

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукопису
УДК 57.043:612.35:354.3

ПЕТРЕНКО ОЛЕКСАНДР ЮРІЙОВИЧ

ЕНЕРГЕТИЧНИЙ СТАН ТА МЕТАБОЛІЗМ КСЕНОБІОТИКІВ В
ІЗОЛЬОВАНИХ ГЕПАТОЦИТАХ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД УМОВ
ВИДІЛЕННЯ ТА КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИН

0 3.00.22 - кріобіологія

03.00.04 - біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття вченого ступіню доктора
біологічних наук

Харків - 1993

574.1
Дисертація виконана в Інституті проблем кріобіології і
кріомедицини Академії наук України

Науковий консультант:

член-кореспондент АН України А.М.ВІЛОУС

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор В.І.ГУВСЬКИЙ

доктор біологічних наук, професор В.І.ЛУГОВИЙ

доктор біологічних наук, професор А.В.ЧЕЧОТКИН

Ведуча установа: Інститут біохімії ім. А.В.Палладіна АН України
(Київ)

Захист відбудеться "21" *червня* 1993 року о "13³⁰" години
на засіданні спеціалізованої ради Д 016.60.01 при Інституті
проблем кріобіології і кріомедицини АН України
(310015, Харків-15, вул. Переяславська, 23).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
проблем кріобіології і кріомедицини АН України

Автореферат розіславий "___" _____ 1993 року

Вчений секретар спеціалізованої ради, доктор медичних наук,
професор А.М.ГОЛЬЦЕВ

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00810594 (R)

ЛННБ ім. В. Стефаніка
АН України

73-20.607

Актуальність теми. Сучасний етап розвитку експериментальної кріобіології характеризується підвищеною увагою щодо досліджень механізмів структурних та функціональних перебудов мембранних структур, які у великій мірі визначають життєздатність клітин. На ізольованих органелах було встановлено, що мітохондрії, які відповідають за генерацію енергії, мають високу чутливість щодо заморожування-відігрівання [Sherman, 1972; Лемешко, 1973; Петренко, 1984], а система біотрансформації ксенобіотиків, яка локалізована в мембранах ендоплазматичного ретикулула, виявилась більш стійкою [Borton, 1974; Ash wood-Smith, 1977; Кудокоцева, 1982; Лемешко, 1978]. Була виявлена здатність мітохондрій частково відновлювати ефективність окислювального фосфорильовання після заморожування-відігрівання [Racker, 1972; Петренко 1984; Лемешко та ін., 1992], однак механізм кріопшкодження та репарації мембран залишається нез'ясованим. Разом з тим, мало вивченою є реакція на дію низьких температур субклітинних структур у складі більш високо організованих об'єктів, хоча існує думка, що їх порушення є однією з причин загибелі клітин після кріоконсервування [Greiff et al., 1961; Heber et al., 1964; Fuller et al., 1985; McGann et al., 1988]. Ізол звані клітини печінки (гепатоцити) на теперішній час знаходять усе більш широке застосування у сфері фундаментальних досліджень та прикладних галузях біології та медицини. Зберігаючи селективні властивості плазматичної мембрани та інтактність внутрішньоклітинних структур, ізольовані гепатоцити адекватно відображають специфічні реакції печінки [Krebs, 1974; Лук'янова, 1985]. Їх застосування як біологічного об'єкту має великий інтерес для розуміння механізмів клітинного рівня регуляції, а використання у фармакології та токсикології дозволяє водночас вивчати особливості біотрансформації та цитотоксичність ксенобіотиків [Chesne et al., 1991].

У останній час інтенсивно розробляються також питання застосування ізольованих гепатоцитів у клініці з метою корекції патологічного становища, яке викликане порушеннями функціонального стану печінки [Островерхов та ін., 1979; Маргуліс та ін., 1985; Matas et al., 1976; Mito et al., 1979, 1986; Michiaki Matsushita, 1986]. Конкретні механізми позитивної дії суспензії

ізолюваних клітин печінки ще не вивчені, але, очевидно, вони пов'язані з елімінацією з кров'яного русла токсичних сполук. Можна вважати, що більшу ефективність матимуть суспензії гепатоцитів, в яких процеси поглинання та біотрансформації ксенобіотиків протікають більш активно. В зв'язку з цим стає вельми актуальним питання стимуляції детоксикаційної функції клітин.

Широке використання ізолюваних гепатоцитів у біології та медицині гальмується відсутністю достатньо простих методів їх виділення та тривалого зберігання. На цей час загальноновизначим методом виділення метаболічно активних гепатоцитів є ферментативний, який передбачає застосування колагенази для послаблення міжклітинних взаємодій [Betty, 1969; Howard, 1968; Seglen, 1972, 1976]. Однак цей метод є достатньо складним і дорогим.

Найбільш перспективним рішенням проблеми зберігання ізолюваних клітин печінки на теперішній момент є створення банку криоконсервованих гепатоцитів. В літературі висвітлюються питання підбору кріопротекторів, адекватних режимів та середовищ заморожування зідігравання [Le Cam, 1976; Fuller, 1980, 1982; Chesne, 1988, 1991]. Результати криоконсервування суспензії поцінуються за збереженістю плазматичної мембрани та специфічних функцій печінки, таких як синтез сечовини, глюкози, білка, метаболізм ксенобіотиків [Fuller, 1980; De Loecker et al, 1990; Powis et al, 1987]. При цьому необхідно відзначити вельми виражену прикладну спрямованість досліджень, які проводяться, відсутність аналізу причин виявлених зрушень. З метою в'ясування основних закономірностей реакції клітин на низькотемпературну дію доцільно досліджувати інтегральні функції клітини, такі як енергетичний стан і транспорт іонів, що регулюють спрямованість метаболічних шляхів.

Метою роботи є дослідження механізму змін енергетичного стану та метаболізму ксенобіотиків в ізолюваних гепатоцитах щурів у залежності від методу їх виділення та умов низькотемпературної дії.

Конкретними завданнями дослідження стали:

1. Розробити неферментативний метод виділення гепатоцитів щурів та провести порівняльний аналіз їх морфо-функціональних

властивостей відносно клітин, одержаних традиційним (ферментативним) методом.

2. Дослідити енергетичний стан, дихальку активність, мембранний потенціал, транспорт та внутрішньоклітинний розподіл K^+ за різних умов виділення та інкубації гепатоцитів.

3. З'ясувати рівень криочутливості ізольованих мікосом та мітохондрій, а також дослідити характер змін у системі окислювального фосфорилування та іонного транспорту мітохондрій після заморожування-відігрівання з метою наукового обґрунтування шляхів їх репарації після криошкодження.

4. Дослідити дію низьких температур на функцію внутрішньоклітинних структур (мітохондрій та ендоплазматичного ретикулула) у складі гепатоцитів та визначити головні причини утиску дихальної та детоксикаційної активностей клітин по заморожуванню-відігріванню.

5. Дослідити основні характеристики та визначити швидкість-лімітуючі стадії поглинання та біотрансформації ксенобіотиків в ізольованих гепатоцитах щурів у залежності від вихідного стану тварини та методу виділення клітин і на цій підставі виявити шляхи стимуляції їх детоксикаційної функції.

6. З'ясувати особливості впливу криопротекторів, умов заморожування та відігрівання на життєздатність ізольованих гепатоцитів з метою розробки методу їх криоконсервування.

7. Провести порівняльне дослідження активностей АТФ-генеруючих та АТФ-споживаючих систем, біотрансформації ксенобіотиків та внутрішньоклітинного розподілу K^+ в суспензіях свіжовиділених та криоконсервованих гепатоцитів однакової життєздатності.

Наукова новизна. Основні результати роботи отримані вперше. Розроблено неферментативний метод одержання функціонально активних гепатоцитів щурів, які можуть бути використані в експериментальній та клінічній медицині. В роботі вперше здійснено паралельне дослідження кінетичних параметрів поглинання та метаболізму ксенобіотиків гепатоцитами в залежності від вихідного стану тварини, умов виділення та інкубації клітин. При цьому показано, що за низьких концентрацій ксе-

побіотика процес поглинання може лімітувати біотрансформацію, а введення тваринам фенобарбіталу індукує не тільки метаболізм, але й поглинання досліджуємої сполуки. Порівняльна оцінка функціональної активності свіжовиділених та деконсервованих суспензій гепатоцитів однакової життєздатності дозволила встановити, що зниження швидкості накопичення АТФ після кріоконсервування зумовлене збільшенням активності Na^+/K^+ -АТРази, спрямованої на відновлення внутрішньоклітинного рівня K^+ . Вперше встановлено, що роз'єднання окислювального фосфорильовання мітохондрій після заморожування-відігрівання у сахарозному середовищі є вдалим, оскільки головна його причина - виникнення протонної провідності через АТРазний канал - ліквідується за присутності ADP.

