

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК *України*
Інститут проблем кріобіології та кріомедицини

На правах рукопису

БОНДАРЕНКО Тетяна Петрівна

ОСМОЛЯРНІСТЬ ТА ТЕМПЕРАТУРА СЕРЕДОВИЩА ЯК
ФАКТОРИ, ЩО РЕГУЛЮЮТЬ ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ДО
ОХОЛОДЖЕННЯ ТА ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

03.00.22 - кріобіологія

автореферат

дисертації на здобуття наукового
ступеня доктора біологічних наук

Харків - 1994 р.



00778494 (\$)

Робота виконана в Інституті проблем кріомедицини Національної Академії наук України.

Науковий консультант:

чл.-кор.НАН України

А.М.БІЛОУС

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук,

професор В.О.МОІСЄВ

доктор біологічних наук,

професор О.Я.МОГІЛЕВСЬКИЙ

доктор біологічних наук,

професор П.А.КАЛІМАН

Провідна організація: Інститут фізіології ім.О.О.Богомольца НАН УКРАЇНИ, м.Київ

Захист відбудеться "21" листопада 1995 р. в "13"³⁰

годин на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 016.60. при Інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (310015, м.Харків, вул.Переяславська, 23).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України.

Автореферат розіслано "20" січня 1995 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради,
доктор медичних наук

А.М.ГОЛЫЦЕВ

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

AB-37.737-3-

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

У дослідженнях, що проводяться в галузі кріобіології, можна виділити два напрямки. Перший з них пов'язаний з розкриттям механізмів холодового пошкодження біологічних об'єктів. Другий - з дослідженням механізмів, які забезпечують підвищення тривкості клітин до дії факторів середовища, пов'язаних зі зниженням температури. Поштовхом до виконання цієї роботи були експериментальні факти, які свідчать, що певна комбінація параметрів середовища, в якому знаходиться клітина, викликає в ній комплекс змін, що супроводжується зміною структурного стану клітини, що й зумовлює тривкість біологічного об'єкту до дії температури і осмотичності. Такі переходи стану можуть бути спрямовані як у бік зниження, так і підвищення тривкості клітин до екстремальних впливів. Ця обставина має важливе значення в кріобіологічній практиці, тому що в умовах охолодження-заморожування на клітину діють високі концентрації солей і неелектролітів, зміни йонної сили середовища, рН та інші. У зв'язку з цим, головна увага в цій роботі приділялася виявленню переходних станів клітин при експонуванні в нефізіологічних умовах (комбінація температурних та осмотичних параметрів середовища) перед обробкою кріопротекторами, охолодженням, заморожуванням і підвищує тривкість клітин до наступних змін температури. Оскільки зміна стану являє собою динамічний процес, який характеризується власною еволюцією, в роботі багато уваги приділялося з'ясуванню ролі часових інтервалів, що забезпечують підвищення або зниження тривкості клітин при цій комбінації параметрів середовища, а також з'ясуванню механізмів загибелі клітин у їх часовому розвитку за умов дії пошкоджуючих факторів середовища, які мають місце

при охолодженні та заморожуванні біоб'єктів.

Отримані результати дали змогу скласти уявлення про визначну роль осмолярності середовища в контролі (керуванні) тривкості клітин до дії температурних і осмотичних факторів середовища, а також виявити механізми цієї регуляції, що поєднана з реорганізацією цитоскелету. Сталий стан клітин є пов'язаним з реорганізацією надлишкової площі цитоскелету через процес "розпластування", несталий стан клітин є пов'язаним з різким зростанням пропорції спектрину та зниженням пропорції білка смуги 3.

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ

В кріобіологічних дослідженнях практично відсутні спроби дати чітке забраження еволюції стану клітинних систем. Це зумовлено тим, що при традиційних підходах у кріобіології припускалась однобічна спрямованість змін стану клітин за умов дії охолодження, а саме, в бік зниження структурної стабільності біологічного матеріалу. При цьому вважалося, що підвищення стабільності клітин можна забезпечити штучним шляхом за допомогою кріопротекторів, полімерних сполук, антиоксидантів (Білоус А.М., Бондаренко В.А., 1982). На наш час маємо еспериментальні факти (Бондаренко В.А., 1989; Поздняков В.В., 1989; Песина Н.И., 1993), що свідчать на користь існування власних внутрішніх механізмів, які забезпечують різке зростання структурної стабільності клітин за певної комбінації параметрів середовища. В зв'язку з цим опис відповідних станів, в які здатна переходити клітина завдяки її внутрішнім змінам, є умовою для розкриття механізмів, які забезпечують ці стани. Критичні параметри змін елементів клітинної структури можуть бути пов'язаними як з фізико-хімічними факторами середовища, так і з часом еквілі-

брації клітин в цих умовах. Ці зміни можуть бути значною мірою зумовленими зміною об'єму внутрішнього розчинника, що приводить до зміни сили взаємодії між структурними елементами клітини внаслідок збільшення або зменшення концентрації макромолекул і йонів цитоплазми. Температура і осмолярність середовища в цьому випадку контролюють швидкість еволюції системи, і відповідно, проміжок часу, потрібний для виникнення критичних змін в клітині.

Вельми важливим є нині виявлення найбільш значущих (первинних) параметрів середовища, які спричиняються до переходу клітини в якісно новий стан, що визначатиме надалі збільшення або зменшення сталості клітин. В зв'язку з цим значний інтерес становить вивчення впливу на холодову і осмотичну тривкість клітин непрониких кріопротекторів, наприклад, поліетилентгліколей (ПЕГ), здатних до модифікуючого впливу на мембрану не лише осмотичним шляхом, але й безпосередньо (Теллаш Р.Л., 1982). Холодову і осмотичну тривкість клітин зручно оцінювати в експериментах по вивченню чутливості клітин до холододового і осмотичного шоку при позитивних температурах. Експериментально доведено (Бондаренко В.А, 1989), що осмотичний фактор є провідним в індукції пошкодження клітин як при холододовому і осмотичному шоці, так і при заморожуванні. Це означає, що спільною основою механізмів пошкодження при цих типах впливів є дегідратація. Цей експеримент створює умови об'єктивної оцінки зв'язків між вихідними параметрами середовища, в якому знаходиться клітина, та її тривкостю до змінення параметрів середовища (охолодження і заморожування) з точки зору виявлення факторів пошкодження клітин або підвищення її стабільності.

МЕТА РОБОТИ. Беручи до уваги вищевикладене, метою, цієї

роботи є вивчення ролі вихідної температури і осмотичності середовища у процесах, що контролюють підвищення або зниження структурної тривкості клітин в залежності від часу їх перебування в цих умовах на чутливість до температурного і осмотичного впливу, а також до заморожування в середовищах, які містять солі, неелектроліти, кріопротектори.

ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ:

1. Оцінити вплив температури (0, 37 °С) і осмолярності середовища (150-4000 мМ NaCl) на змінення бар'єрної функції еритроцитів за часом, що забезпечує розвиток кзотермічного лізису.

2. Вивчити вплив осмотичності, температури і складу середовища на чутливість еритроцитів до гіперосмотичного і температурного шоку.

3. Виявити характер взаємозв'язку між вихідними та кінцевими умовами середовища (температура, осмолярність) при холододовому шоці в електролітних і неелектролітних середовищах.

4. Вивчити вплив поєднаного змінення температури, осмотичності і складу середовища на спрямованість змін тривкості клітин до холододового і осмотичного шоку.

