

4

ISSN 0233-7673

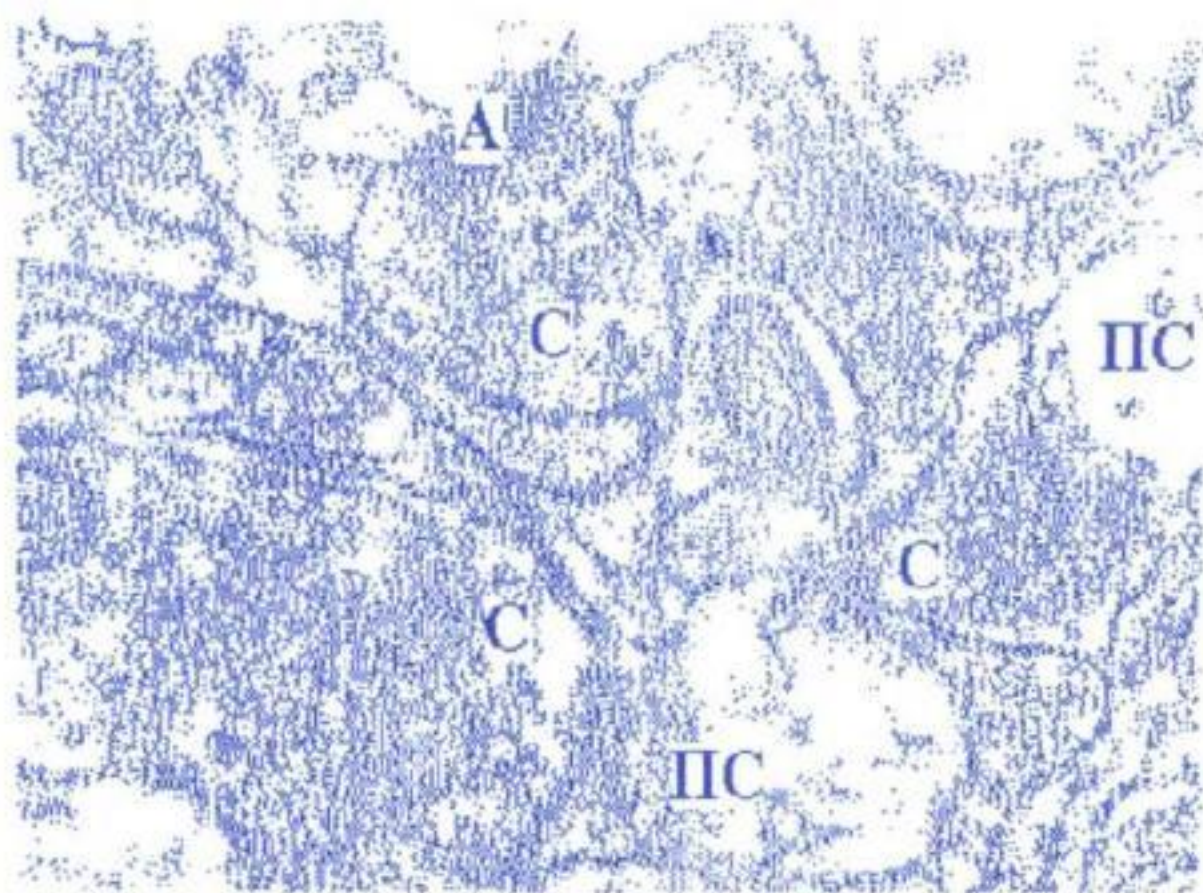
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1995

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ОБНОВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР И ФУНКЦИЙ С
ПОМОЩЬЮ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР И КРИОКОНСЕРВИРОВА-
НИЯ – НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

В.И.Грищенко, Э.И.Обозная-Печенежская, Е.Я.Панков

К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭН-
ЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОХЛАЖДЕННОГО МОЗГА. Сообще-
ние 4. Ультраструктурные особенности и функциональная активность
гематоэнцефалического барьера при ритмических холодовых воз-
действиях *Л.Н.Марченко, Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, В.В.Ломако,
А.В.Шило, Е.В.Алтуева*

Главный редактор **В.И.Грищенко**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Editor-in-Chief **V.I.Grishchenko**

EDITORIAL BOARD

S.I.Aksenov (Moscow), G.A.Babiychuk (Kharkov), A.M.Belous (Associated Editor, Kharkov), M.E.Beker (Riga), Yu.P.Bлагоj (Kharkov), E.Z.Emirbekov (Makhachkala), A.N.Goltsev (Kharkov), V.M.Gordiyenko (Kiev), C.J.Green (Great Britain), V.N.Gurin (Minsk), F.F.Cruz-Sanchez (Spain), W.De Loecker (Belgium), V.I.Lugovoj (Kharkov), V.Ya.Maleyev (Kharkov), G.Matthes (Germany), P.Mericka (Czechia), H.T.Meryman (USA), **E.Ya.Pankov** (Kharkov), Yu.F.Pastukhov (Sankt-Petersburg), E.N.Popov (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 МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1995

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Грищенко В.И., Обозная-Печенежская Э.И., Панков Е.Я. Обновление биологических структур и функций с помощью низких температур и криоконсервирования — новое направление в биологии и медицине 3
- Марченко Л.Н., Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Ломако В.В., Шило А.В., Алтуева Е.В. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 4. Ультраструктурные особенности и функциональная активность гематоэнцефалического барьера при ритмических холодовых воздействиях 10
- Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г., Опанасенко Е.В. Мембранные структуры, определяющие фенотипические характеристики и функциональный статус кровяных клеток; возможная модификация под действием факторов криоконсервирования. Часть II. 19
- Гулевский А.К., Рязанцев В.В., Грищенкова Е.А., Релина Л.И. Изменения в спектре белков личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* в период холодовой акклимации . . . 29

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Суббота Н.П. Функциональное состояние нативных и криоконсервированных аллогепаточитов, предназначенных для клинического использования 32
- Николенко А.В., Компаниец А.М., Луговой В.И. Криопротекторные свойства полиолов и их производных при замораживании тромбоцитов 36

КРИОМЕДИЦИНА

- Романец С.М. Изучение температурной зависимости изменений электрофизиологических показателей сердца крыс при краниocereбральной гипотермии 41
- Чипиженко В.А. Влияние местной гипотермии на кинетические параметры связывания и плотность β -адренорецепторов, а также содержание циклических нуклеотидов кожи с аллергическим контактным дерматитом в эксперименте 44

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Капельяниц А.С., Космина Н.Н. Ультраструктура клеток печени крыс при общем охлаждении 48
- Межидов С.Х., Моисеев В.А. Влияние концентрации внутриклеточного гемоглобина на проницаемость эритроцитов 50
- Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Влияние возрастающих концентраций NaCl в гипертонической сахарозной среде на холодовой и гипертонический шок эритроцитов 51
- Луценко Е.Д. Использование пеннинг-метода для получения обогащенных стволовыми клетками популяций из криоконсервированного костного мозга 52

<i>Овсянников С.Е.</i> Активность ферментативной антиоксидантной системы печени крыс после острого охлаждения организма	54
<i>Божок Г.А., Руденко С.В., Бондаренко В.А.</i> Чувствительность субпопуляций эритроцитов разного возраста к постгипертоническому гемолизу	55

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Grischenko V.I., Oboznaya-Pechenezhskaya E.I., Pankov E.Ya.</i> Renewal of biological structures and functions with the help of low temperatures and cryopreservation - a new trend in biology and medicine	3
<i>Marchenko L.N., Babiychuk G.A., Marchenko V.S., Lomako V.V., Shilo A.V., Altuyeva E.V.</i> On the mechanisms of regulation of permeability of blood-brain barrier of the cooled brain. Report 4. Ultrastructural peculiarities and functional activity of blood-brain barrier during rhythmic cold exposures	10
<i>Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Ostankova L.V., Dubrava T.G., Opanasenko E.V.</i> Membrane structures, determining phenotypical characteristics and functional status of hemopoietic cells; their possible modification under the action of cryopreservation factors. Part II	19
<i>Gulevsky A.K., Ryazantsev V.V., Grischenkova E.A., Relina L.I.</i> Changes in the protein structure of <i>Tenebrio molitor</i> larvae during cold acclimation	29

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

<i>Subbota N.P.</i> Functional state of native and cryopreserved allohepatocytes, destined for clinical application	32
<i>Nikolenko A.V., Kompaniets A.M., Lougovoy V.I.</i> Cryoprotective properties of polyols and their derivatives during freezing of platelets	36

CRYOMEDICINE

<i>Romanets S.M.</i> A study of the temperature dependence of changes in the electrophysiological features of the rat heart during craniocerebral hypothermia	41
<i>Chipizhenko V.A.</i> The effect of local hypothermia on the kinetic parameters of binding and density of β -adrenoreceptors, and the content of cyclic nucleotides in the skin with allergic contact dermatitis in the experiment	44

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Kaprelyants A.S., Kosmina N.N.</i> Ultrastructure of rat's liver cells under general cooling	48
<i>Mezhidov S.Kh., Moiseyev V.A.</i> The effect of concentration of the intracellular hemoglobin on the permeability of red blood cells	50
<i>Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.</i> Effect of increasing NaCl concentrations in hypertonic sugar medium on cold and hypertonic erythrocyte shock	51
<i>Lutsenko E.D.</i> Application of penning-method for obtaining enriched stem cells of populations from cryopreserved bone marrow	52
<i>Ovsyannikov S.V.</i> Activity of the enzymatic antioxidative system of the rat liver after acute cooling of the organism	54
<i>Bojok G.A., Rudenko S.V., Bondarenko V.A.</i> Sensitivity of erythrocyte populations of different age to posthypertonic hemolysis	55

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

Адрес редакции:

310015, Харьков,

ул. Переяславская, 23,

тел. (0572) 72-10-39

Научный редактор *В.И.Луговой*

Редактор *Л.А.Рябинина*

Компьютерный набор и верстка: *И.П.Михайлова, Л.А.Рябинина, Л.В.Смык, А.М.Шаталов*

Подп. в печ. 21.08.96. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.

Тираж 350 экз. Цена договорная. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

ОБНОВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР И ФУНКЦИЙ С ПОМОЩЬЮ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР И КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ – НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Известно, что холод сохраняет или повреждает биообъекты. Но может ли холод вызвать генетически запрограммированные благоприятные изменения (обновление) в биообъектах? В литературе эта проблема почти не обсуждалась. Однако ее актуальность при современном состоянии экологии, возрастании заболеваемости и смертности очевидна. Авторами представлены новые конкурентноспособные технологии повышения трансплантационной способности гемопоэтических клеток, оплодотворяющей способности сперматозоидов, эффективности лечения гипоксических, коматозных и постлучевых состояний организма и новые методы их диагностики.

С помощью низких температур и криоконсервирования можно сохранить биообъекты в жизнеспособном состоянии. Однако в последние годы в связи с экологическими, радиационными и другими проблемами исходный уровень биообъектов не может быть эталоном их качества. Проблема выживаемости человечества потребовала развития нового направления в биологии и медицине — криобиологии обновления, изучающей механизмы необратимых благоприятных изменений (обновления) биологических структур и функций с помощью низких температур.

Идею качественного обновления криоконсервированных биообъектов горячо поддерживал и защищал известный на Украине и за ее пределами ученый-биохимик и криобиолог А.М.Утевский. Основные положения криобиологии обновления теснейшим образом перекликались с его собственными исследованиями. Криоконсервирование, как утверждал А.М.Утевский, представляет собой качественно новое явление, характеризующееся не преформацией, не возвратом к исходному, переходом не от неживого к живому, а от особого состояния ограниченной функциональной способности к полифункциональной жизнедеятельности.

Созданию основ криобиологии обновления предшествовал длительный этап разработки методов определения жизнеспособности клеток и диагностики патологических состояний организма, на которые получено в настоящее время более 40 рационализаторских удостоверений. Создано также новое направление в криоцитологии клетки — изучение внутриклеточных структур и функций в их взаимосвязи. Экспериментальные и теоретические разработки авторов прошли испытания и подтверждены актами внедрения в 15 учреждениях и лечебных заведениях Харькова, Полтавы, Львова и Петропавловска. Наиболее полно вышеизложенное отражено в монографии “Цитохимия замороженной клетки” (Э.И.Обозная и др., [3]) и атласе “Цитохимия костного мозга при криоконсервировании” (Э.И.Обозная, Е.Я.Панков, [2]), а также в статье “Качественное обновление свойств клеток после криоконсервирования” (В.И.Грищенко, Е.Я.Панков, Э.И.Обозная [1]).

Ниже в кратком изложении представлены основные разработки авторов, касающиеся ранней доклинической диагностики коматозных, гипоксических и постлучевых состояний организма, не диагностируемых общепринятыми методами, и способов их лечения. Так, согласно формуле закрытых авторских свидетельств №1329352 (Э.И.Обозная, 1987) и №1822761 (С.И.Логинов, Э.И.Обозная, 1992) разработаны способы ранней доклинической диагностики больных ишемической, геморрагической и постлучевой патологиями с целью их своевременного лечения, а также реанимационных мероприятий по выводу



из коматозного состояния, сроки которого в результате проведенного лечения сократились в среднем на 3–5 дней.

Одной из задач криобиологии обновления является создание новых технологических процессов, способных перевести биообъекты на качественно иной уровень гомеостаза. Для ее решения существует несколько приемов: 1) перенос генов-ХА, генов, индуцирующих гетерозисный эффект, и генов белков-антифризов; 2) индукция криомутаций и криогибридов с гетерозисным эффектом; 3) активация энергообразующих и других систем в стационарной кинетике биохимических реакций. В настоящее время создана теоретическая и имеется практическая база для этих исследований. Так, установлено, что экспрессия генов-ХА осуществляется на транскрипционном уровне, не стимулируется и не индуцируется тепловым шоком, водным стрессом или ранением (Mohapatra S.S. et al., [7]). Экспрессия генов-ХА при -4°C скоординирована и осуществляется на транскрипционном уровне. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при использовании метода дифференциальной гибридизации идентифицированы гены, экспрессия которых индуцируется при низкой температуре (Kondo K., Inouye M., 1991). Анализ проростков *in vitro* трансляции поли (А)⁺РНК, выделенных из разных растительных тканей, свидетельствует о транспецифической экспрессии генов, индуцируемых низкими температурами (Danyluk J., Sarhan F., 1990). Считают, что развитие морозоустойчивости ассоциировано с экспрессией специфических генов, регулируемой на транскрипционном уровне. Холодоустойчивость пшеницы, например, контролируется 2 локусами хромосомы 5А (Roberts D.W.D., [8]). Один локус, частично контролирующий холодоустойчивость, тесно сцеплен с локусом, контролирующим длину листьев. Другой локус, по мнению авторов, тесно сцеплен с геном $V_{rn}1$, обуславливающим образ жизни. Этот локус может частично контролировать розеточный тип куста. Предположили, что ген $V_{rn}1$ зависит от температуры и отчасти является пусковым механизмом яровизации, холодоустойчивости и развития розеточного типа куста. Иными словами, ген $V_{rn}1$ может кодировать синтез специфических к низкой температуре белков. Выделен ген устойчивости пшеницы к низким положительным температурам (Whelan E.D.P., 1991). Ген доминантен и локализован на коротком плече хромосомы 6D *Chinese spring*. Проведено молекулярное клонирование и даны характеристики новых групп генов, ответственных за холодоустойчивость у риса (Bink Le Tran, Oono Kiyoharu, 1992). В природе большинство из 40 генов белков-антифризов, выделенных из семенников рыб, находятся в участках ДНК длиной 7–8 пар оснований, чередующихся в виде tandemных прямых повторов (Scott G.I. et al., [9]). Каждый повтор содержит единственный ген белка-антифриза длиной 1 тыс. пар оснований, транскрипционно ориентированный так же, как и другие подобные гены. Установлено, что гены белков-антифризов tandemно связаны и сгруппированы в геноме камбалы. Изучение организации генома показало, что образование антифризных полипептидов связано с семейством генов, эволюционно более поздних, чем остальной геном (Shidio Sond et al., 1987). Обнаружена также экспрессия белков холодового шока (БХШ), кодируемая специфическими генами: у *E. coli* в условиях низкотемпературного шока увеличивается синтез 14 белков, а синтез белков теплового шока резко снижается (Van Bogelen et al., 1992). Субъединица А ДНК-гиразы является белком холодового шока и продолжает синтезироваться после переноса растущих культур *E. coli* с 37°C на 10°C (Jones Pamela G. et al., 1992). Установлено, что ген *hns*, расположенный на 27 мин хромосомы *E. coli* и кодирующий нуклеотидный белок Н-NS размером 15,4 кД, относится к регулятору холодового шока (Anna La Teana et al., 1991). Показано влияние низких положительных температур на наследование продолжительности жизни взрослых особей *D. Melanogaster* (Gonemura Isamu et al., 1990). При варьировании температуры от 17 до 27°C аутосомные аллели продолжительности жизни A_1 и A_2 проявляли

главные эффекты: увеличение продолжительности жизни с понижением температуры. Сцепленные с полом аллели продолжительности жизни X_1 и X_2 играют вторичную роль во влиянии на продолжительность жизни. Проанализированы гены устойчивости к низкой (12°C) температуре у групп *Poecilia reticulata* в связи со сцепленным с полом наследованием (Fujio G., 1990). Предположили, что аллель устойчивости (R) к низкой температуре доминантен по отношению к аллелю восприимчивости (r); при этом ген R_2 , по-видимому, сцеплен с половой X-хромосомой. Отмечено также, что уровень экспрессии гена R_2 находится под существенным средовым (физиологическим) контролем, чем обуславливается значительная дифференцировка его проявления у разных линий групп, подтвержденная другими авторами: продолжительность инкубационного периода жизни зимней камбалы связана с температурой развития и влияния родителей на 93 и 3% соответственно (Chambers D.Ch., Leggett W.C., 1989). Обнаружили также высокое наследование устойчивости к низким отрицательным температурам ($0, -1, -8^\circ\text{C}$) у молодых проростков риса (Morishima, Hiroko et al., 1991) и клевера ползучего (*Garadus S.R. et al.*, 1990). Авторы считают, что перенос генов-ХА может повысить морозоустойчивость и урожайность растений. Методом переноса генов белков-антифризов можно повысить холодоустойчивость ряда рыб.

Индукция криомутаций и криогибридов с гетерозисным эффектом. Авторы показали, что определенные режимы криоконсервирования гемопоэтических клеток при -196°C позволяют направленно изменять морфофункциональные свойства и получать мутанты с гетерозисным эффектом (Э.И.Обозная, О.П.Маркова, 1979). Обнаружены мутантные формы мегакариоцитов криоконсервированного костного мозга. Последние характеризуются увеличением метаболически активной зоны, описанной М.И.Корневской и др. (1982), идущей на построение полисахаридного компонента мембраны будущих тромбоцитов и интенсификацией тромбоцитоотделения. Спустя 5–10 лет гетерозисный эффект, индуцируемый криоохлаждением, был обнаружен другими авторами. Установлено, что определенные режимы обработки сверхнизкими температурами ($-180 \div -190^\circ\text{C}$) дрожжевых микроорганизмов позволяют направленно изменять морфофункциональные свойства и получать мутанты с полезными биохимическими и технологическими свойствами (С.Ц.Котенко и др., 1984). Выделен биологически активный штамм дрожжей (М-12х) с измененной и увеличенной морфологией, который способен осуществлять брожение при сравнительно низких ($-11 \div -12^\circ\text{C}$) температурах, улучшать качество виноматериалов за счет большего синтеза эндогенных антиоксидантов, меньшего — альдегидов и летучих кислот. Получен гетерозисный криогибрид между немецким карпом и сазаном, который характеризуется скоростью роста в 2 раза большей, чем у родительских форм (Е.Ф.Копейка и др., 1990). Локализовали гены, влияющие на гетерозисный эффект. Наибольший вклад в гетерозисный эффект холодогового мутантного штамма *D.Melanogaster* (большую репродуктивную способность) оказала хромосома 3, затем 2,1 (Guegga D., Cavicchis, 1984). Аналогичные работы можно проводить на различных биологических объектах благодаря величайшему открытию, сделанному генетиками. Установлена известная универсальность кода. Показано, что одинаковые триплеты кодируют одинаковые аминокислоты в бесклеточных системах у различных организмов (бактерии, клетки млекопитающих). Код оказался универсальным для вирусов, водорослей и морского ежа. Гены человека представляют собой различные последовательности тех же самых четырех “букв генетического алфавита”, из которых составлены гены рыбы, злаков, бактерий и дрожжей, а именно: аденозина, цитозина, гуанина, тимина.

Активация энергообразующих и других систем в стационарной кинетике биохимических реакций. Авторами изучен механизм криоповреждения, в котором ведущая роль отведена выходу цитохрома с из митохондрий и сни-

жению активности дыхательных ферментов (Э.И.Обозная, О.П.Маркова, 1976). Спустя 10–20 лет эти данные подтвердили другие авторы (Mogu Yoki et al., 1986, А.Ю. Петренко, 1993). Известно, что основная часть энергии биологического окисления освобождается в результате реакций, катализируемых цитохромной системой, и резервные возможности у дыхательных ферментов очень велики. Цитохромоксидаза в физиологических условиях проявляет лишь 5% максимальной каталитической активности. Активация энергообразующих систем в стационарной кинетике переноса электронов возможна благодаря существованию двух форм дыхательной цепи — активированной и неактивированной, переходящих одна в другую, соотношение между которыми регулируется концентрацией кислорода в среде либо количеством цитохрома с в клетке. Недостаток их вызывает в ранние сроки активацию энергообразующих систем. Это состояние становится высокоустойчивым, если режим дефицита кислорода либо цитохрома с несколько раз повторяется. Молекулярной основой повышения биоэнергетической активности митохондрий является активация ферментов дыхательной цепи, обеспечивающая высокую скорость транспорта электронов (Atkinson D.E., 1968, Е.М.Хватова и соавт., 1977). Возникновение активированной формы дыхательной цепи может быть результатом изменения ее конформации при переносе электронов. На основании построения кинетической модели доказано, что перенос электронов по дыхательной цепи сопровождается возникновением более компактной формы последней, характеризующейся повышением устойчивости к литическим факторам (В.В.Куприянов и соавт., 1974). Экспериментально показано, что кратковременным ответом митохондрий печени крыс при холодовом воздействии (2–4 °С) является увеличение концентрации цитохромов либо ускорением их синтеза, либо замедлением распада (Е.И.Мохова, И.В.Жигачева, 1977). По мере воздействия холода возрастание цитохромов увеличивает окислительный обмен и приводит к интенсификации митохондриогенеза. Через месяц холодового воздействия устойчиво увеличивается концентрация цитохромов и появляются митохондрии с новыми свойствами. Это обеспечивает стабильное возрастание скорости потребления кислорода печенью.

Таким образом, теоретически и экспериментально доказана возможность обновления биологических структур и функций путем активации энергообразующих систем в стационарной кинетике переноса электронов, что легло в основу разработки авторами новых технологий повышения качества криоконсервированных животных и растительных биообъектов. Согласно формуле патента РФ №1441504 (Э.И.Обозная, А.Б.Савчик, 1994) восстановленные после криоконсервирования при 4°С клетки костного мозга и эмбриональной печени по активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) превосходят контроль в 2 и 3 раза соответственно. Активность СДГ криоконсервированных гемопоэтических клеток, заготовленных от взрослых доноров, сохраняется до 10 сут (1 сут в контроле), от эмбрионов — до 21 сут (2 сут в контроле). Эти данные подтверждены клинически: острый период лучевой болезни после трансплантации криоконсервированного костного мозга взрослых и неполовозрелых мышей переживает соответственно 36 и 64% животных по сравнению с 32 и 54% в контроле (В.И.Строна, 1978, Л.П.Игнашева и др., 1982, А.Н.Гольцев, А.А.Цуцаева, 1984) и 72 против 29% (Л.И.Симонова, 1969). Большая клиническая эффективность гемопоэтических клеток, заготовленных от эмбрионов и плодов, обусловлена, по мнению авторов, следующими их морфофункциональными отличиями: 1) несовершенством внутриклеточных иммунных компонентов, вследствие чего вторичная болезнь либо не наступает, либо развивается в более поздние сроки с менее активным ее течением. Гемопоэтические клетки, заготовленные от взрослых доноров, характеризуются хорошо развитыми иммунными компонентами, что способствует развитию реакции “трансплантат против хозяина”, ведущей к гибели реципиентов;

2) большим процентным содержанием стволовых кроветворных клеток (СКК) и клеток-предшественников, способных восстанавливать гемопоэз в более ранние сроки; 3) преобладанием в миелограмме клеток эритроидного ряда (до 90%), для которых характерным является гликолитический тип обмена. В миелограмме гемопоэтических клеток, заготовленных от взрослых доноров, преобладают миелоидные клетки с окислительным типом обмена, ключевые ферменты которого легко повреждаются при криоконсервировании. Хотя макрофаги и образуются за счет гликолитического цикла, продолжающееся накопление недоокисленных продуктов ведет к аутолитическим процессам, лизису мембран, гибели клетки (некрозу) и гибели организма в целом; 4) продукцией гемоглобина фетального типа (гемоглобин F), отличающегося от гемоглобина взрослого типа (гемоглобин A) более высоким сродством к кислороду и способного более эффективно его связывать (Г.И.Козинец, Е.Д.Гольдберг, 1982). Следовательно, в гемопоэтических клетках незрелых доноров образуется меньше недоокисленных продуктов, что уменьшает и задерживает некроз; 5) наличием мегалобластического ростка кроветворения, характерной особенностью которого является накопление гемоглобина F, преимущества которого описаны выше; 6) наличием островков Бессиса (скопление эритроидных клеток вокруг макрофага). Изучен феномен этого явления. Специально проведенные исследования показали, что 34% клеток, несущих маркер макрофагов F4/80, экспрессируют ген EPO (Wght Ch. et al., 1989). Сделан вывод, что в нормальном кроветворении макрофаги активируют ген эритропоэтина, а эритропоэтин эффективно мобилизует СКК для их трансплантации: введение перед электрофорезом эритропоэтина (500 ед/кг) в экспериментах на молодых свиньях резко повышало выход СКК (Smith D.M. et al., 1993). Выяснена роль эритропоэтина при действии низких температур в связи с другим видом клеточной смерти — апоптозом (запрограммированная гибель клеток). В результате охлаждения до 0–2°C клеток BWS 147 тимомы наблюдали фрагментацию внутринуклеосомной ДНК (Kruman J. et al., 1992). В опытах по введению *in vitro* ³H-тимидина обнаружили разрывы в ДНК эритроидных клеток-предшественников (Koungy M., Bondarant M., 1990). В отсутствие эритропоэтина в эритроидных клетках-предшественниках накапливались отщепившиеся фрагменты ДНК: через 2–4 ч в них наблюдались черты апоптоза, а через 16 ч наступала их гибель. В присутствии эритропоэтина уменьшались разрывы в ДНК в 2,7 раза, эритроидные клетки-предшественники выживали и дифференцировались в ретикулоциты. Таким образом, выявленные на основании собственных и литературных данных 6 морфофункциональных отличительных признаков гемопоэтических клеток, заготовленных от неполовозрелых доноров, обусловлены, в основном, их способностью задерживать некроз и апоптоз, а также мобилизовать СКК для их трансплантации.

Согласно формуле патента РФ №1822761 (С.И.Логинов, Э.И.Обозная, 1994) и Украины №5225 (С.И.Логинов, Э.И.Обозная, 1995) совместно с М.И.Крамар установлено, что после 2–3 сут гипотермического хранения спермиев активность СДГ повысилась в незрелых и зрелых клетках соответственно на 30 и 32%. Недостаток технологии — временный стимулирующий эффект. Совместно с Т.Ф.Стрибуль получен стимулирующий эффект криоконсервирования (–196°C) на этапе прорастания семян с последующим увеличением биомассы растений сои. В новые технологии, разрабатываемые авторами в настоящее время, заложен принцип программной активации морфофункциональных свойств охлажденных и криоконсервированных биообъектов в стационарной кинетике биохимических реакций, что обеспечит более высокий уровень гомеостаза.

В начале 1995 г. статья “Криобиология обновления: факты и перспективы” (Э.И.Обозная-Печенежская, В.И.Грищенко, Е.Я.Панков [4]) была направлена на экспертизу независимым рецензентам ближнего и дальнего зару-

бежья. Эксперты заключили, что криобиология обновления — перспективное направление в биологии и медицине и является прерогативой авторов. Результаты их собственных исследований также укладываются в концептуальную модель обновления холодом. Так, В.И.Ващенко и соавт. (Россия, С.-Петербург, НИЛ Центра крови и тканей ВМА им.С.М.Кирова), изучая состояние суперспиральной ДНК “нуклеотидов” клеток костного мозга, обнаружил деконденсирующее свойство криоконсервирования. Деконденсация, как известно, ведет к включению в работу конститутивных генов и открывает возможность реализации механизмов оперонной регуляции, что лежит в основе генетически запрограммированного обновления. E.Siebzehngrubl (Германия, Эрланген-Нюрнберг, Женская клиника акушерской школы) считает, что криоконсервация оплодотворенных яиц человека повышает вероятность беременности в циклах оплодотворения *in vitro* и при пересадке зародышей. E.J.Kendall (Канада, Институт биотехнологии растений) развитие морозоустойчивости растений яровой пшеницы связывает с обнаруженными им с помощью биохимического анализа 8 уникальными полипептидами и более высоким уровнем сахарозы. Terry D.Beacham (Канада, Тихоокеанская биологическая станция) с помощью 17 ферментных систем, кодируемых 23 локусами, установил, что выживаемость эмбрионов и молоди горбуши мужских и женских линий и их развитие при низких температурах (4 и 15°C) не связаны с гетерозиготностью производителей. Иными словами, температурный фактор играет ведущую, генетически запрограммированную роль в процессе выживаемости биообъектов. Рецензент Charles Guy (США, Флорида, Институт урожая и сельскохозяйственных исследований) в своих работах приводит обзор данных по генетическим аспектам зимостойкости и холодовой адаптации (ХА). Allan K.Hardacre (Новая Зеландия, Институт исследования пищевых культур) обнаружил генетически запрограммированную изменчивость морозоустойчивости проростков кукурузы. К.Ebine (Япония, Токио, Кардиологический центр) отмечает большую устойчивость криоконсервированных гемопоэтических клеток к вирусу гепатита: переливание незамороженной цельной аллогенной крови явилось причиной заболеваний гепатитом в 13,7% случаев (49 из 357 больных), при использовании замороженной аллогенной крови посттрансфузионный гепатит не развивался (0%). D.E.Pegg, главный редактор журнала “Cryobiology”, также дал положительную оценку гипотезе качественного обновления криоконсервированных клеток и тканей. Сделан первый шаг к сотрудничеству. К.Ebine (Япония) предложил выслать статью для опубликования в журнале “Low temperature Medicine (LTM)”, редактором которого он является. Ernst Siebzehngrubl (Германия) стал подписчиком журнала “Проблемы криобиологии”. Оба они оказали небольшую финансовую поддержку исследований в области криобиологии обновления.

Существует уже несколько путей качественного обновления биообъектов с помощью низких и сверхнизких температур. Один из них — повышение потенциала статистической морозоустойчивости, так как в естественных условиях либо при использовании агротехнических факторов он не реализуется (Е.М.Полтарев и др., 1991). Действительно, отмечены, например, повышенные репарационная способность и скорость роста у гибридов гетерозисных проростков кукурузы после воздействия сверхнизких температур (–196°C), хотя повышенной холодоустойчивостью они не отличались (В.Г.Шахбазов и др., 1973). Кинетические исследования показали, что в морозоустойчивом сорте озимой пшеницы новые белки с высокой молекулярной массой обнаруживались через 48 ч после начала обработки холодом, то есть задолго до проявления максимальной устойчивости к морозу (Abromeit Midori et al., 1992), что было подтверждено и на других объектах: продолжительность инкубационного периода зимней камбалы определяется температурой развития и влиянием родителей на 93 и 3% соответственно (R.Chambers et al., 1989). При

варьировании температуры от 17 до 27°C аутосомные аллели продолжительности жизни (ПЖ) взрослых особей *D. Melanogaster* A₁ и A₂ проявляли основной эффект: увеличение ПЖ с понижением температуры (Y. Fujio et al., 1990). Сцепленные с полом аллели ПЖ X₁ и X₂ играют вторичную роль во влиянии на продолжительность жизни. Считается, что ген устойчивости (*Rr*) к низкой температуре (12°C) сцеплен с половой X-хромосомой и уровень его экспрессии находится под существенным средовым контролем.