Теоретичне та практичне значення. Загальнобіологічне значення мають дані щодо регуляції дихальної активності та метаболізму ксекобіотиків в ізольованих клітинах. Теоретично значущими є результати, які показують, що порушення бар'єрних властивостей біологічних мембран після дії низьких температур може бути обумовлене утворенням іонних каналів у результаті структурної переорієнтації субодиниць ферментних комплексів. Дані щодо можливості реасоціації субодиниць ферментів, яка супроводжується відновленням бар'єрних властивостей, також носять прикладний характер.

Практичне значення мають розробки методів виділення та кріоконсервування гепатоцитів, захищені 4 авторськими свідоцтвами. Гепатоцити, одержані неферментативним методом, можуть знайти широке застосування у різних галузях біології та медицини. З метою підвищення ефективності детоксикації крові хворих, у медичній практиці результати роботи дозволяють рекомендувати використання свіжовиділених та кріоконсервованих гепатоцитів ситих самців, підданих дії індуктора фенобарбіталу. Дезагрегація тканини за допомогою вібрації з метою одержання клітин та субклітинних структур також може знайти практичне впровадження.

Матеріали роботи використовуються у відповідних лекційних курсах на кафедрі молекулярної та прикладної біології

Харківського державного університету, а також на кафедрі фізіології Української Фармацевтичної Академії.

Основні положення, що виносяться на захист:

1. Неферментативний метод виділення гепатоцитів щурів, який включає перфузію розчином з комплексами Ca^{2+} , дезагрегацію фрагментів печінки та розподіл клітин в ізотопічному сахарозному середовищі, дозволяє одержати суспензію інтактних та функціонально активних гепатоцитів.

2. Головним механізмом роз'єднання окислювального фосфорильовання ізольованих мітохондрій після заморожування-відігрівання у сахарозному середовищі є зниження протонної провідності через АТФазний канал, яка спонтанно ліквідується в процесі інкубації за умови припиччення Ca^{2+} -залежних латентних пошкоджень.

3. Порушення біотрансформації ксенобіотиків та зниження дихальної активності після заморожування-відігрівання ізольованих гепатоцитів у середовищі без і ліопротектора обумовлені втратою субстратів та піридинових нуклеотидів внаслідок необоротного пошкодження плазматичної та мітохондріальної мембран.

4. Розроблений метод кріоконсервування гепатоцитів дозволяє в значній мірі зберегти життєздатність, рівні АТФ та іонів калію, дихальну та детоксикаційну активність клітин, а також їх здатність утворювати моношар за культивування.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи докладалися та обговорювалися на I Всесоюзному біофізичному з'їзді (Москва, 1982), IV-VI Українських біохімічних з'їздах (Івано-Франківськ, 1982, Київ, 1987, 1992), II and III International Conference on Water & Ions in Biological Systems (Bucharest, Romania, 1982, 1984), II Всесоюзній конференції по анабіозу (Рига, 1984), II Всесоюзній конференції "Екоантиоксидант" (Чорноголовка, 1986), XII з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. І.П.Павлова (Львів, 1986), Всесоюзному симпозиумі "Молекулярні механізми та регуляція енергетичного обміну" (Пущино, 1986), Societies for low temperature Biology of United Kingdom and Czechoslovakia (Bohemia, Czechoslovakia, 1990), Всесоюзній науковій

конференції "Актуальні проблеми лікарської токсикології" (Купавна, 1990), IV Congress of the World Federation of Ukrainian Medical Association (Kharkov, 1992), II Міжнародній конференції "Успіхи сучасної кріобіології" (Харків, 1992), I European Conference on Tissue Banking and Clinical Application (Germany, Berlin, 1991), 18th Annual Meeting American Association of Tissue Banks (USA, San Diego, 1992), 27, 29 and 30 Annual Meetings of Society for Cryobiology (USA, 1990, 1992, 1993).

Публікації. Основні положення роботи опубліковані у 81 науковій праці.

Обсяг та структура роботи. Дисертація висладена на _____ сторінках машинописного тексту, складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, восьми розділів власних досліджень та їх обговорення, закінчення, висновків, містить 23 таблиці та 71 малюнок. Список використаної літератури нараховує 300 найменувань.

МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕНЬ

За об'єкт досліджень правили гепатоцити, мітросоми та мітохондрії печінки щурів. Експерименти здійснювали на статевозрілих ситях щурах лінії Вістар вагою тіла 200-300 г та тваринах, які голодували протягом 48 годин.

Ізольовані клітини печінки виділяли методом колагеназної перфузії за Seglen, 1976 та розробленим неферментативним методом, який включає перфузію *in situ* ізотермічним середовищем з 154 мМ NaCl, 6 мМ KCl, 3 мМ NaHCO₃, 2 мМ EDTA та 20 мМ тріс-HCl, pH 7,4, швидкістю 40-50 мл/хв протягом 20-25 хвилин, дезагрегацію фрагментів за допомогою вібрації частотою 50 гц і тривалістю 60 сек та відокремлення пошкоджених клітин за низької швидкісного центрифугування (100 g) у середовищі такого складу: 250 мМ сахарози, 5 мМ KCl, 0,4 мМ KH₂PO₄, 0,4 мМ Na₂HPO₄, 0,8 мМ MgSO₄, 1,2 мМ CaCl₂, 10 мМ тріс-HCl та 1% бичого сироваткового альбуміну (BSA), pH 7,4. Розподілення гепатоцитів також проводили у градієнті густини перколу як описано у роботі [Berry, 1983]. Пермеабілізовані гепатоцити одержували обробкою

клітин дигітоїном за методом [Katz, 1986] з деякими модифікаціями.

Мітохондрії та мікросоми виділяли методами диференціального центрифугування згідно Мосоловій та ін., 1975 та Карузидій, Арчакову, 1977, відповідно.

Швидке заморожування-швидке відігрівання суспензій ізольованих гепатоцитів, мікросом та мітохондрій у середовищі без кріопротекторів здійснювали у поліетиленових пробірках об'ємом 1 мл шляхом швидкого занурювання у рідкий азот (швидкість заморожування 300-400°C/хв). Відігрівання проводили на водяній бані при 38°C до 0-2°C (швидкість відігрівання 400-500°C/хв).

Кріоконсервування клітин здійснювали шляхом швидкого двохступеневого заморожування до -196°C з 20-ти хвилинною аутичкою при -20+-25°C у присутності 10% ДМСО та швидкого відігрівання на водяній бані при 38°C. Швидкість охолодження та відігрівання контролювали за допомогою мідьконстантанової термопари.

Життєздатність одержаної суспензії визначали через забарвлення клітин вітальним красителем трипановим синім [Seglen, 1978], за флуоресценцією флуоресцеїндіацетату та броміду етідія [Friss et al., 1980], а також через стимуляцію дихання сукцинат м. Концентрацію клітин визначали у камері Горяєва. Кількість білку поцінювали за методом Лоурі у модифікації Міллера [Марцишаускас та ін., 1977].

Вміст метаболітів визначали в перебігу інкубації гепатоцитів (концентрація 2×10^6 клітин/мл) при 37°C з постійним перемішуванням. Кількість АТР у кислотному екстракті визначали за допомогою люциферин-люциферазного методу [Аттаулаханов, 1981] на біохемілюмінометрі ВХЛ-06 або "Luminometer 1251" (LKB, Швеція). Вміст глюкози, лактату та пірувату визначали за ферментативними методами [Bergmeyer, 1974].

Дихальну активність ізольованих гепатоцитів та мітохондрій вимірювали полярографічно у камері об'ємом 1 мл при температурах 26°C або 37°C за допомогою закритого платинового кисневого електроду Кларка на полярографі LP-7E.

Інтенсивність перекисного окислення ліпідів визначали через накопичення малонового діальдегіду [Владимиров, Арчаков, 1972].

Кількість цитохрому P-450 визначали за методом диференціальної спектроскопії Omura і Sato, 1964 на спектрофотометрі Specord UV-VIS. Вміст біфенілу (БФ) у середовищі інкубації вимірювали після екстракції в *n*-гептані при 318 нм ($\lambda_{\text{аб.}}=270$ нм) на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-2A (Японія), згідно [Bridges, 1965]. Кількість *p*-нітроанізоли (*p*-НА) визначали спектрофотометрично при 317 нм. Біотрансформацію БФ визначали через утворення продукту реакції 4-гідроксібіфенілу (4-ГБФ) за методом [Creaven, 1965] на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-2A при 400 нм ($\lambda_{\text{аб.}}=270$ нм). Швидкість метаболізму *p*-НА визначали через утворення *O*-деметильованого продукту реакції *p*-нітрофенолу (*p*-НФ) як описано у роботах [Parke et al., 1975; LeCam et al., 1977; Holme et al., 1982]. Для визначення загального 4-ГБФ та *p*-НФ (вільний + кон'югований) проби перед екстракцією піддавали кислотному гідролізу у присутності 0.2 *N* HCl згідно [Holme et al., 1982].