5. Визначити взаємозв'язок між вихідними умовами середовища і порушенням бар'єрної функції за умов охолодження і заморожування.

6. Вивчити характер змін температурної і осмотичної чутливості клітин у середовищах, що містять непроникині кріопротектори (ПЕГи).

7. Виявити характер морфологічних змін еритроцитів, а також їх білкових і ліпідних компонентів залежно від умов середовища і характеру температурного і осмотичного впливу.

НАУКОВА І ПРАКТИЧНА НОВІТНІСТЬ. Подано докладний аналіз зв'язку між вихідними і кінцевими умовами середовища стосовно спрямованості і ступеню змінення температурної і осмотичної чутливості клітин і динаміки їх загибелі в нефізіологічних умовах, а також відомості про незалежний вплив температури і осмотичності середовища на стан клітин за умов дії пошкоджуючих факторів охолодження. При цьому встановлено, що за вихідної осмолярності середовища 0,7 М NaCl і вище клітини виявляють однакову чутливість до холодого і осмотичного впливів, що є свідченням того, що вихідна осмолярність середовища є провідним фактором в контролі чутливості клітин до дії пошкоджуючих факторів середовища. Ця дія осмолярності характеризується різкою трансформацією морфології цитоскелету. Стан тривкості клітин відповідає кренованій формі цитоскелету з надлишковою поверхневою площею за умов осмолярності середовища 0,45 М NaCl . Підвищення чутливості клітин до дії пошкоджуючих факторів середовища пов'язано з реорганізацією цитоскелету в ході процесу "розпластування" (цитоскелет подовженої форми з гладким контуром). Морфологічні зміни супроводжуються при 0 °С різким зростанням відносного вмісту спектрину і зніженням білка смуги 3, що є доказом провідної ролі стану цитогелю в контролі чутливості клітин до охолодження.

Отримано нові відомості про взаємозв'язок між процесами агрегації клітин і ефектом упакування клітин стосовно температурної і осмотичної тривкості клітин у середовищах, що містять непроникнені кріпротектори (ПЕТ-1500).

Результати роботи дали змогу виявити значення вихідних параметрів середовища, при яких спостерігаються виразні зміни тривкості клітин у бік її підвищення або зниження. Це до-

дозволяє обґрунтувати положення про визначну роль вихідної осмолярності середовища на результат охолодження і заморожування і запропонувати принцип спрямованої корекції температурної і осмотичної тривкості клітин на основі використання хімічних модифікаторів цитоскелету, а також створення певної комбінації температурних і осмотичних параметрів і його складу. В перспективі це дозволить підвищити ефективність низькотемпературного консервування клітин на основі добору вихідних умов на етапі, що передує введенню крипротекторів і заморожуванню.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВИНЕСЕНО ДО ЗАХИСТУ:

1. Провідним фактором в контролі температурної і осмотичної тривкості клітин є осмолярність середовища. Температура додатково корегує цей процес. При 37 °С чутливість клітин до стресорних впливів визначається часовою компонентою. При 0°С роль часової компоненти послаблюється. Загибель клітин в останньому випадку є контрольованою рівновагою між процесами, які пов'язані з формуванням дефектів в структурі мембрани та їх еволюцій, і процесами, які мають відношення до модифікації структури мембрани і цитоскелету.

2. Процеси, що спричиняються до лізису клітин, пов'язані з модифікацією цитоскелету і контрольованими осмолярністю середовища (ступенем дегідратації клітин). Осмотичні сили діють здебільшого на білкові компоненти цитозолу. Стабільний стан (800 мОсм) клітин характеризується зниженням відносного вмісту білка смуги 7, зростанням білка смуги 4.1. Зниження температури до 0 °С супроводжується стабілізацією клітин до наступного впливу і відбуваються завдяки змінам у цитоскелеті підвищенням відносного вмісту білків смуг 1, 2, 5. Використання модифікатора цитоскелету (глюкози) підвищує тривкість клітин

до охолодження і заморожування.

3. Підвищення концентрації електроліту (800 мОсм) є фактором, що обмежує розвиток холодового і осмотичного шоку, а також пошкодженнь еритроцитів при їх заморожуванні в середовищах, що містять непроникний кріпротектор (ПЕГ-1500). Дегідратація цитогелю модифікатором цитоскелету дає аналогічний результат.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ, ЇЇ СТРУКТУРА ТА ПУБЛІКАЦІЇ

Основні матеріали дисертаційної роботи викладені на II Республіканській конференції (Мінськ, 1974); III, IV та V Українських біохімічних з'їздах (Донецьк, 1977, Дніпропетровськ, 1982, Івано-Франківськ, 1987); I та II Всесоюзних з'їздах гематологів і трансфузіологів (Баку, 1979, Львів, 1985); I та II Українських з'їздах гематологів і трансфузіологів (Харків, 1980, Київ, 1986), Всесоюзній конференції з холоду (Ташкент, 1977); II Всесоюзном симпозиумі "Ліпіди біологічних мембран" (Ташкент, 1980); IV Всесоюзному біохімічному з'їзді (Москва, 1979); Всесоюзному симпозиумі "Ліпосоми. Взаємодія з клітинами і тканинами" (Москва, 1980); 15 ти ЗІ міжнародних нарадах з крібіології (Токіо, 1978, Кіото, 1994); Міжнародній нараді з проблем гематології, трансфузіології та трансплантації (Лейпциг, 1976); II Всесоюзній конференції з ужиткових питань крібіології (Харків, 1984); Всесоюзному симпозиумі "Реконструкція та репарація біомембран" (Благовещенськ, 1989), II Міжнародній конференції ІНЕСКО (Харків, 1992).

Матеріали дисертації опубліковано в 45 наукових роботах, отримано I авторське свідоцтво.

Робота викладена на 347 сторінках машинописного тексту, який містить 82 малюнка, 8 таблиць та список літератури, який

складається з 333 робіт (32 вітчизняних та 301 закордонних авторів).

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були штучні (ліпосоми) і природні (митохондрії печінки, тині та цитоскелети еритроцитів), а також еритроцити донорської крові людини II групи. Всі об'єкти отримували за загальноприйнятими методиками. Для отримання цитоскелетів використовували градієнтне центрифугування. Густина цитоскелетів визначали шляхом вимірювання рефрактометричного індексу. Розподіл білків на окремі фракції здійснювали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі. Ліпідну фракцію аналізували методом тонкошарової хроматографії в силікагелі.

Бар'єрну функцію мембран аналізували за виходом йонів К (полуменева фотометрія), макромолекул гемоглобіну і малатдегідрогенази (спектрофотометрично).

Морфологічні дослідження проводили за допомогою електроно-мікроскопічного методу заморожування-сколювання на мікроскопі ЕМБ-100БР і оптичної мікроскопії на мікроскопі Біолам з конденсором С1-13 після фіксування 1 % розчином глутарового альдегіду. Збереження еритроцитів розраховували за Мазуром (1969).