Другое направление качественного обновления биообъектов — повышение низкими и сверхнизкими температурами устойчивости биообъектов к облучению: при действии рентгеновского излучения на фибробласты яичника китайского хомячка и микроорганизмы снижение температуры от 22°C до –196°C приводило к уменьшению повреждения хромосом и увеличению выживаемости клеток в 3,5 раза [5]. Устойчивость к облучению в летальных дозах при –196°C у гемопоэтических стволовых клеток (CFU-S) была в 3,45, а у предшественников гранулоцитарно-макрофагальных клеток (GM-CFU-C) костного мозга в 3,04 раза выше, чем при нормотермии (Liu Znobin, 1989). В целом, при температуре ниже –100°C клетки млекопитающих становятся более устойчивыми к облучению, чем при комнатной температуре (22°C). Эти данные подтвердились и на растительных биообъектах: в первые часы после облучения, то есть в фазе G₂ при 34°C возникает больше поврежденных клеток боковых корешков конских бобов (*Vicia Faba*), чем при 20°C, при 4°C клеток с абберациями еще меньше (Н.Н.Елисеенко, М.В.Максимова, 1975). Третье направление — снижение с помощью низких и сверхнизких температур заболеваемости вирусным гепатитом (G. Echert, 1974, В.А.Агроненко и др., 1977, Н. J. Altor, 1978, K. Ebine [6] и др.).

Генетически запрограммированное обновление биологических структур и функций с помощью низких температур — природное явление: пероксидазы из тканей северных растений имеют максимальную активность при температурах, которые значительно ниже температурного оптимума для ферментов растений других регионов (В.Г.Алексеева, 1990).

Важнейшее открытие ведущей роли низких температур во взаимосвязанных отношениях “генотип-среда” заставляет пересмотреть ранние представления о селективном свойстве низких температур, которые связывали лишь с отбором устойчивых форм за счет элиминации неустойчивых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грищенко В.И., Панков Е.Я., Обозная Э.И. Качественное обновление свойств клеток после криоконсервирования // Усп. совр. биол. — 1989. — 108, №2. — С. 299–309.
2. Обозная Э.И., Панков Е.Я. Цитохимия костного мозга при криоконсервировании. Атлас. — Киев: Наук. думка, 1989. — 265 с.
3. Обозная Э.И., Пушкар Н.С., Маркова О.П., Панков Е.Я. Цитохимия замороженной клетки. — Киев: Наук. думка, 1981. — 176 с.
4. Обозная-Печенежская Э.И., Грищенко В.И., Панков Е.Я. Криобиология обновления: факты и перспективы // Проблемы криобиологии. — 1993. — № 4. — С. 11–20.
5. Ashwood-Smith M.J., Fridmann W.B. Lethal and chromosome effects of freezing, thawing, storage time and X-irradiation on mammalian cells preserved at 196°C in dimethyl sulfoxide // Cryobiology. — 1979. — 16, №2. — P. 132–140.
6. Ebine K. Nihon reito kyokai ronbunshu // Tran. Jap. Assoc. Refrig. — 1993. — 10, № 2. — P. 283–289.
7. Mohapatra S.S., Wolfrain L., Poole R.J., Dhindsa R.S. Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold — acclimation — specific genes of alfalfa // Plant physiol. — 1989. — 89, №1. — P. 375–380.
8. Roberts D.W.D. Identification of loci on chromosome 5A of wheat involved in control of cold hardiness, vernalization, leaf length, rosette growth habit, and height of hardened plants // Genome. — 1990. — 33, №2. — P. 247–259.
9. Scott G.K., Ned Ch.L., Davies P.L. Antifreeze protein genes are tandemly linked and clustered in the genome of the winter fecunder // Proc. Nat. of the Winter Acad. Sci. USA. — 1985. — 82, №9. — P. 2613–2617.

В.І.ГРИЩЕНКО, Е.І.ОБОЗНА-ПЕЧЕНЕЖСЬКА, **Е.Я.ПАНКОВ**

ОБНОВЛЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ СТРУКТУР І ФУНКЦІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР І КРІОКОНСЕРВУВАННЯ — НОВИЙ НАПРЯМОК В БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНІ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Відомо, що холод зберігає або пошкоджує біоб'єкти. Але чи може холод викликати генетично запрограмовані сприятливі зміни (обновлення) в біоб'єктах? В літературі це проблема майже не обговорювалася. Однак її актуальність при сучасному стані екології, зростанні захворюваності та смертності очевидна. Авторами представлені нові конкурентноспроможні технології підвищення трансплантаційної здатності гемопоетичних клітин, запліднюючої здатності сперматозоїдів, ефективності лікування гіпоксичних, коматозних і постпроменеви́х станів організму та нові методи їх діагностики.

V.I.GRISCHENKO, E.I.OBOZNAYA-PECHENEZHSKAYA, **E.YA.PANKOV**

RENEWAL OF BIOLOGICAL STRUCTURES AND FUNCTIONS WITH THE HELP OF LOW TEMPERATURES AND CRYOPRESERVATION - A NEW TREND IN BIOLOGY AND MEDICINE

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

Cold is known to preserve or damage biological systems. But is the action of cold capable of triggering genetically programmed favorable changes (renewal) in biological systems? this problem received poor attention in the literature. However, current state of ecology, rise in the rate of diseases and lethality testifies to its being urgent. The authors produce new competitive technologies of increasing transplantability of hemopoietic cells, fertilizing ability of spermatozoa, efficiency of treatment of hypoxic, comatose and post-irradiation states of the organism and new methods of their diagnostics.

УДК 616.12:615

**Л.Н.МАРЧЕНКО, Г.А.БАБИЙЧУК, В.С.МАРЧЕНКО,
В.В.ЛОМАКО, А.В.ШИЛО, Е.В.АЛТУЕВА**

К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОХЛАЖДЕННОГО МОЗГА. Сообщение 4. Ультраструктурные особенности и функциональная активность гематоэнцефалического барьера при ритмических холодовых воздействиях

Изучены ультраструктуры гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и синаптического аппарата гипоталамуса крыс при гипотермии. Исследованы секреция, рецепция и проницаемость ГЭБ для моноаминов. Показано, что ритмические холодовые воздействия увеличивают в 3–4 раза проницаемость ГЭБ для ^3H -норадреналина, но не для ^3H -серотонина. Электронограммы свидетельствуют о том, что после холодовых воздействий синаптический аппарат находится в состоянии напряжения, а в эндотелии микрососудов обнаруживаются клатриновые везикулы, активируются процессы рецепторного трансцитоза. Нейротрансмиттерные процессы, обуславливающие проницаемость ГЭБ, могут оказаться пусковым нейрофизиологическим механизмом изменения центральной терморегуляции при гипотермии.

Исследование ультраструктуры элементов ГЭБ терморегуляторных центров гипоталамуса и изменений его проницаемости для нейромедиаторов при холодовых воздействиях представляется актуальным при решении проблем кріобіології, зв'язаних з вивченням ролі ГЭБ в механізмах підтримання температурного гомеостазу млекопитающих. Тем не менее анализ научной литературы по этим вопросам свидетельствует об отсутствии комплексных исследований как функциональных, так и ультраструктурных характеристик ГЭБ при гипотермии. Поэтому целью настоящего исследования было изучение ультраструктурной основы проницаемости ГЭБ терморегуляторных центров гипоталамуса для моноаминов при ритмических холодовых воздействиях.

Эксперименты проведены на белых крысах-самцах массой 180–200 г. Ритмические холодовые раздражения каудальных терморцепторов (РРР) длительностью 1 с с частотой 0,1 Гц (0,1РРР) проводили путем охлаждения хвоста животного ледяной водой ($\sim 5^{\circ}\text{C}$) в автоматическом режиме. Ультроструктуру и функциональные особенности ГЭБ исследовали в медиопреоптической области переднего гипоталамуса и мамиллярных и премамиллярных ядрах заднего отдела гипоталамуса. У разных групп животных 0,1РРР проводили в течение 20, 40, 60 и 80 мин. Материал для нейрофизиологических и электронно-микроскопических исследований брали непосредственно после окончания воздействия, а также через 6, 10, 14, 18 и 60 ч после воздействия. Животных наркотизировали внутрибрюшинными инъекциями смеси тиопентала натрия и оксибутирата натрия из расчета 30 мг/кг и 100 мг/кг массы соответственно. Блокаду α - и β -адренорецепторов вызывали перфузией *ventriculus tertius* 2 мкМ раствором фентоламина и пропранолола и внутрибрюшинными инъекциями из расчета 1 мг на 100 г массы животного. Гепарин и ипрониазид вводили внутрибрюшинно из расчета 500 ед. и 1 мг на 100 г массы животного соответственно. Изучение секреции и проницаемости ГЭБ мозга для меченных по тритию норадреналина (^3H —НА) и серотонина (^3H —СТ) проводили радиоизотопным методом с использованием *push-pull* канюли [2, 9]. Препарирование ткани гипоталамуса для электронно-микроскопических исследований проводили традиционными методами [5]: использовали электронно-плотные маркеры — пероксидазу хрена (по методу Грэхема и Карновского [13]) и 2%-й раствор нитрата лантана внутривенно.

Морфометрический и стереометрический анализы электронно-микроскопических фотографий производили с помощью компьютерной системы МОРФО-ТУЛС. Рассчитывали: 1) отношение средней площади эндотелиальных везикул к средней площади цитоплазмы эндотелиоцитов капилляров гипоталамуса; 2) отношение средней длины аблюминальных и люминальных впячиваний к средней длине аблюминального и люминального контуров эндотелиоцитов; 3) отношение средней длины микровилей к средней длине люминального контура эндотелиоцитов; 4) отношение средней площади базальной мембраны к ее среднему периметру; 5) отношение средней площади эндотелиоцитов к их среднему периметру; 6) отношение средней длины активной зоны синапсов к средней длине синаптического контакта.

Электронно-микроскопический анализ исследованных образцов свидетельствует о том, что гипоталамус крысы обладает сложной микроскопической организацией и представлен нервными и глиальными клетками с их многочисленными отростками, формирующими нейропиль, пронизанный сетью терминальных сосудов. Сосудистый эндотелий вместе с базальной мембраной и перицитами, а также отростки астроглии, окружающие капилляры, составляют, по современным представлениям, морфологическую основу гематоэнцефалического барьера [6, 8, 9]. Поэтому в наших исследованиях мы обратили особое внимание на ультраструктурные перестройки именно в этих основных элементах ГЭБ.

Установлено, что уже через 20 мин после начала 0,1РРР происходят определенные изменения субмикроскопической организации исследуемых областей гипоталамуса, свидетельствующие об активации различных клеточных групп. У части нейронов, находящихся вблизи кровеносных сосудов, выявляются реактивные изменения: повышается насыщенность матрикса и многих органелл, наблюдается активация комплекса Гольджи, приводящая к образованию пузырьков и гранул, появляются лизосомы, часто неправильной формы, многочисленные митохондрии и рибосомы. Синаптический аппарат находится в состоянии повышенного функционального напряжения: синаптические пузырьки во многих синапсах агглютинируют между собой и сливаются с синаптической мембраной, поэтому снижается их количество; возрастают



Рис. 1. Активные синапсы в переднем отделе гипоталамуса крысы (40 мин 0,1РРР), Х40000: С — пресинаптический бутон с синаптическими пузырьками, ПС — постсинаптический бутон, А — активная зона синаптического контакта

протяженность и электронная плотность зон синаптических контактов, увеличивается средняя длина активной зоны (табл. 1, рис. 1, 4). Необходимо отметить, что обнаруженные изменения ультраструктуры нейронов наиболее выражены в медиопреоптической области переднего гипоталамуса (по сравнению с задним), в области которой, как известно, располагаются нервные клетки, активирующиеся при температурных воздействиях [3]. Поэтому показанные нами реактивные изменения части нейронов могут косвенно свидетельствовать об их принадлежности к пулу термокомпетентных клеток.

Т а б л и ц а 1

Морфометрический анализ электронных микрофотографий синапсов переднего отдела гипоталамуса крыс при 0,1РРР

Объекты исследования	Контроль	Время воздействия, мин			Время после воздействия, ч				
		20	40	60	6	10	14	18	60
Относительная длина активной зоны синапса	0,4±0,04	0,6±0,03	0,55±0,04	0,5±0,03	0,49±0,04	0,41±0,03	0,39±0,04	0,4±0,03	0,4±0,06
Количество синаптических пузырьков	65±5	28±4	33±4	40±5	38±5	60±6	64±6	66±7	65±5
Количество активных синапсов, %	55±5	90±9	80±7	76±8	74±7	55±6	57±6	58±6	55±7

Ритмические холодовые воздействия оказывают заметное влияние на ультраструктуру астроглии, особенно это касается отростков астроцитов, окружающих терминальные сосуды. Через 20 мин воздействия отмечено снижение электронной плотности концевых ножек, напоминающее некоторые признаки отека, исчезающие к 80-й мин воздействия (рис. 2). Многие исследователи считают, что именно астроциты способствуют поддержанию в эндотелиальных клетках капилляров мозга особой ультраструктурной организации, обеспечивающей функционирование ГЭБ. Предполагают, что астроцитарная глия индуцирует формирование плотных контактов, специфических ферментов ГЭБ и подавляет пиноцитоз, формирование эндотелиальных каналов и фенестр [8, 14].

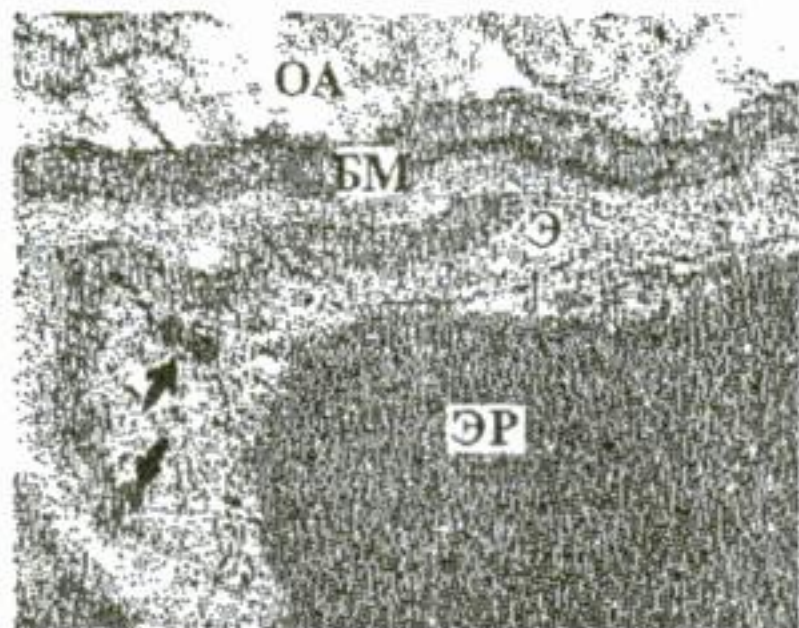


Рис. 2. Пиноцитозные везикулы (указаны стрелками), содержащие пероксидазу хрена, в цитоплазме эндотелиоцита (Э) капилляра медиопреоптической области переднего гипоталамуса крысы (60 мин 0,1РРР). Х60000: БМ — базальная мембрана, ОА — отростки астроцитов, ЭР — эритроцит в просвете капилляра

Если это так, тогда отмеченные реактивные изменения в астроцитах при 0,1РРР должны приводить к соответствующим перестройкам во всех основных ультраструктурных элементах ГЭБ.

Действительно, наиболее существенные изменения наблюдаются в ультраструктуре эндотелиоцитов, их плотных контактов и окружающей сосуд базальной мембраны. На 20-й мин воздействия происходит значительное (в 3–3,5 раза) уменьшение относительной площади базальной мембраны. К 40–60-й мин этот показатель увеличивается, оставаясь на 30–40% ниже нормы. Следует отметить, что в капиллярах переднего отдела гипоталамуса

са относительная площадь базальной мембраны уменьшается на 30–40% больше, чем в капиллярах заднего отдела. Эти изменения сохраняются по крайней мере в течение 18 ч после 60-минутного воздействия (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Морфометрический анализ электронных микрофотографий капилляров переднего отдела гипоталамуса крыс при 0,1 PPP

Объекты исследования	Конт- роль	Время воздействия, мин			Время после воздействия, ч				
		20	40	60	6	10	14	18	60
Относительная площадь эндотелиоцитов	0,1 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,1 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,03
Относительная площадь базальной мембраны	0,17 ± 0,02	0,05 ± 0,005	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,17 ± 0,01
Относительная длина впячивания аблюминальной мембраны	0,045 ± 0,01	0,1 ± 0,05	0,043 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,065 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,002
Относительная длина впячивания люминальной мембраны	0,076 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,08 ± 0,004
Относительная площадь микровилей	0,04 ± 0,008	0,1 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,008	0,05 ± 0,009	0,04 ± 0,003
Относительная площадь эндотелиальных везикул	0,0075 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,014 ± 0,002	0,026 ± 0,003	0,025 ± 0,003	0,008 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,008 ± 0,002
Количество опущенных везикул, %	0	40 ± 5	29 ± 5	67 ± 7	60 ± 7	0	30 ± 4	33 ± 4	0

Гель базальной мембраны, образованный гликозаминогликанами, создает молекулярный и электростатический фильтры, обеспечивающие селективную проницаемость мембраны для отрицательно заряженных молекул, кроме того, протеогликаны обладают осмотической активностью, которая также регулирует проницаемость [4]. Все это позволяет рассматривать базальную мембрану в качестве дополнительного регулятора функциональной активности ГЭБ [8]. Уменьшение площади базальной мембраны, по нашему мнению, может отражать степень полимеризации гликозаминогликанов и влиять на уровень проницаемости ГЭБ. При 0,1 PPP противоположным образом изменяется и относительная площадь эндотелиальной клетки. В первые 20 мин воздействия относительная площадь эндотелиоцита увеличивается в 1,5 раза по сравнению с контролем. Это увеличение сохраняется в течение следующих 20 мин охлаждения, приходя к норме к 60-й мин воздействия. Причем в заднем отделе гипоталамуса отмечается более значительное (на 33%) увеличение относительной площади эндотелиоцита по сравнению с передним отделом (табл. 2).

Существенные вариации при 0,1 PPP обнаруживает поверхность эндотелиоцита (рис. 3,4). На люминальном и аблюминальном контурах появляются многочисленные впячивания, длина которых уже на 20-й мин в 2 раза превышает контрольные значения, сохраняясь на повышенном уровне по крайней мере 18 ч после воздействия (эти изменения более выражены в переднем отделе гипоталамуса). Необходимо отметить, что при 0,1 PPP увеличивается количество микровилей на люминальной поверхности эндотелиоцита, относительная длина которых возрастает более чем в 2 раза. Такое увеличение сохраняется в течение 10 ч после воздействия, приходя к норме к 12–14-му ч (табл. 2).

Ультраструктура ядра и цитоплазмы эндотелиальных клеток в условиях 0,1 PPP близка к нормальной. Отмечена активизация митохондрий, выражающаяся в просветлении матрикса и увеличении их площади. Характерная особенность — появление в капиллярном эндотелии переднего и заднего отделов гипоталамуса на 20-й мин воздействия большого количества эндоцитозных везикул различных размеров, относительная площадь которых возрастает к 60-й мин в 3–4 раза по сравнению с контролем и к норме к 10–12 ч после воздей-

ствия (табл. 2). По всей вероятности, наблюдаемые изменения поверхности эндотелиоцитов вместе с увеличением количества и относительной площади эндоцитозных везикул свидетельствуют о развитии процессов пиноцитоза в эндотелиоцитах капилляров гипоталамуса. На электронных микрофотографиях отражены все этапы формирования пиноцитозных везикул, начиная с инвагинации люминальной мембраны (1), образования открытой и затем замкнутой везикулы, прикрепленной к люминальной мембране, появления свободных пиноцитозных пузырьков (2), слияния их между собой (3), формирования канала из слившихся везикул и заканчивая прикреплением везикул к аблюминальной мембране (4) или трансформацией везикул в системе ГЭРЛ (комплекс Гольджи, эндоплазматический ретикулум, лизосомы) с последующей рециклизацией мембраны (рис. 3, 4). Описанные выше изменения ультраструктуры элементов ГЭБ гипоталамуса предположительно должны приводить к повышению его проницаемости, причем отмеченные особенности структурных перестроек в переднем и заднем отделах гипоталамуса могут соответствовать различным уровням проницаемости барьера. Следующие серии экспериментов были направлены на подтверждение этих положений.

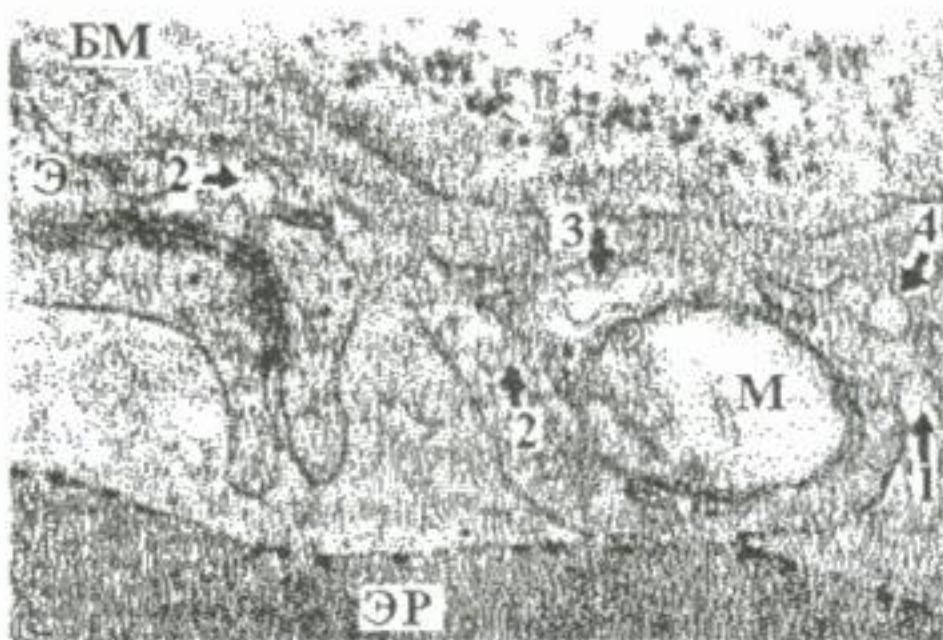


Рис. 3. Расширение межклеточного контакта эндотелиоцитов с образованием "воронки". Основные этапы (1–4) пиноцитоза в эндотелиальной клетке (Э) капилляра заднего отдела гипоталамуса крысы через 18 ч после 0,1РРР. X104000: 1 — инвагинация люминальной мембраны эндотелиоцита, 2 — образование свободных пиноцитозных везикул, 3 — слияние пиноцитозных везикул, 4 — открытая везикула в аблюминальной части эндотелиоцита; БМ — базальная мембрана, ЭР — эритроцит в просвете капилляра

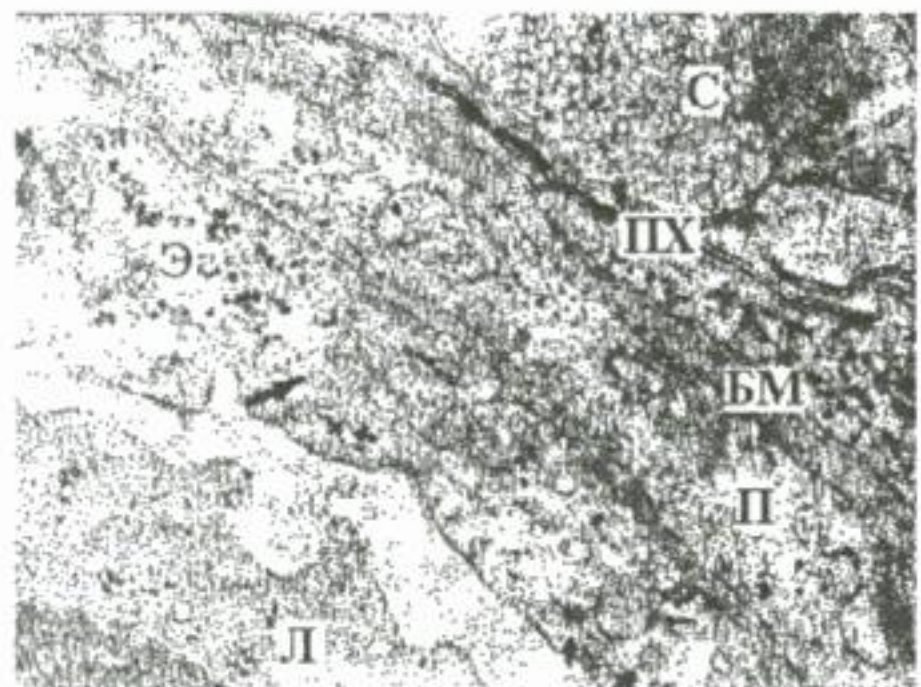


Рис. 4. Фрагмент стенки капилляра из медиопреоптической области переднего гипоталамуса крысы (60 мин 0,1РРР). X100000. Микротрубочки (большая стрелка) и одетые везикулы (маленькие стрелки) в цитоплазме эндотелиоцита (Э). П — перицит, БМ — базальная мембрана, ПХ — отложение электронно-плотного осадка продукта реакции пероксидазы хрена между отростками глиальных клеток, С — синаптические пузырьки в пресинаптическом бутоне аксо-аксонального синапса

Для оценки проницаемости ГЭБ при 0,1РРР нами проведены две серии экспериментов с использованием внутривенного введения электронно-плотных маркеров — пероксидазы хрена и ионов лантана. Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов этих образцов гипоталамуса свидетельствует о том, что пероксидаза хрена, являясь маркером пиноцитоза, обнаруживалась в виде электронно-плотных включений в составе везикул (рис. 2) и в цитоплазматических каналах, образованных, возможно, слиянием таких везикул (рис. 3). Кроме того, отложение гомогенного электронно-плотного осадка, образованного пероксидазой хрена и ионами лантана, обнаруживалось фрагментарно за базальной мембраной между концевыми ножками астроцитов (рис. 4). В эксперименте с применением пероксидазы хрена отмечалось увеличение электронной плотности базальной мембраны капилляров (рис. 2).

Электронно-плотный осадок продукта реакции пероксидазы хрена находился также в контактах между мембранами эндотелиоцитов. Пероксидаза хрена обнаружена и в лизосомах перицитов, обладающих, как предполагают [4, 11] фагоцитарной активностью (рис. 4). Необходимо отметить, что в 30%

исследованных просветов капилляров наблюдался контакт отростков перицитов с эндотелиоцитами, как правило, в районе контактирования эндотелиоцитов или цитоплазматических каналов. Интересным является обнаруженный факт расхождения контактов между эндотелиальными клетками с образованием “воронки”, глубоко выступающей в просвет капилляра (рис. 3). В единичных случаях пероксидаза хрена заполняла весь просвет межклеточного контакта.

Таким образом, при ритмических холодовых воздействиях возникают структурные перестройки во всех основных звеньях гематоэнцефалического барьера гипоталамуса, приводящие к увеличению его проницаемости для использованных электронно-плотных маркеров. Однако при 0,1 РРР, очевидно, не происходит “прорыв” ГЭБ, который должен был сопровождаться отложением электронно-плотных маркеров по всему периметру базальной мембраны, а не фрагментарно, как в наших исследованиях (рис. 4). Поэтому отмеченные изменения функциональной активности ГЭБ, возможно, являются физиологически значимыми для процессов центральной терморегуляции. Очевидно, пероксидаза хрена только визуализирует процесс избирательного трансэндотелиального переноса биологически активных веществ, являясь их “случайным попутчиком”.

Как было показано ранее (см. “Проблемы криобиологии”, 1995, № 3), при 0,1 РРР происходит существенное повышение проницаемости ГЭБ только для нейромедиаторов, опосредующих теплопродукцию (норадреналин), и не изменяется для нейромедиаторов, регулирующих процессы теплоотдачи (серотонин) (рис. 5). Причем в переднем отделе гипоталамуса, где сосредоточен основной пул термочувствительных нейронов [2, 3], проницаемость барьера была значительно выше, чем в задних отделах, что хорошо согласуется с приведенными особенностями ультраструктурных перестроек при холодовых воздействиях. Таким образом, при 0,1 РРР, возможно, включаются специфические нейротрансмиттерные механизмы, избирательно изменяющие проницаемость ГЭБ, что приводит к активизации гипоталамических центров терморегуляции.

Обсуждая влияние ритмических холодовых воздействий на проницаемость ГЭБ для моноаминов, нельзя обойти вопрос о механизмах, обеспечивающих избирательную проницаемость для серотонина и норадреналина. В процессах сохранения резистентности ГЭБ для серотонина большое значение, возможно, имеет энзимный барьер с участием моноаминоксидазы (МАО). МАО, как известно [10], является ферментом, катализирующим деаминацию биогенных аминов. Показано, что уже одиночное кратковременное охлаждение организма приводит к длительному изменению активности фермента [10], и даже после прекращения низкотемпературного воздействия активность МАО сохраняется на повышенном уровне в течение 4 и более сут. Эти данные согласуются с результатами наших экспериментов. Так, на фоне 0,1 РРР введение неспецифического блокатора МАО ипрониазида увеличивало проницаемость барьера для серотонина почти в 2 раза, тогда как дальнейшего повышения проницаемости для ^3H -НА не происходило (рис. 5). Следовательно, если резистентность ГЭБ для серотонина можно объяснить

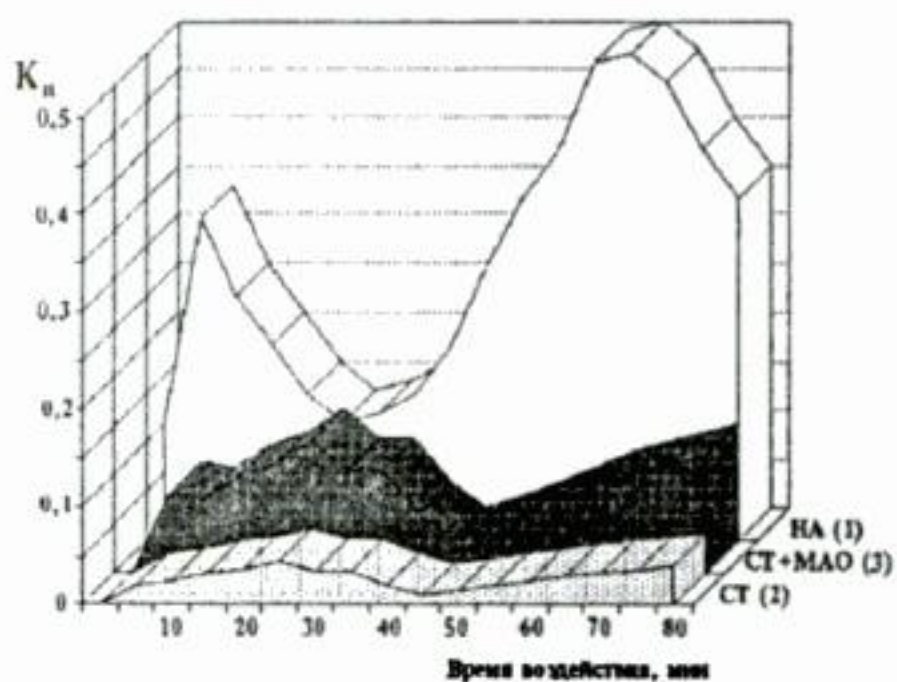


Рис. 5. Проницаемость ГЭБ для моноаминов при ритмических холодовых воздействиях: 1 — коэффициент проницаемости (K_p) для ^3H -НА в динамике 0,1 РРР, 2 — K_p для ^3H -СТ в динамике 0,1 РРР, 3 — K_p для ^3H -СТ в динамике 0,1 РРР на фоне блокады МАО

наличием ферментативного барьера (повышением активности MAO), то норадреналин “ускользает” от действия данного фермента. Повышение специфической проницаемости ГЭБ для норадреналина, по нашему мнению, обеспечивается более сложными структурно-функциональными механизмами, изучению особенностей которых посвящена заключительная серия наших экспериментов.

