

ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

Федосова

ФЕДОСОВА Світлана Миколаївна

**ФАКТОРИ, ЩО КОНТРОЛЮЮТЬ ЧУТЛИВІСТЬ
ЕРИТРОЦИТІВ ДО ОСМОТИЧНОГО
ТА ТЕМПЕРАТУРНОГО ВПЛИВІВ**

03.00.13 — Фізіологія людини та тварин

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00756356 (W)

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

На правах рукопису

ФЕДОСОВА Світлана Миколаївна

ФАКТОРИ, ЩО КОНТРОЛЮЮТЬ ЧУТЛИВІСТЬ
ЕРИТРОЦИТІВ ДО ОСМОТИЧНОГО
ТА ТЕМПЕРАТУРНОГО ВПЛИВІВ

03.00.13 — Фізіологія людини та тварин

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків — 1994

Дисертація є рукопис

Робота виконана на кафедрі фізіології людини та тварин
Харківського державного університету

Науковий керівник доктор біологічних наук, професор
Бондаренко Валерій Антонович

Офіційні опоненти доктор біологічних наук, професор

Панченко Ніна Іванівна
(Харківський інститут
удосконалення лікарів)

доктор біологічних наук, професор

Луговий Володимир Йосипович
(Інститут проблем кріобіології
та кріомедицини АН України, м. Харків)

Провідна установа Харківський медичний інститут

Захист відбудеться « 13 » січня 1995 р.

о 15¹⁵ годині на засіданні спеціалізованої Вченої ради
К 053.06.07 Харківського державного університету (310077,
м. Харків, пл. Свободи, 4, аудиторія 3-15)

З дисертацією можна ознайомитися в Центральній науковій
бібліотеці Харківського держуніверситету.

Автореферат розісланий « 25 » листопада 1994 р.

Учений секретар
спеціалізованої Вченої ради,
кандидат біологічних наук

А. В. Некрасова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Сучасний етап розвитку біологічної науки та медицини характеризується підвищенням інтересом до дослідження загальних закономірностей пошкодження клітин в екстремальних умовах з метою пошуку засобів підвищення їх стійкості до дії несприятливих факторів.

Механізми, що визначають спрямованість відповідної реакції клітини за зміни умов середовища, ще й досі не визначені. Однак, виходячи з того, що початковий структурно-функціональний стан клітини в цілому і, зокрема, її плазматичної мембрани (ПМ), визначають характер адаптаційних та деструктивних змін, що розвиваються в ній при дії несприятливих факторів [Бондаренко В. А. и соавт., 1992; Рамазанов В. В., 1994], формується специфічний підхід до направленої регуляції стійкості клітин. Цей підхід базується на тому, що при перенесенні клітин в специфічні вихідні умови, значно відмінні від фізіологічної норми, можна індукувати в них комплекс змін, які приводять до збільшення стійкості клітин при послідуєчій дії пошкоджуючих факторів [Бондаренко В. А. и соавт., 1992]. Забезпечення таких вихідних умов передбачає модифікацію стану клітини не тільки за допомогою хімічних агентів, фармакологічних препаратів, але й за допомогою добору певного сполучення таких параметрів середовища, як температура та осмолярність.

Важлива роль початкового структурно-функціонального стану клітини і, зокрема, її ПМ, як первинної ланки пошкодження, найбільш чітко просліджується при дії на неї холодового (ХШ) та гіперосмотичного шоку (ГШ) [Белоус А. М. и соавт., 1985] — процесів, які є елементами більш загального механізму пошкодження клітини в процесі консервування органів та тканин методом охолодження або заморожування [Lovelock G. E., 1954; Merz H. T., 1971]. Враховуючи це, складний характер залежності між початковим станом клітини, модифікуючим впливом на нього осмотичних та температурних умов середовища, з одного боку, та чутливістю клітин до наступної дії Х та ГШ, з другого, можна розглядати як тест, що не тільки дозволяє виявити різницю в реакційній здібності клітин, що знаходяться в різних структурно-функціональних станах, але й дає можливість цілеспрямованій регуляції вихідного стану клітини з метою підвищення її стійкості до послідуєчій дії Х та ГШ.

МЕТА ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ. У зв'язку з цим, метою даної роботи було дослідження спрямованості та глибини модифікації структурно-функціонального стану еритроцитів в процесі їх селективної дегідратації в гіперосмотичних розчинах NaCl та сахарози і вивчення взаємозв'язку між вихідним станом клітини та її чутливістю до дії Х та ГШ.

У відповідності з поставленою ціллю були передбачені наступні експериментальні завдання:

1. Дослідити особливості осмотичної та температурної чутливості еритроцитів щурів різного віку (1, 3, 6, 12, 24 міс.).

2. Дослідити спрямованість і глибину модифікації структурно-функціонального стану еритроцитів людини та щурів по мірі збільшення тоничності електролітного та неелектролітного середовища інкубації, включаючи оцінку зміни об'єму і форми клітин, внутріклітинного рН, бар'єрної функції мембрани та стійкості цитоскелету (ЦС) до механічної дії.

3. Прослідкувати особливості розвитку сенсibiliзованого стану еритроцитів людини та щурів до дії Х та ГШ після передінкубації клітин в гіперосмотичних розчинах NaCl та сахарози при 37° і 0°С.

