

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ ТА КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукопису

Рамазанов Віктор Володимирович

ВПЛИВ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ ТА МОДИФІКАТОРІВ ЦИТОСКЕЛЕТА
НА РОЗВИТОК ХОЛОДОВОГО ТА ГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ ЕРИТРОЦИТІВ

03.00.22 - кріобіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття вченої ступені
кандидата біологічних наук

Харків - 1993

АВ 28884

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини Академії наук України.

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
В.І.Луговий

доктор медичних наук
В.І.Губський

Керівна організація: Інститут Фізіології ім. О.О.Вогомольця
АН України, м.Київ

Захист відбудеться "21" листопада 1993 р. в "____"
годин на засіданні спеціальної ради Д 016.60.01
при Інституті проблем кріобіології та кріомедицини АН України
(310016, м.Харків, вул. Переяславська, 23)

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту
проблем кріобіології та кріомедицини.

Автореферат розіслано "20" квітня 1993 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради,
доктор медичних наук

А.Н.Гольцев

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00814070 (K)

ЛННБ ім. В. Стефаника
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. У наш час існує достатній об'єм експериментальних даних, які вказують на те, що однією з причин, яка приводить до пошкодження еритроцитів під час заморожування, є зміни в структурі комплексу цитоскелет-біслой внаслідок зростання осмотичного градієнта на мембрані (Бондаренко В.А., 1988). Відомо, що розвиток чутливості еритроцитів до холодового шоку в гіпертонічних розчинах в значній мірі залежить від рН та іонної сили середовища (Green F.A., Yung C.Y., 1977), які контролюють потоки хлору та калію в еритроцитах (Bernhardt I., 1992). У той же час чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку не залежить від складу середовища передінкубації, а визначається тільки його осмолярністю (Поздняков В.В., 1989). Це вказує на важливу роль початкового об'єму клітин у їх чутливості до гіпертонічного та холодового шоку.

Крім того, встановлено, що білки цитоскелета відповідають за регуляцію осмотичної поведінки еритроцитів (Heunbush P., 1985). Отже, чутливість еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку може визначатись станом мембранного скелета, його окремих компонентів та їх взаємодією з інтегральними білками мембрани, зокрема, з білком смуги 3.

Враховуючи це, метою нашої роботи було вивчення особливостей розвитку чутливості еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку при модифікації функціонального та структурного стану білка смуги 3 еритроцитів, а також при модифікації взаємодії вказаного білка та білка смуги 4.1 з компонентами цитоскелета.

Задачі дослідження. Згідно з постановленою метою роботи передбачали вирішити такі експериментальні задачі:

1. Дослідити взаємозв'язок між характером модифікації білка смуги 3 мембран еритроцитів та розвитком чутливості клітин до холодового та гіпертонічного шоку.

2. Дослідити динаміку розвитку чутливості еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку в умовах, коли зростання осмолярності середовища передінкубації супроводжується або не супроводжується збільшенням іонної сили.

3. Вивчити динаміку розвитку чутливості еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку після обробки клітин реагентами (ДІДС, ПХМБ, гемін), модифікуючими взаємодію білків цитоскелета між

собою та з компонентами мембрани.

Наукова новизна. Показано, що розвиток чутливості еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку в розчині, який містить 0.86 моль/л сахарозу або 1.2 моль/л NaCl, може залежати від іонного складу клітини. Але чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку при переносі клітин в 3 моль/л NaCl не визначається цим фактором.

Показано, що спрямованість дії інгібітора аніонного транспорту ДІДО на розвиток чутливості еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку корелює зі спрямованістю його впливу на звільнення катіонів калію з клітин. Якщо середовище передінкубації містить гіпертонічний розчин з низькою іонною силою (0.86 моль/л сахароза), то інгібування втрат калію в присутності ДІДО супроводжується блокуванням розвитку холодової та осмотичної чутливості. І навпаки, коли середовище передінкубації містить гіпертонічний розчин з високою іонною силою (1.2 моль/л NaCl), то збільшення рівня втрати калію в присутності інгібітора супроводжується ростом чутливості еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку.