Транспорт K^+ , Ca^{2+} та тетрафенілфосфонію (TFF^+) визначали за допомогою іон-селективних електродів у камері об'ємом 5 мл за постійного перемішування. H^+ -АТФазну активність вимірювали потенціометричним методом [Болдирєв, 1977].

H^+ проникність внутрішньої мембрани мітохондрій поцінювали за набуханням в ізотонічному розчині нітрату амонію при 546 нм [Brierly, 1970].

Електроактивність реєстрували як описано у роботі [Зінченко, Моїсєєв, 1989]. Реєстрацію акустичної емісії проводили за допомогою п'єзоелектричного датчика.

Культивування ізольованих клітин печінки щурів проводили у позитивному середовищі Лейбович Л-15 ("Serva") з глутаміном, яке містить в собі 10% ембріональної сироватки теляти та доповнене антибіотиками. Гістологічні дослідження проводили за методом [Меркулов, 1981]. Огляд препаратів здійснювали на мікрокопі МБЦ-15 або МБР-3.

Для електронно-мікроскопічних досліджень суспензію клітин або мітохондрій фіксували глутаровим альдегідом та обробляли за Reynolds, 1963.

Отримані результати оброблялися статистично за методом Ст'юдента-Фішера [Ашмарин, 1975] на ЕОМ IBM. У разі побуду-

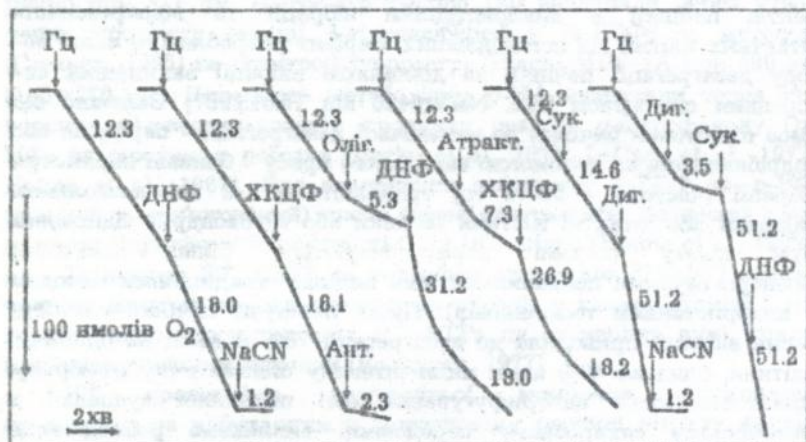
вання прямих залежностей використовувався метод найменших квадратів [Келеті, 1990].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Розроблено неферментативний метод виділення гепатоцитів щурів [А.с. №1463757 від 8.11.1988], куди входять перфузія розчином, що містить в собі комплексони іонів Ca^{2+} , дезагрегація фрагментів печінки з використанням вібрації та відокремлення інтактних клітин від пошкоджених. Варіант розробленого нами методу дезагрегації печінки за допомогою вібрації захищений авторським свідоцтвом [А.с. №1310428 від 15.01.1987]. Залежно від умов підготовки печінки до механічної дезагрегації - перфузія або подрібнювання за допомогою важільного пресу - близькі параметри вібрації (частота - 50-70 гц, тривалість - 1-2 хв) дозволяють виділяти або інтактні клітини печінки або мітохондрії, відповідно. При цьому останні характеризуються більш високими біоенергетичними показниками, ніж виділені традиційним методом з використанням гомогенізації. Після перфузії печінки застосування вібрації приводило до дезагрегації 70% її маси на одиничні клітини, близько 40% яких мали інтактну плазматичну мембрану. Низькошвидкісне центрифугування цієї первинної суспензії в ізотонічному сахарозному середовищі викликало розподілення осаду на два шари різного відтінку. Нижній темний шар містив в собі понад 80% клітин, плазматична мембрана яких була непроникною щодо трипанового синього, а верхній (більш світлий шар) складався на близько 90% з пошкоджених гепатоцитів. На підставі цього спостереження розроблено метод розподілу інтактних та пошкоджених гепатоцитів, який захищено авторським свідоцтвом [А.с. №1510356 від 22.05.1989]. В кінцевій суспензії практично були відсутні непаренхіматозні клітини печінки, гепатоцити мали округлу форму з нерівними кр'ями. Протягом інкубації кількість та життєздатність клітин в суспензії практично не змінювалися, за культивування вони прикріплялися до колагенової підложки і через добу утворювали моношар.

Гепатоцити, виділені неферментативним методом, відповідали загально визнаним критеріям інтактності не тільки за забаренням трипановим синім, флуоресценцією флуоресцеїндацетату та

броміду етідія (відсоток пошкоджених клітин не перебільшував 20%), але й за "сукцинатним тестом" - екзогенний сукцинат не більш, ніж на 30% стимулював швидкість ендogenousного дихання, яка становила 11-13 нмолів $O_2/хв/10^6$ клітин. Було встановлено, що для виключення впливу прониклого до клітини сукцинату, визначення життєдатності суспензії за "сукцинатним тестом" більш коректно проводити в присутності роз'єднувача.



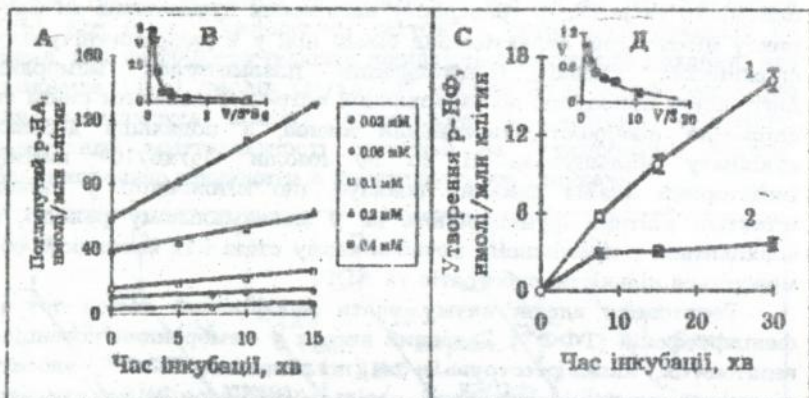
Мал. 1. Дисціальна активність гепатоцитів щури, виділених неферментативним методом. Над кривими наведені швидкості дихання у нмолях $O_2/хв/2 \times 10^6$ клітин. Доданок: гепатоцити (Гц) - 2×10^6 клітин, сукцинат (Сук.) - 2 мМ, NaCN - 2 мМ, ДНФ - 50 мкМ, ХКЦФ - 1 мкМ, антицидин А (Ант.) - 2 мкМ, олігоміцин (Оліг.) - 5 мкг, атрактилолід (Атракт.) - 20 мкМ, дигітонін (Диг.) - 40 мкг.

Ендogenousне дихання залишалось постійним за інкубації гепатоцитів у середовищах зовнішньоклітинного типу на протязі 2 год і було зумовлене споживанням кисню мітохондріями, оскільки інгібувалось ціанідом та антимицином А на 95% і 80%, відповідно (мал. 1). На тлі сталого рівня дихання гепатоцитів у перебігу інкубації збільшувався вміст АТФ до фізіологічних значень та спостерігався синтез глюкози за рахунок глікокогенезу зі швидкістю 2.33 ± 0.31 нмолів глюкози/ 10^6 клітин/хв. Роз'єднувачі окислювального фосфорильовання - ДНФ, ХКЦФ - збільшували швидкість дихання у 1.6 рази. Інгібітор мітохондріальної АТФаз

олігоміцини та інгібітор транспорту аденинових нуклеотидів до матриксу мітохондрій атрактилозид більш ніж у 2 рази притічували споживання кисню. Пошкодження плазматичної мембрани дигітоніном приводило до забарвлення клітин трипаловим сирим та зникнення швидкості споживання кисню, а подальша добавка сукцинату збільшувала її до 50 нмолів O_2 /хв/ 10^6 клітин. Інгібіторний аналіз дихання показує, що мітохондрії у складі інтактною клітини функціонують не у максимальному режимі, а знаходяться у проміжному метаболічному стані і їх активність обмежується кількістю субстратів та ADP.

Гепатоцити здатні акумулювати ліпофільний катіон тетрафенілфосфоній (TFF^+). Головний внесок у мембранний потенціал гепатоцитів, який реєстрували за поглинанням TFF^+ , вносять внутрішньоклітинні мітохондрії, оскільки інгібітори та роз'єднувачі окислювального фосфорилування мітохондрій викликали вихід більшої частини акумульованого катіону. Повне вивільнення TFF^+ досягалося за добавки дигітоніну. Таким чином, у середовищі зовнішньоклітинного типу мембранний потенціал реєструється тільки в інтактних гепатоцитах. Дослідження транспорту TFF^+ дозволяє оцінити величину мембранного потенціалу внутрішньоклітинних мітохондрій та плазматичної мембрани клітин.

