

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ ТА КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукопису

ПЕСІНА Нонна Ісааківна

ДОСЛІДЖЕННЯ БАР'ЄРНОЇ СТІЙКОСТІ ПЛАЗМАТИЧНОЇ
МЕМБРАНИ ЕРИТРОЦИТІВ В УМОВАХ ОСМОТИЧНОГО ТА
ТЕМПЕРАТУРНОГО ШОКУ

03.00.22 - кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків - 1993

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00810525 (L)

AB 28.617

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини АН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
професор В.А.Бомдаренко

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор П.А.Каліман

доктор біологічних наук,
професор А.В.Чуйко

Ведуча організація: Харківський Фізико-технічний
інститут низьких температур
АН України

Захист відбудеться "21" грудня 1993 року в "13"³⁰ год.
на засіданні спеціалізованої ради Д 016.60.01 у
Інституті проблем кріобіології та кріомедицини АН України
(310015, Харків-15, вул.Перейславська, 23).

З дисертацій можна ознайомитися у бібліотеці
Інститута проблем кріобіології та кріомедицини АН України.

Автореферат надіслано "17" листопада 1993 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради

доктор медичинських наук

А.Н.Гельцев

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

AB-28.677
- 3 -
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність проблеми. У наш час одержана велика кількість експериментальних даних, які свідчать про те, що одним з головних факторів, контролюючих холодову та осмотичну чутливість клітини, є їх об'єм у момент охолодження та дії гіпертонічного стресу (Meryman, 1971, 1979; Farrant, 1972). При цьому зміну клітинного об'єму пов'язують з осмотичною відповіддю клітини на зсув осмолярності зовнішнього середовища (Farrant, 1972-73; Meryman, 1971; Pegg, 1987). Незважаючи на значний об'єм експериментальних даних, присвячених осмотичним реакціям клітин, практично не досліджені процеси, які модулюють об'єм клітин та мають у своєму заснові зміну бар'єрних властивостей мембрани. Показано, що в умовах гіпертонічного стресу відбувається звільнення внутріклітинних електролітів (Farrant, 1972; Lew, 1987). У ряді робіт такі процеси розглядаються як основа для пояснення механізмів пошкодження клітин, котрі розвиваються при заморожуванні (Білоус, Бондаренко, 1985; Mc Grath, 1985). Необхідно враховувати те, що порушення іонного гомеостазу клітини у гіперосмотичних розчинах неелектролітів виражені значно більше порівняно з відповідними змінами у розчинах солей (Donlon, 1968; Bernhardt, 1992). Зміна іонного балансу на мембрані в розчинах неелектролітів, наприклад, у сахарозі, пов'язана з індукцією однонаправленого виходу катіонів із клітини. Подібний перерозподіл катіонів здатній викликати додаткове обезвожування клітини внаслідок зменшення осмотичної активності цитозолю та супутнього цьому виходу внутріклітинної води. Останнє може мати несприятливий вплив на стан клітини, особливо в умовах, коли клітинний об'єм близький до мінімального.

Враховувачи викладене має значний інтерес оцінити вплив таких факторів, як зміна клітинного об'єму та втрати внутріклітинних електролітів на процеси, які лежать в основі сенсibilізації еритроцитів до зміни температурних та осмотичних умов середовища.

У наш час висловлено припущення, що чутливість клітин до зміни температурних та осмотичних характеристик середовища залежить не тільки від об'ємної дегідратації, але й від глибини обезвожування полімерного білкового шару, який утворює цитоскелет клітини (Бондаренко, 1988). Припускається, що критичною фазою обезвожування клітин в гіпертонічних розчинах є набуття стану, коли з них видаляється об'ємна вода, після чого розвивається дегідратація білкового шару (Heinbush, 1985; Бондаренко, 1988). Враховувачи те, що білковий скелет являє собою іонний гель (Stokke,

1985-86; *Shanus*, 1988; *Svoboda*, 1992), на стабільність якого значний вплив має рН та іонна сила середовища, можна припустити, що процеси, які супроводжують обезвожування клітини (в першу чергу, зміна концентрації внутріклітинних солей та внутріклітинного рН) будуть впливати на структурну стабільність мембрани. Це означає, що динаміка реорганізації білкового гелю при обезвожуванні клітини в розчинах неелектролітів буде визначати ступінь сенсibilізації еритроцитів до наступних температурних та осмотичних змін умов середовища. Додатковим фактором, який контролює розвиток де-стабілізуючих явищ у білковому гелі може бути тривалість контакту клітини з неелектролітним середовищем.

