Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Мазур Оксана Євгенівна

УДК: 617- 089.843:611-013:612.015.1.331]-074

**Активність ферментів енергетичного обміну ембріональних трансплантатів**

03.00.04-біохімія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2008

Äèñåðòàö³ºþ º ðóêîïèñ.

Робота виконана у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України.

Науковий керівник:

доктор медичних наук, профессор Скляров Олександр Якович,

Львівський національний медичний університет

імені Данила Галицького МОЗ України, завідувач кафедри біологічної хімії.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, профессор Великий Микола Миколайович,

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,

провідний науковий співробітник відділу біохімії коферментів;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Хижняк Світлана Володимирівна,

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,

біологічний факультет, провідний науковий співробітник

лабораторії фізико-хімічної біології.

Захист відбудеться 20.05.2008 р. о 13-30 год.

на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, просп. Глушкова 2, корпус 12, біологічний факультет, ауд. 434.

Поштова адреса: 01033, Київ-33, вул. Володимирська 64, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, спеціалізована вчена рада Д 26.001.24.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Київського національного університету імені Тараса Шевченка: м. Київ, вул. Володимирська 58.

Автореферат розісланий 17.04.2008 р.

Вчений секретар Т.Р. Андрійчук

спеціалізованої вченої ради.

**Загальна характеристика роботи**

Актуальність теми. Ембріональним тканинам властиві характерні морфологічні та біохімічні особливості. Вони складаються, в основному, з бластних та стовбурових клітин, яким притаманні низька антигенність та високий проліферативний і енергетичний потенціал [Грищенко В.І. та ін., 2004].

Cаме ці властивості зумовили широке використання ембріональних тканин і клітин у експериментальній та клінічній медицині для трансплантації з метою стимуляції регенерації, оскільки на основі трансплантованих тканин створюють модель для регенераційних процесів [Азолов В. В и др., 1989].

Регенераторні процеси не лише забезпечують відновлення дефекту тканин при їх пошкодженні, але також є структурною основою відновлення клітинних та тканинних функцій [Tiboni G. M. et al., 1999]. У зв’язку з цим інтенсивність і характер регенераційних процесів суттєво впливають на резистентність організму. Одним із визначальних шляхів впливу на регенераційні процеси є модифікація енергетичного обміну як в тканині, так і на рівні організму [Backstrom S. et al.,1996, Le Bras S., 1998], враховуючи його значення для регулювання проліферативної активності.

Широке застосування трансплантації ембріональних тканин і клітин у медицині обумовило дослідження ряду питань, які пов’язані з визначенням їх впливу на перебіг різноманітних захворювань та вивчення протікання метаболічних процесів (зокрема енергообміну) у трансплантатах.

Таким чином, вивчення метаболізму ембріональних тканин та клітин має подвійну мету – з однієї сторони це виявлення біохімічних особливостей енергетичного обміну ембріональних тканин і клітин, з іншої - визначення метаболічних взаємовідносин ембріональних трансплантатів і тканин організму реціпієнта, що може бути використане у практичній медицині.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисетаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт кафедри факультетської хірургії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького у рамках теми “Вивчити ступінь операційного ризику в адомінальній хірургії з метою попередження ускладнень” № д/р ВН. 21. 00. 000189.

Мета та завдання дослідження.

Метою роботи було дослідити активність ферментів енергетичного обміну ембріональної очеревини, шкіри та остеобластів до та після алотрансплантації зрілому реціпієнту.

У зв'язку з цим поставлено такі завдання:

1. Визначити активність ферментів гліколізу, циклу трикарбонових кислот, пентозофосфатного шляху ембріональної очеревини та шкіри.

2. Визначити активність ферментів лактатдегідрогенази, малатдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази ембріональних остеобластів.

3. Провести гісто-морфологічні дослідження вільно пересаджених зрілому реціпієнту алогенних трансплантатів ембріональної очеревини та шкіри.

4. Дослідити активність ферментів енергетичного обміну (сукцинатдегідрогенази, лактатдегідрогенази, малатдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази) та вміст лактату й пірувату в ембріональних трансплантатах очеревини та шкіри після алотрансплантації зрілому реціпієнту.

5. Дослідити активність ферментів енергетичного обміну ембріональних остеобластів після алотрансплантації зрілому реціпієнту.

6. Провести порівняльний аналіз біохімічних показників енергетичного обміну в трансплантованій ембріональній очеревині, шкірі та остеобластах з використанням факторного та кластерного аналізу.

Об’єкт дослідження: процеси енергетичного обміну ембріональної очеревини, шкіри та остеобластів до та після алотрансплантації зрілому реціпієнту.

Предмет дослідження: активність ферментів енергетичного обміну; вміст лактату та пірувату ембріональної очеревини, шкіри та остеобластів до та після трансплантації зрілому реціпієнту.

