

Резюме. У хворих (n=87) на колоректальний рак у 1-3 добу після госпіталізації до стаціонару у сироватці крові досліджено вміст тканинних гістогормонів простагландинів груп E (PGE₁; PGE₂), групи F (PGF_{1α}; PGF_{2α}) та лейкотриєнів C₄ і B₄ в залежності від локалізації й стадії (I-IV) пухлинного процесу. Референтна група умовно здорових складала n=21 людина. Виявлена динаміка рівнів гістогормонів свідчить про глибокі метаболічні порушення в багатьох периферичних органах і тканинах, у тому числі, при формуванні реакцій клітинного і гуморального імунітету, що в термінальній фазі хвороби призводить до розвитку поліорганної й полісистемної недостатності.

Ключові слова: колоректальний рак, тканинні гістогормони.

UDC 616.351-006-089

PROGNOSTIC MEANING OF HISTOHORMONES in PATHOGENESIS of COLORECTAL CANCER

Perepadya S.V., Zhukov V.I., Moiseenko A.S., Zaytseva O.V., Perepadya O.V.

Summary. In patients (n=87) receiving colorectal cancer during 1-3 days after hospitalization it was investigated in blood serum content of tissue histohormones prostaglandins of group E (PGE₁; PGE₂), group F (PGF_{1α}; PGF_{2α}) and leukothrienes C₄; B₄ in dependence on localization and stage (I-IV) of illness. It is determined dynamics of levels of histohormones is evidence of deep metabolic disturbances in many peripheral organs and tissues including in forming reactions of cellular and humoral immunity that in thermal phase of illness trends to development of polyorganic and polysystemic insufficiency.

Key words: colorectal cancer, tissue histohormones.

Стаття надійшла 14.01.2011 р.

УДК 577.121:591.111.115.431

С. В.Репина, Е.В. Газо, И.Ф. Коваленко, О.А. Нардид, А.В. Шило

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ ГОМОИОТЕРМОВ И ГЕТЕРОТЕРМОВ КАК ОТВЕТ НА ГИПОМЕТАБОЛИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Работа выполнена в рамках тем НИР «Фізіологічні і патофізіологічні механізми дії низьких температур на стан центральної нервової, серцево-судинної та ендокринної систем у тварин різних вікових груп» (№ гос. регистрации 0106U002162) и «Дослідження впливу низькотемпературної обробки тканини плаценти на біологічну активність її водно-солевих екстрактів відносно клітин різного походження» (№ гос. регистрации 0106U002167).

Вступление. Изучение явлений глубокого подавления интенсивности жизненных процессов имеет важное значение при разрешении проблем теоретической и практической медицины: долгосрочное хранение клеток, органов, тканей; проведение операций в условиях гипотермии; охлаждение и сохранение половых продуктов и т.п.

Неослабевающий интерес широкого класса исследователей – от молекулярных биологов до практических медиков – к феномену зимней спячки млекопитающих объясняется их способностью длительно переживать субнулевые температуры тела и переносить резкие и значительные по амплитуде температурные и метаболические сдвиги

при периодических выходах и входах в спячку [2, 6]. Более того, известно, что в состоянии оцепенения млекопитающие переносят без вреда для организма недостаток кислорода, действие многих ядов, заражение смертельными болезнями, действие летальных доз радиации и т.д.

Однако зимняя спячка является генетически закрепленной стратегией адаптации. Объектами практических криомедицины и криоветеринарии служат, как правило, организмы человека или животных, не обладающих такими адаптивными способностями.

В связи с этим интересным представляется исследование состояния искусственного гипобриоза по методу Анджуса-Бахметьева-Джая, сопровождающееся снижением температуры тела животного до 16°C и угнетением метаболизма, что подобно состоянию природной гибернации.

Для понимания интегрального физиологического ответа организма на состояние гипометаболизма важными являются исследования реакции клеток на глубокие изменения состояния организма в условиях, моделирующих природные. Удобной моделью для этого является эритроцит. Ме-

ханические свойства эритроцитарной мембраны, определяющие осмотическую устойчивость, деформируемость, форму клеток и состояние эритроцита в целом управляются динамически регулируемыми белок-белковыми взаимодействиями системы мембрана-цитозоль-цитоскелет [8]. Оксигенация-дезоксигенация эритроцитов и другие физиологические стимулы приводят к сдвигу равновесия «мембраносвязанные – цитозольные» ферменты гликолиза, что прямо коррелирует с их активностью [7]. Мы предполагаем, что в условиях сниженной жизнедеятельности организма происходит подстройка физиологии эритроцита, которая может быть выявлена по изменению его структурно-функциональных характеристик.