Мета роботи. У зв'язку з викладеним вище, метов роботи є вивчення впливу початкових умов середовища (температури, іонної сили, складу, рН) у розчинах неелектролітів та змішаних середовищ змінного складу на стійкість еритроцитів до холодового та осмотичного впливу, а також до заморожування.

Задачі дослідження.

1. Оцінити критичні інтервали часу, в межах котрих з'являється чутливість еритроцитів до наступної зміни температурних та осмотичних параметрів середовища в залежності від початкової осмолярності та складу неелектролітного розчину. Виявити критичне значення осмолярності неелектролітних середовищ, при яких еритроцити сенсibilізуються до наступних температурних та осмотичних впливів при різній тривалості інкубації, а також в залежності від початкових осмотичних та температурних умов.

2. Оцінити роль процесів, пов'язаних з втратою внутріклітинних електролітів у розвитку холодової та осмотичної чутливості еритроцитів при обезвожуванні в середовищах, які містять неелектроліти.

3. Вивчити вплив кислотно-основних характеристик неелектролітних середовищ на розвиток холодової та осмотичної чутливості еритроцитів. Оцінити ступінь порушення кислотно-основного гомеостазу в клітині в залежності від початкових осмотичних, кислотно-основних, іонних параметрів середовища та тривалості інкубації еритроцитів у цих середовищах.

4. Оцінити зв'язок між глибиною обезвожування еритроцитів у неелектролітних та змішаних середовищах, ступенем спрямованості змін клітинного об'єму, а також характером модифікації структури білкового скелету в залежності від осмотичних, температурних та кислотно-основних параметрів середовища.

Наукова новизна. Встановлено, що ступень сенсibiлізації еритроцитів до охолодження та гіперосмотичного стресу контролюється двома групами процесів: процесами, пов'язаними з осмотичним обезвожуванням клітин, та з процесами, котрі мають у своїй основі зміну проникливості мембрани, що викликає звільнення внутріклітинних електролітів. Останнє супроводжується зсувом кислотно-основної рівноваги клітини в сторону зменшення рН, що виступає додатковим фактором сенсibiлізації клітини до холодової та осмотичної дії. Структурною основою зростання чутливості є зміни стану білкового цитоскелету.

Експериментально показано, що зниження рН середовища викликає агрегацію ізольованих цитоскелетних комплексів; при наближенні до критичного значення рН, яке відповідає ізоелектричній точці основного компонента цитоскелетної сітки - спектрина - процес досягає максимальної інтенсивності. Знайдена залежність ступеня релаксації цитоскелетних комплексів при поверненні до вихідних значень кислотності середовища від тоничності цього середовища: при збільшенні тоничності здатність системи до самовідновлення падає.

Сумарним ефектом процесів звільнення внутріклітинних електролітів та зміщення кислотно-основної рівноваги цитозолю з'являється додаткове, по відношенню до викликаного осмотичними умовами, зменшення об'єму еритроцитів. Вперше встановлено, що найбільшого розвитку цей процес набуває в умовах тривалої інкубації еритроцитів в неелектролітних середовищах з низьким значенням рН.

Вперше показано, що введення солей на фоні існуючої осмотичної дегідратації веде до збільшення об'єму клітин та зніження рівня пошкодження при наступному охолодженні.

Вперше показано, що характер впливу кислотності гіперосмолярного неелектролітного середовища на чутливість еритроцитів до холодового та осмотичного впливу має протилежну спрямованість порівнянню з впливом гіпертонічного електролітного середовища.

Показано, що в розчинах, які містять неелектроліти, фактором, який контролює чутливість еритроцитів до холодового та гіперосмотичного впливу, є тривалість перебування у цих середовищах. Виявлено діапазон осмолярності, у якому проявляє себе "часова" компонента сенсibiлізації при інкубації еритроцитів в розчинах неелектролітів. При осмолярності середовища вище цього значення процес розвитку холодової чутливості контролюється переважно осмолярністю.