Протягом інкубації гепатоцити не втрачали іонів K^+ а, навпаки, поглинали їх з середовища. Інгібітори та роз'єднувачі окислювального фосфорилування мітохондрій викликали повільне, а дигітонін - швидке вивільнення іонів K^+ . Після зв'язування іонів Ca^{2+} у середовищі інкубації за допомогою EGTA дигітонін вивільнював лише частину ендогенного калію, а подальша добавка інгібіторів або роз'єднувачів окислювального фосфорилування викликала повний вихід K^+ з клітин. Таким чином, роздільна добавка дигітоніну та мітохондріальних інгібіторів у безкальцієвому середовищі дозволила визначити вміст K^+ у мітохондріальному та немітохондріальному (цитоплазматичному) компартментах клітини.



Мал. 2. Поглинання (А,В) та біотрансформація (С,Д) *p*-нітروанізолу ізольованими гепатоцитами щурів. 1 - утворення загального (вільний + кон'югований) *p*-НФ; 2 - утворення вільного *p*-НФ. В,Д - залежність Іді-Хофсті для поглинання (В) та *O*-деметилування (Д) *p*-НА.

Гепатоцити здатні поглинати та метаболізувати ксенобіотики. Характер поглинання залежав від ступеню гідрофобності досліджуваної сполуки. Елімінація з середовища біфенілу, якому властива висока гідрофобність, здійснювалась протягом кількох секунд незалежно від температури інкубації та життєздатності суспензії. В елімінації менш гідрофобного сполучення - *p*-нітроанізолу - спостерігалися дві фази: фаза швидкого зв'язування та фаза лінійної залежності поглинутого ксенобіотика від тривалості інкубації. Графік Іді-Хофсті щодо поглинання *p*-НА клітинами печінки у координатах $V(V/S^2)$ мав яскраво виражений біфазний характер: ділянка графіку щодо високих концентрацій *p*-нітроанізолу (>0.1 мМ) становила собою пряму, яка йшла практично паралельно до осі ординат, що вказує на проникнення ксенобіотика в клітину шляхом дифузії. Процес поглинання *p*-нітроанізолу в ділянці низьких концентрацій був насичуваним, характеризувався вдаваними величинами V_{max} та K_m - 0.623 нмолів *p*-НА/хв/ 2×10^6 клітин та 0.031 мМ, відповідно, що дозволяє припускати на участь у ньому певної транспортної системи.

Динаміка утворення продуктів біотрансформації біфенілу та *p*-нітроанізолу протягом інкубації гепатоцитів мала подібний ха-

реактер. Вміст загального продукту реакції (вільний + кон'югований) у середовищі постійно збільшувався, а кількість вільного продукту зростала лише у перші хвилини інкубації і потім підтримувалась на постійному рівні, що свідчить про сбалансованість реакцій I та II фаз біотрансформації.

Швидкість цитохром Р-450-залежного гідроксилювання субстратів залежала від концентрації біфенілу та *p*-нітроанізолу в середовищі інкубації. Графіки V/S свідчать про гідлегість цього процесу для обох речовин кінетиці Міхаеліса-Ментен. Однак, якщо графік Лді-Хофсті - $V/(V/S)$ - щодо *O*-гідроксилювання біфенілу виявляє тільки один процес з K_m ад=0.0064 мМ і V_{max} ад=0.048 нмолів БФ/хв/2×10⁶ клітин, то для *O*-деметилування *p*-НА графік мав характерний вигин, який свідчить про наявність двох процесів - з низькою та високою вдовоною K_m . Близькі значення V_{max} ад. щодо високоафінного процесу *O*-деметилування та насичуваної компоненти поглинання дозволяють припустити, що двофазний характер гідроксилювання за низьких концентрацій *p*-НА обумовлений обмеженістю з боку поглинання ксенобіотика.

Було встановлено, що вміст цитохрому Р-450 і біотрансформація *p*-нітроанізолу в гепатоцитах самців щурів на 45% вищі, ніж у клітинах самок. Метаболізм ксенобіотиків в нсмі обумовлюється вмістом у гепатоцитах цитохрому Р-450, може обмежуватися швидкістю проникнення ксенобіотика в клітину і не лімітується доступністю NADPH. Індукція системи мікросомального окислення введенням тваринам фенобарбіталу збільшувала загальний вміст цитохрому Р-450 в клітинах, а також їх спроможність поглинати та метаболізувати ксенобіотик *p*-нітроанізол. При цьому швидкість-лімітуючим чинником біотрансформації за високих концентрацій ксенобіотика ставав не вміст цитохрому Р-450, а доступність відновлюючих еквівалентів. Цей чинник обумовлював також достовірне зниження швидкості *O*-деметилування *p*-нітроанізолу в клітинах, які виділені з тварин, що голодували протягом 48 годин.

За умов, коли швидкість-лімітуючим чинником монооксигеназної системи є рівень відновленості піридинових нуклеотидів (голодування, введення індуктора) присутність субстратів у середовищі може збільшувати швидкість метаболізму ксенобіотиків.

Використання за перфузії як комплексоу Ca^{2+} замість ЕДТА цитрату стимулювало метаболізм ρ -НА в гепатоцитах, які виділені в тварин, що голодували.

З метою детоксикації крові хворих у медичній практиці доцільно використовувати гепатоцити з підвищеною детоксикаційною активністю. Оптимальний підбір тварин за статтю - самці, введення індуктора фенobarбіталу та перфузія печінки середовищем, яке містить субстрат - цитрат дозволяють стримувати клітини, що в 2,8 рази ефективніше біотрансформують ρ -нітроанізол, ніж гепатоцити самок.

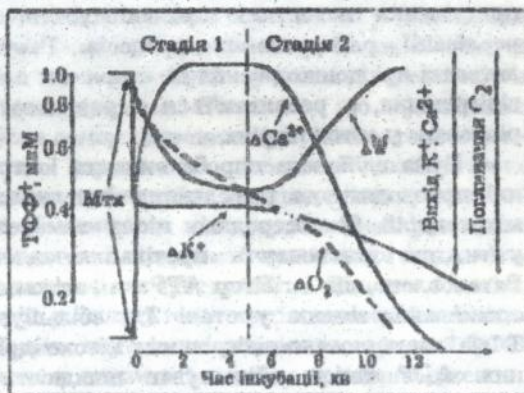
Порівняльне вивчення функціональних властивостей гепатоцитів, виділених розробленим неферментативним та ферментативним [Seglen, 1976] методами не виявило глибоких відмінностей у бар'єрних властивостях плазматичної та мітохондріальної мембран, енергетичному стані, транспорті іонів K^+ , активності глікококсигенази та швидкості біотрансформації ксенобіотиків. Об'єктивним доказом функціональної повноцінності гепатоцитів, виділених розробленим неферментативним методом, є їх здатність прикріплюватися, розпластуватися і утворювати моношар на культивування, тобто проявляти множинні біосинтетичні властивості.

У клітині різні метаболічні системи знаходяться в складній взаємодії одна з одною. Через це раніше ніж досліджувати дію низьких температур на функціональну активність субклітинних структур у складі клітини необхідно вивчити механізми їх криошкодження в ізольованому стані. Було з'ясовано, що мітохондрії та мікосоми мають різну криочутливість. Мікосомальна система біотрансформації ксенобіотиків, функціонування якої залежить, головним чином, від активності електрон-транспортного ланцюгу, виявляє високу криочутливість. Система окислювального фосфорильовання мітохондрій більш криобезпечна, тому що для її роботи необхідна також і збереженість бар'єрних властивостей мембран, які в більшій мірі зазнають порушень за дії низьких температур, ніж електрон-транспортні ланцюги.

Дослідження на ізольованих мітохондріях показали, що в залежності від умов криодії, вид пошкоджень та їх глибина можуть різнитися. Швидке заморожування-швидке відігрівання у сольовому середовищі призводить до утворення необоротних пошкоджень в структурі мембран мітохондрій. У випадку сахарозного середовища заморожування подальша інкубація виявляє дві часові стадії реакції систем іонного транспорту та окислювального фосфорилування мітохондрій на двох низьких температур, що відображає наявність двох різноспрямованих процесів. З мал. 3. видно, що на першій стадії досліджувані показники мітохондрій прагнуть до відновлення (швидкість дихання у стадії 2, мембранний потенціал) або не змінюються (внутрішньомітохондріальний вміст іонів K^+ та Ca^{2+}).

Відновлення ефективності окислювального фосфорилування мітохондрій, яке спостерігається на першій стадії, не залежить від температури, присутності АТФ, кисню, роз'єднувача, тобто не є енергозалежним процесом і, очевидно, обумовлене спонтанним замиканням трансмембранних дефектів, які утворюються в перебігу криодії. Замикання мембрани залежить від умов криодії (реалізується лише за найменш пошкодуючих з них) та складу середовища інкубації. Швидкість замикання зростає зі збільшенням іонної сили та зниженням осмотичного тиску середовища інкубації.