Методи дослідження: біохімічні, спектрофотометричні, гістологічні, математичної варіаційної статистики та факторний і кластерний аналізи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено порівняння біохімічних шляхів енергозабезпечення ембріональної очеревини, шкіри та ембріональних остеобластів. Встановлено, що особливості метаболізму ембріональних тканин визначаються морфологічною структурою тканини й ступінню її диференціації. Показано, що після алотрансплантації зрілому реціпієнту метаболічні зміни в пересаджених тканинах визначаються рівнем розвитку тканини, вихідною функціональною активністю та структурними перетвореннями, що відбуваються в трансплантатах. Встановлено, що різні ембріональні тканини характеризуються відмінністю перебігу метаболічних процесів після вільної алотрансплантації зрілому реціпієнту, а їх адаптивні можливості до метаболічних умов дорослого організму залежать від морфологічної зрілості. Вперше, на основі отриманих результатів, показано, що перебіг енергетичних процесів у вільно трансплантованих ембріональних тканинах є відмінним від такого у тканинах зрілого реціпієнта.

Практичне значення отриманих результатів. Вперше обгрунтовано застосування вільної алотрансплантації ембріональних тканин для активної безпосередньої корекції процесів тканинної репарації з метою підвищення надійності та ефективності загоєння ран. Результати роботи підтверджені патентом на винахід України (Патент 6755, Україна, МКВ 5 А61В 17/00, А61К 35/00, 1994 р.) „Спосіб перитонізації кукси дванадцятипалої кишки”.

Результати досліджень впроваджені в навчальний процес на кафедрах нормальної фізіології, біохімії, факультетської хірургії Львівського національного медичного університету, а також у клінічну практику хірургічних відділів Львівської обласної клінічної лікарні.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто виконано забір та попередню обробку клітинного та тканинного експериментального матеріалу, проведено біохімічні дослідження, обробку та теоретичне обгрунтування результів досліджень. Клініко-морфологічне обстеження оперованих тварин проведено разом з доцентом кафедри гістології та ембріології к. мед. н. Вишемірською Л. Д.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації доповідались на XVIII з’їзді Європейського товариства штучних органів (Відень, 1991), IV конгресі світової федерації українських лікарських товариств (Харків, 1992), на І національному конгресі анатомів, гістологів, ембріологів та топографоанатомів України (Івано-Франківськ, 1994), VII Українському біохімічному з’їзді (Київ, 1997), VII з’їзді Всеукраїнського лікарського товариства (Тернопіль, 2003), International conference “Neuro - humoral and cellular regulatory mechanism of digestion processes” (Львів, 2003).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 робіт, з них 4 статті у фахових виданнях, визначених ВАК України, 10 тез доповідей у збірках матеріалів міжнародних та вітчизняних конференцій, симпозіумів, конгресів та 1 патент на винахід України.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, додатків, списку використаних літературних джерел, що містить 165 найменувань. Матеріали дисертаційної роботи викладені на 149 сторінках машинописного тексту, ілюстровані 49 таблицями, 30 рисунками та 15 фотографіями.

**Матеріали та методи досліджень**

Робота виконана на 110 статевозрілих самцях кролів, яких було розділено на 5 груп. Першій групі тварин (28 кролів) виконано аллотрансплантацію ембріональної очеревини, другій (28 кролів) — алотрансплантацію ембріональної шкіри. Кожній тварині пересаджено 3 препарати ембріональної тканини на незашиту рану тонкої кишки за загальноприйнятою методикою. Третю групу (контроль) склали тварини які утримувалися за стандартних умов віварію (12 кролів), четверту — тварини, яким виконано ентеротомію за прийнятою методикою з однорядним швом рани кишки (12 кролів). Тваринам 5-ї групи (30 кролів) пересаджено ембріональні остеобласти в кісткову рану.

Тварини виводились з експерименту шляхом пропускання електричного струму через спинний та довгастий мозок. Експерименти проводились у відповідності до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях.

Тварин оперували під комбінованим дом’язовим наркозом. Виконували повздовжню ентеротомію (1,5-2,0 см). Рану кишки або залишали відкритою, або зашивали вузловими серозно-м’язовими однорядними повздовжніми швами [Мазур Ю. І., 1996].

Донорами ембріональних тканин і клітин слугували ембріони самки кроля кінця другого – початку третього тижня вагітності. З черевної стінки ембріона сепарували препарати шкіри та м’язово-очеревинного пласту, котрий у подальшому умовно називали очеревиною. Препарати діаметром 1,5-2,0 см фіксували швами поверх рани тонкої кишки.

Для виділення остеобластів використовували росткові зони трубчатих кісток кінцівок трьохтижневого ембріона кроля. Під мікроскопом МБИ-6 при чотирьохразовому збільшенні в умовах темного поля локалізували росткові зони кісток і висікали їх [Созанский О.А. и др., 1998]. Одержаний матеріал гомогенізували в гомогенізаторі Поттера-Евельгейма при 200 об/хв у трьох вертикальних ходах. Для одномоментної трансплантації використовували 200-300 мг клітинної суспензії [Дибас Б.В., 1996].

У подальшому досліджували препарати отримані з ембріональних тканин (очеревина, шкіра) та клітин (остеобласти) до та після алотрансплантації, а також препарати отримані з тонкої кишки реціпієта.

Виділення мітохондріальної та цитоплазматичної фракції здійснювали за методикою диференційного центрифугування [Johnson D., Lardy H.,1967].

Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), сукцинатдегідрогенази (СДГ, КФ 1.3.99) визначали методом [Eщенко Н.Д., 1982], малатдегідрогенази (МДГ, КФ 1.1.1.37) – згідно [Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г., 1982], глюкозо - 6 – фосфатдегідрогенази (Гл -6- ФДГ, КФ 1.1.1.49) – згідно [Путилин Ф.Е., Зоидзе С.Д., 1982], визначення активності кислої фосфатази (КФ, КФ 3.1.3.2) проводили з використанням стандартних наборів реактивів „LACHEMA” (Чехія).

Визначення кількості піровиноградної кислоти в тканинах здійснювали за методом [Czok R., Lamprecht W., 1970]. Вміст молочної кислоти в тканинах визначали згідно з [Hohorst H., 1970].

Гістологічні препарати забарвлювали гематоксилін-еозином за загальноприйнятою методикою [Ромейс В., 1953] й вивчали під світловим мікроскопом.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили згідно зі загальноприйнятими методами варійційної статистики за допомогою пакету прикладних програм STATGRAFICS, а також з використанням факторного та кластерного аналізу [Харман Г., 1972, Лакин Г.Ф., 1990].

**Результати досліджень та їх обговорення**

Морфологічна характеристика вільно алотрансплантованих ембріональних тканин. Внаслідок трансплантації ембріональних тканин в організмі реціпієнта виникає реакція на трансплантат, однак вона маловиражена й перебігає дуже повільно. Імунна реакція на трансплантацію ембріональних тканин не має характерних ознак реакції відторгнення трансплантата, інтенсивність її не залежить від виду пересадженої тканини, морфологічними проявами її є лімфоїдна інфільтрація пересадженої тканини з повнокрів’ям судин.

Після трансплантації ембріональна очеревина з третьої доби набуває сполучнотканинної будови. У трансплантаті протягом двох тижнів спостерігається значне зменшення кількості лімфоїдних елементів та повнокрів’я. Наприкінці 3-го місяця трансплантат має вигляд ледь помітної смужки й побудований зі сполучної та прошарку жирової тканини, частково з’єднаної зі стінкою кишки.

У випадку трансплантації ембріональної шкіри трансплантат з ранніх термінів спостереження має будову, що в цілому відповідає будові шкіри – зроговілий епітелій, волосяні фолікули. Сполучнотканинна основа пересадженої шкіри побудована з молодої грануляційної тканини. Характерними є крововиливи, лімфоїдна інфільтрація.

Протягом усього терміну дослідження після операції спостерігаються послідовні ознаки очищення сполучної тканини трансплантата, багатої на клітини фібробластичного ряду, від лейкоцитарної та еритроцитарної інфільтрації, перетворення зачатків і сформованих волосяних фолікулів у дрібні рогові кісти. Через 6 місяців після операції трансплантат має вигляд тонкого прошарку повнокровної сполучної тканини або повністю заміщується жировою тканиною.

Морфо-функціональні особливості ембріональних трансплантатів зберігаються обмежений проміжок часу, а відтак пересаджені тканини поступово заміщуються сполучною чи жировою тканиною.

Характеристика процесів енергозабезпечення ембріональних тканин і клітин. Встановлено, що гліколіз найбільш інтенсивно протікає в ембріональній очеревині. Серед досліджуваних ембріональних об’єктів для ембріональної очеревини характерна висока активність ЛДГ (рис. 1) і значний вміст пірувату та лактату.

Активність ферментів циклу трикарбонових кислот (ЦТК) є найвищою в ембріональних остеобластах. Показники активності цитоплазматичної малатдегідрогенази (МДГ (ц)) (42,74±3,28 мкмоль НАДН/хв · мг білка) та мітохондріальної малатдегідрогенази (МДГ(м)) (38,93 ± 5,64 мкмоль НАДН/хв · мг білка) перевищують показники активності цих ферментів, які складають відповідно 30,7 ± 2,1 та 40,67 ± 2,74 мкмоль НАДН/хв · мг білка у досліджуваних препаратах ембріональної очеревини; відповідно 24,13 ± 2,22 та 23,65 ± 1,85 мкмоль НАДН/хв · мг білка у препаратах ембріональної шкіри.

Для ембріональної шкіри характерна висока (порівняно з іншими ембріональними об’єктами) активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Гл-6-фДГ).

Для ембріональної очеревини, на відміну від ембріональної шкіри, притаманні вищі показники активності ферментів, що може характеризувати процеси як гліколізу, так і ЦТК при незначній активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази - регуляторного ферменту пентозофосфатного шляху. Оскільки ембріональна очеревина - мало диференційована тканина, то, імовірно, високі потенційні можливості реалізуються в подальшій диференціації тканини. Підвищення активності ферментів гліколізу та ЦТК в ембріональних остеобластах може бути пояснена значною енергоємністю пластичних процесів, що протікають в ембріональній кістці (розвиток і ріст кісткової тканини потребують великих енергетичних витрат).

Особливості енергозабезпечення ембріональних тканин після трансплантації. Протікання метаболічних процесів у препаратах тонкої кишки після ентеротомії в ранньому післяопераційному періоді супроводжується значним підвищенням активності ферментів ЦТК – на 3-ю добу активність МДГ(ц) зростає в середньому в 8,5 раза, МДГ(м) - у 3 рази та сукцинатдегідрогенази (СДГ) майже у в 2 рази (рис. 3, 4).