Охолодження еритроцитів до -196°C змінює напрямок впливу такого фактору, як рН середовища, на протилежний, порівнянню з охо-

лодженням клітин до 0°C.

Основні висновки, винесені до захисту.

1. Чутливість еритроцитів до холодового впливу у розчинах, які містять неелектроліти, контролюється, поряд з осмолярністю та температурою середовища, тривалістю інкубації у гіпертонічних умовах.

2. Порухення іонного гомеостазу еритроцитів, яке пов'язане з виходом внутріклітинного калію в умовах дегідратації в розчинах неелектролітів супроводжується зміщенням кислотно-основної рівноваги клітини в сторону зменшення рН, що асоційовано з розвитком чутливості клітин до наступного охолодження.

3. Характер впливу кислотності гіперосмолярного неелектролітного середовища на чутливість еритроцитів до дії температурного та осмотичного фактора має протилежну спрямованість порівняно з впливом гіпертонічного сольового середовища.

Теоретичне значення роботи. Представлені результати розширюють уявлення про механізм, який контролює чутливість клітин до зміни температурних та осмотичних умов середовища. Підтверджується припущення, що структурною основою цього механізму є динамічний стан цитоскелету. Експериментальний матеріал, приведений у роботі, дозволяє конкретизувати елементи, пошкодження яких в реальних умовах охолодження, заморожування та відтавання можуть впливати на структурну та функціональну стійкість клітини, і в ряді ситуацій набувати особливого значення.

Практичне значення роботи. Практичне значення роботи полягає в розробці нових напрямків регуляції стану клітин на етапах, які передують охолодженню та заморожуванню з метов підвищення стійкості до дії пошкоджувачих факторів.

Апробація роботи. Основні матеріали, представлені в даній роботі були викладені на Всесоюзній конференції по біохімії мембран (Мінськ, 1988), конференціях молодих вчених Інститута проблем кріобіології та кріомедицини АН України (Харків, 1987, 1988, 1990, 1991), на Всесоюзній конференції "Реконструкція, стабілізація та репарація пошкоджених біологічних мембран" (Благовещенськ, 1989), на II Міжнародній конференції "Успіхи сучасної кріобіології" (Харків, 1992), на IV Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992).

Публікації. По матеріалах дисертації опубліковано II наукових работ.

Структура дисертації. Виконані дослідження є частиною пла-

нових наукових робіт Інститута проблем кріобіології та кріомедицини АН України по темі:

Дисертаційна робота складається із вступу, 2 глав обліку літератури, опису матеріалів та методів, 4 глав власних досліджень, їх обговорювання, висновків та списку цитуємої літератури, вклавачки 208 робіт закордонних авторів та 40 вітчизняних. Робота викладена на 123 сторінках машинописного тексту, містить 48 малюнків та 2 таблиці.

ЗМІСТ РОБСТИ

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Об'єктом досліджень були еритроцити людини (II група), ховраха, щурів. Клітини тричі мили 10-кратним об'ємом фізіологічного розчину, який містив 5 мМ фосфатного буферу. Тіні еритроцитів одержували за методом *Dodge*, 1963. Ізольовані цитоскелети еритроцитів одержували за методом *Beaven*, 1985.

Холодовий шок еритроцитів моделювали на основі загальнопринятої методики *Green*, *Yung*, 1977. В експериментах використовувалась 2%-на суспензія еритроцитів. Рівень гемоліза визначали по виходу гемоглобіна за допомогою спектрофотометра СФ-4А ($\lambda=543$ нм). При заморожуванні використовувались кріопротектори - ПЕГ-1000 та гліцерин, які додавались в аліквоту, відібрану в кожній точці часу безпосередньо перед заморожуванням (кінцева концентрація -15%).

Вимірювання об'єму еритроцитів проводили за допомогою двох методів - спектроскопії імпульсів опору (*Akeson*, 1985) та гематокритним методом (центрифуга типу МГЦ-8).

Вимірювання кінетики лізису еритроцитів, викликаного умолами кислотності середовища, проводилось за допомогою метода малюкувального розсіювання світла суспензій клітин (*Lotimer*, 1982), на установці, створеній на базі монохроматора СФ-4А ($\lambda=720$ нм). За допомогою цього метода також реєстрували кінетику переходів форм клітин (Дегтярьов, 1988). Морфологічний контроль здійснювали за допомогою мікроскопа типа Біолам. Форму клітин класифікували по *Bessis*, 1973.