Процеси, що розвиваються на другій стадії інкубації, можна розглядати як "латентні криопошкодження". У їх розвитку приймають участь іони Ca^{2+} і фосфату, процеси перекисного



Мал. 3. Зміна мембранного потенціалу, транспорту іонів K^+ і Ca^{2+} та швидкості окислення сукцинату у стадії 2 в процесі інкубації мітохондрій після заморожування-відігрівання.

Фосфорилування мітохондрій, яке спостерігається на другій стадії інкубації, очевидно, обумовлене спонтанним замиканням трансмембранних дефектів, які утворюються в перебігу криодії. Замикання мембрани залежить від умов криодії (реалізується лише за найменш пошкодуючих з них) та складу середовища інкубації. Швидкість замикання зростає зі збільшенням іонної сили та зниженням осмотичного тиску середовища інкубації.

окислення та гідролізу ліпідів фосфоліпазою A₂. Взаємозв'язок між системами іонного транспорту та ліпідового обміну адійняється системою глутатіону, активність якої обумовлюється степінню відновленості піридинових нуклеотидів у матриці. Сумісне або роздільне введення інгібіторів перекисного окислення або гідролізу ліпідів, комплексонів іонів Ca²⁺, NAD(P)-залежних субстратів до складу середовища інкубації або заморожування забезпечує пригнічення латентних кріопшкоджень і створює умови для реалізації репаративних процесів. Результати показують, що латентні кріопшкодження не є примим наслідком заморожування-відігрівання, а розвиваються в результаті зрушень метаболічної рівноваги у мітохондріях.

Була адійснена спроба виявити іонтранспортируючі системи, які призводять до роз'єднання окислювального фосфорилування мітохондрій безпосередньо після заморожування-відігрівання за умов, що виключають протікання латентних кріопшкоджень. Встановлено, що інгібітор АТРази олігоміцин пригнічує швидкість споживання кисню у стадії 2 і збільшує швидкість акумуляції ТФФ⁺ заморожено-відігрітими мітохондріями до рівня контрольних. ADP також збільшував швидкість поглинання ТФФ⁺. І олігоміцин, і ADP інгібували набухання заморожено-відігрітих мітохондрій в ізотонічному розчині NH₄NO₃, яке зумовлене H⁺-провідністю внутрішньої мембрани [Brierly, 1970]. Після заморожування-відігрівання виявилася олігоміцин-резистентна АТРазна активність, що свідчить про відокремлення фактора F₁ від мембрани. При дисоціації факторів F₁ і F₀, останній може функціонувати як протонний канал. Отримані результати дозволяють вважати, що головною причиною роз'єднання окислювального фосфорилування мітохондрій після заморожування-відігрівання є виникнення протонної провідності через АТРазний канал, яка притічується олігоміцином та ADP.

Експерименти щодо прямого вимірювання утворення АТР показали, що ADP, доданий практично відразу після заморожено-відігрітих мітохондрій, адатний фосфорилуватися до АТР зі швидкістю, порівняваною зі свіжовиділеними мітохондріями. Ці результати показують, що роз'єднання окислювального фосфорилування, яке спостерігалось безпосередньо після заморожу-

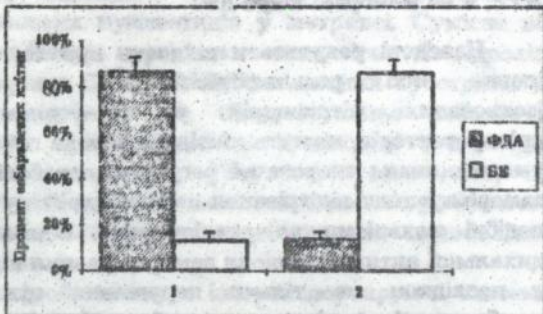
вання-відігрівання мітохондрій і визначалося через швидкість споживання кисню, є адекватним, оскільки ADP фосфорилується до АТР, а на мембрані існує ДУ.

Наведені результати свідчать про те, що структурні порушення, які розвиваються за заморожування-відігрівання ізольованих мітохондрій у сахарозному середовищі без кріопротекторів, можуть ліквідуватися за повернення у фізіологічні умови шляхом скерованої регуляції метаболізму. Разом з тим, за заморожування-відігрівання мітохондрій у складі гепатоцитів подібні механізми не реалізуються. З'ясовано, що притічення дихальної активності після заморожування-відігрівання гепатоцитів є наслідком не тільки порушення цілості плазматичної мембрани і вивільнення субстратів з цитоплазми, але й пошкодження внутрішньої мембрани мітохондрій. Внаслідок цього мітохондрії втрачають ендogenousні піридинові нуклеотиди і здатність окислювати NAD(P)-залежні субстрати. Більш глибокі пошкодження мітохондрій у складі гепатоцитів пов'язані з йонним складом цитоплазми. Заміна внутрішньоклітинного середовища на ізотонічну сахарозу дозволяє знизити величину кріопошкодження і створює умови для відновлення біоенергетичних показників мітохондрій у складі гепатоцитів.

Слід зазначити, що втрата клітиною низькомолекулярних субстратів і піридинових нуклеотидів у циклі заморожування-відігрівання є також головною причиною зниження монооксигеназної активності ізольованих гепатоцитів.

Широкі застосування ізольованих гепатоцитів у біологічних та медичних дослідженнях потребує створення банку клітин і, отже, розробки методів їх довготривалого зберігання. При розробці метода кріоконсервування враховували, що виживання гепатоцитів корелює з утворенням внутрішньоклітинних кристалів льоду. З мал. 4 видно, що 88% клітин, в яких за охолодження було випарито внутріклітинний лід, забарлювалися бромідом етідія, непрониклого через плазматичну мембрану, а 87% клітин, у цитоплазмі яких лід не утворювався, мали інтенсивну зелену флуоресценцію за інкубації з флуоресцеїндіацетатом, тобто залишалися інтактними. Було встановлено, що з метою запобігання утворенню

внутрішньоклітинного льоду важливо, щоб швидкість охолодження у температурній зоні кристалізації не перебільшувала 20°C/хв незалежно від початкової швидкості охолодження. Ця вимога може бути забезпечена використанням не тільки повільного охолодження суспензії з постійною швидкістю, але й експоненціальним заморожуванням з високою швидкістю на першому етапі і зупинкою в температурній зоні кристалізації.



Мал. 4. Вплив внутрішньоклітинної кристалізації на життєздатність гепатоцитів, яка поцінювалась за флуоресценцією броміду етідія (ВЕ) та флуоресцеїндацетату (ФДА). 1 - клітини без внутрішньоклітинного льоду, 2 - клітини з внутрішньоклітинним льодом.

Вивчення рівню пошкодження на кожному окремому етапі дозволило розробити метод кріоконсервування гепатоцитів [Заявка на винахід №4870736/14, пріор. 02.10.90 № 308, Позитивне рішення від 14.11.01]. Загибель клітин була мінімальною за повільного введення кріопротектора на льоду, швидкого двохступеневого заморожування суспензії густиною $5 \pm 15 \times 10^6$ клітин/мл з зупинкою в ділянці $-20 \pm -25^\circ\text{C}$, швидкого відігрівання і відмивання ДМСО середовищем, яке містить 0.5 М глюкозу або сахарозу. Ефективність даного методу кріоконсервування ізолюваних гепатоцитів порівнювана з кращими результатами, одержаними за інших програм заморожування [Coundouris et al, 1987; Chesne et al, 1988; Powis et al, 1988; De Loecker et al, 1990]. Разом з тим, швидке заморожування має ряд переваг, тому що знижує тривалість контакту клітин з гіпертонічним розчином кріопротектору, здатного на токсичну дію, і не потребує спеціального обладнання.

Після кріоконсервування вищеописаним засобом збереженість суспензії дорівнювала $64 \pm 4\%$ за початкового значення $87 \pm 1\%$. В процесі інкубації деконсервованих гепатоцитів досліджувані параметри (рівень АТР, дихальна активність, життєздатність)

знижувалися. Розподіл деконсервованих клітин у розчині перколу дозволив підвищити життєздатність кінцевої суспензії до рівня свіжовиділеної (86±2%). Після відокремлення загиблених клітин швидкість ендоченного дихання в перебігу інкубації зберігалась на постійному рівні, а вміст АТР збільшувався. При цьому дихальна активність деконсервованих гепатоцитів мало відрізнялась від свіжовиділених, а швидкість накопичення АТР була нижча в 2 рази. Причиною цього може бути встановлена втрата частки цитоплазматичного, але не мітохондріального, калію в процесі криоконсервування. За перенесення деконсервованих гепатоцитів у фізіологічні умови вони поглинають калій з середовища, що супроводжується збільшенням активності Na^+/K^+ -АТРазі і призводить до зменшення швидкості накопичення АТР.

Криоконсервування дозволяє в значній мірі (до 78%) зберегти не тільки детоксикаційну активність гепатоцитів, виділених з контрольних щурів, але й стимульовану внаслідок модифікації методу виділення, підбору та підготовки тварин, що дозволяє рекомендувати використання в медичній практиці криоконсервованих гепатоцитів з стимульованою системою поглинання та біотрансформації ксенобіотиків.