4. Вивчити вплив додаткової температурної (+49 ÷ +50°С) та хімічної (за допомогою SITS, діпіридамолу та лідокаїну) модифікації структурно-функціонального стану еритроцитів людини та щурів на чутливість цих клітин до дії Х та ГШ.

НАУКОВА НОВИЗНА. Вперше виявлено, що механізми, які лежать в основі реакційної здібності клітини, можуть контролюватися такими факторами середовища, як температура та осмолярність, але глибина їх проявлення в значній мірі детермінована віком організму. Зміни структурно-функціонального стану еритроцитів, що відбуваються в різних фазах життєвого циклу організму, виявляються в зміні чутливості цих клітин до механічного, температурного та осмотичного впливів. При цьому, зміни різних параметрів структурно-функціонального стану еритроцитів в процесі розвитку та старіння організму не носять прямолінійного характеру та не відбуваються односпрямовано.

Механізм сенсibiliзації еритроцитів людини та щурів до дії Х та ГШ пов'язаний зі змінами, що відбуваються в комплексі ЦС—ПМ. Однак, в еритроцитах щурів, поряд із структурним механізмом контролю реакційної здібності клітин суттєвий вклад в механізм сенсibiliзації вносять інші механізми, які можуть бути зв'язані з метаболічним статусом клітини, станом ліпідів бішару, та з функціонуванням систем транспорту іонів, що регулюють об'єм клітини.

Вперше показано, що додаткова модифікація стану еритроцитів за допомогою препаратів, які змінюють структурно-функціональний стан капнофорину та характер його взаємодії з ферментами гліколізу (ФГК, ГАФДГ), білками ЦС (білками смуг 2.1 та 4.1) та ліпідами бішару, суттєво змінює чутливість еритроцитів людини та щурів до дії Х та ГШ. При цьому, сам модифікуючий вплив SITS, діпіридамолу та лідокаїну на чутливість еритроцитів людини та щурів до дії Х та ГШ має ряд відмінних особливостей.

ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ.

Результати роботи не тільки розширюють уявлення про існуючі в клітинах власні механізми регуляції їх чутливості до дії несприятливих факторів середовища, але й важливі для більш глибокого розуміння механізмів, що обумовлюють розвиток X та ГШ. Одержані дані дають підхід до розуміння механізмів дії на рівні клітини ряду фармакологічних препаратів (діпіридамолу, лідокаїну), що надає можливість для більш адекватного їх використання у медичній практиці.

Одержані в роботі результати дозволяють обґрунтувати нові підходи для розробки методів низькотемпературного консервування еритроцитів з урахуванням впливу температури, іонної сили, осмолярності середовища консервування. Одержані дані також можуть бути використані і для розробки нових підходів у вивченні еритроцитів як показника вікових змін в організмі людини в нормі та при патологічних станах.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВИНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ:

1. Конкретний характер розвитку сенсibilізованого стану еритроцитів до дії X та ГШ обумовлений видовою належністю клітин, а глибина його проявлення — особливостями структурно-функціонального стану клітини, які детерміновані віком організму.
2. Вплив осмотичних та температурних факторів середовища передінкубациї на чутливість еритроцитів до дії X та ГШ може здійснюватись через модифікацію структурно-функціонального стану капнофоріну-білка смуги 3, який контролює не тільки транспорт аніонів та води, але й характер асоціації ЦС з ПМ.
3. Модуляція структурних взаємодій капнофоріну з ферментами гліколізу (ФГК, ГАФДГ), білками ЦС (білками смуг 2.1 та 4.1) та ліпідами бішару є фактором, здатним здійснювати координацію існуючих в клітині функціональних, структурних та метаболічних механізмів регуляції реакційної здібності клітини.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Матеріали дисертації доповідались на конференції молодих вчених біологічного факультету, НДІ біології ХДУ (Харків, 1994); республіканській науково-практичній конференції «Сучасні проблеми фармації» (Харків, 1994).

ПУБЛІКАЦІЇ. По матеріалам дисертації опубліковано 5 робіт: 2 депоновані статті, 3 роботи в тезах.

СТРУКТУРА ТА ОБСЯГ ДИСЕРТАЦІЇ. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, трьох глав опису результатів власних досліджень та їх обговорення, висновків, списку літератури, який включає 178 робіт зарубіжних та 90 робіт вітчизняних авторів, додатку. Робота викладена на 150 сторінках машинописного тексту, утримує 49 малюнків, 4 схеми та 15 таблиць.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі були використані еритроцити 1, 3, 6, 12 та 24 місячних самців — шурів лінії Вістар та еритроцити донорської крові II — групи чоловіків 34—39 років.

Різні початкові стани клітин формувались за допомогою дегідратації в процесі 10-хвилинної інкубації еритроцитів в гіперосмотичних розчинах NaCl та сахарози. Для характеристики вихідного стану клітин рееструвався їх об'єм методом спектроскопії імпульсів опору на приладі типу Coulter-Counter [Heinbush P. et al., 1985]. Аналіз зміни форми еритроцитів проводився на мікроскопі БЮЛАМ. Залишковий вміст іонів K^+ в еритроцитах визначався за допомогою калій-селективного мембранного електроду [Macey R. I., 1978]. Вимірювання внутріклітинного рН проводилось по загальноприйнятому методу [Roos A., 1981]. Досліджувалась стійкість ЦС еритроцитів до механічного впливу згідно Leibo S. P., 1976.