Показано, що модифікація еритроцитів ПХМБ або геміном приводить до втрати здатності цих клітин змінювати свою форму при зростанні осмолярності середовища.

Теоретичне та практичне значення роботи.

Механізм розвитку чутливості еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку пов'язаний з модифікацією взаємодій білка смуги 4.1 та білка смуги 3 з компонентами цитоскелета.

Одержані в роботі результати дозволяють обґрунтувати нові підходи щодо розробки методів низькотемпературного консервування еритроцитів, враховуючи вплив температури, іонної сили, концентрації іонів хлору, а також осмолярності консервуючого розчину.

Положення, які виносяться на захист.

1. Розвиток чутливості еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку визначається механізмом, залежним від осмолярності середовища, в основі якого лежить модифікація структурних взаємодій між цитоскелетом та мембраною.

2. Розвиток холодового шоку еритроцитів в гіпертонічних розчинах з низькою (0.86 моль/л сахарози) або високою іонною силою (1.2 моль/л NaCl) залежить від іонного складу клітини, в той же час

гіпертонічний шок не визначається цими факторами.

Апробація роботи. Матеріали роботи доповідились на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992).

Публікації. По матеріалах дисертації опубліковано 2 роботи.

Структура дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, 5 глав власних досліджень та їх обговорювання, закінчення, висновків та списку літератури, який включає 147 робіт закордонних авторів та 20 - відчизняних. Робота викладена на 138 сторінках машинописного тексту, містить 23 малюнки.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

У роботі використовували еритроцити, одержані з донорської крові 2-ї групи.

Для блокування потоків хлору через мембрану використовували інгібітор аніонного транспорту ДІДС (4,4'-дизотіоціаностильбен-2,2'-дисульфонат).

Для модифікації взаємодії цитоскелет-біслой еритроцити були оброблені геміном або ПХМБ (пара-хлормеркурійбензоат).

Залишкову кількість іонів калію в еритроцитах визначали в гемолізаті калій-чутливим мембранним електродом (Nasey F.I., 1978).

Холодовий шок еритроцитів в гіпертонічних розчинах сахарози та NaCl був змодельований на основі загальнопринятої методики (Green F.A., Jung C.Y., 1977).

Гіпертонічний шок еритроцитів здійснювали в розчині, який містив 3 моль/л NaCl (Поздняков В.В., 1989).

Для аналізу зміни форми еритроцитів під дією гіпертонічних розчинів сахарози використовували мікроскопію.

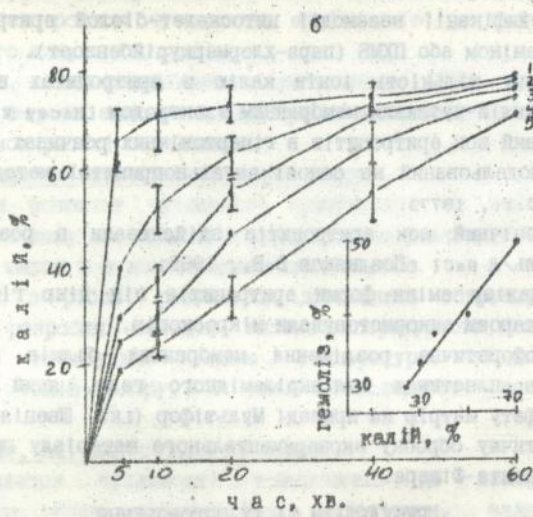
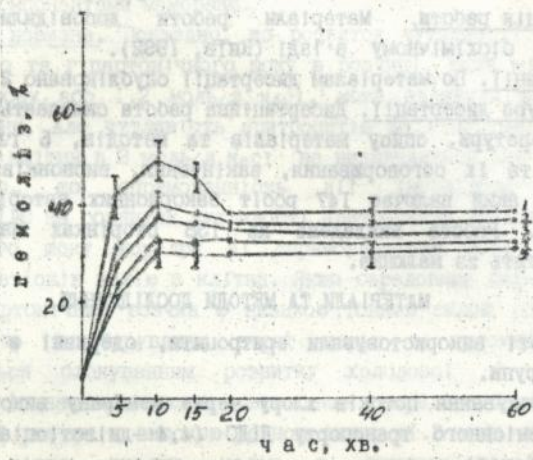
Електрофоретичне розділення мембранних білків еритроцитів проводили в пластинах поліакриламідного гелю, який містив 1х додецилсульфату натрію на приладі Мультифор (ЛКВ, Швеція).