Криоконсервовані гепатоцити зберігали активність глікогеногенезу, прикріплювалися до колагенової підложки та розпластувалися за культивування, що свідчить про їх метаболічну повноцінність і можливість застосування в експериментальній біології як моделі печінки.

ВИСНОВКИ

1. Гепатоцити, виділені розробленим неферментативним методом, куди входять перфузія печінки розчином, що містить комплексони іонів Ca^{2+} , її дезагрегація з використанням вібрації і відокремлення інтактних клітин від пошкоджених, характеризуються високим ендоченним диханням, володіють здатністю накопичувати АТР та синтезувати глюкозу, метаболізувати ксенобіотики, утворювати моношар за культивування, потенціал-залежно поглинати ліпофільний катіон тетрафенілфосфоній.

2. Застосування вібрації дозволяє отримувати або мітохондрії з високими показниками ефективності окислювального фосфори-

лювання або суспензію одичних клітин, яка за низькошвидкісного центрифугування в ізотонічному сахарозному середовищі розділяється на дві фракції, одна з яких містить в собі гепатоцити з інтактною плазматичною мембраною, а друга - з пошкодженою. Клітини з пошкодженою плазматичною мембраною зберігають здатність до біотрансформації ксенобіотиків і функціональну активність мітохондрій у середовищі внутрішньоклітинного тислу.

3. Порівняльний аналіз гепатоцитів, виділених неферментативним та ферментативним методами, не виявив істотних відмінностей у бар'єрних властивостях цитоплазматичної та мітохондріальної мембран, здатності клітин до культивування, а також біотрансформації ксенобіотиків. Часткове зниження енергетичного потенціалу і рівня кальцію в гепатоцитах, виділених неферментативним методом, носить оборотний характер і відновлюється за інкубації клітин у фізіологічних умовах.

4. Поглинання і біотрансформація ксенобіотиків біфенілу та *p*-нітрованізолу гепатоцитами щурів залежать від вихідного стану тварини (статі, споживання), умов виділення та інкубації клітин. Максимальний рівень детоксикаційної функції було одержано на гепатоцитах ситих самців щурів, що отримували фенобарбітал. У випадку, коли швидкість-лімітуючим чинником біотрансформації ксенобіотиків є низький рівень відновленості піридинових нуклеотидів (голодування, індукція монооксигеназної системи), введення цитрату у середовище перфузії печінки збільшує детоксикаційну активність ізольованих клітин.

5. Встановлена різка криочутливість ізольованих субклітинних органел: після заморожування-відігрівання у середовищі без криопротекторів активність мітросомальної системи біотрансформації ксенобіотиків зберігається, а функція мітохондрій порушується. Головною причиною роз'єднання мітохондрій є виникнення протонної провідності через АТФазний канал, яка обумовлена дисоціацією факторів F_1 і F_0 фермента і пригнічується інгібіторами АТФази та ADP.

6. За умова високої іонної проникності у мембранах заморожено-відігрітих мітохондрій розвивається послідовність Ca^{2+} -залежних біохімічних реакцій (латентці крипошкодження), які включа-

ють окислення піридинових нуклеотидів, індукцію перекисного окислення та гідроліза ліпідів; їх пригнічення забезпечує значне відновлення функціональної активності, яке обумовлене спонтанним замиканням мембран внаслідок реасоціації субодиноць АТРази.

7. Процес замикання мембран мітохондрій найбільш повно реалізується після заморожування-відігрівання у середовищі неелектроліта, а його швидкість підлягає рівнянню кінетики реакції першого порядку, залежить від температури, іонної сили та осмотичного тиску середовища інкубації.

8. Заморожування-відігрівання гепатоцитів у середовищі без кріопротекторів призводить до необоротних пошкоджень плазматичної мембрани, пригнічення функцій внутрішньоклітинних мітохондрій і ендоплазматичного ретикулулу, збільшенню активності гліколізу. Головною причиною збурення монооксигеназної та дихальної активностей є втрата цитоплазматичних та мітохондріальних субстратів і кофакторів.

9. Заморожено-відігріті гепатоцити можуть бути використані як модель для вивчення взаємодії цитоплазматичних та мітохондріальних ферментних систем, оскільки зберігають внутрішньоклітинну просторову організацію, активність гліколізу, циклу Кребса та дихального ланцюгу мітохондрій.

10. Розроблено метод кріоконсервування гепатоцитів, який дозволяє в значній мірі зберегти життєздатність, рівень АТР, дихальну активність клітин, а також детоксикаційну активність як контрольних щурів, так і стимульовану внаслідок модифікації методу виділення клітин, підбору та підготовки тварин.

11. За використання кріоконсервованих гепатоцитів для вивчення детоксикаційної функції доцільно використовувати як кріопротектор гліцерин, який по кріозахисним властивостям декілька поступається ДМСО, але не пригнічує цитохром Р-450-залежні реакції, що дозволяє виключити етап відмивання від кріопротектора.

12. Характер змін параметрів функціональної активності деконсервованих гепатоцитів в процесі інкубації залежить від життєздатності суспензії. Після відокремлення пошкоджених в процесі кріоконсервування клітин в градієнті густини перколу

інтактні гепатоцити зберігають активність глікокогенезу, здатні накопичувати АТР, метаболізувати ксенобіотики, утворювати моношар за культивування. Встановлене зниження швидкості накопичування АТР після кріоконсервування обумовлене втратою частки цитоплазматичного калію, рівень якого відновлюється за повернення у фізіологічні умови за рахунок роботи Na^+/K^+ -АТРази.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ РОБІТ:

1. Лемешко В.В., Каліман П.А., Петренко А.Ю. Повышение чувствительности организма старых крыс к гормонам, проявляющееся на уровне мембран эндоплазматического ретикулума // Современные проблемы геронтологии и гериатрии. Материалы III закавказской научной конференции геронтологов и гериатров. - Тбилиси, 1977. - С. 26.
2. Каліман П.А., Лемешко В.В., Петренко А.Ю. Содержание цитохромов в микросомах печени крыс разного возраста в норме и при введении гормонов (тироксина и гидрокортизона) // Актуальные проблемы возрастной физиологии и биофизики. - К., Наукова думка, 1979. - С. 125-131.
3. Суббота Н.П., Мишнева Л.Г., Петренко А.Ю., Кузьмина Л.Н., Белоус А.М. Влияние субнулевых температур на митохондриальные мембраны // I-й Всесоюзный биофизический съезд: Тезисы докладов. Т.2 - М., 1982. - С. 5.
4. Петренко А.Ю., Белоус А.М., Лемешко В.В. Влияние скорости замораживания и отогрева на функциональное состояние и ионную проницаемость митохондрий печени крыс // Биохимия. - 1982. - 47, N 4. - С. 626-632.
5. Белоус А.М., Петренко А.Ю. Влияние скорости замораживания и отогрева на транспорт Ca^{2+} в митохондриях печени крыс // Украинский биохимический журнал. - 1982. - 54, N 2. - С.194-197.
6. Петренко А.Ю., Белоус А.М. Зміна функціонального стану та іонної проникності митохондрий печінки щурів після заморожування-відтавання // IV-й Український біохімічний з'їзд: Тези доповідей, ч.2. - К., Наукова думка, 1982. - С.139.
7. Петренко А.Ю. Влияние мембранотропных соединений на структурно-функциональное состояние митохондрий в процессе их

гипотермического хранения // Трансплантация органов и тканей. Тезисы докладов IX-й Всесоюзной конференции по пересадке органов и тканей. - Тбилиси, 1982. - С. 234-235.

8. Petrenko A.Yu., Belous A.M., Lemeshko V.V. The effect of freezing and thawing rates on the functional state and permeability of rat liver mitochondria // CRYO-letters. - 1982. - 3, N 3. - P. 136-147.

9. Petrenko A.Yu., Belous A.M., Govorukha T.P. The role of thawing rate in the preservation of structural and functional state of mitochondria subjected to deep freezing // II Int. Conf. on Water & Ions in Biol. Systems. - Bucharest, Romania, 1982. - P.159.

10. Петренко А.Ю. Влияние скорости замораживания и отогрева на активность дыхательной цепи митохондрий печени крыс // Криобиология и криомедицина. В. 12. - К., Наукова думка, 1983. - С.29-31.

11. Петренко А.Ю., Говоруха Т.П., Белоус А.М., Загнойко В.И. Электронномикроскопическое и полярографическое исследование митохондрий печени крыс при замораживании и оттаивании в сахарозной и солевой средах // Украинский биохимический журнал. - 1984. - 56, N 1. - С. 84-87.

12. Петренко А.Ю., Белоус А.М., Жегунов Г.Ф. Высвобождение Ca^{2+} из митохондрий печени крыс, подвергнутых глубокому замораживанию // Украинский биохимический журнал. - 1984. - 56, N 4. - С. 453-457.