1. ОСОБЛИВОСТІ ПОВЕДІНКИ ЛІПІДНОЇ ФАЗИ МЕМБРАН ПРИ ДІЇ КРІОПРОТЕКТОРІВ

За умов фракціонування фосфоліпідів (ФЛ) з мембран митохондрій, які зазнали інкубації при 0 °С в присутності 10 % поліетилєнгліколю-400 (ПЕГ-400), якісно змінюється вигляд хроматограм. Це виявляється в зміненні параметру r_f (коефіцієнт рухомості, який залежить від фізико-хімічних властивостей ліпідів) та відсутності чіткого розподілення між окремими фракціями. Дослідження динаміки екстрактивності ФЛ після

20 хв інкубації з розчинами ПЕГ-400 (0 °С) виявило збільшення екстрактивності основних ФЛ. Найбільша екстрактивність спостерігалась в присутності 10 % ПЕГ-400 і значно змінювалась для специфічного мітохондріального ліпиду - кардіоліпіну (КЛ). КЛ знаходиться у внутрішньому шарі, а це означає, що відбувається зміна структурного стану внутрішніх ділянок мембрани, що супроводжується лабілізацією мембрани. Утруднений розгін окремих фракцій свідчить на користь поєднання ПЕГ з ліпідною фазою. В зв'язку з цим виникла проблема розробки засобу визначення ПЕГ в біологічному матеріалі. На основі утворення стійкого комплексу ПЕГ та тіобарбітурової кислоти був розроблений засіб визначення ПЕГ (ав. свід. м 566181).

Експерименти виявили, що обробка мітохондій і тканин (печінка, нирки) ПЕГами викликала утворення забарвлюючого комплексу. Гомогенати аналізувалися 24 години. За цей час лише 20-29 % забарвлюючого комплексу ПЕГ-ТБК перерозподілялося шляхом дисоціації в супернатант. Це означало, що ПЕГ, модифікуючи стан ліпідної фази і утворюючи з нею комплекс, може справити вплив як на окремі компоненти мембрани, так і на поведінку клітини в цілому. Відомо, що поведінка білкових компонентів значною мірою залежить від ліпідного оточення. В зв'язку з цим було вивчено спектри білкової флуоресценції під впливом кріопротекторів. Експерименти виявили, що в присутності ПЕГ-400, ПЕГ-4000 і ПЕГ-20000 при $\lambda=296$ нм в мембранах еритроцитів відзначається довгохвильовий зсув максимуму флуоресценції білків. Цей зсув, наймовірніше, пов'язаний з переходом тирозину в стан флуоресценції за рахунок розриву тирозил-карбоксильного водневого зв'язку. Таке припущення доречно тому, що в присутності всіх кріопротекторів зсув відрізнявся. Якби світіння при λ 280 і 296 нм визначалося тіль-

ки триптофановими залишками, то зсув був би однаковим, оскільки положення максимуму спектру флуоресценції для тирозину мало залежить від діелектричних властивостей розчинника. Відмінний зсув свідчить на користь того, що кріопротектори по-різному впливають на систему водневих зв'язків, збільшувачи внесок тирозинових залишків в світіння мембранних білків.

Беручи до уваги складну організацію біологічних мембран, ми вважали доцільним розглянути поведінку штучних ліпідних мембран (ліпосом) за умов дії кріопротекторів. В якості параметра, який досліджується, використовували світлорозсіювання, яке дає змогу спостерігати зміну об'єму ліпосом. Використовували лецитинові та лецитин/кардіоліпінові ліпосоми (2 мг/мл) які відрізнялися за розміром. 10-хв обробка кріопротекторами супроводжувалася зниженням рівня світлорозсіювання порівняно з контрольними зразками. Для лецитин/кардіоліпінових ліпосом ефект обертався (зростання параметру). Таким чином, реакція ліпосом на дію кріопротекторів залежить від фізико-хімічних властивостей ліпідів. Це означає, що попередній стан, який пов'язаний з обробкою кріопротекторами біоб'єктів, беручи до уваги різний композиційний склад мембран, може мати істотне значення для заморожування-відігріву.

2. ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ХОЛОДОВОГО ШОКУ ТА ЗАМОРОЖУВАННЯ В ПРИСУТНОСТІ НЕПРОНИКНИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ

Холодовий шок реалізується за умов охолодження багатьох клітин і тканин. В реакціях клітин на холододовий шок важлива роль належить екзогенним факторам (наприклад, кріопротекторам). На цей час отримано мало відомостей про взаємозв'язок кризахисної ефективності кріопротекторів і процесів, що відбуваються при охолодженні біоб'єктів до 0 °С. Високомолекулярні ПЕГти при охолодженні можуть впливати подібно до високих концентрацій неелектролітів або бактеріальних токсинів і

коротколанцюжних лізофосфатидів.

В наших експериментах встановлено, що охолодження еритроцитів ($37 \rightarrow 0$ °C) в присутності ПЕГ-1500 викликає розвиток холодового шоку, ступень якого залежить від його концентрації (осмотичності середовища). Якщо концентрація ПЕГ-1500 становить 30 %, тоді різко виявляється ефект залучення електролітів до середовища охолодження. В зоні концентрацій NaCl 0,30-0,47 М чутливість клітин до охолодження різко знижується. Зазначений ефект реалізується і за умов більш високих концентрацій ПЕГ, аж до насичуваних. Дія ПЕГ на мембрани схожа до дії детергентів (Saez *р.*, 1982) і виявляє себе в формуванні макроскопічних дефектів у ліпідному шарі. Захисну дію підвищених концентрацій NaCl можна пояснити їх впливом на дефектні ділянки мембрани за механізмом, подібним до замикання тіней еритроцитів, коли екранування негативно заряджених молекул, що формують дефект, в середовищах з підвищеною силою сприяє замиканню дефекту.

Підвищення молекулярної ваги кріопротекторів (від 1000 до 4000) супроводжується підвищенням його сенсibiliзуючої дії за умов охолодження. До того ж підвищення в середовищі охолодження концентрації солі понад 2,5 М є фактором, який обмежує розвиток холодового шоку. Це дозволяє говорити, що дегідратація клітин в присутності кріопротекторів може бути фактором, що підвищує стабільність клітин. У разі високомолекулярних ПЕГів кінцевий ефект дегідратації може мати декілька наслідків через полідисперсність цих речовин. В зв'язку з цим ми вважали за доцільне вивчити поведінку клітин при їх заморожуванні в багатокомпонентних системах. В цій серії експериментів ми використовували суміші 10 % розчинів ПЕГ з різною молекулярною вагою. Отримані результати свідчать про

просту закономірність - рівень лізису еритроцитів зростає відповідно до долі низькомолекулярних компонентів. Це можна пояснити переважним впливом низькомолекулярних фракцій, які обмежують вилучення надлишку розчинника, що запобігає формуванню стабільної білкової сітки у процесі дегідратації. Високомолекулярні фракції через низьку осмотичну активність свій ефект дегідратації можуть виявити на етапі заморожування, коли концентрація кріопротекторів зростає. В зв'язку з цим за умов роботи з високомолекулярними сполуками значна роль буде належати тривалості обробки та об'ємній частці кріопротектора, який вводять.