Вихід калію з еритроцитів визначали методом *Macey*, 1984 за допомогою валіноіцинового електроду ОР-К-07113 (Угорщина).

Вимірювання внутріклітинного рН проводили за методом *Roos*, *Boron*, 1981 за допомогою рН-метра ОР-212 (Угорщина). Вимірювання динаміки кислотності середовища інкубації реєстрували тим же

електродом, запис сигналу здійснювали за допомогою самописця Т-21 (Чехословаччина).

Електрофорез білків тінв еритроцитів проводили за методом ,1970. Гелі сканували на денситометрі СД -200 (=540 нм).

Вимірювання процесів агрегації цитоскелета проводили за допомогою метода малокутового розсіювання, як описано вище (=720 нм).

Осмотичний тиск середовища вимірювали на осмометрі типу ОМКА-ІІІ-ОІ. Статистична обробка результатів експериментів проводилась за методом Фішера - Ст'юдента, як описано Бейлі,1963.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

І-І. Холодовий шок еритроцитів в неелектролітних та змішаних середовищах: значення внутріклітинного електролітного гомеостазу.

Проведені експерименти показали, що осмолярність середовища при інкубації еритроцитів у розчинах неелектролітів не є єдиним фактором, який контролює чутливість клітин до холодного шоку. Значну роль в механізмі сенсibiлізації відіграє тривалість інкубації клітини на початковому етапі перед охолодженням. Показано, що еритроцити набувають чутливість навіть в середовищах, осмолярність яких незначно перевищує фізіологічний рівень - 450 мосмоль (мал.1).

Типова кінетика сенсibiлізації еритроцитів до охолодження в неелектролітних середовищах має дві фази - початкову фазу зростання чутливості і плато, коли чутливість залишається на одному рівні (мал.1,2). Перша фаза відповідає періоду, в межах якого швидкість звільнення внутріклітинного калію достатньо велика (мал.3).

Закономірності, отримані для розчинів сахарози, спостерігалися і в гіперосмотичних розчинах манітолу (мал.2). Встановлено, що фактор часу в найбільшій мірі проявляється в неелектролітних середовищах з осмолярністю вище 1000 мосмоль, вище цього рівня значення фактору часу нівелиється (мал.4).

Динаміка виходу іонів калію з еритроцитів, які інкубувалися в розчинах неелектролітів, відповідає динаміці розвитку чутливості до охолодження (мал.9). Звільнення іонів контролюється осмолярністю середовища (ма.10). Включення в середовище інкубації КСІ інгібує звільнення внутріклітинного калію; введення КСІ або NaCl в концентрації 150 мМ повністю блокує вихід іонів калію. Хлорид-іон, введений з непроникавчим катіоном (холінхлорид), інгібує цей процес в 2 рази слабше (мал.12).

Зміни клітинного об'єму, викликані звільненням калію (додаткові по відношенню до зумовлених осмотичними умовами) були зафік-

совані в розчинах сахарози з осмолярністю до 0,5 М. При зростанні осмолярності до 0,8 М, на фоні значної осмотичної дегідратації зміни об'єму, викликані втратою іонів K^+ , мінімальні (мал. II).

Включення солей у розчин неелектролітів різко змінює характер залежності холодової чутливості еритроцитів від тривалості інкубації (мал. I5). В присутності 100 мМ NaCl еритроцити практично втрачають чутливість до холодового шоку, якщо осмолярність неелектролітного середовища нижче 1000 мосмоль (мал. I3). Порівнявши ці дані з результатами, які подані на мал. 4, можна зробити висновок, що 1000 мосмоль є критична межа, вище якої в механізм сенсibilізації включаються процеси, пов'язані з переважним впливом осмолярності середовища. При низьких значеннях осмолярності зростає роль процесів, пов'язаних з порушенням іонної рівноваги на мембрані.

