины), принято решение о создании Украинского общества криобиологов и криомедиков. В нем приняли участие 104 делегата из 9 областей Украины, среди которых 15 докторов и 62 кандидата наук.

По поручению группы руководителей областных организаций криобиологов съезд открыл директор Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины академик НАН Украины В.И.Грищенко. В состав президиума съезда были избраны: Грищенко В.И., Бабийчук Г.А. (Харьков), Пищак В.П. (Черновцы), Мануильский В.Д. (Киев), Слободян Т.В. (Николаев). Была принята следующая повестка дня съезда: 1. Достижения и перспективы развития криобиологии в Украине. 2. О развитии криобиологии на Киевщине. 3. Утверждение устава Украинского общества криобиологов и криомедиков. 4. Выборы правления, председателя и его заместителей. Выборы ревизионной комиссии.

По первому вопросу с докладом выступил академик НАН Украины В.И.Грищенко. По второму вопросу заслушали выступление академика Экологической академии Украины, докт. биол. наук В.Д.Мануильского. По третьему вопросу выступил докт. биол. наук, профессор Г.А.Бабийчук. После обсуждения участники съезда утвердили проект Устава Украинского общества криобиологов и криомедиков.

На съезде избран состав правления общества. В него вошли: Пищак В.П. (Черновцы), Сабодаш Е.В. (Луганск), Гольцев А.Н. (Харьков), Запорожан В.Н. (Одесса), Рысик Н.С. (Севастополь), Соболев В.И. (Донецк), Кириухин И.Ф. (Симферополь), Литвин Ю.П. (Днепропетровск), Чемерис И.И. (Сумы), Гнатив В.В. (Тернополь), Осипенко А.П. (Ужгород), Одабашьян А.Л. (Полтава), Белоус В.И. (Житомир), Нардид О.А., Репина С.В., Капрельянц А.С. (Харьков), Грищенко В.И. (Харьков) — председатель, Бабийчук Г.А. (Харьков) — зам. председателя, Мануильский В.Д. (Киев) — зам. председателя, Белоус А.М., Осташко Ф.И., Панков Е.Я., Пушкарь Н.С., Снурников А.С., Гарбуз В.И. (Харьков).

Съезд утвердил также состав президиума общества: Грищенко В.И., Бабийчук Г.А., Гольцев А.Н., Нардид О.А., Репина С.В., Капрельянц А.С., Осташко Ф.И., Мануильский В.Д. В состав ревизионной комиссии, утвержденной съездом, вошли: Нардид О.А., Гарбуз В.И., Моисеев В.А.

В июле Украинское общество криобиологов и криомедиков зарегистрировано в Министерстве юстиции Украины.

О.А.Нардид

3 июля 1994 года исполнилось 90 лет со дня рождения известного биохимика, члена-корреспондента НАН Украины, заслуженного деятеля науки Украины, профессора, доктора биологических наук Арона Михайловича Утевского (1904–1988 гг.), основателя и руководителя лаборатории криобиохимии нейро-гуморальных систем Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР (1975–1988 гг.).

А.М.Утевский, окончив в 1924 г. биологический факультет Харьковского университета, поступил в аспирантуру Украинского биохимического института, возглавляемого академиком А.В.Палладиным. Выполненные им исследования по биохимии авитаминозов и изучению внутриклеточного углеводного обмена, став предметом диссертационной работы, позволили по новому осветить процессы окисления пировиноградной кислоты, определить их влияние на образование дикарбоновых кислот в мышечной ткани.

С 1931 г. А.М.Утевский заведует кафедрой биохимии Харьковского медицинского института (ХМИ). Одновременно он возглавляет биохимический отдел в Украинском институте экспериментальной эндокринологии (УИЭЭ). В 1934 г. он организует отдел биохимии в Украинском институте экспериментальной медицины (УИЭМ). На кафедре биохимии и в этих отделах исследуются вопросы изменчивости ферментов и внутриклеточный обмен в железах внутренней секреции. Роль процессов внутриклеточного обмена в образовании, резервировании и секреции гормонов, биохимическая динамика эндокринных органов, становится основным направлением его исследований.