Статистичну обробку експериментального матеріалу проводили по методу Ст'юдента-Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив інгібітора аніонного транспорту ДІДС на чутливість еритроцитів до холодового шоку.

Зниження концентрації NaCl від 150 ммоль/л до 0 в середовищі, яке містить 0.86 моль/л сахарозу, супроводжується зростанням



Мал.1. Чутливість еритроцитів при охолодженні до 0°C (а) і звільнення катіонів калію (б) після інкубації клітин 0-60 хвилин при 37°C в розчині, який містить 0.86 моль/л сахарозу і різні концентрації NaCl (ммоль/л): 1.-0, 2.-25, 3.-50, 4.-100, 5.-150.

Вставка. Залежність холодової чутливості еритроцитів від рівня втрати катіонів калію на 10-й хвилині передінкубації клітин при 37°C.

холодової чутливості еритроцитів після інкубації клітин до 10 хвилин при 37°C (Мал. 1а). Пошкодження еритроцитів під час холодового шоку корелює із звільненням катіонів калія з клітин до 10-ї хвилини інкубації перед охолодженням (Мал. 1б). Збільшення часу інкубації до 60 хвилин не викликає підвищення чутливості клітин до наступного охолодження (Мал. 1а), не дивлячись на те, що втрата катіонів калію продовжується (Мал. 1б).

Присутність інгібітора аніонного транспорту ДІДС приводить до зміни динаміки розвитку холодової чутливості. Чим нижче концентрація NaCl в середовищі інкубації, тим більше ступінь зниження рівня холодового шоку в присутності ДІДС. Втрата катіонів калію еритроцитами в перші хвилини значно гальмується в присутності ДІДС, що засвідчує про залежність процесу від вихідного потоку хлору. Отже, рівень виходу калія відображає ступінь звільнення хлору з клітин в середовище в перші хвилини інкубації (Мал. 1). Зниження концентрації NaCl в середовищі викликає збільшення градієнта аніонів хлору, спрямованого з клітини [Glaser R, Donath J, 1984]. Отже, можна припустити, що залежність холодового шоку еритроцитів від концентрації NaCl в середовищі, яке містить 0.86 моль/л сахарозу, в перші хвилини інкубації є залежністю процесу від ступеню звільнення аніонів хлору, яке визначає рівень втрати катіонів калія. Відсутність зростання чутливості еритроцитів до холодового шоку в інтервалі часу 10-60 хвилин (Мал. 1а) в умовах тривалої втрати калію можна пояснити тим, що за фазового росту внутріклітинного рН в перші хвилини в гіпертонічному середовищі інкубації з низкою іонною силою відбувається закислення внутріклітинного середовища [Sitaraman V., 1983], яке може блокувати холодову чутливість [Jung C.Y., Green F.A., 1978].

Розвиток чутливості еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку після інкубації в розчинах неелектролітів та електролітів.

Чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку [Поздняков В.В., 1989], на відміну від холодового [Green F.A., Jung C.Y., 1977], визначається тільки осмолярністю і не залежить від іонного складу середовища передінкубації. Це вказує на те, що гіпертонічний шок не залежить від іонного складу клітини.