Конкретний характер сенсibilізації еритроцитів залежить від їх видової належності, яка детермінує динаміку та спрямованість перерозподілу електролітів по обидва боки мембрани (Zaidler, 1979). У випадку зимосплячих, коли працюють системи, які обмежують втрати внутріклітинних електролітів (Монін, 1987), еритроцити демонструють більшу стійкість до гіперосмотичного стресу та охолодження порівнянно з еритроцитами людини (мал. I7, I8).

I-II. Об'ємна зміна клітини як фактор холодової чутливості.

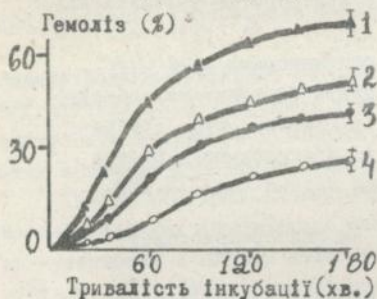
Як свідчать результати наших експериментів, збільшення вмісту неелектроліта у середовищі інкубації різко зменшує об'єм еритроцитів; при цих же умовах відмічається зріст чутливості клітин до охолодження (мал. 2I). Включення у зовнішнє середовище електролітів веде до збільшення об'єму клітини, при цьому спостерігається значне зменшення рівня холодового шоку (мал. 2I). За допомогою спектроскопії імпульсів опору показано, що відносне збільшення об'єму еритроцитів на фоні вже існуючого осмотичного обезвожування при введенні в середовище NaCl в діапазоні концентрації 50-250 мМ досягає 10% (мал. 22).

Часова динаміка зменшення об'єму найбільш чітко проявлялася в 0,3-0,5 М розчинах сахарози, при збільшенні концентрації до 0,8 М така динаміка нівелюється (мал. II). Причина цього може бути пов'язана з двома моментами: 1) реалізацією процесу в початковій фазі інкубації та 2) обмеженнями об'ємних змін з боку білкових структур клітини. Внесок гемоглобіну також можливий, бо

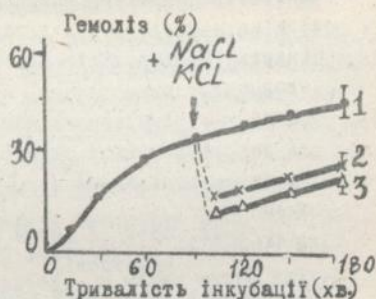
при наближенні осмолярності середовища до вказаних значень він різко змінює свої в'язко-пластичні характеристики в бік рідності (Crandall, 1979).

Показано, що для обмеження або обернення процесів, які модифікують стан клітини при зміні її об'єму на етапі перед охолодженням, достатньо змінити осмолярність до рівня, який забезпечує високоамплітудну регідратацію ("об'ємну") або ввести в зовнішній неелектролітний розчин електроліти, що здатно забезпечити "структурну" (цитоскелетну) регідратацію—мал.24 та 25.

У експерименті, результати якого подані на мал.24, аліквота суспензії клітин у кожній точці часу розводилась до 0,4 М-ої концентрації, після чого клітини інкубували ще 10 хвилини при 37°C, а потім 10 хвилин охолоджувались до 0°C. Процедура розведення знижує чутливість клітин до охолодження, але і в цьому випадку зберігається залежність рівня сенсibiлізації клітин від тривалості контакту з дегідратувачим середовищем.



Мал.24. Чутливість еритроцитів до охолодження (37-0°C) у розчинах сахарози без та після попереднього розведення до 0,4 М: 1-0,7 М розчин сахарози, 2-попередньо розведений до 0,4 М; 3-0,6 М розчин, 4-попередньо розведений до 0,4 М, рН=7,4.



Мал.25. Чутливість еритроцитів до охолодження (37-0°C) у розчинах сахарози без та після попереднього додання солей. Кінцева концентрація солей-0,3 М: 1-0,6 М розчин сахарози, 2-попереднє додання 0,3 М NaCl, 3-попереднє додання 0,3 М KCl, рН=7,4.

Виходячи з даних, які подані на мал.25, можна зробити висновок, що введення солей у неелектролітне середовище в значній мірі може бути аналогічно розведенню. Включення солей безпосередньо на стадії шоку не знижує розвиток пошкодження (мал.27),

Проведення процедури, подібної описаній на мал.25 в розчині сахарози з рН=5,0 не запобігає розвитку гемолізу після охолодження (мал.26). Враховуючи, що інтенсивність виходу внутріклітинного

каліїв в гіперосмотичних розчинах сахарози не залежить від кислотності середовища (мал.28), то в цьому випадку зміни об'єму, викликані втратою каліїв, важко розглядати як провідний фактор цього явища.