Из данных литературы известно, что инициация структурно-функциональных изменений, приводящих к повышению проницаемости ГЭБ, может иметь как гуморальное, так и нейрогенное происхождение [3]. Преобладание одного или другого начала зависит от вида воздействия на организм. Например, при гипертермических воздействиях коммуникативные сигналы, запускающие реактивные изменения ГЭБ, поступают главным образом от клеток крови [1], при этом авторы отмечают краевое стояние и адгезию лейкоцитов, моноцитов, тромбоцитов к поверхности эндотелиальных клеток. Ритмическое холодное воздействие не приводило к подобным феноменам (рис. 4). Поэтому мы предположили, что повышение проницаемости ГЭБ при таком воздействии вызывается активацией специфических нейрофизиологических механизмов ЦНС. В наших исследованиях показана активация синапсов S и в большей степени C типа уже на 20-й мин воздействия (рис. 1, 4). Синаптические окончания S типа содержат сферические везикулы низкой электронной плотности диаметром 500 Å, медиатором в них, предположительно, является ацетилхолин [12]. Синаптические окончания C типа, напротив, содержат сферические везикулы высокой электронной плотности, снижающейся при активации синапса. Предполагают, что медиаторами в таких синапсах выступают моноамины. К сожалению, идентификация адреналиновых, норадреналиновых и серотониновых синапсов по электронно-микроскопическим характеристикам на сегодняшний день невозможна. Однако мы считаем, что при 0,1PPR активируются именно норадренергические синапсы, так как адренергических синапсов в гипоталамусе крайне мало, а в нейрофизиологических опытах *in vivo* показано существенное (в 2–3 раза) повышение спонтанной секреции ^3H -НА в переднем гипоталамусе и незначительное увеличение секреции в заднем отделе, секреция же ^3H -серотонина (^3H -СТ) не изменяется (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Спонтанная секреция ^3H -НА и ^3H -СТ в передних и задних отделах гипоталамуса при 0,1PPR

Условия эксперимента	Передний отдел гипоталамуса		Задний отдел гипоталамуса	
	^3H -НА	^3H -СТ	^3H -НА	^3H -СТ
Контроль	$0,82 \pm 0,05$	$0,79 \pm 0,03$	$0,81 \pm 0,05$	$0,78 \pm 0,04$
Наркоз	$0,78 \pm 0,04$	$0,76 \pm 0,04$	$0,77 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,03$
0,1PPR (10 мин)	$2,37 \pm 0,1$	$0,74 \pm 0,05$	$1,94 \pm 0,1$	$0,76 \pm 0,05$
0,1PPR (20 мин)	$2,01 \pm 0,1$	$0,76 \pm 0,06$	$1,70 \pm 0,1$	$0,74 \pm 0,06$
0,1PPR (40 мин)	$2,63 \pm 0,3$	$0,77 \pm 0,07$	$2,09 \pm 0,3$	$0,71 \pm 0,07$
0,1PPR (60 мин)	$2,81 \pm 0,4$	$0,75 \pm 0,06$	$2,31 \pm 0,4$	$0,73 \pm 0,05$

Применение суперфузии гипоталамуса блокаторами α - и β -адренорецепторов на фоне 0,1PPR снижает проницаемость ГЭБ для ^3H -НА до уровня контроля (рис. 6). Это может свидетельствовать о том, что повышение активности норадренергической функциональной системы гипоталамуса инициирует повышение проницаемости ГЭБ.

Сопоставив результаты физиологических экспериментов и данные ультраструктурного анализа о развитии процессов пиноцитоза в клетках капиллярного эндотелия гипоталамуса, можно предположить, что избирательное повышение проницаемости ГЭБ для ^3H -НА обусловлено процессом высоко-специфического адсорбционного трансцитоза или рецепториндуцируемого трансцитоза [7]. Первый этап специфического эндоцитоза представляет собой адсорбцию веществ на гликокаликсе плазмалеммы [7]. Воздействие на муко-

полисахаридный слой гликокаликса внутрибрюшинным введением гепарина приводит к снижению повышенной проницаемости ГЭБ для ^3H -НА, вызванной 0,1PPR (рис. 6). На следующем этапе клетки захватывают молекулы лигандов при помощи соответствующих рецепторов плазмалеммы. Внутрибрюшинное введение в этот момент блокаторов α - и β -адренорецепторов также снижает проницаемость ГЭБ для ^3H -НА.

Связывание лиганда (в нашем случае норадреналина) с рецептором вызывает инвагинации мембраны, которая углубляется, округляется, слипается, так что норадреналин оказывается в составе специфической эндосомы, называемой "одетой" (окаймленной) везикулой. Одетые везикулы обнаруживаются в цитоплазме эндотелиоцитов уже на 20-й мин воздействия, а к 60-й мин они встречаются в 70% исследованных просветов капилляров, причем в переднем отделе гипоталамуса их в 2,5 раза больше, чем в заднем (табл. 2).

Одетые везикулы на внешней поверхности содержат клатриновую "шубу", представляющую собой корзинчатые структуры с пента- и гексагональными ячейками, образованными в результате полимеризации клатрина. Эти органеллы вариabельны по своим размерам в одной и той же клетке — 50–250 нм в диаметре (рис. 4). Считается, что клатриновая "шуба" способствует сохранению содержимого везикулы от лизиса (норадреналин "ускользает" от МАО) и необходима для сцепления этих органелл с цитоскелетом и последующего их транспорта в клетке. Анализ ультратонких срезов гипоталамуса выявил большинство этапов образования, трансформации и транспортировки одетых везикул в клетках эндотелия (рис. 4).

По мере проникновения в цитоплазму одетые везикулы теряют клатриновую оболочку и сливаются друг с другом или с микропиноцитозными везикулами (в экспериментах с электронно-плотными маркерами захватывается "попутчик" — пероксидаза хрена). Образуются более крупные пузырьки с гладкой поверхностью, гладкоконтурные везикулы передвигаются в толще цитоплазмы вдоль скелета, в частности микротрубочек (рис. 4), и переносят НА прямо или через трансэндотелиальные каналы к аблюминальной поверхности эндотелиоцита. Необходимо отметить, что процессы трансэндотелиального переноса характеризуются секундной ритмикой [4, 7]. Возможно, именно с этим обстоятельством связана эффективность ритмических холодовых воздействий с частотой 0,1 Гц на проницаемость ГЭБ для НА.

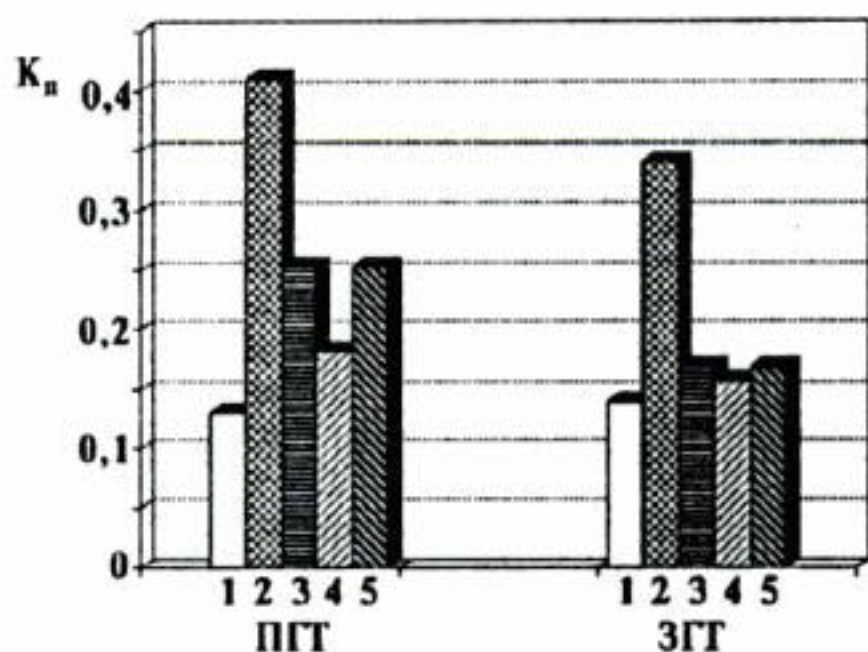


Рис. 6. Проницаемость ГЭБ для ^3H -НА при гипотермических и фармакологических воздействиях (ПГТ, ЗГТ — передний и задний отделы гипоталамуса): 1 — коэффициент проницаемости (K_p) в контроле, 2 — K_p на 60-й мин 0,1PPR, 3 — K_p на 60-й мин 0,1PPR при введении пропранолола, 4 — K_p на 60-й мин 0,1PPR при введении фентоламина, 5 — K_p на 60-й мин 0,1PPR при введении гепарина

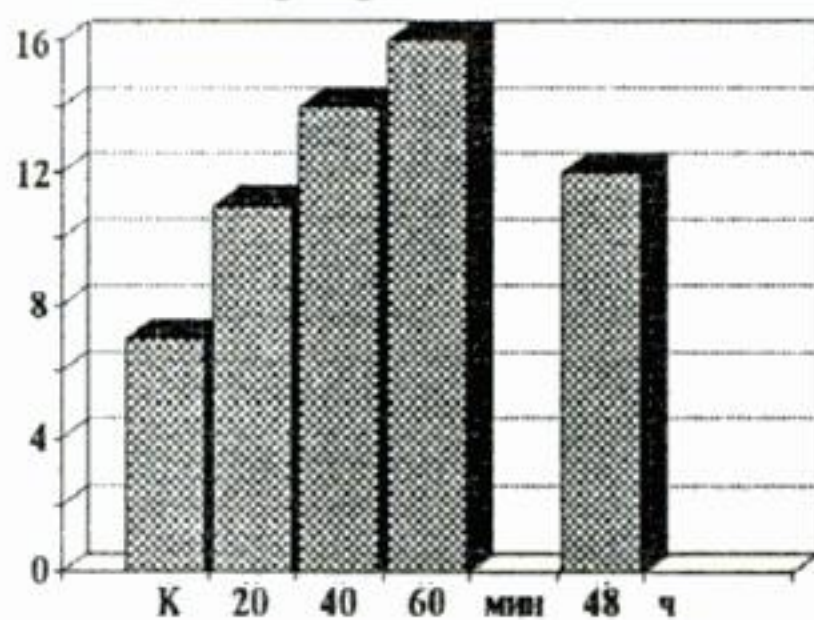


Рис. 7. Холодовая устойчивость крыс после 0,1PPR. По оси X: К — контроль; 20, 40, 60 — время воздействия, мин; 48 — часов после 60-минутного 0,1PPR. По оси Y: время активного плавания в ледяной воде, мин

Вызванные ритмическим воздействием ультраструктурные перестройки элементов ГЭБ сохраняются в течение десятков часов, обеспечивая повышенную специфическую проницаемость барьера. Физиологическое значение повышения проницаемости ГЭБ для НА, по-видимому, заключается в стимуляции гипоталамических центров терморегуляции. Подтверждением этому, является существенное повышение холодовой устойчивости организма после ритмического раздражения каудальных терморцепторов (рис. 7). Таким образом, функциональное состояние гематоэнцефалического барьера, безусловно, должно играть важную роль в регуляции температурного гомеостаза организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчакова Л.И., Белявский Е.М., Гурин В.Н. Ультраструктурная организация медиальной преоптической области гипоталамуса и ее изменения при действии пирогенов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1989. – ХСVI, № 1. – С. 44–50.
2. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Ломакин И.И., Белостоцкий А.В. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. – Киев: Наук. думка, 1992. – 207 с.
3. Белявский Е.М., Арчакова Л.И., Нетукова Н.И. Структурно-функциональная организация центра терморегуляции в нормальных условиях и при развитии лихорадки // Вегетативная нервная система в регуляции функций. – Минск: Наука и техника, 1989. – С. 18–43.
4. Бобрик И.И., Шевченко Е.А., Черкасов В.Г. Развитие кровеносных и лимфатических сосудов. – Киев: Здоров'я, 1991. – 207 с.
5. Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. – М.: Изд. мед. ин-та им. И.М.Сеченова, 1976. – 187 с.
6. Бредбери М. Концепция гемато-энцефалического барьера. – М.: Медицина, 1983. – 480 с.
7. Глебов Р.Н. Эндоцитоз и экзоцитоз. – М.: Высшая школа, 1987. – 94 с.
8. Майзелис М.Я. Современные представления о гемато-энцефалическом барьере: нейрофизиологические и нейрохимические аспекты // Журн. высш. нервн. деят-ти. – 1986. – 36, № 4. – С. 611–626.
9. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Ломако В.В. и др. Общий подход к проблеме повышения проницаемости гемато-энцефалического барьера и холодовой устойчивости организма // Пробл. криобиологии. – 1994. – №4. – С. 24 – 32.
10. Молодцова Г.Ф., Попова Н.К. Следовые эффекты кратковременных температурных воздействий в активности моноаминоксидазы // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1984. – №9. – С. 296–298.
11. Питерс А., Палей С., Уэбстер Г. Ультраструктура нервной системы. – М.: Мир, 1972. – 267 с.
12. Учизоно К. Возбуждение и торможение. Морфология синапсов. – Киев: Наук. думка, 1980. – 216 с.
13. Graham R.C., Karnovsky M.J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique // J. Histochem. Cytochem. – 1966. – №14. – P. 291–302.
14. Hatten M.E., Liem R.K., Shelanski M.L., Mason C.A. Astroglia in CNS injury // Glia. – 1991. – №2. – P. 233–243.

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

Поступила 07.08.95

Л.М.МАРЧЕНКО, Г.О.БАБІЙЧУК, В.С.МАРЧЕНКО, В.В.ЛОМАКО, О.В.ШИЛО,
О.В.АЛТУЄВА

ДО МЕХАНІЗМІВ РЕГУЛЯЦІЇ ПРОНИКНОСТІ ГЕМАТОЕНЦЕФАЛІЧНОГО БАР'ЄРУ ОХОЛОДЖЕНОГО МОЗКУ. ПОВІДОМЛЕННЯ 4. УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ І ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ГЕБ ПРИ РИТМІЧНИХ ХОЛОДОВИХ ВПЛИВАХ.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м.Харків

Вивчені ультраструктури ГЕБ і синаптичного апарату гіпоталамусу щурів при гіпотермії. Досліджен секретія, рецепція і проникність ГЕБ для моноамінів. Показано, що ритмічні холодові впливи підвищують в 3–4 рази проникність ГЕБ для ³Н-норадреналну, але не для ³Н-серотоніну. Електронограми свідчать про те, що після холодових впливів синаптичний апарат перебуває в стані напруження, а в ендотелії мікросудин виявляються клатринові везикули, активуються процеси рецепторного трансцитозу. Нейротрансмітерні процеси, які обумовлюють проникність ГЕБ,

можуть бути пусковим нейрофізіологічним механізмом зміни центральної терморегуляції при гіпотермії.

L.N.MARCHENKO, G.A.BABIYCHUK, V.S.MARCHENKO, V.V.LOMAKO, A.V.SHILO,
E.V.ALTUYEVA

ON THE MECHANISM OF REGULATION OF PERMEABILITY OF BLOOD-BRAIN BARRIER OF THE COOLED BRAIN. REPORT 4.

ULTRASTRUCTURAL PECULIARITIES AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF BLOOD-BRAIN BARRIER DURING RHYTHMIC COLD EXPOSURES

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

The authors investigated the ultrastructure of the blood-brain barrier (BBB) and synaptic apparatus of rats during hypothermic treatment. They studied secretion, reception and permeability of BBB to monoamines. Rhythmic cold exposures were shown to increase by 3-4-fold the BBB permeability to 3H-noephinephrine, but not to 3H-serotonin. The electronograms indicate that following cold exposures the synaptic apparatus is in the state of tension, while the endothelium of the microvessels demonstrate clatrin vesicles, and the processes of receptive transcytosis are activated. The neurotransmitter processes, which determine the BBB permeability, may be a trigger neurophysiological mechanism of changes in the central thermal regulation during hypothermic treatment.

УДК 615.361.018.46.014.41

**А.Н.Гольцев, Е.Д.Луценко, Л.В.Останкова,
Т.Г.Дубрава, Е.В.Опанасенко**

МЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК; ВОЗМОЖНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФАКТОРОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ. ЧАСТЬ II

Продолжена характеристика ряда поверхностных структур кроветворных клеток костного мозга и рассмотрено их участие в рецепции регуляторных сигналов, обеспечивающих гемопоэз. Приведены данные, свидетельствующие об изменении функциональной активности гемопоэтических клеток в результате нарушения (модификации) состояния антигенных структур после криоконсервирования.

Продолжая анализ состояния рецепторных структур на кроветворных клетках, и в частности ИЛ-1-рецептора, начатый в предыдущем разделе статьи (см. "Проблемы криобиологии", 1995, № 3), необходимо отметить, что образование ИЛ-1 + ИЛ-1Р комплекса может активировать тирозинкиназу, вызывать фосфорилирование мембранных белков, а в некоторых случаях, при действии ИЛ-1 на обработанные глюкокортикоидами клетки периферической крови человека, и фосфорилирование белка с молекулярной массой 65 кДа.

Каскад биохимических событий с развитием соответствующего эффекта, очевидно, не ограничивается фосфорилированием белковых структур. Имеются немногочисленные данные, свидетельствующие о возможности интернализации лиганда с последующей его деградацией. С помощью электронной микроскопии и авторадиографии показано появление определенной фракции интернализованного ИЛ-1 в ядре [28]. Многогранность и сложность действия ИЛ-1 на клетки подтверждается еще и тем, что ИЛ-1 быстро увеличивает обмен протеинкиназы C в *jurkat* клетках, не экспрессирующих на мембране ИЛ-1Р.

Наличие стимулирующего эффекта в отношении кроветворных предшественников при введении мышам ИЛ-6 [14] дает основание считать возможным присутствие на этих клетках и рецептора к ИЛ-6. Интересными представляются результаты исследования действия ИЛ-6 на примитивные стволовые клетки, полученные после соответствующей обработки костного мозга

мышей 5-фторурацилом (5-ФУ) и определенным классом моноклональных антител (МАТ). Было отмечено, что для популяции, устойчивой к 5-ФУ и растущей в присутствии оптимальных концентраций КСФ-1 + ИЛ-1 + ИЛ-3, добавление ИЛ-6 приводило к дозозависимому увеличению размера и числа колоний. В то же время при добавлении ИЛ-6 к популяции, чувствительной к 5-ФУ, стимулируемой КСФ1 + ИЛ-3, подобный эффект не наблюдался. Эти результаты свидетельствуют о существовании в костном мозге субпопуляций кроветворных клеток, обладающих высоким пролиферативным потенциалом (ВПП-КОЕ), реализуемым в присутствии ИЛ-6, и подтверждают синергизм действия ИЛ-6 с другими ростовыми факторами в отношении стволовых клеток. Данные о том, что добавление ИЛ-6 увеличивало содержание КОЕ_к в длительной культуре костного мозга, могут свидетельствовать о проявлении стимулирующей активности ИЛ-6 на поздних стадиях миелопоэза [21]. К сожалению, и в этом случае точно нельзя установить, происходит ли прямое или опосредованное действие ИЛ-6 за счет индукции КСФ акцессорными клетками. Известно, например, что ИЛ-6 действует как дополнительный сигнал в митогензависимой Т-клеточной активации, и, возможно, активированные Т-клетки (или другие акцессоры) выделяют в среду ростовые факторы. После исследований, выполненных на лейкозных клетках, являющихся гомогенной популяцией, можно было утверждать, что, по крайней мере, некоторые из сигналов могут быть прямого действия, хотя надо учитывать, что лейкозные клетки сами по себе часто секретируют ГМ-КСФ, Г-КСФ, ИЛ-1. Несколько лет назад в экспериментах на мышах было установлено прямое действие ИЛ-6 (ИФ- β_2) на колониобразующую активность КОЕ-ГМ и отмечена его способность в комбинации с ИЛ-3 поддерживать колониобразование ранних бластообразующих клеток [22].

Расширение сферы применения гормонов коры надпочечников в клинической практике и убедительные доказательства разнонаправленного их влияния на клетки, органы и системы организма человека вызывают острую необходимость определения возможности акцепции этих мощных биорегуляторов кроветворными предшественниками, т.е. наличия на них рецепторов к глюкокортикоидам (ГК). К сожалению, прямых убедительных доказательств наличия рецепторов к ГК на мембранах стволовых кроветворных клеток нет, хотя в литературе обсуждается вопрос участия ГК в модуляции цитокиновых рецепторов на клетках лимфогемопоэтической системы. Отмечено, например, что при введении мышам ИЛ-1 наблюдается временная ингибция связывания Г-, ГМ-КСФ, ФНО с соответствующими рецепторами клеток костного мозга. Дексаметазон вызывал увеличение связывания ИЛ-1 с клетками лимфогемопоэтического комплекса в системе *in vivo*, и наоборот, адреналэктомия приводила к уменьшению связывания ИЛ-1. Необходимо отметить, что результаты этих исследований важны не только в теоретическом, но и в практическом плане, указывая на необходимость внесения соответствующих корректив в комплексную терапию, включающую применение глюкокортикоидов при трансплантации костного мозга, в частности криоконсервированного, в котором возможны как дисбаланс регуляторно-акцессорных клеток и, следовательно, цитокиновой продукции [32], так и изменение функционально-структурной организации рецепторного аппарата клетки [5]. Рецепторы к ГК являются весьма лабильными системами, изменяющими свою функциональную активность при изменении температуры, ионной силы раствора; они чувствительны к действию антагонистов кальмодулина-винбластина, пропандиола [9]. Необходимо подчеркнуть существенную роль в процессах трансформации комплекса рецептор-глюкокортикоид внутриклеточного Ca^{2+} и Mg^{2+} [20]. Важными представляются также данные о состоянии комплекса "гормон-рецептор" после его взаимодействия с хроматином. На основании имеющихся данных о том, что такое взаимодействие приводит к образованию новой

конформационной структуры, обуславливающей подъем синтеза мРНК, высказано предположение, что такие вновь образованные структуры могут существовать в активном состоянии длительное время. Рецепторный белок является термолабильным и содержит сульфгидрильные группы. Окисление или алкилирование разрушает связывающую активность рецептора. Нельзя исключить и то, что подобное изменение конформации рецептора может происходить после криоконсервирования, так как в результате температурно-зависимых фазово-структурных переходов липидов и усиления их перекисного окисления барьерные свойства мембраны нарушаются, происходит утечка транспортируемого Ca^{2+} из везикул СПР как через систему активного транспорта, так и посредством пассивной диффузии через трансмембранные дефекты. В результате нарушения барьерных свойств мембраны из цитоплазмы элиминируются различные белки и ферменты [2]. Даже в физиологических условиях рецептор может возвращаться в цитоплазму и дополнять пул вновь синтезированных рецепторов или может быть деградирован. Если все же согласиться с условием наличия рецепторов к глюкокортикоидам на кроветворных клетках при разработке соответствующих схем применения глюкокортикоидов при трансплантации костного мозга, то, очевидно, необходимо учесть ряд положений об особенностях экспрессии этих структур и на других клетках. Например, на мононуклеарах периферической крови людей уровень этих рецепторов снижается с возрастом, сезонные влияния на этот показатель не оказывают воздействия, у женщин число таких рецепторов несколько ниже, циркадные варианты кортизола в плазме не изменяют уровень рецепторов на мембране и т. д. Важно также и то, что количество рецепторов к глюкокортикоидам может снижаться при длительном их применении [31].

В широком спектре рецепторных структур кроветворных клеток важное место занимают и рецепторы к ретиноловой кислоте. Ретиноловая кислота оказывает значительное действие на пролиферацию и дифференцировку многих гемопоэтических клеток. Механизм этого действия остается неясным. В последнее время клонированы несколько рецепторов ретиноловой кислоты [24]. На основании обобщения результатов этих исследований сделан вывод о том, что экспрессия рецептора ретиноловой кислоты не зависит ни от уровня дифференцировки кроветворных клеток, ни от клеточного цикла. Этот рецептор имел небольшую продолжительность жизни и легко нарабатывался под действием ингибиторов синтеза протеинов. Установлено, что миелоидные предшественники при врожденном агранулоцитозе костного мозга не чувствительны (нет стимуляции пролиферации) к действию ретиноловой кислоты, что указывает на важную роль ретиноловой кислоты в обеспечении миелоидного роста кроветворения.

В последнее время все больше внимания уделяется экспрессируемому в высоких концентрациях на гемопоэтических клетках, а также ткани мозга и плаценты продукту *c-kit* гена-трансмембранного тирозинкиназного рецептора для нового гемопоэтического фактора, называемого ростовым фактором тучных клеток, *c-kit*-лигандом или фактором стволовой клетки, стимулирующим пролиферацию кроветворных предшественников [34]. Показано, что экспрессия продукта *c-kit* гена модулируется гемопоэтическими факторами роста, включая ИЛ-3, ГМ-КСФ и эритропоэтин. Эти факторы роста вызывают снижение уровня *c-kit* белка и его мРНК. Возможно, это и есть одно из звеньев реализации механизма обеспечения сбалансированного состояния пролиферации и дифференцировки клеточных элементов в гемопоэтической системе. С помощью МАТ к *c-kit*-продукту, CD33, CD71 структурам кроветворных предшественников разной степени зрелости методом проточной цитофлуориметрии исследовали распределение этих молекул на гемопоэтических клетках. В 10 образцах нормального костного мозга человека обнаружено 19–51% CD34^+ клеток, экспрессирующих *c-kit*-рецептор. Значительная часть

этих клеток соэкспрессировала CD33 ($52 \pm 23\%$) и/или CD71 ($62 \pm 26\%$), являющиеся маркерами коммитированных колониеобразующих клеток [29]. Данный факт достаточно интересен, так как свидетельствует о возможности регуляции процесса пролиферации не только терминального, но и стволового отдела кроветворных предшественников.

Признание концепции взаиморегуляции ЦНС, эндокринной и иммунной систем требует более глубокого изучения проблемы влияния продуктов деятельности ЦНС на клетки лимфогемopoэтического комплекса. Убедительно доказано участие в регуляции жизненных функций в физиологических и экстремальных условиях эндогенных опиоидных пептидов. Во многих исследованиях показано действие опиоидов и на костномозговое кроветворение. Предположение об участии опиоидов в гемопоэзе основано на идентификации с помощью энкефалиназы CALLA-маркера на незрелых кроветворных клетках [15]. Клональные культуры стволовых клеток костного мозга мышей и человека, выделенных на клеточном сортере, инкубировали с лейци- или метионин-энкефалином в концентрации 10^{-6} – 10^{-15} М в присутствии или без специфического опиоидного антагониста — налоксона. Оба энкефалина снижали число КОЕ-ГМ и кластеров на 50–85% по сравнению с контрольными пробами. Налоксон отменял действие опиоидов. Ингибирующей активностью на эритро- и гранулопоэз обладает и синтетический аналог лей-энкефалина — даларгин, причем не только при сбалансированном гемопоэзе, но и в условиях постиммобилизационного стресса. При сочетанном введении препаратов не наблюдалась гиперплазия костного мозга, характерная для адаптационного синдрома, так как налоксон отменял стимулирующий эффект на гемопоэз эндогенного мет-энкефалина в условиях иммобилизационного стресса. Такой эффект антагониста опиоидных рецепторов, по мнению авторов [4], может быть связан с разнонаправленным влиянием энкефалинов на кроветворение при стрессе. Например, введение мет-энкефалина мышам, подвергнутым иммобилизации, оказывает стимулирующее влияние на гемопоэз. В условиях стресса в надпочечниках вырабатывается преимущественно мет-энкефалин, воздействие которого, по-видимому, может приводить к гиперплазии.

Имеются данные о влиянии опиоидов на рост колоний гранулоцитарно-макрофагального ряда в культуре *in vitro* костного мозга здоровых людей в присутствии или в отсутствие факторов роста. Лей- и мет-энкефалины стимулировали рост костного мозга только в случае их слабого роста. При усиленном росте клеток лей-энкефалин подавлял пролиферацию клеток, а мет-энкефалин не влиял на нее. При использовании стимулирующего фактора роста оба энкефалина или не влияли, или подавляли пролиферацию клеток костного мозга. Приведенные результаты показывают, что, во-первых, опиоиды также ответственны за обеспечение сбалансированного кроветворения в организме и, во-вторых, могут, очевидно, влиять как на ранние, так и более поздние предшественники гемопоэза. При этом нельзя исключить как прямого (через опиоидные рецепторы на кроветворных клетках), так и опосредованного (через рецепторы на клетках микроокружения) влияния энкефалинов на гемопоэз.

При изучении физико-химических и иммунологических свойств рецепторов опиоидных пептидов в мозге и лейкоцитах периферической крови показано, что функционально рецептор опиоидного пептида связан с цАМФ и, вероятно, его активность модулирует K^+ и Ca^{2+} каналы. Рецепторы обладают сходными биохимическими и функциональными особенностями [19].

В общем потоке информации о взаимодействии нервной и лимфогемopoэтической систем появились работы, описывающие эффекты действия на пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток медиаторов адренэргических и холинэргических нервных окончаний. Взаимодействие специфических агонистов с β -адренэргическими, никотин-холинэргическими и гиста-

мин-Н₂ рецепторами может изменять состояние клеточного цикла стволовых клеток костного мозга, запуская КОЕ_с в S фазу цикла [16].

В [25] исследовалась концентрация адренэргических и гистаминовых рецепторов на клетках фракционированного в градиент фиколла костного мозга и изучалось связывание различных лигандов с этими рецепторами. Авторами было отмечено 2–3-кратное увеличение плотности β -адренорецепторов и рецепторов гистамина Н₂ на клетках фракции, в которой располагалось большинство ранних предшественников гемопоэтических клеток. Показано также существование определенных рецепторов для агонистов на кроветворных клетках костного мозга. Пролиферация КОЕ_к изменяется под влиянием агонистов мускарин-холинэргических рецепторов [25]. Лиганды β ₂-адренэргических рецепторов усиливают рост коммитированных прекурсоров эритропоэза и гранулоцитов [12]. Роль данных рецепторов в проявлении функциональной активности клеток пока не совсем ясна. Отмечено, например, что эндогенный гистамин костного мозга может запускать КОЕ_с в S фазу через Н₂-рецепторы [16]. Активация фосфодиэстеразы имидазолом супрессирует этот запуск КОЕ_с в ответ на действие Н-метил-гистамина, указывая на участие циклазной системы в ответе, индуцированном через Н₂-рецепторы гистамина. С другой стороны, ингибция фосфодиэстеразы представляет собой возможный путь запуска КОЕ_с в S фазу, что может приводить к самообновлению КОЕ_с или усилению продукции коммитированных предшественников. Не исключая возможности присутствия рецепторов к гистамину на кроветворных предшественниках разного уровня дифференцировки и активации их при формировании лиганд-рецепторного блока, нельзя не отметить, что активация колониеобразования эндогенным гистамином может осуществляться опосредованно через активацию контрсупрессорных клеток костного мозга и снятием таким образом антимитогенного блока [3]. В связи с изложенным выше уместно заметить, что одной из причин отмеченного нами ранее снижения пролиферативной активности стволовых клеток костного мозга после криоконсервирования может быть не только изменение структурно-конформационных параметров рецепторного аппарата клеток, но и нарушение функциональных свойств аденилатциклазного комплекса, выражающееся прежде всего в снижении активности фермента в присутствии катехоламинов, изопротеренола и ионов фтора [2]. Установлено, что после замораживания-отогрева может происходить нарушение либо структуры активных центров β -адренорецепторов, либо процессов проведения сигналов в циклазной системе.