Для модифікації структурно-функціонального стану капноферину еритроцити оброблялись SITS (0,01 мМ), діпіридамолом (0,05 мМ) та лідокаїном (10 мМ). Температурна денатурація анкірину здійснювалась при $+49^\circ C$ [Лапшина Е. А., Заводник И. Б., 1993].

Гіперосмотичний шок еритроцитів здійснювався переносом аліквот клітинних суспензій, проінкубованих на протязі 10 хвилин при 37° та $0^\circ C$ в досліджуваних розчинах NaCl і сахарози, в 2,00 та 4,00 М розчини NaCl [Поздняков В. В., 1989].

Холодовий шок еритроцитів був змодельований на основі загальноприйнятої методики [Green F. A., Jung C. Y., 1977].

Статистичну обробку експериментальних даних проводили по методу Ст'юдента-Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ОСМОТИЧНОЇ ТА ТЕМПЕРАТУРНОЇ ЧУТЛИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ. З урахуванням того, що структурно-функціональний стан клітин, з одного боку, визначає характер адаптаційних і деструктивних змін, що розвиваються в них при дії пошкоджуючих факторів, а, з другого боку, є відображенням процесів, що відбуваються на рівні цілісного організму [Лопухин Ю. М. и соавт., 1993], можна припустити, що чутливість еритроцитів до дії несприятливих факторів, у тому числі, температурних і осмотичних, може бути детермінована віком організму.

Виявлено, що передінкубація еритроцитів шурів різного віку в гіперосмотичних розчинах NaCl та сахарози за різних температурних режимів дає можливість виявити вікові відмінності структурно-функціонального стану клітин, які в фізіологічних умовах

являються прихованими, латентними. При цьому, зміни структурно-функціонального стану еритроцитів, які відбуваються на різних етапах життєвого циклу організму, проявляються не тільки в зміні бар'єрної функції ПМ клітин, але й в зміні їх чутливості до механічних, осмотичних та температурних впливів (Мал. 1). Спрямованість проявлення цих змін в онтогенезі різна і залежить від тонічності, складу та температури середовища передінкубації (Мал. 1). Однак, вікові відмінності реєструючих параметрів найбільш виражені після передінкубації клітин в умовах, максимально сенсibiliзуючих еритроцити до дії Х та ГШ, тобто після передінкубації клітин в 0,55—0,75; 1,05—1,50 М розчинах NaCl або в 0,60—0,90 М розчинах сахарози. Незважаючи на те, що зміни параметрів еритроцитів 1- та 24-місячних щурів, з одного боку, та еритроцитів 3- і 12-місячних тварин, з другого, відбуваються односпрямовано по відношенню до показників еритроцитів 6-місячних щурів, ці зміни мають різний зміст і генез.

Одержані дані вказують на існування в клітині власних механізмів контролю її реакційної здібності. Глибина проявлення цих механізмів зумовлена особливостями структурно-функціонального стану клітини, які детерміновані віком організму.

ДЕГІДРАТАЦІЯ ЯК ФАКТОР, ЩО КОНТРОЛЮЄ ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ДО ЗМІНИ ТЕМПЕРАТУРНИХ ТА ОСМОТИЧНИХ УМОВ СЕРЕДОВИЩА. Модифікація структурно-функціонального стану еритроцитів в процесі осмотичної дегідратації супроводжується реорганізацією білків ЦС та компонентів ПМ, зміною характеру і тривкості взаємодії білкової решітки з ПМ. При цьому, в однакових осмотичних та температурних умовах передінкубації формуються різні вихідні стани еритроцитів людини та щурів. Це виявляється в різній, по мірі збільшення тонічності електролітного середовища, спрямованості трансформації клітинної форми, що охоплює, у випадку еритроцитів людини, перехід дискоцит-ехіноцит-плоскі гіпертонічні клітини, а у випадку еритроцитів щурів — дискоцит-акантоцит-тороцит. Виявлені закономірності спостерігаються в критичній області осмолярності, при переході через яку, еритроцити людини та щурів не тільки досягають мінімального об'єму, але й гублять здатність до неідеальної осмотичної поведінки.

В процесі інкубації клітин в досліджуваних розчинах NaCl бар'єрні властивості мембран еритроцитів людини та щурів, стійкість ЦС цих клітин до механічної дії, змінюються по-різному. При цьому, відмінною особливістю еритроцитів щурів являється не тільки висока чутливість до механічної дії, але й високий рівень звільнення іонів K^+ із клітин в процесі їх інкубації в 0,55—0,75 М розчинах NaCl, який корелює з закисленням внутрішнього середовища клітини.