I-III. Холодовий шок еритроцитів: значення внутріклітинної кислотно-основної рівноваги.

Згідно моделі *Lew, Bookchin, 1987*, звільнення з дегідратованих еритроцитів іонів каліїв є частиною загального процесу звільнення гіпертонічного розчину, що містить солі каліїв та КОН. Наслідком цього процесу буде вклячення H^+ до цитозолю. Враховуючи те, що швидкість вклячення H^+ у клітину в значній мірі визначається показником кислотності зовнішнього середовища (*Raftos, 1986*), було припущено, що динаміка сенсibilізації еритроцитів у неелектролітних розчинах повинна залежити від такого параметру середовища, як рН. Якщо за вихідний параметр взяти чутливість еритроцитів до охолодження у неелектролітних розчинах з рН=7,0, то зміщення рН середовища у лужну область приводить до зменшення рівня гемолізу, зсув у кислу область підвищує чутливість клітин, що особливо виражено при рН=5,0. Суттєва різниця в рівні сенсibilізації еритроцитів до охолодження починає проявлятися на 90-у хвилину інкубації, та стає максимальною на 180-у хвилину, що співпадає з динамікою звільнення іонів каліїв (мал.32).

Враховуючи те, що головним білком цитоскелету є спектрин, який на кінцях своїх димерів несе негативний заряд та молекули якого-ентропійні пружини, можна припустити, що закислення внутріклітинного вмісту буде підсилувати процеси, які мають місце при дегідратації клітини. До числа таких процесів у першу чергу слід віднести скорочення спектринових субодиниць, зменшення кількості їх ефективних смивок (*Svoboda, 1992; Shanus, 1988*) та, як наслідок, агрегацій та розшарування гелевих структур на області, висококонцентровані за білком та області відшарованого розчинника. Подібні процеси відомі для цілого ряду білкових гелів. (Робідер, 1966; Ізмайлова, 1974; *Carstén, 1970*). Як показали результати наших експериментів, зниження рН середовища викликає агрегацій ізольованих цитоскелетних комплексів (мал.39). При наближенні до критичного значення рН, яке відповідає ізоелектричній точці спектрину (5,0), процес досягає максимальної інтенсивності. Показана залежність ступеня релаксації цитоскелетних комплексів при поверненні до вихідних значень кислотності середовища від тонічності цього середовища: при збільшенні темністості здатність

системи до самовідновлення падає.

Найбільша відносна зміна об'єму еритроцитів на фоні початкової осмотичної дегідратації на 180-у хвилину інкубації у неелектролітному розчині відбувається якраз у кислих середовищах (табл. 1). При введенні до неелектролітного середовища 0,15 M NaCl, які тимчасово блокують виход внутріклітинного калію, часова різниця в об'ємі, також, як різниця об'єму за pH, стає мінімальнов.

Регістрація змінення pH незабуференого зовнішнього середовища при експонуванні у ньому еритроцитів показала, що найбільший зсув у лужну область спостерігається там, де клітини демонструють найбільший ступень дефіциту іонів калію. Динаміка зміни зовнішнього pH співпадала з динаміков звільнення цього катіону та з динаміков сенсibiliзації еритроцитів до охолодження (мал.33). Найбільше закислення внутріклітинного середовища при інкубації еритроцитів у неелектролітних розчинах спостерігалось при низьких значеннях зовнішнього pH(мал.34).

Доказано, що на момент розвитку найбільших кислотних та іонних змін внутріклітинного середовища та найбільшій чутливості до холоду були зареєстровані найбільші зміни в електрофоретичному спектрі, пов'язані, насамперед, со спектрином (мал.36). Введення у сахарозний розчин солей у оптимальних концентраціях запобігало деструктивних змін білків мембрани (мал.38). Зроблено припущення, що в умовах зменшення екранування негативно заряджених молекул цитоскелету зберігається пластична гелева структура, яка хоча і відрізняється від нативній, але забезпечує структурну стабільність мембрани.