Цель работы – исследовать изменения осмотической устойчивости, соотношения форм гемоглобина и динамического состояния цитозоля эритроцитов как физиологического ответа клетки на гипометаболическое состояние организма млекопитающих, генетически адаптированных к разным интервалам колебаний температуры тела.

Объект и методы исследования. Исследования проводили на самцах сирийских хомячков и белых беспородных крыс. Состояние искусственного гипобиоза достигалось по методу Анджуза-Бахметьева-Джая (состояние АБД) [5]. Животное на 3 ч помещается в герметичный сосуд, расположенный в темной холодильной камере при 3-5°C. Гипотермия, гипоксия и гиперкапния, испытываемые животным, вызывают у него состояние искусственного гипометаболизма, которое характеризуется сниженной температурой тела ($16 \pm 1^\circ\text{C}$), сниженным сердечным ритмом (с 380-390 до 80-82 ударов/мин), и практически полной обездвиженностью и отсутствием болевых рефлексов [2], что подобно состоянию природной гибернации. Кровь готовилась на гепарине. Эритроцитарную массу получали трехкратным центрифугированием (1800 g, 5 мин) цельной крови в избытке изотонического Na-фосфатного солевого буфера (рН 7.4).

Исследовали животных: контрольных, в состоянии АБД, через 2 и 24 часа после него, а также в состоянии зимней спячки (не менее 6 особей).

Изменение соотношения форм гемоглобина оценивали методом дифференциальной спектрофотометрии [1] на спектрофотометре «Pye Unicam SP 8000». Осмотическую устойчивость эритроцитов определяли методом малоуглового рассеяния как долю сохранных клеток в гипотонических растворах NaCl [3]. Измерение рассеяния света с длиной волны порядка 1 мкм вперед под углом 9° к направлению падающего пучка проводили на приборе, изготовленном фирмой «Криокон». В отличие от обычного общепринятого метода определения осмотической хрупкости применение метода малоуглового рассеяния позволяет избежать ошибок, связанных с дополнительными механическими нагрузками

на клетки при центрифугировании, и ускорить процедуру определения процента сохранных клеток в заданном гипотоническом растворе. Кривые осмотической хрупкости получали при 25, 20, 15, 8°C .

Динамическое состояние цитозоля эритроцитов оценивали по температурным зависимостям параметра микровязкости в интервале 37-0 С методом ЭПР спиновых зондов с использованием водорастворимого зонда ТЕМПОН и ушряющего агента – феррицианида калия. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре «Bruker» ER 100 D с термостатирующим устройством (точность $\pm 0,5 \text{ K}$).

Результаты исследований и их обсуждение. Нахождение и крыс, и хомячков в состоянии искусственного гипобиоза сопровождалось перераспределением форм гемоглобина: отмечалось увеличение относительного содержания оксигемоглобина (рис.). В процессе выхода крысы из состояния гипобиоза относительное содержание оксигемоглобина сначала приближалось к контрольному значению (2 часа после АБД), а через сутки наблюдалось увеличение этого показателя.

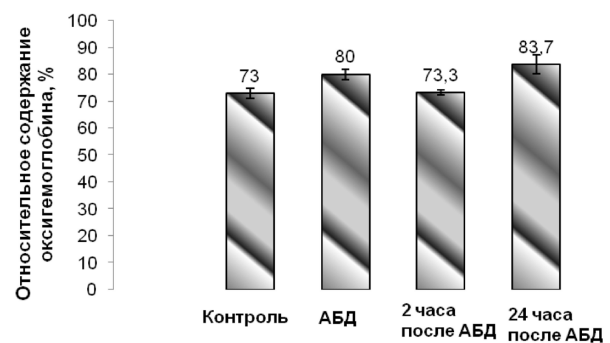


Рис. Изменение относительного содержания оксигемоглобина в эритроцитах крыс.

По данным [2], через 24 часа после состояния АБД парциальное давление O_2 в крови возвращается к норме. Поэтому увеличение содержания оксигемоглобина, наблюдаемое нами, может быть следствием повышения сродства гемоглобина к кислороду.

Отличительной особенностью эритроцитов хомячков было повышенное содержание оксигемоглобина в течение всего наблюдаемого периода выхода из гипометаболического состояния.