Одночасно, майже в 4 рази зменшується кількість пірувату та падає рівень лактату. Активність лактатдегідрогенази достовірно зростає, і становить 28,98 ± 1,44 мкмоль НАДН/хв.мг білка (р≤0,05). При цьому активність Гл-6-фДГ – ферменту окислювальної стадії пентозофосфатного шляху значно знижується впродовж 7-и днів після ентеротомії.

На 7-у добу після операції, за умов розвитку адаптаційно-компенсаторних реакцій спрямованих на поступове відновлення метаболізму клітини, рівень показників, що характеризують активність МДГ, повертається до вихідних величин. Водночас активність СДГ, ЛДГ та Гл- 6- фДГ - на 14-ту добу після операції перевищує контрольні значення.

При дослідженні показників енергообміну ембріональних шкіри, очеревини та остеобластів після алотрансплантації зрілому реціпієнту встановлено, що на третю добу після трансплантації ембріональної очеревини в пересадженій тканині знижується активність ЛДГ (у середньому на 33%), зменшується вміст метаболітів гліколізу (пірувату, лактату в тканині та крові), що може свідчити про інгібування процесів анаеробного гліколізу. Активність МДГ(м) знижується (у середньому на 49%) відносно вихідних показників ембріональної тканини, та відносно контрольних показників тонкої кишки (у середньому на 23%), активність МДГ(ц) зменшується відносно вихідної активності інтактної ембріональної тканини (у середньому на 46%), а активність СДГ достовірно зростає.

У перші три доби в умовах раннього післяопераційного періоду, за вираженої тканинної ішемії, активуються біосинтетичні процеси – спостерігається зростання (відносно вихідної активності інтактної ембріональної тканини), у середньому майже у 2 рази активності Гл- 6- ФДГ.

Через тиждень після алотрансплантації рівень досліджуваних показників енергообміну пересадженої тканини відповідає показникам притаманним для інтактної ембріональної очеревини.

Таким чином, протягом 7-ми діб, незважаючи на явища тканинної ішемії, які мали місце в ранньому післяопераційному періоді, відновилася її вихідна функціональна активність.

На третю добу після алотрансплантаціі ембріональної шкіри зменшується активність ферментів ЦТК, водночас зменшується, порівняно з інтактною ембріональною тканиною, (у середньому на 20%) активність ЛДГ, рівень пірувату залишається без змін, що характеризує стан тканинної ішемії.

Через тиждень після трансплантації ембріональної шкіри спостерігається подібна (як і для ембріональної очеревини) динаміка в змінах активності ферментів ЦТК; одночасно зростає рівень пірувату та лактату в крові. Проте, зміни у величинах досліджуваних показників менш виражені в порівнянні з ембріональною очеревиною.

У пізніші терміни спостереження зміни показників гліколізу, циклу трикарбонових кислот, пентозофосфатного шляху характеризуються подібністю: зростання на 7-му, з наступним зменшенням на 14-ту добу.

Через місяць після трансплантації ембріональних тканин, характерно наступне: кількість пірувату й лактату в тканині стабілізується й утримується на одному рівні, хоча показники дещо нижчі від контрольних показників тонкої кишки. У той же час активність ЛДГ змінюється – незначно зростає на 30-ту добу, падає на 60-ту й знову зростає на 90-ту добу спостереження (рис. 8). Регенераційні процеси, як і більшість метаболічних процесів у біологічних системах, мають фазовий характер.

Одночасно спостерігається ініціювання циклу трикарбонових кислот, активність ферментів якого зростає.

Встановлена динаміка змін досліджуваних показників характеризує особливості метаболізму, які виникають у зв'язку з морфологічною трансформацією пересаджених тканин, і, мабуть, втратою ними характерних для ембріональних тканин як структурних, так і метаболічних особливостей.

Особливості метаболічних процесів вільно алотрансплантованих ембріональних остеобластів. При вільній алотрансплантації ембріональних остеобластів пересаджені клітини опиняються в ситуації зумовленій ізольованістю трансплантата від оточуючих тканин, оскільки реваскуляризація неокістки здійснюється кістковою тканиною реціпієнта. Відсутність повноцінного судинного зв’язку з оточуючою тканиною визначає, по-перше, певну незалежність метаболічних процесів, по-друге, тканинну ішемію трансплантованих клітин.

У перші дні після трансплантації, спостерігається відносна стабільність активності ЛДГ (22,35 ± 6,01 мкмоль НАДН/хв · мг білка) порівняно з вихідним рівнем (26,14 ± 1,15 мкмоль НАДН/хв · мг білка).

Водночас, у ранньому післяопераційному періоді, спостерігається значне зменшення активності ферментів циклу трикарбонових кислот: МДГ (ц) у середньому більш аніж у 2 рази, МДГ (м) майже у 2 рази, сукцинатдегідрогенази — у 1,6 раза.