Вопрос об активации фосфатидилэстеразы и влиянии этого фермента на функциональную активность кроветворных предшественников заслуживает особого внимания. Неоднократно отмечалось принципиально отличающееся от физиологического состояния поведение кроветворных клеток (КОЕ_к и КОЕ_с) после криоконсервирования, выражающееся в изменении пролиферативной активности, что, по мнению авторов [5], является следствием нарушения метаболической активности, состояния рецепторного аппарата, развития нелетальных повреждений. По-видимому, дополнительным фактором (но, безусловно, не единственным) является и изменение активности фосфодиэстеразы. Ингибция в КОЕ_с фосфодиэстеразой (ФДЭ) приводит к включению синтеза ДНК, что свидетельствует о способности КОЕ_с синтезировать циклические нуклеотиды, и может поддерживать количество цАМФ на субтриггерующем уровне в кроветворных клетках, находящихся в состоянии относительного покоя [16]. В связи с этим повышение уровня ФДЭ ведет к выраженному блокированию механизма перехода КОЕ_с в состояние пролиферации. Вместе с тем замораживание-оттаивание является фактором, вызывающим выраженное повышение активности этого фермента [2], что является следствием действия на него протеаз, выходящих из лизосом, поврежденных в процессе криоконсервирования [8]. И хотя в клетках, являющихся «канди-

датами» в стволовые кроветворные элементы, содержание лизосом значительно снижено [6], нельзя полностью исключить это звено активации ФДЭ в кроветворных клетках при криоконсервировании.

По-видимому, еще одним доказательством взаимодействия лимфогемopoэтического комплекса с ЦНС является общность в экспрессии одной из мембранных структур — Thy-1 антигена. Показано, что Thy-1 антиген у разных видов животных и человека связан преимущественно с серым веществом головного мозга, и его синтез осуществляется нейронами.

Результаты исследований последних лет дают основание считать возможным присутствие антигена Thy-1 и на кроветворных клетках костного мозга мышей. Ряд авторов считает, что среди Thy-1⁺ популяции клеток костного мозга содержатся 8- и 12-суточные КОЕ_с [5]. Показано, что по химической структуре Thy-1 антиген представляет собой гликопротеин [1]. Состав углеводов Thy-1 антигена у млекопитающих разных видов различен. Заслуживает внимание предположение о возможной общности углеводного компонента Thy-1 антигена и моносиалоганглиозида, считавшегося в течение ряда лет Thy-1 антигеном. Различия в гликозилировании полипептидной цепи этого антигена в тканях тимуса и головного мозга могут свидетельствовать о различной функции Thy-1 антигена в этих органах. Имеются сведения об участии углеводного компонента Thy-1 антигена в функционировании Т-лимфоцитов. Лишение Т-лимфоцитов сиаловой кислоты путем обработки нейроминидазой приводит к утрате способности лимфоцитов расселяться в соответствующих органах. Было показано, что Thy-1 антиген опосредует адгезию мышинных тимоцитов к тимусным эпителиальным клеткам через Ca²⁺-независимый механизм. Имеются данные о влиянии Thy-1 антигена на иммуногенез. Предполагают, что Thy-1 антиген включен в процесс активации Т-лимфоцитов при участии других клеток, в частности макрофагов. Вероятно, активация Т-лимфоцитов через Thy-1 антиген осуществляется при взаимодействии этого антигена с другими мембранными компонентами клетки, такими как антигены гистосовместимости — H-2, Fc-рецептор [26]. Не исключено взаимодействие Thy-1 антигена с гликолипидом ганглиозидной природы. Установлена связь Thy-1 антигена с мембранным фосфолипидом (фосфатидилинозитом-4, 5-бифосфатом) (ФТИ), гидролиз которого под влиянием фосфолипазы С, как известно, приводит к активации иммунокомпетентных клеток [23]. Гидролиз фосфолипидов в результате активации внутримембранных фосфолипаз после криоконсервирования должен сопровождаться, исходя из изложенного выше, активацией иммунокомпетентных клеток (ИКК), однако экспериментальные исследования этого не подтверждают. Существует предположение, что активация ИКК осуществляется под действием нескольких активационных сигналов [11]: первичного антиген-специфического, переводящего клетку в G₁ фазу, и вторичного — иммунологически неспецифического, реализуемого различными лимфокинами, необходимого для продвижения клетки в S фазу. Возможно, что при наличии первого сигнала криоконсервированные клетки (даже после временного шеддинга акцептирующих его структур) способны к активации, однако отсутствие второго сигнала (гибель, нарушение способности регуляторных клеток после криоконсервирования продуцировать цитокины) приводит к наблюдаемому снижению степени пролиферативного ответа криоконсервированных ИКК.

Сейчас не доказано, существует ли эффект повышения активности кроветворных клеток подобно ИКК в результате активации инозитол-фосфатного цикла, хотя развитие таких событий возможно, поскольку ковалентная связь протеиновой части рецептора с ФТИ, кроме Thy-1, доказана для многих белков. Примером ковалентно-связанных рецепторов на гемopoэтических клетках являются структуры L_у6, LFA [7]. Взаимодействие связанного с ФТИ рецептора с лигандом приводит к активации фосфолипазы С, которая осво-

бождает мембранные белки от связи с ФТИ. При этом не все белок-гликолипидные комплексы расщепляются с одинаковой скоростью. Антиген Thy-1 относительно устойчив, тогда как антигены Lya и LFA быстро переходят в растворимые формы. Освобождение ФТИ-связанных белков при клеточной активации имеет большое значение в процессах адгезии, хоминга клеток, передачи внутриклеточных стимулов и в первую очередь зависит от обмена фосфолипидов мембран и ферментативной работы фосфолипаз. Проследить механизм внутриклеточной активации стволовых кроветворных клеток в ответ на действие регуляторных сигналов достаточно сложно из-за общеизвестных трудностей получения гомогенной популяции кроветворных клеток. Однако с определенными допущениями такую работу можно осуществить на примере лимфоцитов. Было показано, что ранняя трансформация лимфоцитов при митогенной стимуляции сопровождается активацией ФТИ-каскада при участии фосфолипазы C, активации протеинкиназы C, фермента, осуществляющего фосфорилирование специфических белков, играющих ключевую роль в активации генома при трансформации лимфоцитов. Активация клеток связана также с изменением во фракции фосфатидилхолина, содержание которого увеличивается во внешнем слое мембраны, уменьшая вязкость этого слоя и повышая поступление Ca^{2+} в клетку, что в сочетании с метилированием фосфатидилхолина сопровождается активацией фосфолипазы A₂ и освобождением арахидоновой кислоты из фосфатидилхолина с последующей ее трансформацией и накоплением местных тканевых регуляторов-простагландинов [11].

Система метаболизма фосфатидилинозидов, наряду с аденилатциклазной и ионтранспортными системами, является основной системой регуляции физико-химических процессов в мембранах и клетке в целом при восприятии различных внешних сигналов, в том числе температурных и осмотических [2]. Например, снижение текучести мембраны при 4°C увеличивает возможность низкоавидного взаимодействия супрессорного фактора, продуцируемого регуляторными клетками костного мозга, с соответствующими рецепторами клеток мастоцитомы P-815 [10]. В настоящее время доказано влияние этого фактора на кроветворные предшественники, в связи с чем в новом ракурсе можно рассматривать некоторые аспекты проблемы температурозависимой изменчивости функционального статуса этих клеток. К тому же при 4°C отсутствует перекрестное связывание между мышинным ИЛ-3 и ГМ-КСФ с рецептором, хотя при 37°C ИЛ-3 снижал связывание ГМ-КСФ [33].

Вся накопленная информация о действии криоконсервирования на состояние антигенно-рецепторных структур касается, в основном, изучения характеристик криоконсервированных лимфоидных клеток. При этом надо отметить, что результаты этих исследований весьма противоречивы. Так, показано, что при криоконсервировании лимфоцитов периферической крови человека изменяется ряд функциональных свойств этих клеток, но экспрессия поверхностных антигенных структур не изменяется [17]. В работах других исследователей [27] на фоне незначительного снижения общего количества Т-клеток, выделенных методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана, значительно снижалось количество Т_H и Т_H клеток, что свидетельствует о большей криочувствительности Fc рецепторов, чем E-рецепторов. Криоконсервированные полиморфоядерные лейкоциты периферической крови резко теряли способность связывать опсонизированные IgG и C3 компоненты комплемента [30]. Подобные результаты были получены и после того, как клетки подвергали осмотическому стрессу в гипертонической среде, который моделирует цикл замораживания-оттаивания. Указанные мембранные структуры определялись в клеточном надосадке, что позволило авторам утверждать, что после криоконсервирования в результате гипертонического стресса происходит схождение (shedding) мембранных структур. Аналогичными являются и результаты работ, в которых отмечено изменение экспрессии антиге-

нов клеток костного мозга при некоторых видах лейкемии в результате криоконсервирования по 2-этапной программе [18]. При этом наибольшей криочувствительностью обладали более дифференцированные лейкозные клетки. Различная чувствительность к криоконсервированию разных рецепторов одних и тех же клеток показана в экспериментах [13] с криоконсервированным костным мозгом при оценке состояния КОЕ-ГМ: эти клетки после криоконсервирования теряли чувствительность к колониестимулирующей активности кондиционной среды (GCT), сохраняя чувствительность к факторам фидерного слоя.

Конформационные перестройки гликопротеиновых комплексов, белок-липидных компонентов, шеддинг, обусловленные изменением в процессе криоконсервирования *pH* среды, концентрации солей, температуры, льдообразования, могут лежать в основе снижения способности Thy-1^+ клеток костного мозга, включая и кроветворные — КОЕ_с, соединяться с МАТ к антигену Thy-1,2 [5]. Кроме того, установлена временная ингибция метаболической активности кроветворных клеток после криоконсервирования. Так, у модулированных по антигену Thy-1,2 КОЕ_с ("снятие" Thy-1,2 антигена путем формирования комплекса антиген+антитело+антитело) отмечается выраженное снижение скорости синтеза указанных структур в сравнении с динамикой аналогичного процесса в нативных антигенмодулированных КОЕ_с [5]. Следовательно, на примере указанных изменений состояния Thy-1,2 мембранных структур можно сделать заключение, что криоконсервирование, безусловно, может вызвать как изменение состояния антигенно-рецепторных структур кроветворных клеток, так и снижение их наработки за счет ингибции процессов метаболизма. В совокупности это приводит к нарушениям межклеточного взаимодействия и, в конечном итоге, функционального статуса кроветворных клеток.

При помощи молекулярно-генетических, иммунологических методов исследований получены данные о субмолекулярной структуре ряда рецепторных молекул кроветворных клеток и о функциональной роли их отдельных доменов. Однако вопрос о путях регуляции взаимоотношений рецептора с разными компонентами клетки достаточно сложен. Остается неясным, в какой мере разные механизмы передачи сигнала обусловлены в каждом отдельном случае рецепторами разных типов и сколько типов рецепторов имеется вообще.

Таким образом, приведенный анализ данных литературы свидетельствует о наличии на кроветворных клетках мембранных структур, реализующих широчайший спектр функциональных нагрузок. Большинство из них является достаточно лабильными и, пожалуй, наиболее "уязвимыми" к действию неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе и криоконсервированию. Использование криоконсервированного костного мозга в экспериментальной и клинической практике и доказанный факт нарушения функционирования миелотрансплантата в организме реципиента определяют необходимость по-новому подойти к проблеме оценки состояния криоконсервированной гемопоэтической ткани и разработки методов криоконсервирования этого материала. Поэтому одним из критериев эффективности того или иного метода криоконсервирования кроветворных клеток является обеспечение функционально активного состояния их мембранно-рецепторных структур. Определение сохранности мембранно-рецепторных структур должно быть включено в оценку морфофункционального состояния кроветворных клеток в целом. Данные об изменении экспрессии антигенов и функциональной активности рецепторных структур кроветворных клеток после криоконсервирования позволяют определить новые механизмы защитного действия трансплантируемого костного мозга. При учете возможной модификации антиген-рецепторного спектра мембран кроветворных клеток после криоконсервирования и способ-

ности гуморальных субстанций усиливать экспрессию поверхностных структур становится очевидной перспективность использования индукторов-стимуляторов экспрессии рецепторов к регуляторным гемopoэтическим факторам для повышения эффективности применения криоконсервированного костного мозга.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГМ(Г)-КСФ — гранулоцито-макрофагальный (Г-гранулоцитарный) колониестимулирующий фактор
ГК — глюкокортикоиды
ИКК — иммунокомпетентные клетки
ИЛ — интерлейкин
ИЛ-1Р — рецептор к ИЛ-1
ИФ — интерферон
КОЕ-ГМ — колониеобразующие единицы, формирующие колонии, состоящие из гранулоцито-макрофагальных клеток
КОЕ_{к(с)} — колониеобразующая единица в культуре (в селезенке)
СПР — саркоплазматический ретикулум
ФДЭ — фосфодиэстераза
ФНО — фактор некроза опухоли
5-ФУ — 5-фторурацил

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белокрылов Г.А. Thy-1-антиген и его функции // Усп. совр. биол. — 1986. — 102, № 1. — С. 39–51.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. — Киев: Наук.думка, 1994. — 431 с.
3. Беляев Н.Н., Закирьянова Г.К. Антимитогенный фактор костного мозга и его регуляция гистамином // Иммунология. — 1991. — №3. — С. 27–30.
4. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Захарова О.Ю. Регуляторное влияние опиоидных пептидов на костномозговое кроветворение при стрессе // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 8. — С. 216–219.
5. Гольцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на иммунобиологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. ... д-ра мед. наук. — Харьков, 1988. — 35 с.
6. Зак К.П., Бутенко З.А., Комиссаренко Т.Л. и др. Ультраструктура мононуклеаров костного мозга, маркированных антистволовой клеточной сывороткой с помощью ПАП-метода // Гематол. и трансфузиол. — 1983. — 27, № 2. — С. 38–42.
7. Извекова В.А. Липиды мембран и функции иммунокомпетентных клеток в норме и патологии // Усп. совр. биологии. — 1991. — 111, № 4. — С. 577–591.
8. Луговой В.И. Механизмы повреждающего действия замораживания на растворимые и мембраносвязанные ферменты: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Харьков, 1985. — 38 с.
9. Сергеев Г.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы. — М.: Медицина, 1987. — 397 с.
10. Сидорович И.Г., Ляхов В.В., Власов А.А. Характеристика и клетки-мишени супрессорного фактора, секретируемого клетками костного мозга // Иммунология. — 1987. — №4. — С. 67–69.
11. Утешиев Б.С. Механизмы активации В-лимфоцитов // Усп. совр. биологии. — 1991. — 111, № 4. — С. 591–604.
12. Adamson L., Popovic W. Modulation of *in vitro* erythropoiesis // Blood. — 1979. — 52, Suppl. 1. — P. 223–230.
13. Aglietta M., Piacibello W., Sanavio F. Retinoic acid enhances the growth of only one subpopulation of granulomonocyte precursors // Acta Haematol. (Basel). — 1984. — 71, № 2. — P. 97–99.
14. Bertoncello I., Krieger A.B. The effect of IL-6 on hemopoietic stem cell subsets resolved by rhodamine 123 // Exp. Hematol. — 1990. — 18, № 6. — P. 550.
15. Boranic M., Krizanac-Benger L.J. Effect of enkephalins on bone marrow cells in culture // Exp. Hematol. — 1990. — 18, № 6. — P. 552.
16. Byron J. Analysis of receptor mechanisms involved in the hemopoietic effects of androgens: use of the Tfm mutant // Exp. Hematol. — 1977. — 5, № 6. — P. 429–435.
17. Callery Ch.D., Colighthy M. Lymphocyte surface markers and cytotoxicity following cryopreservation // J. Immunol. Methods. — 1980. — 35, № 4. — P. 213–223.
18. Campos L., Guyotat D. Expression of immunological markers on leukemic cells before and after cryopreservation and thawing // Cryobiology. — 1988. — 25, № 1. — P. 18–22.
19. Carr D.J., DeCosta B.R. Anti-opioid receptor antibody recognition of binding site on brain and leukocyte opioid receptors // Neuroendocrinology. — 1990. — 51, № 5. — P. 552–560.
20. Hubbard J.R., Mohammed K. Differential effect of chelating agents on cytosolic glucocorticoid receptor stability and nuclear binding *in vitro* // Steroid. Biochem. — 1983. — 19, № 11. — P. 1163–1167.

21. *Hudac S., Thompson-Snipes L.* Anti-IL-6 antibodies suppress total cell production and the development of CFU-C in long-term myeloid bone marrow cultures // *Exp. Hematol.* -1990.-18, № 6. - P. 567.
22. *Ikebuchi K., Wong G.G.* IL-6 enhancement of IL-3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* -1987.-84, № 12. - P.9035-9039.
23. *Kings S.L.* An assessment of phosphoinositide hydrolysis in antigenic transduction in lymphocytes // *Immunology.* -1988. - 65, № 1.- P. 1-8.
24. *Kizaki M., Koeffler H.P.* Expression of retinoic acid receptor mRNA hematopoietic cells // *Leuk. Res.* -1990. -14, № 7. - P. 645-655.
25. *Kurland J., Hadden J.* Role of cyclic nucleotides in the proliferation of committed granulocyte-macrophage progenitor cells // *Cancer Res.* -1977. -37, № 4. - P. 4533-4538.
26. *Maino V.C., Nocross M.A.* Mechanism of Thy-1-mediated T cell activation: roles of Fc receptors, T200, Ia, and H-2 glycoproteins in Accessory cell function // *J. Immunol.* -1981. -126, № 5. - P. 1829-1837.
27. *Pusztai-Markos Z., Eberfeld R.* Fc receptor and human T-lymphocytes in frozen-thawed peripheral blood cells // *Cryobiology.* -1984.-21, № 4.- P. 427-434.
28. *Sorg G.* Macrophage-derived cell regulatory factors // *Basel.* -1989.-234 p.
29. *Strobl H., Tacimoto M.* Antigenic analysis of human haemopoietic progenitor cells expressing the growth factor receptor c-kit // *Brit.J.Haematol.* -1992.-82, № 2.- P. 287-294.
30. *Takahashi T., Moji S.* Cold shock hemolysis in human erythrocytes studied by spin probe method // *Biophys. J.* -1986.-49, № 2.- P. 403-410.
31. *Tanaka H., Hideto A.* Glucocorticoid receptors in normal leukocytes: Effect of age, season, plasma cortisol concentration // *Clin. Chem.* -1991.-37, № 1.- P. 1715-1719.
32. *Venkataraman M.* Cryopreservation-induced enhancement of IL-2 production in human peripheral blood mononuclear cells // *Cryobiology.* -1992.-29, № 2.- P. 165-175.
33. *Walker F., Nicola N.A.* Hierarchical downmodulation of hemopoietic growth factor receptors // *Cell.* -1985.-43, № 2.- P. 269-274.
34. *Welham M.J., Schrader J.W.* Function and expression of c-kit // *Exp. Hematol.* -1990.-18, № 6. - P. 619.

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

Поступила 14.03.95

А.М.ГОЛЬЦЕВ, О.Д.ЛУЦЕНКО, Л.В.ОСТАНКОВА, Т.Г.ДУБРАВА, О.В.ОПАНАСЕНКО

МЕМБРАННІ СТРУКТУРИ, ЯКІ ВИЗНАЧАЮТЬ ФЕНОТИПІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ І ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАТУС КРОВОТВОРНИХ КЛІТИН; МОЖЛИВА МОДИФІКАЦІЯ ПІД ДІЄЮ ФАКТОРІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ. ЧАСТИНА II

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м.Харків

Продовжена характеристика ряду поверхневих структур кровотворних клітин кісткового мозку та розглянута їх участь в рецепції регуляторних сигналів, які забезпечують гемопоез. Наведені дані, які свідчать про зміну функціональної активності гемопоетичних клітин в результаті порушення (модифікації) стану антигенних структур після кріоконсервування.

A.N.GOLTSEV, E.D.LUTSENKO, L.V.OSTANKOVA, T.G.DUBRAVA, E.V.OPANASENKO

MEMBRANE STRUCTURES, DETERMINING PHENOTYPICAL CHARACTERISTICS AND FUNCTIONAL STATUS OF HEMOPOIETIC CELLS; POSSIBLE MODIFICATION UNDER THE ACTION OF CRYOPRESERVATION FACTORS. PART II

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

The authors continue characterization of some surfacial structures of the bone marrow hemopoietic cells, and speculate on their involvement into reception of the regulatory signals, providing for hemopoiesis. They produce the data, testifying to a change in the functional activity of hemopoietic cells due to the impairment (modification) of the state of the antigen structures after cryopreservation.

**А.К.Гулевский, В.В.Рязанцев, Е.А.Грищенко,
Л.И.Релина**

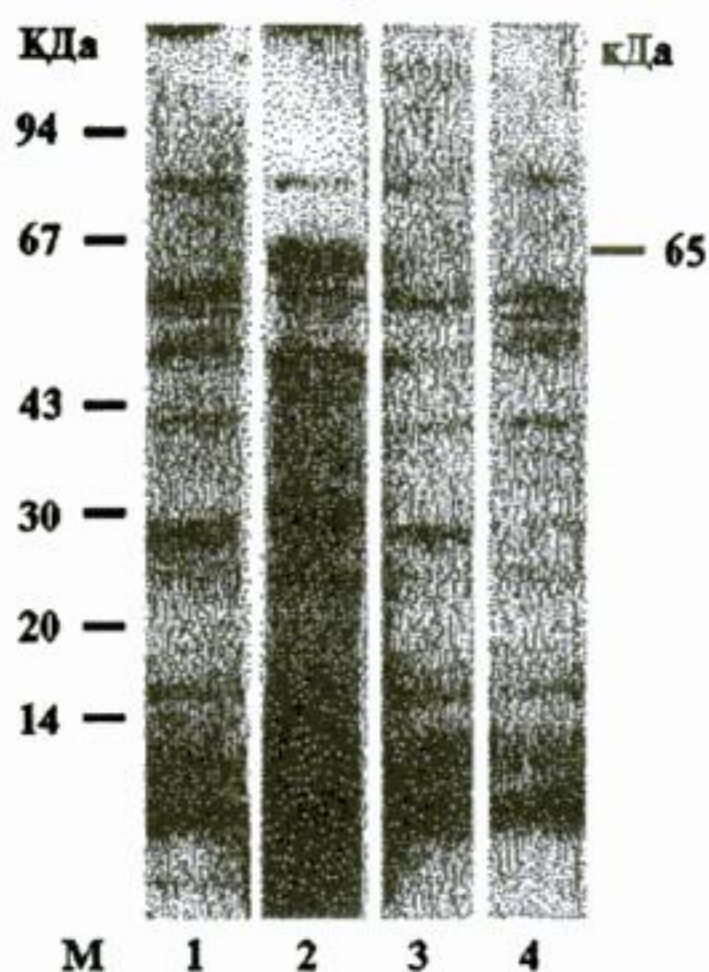
ИЗМЕНЕНИЯ В СПЕКТРЕ БЕЛКОВ ЛИЧИНОК БОЛЬШОГО МУЧНОГО ХРУЩАКА *TENEBRIO MOLITOR* В ПЕРИОД ХОЛОДО- ВОЙ АККЛИМАЦИИ

Проведено исследование спектра белков из тканей избегающих замерзания личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (сем. *Tenebrionidae*) в условиях различных температурных режимов. Методом ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) было установлено, что при низкотемпературной акклимации личинок вероятность появления протеина 65 кДа значительно возрастает по сравнению с таковой у контрольных особей, содержащихся в условиях комнатной температуры. Существенная редукция содержания данного белка у особей, которым накануне акклимации был введен ингибитор трансляции – циклогексимид, указывает на возможность синтеза этого белка в условиях холодовой акклимации *de novo*.

В настоящее время одной из актуальных проблем криобиологии является исследование механизмов адаптационных реакций животных на охлаждение. В ряде работ было показано, что в период холодовой акклимации в организме некоторых животных, в частности насекомых, избегающих замерзания, происходит накопление белков с молекулярными массами около 9 кДа [6], способствующих переохлаждению внеклеточных жидкостей тела до -9 – -20 °C [2–5], в зависимости от вида и условий холодовой закалки. Наряду с этим активируется ряд ферментных систем, ответственных за синтез низкомолекулярных антифризов небелковой природы [2–5, 7, 8]. Приведенные данные свидетельствуют о запрограммированном изменении биосинтетических процессов в клетках, что способствует холодовой акклимации животных; и в общем виде вновь синтезированные белки можно обозначить как белки-адаптогены. Не исключено, что, помимо вышеуказанных низкомолекулярных белков, синтез которых активируется на холоде, в период акклимации происходит активация синтеза и других белков-адаптогенов, в частности, белков-шаперонов и др. [5]. С целью установления спектра белков, синтезирующихся в период холодовой акклимации, нами было проведено исследование качественного и количественного спектра белков из тканей избегающих замерзания личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (сем. *Tenebrionidae*).

Работа проводилась на личинках большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (сем. *Tenebrionidae*) из лабораторной популяции. Для экспериментов отбирали личинок со средней массой 100–150 г. Личинки акклимировались при 2–4, 7–10, 12–15 °C в холодильнике. Часть личинок проходила акклимацию в условиях длинного фотопериода (18 ч свет: 6 ч темнота). Ингибитор трансляции – циклогексимид – вводили личинкам в количестве 3 мкг/особь при помощи шприца фирмы “Hamilton”. Концентрация раствора циклогексимиды 1 мкг/мкл. Каждую личинку гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 400 мкл 0,1 М фосфатного буфера pH 8, в который с целью инактивации протеаз добавляли спиртовой раствор фенилметилсульфонилфлуорида (ФМСФ) – ингибитора протеаз – до конечной концентрации 0,3 мг/мл. К аликвоте гомогената добавляли 96 %-й этанол в соотношении 1:1 [6]. Экстракцию проводили в течение 25–30 мин при интенсивном перемешивании. Затем пробы центрифугировались (3000 об/мин 5 мин). Для дальнейшей работы отбирали надосадки (спиртовые экстракты). При приготовлении проб для ДСН-электрофореза 50 мкл надосадка смешивали с 50 мкл буфера для растворения проб (0,05 М трис-НСl, pH 6,8; 20 % глицерин; 0,003 М трилон Б; 2 % додецил сульфат натрия; 0,4 мг/мл азида натрия; 0,1 мг/мл ФМСФ; 5 % меркаптопропандиол; 0,01 % бромфеноловый синий) и кипятили в течение 3 мин на водяной бане. В ряде экспериментов пробы готовили из смеси спиртовых экстрактов, полученных из 5–6 личинок. Пробы хранили в морозильной каме-

ре при -10°C . ДСН-электрофорез проводили в полиакриламидном градиентном геле (12,5–25%) по стандартной методике [1]. Фиксацию и окрашивание белков в геле проводили, как описано в [1].



Электрофореграмма спирторастворимых белков из тканей неакклимированных личинок *Tenebrio molitor* (1), акклимированных личинок (2), деакклимированных личинок (3), личинок, акклимированных в присутствии циклогексамида *in vitro* (4). М – маркеры молекулярной массы

связаны с индивидуальным внутривидовым белковым полиморфизмом. Анализ доступной нам литературы показал, что данных о молекулярных массах, определенных методом ДСН-электрофореза (т.е. в денатурирующих условиях), растворимых в этаноле белков и пептидов, появляющихся в период акклимации, на данный момент не имеется. Исследования [6] свидетельствуют о том, что, по крайней мере, один из компонентов спиртового экстракта из тканей холодаакклимированных личинок *T. molitor*, обладающий термогистерезисной активностью, имеет молекулярную массу 9 кДа, которая была определена методом гель-фильтрации, т.е. в условиях, сохраняющих нативную конформацию пептидов. Вследствие этого представляется затруднительным сопоставление полученных нами результатов с результатами работ исследователей антифризных белков.

Следует отметить, что белок с массой 65 кДа присутствует у некоторых особей и в условиях комнатной температуры (примерно у 25% особей из исследованной выборки). После акклимации же количество особей, обладающих этим белком, возрастает до 75%. После возвращения насекомых в условия комнатной температуры (процесс, названный нами деакклимацией) спектр белков начинает постепенно меняться и к 7-м сут белковые образцы деакклимированных личинок становятся сходными с таковыми неакклимированных личинок (образец 3 на рис.; примерно у 25% деакклимированных особей присутствует белок 65 кДа).

Важно отметить, что качественные изменения в спектре белков, по крайней мере полосы 65 кДа, возможно, связаны с синтезом белков *de novo*, так как её появление блокируется при введении в организм ингибитора трансляции циклогексамида (образец 4 на рис.). Данные денситометрии показывают, что редукция содержания данного белка у личинок, которым был введен циклогексимид, составляла 50% по отношению к содержанию данного белка у акклимированных личинок, которым ингибитор синтеза белка не вводили (отно-

На рисунке представлены данные ДСН-электрофореза в ПААГе белков спиртовых экстрактов, выделенных из тканей личинок *T. molitor*. Как видно из рисунка (на образцах 1 и 2 изображены спектры белков неакклимированных и акклимированных личинок соответственно), после холодовой акклимации длительностью 14 сут и более происходит изменение качественного состава белков, в частности, наиболее заметно появление полосы с молекулярной массой 65 кДа. Обращают на себя внимание также изменения во фракциях 30 кДа, 16–18 кДа и 5–10 кДа. Заметно, что некоторые компоненты этих фракций, присутствующие у личинок, содержащихся в условиях акклимации, отсутствуют у контрольных личинок, в частности 30 и 5–10 кДа; однако группа белков 16–18 кДа у акклимированных личинок существенно редуцируется. Имеются также отличия в спектре белков в районе 80 кДа, однако не удалось установить такой зависимости между температурой содержания насекомых и характером изменений в этой области, возможно, эти различия

сительное содержание белка 65 кДа — 32,4 и 16,3% для акклимированных личинок без введения циклогексимида и личинок, акклимировавшихся после введения циклогексимида соответственно). Следует отметить, что при введении циклогексимида несколько снижается содержание белка в получаемых пробах в целом. Только у 32% акклимированных личинок, которым был введен циклогексимид, отмечено появление белка 65 кДа.

В работе [8] было показано, что инициация синтеза белков-антифризов происходит под влиянием короткого фотопериода (10–11 ч свет: 13–14 ч темнота). Имеются также данные о том, что антифризные белки синтезируются у личинок, содержащихся в условиях темноты с сочетанием определенного температурного режима (8 ч при 25 °C: 16 ч при 17 °C) [8]. В связи с этим нами было исследовано влияние длины фотопериода и освещения на появление белка 65 кДа в условиях низкотемпературной акклимации. Часть личинок акклимировалась при длинном фотопериоде (18 ч свет: 6 ч темнота), у этих личинок также было отмечено появление полосы 65 кДа. Кроме того, часть личинок проходила деакклимацию в условиях темноты. Белок 65 кДа отсутствовал в белковых паттернах личинок, деакклимированных в темноте. Полученные данные позволяют сделать вывод, что причиной появления белка 65 кДа является именно понижение температуры. Возможно, данный белок принадлежит к группе отличных от белков-антифризов холодовых белков-адаптогенов, регуляция синтеза которых осуществляется иными путями.

Таким образом, в условиях низкотемпературной акклимации (длительностью более 7 сут) наблюдаются качественные и количественные изменения спектра белков в акклимированных личинках *Tenebrio molitor*, о чем свидетельствуют данные ДСН-электрофореза в ПААГе. Установлено, что при акклимации в условиях понижения температуры с высокой частотой появляется новая белковая полоса, соответствующая протеину с молекулярной массой 65 кДа, отсутствующая у большинства особей популяции при комнатной температуре. На возможность синтеза этого белка *de novo* указывает существенная количественная редукция данной полосы в белковых паттернах особей, которым перед акклимацией инъецировали циклогексимид.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот // Электрофорез и ультрацентрифугирование. — М.: Наука. — 1981. — С. 37–116.
2. Bale J.S. Insect cold hardiness: freezing and supercooling - an ecophysiological perspective // J. Insect. Physiol. — 1987. — 33, № 12. — P. 899–908.
3. Bale J.S. Cold hardiness and overwintering of insects // Agr. Zool. Rev. — 1989. — 3, № 4. — P. 157–192.
4. Block W. Cold tolerance of insects and other arthropods // Phil. Trans. R. Soc., London. — 1990. — B326, № 1237. — P. 613–631.
5. Lee R.E. Insect cold hardiness: to freeze or not to freeze? How insects survive low temperatures // BioScience. — 1989. — 39, № 5. — P. 308–313.
6. Schneppenheim R., Theede H. Isolation and characterization of freezing-point depressing peptides from larvae of *Tenebrio molitor* // Comp. Biochem. Physiol. — 1980. — 67B, № 6. — P. 561–568.
7. Storey K.B. Biochemical adaptation for cold hardiness // Phil. Trans. R. Soc., London. — 1990. — B326, 1237. — P. 635–654.
8. Storey K.B., Storey J.M. Freeze tolerance in animals // Physiol. Rev. — 1988. — 68, № 1. — P. 27–84.