Виходячи з того, що найбільш ранніми, неспецифічними ознаками метастабільного стану клітини є високий рівень звільнення

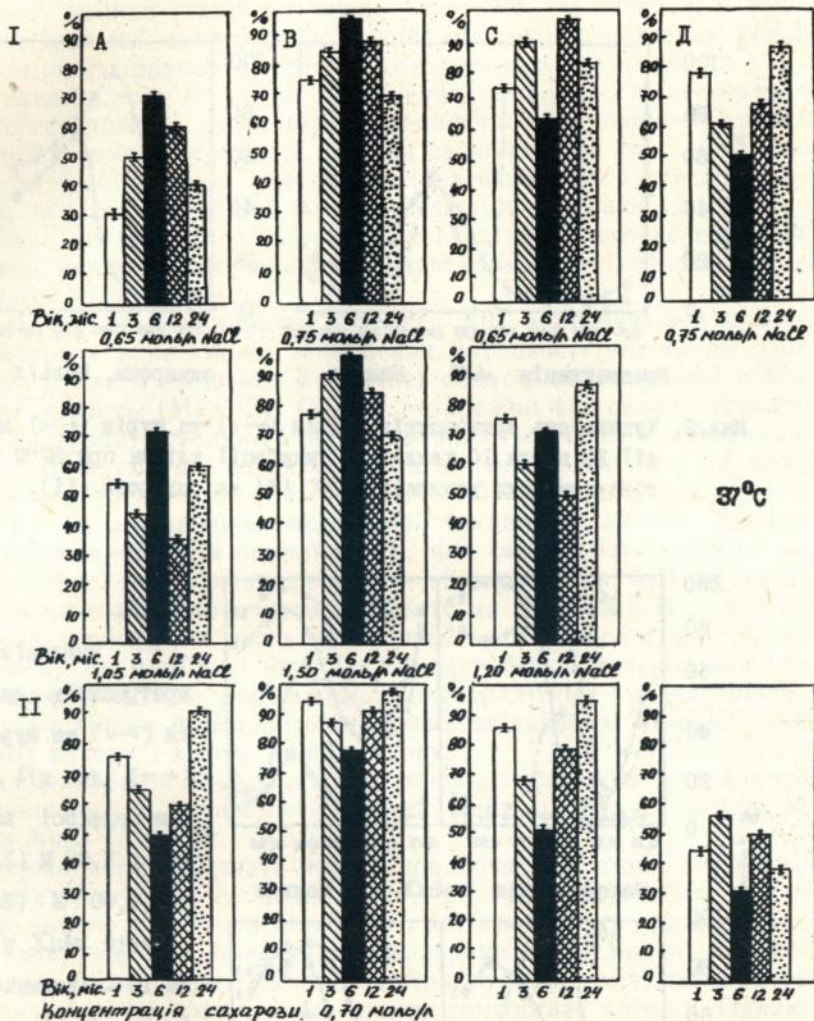
із клітин іонів K^+ і закислення внутріклітинного рН [Бондаренко В. А., 1988; Браун А. Д., 1987; Roos A., 1981], можна чекати, що передінкубація еритроцитів людини в 0,85—3,00 М розчинах NaCl буде сенсibilізувати клітини до наступної зміни осмотичних та температурних умов середовища. У випадку еритроцитів щурів, поряд з цим критичним інтервалом вірогідно існування другого концентраційного інтервалу — 0,55—0,75 моль/л NaCl, передінкубація в межах якого також може чинити сенсibilізуючий вплив. Одержані дані показали, що еритроцити людини та щурів виявляються сенсibilізованими до охолодження після передінкубації в передбачених умовах (Мал. 2).

Чутливість еритроцитів людини та щурів до дії ГШ також значно змінюється в залежності від тоничності середовища передінкубації (Мал. 3). При цьому, відмінною рисою еритроцитів щурів є більш висока, в порівнянні з еритроцитами людини, чутливість до переносу в 2,00 М розчини NaCl. Якщо, у випадку еритроцитів людини, по мірі збільшення тоничності середовища передінкубації відмічається кореляція в зміні чутливості клітин до механічного впливу та до дії ГШ, то еритроцити щурів виявляються максимально сенсibilізованими до дії ГШ в умовах, передінкубація в яких призводить не тільки до максимальної механічної чутливості, але й різкому збільшенню рівня вивільнення іонів K^+ .

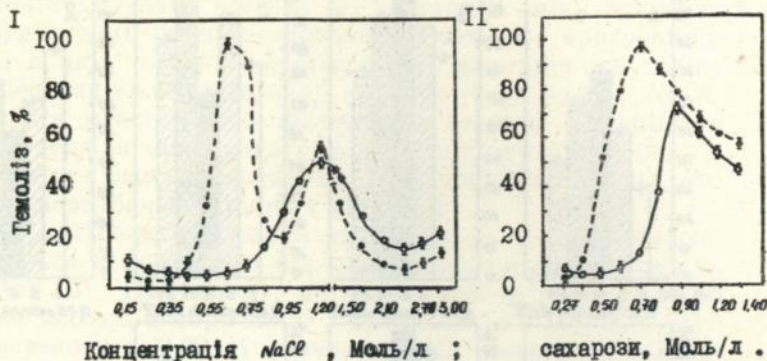
Виявилось, що проявлення клітинних механізмів контролю реакційної здібності залежить не тільки від осмолярності середовища, але й від його температури. Так, передінкубація еритроцитів людини та щурів в гіперосмотичних розчинах NaCl при 0 °С, в порівнянні з 37 °С, призводить не тільки до зменшення рівня звільнення із клітин іонів K^+ , зменшенню механічної чутливості клітин, але й до збільшення їх стійкості до наступних змін умов середовища. Таким чином, виникає можливість цілеспрямованої модифікації вихідного стану клітини за допомогою добору певного сполучення таких параметрів середовища, як температура та осмолярність.