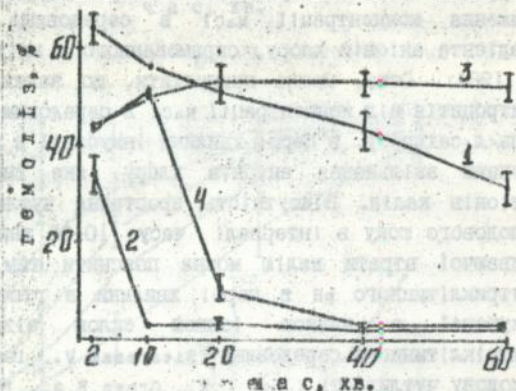
Інкубація еритроцитів в розчині, який містить 1.2 моль/л NaCl , до 60-ти хвилин зумовлює зниження чутливості клітин до охолодження

(Мал. 2). При цьому чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку при переносі в 3 моль/л насі не змінюється. Присутність іонофора нігірицина викликає втрату чутливості еритроцитів до охолодження раніше, чим до гіпертонічного шоку (Мал. 2). Можливо, повне усунення осмотичного градієнта насі відбувається на 40-й хвилині передінкубації в іонофором, коли повністю зникає чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку.

Чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку після інкубації на протязі 60 хвилин в середовищі, яке містить 0.86 моль/л сахарозу, не змінюється. Це вказує на те, що звільнення катіонів калію в данному середовищі не впливає на розвиток гіпертонічного шоку на відміну від холодового.

Чутливість еритроцитів до холодового шоку та заморожування в значній мірі залежать від початкового об'єму клітин (Негуман

Мал.2. Вплив нігірицина на чутливість еритроцитів до охолодження до 0°C (1,2) і гіпертонічного шоку при переносі в 3 моль/л насі (3,4) після інкубації при 37°C в розчині, який містить 1.2 моль/л насі. 1,3-контроль, 2,4-нігірицин, 10 мкмоль/л.

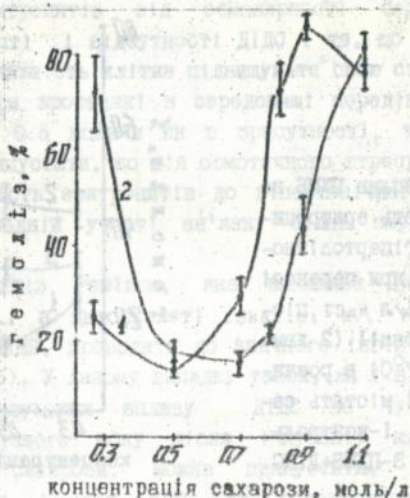


н.т., 1971) також, як і чутливість їх до гіпертонічного шоку (Поздняков В.В., 1969). Еритроцити, виснажені по калію, в ізотонічному середовищі мають менший об'єм, чим нормальні клітини, тоді як підвищення осмолярності середовища вище 0.6 осмоль ліквідує різницю в об'ємах (Негуман Н.Т., 1971). З цього слідує, що втрата катіонів калію в середовищі, яке містить 0.86 моль/л сахарозу, не приводить до додаткового зменшення об'єму еритроцитів. Таким чином, можна припустити, що чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку не залежить від іонного складу клітини порівняно з холодовим шоком.

Додаткове підвищення чутливості еритроцитів до холодного шоку при зростанні рівня втрат калію може бути пов'язане з перебудовами в мембрані, які викликаються температурою під час охолодження (Бондаренко В.А., 1988).

Вплив модифікаторів цитоскелета на чутливість еритроцитів до холодного та гіпертонічного шоку.

Зростання концентрації сахарози в середовищі передінкубації до 0.5 моль/л веде не тільки до зниження чутливості клітин до гіпертонічного шоку, але й до усунення впливу ДІДС на цю чутливість (Мал. 3). Так, якщо присутність модифікатора в ізосмотичному середовищі інкубації викликає підвищення чутливості еритроцитів до гіпертонічного шоку, то в середовищі, яке містить 0.5 моль/л сахарозу, де еритроцити набувають стійкості до гіпертонічного шоку, присутність ДІДС вже не викликає зміни чутливості.