На сьому добу післяопераційного періоду в середньому в 2,5 раза зростає активність МДГ (ц), хоча й не досягає величин вихідних показників, і, що особливо важливо, СДГ (в середньому на 20%). Відомо, що активність СДГ зростає в екстремальних умовах, коли є необхідним продукування великої кількості енергії за короткий час. Завдяки зростанню активності ферментів циклу Кребса покращується енергозабезпечення репараційних процесів.

На 14-ту добу після алотрансплантації активність усіх досліджуваних ферментів порівняно з вихідними контрольними показниками значно зменшується: ЛДГ — у середньому 2,6 раза, МДГ(ц) — у 2,8 раза, МДГ(м) — у 5 разів, СДГ — у 3 рази, що може бути пояснене зменшенням енергетичних та пластичних потреб у зв’язку з відповідною морфологічною перебудовою трансплантованих остеобластів.

Активність Гл-6-ФДГ на третій день післяопераційного періоду зберігається практично на рівні вихідного показника, у той же час активність кислої фосфатази (КФ) — зменшується. Тобто, біосинтетичні процеси протікають на рівні характерному для інтактних ембріональних клітин, а деструктивні процеси є мінімальними. Через 7 діб після трансплантації активність Гл-6-ФДГ значно зростає при подальшому падінні активності КФ, що свідчить про високий рівень перебігу репаративних процесів.

Оцінка протікання процесів енергетичного забезпечення трансплантованих ембріональних тканин та клітин проведена на основі факторного аналізу. Виконано аналіз числових характеристик біохімічних показників, сформовано кореляційні матриці відповідно до термінів спостережень, проведено розрахунки для головних факторів з найбільшим відсотковим та нагромадженим вкладом та визначено їх зв’язки з окремими досліджуваними біохімічними показниками.

Встановлено, що для ембріональних тканин характерним є поєднання двох різних типів енергозабезпечення, які умовно можна назвати «ембріональний тип енергообміну» (характеризується кореляційним зв’зком з активністю Гл-6-ФДГ (r = 0,72), вмістом лактату (r = 0,93) і пірувату (r = 0,83), та «зрілий тип енергообміну» (характеризується кореляційним зв’язком з ЛДГ (r = 0,87), МДГ(ц) (r = 0,96) та МДГ(м) (r = 0,97), що притаманно для зрілого організму).

Проведений аналіз дозволяє стверджувати, що протікання метаболічних процесів у інтактних ембріональних тканинах характеризується середньою інтенсивністю (f) — -1 <f> +1.

Вихідна інтенсивність «ембріонального типу енергообміну» є вищою ніж інтенсивність «енергообміну за зрілим типом» є вищою в обох інтактних ембріональних тканинах. У ранньому післяопераційному періоді інтенсивність протікання метаболічних процесів за обома типами зменшується в препаратах ембріональної очеревини удвічі. У препаратах ембріональної шкіри інтенсивність «енергобміну за зрілим типом» зменшується у 4,5 раза, інтенсивність «ембріонального типу енергообміну» у середньому на 60%. На 7-му добу після трансплантації інтенсивність «ембріонального типу енергообміну» у дослідженнях ембріональної очеревини зростає на 60% відносно вихідної. Відірваність ембріональної очеревини від організму донора, умови тканинної ішемії дезорганізують структурно-функціональні взаємозв’язки пересадженої тканини й зумовлюють її повернення до більш ранніх, у філогенетичному сенсі, форм метаболічної організації.

Водночас, у препаратах ембріональної шкіри починає помітно зростати роль «енергообміну за зрілим типом», його інтенсивність порівняно з вихідним показником зростає в середньому на 67%. Достатньо висока інтенсивність «ембріонального типу енергообміну» (у межах середніх величин) спостерігається впродовж всього терміну спостереження як для препаратів ембріональної очеревини, так і для препаратів ембріональної шкіри. Через місяць після трансплантації ембріональних тканин основним стає «зрілий тип енергообміну». Інтенсивність його у препаратах ембріональної шкіри та очеревини у 3,6 раза та відповідно — 2,3 раза перевищують інтенсивність «ембріонального типу енергообміну» на 60-ий день після трансплантації.

На третю добу після трансплантації ембріональних остеобластів інтенсивність протікання метаболічних процесів за обома типами енергообміну як і у дослідженнях трансплантованих ембріональних тканин зменшується: інтенсивність «ембріонального типу енергообміну», у середньому, на 50%, а інтенсивність «енергообміну за зрілим типом», у середньому, на 100%.

На сьому добу інтенсивність протікання метаболічних процесів за обома типами енергообміну практично не змінюється, залишаючись у межах середніх величин. На 14–ту добу інтенсивність перебігу процесів «енергообміну за зрілим типом» у 2 рази переважає інтенсивність перебігу процесів за «ембріональним типом енергообміну».

Аналіз динамічної активності різних метаболічних ланцюгів енергообміну ембріональних тканин та клітин не може бути повноцінним без інтерпретації одержаних результатів з урахуванням функціонально-морфологічної характеристики об’єктів дослідження та визначення співвідношень метаболізму трансплантата й реціпієнта.