Механізм сенсibilізації клітин до дії Г та ХШ має складну основу та може бути пов'язаний з одночасною дією таких факторів, як зміна об'єму та форми клітини, перерозподіл іонів, зміна внутріклітинного рН та інш.

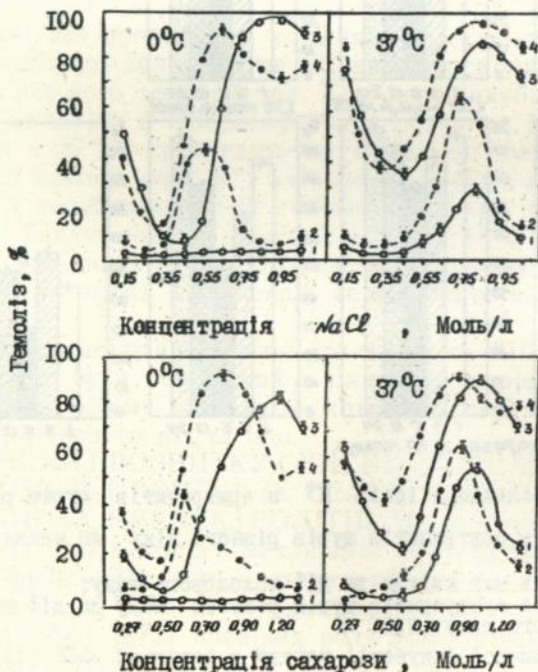
ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ СЕНСIBILІЗОВАНОГО СТАНУ ЕРИТРОЦИТІВ В ПРОЦЕСІ ЇХ СЕЛЕКТИВНОЇ ДЕГІДРАТАЦІЇ В РОЗЧИНАХ НЕЕЛЕКТРОЛІТІВ. Незважаючи на існування в клітинах трьох типів механізмів регуляції їх реакційної здібності: функціонального, структурного та метаболічного [Александров А. А., 1989; Бужурин І. М. і соавт., 1986; Хочачка П., Самеро Дж., 1977] провідна роль відводиться [Браун А. Д. і соавт., 1987] структурному механізму, тобто стану комплексу ЦС—ПМ.



Мал. I. А - Рівень звільнення іонів K^+ з еритроцитів шурів різного віку;
 В - чутливість еритроцитів шурів різного віку до механічного впливу;
 С - чутливість цих клітин до дії холодового шоку;
 Д - чутливість еритроцитів шурів різного віку до дії гіперосмотичного шоку (2,00 М)
 після 10-хвилинної інкубації клітин в розчинах NaCl (I) та сахарози (II) при 37°C.



Мал. 2. Чутливість еритроцитів людини (—○—) та шурів (---) до дії III після 10-хвилинної інкубації клітин при 37°C в гіпертонічних розчинах NaCl (I) та сахарози (II).



Мал. 3.

Чутливість еритроцитів людини (—○—) та шурів (---) до дії III при переносі клітин в 2,00 М (1,2) та 4,00 М (3,4) розчини NaCl після 10-хвилинної їх інкубації при 0° та 37°C в гіперосмотичних розчинах NaCl та сахарози.

Якщо припустити, що визначаючим фактором в механізмі регуляції чутливості клітин до дії Х та ГШ лежать процеси, пов'язані зі зміною стану комплексу ЦС—ПМ, то виявлені в умовах дегідратації еритроцитів в гіперосмотичних розчинах NaCl закономірності повинні зберегтися і в розчинах сахарози.

Виявилось, що за умови збільшення осмолярності неелектролітного середовища зберігаються специфічні спрямованості трансформації форми еритроцитів людини та щурів, які спостерігаються по мірі збільшення осмолярності електролітного середовища. Однак, перехід від однієї клітинної форми до іншої спостерігається при значеннях осмолярності неелектролітного середовища в 2 рази менших в порівнянні зі значеннями осмолярності електролітного середовища.

Характерною особливістю розвитку ХШ еритроцитів в розчинах сахарози є не тільки збільшення чутливості клітин до охолодження, але й зміщення критичної області осмолярності в бік менших значень (Мал. 2). Однак, незалежно від складу середовища, еритроцити людини і щурів виявляються сенсibiliзованими до дії ХШ в умовах, передінкубація в яких призводить до максимального зменшення об'єму клітин, збільшенню рівня втрати іонів K^+ та збільшенню механічної чутливості клітин. Відсутність фіксованої межі осмолярності, яка сенсibiliзує клітини до охолодження, може свідчити про те, що розвиток ХШ визначається величиною осмотичного градієнту на мембрані. В розчинах сахарози досягнення цього критичного негативного гідростатичного тиску на мембрані відбувається при більш низьких значеннях осмолярності, в порівнянні з електролітним середовищем, в силу не тільки більш високого рівня звільнення іонів K^+ , але й в силу виходу з клітин аніонів хлору.

Передінкубація еритроцитів в розчинах сахарози призводить до зменшення їх ізоосмотичної чуттєвості до переносу в 4,00 М розчин NaCl (Мал. 3).