Експерименти свідчать, що чутливість еритроцитів тим нижча, чим вища об'ємна частка введеного кріопротектора (частину кріопротектора вводять через деякий час). Час еквілібрації в обох випадках 40 хв. Максимальний ефект збереженості відмічається при одноразовому введенні кріопротектора, коли складаються умови, що забезпечують при еквілібрації часткову дегідратацію, яка стабілізує білкову сітку. Слід зважити на те, що непроникні сполуки здатні викликати агрегацію клітин, що також може спричинитися до розвитку пошкоджень і поведінки клітин в мікрокавальцах розчинника при заморожуванні. В зв'язку з цим ми провели аналіз реакції осідання еритроцитів за умов еквілібрації клітин (60 хв) з кріопротекторами (5 і 10 % на тлі зростаючої концентрації солі - 0,075-1,000 М NaCl). За умов такого експерименту кріопротектор не змінював концентрацію клітин. При підвищенні концентрації ПЕГ-1500 до 15 % на графіку залежності рівня агрегації від присутності солі реєструють два гілки. Ліва (0,07-0,45 М) і права (0,45-1,00 М) з мінімальним рівнем агрегації клітин при 0,45 М концентрації солі. Поблизу фізіологічної норми

(0,15-0,40 М) ПЕГ не справляв значного впливу на агрегацію. Підвищення або зниження концентрації солі супроводжувалося підвищенням рівня агрегації. Центрифугування та повторне ресуспендування клітин у своїх розчинах супроводжувалося додатковим руйнуванням клітин в зоні концентрацій солі вище 0,6 М. Кріопротектор (навіть в 5 % концентрації) значно знижував ступінь руйнування клітин; тобто агрегація не є фактором, який додатково руйнує клітини в момент ресуспендування (руйнування) агрегатів. Для виявлення "ефекту упакування" (агрегації) потрібна рівночасна дія принаймі двох факторів - втрати клітинами значного об'єму внутрішньоклітинного розчинника і механічного стиснення. Це означає, що вода є "деміфером", який обмежує механічний стрес. Картина, яку можна спостерігати після заморожування в присутності ПЕГ-1500 (10-15 %) збігається з тією, що мала місце за умов ресуспендування клітин. Це свідчить про єдність механізмів, що викликають пошкодження клітин при заморожуванні і щільному упакуванні при позитивних температурах. Спільним сенсibilізуючим фактором в обох випадках є осмотичне зневоднення, тобто чутливість еритроцитів до дії фізико-хімічних факторів середовища залежить від вихідного об'єму клітин.

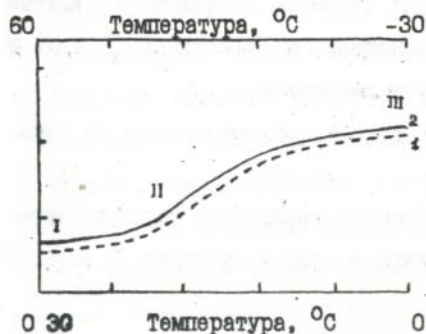
3. ВНЕСОК ТЕМПЕРАТУРНОЇ ТА ОСМОТИЧНОЇ КОМПОНЕНТ В РОЗВИТОК КРІОТЕМОЛІЗУ ПРИ НЕГАТИВНИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

До цього часу залишається невідомим внесок температурної і осмотичної компонент в механізм пошкодження клітин при температурах нижче 0 °С. При охолодженні ліпосом з яєчного фосфатидилхоліну в температурній зоні 0→25 °С ми спостерігали різке зростання проникності бішару при -9- - 12 °С (температура фазового переходу). Процес фазового переходу природних мембран супроводжується латеральним розподіленням ліпідів і конформаційними змінами білків, що може призвести

до більш виразного розвитку кріпошкоджень. Дослідження стану мембран мітохондрій за умов охолодження до температур, які охоплюють фазові переходи ліпідів, свідчить про значне зміння їх бар'єрної функції як для йонів (K^+), так і макромолекул (малатдегідрогеназа - МДГ). Для збереження рідкої фази до $-25^{\circ}C$, для того, щоб визначити внесок власної температури, використали 40 % етиленгліколь (ЕГ). ЕГ не змінює температуру фазового переходу ліпідів. Після охолодження до $-10^{\circ}C$ (температура напівпереходу) спостерігався максимальний вихід K^+ і МДГ. Ці зміни мають доволі глибокий характер, тому що швидке заморожування та відігрів в тих самих середовищах викликали лише 50 % звільнення МДГ відносно рівня при охолодженні до $-10^{\circ}C$. Це значить, що експонування біоб'єктів при температурах фазових переходів ліпідів є фактором, що визначає ступінь порушення бар'єрної функції.

На відміну від механізму пошкоджень клітин при глибокому заморожуванні в механізмі холодового шоку значна роль належить температурному зсуву. З огляду на це, було проведено експерименти з вивчення розвитку кріогемолізу еритроцитів в 1,2 М NaCl при негативних температурах ($0 \rightarrow 30^{\circ}C$) в присутності 6,0 М гліцерину (який дозволяв зберігати рідку фазу). В температурній зоні $0 \rightarrow 15^{\circ}C$ охолодження не викликало значного лізису клітин. В той же час в зоні $-18 \rightarrow 30^{\circ}C$ спостерігається значний розвиток кріогемолізу. Паралельно визначали вихід K^+ . Виявлення характеру взаємозв'язку між виходом K^+ і лізисом клітин свідчить, що при охолодженні вихід гемоглобіну є термінальним етапом будь-якого більш-менш загального процесу, на початкових стадіях якого відбувається порушення бар'єрної функції мембрани. Вихід K^+ можна розглядати як "тло" процесу модифікації клітин. До того ж провідним фактором в цьому про-

цесі є осмотична компонента, а не температура. Порівняння температурної залежності розвитку криогемолізу при фіксованому зсуві (на 30°C) в температурному інтервалі $+30 \rightarrow -30^{\circ}\text{C}$ (мал. 1) дозволяє зробити висновок, що важлива роль в розвитку за-



Мал. 1. Форма температурної залежності розвитку криогемолізу еритроцитів в присутності $1,2 \text{ M NaCl}$ при однаковому відхиленні від вихідної температури. I - інтервал $+30 \rightarrow 0$; 2 - інтервалі $0 \rightarrow -30^{\circ}\text{C}$.

до негативних температур без кристалізації водної фази має місце така ж закономірність, що і в зоні позитивних температур. В обох випадках сенсibiliзація клітин до охолодження зумовлена осмолярністю зовнішнього середовища.

4. РОЗВИТОК ІЗОТЕРМІЧНОГО ЛІЗИСУ ЕРИТРОЦИТІВ ЗАЛЕЖНО ВІД ВИХІДНОЇ ТОНІЧНОСТІ ТА ТЕМПЕРАТУРИ СЕРЕДОВИЩА

Серед великої кількості механізмів, які реалізуються в зоні низьких температур і викликають пошкодження клітин, можна виділити температурно-залежні (холодовий шок) і осмотичні (осмотичний шок, постгіпертонічний та ізотермічний лізис). Останній з них є вивченим менш за все і пов'язаний з прогресуючою дегідратацією клітин, а його структурний механізм полягає у модифікації комплексу цитоскелет-мембрана. Розвиток ізотермічного лізису контролюється осмолярністю, температу-

гального процесу належить амплітуді температурного зсуву. В разі позитивних і негативних температур підсумковий процес застається в досить широкому інтервалі температур (зони I і III) і маємо перехідну (II) зону, в якій відбувається зростання криогемолізу.

Таким чином, за умов охолодження еритроцитів

рою і тривалістю перебування клітин в цих умовах. Останній параметр має важливе значення тому, що визначає ступінь модифікації клітин. В цій роботі досліджували розвиток ізотермічного лізису при 0 і 37 °С в електролітних середовищах (0,15-3,00 М NaCl, 0-390 хв).

Аналіз результатів що до динаміки збереженості клітин при 37 °С (390 хв) в середовищах, що містять 0,15-3,00 М NaCl, дозволяє зробити декілька висновків:

1) рівень збереженості клітин мало змінюється на початковому етапі (0-90 хв);

2) за умов змінення тонічності середовища спостерігаються дискретні зміни збереженості клітин в інтервалі 0,95-1,10 і 2,00-2,10 М NaCl.