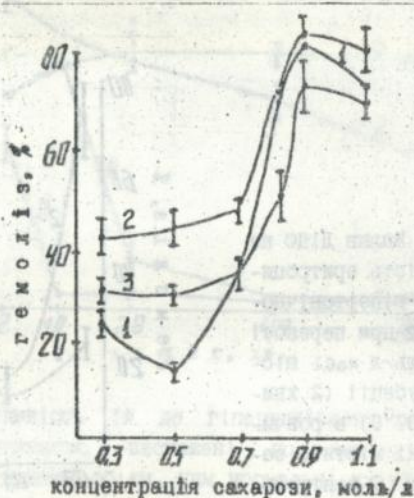


Мал.3. Вплив ДІДС на чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку при переносі в 3 моль/л NaCl після інкубації (2 хвилини, 37°C) в розчинах, які містять сахарозу. 1-контроль, 2-ДІДС, 10 мкмоль/л.

Зростання концентрації сахарози вище 0.5 моль/л викликає підвищення чутливості еритроцитів до гіпертонічного шоку. При цьому вплив ДІДС зводиться до зниження чутливості (Мал. 3). Таким чином, спрямованість дії ДІДС залежить від осмослярності середовища.

передінкубації. Враховуючи те, що дія інгібітора аніонного транспорту ДІДС на холододивний та гіпертонічний шок може бути пов'язана з його впливом на взаємодію білка смуги 3 з цитоскелетом [New L., Morrison M., 1983], ми використали ПХМБ з метов модифікації вказанної взаємодії [Clark S., Falston G.V., 1990].

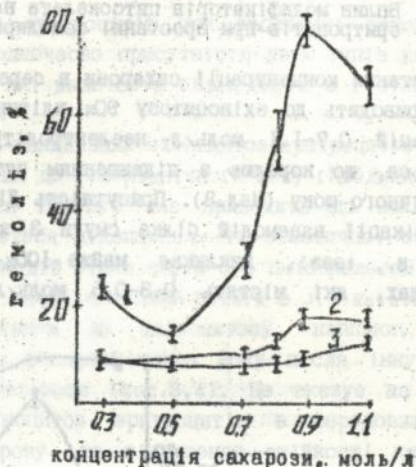
Внаслідок модифікації еритроцитів ПХМБ рівень гіпертонічного шоку після інкубації в розчинах, які містять 0.27 та 0.5 моль/л сахарозу, зростає (Мал.4), і ефект зниження чутливості, який відмічався для інтактних еритроцитів при підвищенні концентрації сахарозу, не виявляється. Крім того, вказана модифікація привела до усунення дії ДІДС, залежної від осмолярності середовища, що було виявлено у випадку немодифікованих еритроцитів (Мал.3). Так, в ізоосмотичному середовищі, присутність ДІДС вже не приводить до зростання чутливості еритроцитів до гіпертонічного шоку (Мал.4).



Мал.4. Вплив ПХМБ на чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку при переносі в 3 моль/л наст після інкубації (2 хвилини, 37°C) в розчинах, які містять сахарозу. 1-контроль, 2-ПХМБ, 3-ПХМБ+ДІДС.

Іншими словами, модифікація еритроцитів ПХМБ приводить не тільки до усунення механізму, за участю якого зростання осмолярності середовища підвищує стійкість еритроцитів до гіпертонічного шоку, але до зміни спрямованості дії ДІДС, яка залежить від осмолярності середовища передінкубації. Враховуючи подібний характер залежностей

Мал.5. Вплив геміна на чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку при переносі в 3 моль/л касі після інкубації (2 хвилини, 37°C) в розчинах, які містять сахарозу. 1-контроль, 2-гемін, 3-гемін+ДІДС.