III. Лізис еритроцитів, який викликаєм зниженням pH зовнішнього середовища.

У главі подані результати досліджень динамікі процесу лізиса еритроцитів, який розвивається в умовах зниження pH зовнішнього середовища. Встановлено, що при досягненні pH розчину 4,9, значно зростає швидкість лізису (мал.42). Обробка еритроцитів акридином оранжевим, який викликає агрегацію білкових структур мембрани, прискорює лізис клітин (табл.2). Подібний результат спостерігається при зкрепленні білків цитоскелету та мембрани через додаткові дисульфідні зв'язки, які утворюються після обробки клітин хлоридом кадмія (табл.2).

Досліджені зміни форми клітин, як інтегрального параметру, що відображає зміни стану опорних систем. Динаміка трансформації бу-

ла представлена фазами: дискоцит - стоматоцит - сфера (мал.43). Швидкість переходу контролювалась температурою та рН. При наближенні зовнішнього рН до 5,0 спостерігалось значне зменшення коефіцієнту сферичності (сферуляція) еритроцитів та тинів (мал.40). Припускається, що в основі трансформації лежать процеси супраження бар'єрної нестійкості та нестійкості до вигину, які при критичному поєднанні викликають появу пори. Зниження рН може стати пусковим фактором зриву бар'єрної стійкості та стійкості до вигину внаслідок модифікації скелетного комплексу.

Глава IV присвячена особливостям криогемолізу еритроцитів у неелектролітних середовищах при негативних температурах. Показано, що при експонуванні еритроцитів при $T = -10^{\circ}\text{C}$ у розчинах неелектролітів також спостерігається часова динаміка лізису клітин, яка контролюється осмолярністю середовища (мал.44). При заморожуванні також визначається розвиток гемолізу протягом часу, але вплив осмотичного фактору стає менш вираженим (мал.45). Спостерігається одночасовий вихід усіх кривих на плато в інтервалі 30-60 хвилин, незалежно від осмолярності середовища. Останнє свідчить про те, що до механізму пошкодження клітин при заморожуванні в неелектролітних середовищах залучені фактори, які відсутні при охолодженні до 0°C . Охолодження еритроцитів до -196°C змінює напрямок впливу рН зовнішнього середовища (мал.47). Найбільші пошкодження відбувались у лужних середовищах, в протилежність тому, що спостерігається при охолодженні клітин, яке проходить без кристалізаційних процесів (мал.32). Подібна рН-залежність відзначається при переносі еритроцитів з розчину сахарози у сольові середовища з одночасним охолодженням до 0°C (мал.46).

ВИСНОВКИ.

I. Ступень сенсibilізації еритроцитів до охолодження та гіпертонічного стресу у розчинах, що містять неелектроліти, контролюється двома групами процесів: процесами, пов'язаними з осмотичним обезвожуванням клітин, та з процесами, які мають в основі зміни проникливості мембрани, що приводить до звільнення внутріклітинних електролітів. Останнє супроводжується додатковим, по відношенню к викликаному осмотичними умовами, зменшенням клітинного об'єму. Введення електролітів у неелектролітні середовища змінює відповідь еритроцитів на тривале експонування в гіперосмотичних середовищах і розвиток чутливості до охолодження. У цьому ви-

падку клітини демонструють збільшення об'єму порівняно того, що досягається в умовах неелектролітного розчину.

2. У середовищах, що містять неелектроліти, чутливість еритроцитів до холодового та осмотичного впливу контролюється, крім осмолярності та температури розчину, тривалістю експонування у дегідратувчих умовах. Тривалість інкубації визначає межу осмолярності, вище якої відбувається зміна бар'єрних властивостей мембрани та розвиток холодового шоку. Тривалість інкубації контролює холодову чутливість еритроцитів людини в інтервалі осмолярності до 1000 мосмоль. При підвищенні осмолярності середовища вище цього значення, вплив часового фактору нівелиється, холодова чутливість контролюється переважно осмолярністю розчину.

3. Процес звільнення внутріклітинного калію супроводжується зміщенням кислотно-основної рівноваги клітини у бік зниження рН. Глибина розвитку останнього процесу залежить від кислотності дегідратувчих розчинів, у яких клітини експонуються поперед охолодженням. Характер впливу кислотності гіперосмолярного неелектролітного середовища на холодову та осмотичну чутливість еритроцитів має протилежну спрямованість порівняно з гіпертонічним сольовим розчином.