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

Поступила 21.12.94

О.К.ГУЛЕВСЬКИЙ, В.В.РЯЗАНЦЕВ, О.О.ГРИЩЕНКОВА, Л.І.РЕЛІНА

ЗМІНИ У БІЛКОВОМУ СПЕКТРІ ЛИЧИНОК *TENEBRIO MOLITOR*, У ПЕРІОД ХОЛОДОВОЇ АККЛІМАЦІЇ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Проведено дослідження спектру білків з тканин унікаючих замерзання личинок *Tenebrio molitor* (род. *Tenebrionidae*) в умовах різних температурних режимів. Методом ДСН-електрофо-

результат у ПААГі було встановлено, що при низькотемпературній акліматизації личинок вірогідність появи протеїну 65 кДа значно зростає у контрольних об'єктах, які утримувались в умовах кімнатної температури. Суттєва редукція вмісту даного білка у об'єктів, яким напередодні акліматизації був введений інгібітор трансляції – циклогексимід, вказує на можливість синтезу цього білка в умовах холодової акліматизації *de novo*.

A.K.GULEVSKY, V.V.RYAZANTSEV, E.A.GRISCHENKOVA, L.I.RELINA

ALTERATIONS IN PROTEIN SPECTRUM OF A *TENEBRIO MOLITOR* LARVAE DURING COLD ACCLIMATION

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

Protein spectrum of the tissues of *Tenebrio molitor* (family of Tenebrionidae) larvae, which avoid freezing, was studied under various temperature modes. A method of SDS- electrophoresis in polyacrylamide gel (PAAG) showed that during low temperature acclimation of larvae a possibility of the appearance of a 65 kDa protein significantly increases as compared with that in the control samples, kept at room temperature. A considerable reduction in the content of the given protein in the samples, which prior to acclimation were injected with the inhibitor of translation – cycloheximide, supports a possibility of synthesis of this protein during cold acclimation *de novo*.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 611.36.018.1:57.043:577.1:616.36

Н.П.Суббота

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НАТИВНЫХ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ АЛЛОГЕПАТОЦИТОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Изучены структурное состояние, дыхательная и белоксинтезирующая активность, захват ксенобиотика бифенила нативными и криоконсервированными гепатоцитами печени плодов человека и кадаверов, предназначенными для клинического использования. Разработаны методы криоконсервирования гепатоцитов в среде с низкими концентрациями протекторов без уменьшения их жизнеспособности.

Одним из актуальных направлений современной медицины является использование биологических субстратов аллопечени, в том числе и изолированных клеток, для лечения эндотоксикозов различной этиологии [2, 7]. Ограничение использования этого метода в широкой клинической практике определено отсутствием простых дешевых способов выделения жизнеспособных клеток, а также адекватных методов оценки жизнеспособности на этапе получения и длительного хранения. Целью работы явилось изучение структурно-функциональных свойств гепатоцитов после выделения и криоконсервирования из печени плодов человека и кадаверов.

Для получения гепатоцитов использовали трупную печень человека, полученную в НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского (г. Москва, Россия). Срок ишемии органа не превышал 1,5–2,0 ч. Противопоказаниями к забору служила информация службы скорой помощи “03” о повреждении или заболевании органа, а также отсутствие соответствующей записи судмедэксперта. Получение клеток производили из донорского материала при отсутствии патологических процессов (цирроз, разные формы гепатитов, жировая дистрофия) по методу [10]. Гепатоциты плодов человека поздних сроков развития (16–26 недель) получали как описано в работе [4] в результате искусственных родов по медицинским показаниям в отделении патологии беременности 1-й Городской больницы г. Харькова. О противопоказаниях к забору судили по данным анамнеза беременности. С целью длительного хранения гепатоцитов использовали субнулевые температуры (–196 °С). Замораживание производили по двум режимам: двухэтапно — медленно со скоростью 1 °С/мин до –60 °С, температурная остановка 3–5 мин, затем — быстрое погружение в

жидкий азот (режим 1) и одноэтапно со скоростью 16000 °C/мин (режим 2). Для осуществления замораживания по режиму 1 использовали программный замораживатель УОП-6, а по режиму 2 — методический прием, описанный в [11]. Отогрев проб производили на водяной бане при 37 °C. С целью криопротекции гепатоцитов в процессе замораживания применяли 3 или 10%-е растворы димексида (ДМСО) и глицерина. Жизнеспособность гепатоцитов оценивали по окраске с трипановым синим. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева. Гистологические исследования проводили как описано в работе [6], а ультраструктуру клеток — по методу [9].

Уровень эндогенного дыхания и его стимуляцию увеличивающимися (1 мМ, 10 мМ) концентрациями сукцината оценивали в среде, содержащей (в мМ): KCl — 5,0; дитиотреитол — 2,0; KH_2PO_4 — 0,4; NaHPO_4 — 0,4; ЭДТА — 2,0; сахароза — 250,0; альбумин — 1%-й с использованием электрода кларковского типа на полярографе ПА-2 “Прага”. Концентрация клеток в одном миллилитре составляла в среднем 2 млн. Белоксинтезирующую способность гепатоцитов определяли по включению в суммарные белки гепатоцитов меченых аминокислот [5]. Захват ксенобиотика гепатоцитами измеряли по интенсивности флуоресценции на спектрофлуориметре “ХИТАЧИ” MPF-2A [12] после 20-минутной инкубации (37 °C) суспензии клеток с 70 мкМ бифенила.

Жизнеспособность суспензии выделенных гепатоцитов составляла 75–80%. Клетки характеризовались сохранением структуры плазматической мембраны, клеточных органелл (рис. 1). После замораживания суспензии гепатоцитов как по программе 1, так и 2 нарушения структурной организации были несовместимы с процессами их жизнедеятельности. Большая часть клеток разрушена, встречаются обломки с гиперхромными ядрами. Единичные сохранившиеся клетки деформированы, имеют необычные контуры и плотную цитоплазму. Митохондрии таких гепатоцитов увеличены в размерах, деформированы, наружная мембрана и кристы практически отсутствуют, отмечаются грубые разрывы внутренней мембраны и просветление матрикса в результате гидратации.

Сравнительное исследование функциональной активности нативных гепатоцитов кадаверов и плодов человека выявило некоторые возрастные особенности. С увеличением сроков развития плодов от 16 до 26 недель в изолированных деконсервированных клетках отмечались тенденция к увеличению уровня эндогенного дыхания и снижение стимуляции дыхательной активности экзогенным сукцинатом.

Изучение влияния различных скоростей замораживания показало угнетение способности гепатоцитов каждой исследованной группы исключать витальный краситель, включать меченые аминокислоты в суммарные белки, а также увеличение скорости окисления экзогенного сукцината, что свидетельствует о нарушении целостности плазматической мембраны и изменении ее барьерных свойств (табл. 1). Включение меченых предшественников в суммарные белки деконсервированных гепатоцитов плодов человека 24–26 не-

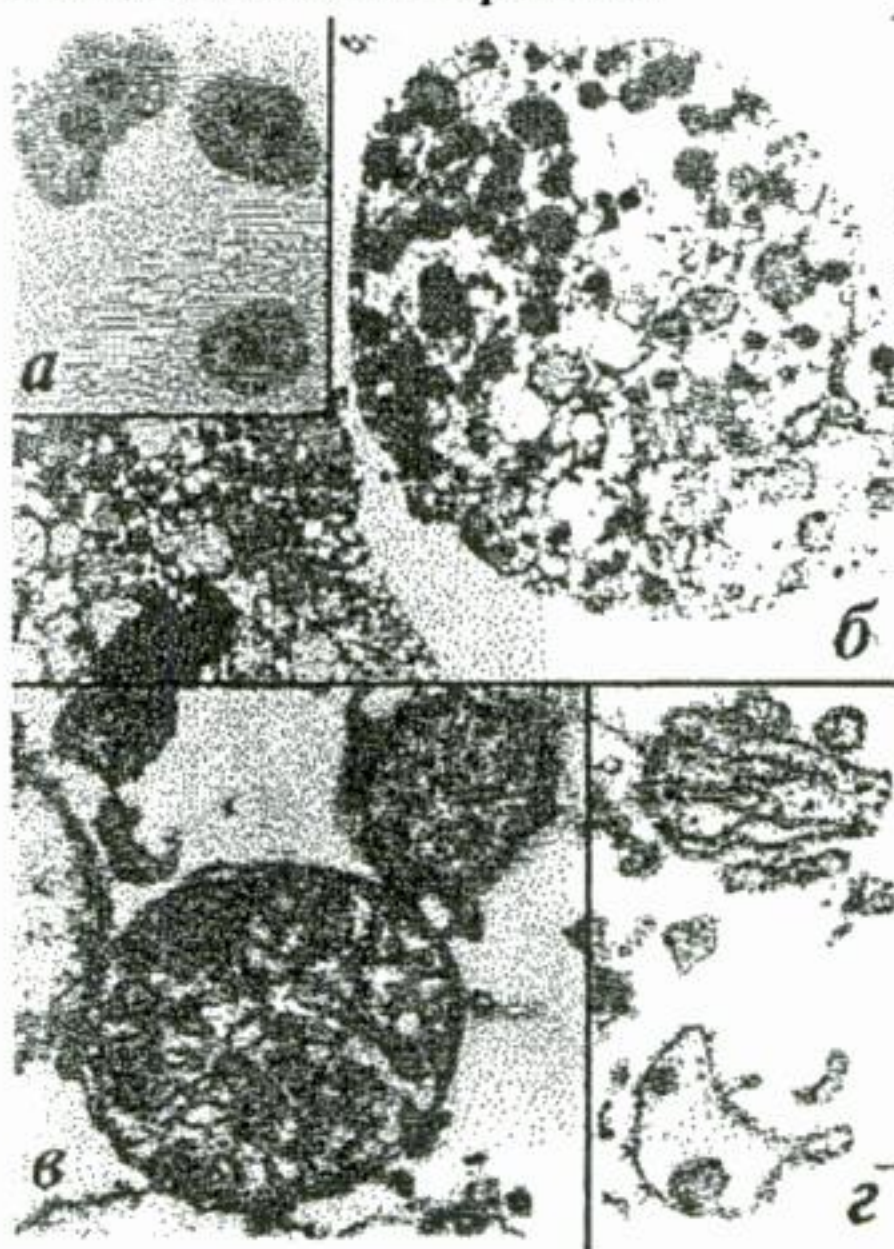


Рис. 1. Морфологическая сохранность гепатоцитов, выделенных из трупной печени взрослых доноров-людей (гематоксилин, эозин): а — X400, б — X9500, в — X36200, г — X64500, уменьшение при репродукции 3/5

дель развития и кадаверов было значительно угнетено и мало зависело от скорости замораживания, составляя в среднем 30% от контрольных величин (табл. 2).

Т а б л и ц а 1

Влияние режима замораживания, вида и концентрации криопротектора на морфофункциональные свойства гепатоцитов плодов человека (26 недель развития), n=5-7

Условия эксперимента	Измеряемый параметр		
	Скорость эндогенного дыхания, нМ O ₂ /мин млн клеток	Коэффициент стимуляции эндогенного дыхания сукцинатом	Жизнеспособность, окраска трипановым синим, % от контроля
Контроль	10,3±1,2	1,24±0,1	75
В среде без криопротектора			
Режим 1	4,3±0,18	2,4±0,18	35
Режим 2	5,0±0,1	2,6±0,2	35
В среде с криопротекторами			
Режим 1 + 10%-й КП			
Глицерин	6,47±0,2	2,20±0,15	65
ДМСО	7,04±0,3	2,14±0,14	68
Режим 2 + 3%-й КП			
Глицерин	6,1±0,2	2,20±0,15	70
ДМСО	6,5±0,1	2,03±0,10	65
Режим 2 + 10%-й КП			
Глицерин	6,2±0,2	2,20±0,10	65
ДМСО	6,4±0,4	2,45±0,20	68

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

Способность к захвату ксенобиотика бифенила гепатоцитами кадаверов, после замораживания их по режиму 1 в среде без криопротектора, снижалась в среднем на 50%. При увеличении скорости замораживания (режим 2) этот показатель увеличивался на 10% и не отличался от величин, полученных при этой скорости замораживания для гепатоцитов плодов человека 24-26 недель развития (рис. 2).

Т а б л и ц а 2

Влияние режима замораживания и криопротекторов на морфофункциональные свойства гепатоцитов кадаверов, n=7-10

Режим замораживания		Концентрация криопротектора, %	Жизнеспособность гепатоцитов, %	Включение аминокислот в суммарные белки гепатоцитов, имп/мин ЖС клеток
Режим 1	ДМСО	10	75	36230±96
	Глицерин	10	72	28253±100
Режим 2	ДМСО	3	68	39925±120
	Глицерин	3	60	27421±91
	ДМСО	10	72	39000±112
	Глицерин	10	60	28006±120



Рис. 2. Влияние скорости замораживания, вида и концентрации криопротектора на захват бифенила аллогенными гепатоцитами: 1 - двухэтапно, 2 - 200 °С/мин, 3 - 16000 °С/мин; а - 10%-й ДМСО, б - 3%-й ДМСО, в - 3%-й глицерин; КП - криопротектор

С целью протекции гепатоцитов при низкотемпературном замораживании в работе использованы два подхода: увеличение скорости замораживания при одноэтапных режимах и комбинирование скоростей на этапах замораживания с включением в режим температурной остановки. Увеличение скорости замораживания приводит к формированию мелкокристаллической структуры льда, ослаблению действия таких повреждающих факторов, как обезвоживание, дегидратация макромолекул, увеличение концентрации электролитов и других растворенных веществ, медленное повреждение клеток внутриклеточным льдом и т. д.

Замораживание со скоростью 16000 °С/мин позволяет снизить эффек-

тивную концентрацию криопротектора до 3%. Если в среде замораживания гепатоцитов присутствовал 3%-й ДМСО, показатели включения аминокислот в суммарные белки и захват бифенила сохранялись на более высоком уровне (табл. 2, рис. 2), чем в присутствии 3%-го глицерина. Увеличение концентрации ДМСО в среде до 10% и изменение режима замораживания не оказывают дополнительного криозащитного эффекта: жизнеспособность в деконсервированных гепатоцитах практически одинакова как после замораживания по программе 1, так и по программе 2.

Анализ изменений функциональной активности гепатоцитов плодов человека 24–26 недель развития после замораживания по программам 1 и 2 показал, что использование 3%-го глицерина или 3%-го ДМСО при одноэтапном сверхбыстром замораживании обеспечивает такой же эффект в отношении исследованных параметров, как и двухэтапное замораживание в среде с 10%-м ДМСО. В гепатоцитах плодов, замороженных с использованием режима 2, жизнеспособность сохранялась на таком же уровне, как и после охлаждения по режиму 1, однако включение меченых аминокислот и скорость эндогенного дыхания были значительно выше, чем в гепатоцитах, замороженных с использованием режима 1 (табл. 1). При этом следует отметить более выраженную криочувствительность гепатоцитов, выделенных из печени плодов человека, чем из печени кадаверов.

Таким образом, полученные результаты исследований свидетельствуют, что в изолированных гепатоцитах, замороженных в среде с криопротекторами по описанным режимам, сохраняется важная для клинического использования гепатоцитов способность к взаимодействию субклеточных структур, например митохондрий и эндоплазматического ретикулума, что невозможно в поврежденных клетках. В частности, сохраняется направленная регуляция процессов биотрансформации ксенобиотиков, обеспечивающая усиление или ослабление активности микросомального окисления. Это особенно важно, поскольку известно [1], что первые этапы метаболизма некоторых ксенобиотиков происходят в цитозоле, а промежуточных продуктов — в митохондриях. Отсюда следует, что одним из критериев пригодности суспензии гепатоцитов к криоконсервированию, а также клиническому использованию должен быть высокий уровень жизнеспособности гепатоцитов, что может быть лишь при сохранности всех мембранных структур клеток, участвующих в обеспечении таких важных для клетки процессов, как биоэнергетика, биосинтез белка, детоксикация ксенобиотиков.

Надежность разработанных методов получения и криоконсервирования гепатоцитов плодов человека и кадаверов в отношении сохранения их структурно-функциональных свойств подтверждена не только экспериментальными исследованиями, но и эффективностью их практического использования для экстракорпорального лечения печеночной недостаточности у 69 больных (отравление грибами и гепатотропными ядами — CCl_4 , дихлорэтаном и др.) с фиксацией гепатоцитов на полупроницаемой мембране (175 клеточных диализов) [13]. Вместе с тем показанная [8] более выраженная эффективность проведения “клеточной” терапии с применением гепатоцитов по сравнению с другими используемыми с целью детоксикации методами требует тщательного выяснения их механизма действия, так как показано [3], что он обеспечивается не высокой сорбционной способностью клеток, а какими-то другими механизмами, расшифровка которых пока не сделана.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А.И., Карузина И.И. Окисление чужеродных соединений и проблемы токсикологии // Вестн. АМН СССР. — 1988. — № 1. — С. 14–23.
2. Бочаров А.В., Федина И.Б., Спиров В.Г. и др. Использование культивируемых на микроносителях гепатоцитов для коррекции острой печеночной недостаточности // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1990. — 109, № 6. — С. 590–592.

3. Велигоцкий А.Н. Применение криоконсервированных ксеногепатоцитов у хирургических больных с диффузными повреждениями печени: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. — Харьков, 1994. — 22 с.
4. Грищенко В.И., Пономарев Ю.И., Суббота Н.П. Одномоментная перфузионная дезинтеграция органов плода человека на клетки // 11 Всес. конф. по трансплантации сердца, печени, почки, поджелудочной железы и других органов: Тез. докл. — Львов, 1990. — С. 234–235.
5. Кеннел Д. Методы исследования нуклеиновых кислот (пер. с англ.). — М.: Мир, 1970. — 277 с.
6. Мануилова Н.А. Гистология с основами эмбриологии. — М.: Мир, 1972. — С. 410–427.
7. Маргулис М.С., Ерухимов Е.А., Андрейман Л.А. и др. Применение взвеси гепатоцитов в гемосорбционной системе при острой печеночной недостаточности: экспериментальное исследование // Хирургия. — 1985. — № 3. — С. 121–123.
8. Шумаков В.И., Арзуманов В.С., Онищенко Н.А. и др. Лечение тяжелой печеночной недостаточности перфузией крови больного через взвесь криоконсервированных гепатоцитов // Хирургия. — 1990. — № 2. — С. 113–116.
9. Ховитсон А. Методы электронной микроскопии // Методы вирусологии и молекулярной биологии. — М.: Мир, 1972. — С. 410–427.
10. А.с.1659476 СССР, МКИ⁴ С 12 N 5/00. Способ получения изолированных гепатоцитов / Н.П.Суббота, И.И.Шиманко, А.М.Белоус и др. — Оpubл. 30.06.91. Бюл. № 24.
11. А.с. 1412039 СССР, 1986. Не публикуется.
12. Bolesfoldi G., Johansson M. Andersson B. et al. Biotransformation of xenobiotics in isolated dog hepatocytes // Acta pharmacol. toxicol. — 1981. — 48. — P. 227–232.
13. Subbota N.P., Lebedeva Yu.N., Grischenko V.I. Application of cryopreserved allohepatocytes fixed on a semipermeable membrane for organism detoxication // Data medica. — 1994. — № 3. — С. 17–20.

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

Поступила 16.03.95

Н.П.СУББОТА

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НАТИВНИХ І КРІОКОНСЕРВОВАНИХ АЛЛОГЕПАТОЦИТІВ, ЯКІ ПРИЗНАЧЕНІ ДО КЛІНІЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчені структурний стан, дихальна та білоксинтезуюча активності, захват ксенобіотика біфеніла нативними і криоконсервованими гепатоцитами печінки плодів людини і кадаверів, які призначені до клінічного використання. Розроблені методи криоконсервування гепатоцитів у середовищі з низькими концентраціями протекторів без зменшення їх життєздатності.

N.P.SUBBOTA

FUNCTIONAL STATE OF NATIVE AND CRYOPRESERVED ALLOHEPATOCYTES, DESTINED FOR CLINICAL APPLICATION

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

The authors studied the structural state, respiratory and protein-synthesizing activities, capture of xenobiotic biphenyl by native and cryopreserved hepatocytes of human fetal and cadaver livers, destined for clinical application. There were developed the methods of cryopreservation of hepatocytes in the medium with low concentrations of cryoprotectants without reducing their survival rate.

УДК 612.111.7 : 615.387

А.В.Николенко, А.М.Компаниец, В.И.Луговой

КРИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИОЛОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ ТРОМБОЦИТОВ

Исследовались криопротекторные свойства 1,2-пропандиола и алкил-, этокси-производных классического криопротектора глицерина при замораживании тромбоцитов. Из числа исследованных веществ наряду с глицерином выраженными криозащитными свойствами обладают 1,2-пропандиол, 1-монометиловый эфир глицерина и оксиэтилированный глицерин (ОЭГ, $n=5$).

В решении проблемы криоконсервирования тромбоцитов можно выделить два подхода: с одной стороны, — поиск условий, способствующих снижению цитотоксичности и усилению криозащитного действия традиционных

криопротекторов, с другой, — поиск новых криопротекторов, обладающих низкой токсичностью и достаточной криозащитной эффективностью в отношении тромбоцитов. В работе нами использован комплексный подход к поиску криопротекторов, включающий направленный синтез новых веществ посредством химической модификации известных криопротекторов, изучение их физико-химических и криопротекторных свойств, а также характера и особенностей влияния на криобиологический объект [2, 3]. Целью настоящего исследования явилось изучение криопротекторных свойств 1,2-пропандиола и производных классического криопротектора глицерина при замораживании тромбоцитов.

Исследования проводились на тромбоцитах человека, полученных путем дифференциального центрифугирования в пластикатные мешки типа “Гемакон” на консерванте глюцир. В ряду полиолов были исследованы: 1,2-пропандиол (1,2-ПД), глицерин — вещества, получаемые промышленным способом, 1-монометиловый (1-ММЭГ), 1,3-диметиловый (1,3-ДМЭГ), 1,2-диметиловый (1,2-ДМЭГ), 1,2-диэтиловый (1,2-ДЭЭГ), 1,3-диэтиловый (1,3-ДЭЭГ) эфиры глицерина, оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n=5$ (ОЭГ, $n=5$) — вещества, полученные в отделе криопротекторов ИП-КиК НАН Украины группой химиков (руководитель — ст. науч. сотр. Л.А.Ханина). Вещества готовились на плазме *ex tempore* и соединялись с тромбоконцентратом 1:1 в конечной концентрации 2,5, 5 и 7,5%. Время экспозиции составляло 15–60 мин. Замораживание образцов тромбоконцентратов осуществляли в полиэтиленовых ампулах объемом 1,5 мл со скоростью 1, 10, 20 и 30 °С/мин до –70 °С с последующим погружением в жидкий азот. Оттаивание замороженных образцов проводили на водяной бане 37 °С. Функциональную ценность тромбоцитов исследовали после предварительного удаления веществ по следующим показателям: подсчет общего количества клеток в камере Горяева, морфологический контроль в фазово-контрастном микроскопе [6], определение ретрактивной активности [2], АДФ-индуцированной агрегации (фотометрический метод), реакции на гипотонический шок (РГШ) [4]. В исследовании по криоконсервированию тромбоцитов был использован тест, основанный на измерении оптической плотности суспензии тромбоцитов с окрашивающими растворами до замораживания и после оттаивания [5].

При исследовании криопротекторных свойств новых веществ важно изучение их цитотоксичности на этапе экспозиции, что позволяет провести отбор веществ с потенциальными криозащитными свойствами. Результаты исследований представлены в табл.1. Установлено, что из 9 исследуемых соединений наименее выраженное влияние на специфические функции тромбоцитов в диапазоне концентраций 2,5 – 7,5% оказывали 1,2-ПД, глицерин, 1-ММЭГ и ОЭГ ($n=5$). Такие показатели, как общее количество клеток, ретрактивная активность, находились на достаточно высоком уровне (80–98%) относительно исходного, независимо от концентрации этих веществ и времени экспозиции (15–60 мин). В то же время сохранность дискоидной формы, характерной для интактных тромбоцитов, изменения реакции на гипотонический шок и агрегационные свойства тромбоцитов носили концентрационно-зависимый характер. Следует отметить, что именно сохранность дискоидности и степень реакции на гипотонический шок являются самыми информативными показателями *in vitro*, характеризующими морфофункциональную полноценность тромбоцитов. После экспозиции с 2,5%-и растворами глицерина, 1,2-ПД, 1-ММЭГ, ОЭГ ($n=5$) содержание дискоидных форм в образцах не изменялось по сравнению с контролем. С повышением концентрации веществ в клеточной суспензии количество дискоидных форм уменьшалось за счет появления отростчатых и сферических тромбоцитов. Достоверное снижение степени реакции на гипотонический шок, агрегации наблюдалось с увеличением концентраций до 5 и 7,5%. Установлено отчетливое подавление функциональной активно-

сти тромбоцитов растворами, содержащими 1,3-ДМЭГ, особенно способности к реакции на гипотонический шок. Вместе с тем количество дискоидных пластинок после контакта с 2,5%-м раствором 1,3-ДМЭГ не отличалось от контроля. Наиболее выраженное угнетающее действие на специфические функции тромбоцитов оказывали растворы: 1,2-ДМЭГ, 1-МЭЭГ, 1,3-ДЭЭГ и 1,2-ДЭЭГ. Уже после 15 мин экспозиции с этими веществами уменьшалось общее количество тромбоцитов, наблюдалось снижение ретрактивной активности в среднем на 30–50% после экспозиции с 2,5%-й концентрацией растворов, а 5 и 7,5%-е концентрации 1,2-ДМЭГ, 1,2-ДЭЭГ и 7,5%-е концентрации 1-МЭЭГ, 1,3-ДЭЭГ вызывали необратимое подавление данной функции. Одновременно с этим тромбоциты утрачивали способность к АДФ-индуцированной агрегации и реакции на гипотонический шок. После 60 мин экспозиции действие этих веществ усиливалось, что проявлялось в уменьшении общего количества клеток и ретрактивной активности, а также необратимом подавлении агрегации и способности к реакции на гипотонический шок при использовании 2,5%-й концентрации растворов.

Т а б л и ц а 1

Влияние веществ класса полиолов на показатели морфофункциональной активности тромбоцитов (экспозиция 30 мин, 22 °С; $M \pm m$, $n=11$)

Вещества	Концентрация вещества, %	Исследуемые показатели, %				
		Количество	Ретракция	Агрегация, индуктор-АДФ (20 Мм)	РГШ	Содержание дискоидных форм
Контроль	0	100	83±3	71±4	81±3	79±7
1,2-ПД	2,5	98±2	80±2	65±3	75±3	73±3
	5,0	97±3	78±2	62±3	72±4	69±5
	7,5	95±3	75±3	59±4*	69±4	67±4
	7,5	95±3	75±3	59±4*	69±4	67±4
Глицерин	2,5	94±2	78±2	61±5	73±2	70±4
	5,0	92±2	75±4	65±4	61±4*	55±7*
	7,5	86±3*	68±3*	57±4*	47±6*	49±8*
1-ММЭГ	2,5	96±2	76±3	60±5	75±3	72±4
	5,0	95±2	74±4	58±4*	63±2*	64±5
	7,5	83±3*	69±4*	44±5*	57±4*	55±6*
ОЭГ (n=5)	2,5	95±2	78±4	59±5	62±4*	68±5
	5,0	90±4	69±4*	50±4*	50±3*	58±5*
	7,5	87±3*	66±3*	32±4*	33±3*	50±7*
1,3-ДМЭГ	2,5	96±2	67±2*	49±5*	36±3*	70±5
	5,0	93±3	58±3*	36±5*	24±4*	52±6*
	7,5	80±3*	52±3*	22±4*	15±3*	39±8*
1,2-ДМЭГ	2,5	89±2*	42±2*	32±4*	20±3*	32±8*
	5,0	93±3*	0	0	0	0
	7,5	68±3*	0	0	0	0
1-ММЭГ	2,5	87±2*	45±2*	29±4*	15±3*	30±5*
	5,0	80±3*	25±3*	14±3*	12±3*	0
	7,5	75±3*	0	0	0	0
1,3-ДЭЭГ	2,5	90±3*	42±3*	25±3*	20±3*	27±6*
	5,0	86±3*	20±3*	22±5*	10±3*	0
	7,5	80±3*	0	0	0	0
1,2-ДЭЭГ	2,5	83±4*	25±4*	14±5*	10±5*	18±5*
	5,0	75±3*	0	0	0	0
	7,5	63±3*	0	0	0	0

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

Данные, полученные при исследовании цитотоксичности веществ одного ряда с постепенно усложняющейся структурой, свидетельствуют о том, что с увеличением длины и числа алкильных радикалов цитотоксичность веществ возрастает. При этом обнаружена прямая зависимость между цитотоксичностью и гидрофобностью этих соединений, которая определялась по коэффициенту распределения веществ в системе октанол–вода.

При первичном скрининге криопротекторной активности испытуемых соединений (определение общего количества клеток, ретрактивной активности, а также измерение оптической плотности их суспензий с ограждающими растворами до и после замораживания) установлено, что наиболее эффективное криопротекторное действие наряду с 5%-й концентрацией глицерина ока-

зывают 1,2-ПД и 1-ММЭГ в 2,5%-й конечной концентрации при скорости охлаждения 1–10 °С/мин (табл. 2).