У ембріональній шкірі є всі структурні елементи, притаманні тканині зрілого організму, включно з додатками шкіри, і вона є завершеною за гісто-морфологічними характеристиками тканиною, трансплантат ембріональних остеобластів є лише конгломератом проліферативно активних ембріональних клітин. Ембріональна ж очеревина займає проміжну позицію, оскільки її основними структурними компонентами є сполучнотканинні елементи, зрілість яких і в дорослому організмі мінімальна.

Таким чином, за рівнем розвитку, структурною зрілістю, функціональною активністю об’єкти трансплантації можуть бути розміщені в класифікаційній шкалі від найнижчого рівня до найвищого в такому порядку: ембріональні остеобласти — ембріональна очеревина — ембріональна шкіра. Найбільш «зрілою» тканиною є ембріональна шкіра, а «юними» — ембріональні остеобласти.

Цим, очевидно, можна пояснити різну інтенсивність протікання метаболічних процесів енергозабезпечення до і після трансплантації в ембріональній шкірі, очеревині та остеобластах.

Паралельне співіснування й активне функціонування різних метаболічних шляхів енергозабезпечення в трансплантованих ембріональних тканинах та клітинах на пізніх етапах спостереження при наявності повноцінного судинного зв’язку з організмом дорослого реціпієнта свідчить про певну автономність та відсутність прямої метаболічної індукції обмінних процесів ембріональних трансплантатів з боку тканини зрілого організму. Визначальною, у даній ситуації, є поступова морфологічна трансформація трансплантатів, яка зумовлює утворення зрілої тканини з одночасним переходом на метаболізм зрілого організму.

**Висновки**

У дисертаційній роботі проведено дослідження процесів енергозабезпечення препаратів ембріональних очеревини, шкіри й остеобластів до та після алотрансплантації зрілому реціпієнту.

Дослідження активності ферментів енергообміну ембріональних тканинах і клітин показало, що для ембріональної очеревини характерна найвища активність ЛДГ (39,94±3,18 мкмоль НАДН/хв . мг білка); для ембріональної шкіри характерна найнижча активність ЛДГ (22,86±0,76 мкмоль НАДН/хв . мг білка) та найвища активність Гл-6-фДГ (2,17±0,238 нмоль НАДФН/хв . мг білка); ембріональним остеобластам притаманна найвища серед усіх досліджуваних ембріональних об’єктів активність МДГ(ц) (42,74±3,28 мкмоль НАДН/хв . мг білка).

Встановлено, що досліджувані ембріональні тканини й клітини характеризуються специфічністю протікання процесів енергообміну, яка визначається їх структурною диференціацією, функціональною активністю та рівнем розвитку.

Показано, що з третьої доби після вільної алотрансплантації відбувається морфологічна трансформація пересаджених тканин, які в кінці терміну спостереження (6 місяців) мають вигляд тонкого прошарку сполучної або жирової тканини.

Встановлене зниження активності ферментів енергообміну досліджуваних ембріональних трансплантатів на третю добу після алотрансплантації, зумовлене явищами тканинної ішемії.

Показано, що на 7-му добу після алотрансплантації досліджувані показники енергообміну (активність МДГ(ц), МДГ(м), ЛДГ, СДГ) трансплантованої ембріональної очеревини відповідають вихідним показникам притаманним інтактній ембріональній тканині.

На основі результатів досліджень встановлено, що активність досліджуваних ферментів енергообміну на 14-у добу після алотрансплантації у всіх ембріональних трансплантатах зменшується (в ембріональній шкірі в середньому 1,4 раза, ембріональній очеревині 1,4–2,2 раза, ембріональних остеобластах 2,4–5,4 раза), а через місяць пересадженим тканинам (очеревина, шкіра) притаманні показники енергообміну характерні для організму реціпієнта.

Дослідженнями встановлено, що ембріональні тканини (очеревина та шкіра) характеризуються різною інтенсивністю протікання процесів енергозабезпечення після вільної алотрансплантації, що обумовлюється їх морфологічною зрілістю.

Проведені дослідження та результати факторного аналізу отриманих даних свідчать про позитивний вплив ембріональних трансплантатів на репараційні процеси в тканинах унаслідок покращення енергозабезпечення.

**Список опублікованих праць за темою дисертації**

Мазур О.Є. Порівняльна характеристика процесів енергообміну та біосинтезу деяких ембріональних тканин і клітин // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2000. – №4. - С. 44-47.

Мазур О.Є. Дослідження активності гліколізу в ембріональних трансплантатах після алотрансплантації зрілому реципієнту //Медична хімія.- 2005. - № 3. – С. 81-84.

Мазур О.Є. Особливості енергозабезпечення вільно алотрансплантованих ембріональних остеобластів // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. - № 4. – 2005. – С. 87 - 90.

Павловський М.П., Бойко Н.І., Мазур Ю.І., Дибас Б.В., Мазур О.Є. Використання ембріональних трансплантатів у клініці // Acta medica Leopolensia. – 1996. – № 1. – С. 70-75. (Здобувач провела експериментальні дослідження, літературний пошук, підготувала статтю до друку).

Павловський М.П., Мазур Ю.І., Созанський О.О., Поспішіль Ю.О., Мазур О.Є. Орто- і гетеротопічна алотрансплантація ембріональних тканин // Лікарський збірник / Наукове товариство ім. Шевченка у Львові. Лікарська комісія. – Львів, 1996. – № 3. – С. 17 - 19.