4. Зниження рН середовища, а також підвищення осмолярності, викликає кренування еритроцитів. Вважається, що в основі цих змін лежать процеси, пов'язані зі зміною стану білкового гелю, який утворює цитоскелет. При наближенні до критичного значення рН (5,0) клітини та тіні трансформуються у сфери, що може відображати процеси порушення прикріплення скелету до мембрани, які супроводжують об'ємне стиснення білкового гелю. Наслідком таких процесів стає прискорення лізису, зумовленого зміщенням рН зовнішнього середовища.

ПЕРЕЛІК РОБОТ, ЯКІ ОПУБЛІКОВАНІ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Песіна Н.І., Дегтярьов О.В. Лізис еритроцитів, зумовлений закисленням середовища.- В зб.: "Тезиси докладів II Всесоюзної конференції по біохімії мембран", 1988, Мінськ, с.104.

2. Дегтярьов О.В., Песіна Н.І. Роль периферичних білків еритроцитів у процесі лізису, зумовленого закисленням середовища.- У зб.: "Теоретичні та практичні аспекти сучасної кріобіології", 1989, Харків, Наукова думка, с.18-21.

3. Песіна Н.І., Бондаренко В.А. Дослідження впливу $CdCl_2$ на структуру мембран еритроцитів при різних стресах.- У зб.: "Рекон-

струкція, стабілізація та репарація пошкоджених біологічних мембран", Тез. доп. Всесовязного симпозіуму, Благовещенськ, 1989, с.72.

4. Песіна Н.І., Бондаренко В.А. Осмолярність середовища та тривалість інкубації як два незалежних фактори, які контролюють чутливість еритроцитів до охолодження у середовищах, що містять неелектроліт.- У зб.: "Біохімічні аспекти кріоповодження та кріозахисту клітинних систем", Харків, с.26-33.

5. Песіна Н.І., Руденко С.В. Особливості розвитку холодового шoku еритроцитів у середовищах, що містять неелектроліт.- У зб.: "Холодовий анабіоз", Харків, ІПКіК АН Укр, 1991, с.32-36.

6. Песіна Н.І., Бондаренко В.А. Холодова чутливість еритроцитів у середовищах, що містять неелектроліти: значення часового фактору в індукції сприйнятливості до температурного та осмотичного стресу.- У зб.: "Біохімічні аспекти холодових адаптацій", Харків, ІПКіК АН Укр., 1991, с.110-123.

7. Бондаренко Т.П., Мельнікова О.В., Песіна Н.І. Внесок температурної та осмотичної компонент у розвиток кріогемолізу при негативних температурах.- У зб.: "Фізико - хімічні процеси в кріобіологічних системах", Харків, ІПКіК АН Укр, 1991, с.3-13.

8. Песіна Н.І. Фактори, які контролюють чутливість еритроцитів до охолодження у розчинах, що містять неелектроліт.- У зб.: "Вплив холода на біологічні об'єкти", КіУВ, Наукова думка, 1992, с.50-56.

9. Песіна Н.І., Бондаренко В.А., Фактори, які контролюють чутливість еритроцитів до охолодження у розчинах, що містять неелектроліти.- У зб.: "Успіхи сучасної кріобіології", Тез. доп. II міжнародній конференції, Харків, 1992, с.138-139.

10. Песіна Н.І., Семенченко О.Ю. Значення скелет - мембраного комплексу еритроцитів у процесі розвитку чутливості до зміни температурно-осмотичних умов середовища.- У зб.: "Тез. доп. VI Українського біохімічного з'їзду", Київ, 1992, ч. III, с.91.

11. Песіна Н.І. Розвиток чутливості еритроцитів до охолодження у середовищах, що містять неелектроліти// Проблеми кріобіології.- 1993, №4.- с.52-54.

AB 28.611

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

Подписано к печати 9. II . 1993 года.

Объем I п.л. Формат 60x84 1/16. Зак. 78 , Тпр.100.

Отпечатано на ротаприте Харьковского Физико - технического
института низких температур, Харьков, 164, пр.Ленина, 47 .