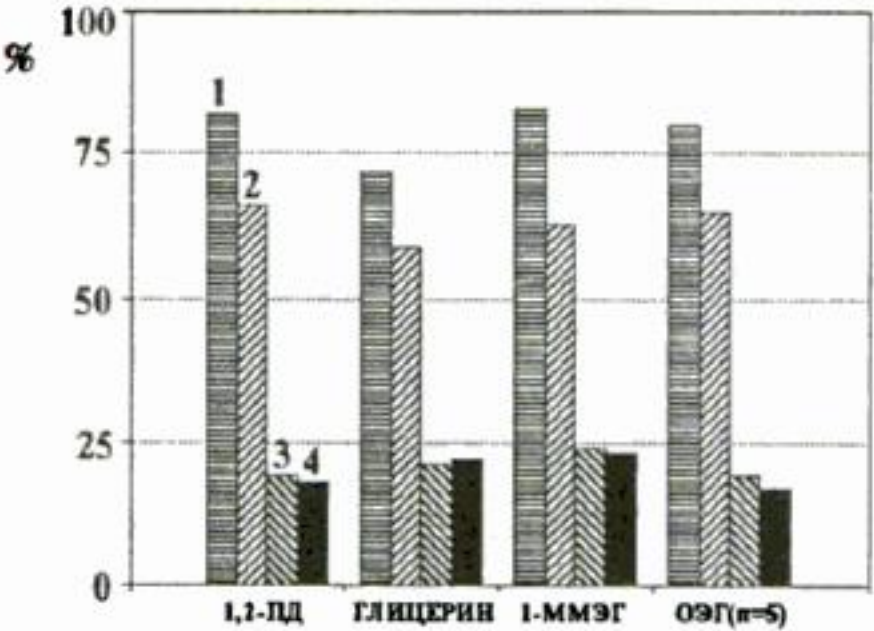
Т а б л и ц а 2

Сохранность тромбоцитов, криоконсервированных под защитой веществ ряда полиолов при различных режимах охлаждения ($M \pm m$; $n=9$)

Вещества	Кон- центра- ция ве- щества, %	Исследуемые показатели, %								
		Количество клеток			Ретракция			Оптическая плотность		
		Скорость охлаждения, °С/мин								
		1	10	20	1	10	20	1	10	20
1,2-ПД	2,5	82±3	80±3	72±2*	66±4	61±3	53±4*	91±5	89±3	76±4*
	5,0	87±4	83±2	73±3	52±5	50±4	48±3	80±3	78±3	75±3
Глицерин	2,5	60±3	65±4	72±2*	39±6	41±3	30±4	78±3	76±4	70±3*
	5,0	72±4	72±3*	76±3	59±3	52±4	48±5*	83±2	81±3	78±3
1-ММЭГ	2,5	83±2	81±2	71±4*	63±4	59±3	47±4*	85±3	80±3	71±2*
	5,0	85±4	80±3	68±3	51±5	49±4	41±5	79±4	76±5	70±3
1,3-ДМЭГ	2,5	80±4	76±2	65±4*	27±4	25±3	17±2*	76±3	73±4	61±2*
	5,0	69±3	73±4	80±3	15±3	10±2	0	73±2	70±3	66±4
1,2-ДМЭГ	2,5	70±3	68±4	60±4*	20±4	24±3	30±5	72±3	70±5	58±5*
	5,0	79±2	75±3	67±3*	0	0	0	70±2	67±4	58±4*
1-МЭЭГ	2,5	69±3	66±2	59±4*	20±3	23±5	0	73±3	71±4	63±5
	5,0	76±4	70±3	65±5	0	0	0	70±2	66±3	60±3*
1,3-ДЭЭГ	2,5	71±2	67±3	60±3*	0	0	0	64±4	60±6	55±4
	5,0	78±3	73±2	66±2*	0	0	0	61±5	59±6	53±3
1,2-ДЭЭГ	2,5	63±4	62±3	52±4*	0	0	0	62±4	60±4	52±6
	5,0	70±3	68±2	57±3*	0	0	0	58±5	57±6	50±5
ОЭГ (n=5)	2,5	76±3	81±4	71±4	54±4	65±4*	50±3	81±3	78±4	70±3*
	5,0	89±4	80±3	69±3	51±5	49±4	33±4	82±3	77±5	75±4

Примечание. * — $p < 0,05$, достоверность различий по сравнению со скоростью замораживания 1 °С/мин; — $p < 0,05$, достоверность различий между показателями для 2,5 и 5%-х концентраций веществ.

При использовании 5%-х концентраций 1,2-ПД, 1-ММЭГ, а также 2,5%-й концентрации глицерина показатели сохранности тромбоцитов снижаются. При замораживании тромбоконцентратов под защитой 1,3-ДМЭГ, 1,2-ДМЭГ, 1-МЭЭГ, 1,3-ДЭЭГ, 1,2-ДЭЭГ со скоростью 1 и 10 °С/мин общее количество клеток оставалось в пределах 65–80%. Однако низкие показатели оптической плотности, ретракции плазменного сгустка, а при использовании 1,3-ДЭЭГ и 1,2-ДЭЭГ – полная потеря ретрактивной активности, не позволяют говорить о проявлении данными соединениями криопротекторных свойств уже на этапе скрининга. Для определения эффективности криоконсервирования тромбоцитов с испытуемыми соединениями было проведено исследование сохранности основных специфических функций кровяных пластинок. После замораживания тромбоцитов со скоростью 1 и 10 °С/мин под защитой 5%-й концентрации глицерина определялось в среднем 70% тромбоцитов, а под защитой 2,5%-й концентрации 1,2-ПД и 1-ММЭГ – в среднем 80%, при этом сохранялась крайне лабильная, высокоспецифическая функция тромбоцитов – агрегационная активность. Достоверных различий в уровне АДФ-индуцированной агрегации при использовании глицерина, 1,2-ПД и 1-ММЭГ не обнаружено, и они соответствовали для глицерина — $21 \pm 4\%$, для 1,2-ПД — $18 \pm 3\%$ и для 1-ММЭГ — $24 \pm 3\%$ относительно исходного уровня. При замораживании тромбоцитов с глицерином, 1,2-ПД и 1-ММЭГ со скоростью 1 и 10 °С/мин сохранялась реакция на ги-



Показатели функциональной полноценности тромбоцитов после замораживания под защитой полиолов: 1 – количество клеток, 2 – ретракция, 3 – агрегация, 4 – реакция на гипотонический шок

потонический шок; наиболее высокие результаты получены после криоконсервирования с 5%-м раствором глицерина и 2,5%-ми растворами 1,2-ПД и 1-ММЭГ и составляли 22 ± 3 , 19 ± 4 , $23 \pm 3\%$ соответственно (рис.). С увеличением скорости охлаждения показатели реакции на гипотонический шок снижались, а при охлаждении со скоростью $30^\circ\text{C}/\text{мин}$ под защитой 1,2-ПД и 1-ММЭГ тромбоциты полностью утрачивали способность к реакции на гипотонический шок.

Поскольку такие исследования на тромбоцитах проводились впервые, нами была изучена функциональная полноценность тромбоцитов и после замораживания с растворами 1,3-, 1,2-ДМЭГ, 1-МЭЭГ и 1,3-, 1,2-ДЭЭГ. Оказалось, что независимо от скорости охлаждения тромбоциты необратимо утрачивали свои специфические функции: агрегацию, реакцию на гипотонический шок. Морфологически преобладали сферы с шиповидными отростками. Полученные данные подтверждают отсутствие криозащитных свойств в отношении тромбоцитов у перечисленных выше веществ и позволяют рекомендовать при проведении подобного рода исследований использовать только первичный скрининг с целью упрощения и сокращения времени исследования. Отдельно следует остановиться на оксиэтилированном глицерине — ОЭГ ($n=5$), криопротекторе экзоцеллюлярного механизма действия. Установлено, что криоконсервирование тромбоконцентратов с ограждающими растворами, содержащими 5 и 10%-е концентрации ОЭГ ($n=5$), позволяет сохранять от 70 до 80% тромбоцитов. Наиболее высокие показатели ретракции, агрегации, реакции на гипотонический шок были получены при охлаждении тромбоконцентратов под защитой 5%-го раствора ОЭГ ($n=5$) со скоростью охлаждения $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ и составляли: 65 ± 3 , 19 ± 4 и $17 \pm 4\%$ соответственно.

Таким образом, проведенные исследования позволили определить ряд новых веществ, перспективных для использования в качестве криопротекторов при замораживании тромбоцитов: 1,2-пропандиол, 1-монометиловый эфир глицерина, оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n=5$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Компаниец А.М., Новиков А.Н., Линник Т.П. и др. Криопротекторные свойства соединений ряда амидов при криоконсервировании тромбоцитов // Рук. деп. в ВИНТИ 26.03.85 N 2111-85.
2. Скопина С.Б., Виноград-Финкель Ф.Р., Полушина Т.В., Суздалева В.В. Изыскание эффективных ограждающих растворов для криоконсервирования тромбоцитов // Пробл. гематол. и перелив. крови. — 1975. — 20, № 9. — С. 17–21.
3. Шраго М.И., Новиков А.Н., Ханина Л.А. и др. Криопротекторы и криоконсерванты (основные направления исследований) // Криобиология. — 1985. — № 3. — С. 8–13.
4. Handin R.J., Fortier E.L., Valeri C.R. Platelet response to hypotonic stress after storage at 4 or 22°C // Transfusion. — 1970. — 10, № 3. — P. 305–309.
5. Odink J., Sprokholt R. Platelet preservation. 1. The use of decrease in light absorbance as a scrining method in cryopreservation studies jn human platele // Cryobiology. — 1977. — 14, № 6. P. 519–528.
6. Zucker M.B., Borelly J. Reversible alteration in platelet morphology produced by anticoagulants and by cold // Blood. — 1954. — 9, № 9. — P. 602–608.

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

Поступила 17.05.94

О.В.НІКОЛЕНКО, А.М.КОМПАНІЄЦЬ, В.Й.ЛУГОВИЙ

КРІОПРОТЕКТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОЛІОЛІВ ТА ЇХ ПОХІДНИХ ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ ТРОМБОЦИТІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчались криопротекторні властивості 1,2-пропандіолу і алкіл-, етоксипохідних гліцерину при заморожуванні тромбоцитів. Шз усіх досліджених речовин, окрім гліцерину, найбільш значними криозахисними властивостями відзначались 1,2-пропандіол, 1-монометиловий ефір гліцерину та оксиетильований гліцерин (ОЕГ, $n=5$).

A.V.NIKOLENKO, A.M.KOMPANIETS, V.I.LOUGOVOY

CRYOPROTECTIVE PROPERTIES OF POLYOLS AND THEIR DERIVATIVES DURING FREEZING OF PLATELETS

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

Cryoprotective properties of 1.2-propanediol and alkyl-, etoxy-derivatives of a classical cryoprotectant glycerol were studied during freezing of platelets. It was found that together with glycerol the highest cryoprotective ability was characteristic of 1.2-propanediol, 1-monomethyl ether of glycerol and oxyethylated glycerol (OEG, n=5) among the studied substances.

КРИОМЕДИЦИНА

УДК 57.043:615.832.9:591.112.2:57.084.1

С.М.Романец

ИЗУЧЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЕРДЦА КРЫС ПРИ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

Изучено влияние изменения температуры тела крыс при краниocereбральной гипотермии (КЦГ) и последующем отогреве на длительность процессов проведения и распространения возбуждения в миокарде, время деполяризации и реполяризации миоцитов, а также длительность электрической систолы и диастолы миокарда. Определены закономерности изменения исследуемых показателей в динамике охлаждения до ректальной температуры 28 °С и отогрева. Установлено, что длительность электрофизиологических показателей сердца крыс при охлаждении увеличивается в неодинаковой степени, а при отогреве уменьшается, не восстанавливаясь полностью даже при 37 °С.

В настоящее время КЦГ широко применяют в медицинской практике. Этот метод оказался эффективным при лечении нервно-психических расстройств [5], хронического алкоголизма [2], бесплодия [3], острых отравлений [1] и др. На данный момент изучены процессы регуляции сердечной деятельности при таком охлаждении [4]. Ранее было показано [6], что при охлаждении изолированного сердца собаки от 35 до 25 °С нарушается нервная, особенно симпатическая регуляция, проявляется выраженное угнетение хронотропной саморегуляции сократительности миокарда. В то же время такое гипотермическое воздействие в наименьшей степени сказывается на скорости проведения возбуждения по предсердиям. Однако подробных исследований особенностей электрофизиологических показателей миокарда крыс в динамике КЦГ и отогрева в доступной нам литературе недостаточно. Поэтому целью нашей работы являлось изучение температурной зависимости изменений комплекса электрофизиологических показателей сердца крыс при КЦГ с последующим отогревом.

Исследования проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 200–300 г. КЦГ осуществляли охлаждением наружных покровов головы хладоносителем (лед) с непосредственным контактом до ректальной температуры 28 °С. После достижения требуемой температуры холодное воздействие прекращали и отогревали животных при температуре окружающего воздуха 30–35 °С. В ходе эксперимента измеряли температуру тела крысы в прямой кишке при помощи медь-константановой термопары. Для блокирования рефлекторных терморегуляторных реакций организма животных наркотизировали смесью растворов тиопентала натрия (Завод медпрепаратов, Киев, Украина) и оксибутирата натрия (Химфармзавод № 6, Рига, Латвия) из расчета 30 и 100 мг/кг массы крысы соответственно. Электрокардиограмму (ЭКГ) регистрировали на ЭК1К-01 во II-м стандартном отведении. ЭКГ снимали в ходе охлаждения и отогрева животного через каждый градус изменения температуры тела. Анализируя кривые ЭКГ, рассчитывали длительность интервалов: от

начала волны Р до начала зубца Q (время проведения возбуждения от предсердия до желудочков), от начала сегмента Р до его окончания (время распространения возбуждения по предсердию, а также время деполяризации предсердия), от начала зубца Q и до конца волны S (время деполяризации желудочков), от начала зубца Q до конца волны Т (длительность электрической систолы желудочков), от начала волны Т до ее окончания (время реполяризации миоцитов желудочков) [7, 8], от начала зубца Q до начала волны Р следующего цикла (электрическая диастола предсердий), от конца волны Т до начала зубца Q следующего цикла (электрическая диастола желудочков), от конца волны Т до начала волны Р следующего цикла (время общей диастолы миокарда) и интервал RR (длительность сердечного цикла) [7, 8].

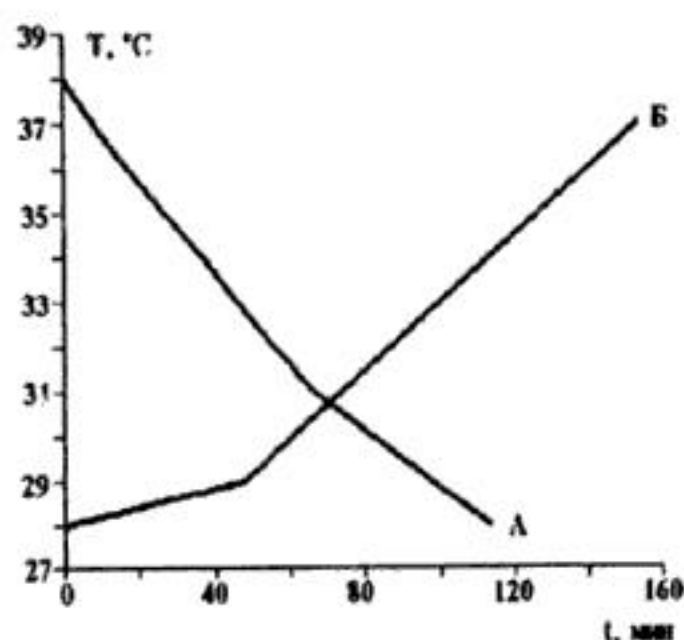


Рис. 1. Динамика изменения температуры тела крысы во время охлаждения (А) и отогрева (Б)



Рис. 2. Электрокардиограммы крыс при охлаждении (А) и отогреве (Б). Температура тела, °C: 1 – 37, 2 – 36, 3 – 35, 4 – 34, 5 – 33, 6 – 32, 7 – 31, 8 – 30, 9 – 29, 10 – 28

На рис. 1 представлена динамика снижения температуры тела животного во время охлаждения и отогрева. Как видно из графика, процесс охлаждения протекал равномерно до 31 °C со скоростью 0,09 °C/мин и далее со скоростью 0,06 °C/мин до 28 °C. Отогрев животных протекал двухэтапно. С 28 до 29 °C животное отогревалось медленно со скоростью 0,02 °C в мин. После этого отогрев протекал равномерно и его скорость увеличилась до 0,08 °C в мин.

На рис. 2 представлены ЭКГ, полученные у животных до начала гипотермического воздействия, а также в процессе охлаждения и отогрева. Видны значительные изменения в электрофизиологической картине сердечной мышцы крыс при КЦГ и отогреве по сравнению с нормотермией. Результаты обработки ЭКГ показали, что по мере охлаждения животных в 1,7 раза снижается частота сердечных сокращений (ЧСС) (рис. 3). Как видно из рис. 4, такое снижение ритма связано главным образом с увеличением длительности сердечного цикла, в первую очередь диастолы миокарда (ТР). При этом время общей диастолы миокарда крыс (ТР) практически не меняется до достижения ректальной температуры 31 °C, а затем резко увеличивается в 2,1 раза. Следует отметить, что и другие электрофизиологические показатели сердца животных (время распространения возбуждения, длительность процессов деполяризации и реполяризации предсердий и желудочков) увеличиваются в интервале температур от 37 до 28 °C (рис. 4, 5). В частности, в 1,7 раза увеличивается время электрической диастолы предсердий (QR), а динамика его изменения аналогична динамике изменения времени общей диастолы миокарда (ТР) (рис. 4). Показано, что время проведения возбуждения от предсердий до желудочков (PQ), длительность электрической систолы (QT) и диастолы (TQ) желудочков и время реполяризации желудочков (T) увеличиваются в 1,5 раза (рис. 4, 5). В то же время длительность деполяризации желудочков (QS) увеличивается незначительно (рис. 5), а время распространения возбуждения по предсердиям не изменяется на протяжении всего процесса охлаждения.

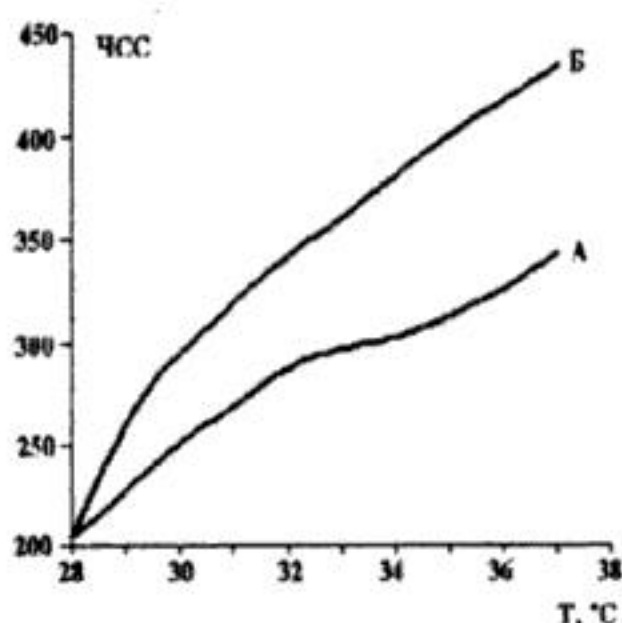


Рис. 3. Динамика изменения ЧСС крыс во время охлаждения (А) и отогрева (Б)

По мере отогрева животных ЧСС постепенно увеличивалась, опережая норму. При полном отогреве эта величина превосходит ЧСС неохлажденных крыс в 1,4 раза (рис. 3). Такое изменение сердечного ритма связано с уменьшением длительности сердечного цикла в 1,4 раза. Анализируя ЭКГ, следует отметить ряд закономерностей. Все временные интервалы сердечного цикла при отогреве равномерно уменьшаются, кроме времени распространения возбуждения по предсердию, которое остается неизменным. К концу отогрева значения этих параметров не возвращаются к исходному уровню. Исключением является время деполяризации желудочков, величина которого к концу отогрева восстанавливается. Степень уменьшения параметров сердечного цикла при отогреве неодинакова для разных интервалов и наиболее выражена для времени общей диастолы миокарда (ТР) (рис. 4, 5).

На основании полученных результатов можно предположить разный характер изменения мембранных процессов в клетках сердца. Рис. 5 свидетельствует о постепенном увеличении длительности потенциала действия при охлаждении, а рис. 4 — об относительной стабильности потенциала покоя вплоть до 30–32 °C, после чего он резко нарушается. Можно предположить также изменение каких-то физиологических механизмов регуляции сокращения сердца. Полученные результаты позволяют сделать заключение о закономерностях изменений систолических и диастолических параметров миокарда крыс по ходу КЦГ и отогрева. Установлено, что длительность электрофизиологических показателей сердца крыс при охлаждении увеличивается в неодинаковой степени, а при отогреве уменьшается, но не восстанавливается полностью даже при 37 °C. Систолические характеристики меняются монотонно, а диастолические — незначительно до 30–32 °C, затем происходит резкое изменение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабийчук Г.А., Аркатов В.А., Арцыбушев Ю.Н., Гнатив В.В. Гипотермия в лечении острых отравлений. — Киев: Наук. думка, 1990. — 128 с.
2. Бабийчук Г.А., Белостоцкий А.В. Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы при интенсивной терапии алкогольного абстинентного синдрома и алкогольного делирия с использованием кранио-церебральной гипотермии // Лечебная гипотермия. — Харьков: Б. и., 1992. — С. 9–19.

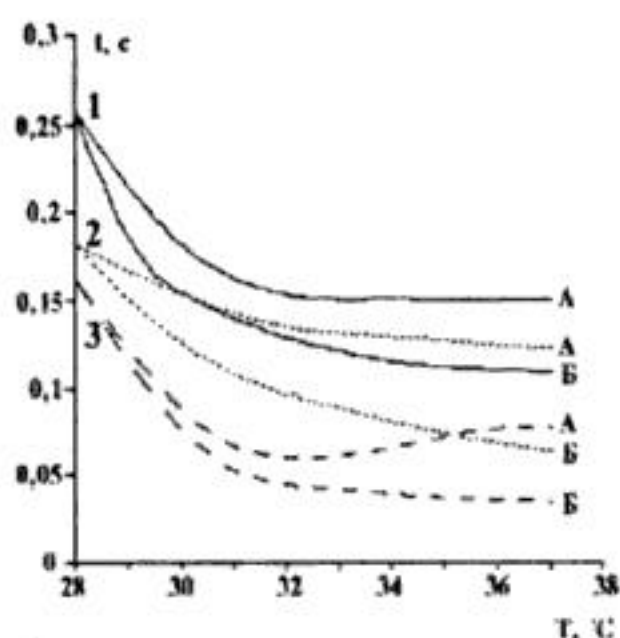


Рис. 4. Динамика диастолических характеристик сердечного цикла крыс при охлаждении (А) и отогреве (Б). Время: 1 — электрической диастолы предсердий, 2 — электрической диастолы желудочков, 3 — общей диастолы миокарда

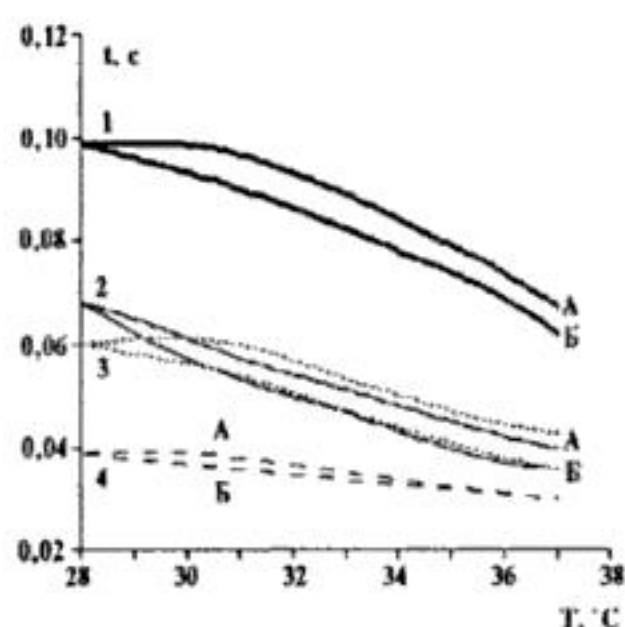


Рис. 5. Динамика систолических характеристик сердца крыс при охлаждении (А) и отогреве (Б). Время: 1 — электрической систолы желудочков, 2 — проведения возбуждения от предсердия до желудочков, 3 — реполяризации миоцитов желудочков, 4 — деполяризация желудочков

3. Грищенко В.И., Паращук Ю.С., Дахно Ф.В., Юрченко Г.Г. Кробиология и проблема бесплодия. – Киев: Наук. думка, 1990. – 135 с.
4. Ломакин И.И., Ломако В.В. Особенности регуляции сердечного ритма при кранио-церебральной гипотермии в эксперименте // Патологические аспекты действия холода на организм. – Харьков: Б. и., 1989. – С. 83–89.
5. Ломакин И.И., Ломако В.В., Шило А.В. Нетрадиционные подходы к лечению депрессивного синдрома // Лечебная гипотермия – Харьков: Б. и., 1992. – С. 110–120.
6. Покровский В.М., Шейх-Заде Ю.Р., Воверейдт В.В. Сердце при гипотермии. – Л.: Наука, 1984. – 144 с.
7. Рашид Р. Динамика сердечно-сосудистой системы. – М.: Медицина, 1981. – 600 с.
8. Цукерман Б.М., Титомир Л.И. Электрокардиография // Руководство по физиологии. – Л.: Наука, 1980. – С. 288–317.

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

Поступила 29.08.94

С.М.РОМАНЕЦЬ

ВИВЧЕННЯ ТЕМПЕРАТУРНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ ЗМІН ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СЕРЦЯ ЩУРІВ ПІД ЧАС КРАНІОЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ГІПОТЕРМІЇ

Інститут проблем кробиології і криомедицини НАН України, м. Харків

Вивчено вплив зміни температури тіла щурів під час краниоцеребральної гіпотермії та подальшого відігрівання на тривалість процесів проведення та розповсюдження збудження у міокарді, час деполяризації та реполяризації міоцитів, а також тривалість електричної систоли і діастоли міокарду щурів. Вивчені закономірності зміни показників в динаміці охолодження до ректальної температури 28 °С та відігрівання. Встановлено, що тривалість електрофізіологічних показників серця щурів під час охолодження збільшується неоднаково, а під час відігрівання зменшується, не відновлюючись повністю навіть при 37 °С.

S.M.ROMANETS

STUDY OF TEMPERATURE DEPENDENCE OF CHANGES IN ELECTROPHYSIOLOGICAL INDICES OF RAT HEART DURING CRANIOCEREBRAL HYPOTHERMIA

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

The effects of the rat body temperature changing during craniocerebral hypothermia (CCH) and subsequent thawing on the duration of the processes of behavior and propagation of excitation in the myocardium, time of depolarization and repolarization of myocytes, and the duration of the electric systole and diastole of the myocardium were studied. The authors determined the rules of changes in the indices under study in the time course of cooling down to the rectal temperature of 28 °C and thawing. It was found that the duration of the electrophysiological indices of the rat heart during cooling increases differently, while it is reduced during thawing, though it is not completely restored even at 37 °C.

УДК 616-001/002-089.583.29:576.097.01

В.А.Чипиженко

ВЛИЯНИЕ МЕСТНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ И ПЛОТНОСТЬ β -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ, А ТАКЖЕ СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ КОЖИ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ КОНТАКТНЫМ ДЕРМАТИТОМ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Изучалось влияние местной гипотермии (охлаждение пораженной конечности в воздушной камере гипотерма до температуры поверхности кожи 22–24 °С в течение 1 ч) на кинетические параметры связывания и плотность β -адренорецепторов, а также уровень циклических нуклеотидов кожи с аллергическим контактным дерматитом на 2,4-динитрохлорбензол. Рассматривается возможность применения местной гипотермии для наружного лечения аллергических дерматозов.

В механизме аллергических дерматозов важное значение отводится нарушениям вегетативной нервной системы, которая активно участвует в стаби-

лизации структуры клеток и тканей, в регуляции их функциональной деятельности через внутриклеточные регуляторные механизмы. Так, активация регуляторной цепи: симпатическая нервная система — местное освобождение катехоламинов — стимуляция β -адренорецепторов (АР) и сопряженной с ними аденилатциклазы — накопление внутриклеточного циклического аденозин-3',5'-монофосфата — приводит к уменьшению освобождения клетками кожи и крови гистамина, серотонина, кининов, лизосомальных ферментов, участвующих в развитии аллергического воспаления [2, 4, 7]. По-видимому, воздействуя на отдельные звенья описанной регуляторной цепи, например на АР, можно влиять на течение кожных аллергических реакций. В то же время имеются отдельные сообщения о зависимости функционального состояния АР от температуры [1, 9, 11, 13]. Учитывая вышесказанное, мы поставили цель изучить влияние местной гипотермии на кинетические параметры связывания и плотность β -АР, а также содержание циклического аденозин-3',5'-монофосфата (цАМФ) и циклического гуанозин-3',5'-монофосфата (цГМФ) в коже морских свинок с аллергическим контактным дерматитом (АКД).

У 24 морских свинок-самцов белой масти массой 350–400 г воспроизводили АКД на 2,4-динитрохлорбензол (ДНХБ). Сенсибилизация проводилась однократным нанесением на выбритый участок кожи бедра 0,1 мл 5%-го раствора ДНХБ с одновременным нанесением дополнительно 0,02 мл 1%-го раствора ДНХБ на 7 других выбритых участков кожи спины. На 14-е сут от начала опыта на кожу бедра наносилась разрешающая доза ДНХБ — 0,02 мл 0,1%-го раствора, после чего на следующий день в месте аппликации развивался АКД [5]. У 12 животных биоптаты кожи для исследования были взяты из очагов поражения сразу, а 12 животным было проведено локальное охлаждение задних конечностей (место локализации АКД) в воздушной камере гипотерма до температуры поверхности кожи 22–24 °С (контроль электротермометром) в течение 1 ч, после чего пораженная кожа бралась для исследования. Кожа 10 интактных морских свинок послужила контролем. Для изучения связывания АР с лигандами использовали препараты плазматических мембран клеток кожи, которые получали и очищали методом [6].

Связывание β -АР проводили ^3H -дегидроальprenололом 0,6–6 нМ в присутствии 10 мМ MgCl_2 . Условие кинетического равновесия достигалось за 20 мин при температуре 25 °С. Разделение связанного и свободного лиганда проводили методом вакуумного фильтрования через стекловолокнистые фильтры YF/c "Whatman". Величину специфического связывания определяли по разнице между уровнем связывания в отсутствие и присутствии немеченного лиганда. Все условия связывания β -АР взяты из работы [12]. Расчет кинетических параметров связывания и содержания АР проводили на ЭВМ на основе анализа кривых связывания в координатах Скэтчарда. Кинетические параметры связывания — K_d (константа диссоциации комплекса АР-лиганд) выражалась в нмоль, а V_{max} (плотность АР) — в пмоль/мг белка. Параллельно в тех же образцах кожи исследовали внутриклеточное содержание цАМФ и цГМФ. Последнее определялось радиоиммунологическим методом с помощью стандартных наборов соответственно TRK-432 и TRK-500 ("Amersham", Англия) и выражалось в пмоль/г сырой ткани. Результаты исследования влияния местной гипотермии на K_d и V_{max} β -адренорецепторов кожи морских свинок приведены в табл. 1.

Как следует из табл. 1, при развитии АКД имело место резкое увеличение K_d ($P < 0,001$), в то время как рост V_{max} был статистически недостоверным ($P > 0,1$). Сеанс локальной гипотермии вызывал резкое падение K_d ниже контроля ($P < 0,001$) и незначительное снижение V_{max} , статистически недостоверное по сравнению с контролем ($P > 0,5$) и достоверное по сравнению с соответствующим показателем до гипотермии ($P < 0,05$). Однако при исследовании любых рецепторов методом радиолигандного связывания желательно выявить

Т а б л и ц а 1

Kd комплекса β -АР-лиганд и $V_{\max}$ β -АР кожи морских свинок

Статистические показатели	Интактная кожа (контроль)	Кожа с АКД до гипотермии	Кожа с АКД после гипотермии
Kd, нмоль			
n	10	12	12
M $\pm$ m	2,21 $\pm$ 0,2	6,17 $\pm$ 0,64	1,22 $\pm$ 0,14
P	—	< 0,001	< 0,001
$V_{\max}$, пмоль/мг			
n	10	12	12
M $\pm$ m	0,094 $\pm$ 0,015	0,127 $\pm$ 0,013	0,075 $\pm$ 0,017
P	—	> 0,1	> 0,5

точного физиологического ответа [3]. О физиологической активности агонистов β -АР можно судить по уровню внутриклеточного цАМФ, так как в настоящее время считается доказанным факт тесного сопряжения между β_1 - и β_2 -АР и аденилатциклазой — ферментом, ответственным за синтез цАМФ [3, 8, 10]. Учитывая вышеизложенное, мы сочли целесообразным в тех же образцах кожи морских свинок определить внутриклеточное содержание цАМФ и цГМФ (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Содержание цАМФ и цГМФ в коже морских свинок в пмоль/г сырой ткани

Статистические показатели	Интактная кожа (контроль)	Кожа с АКД до гипотермии	Кожа с АКД после гипотермии
цАМФ			
n	10	12	12
M $\pm$ m	229,0 $\pm$ 29,2	54,0 $\pm$ 9,0	166,0 $\pm$ 22,6
P	—	< 0,001	< 0,01
цГМФ			
n	10	12	12
M $\pm$ m	35,0 $\pm$ 4,73	41,0 $\pm$ 7,23	13,9 $\pm$ 3,54
P	—	> 0,2	< 0,001

достигая, однако, границ нормы ($P < 0,01$). В то же время уровень цГМФ резко снижался ниже нормы ($P < 0,001$). Еще более показательной была динамика соотношения цАМФ/цГМФ. В интактной коже оно составило в среднем 6,5, значительно уменьшалось при АКД до 1,3 и резко возрастало выше нормы до 11,9 после проведенного сеанса гипотермии.