Таким чином, тривалість інкубації впливає на осмотичну модифікацію еритроцитів при 37 °С, осмолярність середовища контролює швидкість модифікації (збереженість клітин на 390 хв для 0,15 М NaCl становить 99,5 %, для 3,00 М - 32,66 %. При 0 °С (0,15-0,95 М NaCl) зміни клітин схожі на зміни при 37 °С. Підвищення тонічності (1,05-1,90 М) характеризується підвищенням амплітуди збереженості еритроцитів порівняно до 37 °С і виникненням (0,95-1,10 М) дискретного змінення рівня збереженості еритроцитів. В зоні тонічності 2,00-3,00 М NaCl з'являються різкі зміни рівня збереженості клітин в перші 30 хв, а потім час не впливає на осмотичну модифікацію. Таким чином, при 0 °С істотно послаблюється роль часової компоненти і на перший план виходить роль осмотичного фактора. Це підтверджується виникненням ще одного дискретного змінення збереженості клітин (2,5 М NaCl).

Відмінності, що виявляються в поведінці клітин при 0 і 37 °С, можна пояснити з позиції того, що ізотермічний лізис

контролюється рівновагою між процесами, що пов'язані з формуванням дефектів структури мембрани, їх еволюцією та часом життя, і процесами, які пов'язані з структурно-фазовим станом мембрани, характером асоціації її компонентів. При 37 °C ця рівновага підтримується більш високою плинкістю і відсутністю обмежувачої асоціації компонентів мембрани між собою і з цитоскелетом. Низька температура (0 °C) порушує рівновагу внаслідок змінення плинкості ліпідів і характеру модифікації компонентів мембрани і цитоскелету. Тривалість життя пори зростає, вона переходить в стабільний стан. З умов низької температури переважає осмотичний механізм.

Порівнення кривих динаміки модифікації клітин при 37 і 0 °C в середовищах з різною осмолярністю виявило наявність декількох родин кривих з різною динамікою процесу. При 37 °C - це 3 родини (1,00-1,30; 1,40-2,20 і 2,30-3,00 М насі). При 0 °C ці родини охоплюють міжи 1,05-1,50; 1,60-2,60 і 2,70-3,00 М насі. Підвищення тонічності середовища при 0 °C від 2,50 до 3,00 М насі супроводжується підвищенням швидкості лізису з наступним зниженням при переході в другу фазу.

Процес руйнування еритроцитів за часом задовільно описується рівнянням розпаду: $n = n_0 \cdot e^{-kt}$, де n - число цілих клітин в момент часу t , n_0 - загальне число клітин, k - константа швидкості гемолізу. При збільшенні часу впливу на клітину гіпертонічного стресу здійснюється дестабілізація клітин, що полегчує лізис. В цьому разі лізис зручно описувати величиною $\ln n/n_0$ для кожного часу. Експерименти свідчать, що цей параметр має виразану концентраційну залежність при 37 °C і характеризується наявністю декількох фаз за часом для інтервалу 0,15-0,95 М насі. При 0 °C для цього концентраційного інтервалу відсутні концентраційна і часова залежність. Двофазна

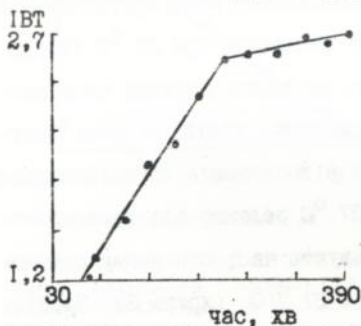
кінетика процесу виявляє себе лише на 330 хв (процес загибелі прискорюється). Цю тенденцію можна простежити до 1,5 М насі, але змінення параметру $1/n/n_0$ здійснюється з більшою швидкістю.

При 37 і 0 °С зона концентрацій 2,1-2,5 М насі характеризується схожою динамікою загибелі клітин і відсутності концентраційної залежності. Істотні зміни відмічаються при 0 і 37 °С в інтервалі 2,6-3,0 М насі. Для 0 °С спостерігається різке змінення на початковому етапі (0-30 хв). Форма отриманих кривих нагадує кінетичні криві хімічної реакції, тобто кожна мить часу характеризується статистичним розподіленням елементарних подій, які залучені до процесу загибелі клітин. Лізис є одноразовою подією і кваліфікується як катастрофа, тобто подія з низькою вірогідністю для будь-якого компонента клітини. Цим компонентом може бути елементарна комірочка цитоскелету. Механічний лізис розвивається за умов порушення поверхні еритроцитів на площі елементарної комірки (Козлов М.М. 1986). Такий підхід є коректним і відносно ізотермічного лізису в гіпертонічних середовищах з таких міркувань: для обох процесів характерна наявність спільної структурної мішені, на яку діють несприятливі фактори. Осмотична дегідратація, яка викликає пружну деформацію компонентів цитоскелету за механізмом "осмотичного спряження", може вважатися фактором, який викликає механічне порушення цитоскелету, коли діють сили з боку щільно упакованого гемоглобінового ядра і мембрани.

Порівняльний аналіз характеру змін швидкості лізису еритроцитів і динаміки їх загибелі не дозволяє зробити висновок відносно відмінностей, які спричиняє температура на різних часових етапах. В зв'язку з цим було побудовано графіки "змінення" індексу впливу температури (ІВТ - відношення рівня збе-

реженості клітин при 0 і 37 °С) залежності від тоничності середовища на кожну мить часу. Цей параметр дозволяє оцінити внесок температури. При значеннях ІВТ вище 1,0 збереженість клітин вище при 0 °С, при значеннях нижче 1,0 - нижче при 0 °С. Було встановлено, що для інтервалу 2,0-2,5 М насі є характерним більш високий рівень залежності при 0 °С (60-390 хв); для інтервалу 2,5-2,8 М - відсутній вплив температури; в зоні 2,8-3,0 М - збереженість клітин для 0 °С нижче.

Таким чином, при збільшенні концентрації насі низьку температуру можна вважати додатковим фактором, який знижує збереженість еритроцитів. Для часових інтервалів 240-390 хв вплив часового фактору відсутній. При цьому слід відзначити факт зворотної залежності ІВТ для концентрацій 2,0-2,5 і 2,8-3,0 М насі. На основі цього можна зробити висновок, що змінення ІВТ за часом на початку концентраційного інтервалу 2,0-3,0 М насі (наприклад, 2,1 М) "програмує" змінення ІВТ в кінці інтервалу 3,0 М. Це наочно ілюструє мал.2, який подає співвідношення $ІВТ_{2,1} / ІВТ_{3,0}$ залежно від часу. Можна бачити виразний лінійний характер змінення цього параметру за видінок часу 60-240 хв. Така кореляція може відбивати існування зв'язку між механізмами, які забезпечують більш високу збереженість еритроцитів при 0 °С і тими, що викликають її зниження в 3,0 М насі при 37 °С, коли переважними стають ефекти високої температури.

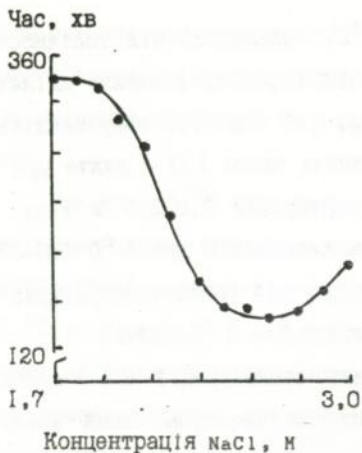


Мал.2. Ізотермічний лізис еритроцитів. Часова динаміка ІВТ для значень тоничності 2,1 і 3,0 М насі.