Нахождение и гетеротермов, и гомойотермов в состоянии искусственного гипобиоза приводило к некоторому снижению осмотической устойчивости эритроцитов. Так, 50% гемолиз при 25°C наблюдался: в контроле – при $180 \pm 7,2 \text{ mOsm}$, в состоянии АБД – при $186 \pm 7,44 \text{ mOsm}$. Уже через 2 часа по физиологическим показателям животные не отличались от контрольных. Однако осмотическая устойчивость их эритроцитов значительно превышала этот параметр для контрольных животных: у хомячков 50% гемолиз происходил при $138 \pm 5,52 \text{ mOsm}$, у крыс – при $114 \pm 4,56 \text{ mOsm}$.

Таблиця

Осмотическая хрупкость эритроцитов (концентрация NaCl в mOsm при 50% гемолизе) при разных температурах

	25°C	20°C	15°C	8°C
Хомяк (контроль)	180±7,2	169,5±6,78	162±6,48	159±6,36
Хомяк (в состоянии АБД)	186±7,44	186±7,44	189±7,56	—
Крыса (в состоянии АБД)	183±7,32	181,5±7,26	180±7,2	—
Хомяк (зимняя спячка)	156±6,24	158±6,32	156±6,24	162±6,48

Такая повышенная осмотическая устойчивость эритроцитов сохранялась вплоть до 24 часов.

Определение осмотической устойчивости эритроцитов при разных температурах выявило различия между гомойотермами и гетеротермами.

Осмотическая устойчивость эритроцитов хомяков в контроле со снижением температуры повышалась (табл.), у крыс – снижалась.

Состояние искусственного гипобиоза «нивелировало» различия между клетками гомойотермных и гетеротермных организмов. Как видно из табл., осмотическая устойчивость эритроцитов хомяков и крыс была практически одинаковой и не зависела от температуры.

В отличие от состояния искусственного гипобиоза, у зимоспящего хомяка ($T_{\text{тела}} +4-5^{\circ}\text{C}$) эритроциты имели повышенную осмотическую устойчивость, но также не зависящую от температуры (табл.). У контрольного хомяка осмотическая устойчивость эритроцитов повышалась со снижением температуры так, что при 8°C соответствовала этому параметру для спящего животного при всех исследованных температурах (табл.). Аналогичные данные о повышенной осмотической устойчивости эритроцитов получены для эктотермных позвоночных [4].

Нахождение и крысы, и хомяка в состоянии искусственного гипобиоза приводило к изменениям динамического состояния цитозоля эритроцитов. Это проявлялось в значительном снижении микровязкости цитозоля (на $16\pm 2\%$ для хомяков и $25\pm 2\%$ для крыс) по сравнению с контролем. Как было отмечено выше, состояние животных приближалось к контролю уже через 2 часа после АБД. Однако микровязкость цитозоля эритроцитов и крыс, и хомяков к этому времени продолжала снижаться. В дальнейшем реакции эритроцитов гомойотермных и гетеротермных млекопитающих различались. У «зимних» и «осенних» хомяков наблюдалось дальнейшее снижение микровязкости цитозоля (на $28\pm 2\%$) вплоть до 24 часов после состояния АБД так, что состояние цитозоля приближалось к характерному для зимней спячки. У крыс и «летних» хомяков оно приближалось к контролю.

Снижение микровязкости цитозоля может быть следствием повышения количества свободной воды из-за увеличения относительного количества цитозольных компонентов в мембранно-связанном состоянии [9]. Этим же может объясняться и повышенная осмотическая устойчивость клеток. Снижение микровязкости может быть также вызвано увеличением объема клетки, однако результаты световой микроскопии показывают, что объем эритроцитов существенно не менялся.

Выводы. Физиологические изменения организмов гетеротермных и гомойотермных млекопитающих, связанные с пребыванием в состоянии искусственного гипобиоза и выходом из него, проявлялись в изменении структурно-функциональных характеристик эритроцитов. Через 24 часа после гипобиоза наблюдалось повышение относительного содержания оксигемоглобина, существенное увеличение осмотической устойчивости и снижение микровязкости цитозоля эритроцитов, несмотря на то, что состояние животных приближалось к контролю уже через 2 часа.

Перспективы дальнейших исследований. Отмеченные следовые реакции эритроцитов на состояние искусственного гипобиоза животных позволяют считать, что эта модель может использоваться при разработке подходов к терапии анемий различного генеза в ветеринарной практике.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Е.Д. Розановой за неоценимую помощь в проведении исследований по определению форм гемоглобина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Изменение соотношения форм гемоглобина в эритроцитах коров, больных лейкозом / Л. В. Коваленко, Е. Д. Розанова, В. Д. Зинченко [и др.] // Доповіді НАН України. – 1995. – № 9. – С. 101–103.
2. Мельничук С. Д. Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини) / С. Д. Мельничук, Д. О. Мельничук. – К.: Видавничий центр НАУ, 2007. – 220 с.
3. Фізико-математичний аналіз та експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові людини за індексом сферичності / Е. О.