При сравнении динамики Kd комплекса β -АР-лиганд с содержанием цАМФ в коже прослеживалась довольно четкая обратная зависимость между первым и последующими двумя показателями. Так, при развитии АКД увеличение Kd в среднем в 2,8 раза сочеталось с одновременным уменьшением уровня цАМФ в 4,2 раза и уменьшением соотношения цАМФ/цГМФ в 5 раз. После гипотермии уменьшение Kd в 5,1 раза от исходного сопровождалось одновременным увеличением содержания цАМФ в 3,1 раза, а соотношения цАМФ/цГМФ в 9,1 раза от исходного.

Таким образом, выявленное нами значительное нарушение функциональной активности β -АР и внутриклеточного содержания циклических нуклеотидов в пораженной коже позволяет считать, что указанные нарушения играют патогенетическую роль при АКД. Локальная гипотермия кожи с АКД, с одной стороны, резко повышает сниженный аффинитет β -АР к соответствующему лиганду, с другой стороны, приводит к незначительному снижению плотности этого типа рецепторов. В итоге можно ожидать повышения эффекта β -адренергической стимуляции, что подтверждается ростом внутриклеточного содержания цАМФ, и торможения либерации ряда медиаторов аллергического воспаления и лизосомальных ферментов.

наличие корреляции между связыванием лиганда и выраженностью его физиологической активности, что делается для исключения так называемых “молчащих рецепторов”. Последние могут связывать лиганд неспецифично или же специфично, но не опосредуя реализации кле-

Как видно из табл. 2, с развитием АКД содержание цАМФ в пораженной коже резко уменьшалось ($P < 0,001$), а некоторое увеличение цГМФ было статистически недостоверным ($P > 0,2$). После сеанса гипотермии уровень цАМФ значительно возрастал по сравнению с исходным уровнем ($P < 0,001$), не

Полученные результаты дают возможность предположить, что местная гипотермия кожи, действуя через β -АР и систему циклических нуклеотидов, может модифицировать течение кожных аллергических реакций. Подобное предположение служит теоретическим обоснованием для использования местной гипотермии в наружной терапии больных алергодерматозами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакян О.М., Норавян О.С. К вопросу о трансформации адренергических рецепторов под воздействием температуры // Биол. журн. Армении. – 1978. – 31, № 4. – С. 400–404.
2. Кубанова А.А. Значение нарушений иммунологической реактивности, соотношения уровня циклических нуклеотидов и простагландинов в патогенезе и клинике истинной экземы и их терапевтическая коррекция: Автореф дис....д-ра мед. наук. – М., 1986. – 22 с.
3. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы физиологически активных веществ. – М.: Медицина, 1987. – 400 с.
4. Фролов Е.П. Патогенетические основы алергодерматозов. Кожа. – М.: Медицина, 1982. – С. 272–286.
5. Цветкова Г.М., Персина И.С., Лезвинская Е.М. О некоторых особенностях развития экспериментального аллергического контактного дерматита // Арх. пат. – 1979. – № 5. – С. 30–37.
6. Altire R.J., Douglas J.S., Gillis C.N. Temperature related effects on the binding characteristics of β -adrenergic receptor agonist and antagonist by rabbit lung // Archives of Pharmacol. Springer – Verlag. – 1981. – 316, № 4. Н. 277–287.
7. Lichtenstein L.M. In vitro studies on the biochemical mechanism and pharmacologic control of atopic reactions // Allergy. – 1974. – Amsterdam. – P. 294–305.
8. Michel T., Hoffman B.B., Lefkowitz R.J. Regulation of adenylat cyclase by adrenergic receptors // Biochemical actions of hormony. – New Vork. – 1982. – 20. – P. 43–47.
9. Racz I. A seimembran allapotanak szerepe egyes borbetegsegek patomechanizmusaban // Borgyogyaszati es venerologiai szemle. – 1985. – 61, № 3. – P. 49–53.
10. Ross C.V., Gilman A.G. Biochemical properties of hormone – sensitive adenylat cyclase // Ann. Rev. Biochem. – 1980. – 49. – P. 533–564.
11. Scarpace P.J., Baresi L.A., Morley J.C. Modulation of receptors and adenylate cyclase activity during sucrose feeding, food deprivation and cold exposure // Amer. J. Physiol. – 1987. – 253, № 6. – Pt. 1. – P. 629–635.
12. U'Prichard D.S., Bylund D.B., Snyder S.H. ($\pm$) - [3 H] Epinephrine and (–) - [3 H] dihydroalprenolol binding to β_1 - and β_2 -noradrenergic receptors in brain, heart and lung membranes // J. Biol. Chem. – 1978. – 253, № 14. – P. 5090–5102.
13. Vanhoutte P.M., Flavagan N.A. Effects of temperature on α -adrenoceptors in limb veins: role of receptor reserve // Fed. Proc. – 1986. – 45, № 9. – P. 2347–2354.

Харьковский гос. мед. ун-т

Поступила 05.10.94

В.А.ЧИПИЖЕНКО

ВПЛИВ МІСЦЕВОЇ ГІПОТЕРМІЇ НА КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ ЗВ'ЯЗУВАННЯ І ЩІЛЬНІСТЬ β -АДРЕНОРЕЦЕПТОРІВ, А ТАКОЖ ВМІСТ ЦИКЛІЧНИХ НУКЛЕОТИДІВ ШКІРИ З АЛЕРГІЧНИМ КОНТАКТНИМ ДЕРМАТИТОМ У ЕКСПЕРИМЕНТІ

Державний медичний університет, м.Харків

Вивчався вплив місцевої гіпотермії (охолодження ураженої кінцівки у повітряній камері гіпотерма до температури поверхні шкіри 22–24 °С на протязі 1 г) на кінетичні параметри зв'язування і щільність β -адренорецепторів, а також рівень циклічних нуклеотидів шкіри з алергічним контактним дерматитом на 2,4-динітрохлорбензол (ДНХБ). Розглядається можливість застосування місцевої гіпотермії для зовнішнього лікування алергічних дерматозів.

V.A.CHIPIZHENKO

THE EFFECT OF LOCAL HYPOTHERMIA ON THE KINETIC PARAMETERS OF BINDING AND DENSITY OF β -ADRENORECEPTORS, AND THE CONTENT OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN THE SKIN WITH ALLERGIC CONTACT DERMATITIS IN THE EXPERIMENT

Kharkov Medical Institute

The authors studied the action of local hypothermia (cooling of the injured limb in the air chamber of the hypotherm down to the temperature of 22–24 °C of the skin for 1 hour) on the kinetic parameters of

binding and density of β -adrenoreceptors, and the level of the skin cyclic nucleotides with allergic contact dermatitis on 2,4-dinitrochlorobenzene. They speculate on the possible application of local hypothermia for external application for treating allergic dermatitis.

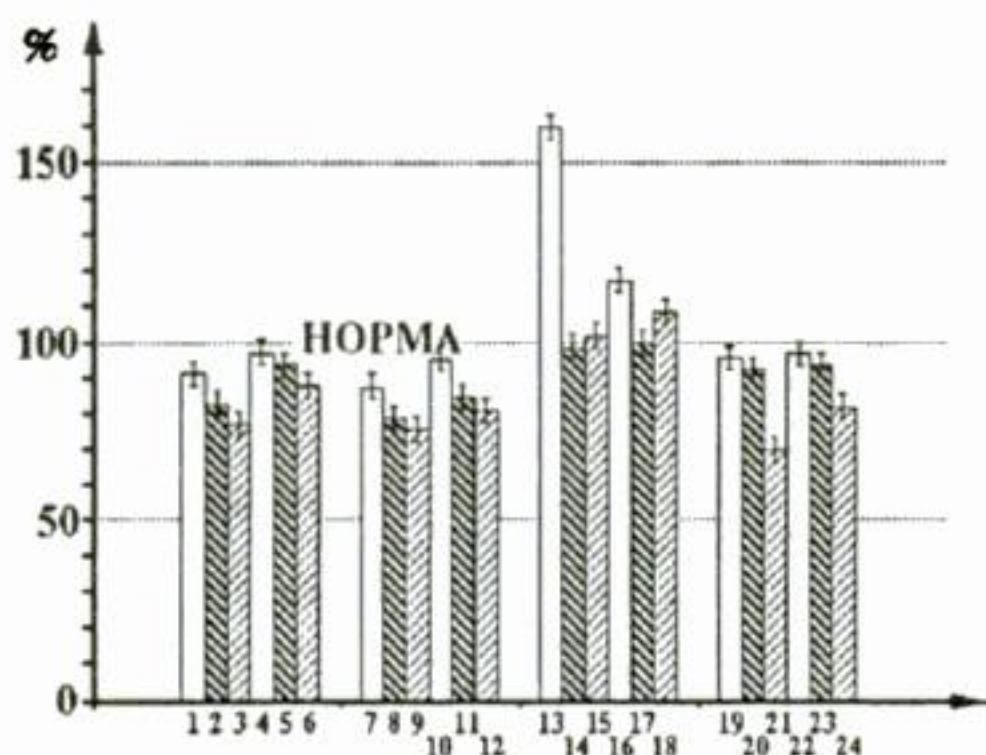
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043:611.36

А.С.Капрельянц, Н.Н.Космина

УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОБЩЕМ ОХЛАЖДЕНИИ

Реакция организма, тканей и органов теплокровных животных и человека на общее охлаждение изучается в течение многих десятилетий [1, 2, 7, 14]. Принципиальная возможность обратимого охлаждения гомойотермных организмов была установлена еще в прошлом веке, но до настоящего времени нет физиологически адекватного способа длительного поддержания этих состояний [3, 7, 8]. Интерес к идее обратимого замедления жизненных процессов не утрачен и до сегодняшнего дня. При прямом действии охлаждения на ткани в организме могут развиваться стрессорные реакции, в которых принимают участие нейровегетативные и гормональные системы, что может приводить к усилению теплопродукции и метаболизма [2, 4, 9, 10, 13]. Однако состояние клеток печени при глубоком общем охлаждении изучено еще недостаточно [6]. Поэтому целью настоящей работы явилось исследование ультраструктурных характеристик гепатоцитов при общем охлаждении крыс до температур 15, 9, 6 °С. Эксперименты были проведены на половозрелых белых крысах-самцах линии Вистар массой 180–220 г. Для охлаждения животных использовался метод Анджуса [14]. Животных помещали в пенал объемом 2 л и затем переносили в холодную камеру с температурой среды 0 °С. Через 2 ч ректальная температура (РТ) составляла у этих животных 15 °С (первая серия экспериментов). При этом животные реагировали на раздражители, но уже не были способны передвигаться. Частота сердечных сокращений (ЧСС) равнялась 60 ударов/мин. После этого крыс обкладывали льдом, и через 20 мин РТ достигала 9 °С (вторая серия экспериментов), дыхание крыс при этом прекращалось, ЧСС почти не изменялась. При дальнейшем охлаждении крыс в течение еще 20 мин РТ достигала 6 °С, ЧСС приближалась к нулю (третья серия экспериментов). Контролем служили животные, находящиеся при комнатной температуре. После забоя животных первой, второй, третьей серий соответственно быстро выделяли печень охлажденных крыс для дальнейших исследований. Проводился гистологический контроль печени по стандартной методике. Для электронно-микроскопического исследования кусочки печени фиксировали в 2%-м растворе глутаральдегида и постфиксировали в 1%-м растворе OsO_4 . Далее образцы обезжировали ацетоном восходящей концентрации и заливали по традиционной методике смесью эпон-аралдита [12]. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме УПТМ-6М, контрастировали насыщенным раствором уранил ацетата и раствором цитрата свинца по Рейнольдсу [16]. Просмотр и фотографирование объектов проводили с по-



Результаты компьютерного морфометрического анализа ультраструктурных параметров гепатоцитов при охлаждении до 15 °С (ось X – 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22), до 9 °С (2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23) и до 6 °С (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24). Значения площади: ядра 1–3; диффузного хроматина 7–9; компактного хроматина 10–12; ЭПР 13–15; митохондрий 19–21. Значения периметра: ядра 4–6; ЭПР 16–18; митохондрий 22–24. По оси Y — значения параметров, %.

мощью электронного микроскопа ЭМВ-100 БР при ускоряющем напряжении 75 кВ. Морфометрический анализ органоидов клетки проводился при помощи компьютерной системы МОРФО-ТУЛС, разработанной проф. А.С.Капрельянцем и А.Н.Рейлян (ИПККиК НАН Украины). Для ввода изображений использовался дигитайзер К 6405 и ПЭВМ СМ 1910 фирмы ROBOTRON. Пакет прикладных программ системы МОРФО-ТУЛС обеспечивал расчет морфометрических характеристик, их статистическую обработку и представление результатов в цифровой и графической формах. В результате исследования образцов первой серии на микроскопическом уровне была отмечена обычная цитоархитектоника клеток печени. Электронно-микроскопический анализ показал, что качественно ультраструктура гепатоцитов имеет обычный вид и характеризуется наличием митохондрий округлой формы и различных размеров. Зернистая и гладкая эндоплазматическая сеть представлена в

виде цистерн с локальными расширениями. Ядра гепатоцитов имеют округлую форму с ровным контуром. Мелкодисперсный хроматин рассеян по всей нуклеоплазме, а конденсированный хроматин обнаруживается в виде небольших глыбок вдоль ядерной мембраны. Глобулярно-фибрилярная структура ядрышек не изменена. Анализ морфометрических показателей внутриклеточных структур гепатоцитов позволил установить в данной серии экспериментов некоторое уменьшение площади ядер, а также диффузного и компактного хроматина (рисунок). Отмечается также тенденция к уменьшению площади митохондрий и эндоплазматической сети. Во второй серии экспериментов при электронно-микроскопическом исследовании обнаружено просветление митохондриального матрикса, который имеет мелкогранулярную структуру. Ядра округлой или эллипсоидной формы уменьшены в размере. Канальцы эндоплазматической сети близки к норме, изредка наблюдается расширение канальцев, находящихся вблизи митохондрий. Местами отмечена нерегулярность расположения рибосом на мембранах эндоплазматической сети. Капли жира диффузно располагались по всей клетке. Морфометрические показатели при данном воздействии свидетельствуют о дальнейшем уменьшении площади и периметра ядер, площади компактного и диффузного хроматина, а также уменьшении площадей и параметров эндоплазматического ретикулула и липидов. В третьей серии экспериментов исследования ультраструктуры свидетельствуют о наличии более выраженных изменений органоидов гепатоцитов крыс. Компактный хроматин скапливался преимущественно на внутренней поверхности ядерной мембраны. Размер ядер визуально уменьшен. Митохондрии характеризовались выраженным просветлением матрикса и разрушением крист. Липидные включения в цитоплазме гепатоцитов обнаруживаются в незначительном количестве. Данные морфометрии указывают на дальнейшее уменьшение площади и периметра ядра, эндоплазматической сети, компактного хроматина, липидов. Таким образом, проведенное исследование позволяет качественно и количественно оценить структурные перестройки органоидов гепатоцитов при общем охлаждении различной степени. Результаты визуального анализа трансмиссионной электронной микроскопии дополняются и согласуются с результатами морфометрического исследования. Органоиды гепатоцитов на различных этапах глубокого охлаждения характеризуются уменьшением площади и периметра ядра, а также уменьшением площади диффузного хроматина при переходе РТ от 15 к 9 °С. Эти значения несколько снижаются при переходе РТ от 9 к 6 °С. В то же время реакция компактного хроматина несколько иная. При РТ 15 и 9 °С различия минимальны, но при снижении до 6 °С наблюдается резкое его увеличение. Реакция митохондрий на глубокое охлаждение выражается в просветлении матрикса этих органоидов. При этом наиболее выраженные изменения обнаружены при охлаждении до 6 °С. При охлаждении животных до РТ 15 и 9 °С также были обнаружены изменения тонкой структуры этих органоидов, что может свидетельствовать о начальном этапе дезинтеграции клеточных структур и функциональном расстройстве клетки, а также об усилении процесса разобщения окислительного фосфорилирования [5, 11, 13, 15]. Для эндоплазматической сети характерно резкое уменьшение площади и периметра при переходе РТ от 15 к 9 °С и незначительное отличие между РТ 9 и 6 °С. Изменение липидов характеризуется увеличением их площади при РТ 6 °С, и почти не обнаруживаются отличия морфометрических параметров липидов при РТ 15 и 9 °С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бернштейн В.А. Обмен углеводов и его регуляция при гипотермии // Усп. физиол. наук. – 1973. – № 4. – С. 142–143.
2. Вайнер Э.Н. Функциональная дезинтеграция организма в условиях переохлаждения // Конф. "Адаптация к экстремальным условиям": Тез. докл., Сыктывкар: Б. и., 1982. – 4. – С. 14–15.
3. Гичев Ю.П. Роль печени в стрессовых реакциях организма // Усп. физиол. наук. – 1980. – 21, № 1. – С. 23–33.
4. Жирнова А.А., Широкова Н.Н. Изменения в печени белых крыс под влиянием низкой температуры // Арх. анат., эмбриол. и гистол. – 1983. – LXXXIV, № 2. – С. 65–68.
5. Капрельянц А.С., Марченко Л.Н., Мигшунова Р.К., Космина Н.Н. Клеточный и тканевой аспекты механизма криодеструкции печени // II Междунар. конф. "Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины": Материалы конф., Харьков: Б. и., 1992. – С. 80.
6. Пушкарь Н.С., Капрельянц А.С., Панков Е.Я. Ультраструктура клетки при низких температурах. – Киев: Наук. думка. – 1978. – 180 с.
7. Майстрах Е.В. Приостановленная жизнь. – М.: Знание. – 1971. – С. 3–5, 36–37.
8. Малыгина Е.Б. К проблеме холодового гипобиоза // Физиология и биохимия терморегуляции гипотермии. – Алма-Ата: Б. и., 1982. – С. 3–7.
9. Сумбатов Л.А. Искусственная гипотермия: патофизиология и защитное действие. – М.: Медицина. – 1985. – 85 с.
10. Тимофеев Н.Н. Искусственный гипобиоз. – М.: Медицина. – 1983. – 190 с.
11. Тюкавин А.И. структура гемодинамического ответа и резистентность организма к гипоксии // Физиол. журн. – 1992. – 78, № 7. – С. 18.
12. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – М.: Мир, 1975. – 240 с.
13. Усенова Н.Ш., Долгова З.Я. Морфофункциональные изменения в органах белых крыс при глубокой гипотермии // Тез. докл. Всесоюз. симп. – Махачкала: Б. и., 1990. – С. 55.
14. Andjus R.K. Suspended animation in cooled, super cooled and frozen rats // Am. J. Physiol. – 1955. – 128, № 3. – P. 547–556.

15. Anders A. Morphological changes in the archanjid layer of he rat after cooled injury // Cryobiology. – 1989. – 8, № 2. – P. 173–182.
16. Reynolds E.S. The use of load citrate at high pH in electron microscopy // J. Cool. Biol. – 1963. – № 17. – P. 208–213.

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

Поступило 14.03.95

УДК 577.352.464

С.Х.Межидов, В.А.Моисеев

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ГЕМОГЛОБИНА НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

Существуют две теории клеточной проницаемости: мембранная и сорбционная [1]. Мембранная теория получила широкое распространение в силу хорошего теоретического и экспериментального обоснования, тогда как сорбционная теория не имеет всестороннего экспериментального обоснования. Так, не изучено влияние концентрации внутриклеточного содержимого на проницаемость клеток. В связи с этим нами проведены исследования по изучению проницаемости эритроцитов при различных концентрациях внутриклеточного гемоглобина. Проницаемость эритроцитов изучалась методом ЭПР спинного зонда, предложенного нами ранее [2]. Коэффициент проницаемости (P) определяли на основе законов диффузии. Эксперименты проведены на эритроцитах донорской крови человека 3–4 сут хранения при 4 °С. Перед экспериментом эритроциты отмывали 3 раза физиологическим раствором хлорида натрия, приготовленным на 5 ммоль/л натрий-фосфатного буфера, pH 7,4. Розовые тени эритроцитов получали описанным ранее методом [3]. Содержание гемоглобина в розовых тенях эритроцитов составило $(23,9 \pm 1,7) \%$ от исходного. На рис. 1 представлена кинетика проникновения 20%-го глицерина при 0 °С в интактные эритроциты. Коэффициент проницаемости, вычисленный из графических данных рис.

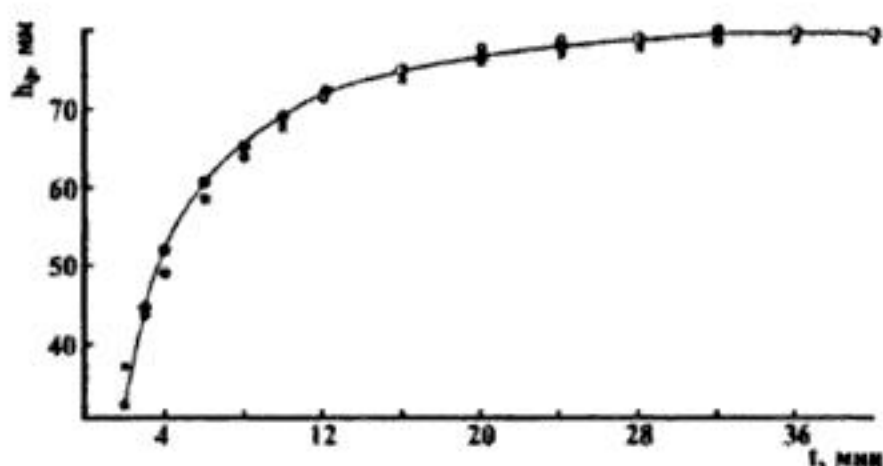


Рис. 1. Кинетика проникновения 20%-го глицерина в эритроциты при 0 °С (3 экс.)

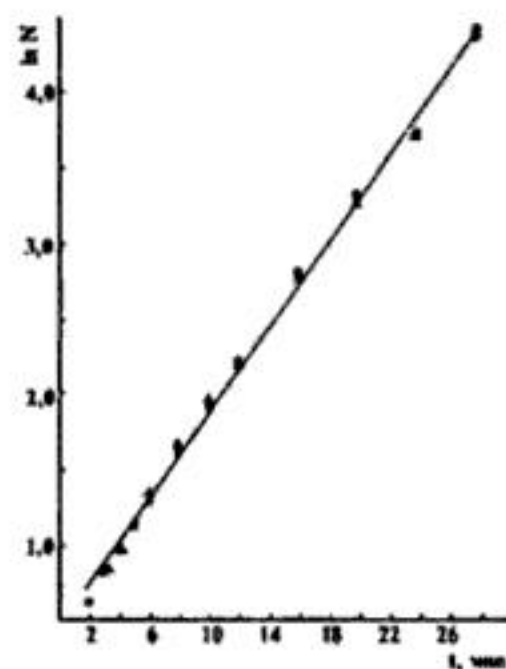


Рис. 2. График для расчета константы скорости проникновения глицерина при 0 °С.

$N = \frac{h_0 - h_t}{h_0}$; h_0 – конечное значение h ; h_t – значение h в момент времени t

2, был равен $(8,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$ см/мин. Кинетика проникновения 20%-го глицерина при 0 °С в розовые тени эритроцитов представлена на рис. 3 (кривая 1). Из рисунка видно, что процесс проникновения глицерина завершается в течение 4–5 мин, в то время как для интактных эритроцитов это время более 30 мин. Коэффициент проницаемости для розовых теней эритроцитов был равен $(5,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ см/мин. Для изучения влияния повышения концентрации гемоглобина внутри эритроцитов (дегидратация) на их проницаемость интактные эритроциты помещены в гипертонический раствор хлорида натрия (0,4 моль/л) 1:10, и удален надосадок после осаждения эритроцитов путем центрифугирования. Затем к эритроmasse добавлен раствор 1:1, содержащий 0,4 моль/л хлорида натрия, 20% глицерина и изучена кинетика проникновения глицерина (рис. 3, прямая 2). Из рисунка видно, что кинетика проникновения глицерина не регистрируется. Дополнительное исследование методом ^1H -ЯМР спектроскопии показало, что концентрация глицерина в эритроmasse через 20 мин отличалась от определенной через 2 мин концентрации на 8% (ошибка в определении концентрации $\pm 10\%$). Для исключения влияния концентрации электролита на проницаемость мембраны эритроцитов проведены эксперименты на розовых тенях эритроцитов с добавлением к ним 0,4 моль/л натрия хлорида, как и с интактными эритроцитами (рис. 3, кривая 2). Из рисунка видно, что кинетика проникновения глицерина наблюдается достаточно хорошо. Полученное значение коэффициента проницаемости $P = (4,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$ см/мин. Этот результат

показывает, что одной из причин блока проницаемости эритроцитов для глицерина является не изменения в мембране под влиянием электролитов, а повышение концентрации гемоглобина из-за дегидратации. Увеличение концентрации гемоглобина в розовых телях уменьшает P на 23% по сравнению с телями в физиологическом растворе, что достаточно близко к увеличению микровязкости их цитозоля (~15%). Уменьшение гемоглобина в эритроцитах приводит к увеличению P более чем в 6 раз. Результаты исследования влияния внутриклеточного белка на проницаемость эритроцитов важны не только для понимания механизма регуляции клеточной проницаемости, процессов, происходящих при криоконсервировании биологических объектов, но и для создания новых криобиологических технологий.

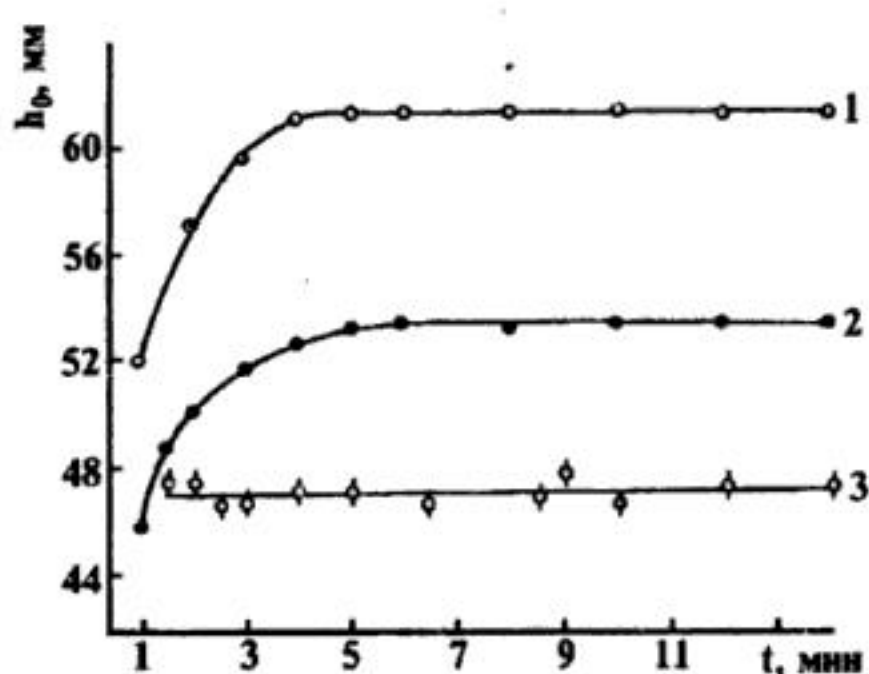


Рис. 3. Кинетика проникновения 20%-го глицерина при 0 °C: 1 — розовые тели эритроцитов; 2 — розовые тели эритроцитов в присутствии 0,4 моль/л натрия хлорида; 3 — интактные эритроциты в присутствии 0,4 моль/л хлорида натрия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трошин А.С. Распределение веществ между клеткой и средой. — Л.: Наука, 1985. — 192 с.
2. А.с. 1384006 СССР, МКИ⁴ G 01 N 24/10. Способ определения проницаемости эритроцитов для осмотически активных органических веществ / С.Х.Межидов, О.А.Нардид, В.А.Моисеев. — Оpubл. 1995, Бюл. № 14.
3. Whittam R, Ager M.E. Vectorial aspects adenosine triphosphatase activity in erythrocyte membranes // Biochem. J. — 1964, 93, № 2. — P. 337–347.