Одержані дані свідчать про те, що початкові стани сенсibiliзації еритроцитів до охолодження та дії ГШ можуть бути пов'язані зі зміною структури білків ЦС, які протидіють стискуванню. На відміну від ГШ, появлення у еритроцитів чутливості до охолодження є наслідком глибоких внутріклітинних змін, які можуть бути пов'язані і з порушенням іонного гомеостазу клітини. Однак, конкретний характер розвитку сенсibiliзованого стану еритроцитів до дії Х та ГШ обумовлений видовою належністю клітин.

ВПЛИВ МОДИФІКАЦІЇ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ КАПНОФОРІНУ НА ХОЛОДОВУ ТА ОСМОТИЧНУ ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ТА ЩУРІВ. Холодова та осмотична чутливість еритроцитів може контролюватися, принаймні, двома групами процесів: 1. Процесами, які зв'язані зі зміною характеру взаємодії білків ЦС між собою та компонентами ПМ на етапі передінкубації; 2. Процесами, які зв'язані зі

змiнами, що розвиваються в клiтинi безпосередньо при переносi її в новi температурнi або осмотичнi умови, коли вiдбувається зрив вихiдної метастабiльностi клiтини. Ця група процесiв може вiдiгравати важливу роль в умовах, коли руйнування клiтин при змiнi умов середовища не зв'язана з їх вихiдною метастабiльностю, наприклад, при переносi клiтин в 4,00 М розчин NaCl iз середовищ з осмолярностю, близькою до фiзiологiчної [Рамазанов В. В., 1994]. В цьому випадку, змiни асоцiацiї компонентiв ЦС з ПМ можуть бути пов'язанi з фазою швидкої змiни об'єму клiтин лiд час переходу в новi осмотичнi умови. При цьому, амплiтуда «об'ємного здвигу» мiнiмальна при величинах осмолярностi 400—500 та 800—900 мОсмоль для розчинiв сахарози та NaCl, вiдповiдно, коли завершується об'ємна, але не розвивається структурна дегiдратацiя клiтини, яка iндукує її вихiдну метастабiльность. В цьому випадку, виникає динамiчно стiйкий стан клiтин, зв'язаний з осмотично iндукованим включенням «структурного механiзму», в основi якого може лежати порушення взаємодiй спектру з лiпiдним бiшаром мембрани, опосередкованих анкiрином, або бiлком смуги 4.1.

Таким чином, рiзниця мiж Х та ГШ полягає в природi процесiв, що модифiкують стан еритроцитiв в перехiднiй фазi. Якщо перехiдна фаза у випадку ГШ — миттєве стиснення еритроцитiв в умовах iзотермiї, то перехiдна фаза ХШ — термотропнi структурнi перебудови, якi вiдбуваються в комплексi ЦС—ПМ.

Оскiльки провiдна роль в контролi стану бiлкiв ЦС та характеру їх взаємодiй з компонентами ПМ належить капнофiрину [Каззенов А. М. и соавт., 1987, 1991], який контролює також анионний та водний транспорт, треба чекати, що змiни структурно-функцiонального стану цього бiлка можуть суттєво змiнити чутливiсть клiтин до температурних та осмотичних впливiв.

Обробка еритроцитiв людини iнгiбитором анионного транспорту — SITS призводить до зменшення чутливостi клiтин до дiї ХШ не тiльки в розчинах сахарози, але й в гiперосмотичних розчинах NaCl. Пiд впливом SITS зменшується чутливiсть еритроцитiв людини до переносу в 2,00 М розчин NaCl, але зростає їх iзоосмотична чутливiсть до переносу в 4,00 М розчин NaCl. Iнгiбуруючий вплив SITS на розвиток ХШ еритроцитiв в розчинах NaCl та сахарози; рiзноспрямована його дiя на чутливiсть клiтин до дiї ГШ в залежностi вiд осмолярностi середовища передiнкубацiї указує на те, що процеси, якi пов'язанi з перерозподiлом мiж клiтиною та середовищем анионiв хлору та катионiв калiю, не являються головними факторами, що контролюють змiну осмотичної та температурної чутливостi еритроцитiв. Таким чином, модифiкуючий вплив SITS на чутливiсть еритроцитiв до дiї Х та ГШ може бути пов'язаний з його впливом на структуру комплексу ЦС—ПМ, оскiльки лiд час взаємодiї SITS з капнофiрином, змiнюється характер взаємодiї анионного переносника

з ліпідами бішару, зростає чисельність зв'язків білка-3 з ГАФДГ та з спектрін-актиновим комплексом, посередником в яких є анкірін [Hsu L., 1983; Clague M. J. et al., 1989].

Додаткова модифікація структурно-функціонального стану еритроцитів людини діпіридамомом, котрий як і SITS, збільшує кількість зв'язків у ланцюзі спектрін—анкірін—капнофорін, підвищує спорідненість капнофорину до ГАФДГ та збільшує рівень внутріклітинногоДФГ [Eaton J. N. et al., 1980; Lowe A. G., et al., 1983], справляє менш виражений, в порівнянні з SITS, інгібіруючий ефект на розвиток ХШ, але більш виражений сенсibiliзуючий вплив на ізоосмотичну чутливість клітин до переносу в 2,00 М та 4,00 М розчини NaCl.

Таким чином, регуляція реакційної здібності еритроцитів людини осмотичними та температурними факторами середовища передінкубації може бути пов'язана і з метаболічним контролем стану комплексу ЦС—ПМ, що відбувається на рівні структурних взаємодій капнофорину з ферментами гліколізу (ГАФДГ, ФГК).