13. Петренко А.Ю., Белоус А.М., Повгородов С.А., Маршанский В.Н., Ягужинский Л.С. Ионный транспорт в митохондриях печени крыс после замораживания-оттаивания // Украинский биохимический журнал. - 1984. - 56, N 6. - С. 651-656.

14. Петренко А.Ю., Белоус А.М., Маршанский В.Н., Повгородов С.А., Ягужинский Л.С. Роль липолиза и перекисного окисления липидов в индукции ионного транспорта митохондрий после замораживания-отогрева // Украинский биохимический журнал. - 1984. - 56, N 6. - С. 656-660.

15. Petrenko A.Yu. Changes in the mitochondrial membrane permeability for Ca^{2+} ions after freeze-thawing // Abstracts Third Int. Conf. on Water & Ions in Biol. Systems. - Bucharest, Romania, 1984. - P.213-214.

16. Петренко А.Ю. Восстановление функционального состояния митохондрий после низкотемпературного воздействия // Материалы XI конференции "Холод в биологии и медицине". - 1984. - С. 2.

17. Суббота Н.П., Петренко А.Ю., Дубур Г.Я., Озол Я.Я. Действие антиоксидантов на биоэнергетические характеристики митохондрий в условиях экспериментального анабиоза // II Всесоюзная конференция по анабиозу. - Рига, 1984. - С. 99.

18. Петренко А.Ю. Реабилитация субклеточных структур после действия низких температур // Медико-технические, фармакологические и научные аспекты медицинской профилактики, диспансеризации и реабилитации. Тезисы докладов. - Харьков, 1984. - С. 227-228.

19. Петренко А.Ю., Говоруха Т.П. Восстановление некоторых биоэнергетических показателей и ультраструктуры митохондрий печени после различных условий охлаждения // Медико-технические, фармакологические и научные аспекты медицинской профилактики, диспансеризации и реабилитации. Тезисы докладов. - Харьков, 1984. - С. 235-236.

20. Петренко А.Ю., Белоус А.М., Суббота Н.П. Особенности ионного транспорта в митохондриях печени крыс // Вісник Академії наук Української РСР. - 1986. - Л, N 5. - С. 28-33.

21. Белоус А.М., Суббота Н.П., Петренко А.Ю. Перспективы использования антиоксидантов в криобиологии // Тезисы II Всесоюзной конференции "Биоантиоксидант". - Черноголовка, 1986. - С. 82-83.

22. Петренко А.Ю. Взаимосвязь ионтранспортирующих систем в мембранах митохондрий после замораживания-отогрева // Криобиология. - 1986. - 1, N 3. - С. 47-48.

23. Petrenko A.Yu., Subbota N.P. Inhibition on the activity of mitochondrial electron transport chain by low temperature: losses of cytochrome c // CRYO-letters. - 1986. - 7. - P. 395-402.

24. Петренко А.Ю., Белоус А.М. Зміна мітохондріального метаболізму після заморожування-відігріву // Тези доповідей XII з'їзду Українського фізіологічного товариства ім.І.П.Павлова. - Львів, 1986. - С. 320.

25. Петренко О.Ю., Мишньова Л.Г., Сукач О.М. Зміна метаболічного стапу та активність іонтранспортних систем у мітохондріях після заморожування-відігріву // V Український біохімічний з'їзд. Тези доповідей Ч. 2. - К., 1987. - С. 148-149.

26. Петренко А.Ю., Белоус А.М., Суббота Н.П. Первичные и латентные криоповреждения митохондрий // Всесоюзный симпозиум "Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена". Тезисы докладов. - Пушкино, 1986. - С. 76-77.

27. Петренко А.Ю. Изучение репарации мембран митохондрий после замораживания-отогрева // Криобиология. - 1987. - N 2. - С. 24-29.

28. Петренко А.Ю., Белоус А.М., Суббота Н.П., Сукач А.Н. Способ получения изолированных клеток печени // Авторское свидетельство N 1310426, 15.01.87.

29. Петренко А.Ю. О возможности применения липидных везикул для реабилитации биологического материала после действия низких температур // Научно-технический прогресс в медицине и фундаментальные проблемы биологии. - Харьков, 1987. - С. 44-46.

30. Петренко А.Ю. Изучение репарации мембран митохондрий после замораживания-отогрева // Криобиология. - 1987. - 2. - С.24-29.

31. Петренко А.Ю., Назарова Л.В. Возникновение протонной проводимости в АТФ-синтазном комплексе митохондрий после действия низких температур // Криповреждение и криозащита биологических объектов. - К., Наукова думка, 1988. - С. 41-46.

32. Петренко А.Ю., Росляков А.Д., Белоус А.М. Определение детоксикационной активности гепатоцитов с помощью антипиринового теста // "Экспериментальное и клиническое обоснование методов криомедицины". - Харьков, 1988. - С. 130-135.

33. Петренко А.Ю., Радченко С.В. Изучение кинетики "замыкания" мембран митохондрий после замораживания-отогрева // Моделирование криобиологических процессов. - Харьков, 1988. - С. 95-104.

34. Сукач А.Н., Петренко А.Ю. Изучение антиоксидантной функции изолированных гепатоцитов с использованием бифенила // Тезисы докладов областной конференции молодых ученых

"Актуальные проблемы медицины и научно-технический прогресс".
- Харьков, 1988. - С. 19.

35. Кравченко Л.П., Андриенко А.Н., Семенченко О.А., Сукач А.Н., Петренко А.Ю. Способ получения изолированных клеток печени - Заявка на изобретение N 4221432/28-13 от 02.04.87. Положительное решение от 28.01.88.

36. Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Кравченко Л.П. Способ разделения гепатоцитов - Заявка на изобретение N 4272263/14 от 29.06.87. Положительное решение от 28.09.88. АС N 1510356, 1989.

37. Петренко А.Ю., Андриенко А.Н., Кравченко Л.П., Сукач А.Н. Некоторые характеристики состояния гепатоцитов крыс, изолированных неферментативным способом и инкубируемых *in vitro* // Цитология. - 1989. - 31, N 5. - С. 608-610.

38. Петренко А.Ю., Сукач А.Н. Выделение интактных митохондрий из печени крыс с использованием вибрации // Украинский биохимический журнал. - 1989. - 61, N 5. - С. 117-119.

39. Петренко А.Ю., Грищук В.П., Сукач А.Н., Росляков А.Д., Белоус А.М. Энергетическое состояние гепатоцитов сытых крыс, выделенных с помощью ЭДТА и вибрации // Биохимия. - 1989. - 54, N 12. - С. 1952-1955.

40. Петренко А.Ю. Репарация мембран митохондрий после криповреждения // Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума "Реконструкция, стабилизация и репарация биомембран". - Благовещенск, 1989. - С. 71.

41. Кравченко Л.П., Андриенко А.Н., Петренко А.Ю., Сукач А.Н. Неферментативный метод получения изолированных гепатоцитов: оценка их морфо-функциональной активности // Украинский биохимический журнал. - 1989. - 61, N 4. - С. 112-116.

42. Грищук В.П., Петренко А.Ю. Распределение липофильного катиона тетрафенилфосфония в изолированных гепатоцитах крыс после замораживания-отогрева // Биохимические аспекты криповреждения и криозащиты клеточных систем. - Харьков, 1989. - С. 98-103.

43. Мазур С.П., Петренко А.Ю. Криоустойчивость цитохром Р-450-зависимого *O*-деметилирования *p*-нитроанизола в изолированных микросомах печени крыс // Биохимические аспекты

криповреждения и криозащиты клеточных систем. - Харьков, 1989. - С. 104-108.

44. Загородний И.В., Василенко Н.М., Петренко А.Ю., Падалка В.И. Особенности токсикодинамики красителя кубозоля красно-коричневого Ж на клеточном и субклеточном уровнях // Морфология, эпидемиология и клиника инфекционных болезней. - Харьков, 1989. - С. 32-35.

45. Belous A.M., Babychuk I.A., Zemlyanskikh N.G., Ryazantsev V.V., Petrenko A.Yu. Current problems of cryopreservation of cell suspensions // Low temperature 90th Societies for low temperature Biology of United Kingdom and Czechoslovakia. May 22-27, 1990. - West Bohemia, Czechoslovakia, 1990. - P. 33-34.

46. Petrenko A.Yu., Belous A.M. The redox state of pyridine nucleotides controls the lipid peroxidation, membrane permeability for ions, and mitochondrial function after freeze-thawing // Low temperature 90th Societies for low temperature Biology of United Kingdom and Czechoslovakia. May 22-27, 1990. - West Bohemia, Czechoslovakia, 1990. - P. 28.

47. Сукач А.Н., Петренко А.Ю. Модификация метаболизма бифенила в изолированных гепатоцитах сывороточным альбумином // Всесоюзная научная конференция "Актуальные проблемы лекарственной токсикологии". Ч. 3. - М., 1990. - С. 300.