- Гордієнко, О. І. Гордієнко, І. Ф. Коваленко [та ін.] // Біофізичний вісник. — 2000. — Вип. 1 (6). — С. 75–78.
4. Aldrich K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures / K Aldrich, D K. Saunders // Journal of Thermal Biology — 2001. — № 26. — P. 179–182.
 5. Andjus R. K. Reanimation of adult rats from body temperature between 0 and +2°C / R. K. Andjus, A. U. Smith // J. Physiol. — 1955. — № 128. — P. 446–472.
 6. Carey H. V. Mammalian Hibernation: Cellular and Molecular Responses to Depressed Metabolism at Low Temperature / H. V. Carey, M. T. Andrews, S. L. Martin // Physiol. Rev. — 2003. — V. 83. — P. 1153–1181.
 7. Campanella M. E. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane / M. E. Campanella, H. Chu, P. S. Low // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2005. — V. 102. — № 7. — P. 2402–2407.
 8. Manno S. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation / S. Manno, Y. Takakuwa, N. Mohandas // J Biol Chem. — 2005. — V. 280. — № 9. — P. 7581–7587.
 9. Repina S.V. The structural rearrangements in erythrocyte membrane: adaptive function of membrane skeleton / S. V. Repina, N. V. Repin // Abstracts of 15th EARC Meeting. — Murten, Switzerland, 2005. — P. 73.

УДК 577.121:591.111.115.431

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ ГОМОИОТЕРМОВ И ГЕТЕРОТЕРМОВ КАК ОТВЕТ НА ГИПОМЕТАБОЛИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА

Репина С.В., Газо Е.В., Коваленко И.Ф., Нардид О.А., Шило А.В.

Резюме. Показано, что нахождение хомяков и крыс в состоянии искусственного гипобיוза по модели Анджуса-Бахметьева-Джая приводит к перераспределению форм гемоглобина, изменению осмотической устойчивости и состояния цитозоля эритроцитов. Повышение относительного содержания оксигемоглобина, осмотической устойчивости и снижение микровязкости цитозоля наблюдаются вплоть до 24 часов после гипометаболического состояния животных.

Ключевые слова: гипометаболизм, эритроцит, осмотическая устойчивость, формы гемоглобина, микровязкость цитозоля.

УДК 577.121:591.111.115.431

ЗМІНА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЕРИТРОЦИТІВ ГОМОІОТЕРМІВ ТА ГЕТЕРОТЕРМІВ ЯК ВІДПОВІДЬ НА ГІПОМЕТАБОЛІЧНИЙ СТАН ОРГАНІЗМУ

Репіна С.В., Газо Є.В., Коваленко І.Ф., Нардід О.А., Шило О.В.

Резюме. Показано, що перебування ховрахів і щурів у стані штучного гіпобіозу за моделлю Анджуса-Бахмет'єва-Джая призводить до перерозподілу форм гемоглобіну, зміни осмотичної стійкості та стану цитозолу еритроцитів. Підвищення відносного вмісту оксигемоглобіну, осмотичної стійкості та зниження мікрів'язкості цитозолу спостерігаються аж до 24 годин після гіпометаболічного стану тварин.

Ключевые слова: гіпометаболізм, еритроцит, осмотична стійкість, форми гемоглобіну, мікрів'язкість цитозолу.

UDC 577.121:591.111.115.431

CHANGING of STRUCTURAL and FUNCTIONAL CHARACTERISTICS of HETEROOTHERMS and HOMOIOOTHERMS ERYTHROCYTES as RESPONSE to ORGANISM HYPOMETABOLIC STATE

Repina S. V., Gazo I. V., Kovalenko I. F., Nardid O. A., Shilo A. V.

Summary. It was shown that hamsters and rats being in a state of artificial hypobiosis under Andjus-Bachmetjev-Giaya method resulted in redistribution of hemoglobin forms, changing of osmotic resistance and erythrocyte cytosol state. Increasing of relative oxyhemoglobin content, osmotic resistance and decreasing of cytosol microviscosity were persisted up to 24 hours after an animals hypometabolic state.

Key words: hypometabolism, erythrocyte, osmotic resistance, hemoglobin forms, cytosol microviscosity.

Стаття надійшла 10.02.2011 р.