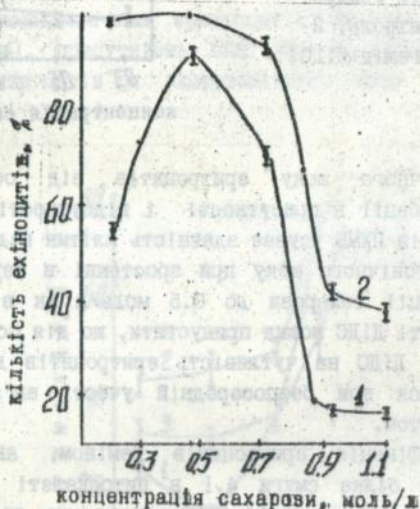


гіпертонічного шоку еритроцитів від осмолярності середовища передінкубації в присутності і відсутності ДІДС і те, що обробка еритроцитів ПХМБ усуває здатність клітин підвищувати свою стійкість до гіпертонічного шоку при зростанні в середовищі передінкубації концентрації сахарози до 0.5 моль/л як в присутності, так і в відсутності ДІДС можна припустити, що дія осмотичного стресу, також як і дія ДІДС на чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку, здійснюється при безпосередній участі зв'язку білка смуги 3 з цитоскелетом.

Модифікація еритроцитів геміном, яка викликає порушення взаємодій білка смуги 4.1 в цитоскелеті [Shaklai M., 1988] на відміну від модифікації ПХМБ, приводить до значного інгібування гіпертонічного шоку (Мал.5). У даному випадку також, як і в випадку з ПХМБ, відбувається усунення впливу ДІДС на чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку після інкубації клітин в ізоосмотичному розчині сахарози. Можна припустити, що дія осмотичних факторів, як і дія ДІДС на гіпертонічний шок відбувається внаслідок модифікації взаємодій як білка смуги 3, так і білка смуги 4.1 з компонентами цитоскелета.

Вплив модифікаторів цитоскелета на зміну форми еритроцитів при зростанні осмолярності середовища.

Зростання концентрації сахарози в середовищі інкубації до 0.6 моль/л приводить до ехіноцитозу 90% клітин (Мал. 6). В інтервалі концентрацій 0.7-1.1 моль/л неелектроліту кількість ехіноцитів зменшується, що корелює з підвищенням чутливості еритроцитів до гіпертонічного шоку (Мал.3). Присутність ДІДС, дія якого приводить до модифікації взаємодії білка смуги 3 з цитоскелетом [Inou L., Morrison N., 1983], викликає майже 100%-й ехіноцитоз клітин в середовищах, які містять 0.3-0.5 моль/л сахарози. Підвищення



Мал.6. Вплив ДІДС на зміну форми еритроцитів при зростанні осмолярності середовища. 1-контроль, 2-ДІДС. 10 мкмоль/л.

концентрації неелектроліту до 1.1 моль/л приводить до зниження рівня ехіноцитозу, викликаного в присутності ДІДС (Мал.6), що також корелює з ростом чутливості еритроцитів до гіпертонічного шоку (Мал.3).

Модифікація еритроцитів ПХМБ [Clark S.J., Ralston G.V., 1980] або геміном [Shaklai N., 1986], яка приводить до зміни взаємодії білка смуги 3 або білка смуги 4.1 з цитоскелетом, відповідно, приводить до ехіноцитозу і повної втрати здатності клітин змінювати свою форму при підвищенні осмолярності середовища. Ці дані свідчать

про те, що зміна форми еритроцитів при зростанні осмоларності середовища визначається одночасно присутністю двох типів контактів цитоскелета з мембраною, які включають білок смуги 3 і білок смуги 4.1.

Відомо, що осмотично-викликаний ехіноцитоз еритроцитів веде до підвищення стійкості клітин до гіпертонічного шоку (Поздняков В.В., 1988). Дія на еритроцити геміну, яка приводить до ехіноцитозу клітин, також супроводжується підвищенням їх осмотичної стійкості (Мал.5). Модифікація взаємодії білка смуги 3 з цитоскелетом при дії ДІДС (Hsu L., Morrison M., 1983) або ПХМБ (Clark S.J., Ralston G.V., 1990), яка приводить також до ехіноцитозу, навпаки, знижує стійкість еритроцитів до гіпертонічного шоку після інкубації в ізосмотичному розчині сахарози (Мал.3,4). Це вказує на те, що осмотично-викликаний ехіноцитоз еритроцитів в середовищі, яке містить 0.5 моль/л сахарозу, та підвищення стійкості клітин до гіпертонічного шоку після інкубації в цьому середовищі, пов'язані насамперед, з модифікацією взаємодії білка смуги 4.1 в цитоскелеті.