Павловський М.П., Мазур Ю.І., Дибас Б.В., Поспішіль Ю.О., Мазур О.Є. Діагностика життєздатності ембріональних алотрансплантатів // Медична діагностика: Зб. наук. праць. – Львів, 1991. – С. 176-177.

Pavlovsky M.P., Masur Yu.I., Pospishil Yu.A., Dybas B.V., Masur O.E. Experimental allotransplantation of embryonal tissues // XVIII th ESAO Congress. Vienna, 11 – 14 September 1991.- The international journal of artificial organs. – Vienna; Milano; Birmingham; Osaka, 1991. – Vol. 14, №9. – P. 560

Павловський М.П., Мазур Ю.І., Дибас Б.В., Поспішіль Ю.О., Мазур О.Є. Алотрансплантація ембріональних тканин в експерименті // Тези IV конгресу світової федерації українських лікарських товариств. – Харків, 1992. – С. 269

Мазур Ю.І., Вишемирська Л.Д., Дибас Б.В., Мазур О.Є. Вплив алотрансплантації ембріональної тканини на репаративний процес ентеротомної рани // Актуальні проблеми функціональної анатомії судинної системи: Наук. конф. анатомів, гістологів, ембріологів і топографоанатомів України, присвячена 100-річчю від дня народження професора А.П. Любомудрова. – Львів, 14-15 вересня 1995. – С. 77

Pawlowsky M., Masur J.I., Masur O.E., Dybas B.W. Energiestoffwechsel bei Peritonitis // Wiener klinische Wochenschrift: Metabolismus Stoffwechselprobleme und Ernahrung des Intensivpatienten. Wien, 24 – 26 Februar 1994 . – Springen-Verlag / Wien, 1994. – Vol. 106, № 4. – S. 28.

Pawlowsky M., Masur J. I., Masur O. E. Energiestoffwechsel der peritonisierten Dьnndarmwunde // Wiener klinische Wochenschrift: Metabolismus Stoffwechselprobleme und Ernahrung des Intensivpatienten. Wien, 24 – 26 Februar 1994 . – Springen-Verlag / Wien, 1994. – Vol. 106, № 4. – S. 28.

Мазур О.Є. Особливості процесів енергообміну та біосинтезу деяких ембріональних тканин і клітин // VII Український біохімічний з’їзд. Київ, 1997. – ч. ІІІ . – С. 47 – 48.

Мазур О.Є. Особливості метаболічних процесів вільно алотрансплантованих ембріональних тканин // VII з’їзд Всеукраїнського лікарського товариства. Тернопіль, 16 – 17 травня 2003 р. – Українські медичні вісті. – 2003. – т. 5 . – № 1 (63) . – С.185.

Masur O., Sklyarov A. Energy metabolism and biosyntesis of small intestine after control enterotomy // Abstract International conference “Neuro – humoral and cellular regulatory mechanism of digestion processes”, Lviv. – 2003.– C.28- 29.

Пат. 6755 Україна, МКВ5 А61В 17/00, А61К 35/00. Спосіб перитонізації кукси дванадцятипалої кишки: Пат. 6755 Україна, МКВ5 А61В 17/00, А61К 35/00 М.П. Павловський, Ю.І. Мазур, О.Є. Мазур (Україна). – Державне патентне відомство України . – № 94061588 . – Заявл. 08.04.94 . – Опубл. 29.12.94, Бюл. №8 – І . – 2 с. (Здобувач виконала експериментальні дослідження, опрацювала та узагальнила результати).

**Анотація**

Мазур О.Є. Активність ферментів енергетичного обміну ембріональних трансплантатів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04–біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2007.

У роботі представлено експериментальні дослідження енергетичного обміну ембріональних тканин і клітин до та після алотрансплантації зрілому реціпієнту. На основі отриманих даних встановлено, що ембріональний обмін речовин залежить від рівня розвитку тканини, характеризується високою активністю енергетичного обміну. Для ембріональних тканин і клітин характерне одночасне існування та активне функціонування ембріонального типу енергообміну й енергообміну характерного для зрілого організму. Активність ферментів енергетичного обміну трансплантованих ембріональних тканин і клітин не залежить від метаболічних змін оточуючих тканин зрілого реціпієнта. Морфологічна трансформація ембріональних трансплантатів зумовлює їх перехід на тип енергообміну притаманний зрілому організму. У екстремальних, несприятливих умовах можливий перехід ембріональних обмінних процесів до більш ранніх форм метаболічної організації. Для клінічного застосування запропонований спосіб перитонізації кукси дванадцятипалої кишки, на який одержано патент України на винахід за № 6755, 1994 р.

Ключові слова: ембріональні клітини, тканини, морфологічна трансформація, ембріональний метаболізм, метаболічна трансформація, алотрансплантація.

**Аннотация**

Мазур О.Е. Активность ферментов энергетического обмена эмбриональных трансплантатов. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2007.

В работе представлены експериментальные исследования энергетического обмена эмбриональных тканей и клеток до и после аллотрансплантации зрелому реципиенту.