Мал.2. Ізотермічний лізис еритроцитів. Часова динаміка ІВТ залежно від часу. Можна бачити виразний лінійний характер змінення цього параметру за видінок часу 60-240 хв. Така кореляція може відбивати існування зв'язку між механізмами, які забезпечують більш високу збереженість еритроцитів при 0 °С і тими, що викликають її зниження в 3,0 М насі при 37 °С, коли переважними стають ефекти високої температури.

Мал.2. Ізотермічний лізис еритроцитів. Часова динаміка ІВТ для значень тоничності 2,1 і 3,0 М насі.

Наявність специфічних інтервалів концентрацій насі, в



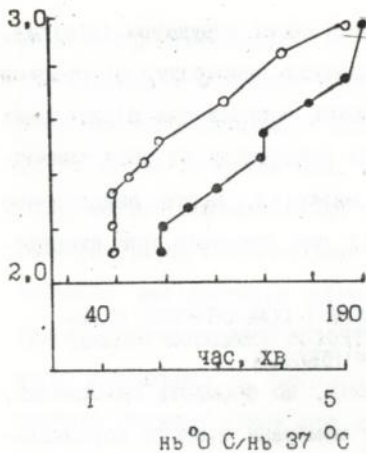
Мал.3. Ізотермічний лізис. Часова точка при 37 °С, при якій реєструється мінімальна збереженість, що відмічається на всьому протязі (390 хв) при 0 °С.

межах яких змінюється неоднаковим чином стан клітин, доказується даними мал.3, де подано відповідні значення часової точки при 37 °С, в яких реєструється рівень гемолізу той самий, що і в кінці інкубації при 0 °С, тобто ступінь збереження клітин відповідає мінімуму при 0 °С. Можна бачити 3 інтервали концентрацій: 1,9-2,5; 2,5-2,8 і 2,8-3,0 М NaCl (клітини характеризуються власним структурним станом). Після здобуття певного критичного

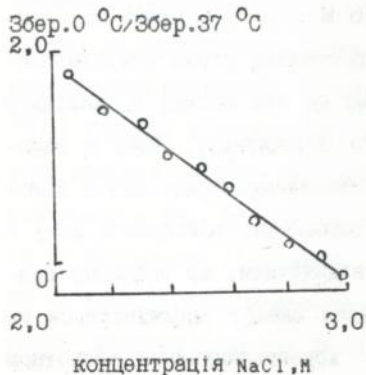
рівня відбувається дискретний перехід. Цей перехід може бути наслідком генералізованого переходу цитоскелету (фазовий перехід). Окрім осмолярності керуючим фактором є час.

Сенсибілізуючим фактором до холодового шоку еритроцитів в гіпертонічних середовищах є 10-хв інкубація при 37 °С (Бондаренко В.А., 1988). Ми припустили, що цього періода часу вис-тачить і для детермінації послідовності подій за умов інкубації. На мал.4 подано криві, які відображають співвідношення на 10 хв рівня гемолізу при 0 і 37 °С залежно від осмолярності середовища (крива 1) і відображають час, при якому однаковий гемоліз здобувається при 0 і 37 °С (крива 2). Профілі цих кривих схожі, з чого можна зробити висновок, що процес, який розвивається на початковому етапі, детермінує послідовність подій, які залежать від вихідних умов.

Завдяки графіку залежності параметру співвідношення рів-



Мал.4.Ізотермічний лізис. 1 - час здобуття однакового гемолізу при 0 і 37 °С залежно від тонічності середовища; 2 - співвідношення на 10 хв рівня гемолізу при 0 і 37 °С залежно від тонічності.



Мал.5.Ізотермічний лізис.Змінення параметру залежно від концентрації NaCl в середовищі.

ней збереженості від осмолярті (2,1-3,0 М NaCl) було знайдено лінійну залежність (мал. 5), з чого випливає, що провідним фактором, який керує еволюцією стану клітин за часом в зазначених умовах, є осмолярність середовища.

Отримані нами результати свідчать, що тривала гіпертонічна інкубація клітин призводить до прогресуючого зростання лізису за часом. Проте, ця особливість є характерною тільки для помірно високих концентрацій NaCl. При максимальних концентраціях лізис досягає максимальношо рівня на початковому етапі і потім практично не змінюється, тобто частина клітин здатна "адаптуватися" до несприятливих умов і виявляти тривкість довгочасного перебування в

умовах після перехідної фази. Процеси, що розгортаються в перехідній фазі, відіграють більш важливу роль в поведінці клітин, ніж процеси, що діють за часом, коли зовнішні фактори набувають незмінного характеру.

Біологічні мембрани містять елементи, які здатні реагу-

вати на змінення температури змінює своєї структури (ліпіди), тому слід очікувати, що в зоні низьких температур ці процеси будуть мати певний вплив на ступінь пошкодження біологічних об'єктів. В дослідженні ліпідного компоненту за умов зниження температури набули значний матеріал, проте недостатньо вивчена можливість сенсібілізації цих процесів при використанні кріопротектору.

5. КОМБІНОВАНА ДІЯ ТЕМПЕРАТУРИ І ОСМОЛЯРНОСТІ СЕРЕДОВИЩА ЯК ФАКТОР, ЩО КОНТРОЛУЄ ПОВЕДІНКУ КЛІТИН ЗА УМОВ, ЯКІ ЗМІНЮЮТЬСЯ

Підвищення концентрації білків, що формують цитоскелет, призводить до формування поблизу мембрани міцного кортикального шару, що підвищує структурну тривкість мембрани (Colclausе с.с., 1992). Цю обставину підтвердили наші експерименти. Якщо еритроцити попередньо зневоднювати в 0,86 М сахарозі, а потім піддати температурному шоку в розчинах NaCl зі зростаючою концентрацією (1,0-2,0 М), то холододовий шок супроводжується не зменшенням, а зростанням рівня збереженості клітин з ростом тонічності, що на наш погляд є наслідком структурної модифікації білкового цитоскелету. Таку ж закономірність ми отримали за умов зневоднення еритроцитів солевим середовищем (0,9 М NaCl) і проведенні холододового шоку в сахарозному середовищі. Важливо відзначити, що значному підвищенні об'ємної концентрації белка скелет наближається за своїми властивостями до гелів - характеризується оборотною деформацією і відсутністю плинкості. Така поведінка передбачає, що температура повинна сильно впливати на структурну стабільність клітин (при низькій температурі стабільність підвищується).

Це підтверджується нашими експериментами, в яких клітини інкубували при 0 °С і після змінення осмотичних умов ста-

вали більш стабільними. Це означає, що збереженість бар'єрної тривкості мембрани (контролюється білковим цитоскелетом) залежить від комбінації факторів середовища. Враховуючи ці дані, можна говорити про наявність певних принципів, яких потрібно дотримуватися для того, щоб запобігти осмотичному і температурному шоку за умов охолодження і заморожування - це часткова дегідратація клітин на попередньому етапі. Можна також зробити висновок, що змінення об'єму анутрішньоклітинного розчинника є фактором, який стабілізує мембрану. Це ставить питання також про специфічну стабілізацію не тільки через спрямовану дегідратацію клітин шляхом введення в зовнішнє середовище непроникних сполук, але й через використання хімічних речовин, які здатні стабілізувати білковий гелі. Дійсно, як виявили наші експерименти, обробка еритроцитів глікозою (стабілізатор білкового гелю) підвищує тривкість клітин до осмотичного і температурного шоку, а також до заморожування-відігріву. Поєднана дія низької температури (0 °С) і глікози підсилює цей ефект. Але за цих умов важливої ролі набуває часовий інтервал дії на клітини цих факторів. Це пов'язано з тим, що стабілізація білкової сітки може призвести до збільшення її товщини і порушенню безперервності мембрани за термопружним механізмом (в наших експериментах цей часовий інтервал становив 30-40 хв). Збільшення часу обробки призводило до різкого зростання чутливості клітин до температурних і осмотичних умов середовища, що змінюються.