ВИСНОВКИ

1. Втрата катіонів калію еритроцитами в середовищі, яке містить 0.86 моль/л сахарозу, при інкубації до 10 хвилин корелює із зростанням чутливості клітин до наступного охолодження. Додаткова втрата катіонів калію при інкубації еритроцитів від 10 до 60 хвилин не приводить до підвищення чутливості клітин до охолодження.

2. Втрата катіонів калію еритроцитами в середовищах, які містять 0.27, 0.86 моль/л сахарозу або 1.2 моль/л NaCl, при інкубації до 60 хвилин не впливає на чутливість клітин до гіпертонічного шоку при їх переносі в 3 моль/л NaCl із відповідних середовищ.

3. Дія інгібітора аніонного транспорту ДІДС на чутливість еритроцитів до холодового та гіпертонічного шоку та звільнення катіонів калію залежить від іонної сили середовища передінкубації. В середовищі, яке містить 0.86 моль/л сахарозу, присутність ДІДС викликає зменшення як виходу калію, так і чутливості еритроцитів до охолодження. Якщо середовище інкубації містить 1.2 моль/л NaCl, то присутність ДІДС приводить до збільшення виходу калію і росту чутливості клітин до охолодження.

4. Обробка еритроцитів ПХМБ не викликає суттєвих змін в

чутливості клітин до холодового та гіпертонічного шоку після інкубації їх в розчинах, які містять 0.86 моль/л сахарозу або 1.2 моль/л NaCl, тоді як обробка еритроцитів геміном приводить до значного інгібування холодового та гіпертонічного шоку.

5. Підвищення в середовищі передінкубації концентрації сахарози до 0.5 моль/л або NaCl до 0.45 моль/л як в присутності, так і відсутності ДІДС приводить до зниження чутливості еритроцитів до гіпертонічного шоку при їх наступному переносі в 3 моль/л NaCl. Обробка еритроцитів ПХМБ супроводжується втратою клітин здатності набувати стійкості до гіпертонічного шоку.

6. Присутність ДІДС в середовищі інкубації еритроцитів, яке містить 0.27-0.5 моль/л сахарозу, викликає 100%-й ехіноцитоз клітин. Зростання концентрації сахарози від 0.5 до 1.1 моль/л приводить до зниження здатності ДІДС викликати зміну форми еритроцитів. Обробка еритроцитів ПХМБ або геміном приводить також до ехіноцитозу, але в даному випадку клітини втрачають здатність змінювати форму при підвищенні осмолярності середовища інкубації.

7. Осмотично-викликаний ехіноцитоз або ехіноцитоз, досягнутий внаслідок модифікації еритроцитів геміном, приводить до зниження чутливості клітин до гіпертонічного шоку. Ехіноцитоз, досягнутий дією ПХМБ або ДІДС, навпаки, приводить до росту осмотичної чутливості еритроцитів.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А., Роль структурного стану білків мембрани в розвитку холодового шоку еритроцитів людини// в об.: ві Український біохімічний в'їзд.-Київ.-1992.-ч 1, с.93.

2. Рамазанов В.В., Руденко С.В., Бондаренко В.А. Зв'язок іонних потоків хлору та калію при осмотичному стресі з холодовим шоком еритроцитів// в об.: Фундаментальні та прикладні проблеми кріобіології.-Харків.-1993.

464449

AB 28884
AB 28.884

Відповідальний за випуск В.І.Грищенко

Шлях до друку 17.11.88 Формат 60×84^{1/8}. Папір друк. Друк офсетний.
Умови друк. арк. 40 Умови фарбо-відб. 1,4 Облік-вид. арк. 40
Тираж 120 прим. Зам. № 5447. Безплатно.

Харківське орендне поліграфічне підприємство.
310093, Харків, вул. Свердлова, 115.