Обробка еритроцитів людини лідокаїном, що підвищує текучість ліпідного бішару, послабляє зв'язки у ланцюзі спектрін—анкірін—капнофорін, та заважає безпосереднім контактам спектрину з фосфоліпідами бішару [Nishiguchi E. et al., 1993; Fuller G. M. et al., 1994], призводить до зменшення чутливості клітин до дії Х та ГШ. При цьому, інгібіруюча дія лідокаїну на холододову чутливість еритроцитів виражена менш, чим SITS, та подібна впливу діпіридамоу, тобто відбувається зміщення критичної області осмолярності, при переході через яку клітини вияляються сенсibiliзованими до охолодження, в бік більших величин. Однак, на відміну від SITS та діпіридамоу, які справляють інгібіруючий вплив на зміни об'єму еритроцитів та збільшують ізоосмотичну чутливість клітин до дії ГШ (4,00 М NaCl), під впливом лідокаїну еритроцити втрачають не тільки здатність до неідеальної осмотичної поведінки, але й високу ізоосмотичну чутливість до переносу в 4,00 М розчин NaCl.

Температурна модифікація (+49 °С) стану еритроцитів людини, яка супроводжується денатурацією анкірину [Лапшина Е. А., Заводник І. Б., 1993] також призводить до зменшення ізоосмотичної чутливості клітин до дії ГШ, втрати неідеальної осмотичної поведінки, але не справляє суттєвого впливу на чутливість еритроцитів до охолодження. Подібний вплив температурна інкубація при +49 °С справляє і на чутливість еритроцитів щурів до дії Х та ГШ. Таким чином, порушення опосередкованих анкіріном взаємодій спектрін-актинової сітки з капнофоріном не справляє суттєвого впливу на чутливість клітин до охолодження, але відіграє важливу роль в «осмотично індукваному механізмі» збільшення стійкості клітин до дії ГШ (4,00 М) по

мірі збільшення тоничності середовища передінкубації до 0,35—0,45 та 0,40—0,50 Моль/л NaCl та сахарози, відповідно.

Вплив же SITS, діпіридамолу та лідокаїну на осмотичну та температурну чутливість еритроцитів щурів має ряд особливостей. На відміну від еритроцитів людини, більш виражений модифікуючий вплив на чутливість клітин до дії X та ГШ справляє не SITS, а діпіридамол та лідокаїн. При цьому, характер зміни осмотичної та температурної чутливості клітин як модифікованих, так і нативних, корелює не тільки зі зміною їх механічної чутливості, але і з характером зміни проникності мембрани для іонів K^+ та зміною внутріклітинного рН. Таким чином, на відміну від еритроцитів людини, структурні механізми контролю реакційної здатності еритроцитів щурів більш тісно пов'язані з метаболічним статусом клітини, станом ліпідів бішару, а також з функціонуванням систем транспорту іонів, які регулюють об'єм клітини.

В основі механізму сенсibiliзації еритроцитів людини та щурів лежить єдиний механізм, пов'язаний зі станом комплексу ЦС—ПМ. На рівні структурних взаємодій капнофоріну з ферментами гліколізу (ГАФДГ, ФГК), білками ЦС (білками смуг 2.1 та 4.1) і ліпідами бішару може здійснюватися координація існуючих в клітині власних структурних, функціональних та метаболічних механізмів контролю її реакційної здібності.

ВИСНОВКИ

1. Характер реакції еритроцитів на зміну осмотичних та температурних умов середовища вказує на існування в цих клітинах специфічних та неспецифічних механізмів, які контролюють спрямованість та глибину розвитку їх відповідних реакцій на дію зовнішніх факторів.

2. Механізми, що забезпечують реакції клітин на зміну зовнішніх умов, контролюються такими факторами середовища як температура та осмолярність, однак їх проявлення залежить від структурно-функціонального стану клітини та, в значній мірі, детерміновано віком організму.

3. Зміни структурно-функціонального стану еритроцитів, що відбуваються на різних етапах життєвого циклу організму, виявляються в зміні чутливості цих клітин до механічних, осмотичних та температурних впливів.

4. Для зміни різних параметрів структурно-функціонального стану еритроцитів в процесі розвитку та старіння організму експериментальних тварин відмічається відсутність не тільки прямолінійного характеру, але й односпрямованості. Незважаючи на те, що відмічається кореляція в зміні параметрів еритроцитів 1- та 24-місячних щурів по відношенню до показників еритроцитів

6-місячних тварин, з одного боку, і еритроцитів 3- та 12-місячних шурів, з другого, ці зміни мають різний зміст та генез.

5. Структурною основою механізму, який контролює в умовах дегідратації чутливість еритроцитів до дії Х та ГШ є зміна характеру асоціації білків ЦС між собою та компонентами ПМ.

6. Аналіз впливу температурних та осмотичних умов середовища на стан комплексу ЦС—ПМ, вказує на втягнення в процес зміни структурно-функціонального стану капнофорину, який контролює аніонний та водний транспорт, а також стан комплексу ЦС—ПМ.

7. Модуляція структурних взаємодій капнофорину з ферментами гліколізу (ГАФДГ, ФГК), ліпідами бішару та білками ЦС (білками смуг 2.1 та 4.1) є фактором, що здатний здійснювати координацію структурного, функціонального та метаболічного механізмів регуляції реакції еритроцитів на осмотичні та температурні дії.