С середины 30-х годов А.М.Утевский со своими учениками и сотрудниками проводит цикл исследований в области биохимии адренергических гормонов-медиаторов — катехоламинов, которые принесли ему широкую известность.

Этот плодотворный период научных исследований А.М.Утевского был прерван войной. В годы Великой Отечественной войны А.М.Утевский работал и. о. директора Киргизского медицинского института, в который влился 2-й Харьковский медицинский институт. Им было организовано первое в Киргизии производство витаминов для снабжения госпиталей.

После освобождения г. Харькова в 1944 г. А.М.Утевский возобновляет работу в ХМИ, где он возглавляет кафедру биохимии и одновременно биохимический отдел УИЭЭ. Послевоенные фундаментальные исследования, проведенные им и его сотрудниками, были посвящены изучению формирования центральных и периферических нейро-эндокринных механизмов, лежащих в основе регуляции и интеграции процессов и функций в организме животных и человека. Большое значение для понимания и исследования этих процессов имела выдвинутая и экспериментально обоснованная А.М.Утевским концепция о функциональном значении обмена адренергических гормонов-медиаторов в механизме их регуляторного действия. Было высказано положение о ведущем значении в механизме действия катехоламинов не только количества гормона-медиатора и скорости его изменения, как долгое время считалось в эндокринологии и нейрохимии, но и пути, по которому осуществляется это изменение (метаболический вектор регулятора). Обоснованная и сформулированная А.М.Утевским концепция оказалась приложимой и к другим регуляторам обмена — йодированным тиронинам, стероидным гормонам, нейропептидам, — что расширило границы ее значимости и пронесло А.М.Утевскому международную известность.

В 1975 г. А.М.Утевский по приглашению Н.С.Пушкаря переходит на работу в Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, где организует Лабораторию криобиохимии нейро-гуморальных систем, в которой развивает с сотрудниками новое перспективное направление — криобиохимию регуляторных систем, занимается исследованием влияния криогенных факторов на функциональные свойства адренергических систем, поиском оптимальных методов криозащиты гормонально-медиаторных и рецепторных механизмов регуляции.

Большое внимание уделял А.М.Утевский использованию данных и концепций криобиологии для анализа общебиологических проблем, вопросам, имеющим методологическое значение для формирования криобиологии как науки, и связи ее с другими отраслями знаний. Весьма плодотворной была работа Арона Михайловича в проблемной комиссии, где происходило концептуальное оформление теоретических и прикладных исследований в криобиологии. А.М.Утевский — автор более 200 научных публикаций по биохимии; известны также его работы по истории науки, философии естествознания, научно-популярные статьи и книги, публикации по методике лекционной пропаганды. А.М.Утевский был блестящим лектором, с огромным интересом и самоотдачей занимался преподавательской работой. Среди его учеников 21 доктор и 65 кандидатов наук, многие стали видными учеными, заведующими кафедрами и отделами. Большую работу проводил А.М.Утевский по пропаганде достижений биохимии среди работников практического здравоохранения, по внедрению в клиники новых биохимических методов исследования. А.М.Утевский был бессменным председателем Харьковского биохимического общества, участвовал в руководстве работой Всесоюзного и Украинского биохимических обществ и ряда научных советов, был членом редколлегий ряда научных журналов, БСЭ и БМЭ. За заслуги перед страной А.М.Утевский был награжден Почетными грамотами Президиума Верховного Совета Украинской ССР и Президиума Верховного Совета Киргизской ССР, медалями.

Яркая творческая жизнь А.М.Утевского — пример беззаветного служения науке, его интеллигентность и порядочность, доброжелательность и чуткость живут в памяти его учеников, развивающих его идеи и концепции, продолжающих дело его жизни.

В.И.Грищенко, В.А.Чуйко

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

4 1994

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. – "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском языках. Объем 5,6 печ. л., периодичность четыре номера в год. В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

Журнал переводится на английский язык и распространяется по подписке в США, Франции, Израиле, Германии, Японии.

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

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

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

ИНДЕКС 70474
ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1994. № 4. 1-56