48. Петренко А.Ю., Мазур С.П., Росляков А.Д., Сукач А.Н. Связывание, транспорт и метаболизм ксенобиотиков изолированными гепатоцитами // Всесоюзная научная конференция "Актуальные проблемы лекарственной токсикологии". Ч. 2. - Киев, 1990. - С. 225.

49. Petrenko A.Yu. The investigation of the kinetics of mitochondrial membrane resealing after cryoinjury // 27th Annual Meeting of Society for Cryobiology. - USA, New York, 1990. - P. 14.

50. Петренко А.Ю., Гришук В.П. Определение активности Na,K-АТФазы и субклеточного распределения ионов калия в свежевыделенных гепатоцитах // Цитология. - 1990. - 32, N 9. - С. 944-945.

51. Петренко А.Ю., Гришук В.П. Влияние замораживания отогрева под защитой диметилсульфоксида на сохранность изолированных гепатоцитов крыс // Физико-химические свойства и

биологическое действие криопротекторов. - Харьков, 1990. - С. 109-114.

52. Петренко А.Ю., Гришук В.П. Чувствительность к замораживанию-отогреву митохондрий в составе интактных и пермеабелизированных гепатоцитов // Влияние охлаждения на биологические объекты. - Харьков, 1990. - С. 109-120.

53. Мазур С.П., Петренко А.Ю. Влияние голодания на биотрансформацию *p*-нитроанизола и дыхательную активность гепатоцитов самцов и самок крыс // Док. в ВИНТИ 27.05.91. N 2216-B91. - 16 с.

54. Petrenko A.Yu., Sukach A.N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // Analytical Biochem. - 1991. - 194, N 2. - P. 326-329.

55. Петренко А.Ю., Гришук В.П., Росляков А.Д., Мазур С.П. Способ консервирования гепатоцитов. Заявка на изобретение N 4870736/14, приор. 02.10.90 N 308. Положительное решение от 14.11.91.

56. Мазур С.П., Белоус А.М., Петренко А.Ю. Изучение причин угнетения активности системы биотрансформации *p*-нитроанизола в изолированных гепатоцитах крыс после криоконсервирования // Проблемы криобиологии. - 1991. - N 4. - С. 3-5

57. Петренко А.Ю. Дыхательная активность изолированных гепатоцитов // Украинский биохимический журнал. - 1991. - 63, N 4. - С. 114-118.

58. Сукач А.Н., Петренко А.Ю. Экзогенный NADPH восстанавливает детоксикационную функцию изолированных гепатоцитов, утраченную в процессе замораживания-отогрева // Украинский биохимический журнал. - 1991. - 63, N 6. - С. 53-56.

59. Сукач А.Н., Петренко А.Ю., Белоус А.М. Роль альбумина в биотрансформации бифенила изолированными гепатоцитами крыс // Украинский биохимический журнал. - 1991. - 63, N 6. - С. 57-61.

60. Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Росляков А.Д. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности // Биохимия. - 1991. - 56, N 9. - С. 1647-1651.

61. Петренко А.Ю., Росляков А.Д. Изменение содержания некоторых метаболитов в изолированных гепатоцитах крыс после замораживания-отогрева // Холодовый анабиоз. - К., Наукова думка, 1991. - С. 16-21.

62. Петренко А.Ю., Росляков А.Д. Энергетическое состояние и активность глюконеогенеза в изолированных гепатоцитах крыс до и после криоконсервирования // Физико-химические процессы в криобиологических системах. - Харьков, 1991. - С. 111-119.

63. Петренко А.Ю., Щенявская Е.Н. Изучение эффективности окислительного фосфорилирования и кинетики замыкания мембран митохондрий после замораживания-отогрева в средах различного состава // Физико-химические процессы в криобиологических системах. - Харьков, 1991. - С. 120-127.

64. Зинченко А.В., Петренко А.Ю. Низкотемпературные фазовые переходы в среде для криоконсервирования гепатоцитов на основе ДМСО // Физико-химические процессы в криобиологических системах. - Харьков, 1991. - С. 56-59.

65. Petrenko A.Yu., Mazur S.P. Rate-limiting factors of xenobiotics biotransformation in isolated hepatocytes after cryopreservation // 1st European Conference on Tissue Banking and Clinical Application - Germany, Berlin, 1991.- P. 124.

66. Сукач О.М., Петренко О.Ю. Дія альбуміну при пошкодуючому впливі ксенобіотиків на ізольовані клітини печінки щурів // VI-й Український біохімічний з'їзд. Тези доповідей. Ч. 1. - К., 1992. - С. 22.

67. Мазур С.П., Петренко О.Ю. Вплив фенобарбіталу на метаболізм р-нітроанізолу в інтактних та пермеабілізованих гепатоцитах щурів // VI-й Український біохімічний з'їзд. Тези доповідей. Ч. 1. - К., 1992. - С. 205.

68. Петренко О.Ю., Сукач О.М., Мазур С.П., Росляков А.Д., Грицик В.П. Модифікація клітинного метаболізму на етапі виділення гепатоцитів // VI-й Український біохімічний з'їзд. Тези доповідей. Ч. 1. - К., 1992. - С. 219.

69. Петренко О.Ю., Сукач О.М., Мазур С.П. Деякі напрямки підвищення ефективності застосування ізольованих гепатоцитів у клініці для лікування печінкової недостатності // IV конгрес

світової федерації українських лікарських товариств. Тези. - Харків, 1992. - С. 186 (448).

70. Гришук В.П., Петренко А.Ю., Мазур С.П., Росляков А.Д. Функции гепатоцитов после быстрого двухэтапного замораживания и отогрева под защитой ДМСО // "Успехи современной криобиологии". II Международная конференция. Тезисы. - Харьков, 1992. - С. 108-109.

71. Петренко А.Ю., Мазур С.П., Белоус А.М. Перспективы выделения и применения в медицине "функционально стимулированных" гепатоцитов // "Успехи современной криобиологии". II Международная конференция. Тезисы. - Харьков, 1992. - С. 139-140.

72. Petrenko A.Yu. A mechanism of latent cryoinjury and reparation of mitochondria // Cryobiology. - 1992. - 29. - P. 144-152.

73. Petrenko A.Yu., Grischuk V.P., Roslyakov A.D., Mazur S.P., Belous A.M. Survival, metabolic activity and transport of potassium ions of rat hepatocytes after rapid freeze-thawing under protection of dimethylsulfoxide and separation in Percoll density gradient // Cryo-Letters. - 1992. - 13. - P. 87-98.

74. McGann L.E., Hongyou Yang, Zhixiu Huang, Petrenko A., Larese A. Cell-to-cell and cell-to surface interactions after responses during cryopreservation // 16th Annual Meeting American Association of Tissue Banks. -USA, San Diego, California, 1992, P.12.

75. Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Mazur S.P. A loss of pyridine nucleotides results in the inhibition of respiratory activity and metabolism of xenobiotics of isolated rat hepatocytes after freeze-thawing // 29th Annual Meeting of Society for Cryobiology Cornell University. - USA, New York, 1992. - P. 33-34.

76. Petrenko A.Yu., Hongyou Yang, Locksley E. McGann. Loss of cell-to-surface adhesion during cryopreservation // 29th Annual Meeting of Society for Cryobiology. - USA, New York, 1992. - P. 25-26.

77. Petrenko A.Yu., Mazur S.P. Inhibition of biotransformation of a xenobiotic p-nitroanisole after cryopreservation of isolated rat hepatocytes // Cryobiology. - 1993. - 30. - P.158-163.

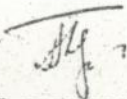
78. Малоптан Л.М., Петренко О.Ю. Модельне дослідження механізму дії гіпоглікемічних препаратів на життєздатність та ме-

табличку активність гепатоцитів // Вісник Фармації. - 1993. - 1-2. - С.107-110.

79. Петренко А.Ю., Росляков А.Д. Окисление экзогенного NADH свежеразделенными и замороженно-отогретыми гепатоцитами // Проблемы криобиологии. - 1993. - 2. С.34-39.

80. Petrenko A.Yu., Roslyakov A.D., Grishchuk V.P., Mazur S.P. Factors affecting the functions of cryopreserved rat hepatocytes during incubation // 30th Annual Meeting of Society for Cryobiology. - USA, New York, 1993. - P. 25-26.

81. Mazur S.P., Petrenko A.Yu., Roslyakov A.D. Choosing cryoprotectant for maintenance of biotransforming activity of hepatocytes, cryopreserved by two-stage rapid freeze-thawing // Cryo-Letters. - 1993. - 14. - P. 5-12.



Ответственный за выпуск
академик АН Украины В.И. Грищенко.

Полп. в печать 11.11.93г. формат 60/х 84' 1/16

Объем: 1,5 усл.- печ.л., 1,5 уч.-изд.л

Тир.50. Зак.276

Редакционно - издательский отдел Харьковского государственного аграрного университета им. В.В.Довгучаева, 312131, г. Харьков
п/о Коммунист- I, учебный городок ХГАУ

Участок оперативной печати

463143

AB 28.607

AB 28.607