8. Виявлені відмінності в механічній, осмотичній та температурній чутливості нативних та модифікованих SITS, діпіридамом та лідокаїном еритроцитів людини та шурів можуть бути обумовлені не тільки видовими особливостями організації комплексу ЦС—ПМ, механізмів активації транспорту іонів при зміні об'єму клітини, але й особливостями інтеграції процесів, які формують загальний механізм контролю іонного гомеостазу еритроцитів людини та шурів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Федосова С. Н. Модифицирующее действие курантила на развитие холодового и гиперосмотического шока эритроцитов в растворах электролитов//ВИНИТИ. Депонированные научные работы. — 1994. — № 94-УК-94.

2. Федосова С. Н. Модифицирующее влияние курантила на температурную, осмотическую и механическую чувствительность эритроцитов в растворах неэлектролитов//ВИНИТИ. Депонированные научные работы. — 1994. — № 96-УК-94.

3. Федосова С. Н., Божок Г. А. «Печать» возраста организма на осмотическом поведении эритроцитов//Биологические механизмы старения. Симпозиум. Тез. докл. — Харьков, 1994. — С. 153.

4. Федосова С. М., Кудокоцева О. В. Курантил як модифікатор температурної та осмотичної чутливості еритроцитів людини в розчинах неелектролітів//В зб.: Сучасні проблеми фармації. Тез. доп. респ. наук. практ. конф. — Харків, 1994. — С. 15.

5. Федосова С. Н. Модифицирующее влияние лидокаина на температурную, осмотическую и механическую чувствительность эритроцитов человека и крысы//Тез. докл. науч. конф. мол. уч. биол. ф-та и НИИ биол. ХГУ. — Харьков. — 1994. — С. 43.

Федосова Светлана Николаевна. Факторы, контролирующие чувствительность эритроцитов к осмотическим и температурным воздействиям.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 — Физиология человека и животных. Харьковский государственный университет, Харьков, 1994.

Исследовалось влияние температурных и осмотических условий среды прединкубации, фармакологических препаратов, возраста организма на чувствительность эритроцитов человека и крысы к действию холодового и гиперосмотического шока. Установлено, что механизмы, лежащие в основе реакционной способности клетки, контролируются такими факторами среды как температура и осмолярность, однако проявление этих механизмов детерминировано возрастом организма и зависит от исходного состояния клетки. Делается вывод о том, что на уровне структурных взаимодействий капнофорина с ферментами гликолиза (ГАФДГ, ФГК), белками цитоскелета (белками полос 2.1 и 4.1) и липидами бислоя может осуществляться координация существующих в клетке собственных структурных, функциональных и метаболических механизмов контроля ее реакционной способности. Выявленные различия в осмотической, механической и температурной чувствительности нативных и модифицированных SITS, дипиридамолом и лидокаином эритроцитов человека и крысы могут быть обусловлены не только видовыми различиями структурной организации комплекса цитоскелет—мембрана, особенностями механизмов активации транспорта ионов при изменении объема клетки, но и особенностями самих механизмов контроля ионного гомеостаза эритроцитов человека и крысы.

Fedosova Svetlana Nicolajevna. The factors that control the sensitivity of erythrocytes to osmotic and temperature influences.

The thesis on competition for scientific degree of candidate of biological science on speciality 03.00.13 — Human and animal physiology. Kharcov State University, Kharcov, 1994.

The influence temperature and osmotic condition of preincubation, pharmacologic preparation and age of organism on sensitivity of human and rat erythrocytes to action of cold and osmotic shock have been studed.

It has been shown that mechanisms underlying the cell reactivity may be controlled by such parameters of mediun as temperature and osmolarity, none the less display of these mechanisms was determined by age of organism and depended on initial state of cell. It has been concluded that structural, functional and metabolic mechanisms of regulation of cell reactivity may be co-ordinated by the structural interections of capnophorine with

glycolytic enzymes (PGK, GAPDN), cytoskeleton proteins (protein band 4.1 and ankyrin) and lipid bilayer. The revealed distinction of temperature and osmotic sensitivity of native and modified by SITS, dipyrindamol and lidocain human and rat erythrocytes may be determined not only by structural differences of cytoskeleton — membrane complex; activation mechanism peculiarities of the ion transport in the process of cell volume change, but also by control mechanism peculiarities of the ionic homeostasis of human and rat erythrocytes.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: еритроцит, плазматична мембрана (ПМ), цитоскелет (ЦС), карнофорін, анкірін, гліцераальдегід-3-фосфат-дегідрогеназа (ГАФДГ), фосфогліцераткіназа (ФГК), 2,3-дифосфогліцерат (ДФГ), холодний шок (ХШ), гіперосмотичний шок (ГШ), діпіридамо́л, лідокаїн, 4-ацетамідо-4'-ізотіоціаностильбен-2,2-дисульфат (SITS).

Резюме



Підп. до друку 11.10.1994 р. Формат 60×84¹/₁₆. Папір друк. Умов. друк.
арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0. Зам. № 1621. Тираж 100 прим. Безкоштовно.
310003. Харків, вул. Університетська, 16, Харківська друкарня № 16.

456905

Ac 31.597

AB 31.597