Оценка протекания процессов энергетического обмена транплантированных эмбриональных тканей клеток проведена с использованием факторного анализа. Выполнен анализ числовых характеристик биохимических показателей, сформированы корреляционные матрицы для объектов исследования соответственно срокам наблюдения, выполнены расчеты для главных факторов с наибольшим процентным и накопленым вкладом и определены их связи с исследуемыми биохимическими показателями.

На основании полученных экспериментальных данных установлено, что эмбриональный метаболизм определяется структурной зрелостью, функциональной активностью и уровнем развития соответствующей ткани, характеризуется высокой активностью енергетического обмена. Для эмбриональных тканей характерным является одновременное сосуществование и активное функционирование «эмбрионального типа енергообмена» и енергообмена типичного для зрелого возраста. Обменные процессы в интактных эмбриональных тканях функционируют со средней интенсивностью (1≤ f ≤-1), за исключением сукцинатдегидрогеназного комплекса, активность которого в эмбриональной коже ниже средних величин (f≤-1), а в эмбриональных остеобластах – выше средних величин (f≥1). Интенсивность метаболических процессов енергообмена по «эмбриональному типу» выше показателей зрелого организма. Начиная с седьмого дня после трансплантации препаратов эмбриональной брюшины интенсивность «эмбрионального типа енергообмена» возрастает, хотя в то же время в исследованиях эмбриональной кожи значительно возростает роль енергообмена типичного для зрелого организма. Спустя один месяц после трансплантации эмбриональных тканей, ведущим становится тип енергообмена, характерный для зрелого организма, несмотря на то, что морфологические черты эмбриональной кожи сохраняются до третьего месяца наблюдения. Анализ динамической активности различных метаболических путей энергообмена эмбриональных тканей и клеток не может быть полноценным без интерпертации полученных результатов в соответствии с функционально-морфологической характеристикой объектов исследования и определения соотношений метаболизма трансплантанта и реципиента. По уровню развития, структурной зрелости, функциональной активности объекты трансплантации размещаются в таком порядке: эмбриональные остеобласты, эмбриональная брюшина, эмбриональная кожа. Этим, вероятно, можно объяснить различную интенсивность протекания процессов энергообмена в эмбриональной брюшине, коже, остеобластах до и после трансплантации зрелому реципиенту.

Уровень активности исследуемых ферментов энергетического обмена свободно пересаженных эмбриональных клеток и тканей не зависит от изменений метаболических процессов окружающих тканей зрелого реципиента; динамика активности ферментов гликолиза, цикла трикарбоновых кислот, пентозофосфатного пути определяется явлениями тканевой ишемии и морфологическими изменениями в эмбриональных объектах. Морфологическая трансформация трансплантатов с замещением зрелой тканью обуславливает переход пересаженных тканей на тип енергообмена присущий зрелому организму. В экстремальных, неблагоприятных условиях возможен переход эмбриональных обменных процессов к более ранним формам метаболической организации. Мобильность метаболической трансформации эмбриональной ткани определяется ее морфологической зрелостью, степенью диференциации и структурными особенностями.

Для клинического применения аллотрансплантации эмбриональных тканей и клеток предложен “Способ перитонизации культи двенадцатиперстной кишки”, на который получен патент Украины на изобретение за № 6755, 1994 г. В результате применения аллотрансплантата эмбриональной брюшины, который отличается незначительной антигенностью, высокой резистентностью, выраженным стимулирующим влиянием на репаративные процессы повреждённых тканей, свободная аллотрансплантация тканей эмбриональной брюшины моделирует репаративные процессы раны кишки, гарантируя герметичность культи двенадцатиперстной кишки, минимальную травматизацию кишки, соседних органов и тканей, что обеспечивает надёжное соединение краёв раны, сокращение сроков её заживления.

Ключевые слова: эмбриональные клетки, ткани, морфологическая трансформация, эмбриональный метаболизм, метаболическая трансформация, аллотрансплантация.

**Annotation**

Mazur O.E. Activity of enzymes of embryonic transplant energetic exchange. – Manuscript.

Dissertation for the candidate of biological science degree in the specialty 03.00.04-Biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2007.

The experimental researches of energy and plastic metabolism of embryonic tissues and cells before and after allotransplantation to a mature organism are presented in the work. It was established on basis of received data that embryonic metabolism depends on the development of tissue, is characterized with high activity of energy metabolism. Embryonic tissues and cells are characterized with simultaneous existence and active functioning of embryonic type of metabolism and typical for mature organism metabolism. The activity of energy and plastic metabolism of transplanted embryonic tissues and cells does not depend on metabolic changes of environmental tissues of mature recipient. The morphologic transformation of embryonic transplants causes their transition to the type of metabolism, which is peculiar to mature organism. It is possible that embryonic metabolism processes will pass to earlier phylogenetic forms of metabolic organization under extreme unfavorable conditions. The method of duodenum stump peritonisation of human embryo peritoneum, on which it was taken out the patent to the invention under № 6755, 1994, was proposed to clinical application.

Key words: embryonic tissues, cells, morphologic transformation, embryonic metabolism, metabolic transformation, allotransplantation.