Для вирішення ряду кріобіологічних проблем істотний інтерес становить зв'язування взаємозв'язку вихідної температури і осмолярності середовища, в якому знаходиться клітина, та її тривкості до дії гіпертонічного стресу при різних температурах. Це зумовлено тим, що гіпертонічний стрес є прові-

дним фактором кріпошкоджень, що дозволяє використовувати перенесення клітин в сильно гіпертонічні розчини при позитивних температурах як процес, який моделює заморожування. В цій групі експериментів ми використовували підхід, при якому на етапі попередньої інкубації було обрано дві зони тоничності - 0,45 М, що відповідає зоні, яка забезпечує мінімальну гіпертонічну чутливість порівняно з фізіологічною зоною (0,15 М) і гіпертонічною (1,0 М NaCl), яка сенсibiliзує клітину до холодового шоку. Друга зона (0,95 М NaCl) відповідала температурно-осмотичній сенсibiliзації клітин. При проведенні цієї серії дослідів використовували принцип перехресного змінення температури, коли клітини інкубували в вихідних розчинах за умов однієї температури, а потім переносили їх в сильно гіпертонічний розчин (3,0 М NaCl) за умов іншої. Додатковими варіантами були ізотермічні варіанти ($37 \rightarrow 37$ і $0 \rightarrow 0$ °C). На першому етапі оцінювали вплив вихідної інкубації клітин в 0,45 і 0,95 М розчинах NaCl при 0 і 37 °C (10-60 хв) на їх тривкість до перенесення в 3,0 М NaCl (180 хв). Інкубація в 0,95 М NaCl виявляла себе більш високою чутливістю до перенесення в гіпертонічний розчин. При цьому час інкубації не мав значення. Максимальні пошкодження розвивалися в випадку комбінованої температурно-осмотичної дії ($37 \rightarrow 0$ °C).

Найбільший інтерес становлять дані, отримані в присутності 0,95 М NaCl в температурному варіанті $0 \rightarrow 37$ °C. В цьому випадку відмічалось зникнення впливу як температурної, так і осмотичної компонент на реакцію клітин. Для зони 3,0 М NaCl такі дані отримані вперше. Це є важливою основою для розширення уявлень про механізми температурної і осмотичної тривкості клітин. В цьому випадку було досягнуто стану клітин, який можна розглянути як винятково стабільний, тому, що мова

йде про 180 хв перебування клітин в сильно гіпертонічному середовищі. В чому полягає особливість отриманих даних. По-перше, в цьому випадку ми маємо справу з варіантом неізотермічної тривкості, оборотної до холодового шока. По-друге, і в цьому разі керувчим фактором є температура, і практично відсутній гемоліз на попередньому етапі. Знайдене явище можна пояснити тільки, якщо розширити наше уявлення стосовно механізмів, які контролюють тривкість клітин. Таким додатковим елементом може бути уявлення про взаємозв'язок між фізико-хімічним станом цитогелю (контролюється температурою і осмолярністю) і фізичним станом мембрани (контролюється температурою).

Ключовим елементом при такому підході є число і міцність контактів між гелем і мембраною. Цей параметр ми назвали факторами I порядку. В цьому контексті факторами II порядку буде число і міцність зв'язків в межах цитоплазматичного гелю, його здатність віддавати або утримувати воду, а також фазовий стан ліпідів мембрани. Сюди можна віднести і стан інтегральних білків (цитоплазматичні ділянки утримання гелю). До факторів III порядку ми віднесли локальні фактори, які пов'язані з розподіленням мікрофаз в площані мембрани при змінній формі клітин, зсуві температури, виникненні термпружних натягань. На наш погляд найбільш привабливою гіпотезою для пояснення отриманих результатів є зростання внеску факторів II порядку в загальну структурну стабільність клітин. В цьому випадку стабільність клітин при 0 °C зростає завдяки формуванню міцного цитоплазматичного гелю, коли низька температура і дегідратація діють односпрямовано, тобто осмотична дегідратація викликає збільшення числа контактів, а низька температура - збільшення міцності цих контактів. За умов підвищення темпе-

ратури обмеження, які накладаються білками, можуть зніматися, контакт між гелем і мембраною буде більш міцним. В зв'язку з цим в варіанті $37 \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ послаблюється внесок факторів II порядку; варіант $37 \rightarrow 0^{\circ}\text{C}$ можна пояснити різким послабленням внеску факторів I порядку (змінюється число контактів між мембраною і скелетом, а міцний гель ще не сформувався). В варіанті $0 \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ внесок факторів I порядку стає значним, а плазматичний гель не встигає зруйнуватися. Для такого механізму важливим стає значення осмолярності зовнішнього середовища. При підвищенні осмолярності буде мати місце підвищення стабільності клітин як результат формування контактів і стищення протилежних - ліпідної і білкової поверхні. Слід звернути увагу на нівелювання відмінностей, які характерні для ізотермічних варіантів. Осмотична компонента усуває температурну, що виявляє себе в зменшенні осмотичної тривкості клітин за умов збільшення тривалості їх обробки при 0°C . Гель в цьому випадку може бути вельма міцним, але число контактів між ним і мембраною знижується за часом.

6. ЗВ'ЯЗОК МІЖ ВИХІДНИМИ УМОВАМИ І ТРИВКІСТЮ ЕРИТРОЦИТІВ ДО ХОЛОДОВОГО І ОСМОТИЧНОГО ШОКУ

Найбільш важливою величиною, яка контролює холодову і осмотичну чутливість клітин, є їх вихідний об'єм. Проте який зв'язок між ступенем вихідної дегідратації, що визначає об'єм клітин і їх чутливість до холодового і осмотичного шоку, невідомо. В зв'язку з цим становить інтерес вивчення модифікуючого впливу дегідратації на клітини на тлі додаткових змінень параметрів середовища, в якому вони знаходяться. При цьому важливим є порівняльний аналіз ролі параметрів середовища стосовно розвитку холодового і осмотичного шоку - двох явищ, що якісно відрізняються.