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

Поступило 04.05.94

УДК 57.043

В.В.Рамазанов, В.А.Бондаренко

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТАЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ NaCl В ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ САХАРОЗНОЙ СРЕДЕ НА ХОЛОДОВОЙ И ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ШОК ЭРИТРОЦИТОВ

Параллельное исследование холодового и гипертонического шока эритроцитов показало, что блокирование процессов ингибитором анионного транспорта диизотиоцианостильбендисульфонатом (ДИДС) различается по степени [2]. Данный ингибитор блокирует не только обмен анионов [6] и освобождение катионов калия при осмотическом стрессе [3], но и модифицирует взаимодействие белка полосы 3 с белками цитоскелета [5]. Было выявлено, что гипертонический шок определяется только осмолярностью среды прединкубации и не зависит от ее ионного состава [1], который определяет потерю катионов калия в гипертонической среде [3]. Описанные данные указывают на то, что потеря катионов калия может не оказывать существенного влияния на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку. С учетом этих данных мы попытались дифференцировать функциональное и структурное действие ДИДС вследствие обработки эритроцитов парахлормеркурийбензоатом (ПХМБ), при котором происходит нарушение взаимодействий белка полосы 3 с цитоскелетом [4]. Полученные результаты показали, что обработка эритроцитов ПХМБ не приводит к значительным изменениям уровней холодового и гипертонического шока. Однако действие ингибитора анионного транспорта ДИДС, имевшее место в немодифицированных эритроцитах [2], практически полностью устраняется обработкой эритроцитов ПХМБ, исключая неполную редукцию эффекта ДИДС при холодовом шоке (рис. 1). Данный эффект можно интерпретировать так, что действие ДИДС на гипертонический шок связано в основном с модификацией взаимодействий белка полосы 3 с цитоскелетом. В то же время остаточное блокирующее влияние ДИДС на холодовый шок (рис. 1, кривая 3) может происходить за счет торможения потери катионов калия [3]. В связи с этим можно предположить, что комбинирование среды прединкубации с возрастающими концентрациями NaCl должно приводить к росту чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку, но к снижению чувствительности к охлаждению. С учетом этого исследовали влияние возрастающих концентраций NaCl на чувствительность эритроцитов к охлаждению и гипертоническому шоку после инкубации в среде, содержащей 0,7 моль/л сахарозу. Повышение концентрации NaCl в среде инкубации до 150 моль/л приводит к росту чув-

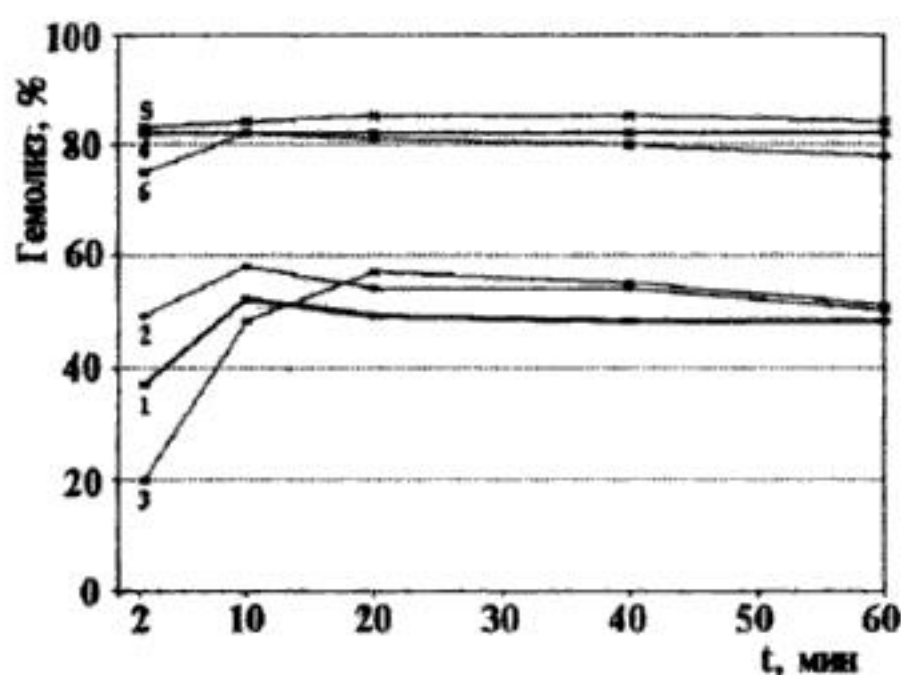


Рис. 1. Влияние обработки ПХМБ на чувствительность эритроцитов к охлаждению до 0 °C (1, 2, 3) и гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl (4, 5, 6) после инкубации при 37 °C в среде, содержащей 0,86 моль/л сахарозу: 1, 4 – контроль, 2, 5 – ПХМБ, 3, 6 – ПХМБ+ДИДС

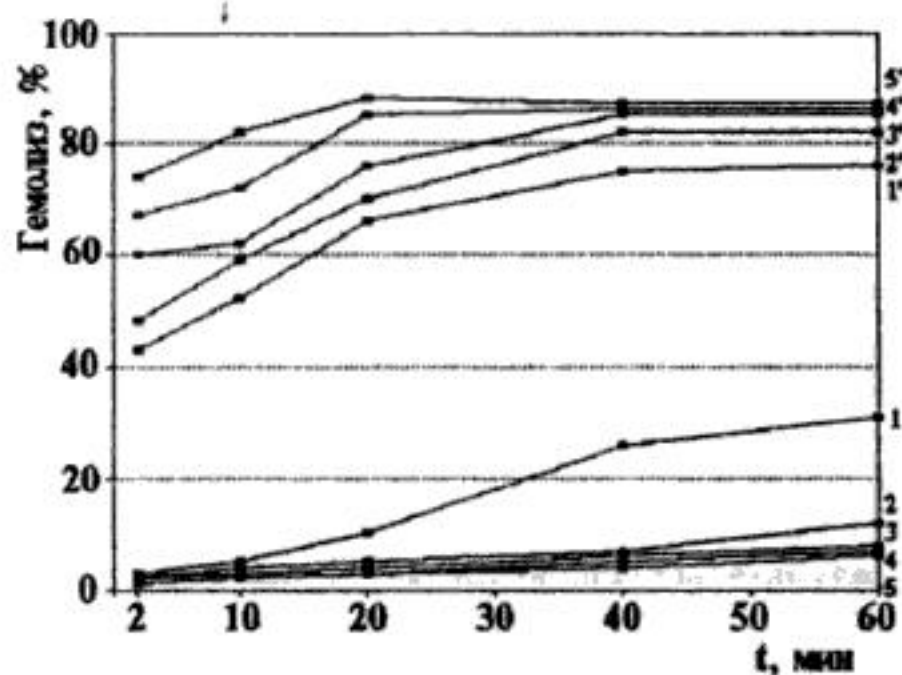


Рис. 2. Влияние возрастающих концентраций NaCl на чувствительность эритроцитов к охлаждению до 0 °C (1, 2, 3, 4, 5) и гипертоническому шоку при переносе в 3 моль/л NaCl (1', 2', 3', 4', 5') после инкубации при 37 °C в среде, содержащей 0,7 моль/л сахарозу: 1, 1' – 0 ммоль/л NaCl; 2, 2' – 25; 3, 3' – 50; 4, 4' – 100; 5, 5' – 150

ствительности эритроцитов к переносу в 3 моль/л NaCl, однако чувствительность клеток к охлаждению при этом снижается (рис. 2). Таким образом, полученные результаты указывают на то, что чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку не определяется освобождением катионов калия. Кроме того, нарушение взаимодействий белка полосы 3 с цитоскелетом не приводит к потере холодовой и осмотической чувствительности клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф.дисс. ... канд.биол.наук. – Харьков. – 1989. – 16 с.
2. Рамазанов В.В. Вплив осмотичного стресу та модифікаторів цитоскелета на розвиток холодового та гіпертонічного шоку еритроцитів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків. – 1994. – 14 с.
3. Рамазанов В.В., Руденко С.В., Бондаренко В.А. Связь ионных потоков хлора и калия при осмотическом стрессе с холодным шоком эритроцитов // Фундаментальные и прикладные проблемы криобиологии. – Харьков: Б. и. – 1993. – С. 106–111.
4. Clark S.J., Ralston G.B. The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membranes brought about by p-mercuribenzenesulfonate // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – 1021, P. 141–147.
5. Hsu L., Morrison M. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components // Arc. Biochem. Biophys. – 1983. – 227. – № 1. P. 31–38.
6. Jennings M.L. Structure and function of the red blood cell anion transport protein // Annual Rev. Biochem. Biophys. Chem. – 1989. – 18. – P. 397–420.

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

Поступило 22.02.95

УДК 615.361.018.46.014.41

Е.Д. Луценко

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕННИНГ-МЕТОДА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОБОГАЩЕННЫХ СТЕЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ПОПУЛЯЦИЙ ИЗ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА

Использование моноклональных антител (МАТ) в современных иммуногематологических исследованиях позволяет идентифицировать широкий спектр мембранных структур на клетках с теми или иными функциональными свойствами, выяснить роль этих структур. С помощью МАТ возможно также элиминировать из общей гетерогенной популяции костного мозга, в том числе и криоконсервированной, различные субпопуляции клеток, включая кроветворные предшественники, повышая их концентрацию. Обогащенные фракции кроветворных предшественников без значительного числа факторпродуцирующих клеток могут быть использованы для изучения роли в регуляции гемопоэза каждой из этих популяций и рекомбинантных экзогенных факторов роста. Популяция кроветворных предшественников может найти также применение для трансплантации аллогенного костного мозга, когда возникает необходимость снизить риск развития иммунных конфликтов, учитывая возможность развития иммунологической толерантности у формирую-

щихся из них иммунокомпетентных клеток. Кроме того, применение такого методического подхода дает возможность проводить оценку сохранности, возможной модификации мембранных структур после воздействия на кроветворные клетки факторов криоконсервирования, оценивать изменение концентрационных параметров этих клеток в общей популяции. Существующие в настоящее время методы селекции стволовых клеток позволяют достичь высокой степени очистки, однако наиболее эффективные, например, с использованием клеточных сортеров, являются дорогостоящими, что ограничивает возможность их применения. С другой стороны, обработка суспензии костного мозга в цитотоксическом тесте (МАТ и комплементом) не позволяет получить обе разделяемые популяции жизнеспособными. В приведенных исследованиях был использован прямой пеннинг-метод с МАТ к Thy-1,2 антигену, основанный на способности Thy-1,2^+ клеток сорбироваться в лунках пластикового планшета, покрытого МАТ [2]. Выделение сорбированных Thy-1,2^+ клеток осуществлялось мягким пипетированием с последующим введением летально облученным мышам для оценки колониеобразующей активности выделенной популяции [4]. Статистическая обработка данных выполнена с помощью метода Стьюдента-Фишера. В результате проведенных экспериментов было установлено, что после сорбции на МАТ из костного мозга интактных доноров элиминируется в среднем 2,5% Thy-1,2^+ клеток (фракция С-1), а при повторной сорбции около 0,5% Thy-1,2^+ (фракция С-2), что согласуется с данными других исследователей [3]. Фракция С-1 обладала примерно в 3,5 раза более высокой колониеобразующей активностью в сравнении с контролем на 8-е сут и в 10 раз — на 12-е сут (таблица). Очевидно, что колониеобразующая активность сорбированных на МАТ фракций обусловлена наличием в них Thy-1,2^+ КОЕ_с, причем Thy-1,2^+ фракция представляет собой популяцию, обогащенную кроветворными предшественниками разной степени дифференцировки. Сравнив концентрацию КОЕ_с в исходной суспензии и в сорбированной на МАТ, а также выполнив несложную математическую обработку [1], получаем данные, из которых следует, что содержание Thy-1,2^+ КОЕ_с-8 в костном мозге не превышает 5–10% от общего числа КОЕ_с-8, а Thy-1,2^+ -12 составляет примерно 30–35% от всех КОЕ_с-12. Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что сорбция на МАТ клеток регенерирующего после обработки цитостатиком костного мозга не может отражать изменения соотношений кроветворных клеток в таком миелотрансплантате.

Колониеобразующая активность различных фракций костного мозга: интактного, криоконсервированного и обработанного 5-ФУ

Фракции трансплантируемого костного мозга	Трансплантат					
	Интактный нативный 1×10^5 /мышь		Обработанный 5-ФУ 5×10^3 /мышь		Интактный криоконсер- вированный 1×10^5 /мышь	
	КОЕ _с -8	КОЕ _с -12	КОЕ _с -8	КОЕ _с -12	К-1 КОЕ _с -12	К-2 КОЕ _с -12
Исходная контрольная	$14,2 \pm 1,5^{\circ}$	$16,4 \pm 0,9$	$14,4 \pm 2,6$	$16,9 \pm 2,9$	$13,5 \pm 1,7$	$11,2 \pm 2,0$
С-1	$51,1 \pm 8,1^*$	$163,3 \pm 12,0^*$	$1,8 \pm 0,6^*$	$32,4 \pm 4,1^*$	$122,9 \pm 12,3^*$	$27,3 \pm 9,1^*$
С-2	$29,4 \pm 5,2^*$	$56,0 \pm 6,3^*$	$3,6 \pm 2,4^*$	$20,3 \pm 3,8^*$	-	-

Примечание. Эксперименты выполнены на линейных мышах СВА; в эксперименте было использовано 380 животных; $^{\circ}$ — средняя величина учета 9 селезенки; * — достоверные различия ($p < 0,05$) в сравнении с контролем

Через 8 сут после введения 5-фторурацила (5-ФУ) 150 мг/кг массы тела на фоне резкого снижения содержания ядерных клеток костного мозга (в 10–12 раз) абсолютное содержание КОЕ_с-12 и КОЕ_с-8 в бедре превышало примерно в 20 раз их исходный уровень в нормальном костном мозге. Из этой суспензии пеннинг-методом было элиминировано около 5% Thy-1,2^+ . Однако, несмотря на повышение содержания в таком костном мозге и КОЕ_с, и Thy-1,2^+ клеток в целом, концентрация Thy-1,2^+ КОЕ_с-8 среди всех КОЕ_с-8 снижалась до 0,5–0,6%, то есть была в 16–18 раз ниже, чем в популяции КОЕ_с-8 нормального костного мозга. Концентрация КОЕ_с-12 во фракции С-1 была примерно в два раза выше, чем в цельном костном мозге, обработанном 5-ФУ, и, следовательно, более чем в 40 раз выше в сравнении с нормальным костным мозгом. Несмотря на это содержание Thy-1,2^+ -КОЕ_с-12 составляло около 15% от всех КОЕ_с-12, то есть было в два раза ниже, чем в нормальном костном мозге, что может быть следствием “разбавления” оставшихся в костном мозге бедренной кости Thy-1,2^+ КОЕ_с вновь сформированными Thy-1,2^+ -КОЕ_с, поскольку снижение процентного содержания Thy-1,2^+ КОЕ_с в два раза прослеживалось на фоне двукратного увеличения общего числа КОЕ_с-12 в костном мозге бедренной кости. После выхода из состояния глубокого холодового анабиоза существенным образом изменяются показатели, характеризующие не только функциональные, но и структурные свойства этих клеток [1]. В зависимости от выбранного режима криоконсервирования может изменяться число колоний, формируемых криоконсервированным костным мозгом: криоконсервирование с 10%-м раствором ДМСО (К-1) обеспечивает высокую сохранность КОЕ_с (90%). Примерно на 35% снижалось число колоний, формируемых криоконсервированным костным мозгом под защитой 7,5%-го ПЭО (К-2). Как видно из полученных результатов, после криоконсервирования в режиме К-2 происходит нарушение/изменение состояния Thy-1,2 структур, о чем свидетельствует выраженное снижение общего количества сорбируемых на МАТ клеток, составляющего не более 15% от нативного или криоконсервированного в режиме К-1 костного мозга. Расчеты показали, что способность Thy-1,2^+ КОЕ_с взаимодействовать с МАТ после криоконсервирования (К-2) снижалась еще в большей степени,

чем всей фракции Thy-1,2⁺ клеток, и составляла по отношению к нативному контролю не более 5–6%. Однако и в данной модели пеннинг-метод обеспечивал обогащение миелотрансплантата КОЕ_с в 2,5 раза. Приведенные результаты доказывают возможность использования пеннинг-метода для оценки качественного состояния криоконсервированного миелотрансплантата, а именно для определения наличия рецепторных структур на кроветворных клетках и подтверждают пригодность этого метода для получения фракций криоконсервированного миелотрансплантата, обогащенных кроветворными предшественниками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г. и др. Идентификация антигена Thy-1,2 на кроветворных предшественниках (КОЕ_с) и оценка его состояния после криоконсервирования костного мозга // Рук. деп. в ВИНТИ 18.07.90 № 4034 – В90.
2. Greenberg P., Baker S. Immunologic selection of hematopoietic precursor cells utilizing antibody-mediated plate binding ("penning") // Blood. – 1985. – 65, № 1. – P. 190–197.
3. Spangrude G.J., Scolley R. A simplified method for enrichment of mouse hematopoietic stem cells // Exp. Hematol. – 1990. – 18, № 8. – P. 920–927.
4. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Radiat. Res. – 1961. – 14, № 2. – P. 213–222.

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

Поступило 23.02.95

УДК 612.35:612.592:577:1

С.Е. Овсянников

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ОСТРОГО ОХЛАЖДЕНИЯ ОРГАНИЗМА

В экспериментах по изучению интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в динамике самоотогрева после острого охлаждения организма крыс до состояния глубокой гипотермии (РТ 19–20 °С) в гомогенатах печени экспериментальных животных были обнаружены фазовые изменения накопления малонового диальдегида. Максимумы повышения уровня ПОЛ наблюдались через 3 и 24 ч после холодового воздействия. Одним из возможных объяснений активации ПОЛ может быть снижение активности глутатионзависимой ферментативной системы клеток. Доказательством этого утверждения служит установленное в той же серии экспериментов изменение содержания восстановленного глутатиона (GSH) в ткани печени (снижение приблизительно на 26–27% через 3 и 24 ч самоотогрева), которое также имело фазовый характер, однако, направленность его была противоположной изменениям интенсивности ПОЛ. Так как основные ферменты, утилизирующие гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот, являются NADPH-зависимыми, повышение интенсивности ПОЛ может происходить в результате снижения обеспеченности защитной антиоксидантной системы клетки восстановительными эквивалентами. Исходя из вышесказанного, для выяснения более тонких механизмов регуляции уровня ПОЛ в организме теплокровных в постхолодовой период было целесообразным исследование активности глутатионзависимой антиоксидантной системы и системы восстановления NADPH. В данной серии экспериментов крысы-самцы линии Вистар массой 200–220 г охлаждались в процессе свободного плавания в воде с температурой 7 °С до РТ 19–20 °С. Забой экспериментальных животных производили через 3 и 24 ч самоотогрева. Контролем служили интактные крысы. В гомогенатах печени, приготовленных на 100 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,4, соотношение ткань-буфер 1:3), определяли глутатионпероксидазную, с H₂O₂ и с гидроперекисью кумола (GSH-пероксидаза), глутатион-S-трансферазную (GSH-S-трансфераза) и глутатионредуктазную (GSH-редуктаза) активности [2]. О скорости восстановления NADP⁺ в тех же гомогенатах судили по активности малатдегидрогеназы (МДГ) [3], глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6Р-ДГ), 6-фосфо-глюконат-дегидрогеназы (6Р-Г-ДГ) [4] и изоцитрат-дегидрогеназы (Иц-ДГ) [5].

Т а б л и ц а 1

Активность некоторых GSH-зависимых антиоксидантных ферментов (нмоль субстрата/1 мг белка/1 мин) в гомогенатах печени крыс после острого охлаждения (Sx ± x; n=5–7)

Ферментативная активность	Время самоотогрева, ч		
	Контроль	3	24
GSH-пероксидазная с H ₂ O ₂	49,9±5,4	36,4±1,8*	32,7±1,2**
GSH-пероксидазная с гидроперекисью кумола	213,6±11,3	194,8±13,2	180,6±30,2
GSH-S- трансферазная	719,8±54,5	753,9±45,5	671,8±79,8
GSH-редуктазная	44,9±4,8	56,7±1,03**	58,5±5,2*

Примечание. * – p < 0,1; ** – p < 0,05 – относительно контроля.

Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что в постхолодовой период происходят изменения активности глутатионзависимой антиоксидантной ферментативной системы. А именно: через 3 ч самсогревания наблюдалась тенденция к снижению глутатионпероксидазной активности с H_2O_2 ($p < 0,1$), а через 24 ч после холодового воздействия было установлено статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение активности этого фермента, по сравнению с контрольными животными. Наряду с этим, было отмечено достоверное повышение активности GSH-редуктазы ($p < 0,05$) через 3 ч самоотогрева, тенденция к которому ($p < 0,1$) сохранялась и через 24 ч. В то же время каких-либо изменений активности GSH-S-трансферазы и GSH-пероксидазы с гидроперекисью кумола в печени экспериментальных животных выявлено не было. Менее заметные изменения происходили при наших условиях эксперимента в системе восстановления $NADP^+$ (табл. 2). Среди исследованных ферментов наблюдалась лишь тенденция к снижению ($p < 0,1$) активности Иц-ДГ, а значения активности МДГ, Г-6Р-ДГ, 6Р-Г-ДГ не отличались от регистрируемых показателей у контрольных животных. Полученные результаты согласуются с данными, опубликованными в научной литературе. Так, авторы работы [1] приводят сведения о снижении в печени крыс, подвергшихся низкотемпературному воздействию в холодовой камере при $-25 \div -27^\circ C$ в течение 4 ч (без изменения РТ), пероксидазной активности через 24 и повышении глутатионредуктазной активности через 2 ч после воздействия с последующим снижением ее к 24 ч. По мнению этих авторов, активация GSH-редуктазы на начальных этапах холодового воздействия является компенсаторной реакцией на снижение содержания в клетке GSH. Понижение ее активности на относительно отдаленных этапах самоотогрева свидетельствует о несостоятельности этой системы регенерации восстановленного глутатиона.

Таким образом, принимая во внимание факт отсутствия заметных изменений активности $NADP^+$ -редуцирующих ферментов, а также учитывая значительное снижение содержания восстановленного глутатиона в ткани печени при данных условиях эксперимента, можно предположить, что наиболее слабым звеном в глутатионзависимой системе утилизации гидроперекисей ненасыщенных жирных кислот является репарация глутатиона. Тем не менее нельзя исключить и вероятность того, что истощение глутатионзависимой антиоксидантной системы происходит из-за недостаточной скорости восстановления $NADPH$. Для получения ответа на этот вопрос необходимы дальнейшие более глубокие исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова А.И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор. – Новосибирск: Наука, 1988. – 184 с.
2. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Свич И.В., Овсянников С.Е. Перекисное окисление липидов биологических мембран и его ферментативная регуляция при старении крыс // Укр. биохим. журн. – 59, № 2. – С. 50–57.
3. Усатенко М.С., Уончева А.В. Влияние инсулиннедостаточности и гидрокортизона на активность $NADP^-$ и $NADPH$ -зависимых малат-дегидрогеназ в печени и коре почек крыс // Вопр. мед. химии. – 1974. – 20, № 4. – С. 401–406.
4. Bauman D.E., Brown R.E., Davis C.L. Pathway of fatty acid sinthesis and reducing equivalent of rat, sow and cow // Arch. Biochem. Biophys. – 1979. – 140, № 1. – P. 237–244.
5. Komberg A., Horecker B.L. In methods in enzymology. – New-York, 1955. – 1. – P. 323–327.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины, г. Харьков Поступило 09.02.96

УДК 612.111.22+612.118.221.3

Г.А.Божок, С.В.Руденко, В.А.Бондаренко

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЭРИТРОЦИТОВ РАЗНОГО ВОЗРАСТА К ПОСТГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ ГЕМОЛИЗУ

Моделью повреждения эритроцитов при медленном замораживании-оттаивании может являться процесс их постгипертонического лизиса (ПЛ) [6]. Перенос эритроцитов из гипертонической среды в изотоническую приводит к повреждению их эритроцитарной мембраны и лизису, который был назван постгипертоническим. Данные [5, 9] подтверждают значительную роль состава гипертонического и изотонического растворов, времени экспозиции в них эритроцитов и начальной тоничности, после которой клетки подвергались гипертонической обработке путем ди-

ализа [7] или замораживанию и последующему оттаиванию [5]. В процессе ПЛ средний объем клеток повышается по сравнению с физиологической величиной, однако регидратированные клетки отвечают неодинаково, так как кривые объемных распределений показывают существование двух субпопуляций эритроцитов: набухших и оставшихся в рамках нормального объема [8]. Подобное поведение объектов соответствует ответу "все или ничего", который известен для некоторых феноменов, когда избирательно действующий фактор неодинаково распределен среди клеток в общей популяции. Различную степень чувствительности эритроцитов к дегидратации подтверждает тот факт, что экспериментальная обработка, моделирующая процессы замораживания-оттаивания, приводит к гемолизу лишь части клеток [5–9]. В данной работе исследована гипотеза, согласно которой неодинаковая устойчивость эритроцитов в ходе процесса ПЛ может быть связана с внутренней гетерогенностью общей популяции клеток, выражающейся в разной величине их плотности, которая коррелирует с возрастом клеток [1, 2]. Эритроциты донорской крови трижды отмывали в физиологическом растворе (10 мМ *трис*-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4) и фракционировали в ступенчатом градиенте фикола (Ficoll-400, Pharmacia). Фиколл растворяли в физиологическом растворе, причем плотности приготовленных растворов находились в пределах от 1,04 до 1,12 г/см³; 1,6 мл этих растворов наслаивали друг на друга в центрифужной пробирке для получения 4 ступеней градиента фикола, 1,6 мл достаточно разбавленной суспензии эритроцитов осторожно наслаивали сверху. Центрифугирование проводилось при 350 g в течение 4 мин при комнатной температуре. Полученные субпопуляции эритроцитов разной плотности отбирались из каждого слоя градиента и отмывались дважды в физиологическом растворе. По 10 мкл суспензии каждой субпопуляции помещали в дистиллированную воду или цианметгемоглобиновый реагент для определения соответственно содержания ионов K⁺ или гемоглобина в клетках. Тестирование на чувствительность к ПЛ проводилось путем экспозиции 10 мкл суспензии эритроцитов в 1 мл гипертонического раствора сахарозы (1,2 М) или NaCl (1,5 М), предварительно нагретого до 37 °C или охлажденного до 0 °C, в течение 15 мин при 37 °C и 90 мин при 0 °C. Далее 10 мкл клеточной суспензии переносили в 1 мл изотонической сахарозы или NaCl в присутствии или в отсутствие катионов Zn²⁺ и Ca²⁺, выдерживали 5 мин при комнатной температуре. Полученные образцы центрифугировали при 600 g 3 мин после чего спектрофотометрически на длине волны 415 нм определяли степень гемолиза клеток. Средний объем клеток общей эритроцитарной массы (ОЭМ) и субпопуляций были измерены с помощью аппарата типа Coulter-Coulter с отверстием датчика диаметром 50 мкм и длиной 50 мкм, используя ток < 0,3 мА. В результате центрифугирования в

Т а б л и ц а 1

Параметры эритроцитарных фракций, полученных при центрифугировании в градиенте фикола

Номер фракции	K/K ₀	Hb/Hb ₀	V/V ₀	Количество клеток во фракции, %
ОЭМ	1	1	1	100
1	1,21±0,08	1,1±0,08	1,01±0,01	33,2
2	0,91±0,1	0,98±0,02	0,99±0,01	55,6
3	1,08±0,11	1,10±0,07	1,00±0,01	12,7
4	0,85±0,12	0,88±0,07	0,98±0,01	1,5

Примечание. Содержание ионов K(K), гемоглобина (Hb), средний объем клеток (V) указаны относительно соответствующих параметров в ОЭМ.

табл. 2 представлен процент гемолиза после инкубации эритроцитов в гипертоническом растворе и переноса их в изотонические условия. Эквilibрация клеток в растворе NaCl характеризуется большим процентом гемолиза по сравнению с сахарозной средой, однако этот эффект наблюдался и в контрольных, и во фракционированных образцах, причем степени гемолиза эритроцитов были

Т а б л и ц а 2

Уровень ПЛ (%) после инкубации ОЭМ и фракций в гипертонических растворах NaCl и сахарозы в течение 15 мин при 37 °C и 90 мин при 0 °C и последующей регидратации в соответствующей изотонической среде

Номер фракции	Постгипертонический лизис, %			
	1,2 М сахароза		1,5 М NaCl	
	0 °C	37 °C	0 °C	37 °C
ОЭМ	2	24	15	85
1		20		79
2		24		84
3		25		86
4		24		83

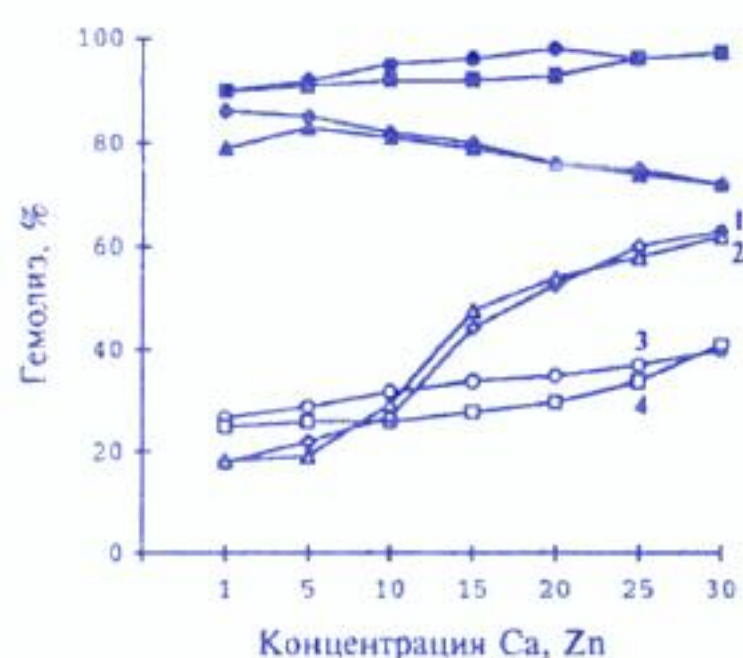
схожи для каждой среды с некоторой тенденцией уменьшения гемолиза в 1-й фракции. С понижением температуры гипертонической среды до 0 °C уровень ПЛ значительно уменьшался, несмотря на увеличение времени экспозиции до 90 мин. Эксперименты показали, что фактор температуры значительно больше детерминирует чувствительность эритроцитов к постгипертоническому повреждению в отличие от критерия сепарации клеток в градиенте фикола. Известно, что дивалентные катионы Ca²⁺ и Zn²⁺ существенно влияют на степень ПЛ [8]. На рисунке представлена зависимость уровня ПЛ, полученного для 3-й фракции и нефракционированной крови, от концентраций ионов Ca²⁺ и Zn²⁺ в среде регидратации. Повышение концентрации Ca²⁺ стимулирует ПЛ клеток, дегидратированных в гипертоническом растворе сахарозы, но имеет противоположный эф-

фekt в случае клеток, инкубировавшихся в гипертоническом NaCl. Ионы Zn^{2+} имеют схожий активационный эффект на ПЛ клеток, дегидратированных в сахарозе, и не влияют на ПЛ клеток, обработанных гипертонией NaCl. Эти данные на первый взгляд противоречат полученным ранее, когда наблюдалось ингибирование ПЛ эритроцитов теми же самыми ионами [8]. Однако выяснено, что направленность действия Ca^{2+} и Zn^{2+} определяет следующий фактор: присутствует ли ион в среде регидратации изначально или добавляется после перенесения туда клеток. Таким образом, активирующее ПЛ влияние катионов Zn^{2+} и Ca^{2+} было использовано для определения характера поведения эритроцитов разных субпопуляций в условиях дегидратации-регидратации. Было выяснено также, что нефракционированная кровь и все субпопуляции проявили одинаковую реактивность в отношении действия катионов, как это представлено на рис. для 3-й фракции. Дегидратация при 0 °C не только значительно уменьшает процент ПЛ, но и устраняет активирующее и ингибирующее влияния дивалентных катионов. Ни Ca^{2+} , ни Zn^{2+} в данных условиях не изменяют уровень ПЛ относительно контрольного (данные не представлены). Итак, полученные результаты показали, что чувствительность эритроцитов к ПЛ не детерминируется теми параметрами, по которым происходит их разделение в градиенте плотности. Иными словами, каждая клеточная фракция содержит приблизительно равное число клеток, потенциально способных набухать и лизировать при переносе их из гипертонической среды в изотоническую. Тип обработки (электролитное содержание дегидратирующей среды и температура) является более значимым для изменения свойств эритроцитов в процессе ПЛ. Известно, что продолжительная деформация мембранно-цитоскелетного комплекса приводит к смещению димер-тетрамер равновесия спектрина в сторону образования олигомеров, причем процесс имеет выраженную температурную зависимость [3]. Фактически, экспозиция клеток в условиях гипертонии соответствует подобной мембранной деформации. Кроме того, повышение концентрации гемоглобина и цитоскелетных белков в дегидратированных эритроцитах облегчает олигомеризацию спектрина [4]. Понижение температуры и времени инкубации понижают как способность спектрина к самоассоциации [3, 4], так и ПЛ. Вероятно, "политические" изменения во взаимодействиях цитоскелет-мембранных белковых компонентов эритроцитов являются ответственными за различную чувствительность клеток общей эритроцитарной массы к ПЛ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варламова С.В. Методы сепарации возрастных фракций эритроцитов // Лаб. дело. -1989.-№ 9.-С. 32-35.
2. Кобозев Г.В., Троицкая Н.А. Новый метод извлечения фракций эритроцитов, отличающихся по возрасту, после центрифугирования в градиенте плотности // Мол. биология. -1981.-Вып. 28.-С. 30-35.
3. Liu S.L., Derick L.N., Ralek J. Dependence of the permanent deformation of red blood cell membranes on spectrin dimer-tetramer equilibrium: implication for the permanent membrane deformation of irreversible sickle cells // Blood.-1993.-81.-P. 522-528.
4. Liu S.-C., Ralek J. Hemoglobin enhance the self-association of spectrin heterodimers in human erythrocytes // J.Biol.Chem.-1984.-259.-P. 11556-11562.
5. Mazur P., Cole K.W. Role of unfrozen fraction salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes // Cryobiology.-1989.-26.-P. 1-29.
6. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology.-1972.- № 8.-P. 489-500.
7. Pegg D.E., Diaper M.P. The effect of initial tonicity of freezing/thawing injury to human red blood cells suspended in solution of sodium chloride // Cryobiology.-1991.-28, № 1.-P. 18-35.
8. Rudenko S.V. Influence of cations on the inhibition of posthypertonic hemolysis of erythrocytes // Cryo-Letters.-1994.-15.-P. 33-40.
9. Woolgar A.E., Morris G.J. Same combined effects of hypertonic solution and changes in temperature on posthypertonic hemolysis of human red blood cells // Cryobiology.-1973.- № 10.-P. 82-86.

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



Влияние дивалентных катионов Ca^{2+} мМ (1, 2) и Zn^{2+} мкМ (3, 4) на постгипертонический лизис общей эритроцитарной массы (2, 3) и третьей фракции (1, 4). Эритроциты были инкубированы 15 мин в гипертонических растворах NaCl (закрытые символы) и сахарозы (открытые символы) и регидратированы в соответствующих изотонических растворах в присутствии указанных концентраций дивалентных катионов при комнатной температуре

Поступило 22.09.95

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

4¹⁹⁹⁵

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

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

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

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

ИНДЕКС 70474

ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1995. №4. 1-56