Експерименти виявили, що в присутності $1,2 \text{ M NaCl}$ чутли-

вість еритроцитів до охолодження ($37 \rightarrow 0$ °C) і гіпертонічного шоку ($4,0$ М NaCl) залежить від вихідної тонічності розчинів, в яких проводили дегідратацію клітин. В обох випадках спостерігалось різке зростання чутливості еритроцитів при досягненні критичної межі осмолярності вихідного середовища ($0,6-0,8$ М NaCl). Зниження вихідної температури, за якою здійснювали дегідратацію, до 0 °C супроводжувалось підвищенням збереженості клітин, які зазнали холодового і осмотичного шоку. Це свідчить про схожість механізмів сенсibiлізації клітин до зазначених дій. Поширення концентрації NaCl ($0,15-1,60$ М) вихідних розчинів при 0 °C з наступним моделюванням холодового і осмотичного шоку ($4,0$ М) показало наявність певної схожисті, а саме, наявність двох концентраційних інтервалів ($0,15-0,75$ і $0,75-1,60$ М NaCl), в межах яких змінюється поведінка еритроцитів. Для першого інтервалу відмічається максимум збереженості, ступінь якої визначається температурним режимом перенесення в $4,0$ М NaCl. В другому інтервалі відсутні максимум збереженості і виразна залежність від осмолярності середовища. Слід також зазначити, що при мінімальній тонічності вихідного середовища ($0,15$ М) характерна відсутність залежності клітин як від температурного, так і осмотичного режимів впливу. Для максимальної тонічності вихідного середовища ($1,6$ М) істотного значення набуває температурний режим.

Якщо дегідратацію клітин здійснювати при 0 °C в комбінованих середовищах, які містять неоднакові пропорції електроліту ($0-0,2$ М NaCl) і неелектроліту ($0,40-0,65$ М сахароза), а потім піддати клітини поєднаній дії температурного і осмотичного шоку в $4,0$ М NaCl ($0 \rightarrow 37 \rightarrow 0$ °C), то збереженість клітин характеризується складною залежністю від вихідних осмотичних умов. При відсутності NaCl підвищення концентрації сахарози

характеризується зростанням збереженості клітин (максимум при концентрації 0,6 М). З ростом концентрації NaCl знижується концентрація сахарози, при якій реєструється максимальна збереженість клітин. При концентраціях NaCl 0,075-0,1000 М зростання концентрації сахарози вище 0,4 М супроводжується зниженням рівня збереженості клітин. Оскільки сахароза і NaCl в нормі не проникають в еритроцити, їх вплив на клітини пов'язаний зі зміненням осмолярності середовища і свідчить на користь осмотичної регуляції холодової і осмотичної чутливості клітин. При фіксованій концентрації NaCl спостерігається лінійна залежність між рівнем збереженості клітин і зміненням концентрації сахарози. Відмінності виявляються тільки за умов крайніх концентрацій сахарози, тобто існує певна критична зона осмолярності, за межами якої клітини втрачають тривкість, і цей механізм є одним і тим самим при різних співвідношеннях NaCl і сахарози. Основою такого механізму може бути різниця осмотичного тиску між зовнішнім і внутрішнім середовищем.

Осмотичний контроль тривкості еритроцитів зберігається і при їх заморожуванні до -196°C в присутності NaCl і 10 % ПЕГ-1500. Існує зона концентрації NaCl , вище і нижче якої збереженість клітин знижується. Винакає питання про механізм контролю осмотичної поведінки клітин і зв'язках з механізмами контролю тривкості клітин до холодового і осмотичного шоку. Власні результати і аналіз літератури свідчать, що в умовах дегідратації еритроцитів існує зона осмолярності (800-900 мОсм), при якій відзначається максимальна тривкість клітин до гіперосмотичного шоку і в якій розвивається комплекс процесів, що охоплюють мембрану і цитозоль. Наші дослідження свідчать, що на тлі контролю поведінки клітин осмолярністю додаткові впливи здійснюють зміцнення компонентів цитоскелету

(денатурація спектрину і зсув рН дає додатковий внесок в події, що відбуваються). Максимальна тривкість до охолодження спостерігається в інтервалі рН 6,0- 7,0, але при цьому відсутній вплив рН на чутливість клітин до гіпертонічного стресу. При однаковому механізмі сенсibiliзації клітин до холодового і осмотичного шоку (осмолярність середовища) відмінності можуть бути пов'язані з процесами, що відбуваються в перехідній фазі (змінення температури і осмолярності середовища). Більш специфічними, напевне, є процеси, що забезпечують стабільний стан клітин.

Найбільш адекватним засобом оцінки макроскопічних змін "цитоскелет-мембрана" є аналіз форми ізольованих скелетів при змінненні форми клітин при різних значеннях осмолярності середовища. В експериментах було встановлено, що при 0 °С в інтервалі тонічності 0,1-0,2 М NaCl скелети мають гладкий контур, починаючи з 0,3 М контур скелетів стає деформованим (кренування). В зоні центральної западини з'являється поодинокий досить значний виступ при досягненні 0,45 М концентрації NaCl (область максимальної стабільності клітин). При цьому зберігається деформований контур. Наступне підвищення тонічності супроводжується подовженням контуру, який нагадує еліпсоцит при 0,6 М NaCl. Таким чином, сталий стан клітин відповідає кренованій формі цитоскелету з організацією надлишкової площі в формі виступів. Перехід до менш сталого стану пов'язаний з реорганізацією надлишкової площі через процес "розпластування" до гладкого контуру з втратою сталого стану.

Порівнення цих морфологічних змін цитоскелетів з відповідними зміненнями інтактних еритроцитів (ми аналізували змінення форми еритроцитів при їх переносі при 0 °С в 0,15 М

NaCl (ізотонія); 0,45 М (зона максимальної стабільності клітин); 0,75 М (зона гіпертонічного мінімуму) свідчало про наявність схожості. Крім того, ми проаналізували морфологічні зміни при 0 °С клітин, що збереглися і були піддані дії сильного гіперосмотичного стресу. Підвищення тоничності середовища до 0,45 і 0,75 М NaCl призводить до змінення форми еритроцитів. В першій зоні було відзначено виникнення виступів в зоні центральної западини, а в другій - контур зглажується. Перенос клітин з ізотонії в сильно гіпертоничний розчин супроводжується появою надлишкової площі в вигляді зморшок. При переносі клітин з 0,45 М NaCl кінцева форма значно меншою мірою відрізняється від вихідної, хоча еритроцити стають більш сплюсненими, але зберігають центральний виступ. Невиразані відмінності відмічалися і в випадку переносу клітин з 0,75 М NaCl. Тут має місце додаткове розпластування і закруглення частини клітин.

Додаткову інформацію про змінення мембрани і цитоскелету ми отримали за допомогою кріофрактографії. В 0,45 М NaCl приблизно 50 % клітин характеризувалося розшаруванням вмісту цитозоля. Можливо, гладка поверхня сколів відноситься до зони западини, а неоднорідності пов'язані з зоною виступу. Крім того, для цих клітин зазначена агрегація внутрішньомембранних часток (ВМЧ) на цитоплазматичній поверхні мембрани. У випадку клітин, що інкубуються 0,75 М NaCl, відмічається рівномірне розподілення компонентів цитозолю і слабка агрегація ВМЧ. Ці результати добре відповідають змінню форми ізольованих цитоскелетів і еритроцитів. Змінення форми клітин може бути пов'язано з модифікацією структурного стану цитоскелету і характеру його асоціації з мембраною. А також зі зміненнями цитозолю, що містить гемоглобін, і впливом цих змін на цитоске-

лет і мембрану. В зв'язку з цим ми провели аналіз білкового спектру цитоскелетів і мембран еритроцитів. У послідовності концентрацій NaCl 0,15-0,95 М при 37 °С можна виділити такі особливості:

- 1) різке зниження пропорції мінорного компоненту - білка 7 (тропоміозин) при досягненні концентрації вище 0,45 М;
- 2) зростання пропорції білка 4.1 і усієї групи білків смуги 4 з зростанням концентрації NaCl ;

Втрата білка смуги 7 може бути пов'язана з підвищенням йонної сили внутрішньоклітинного розчинку при дегідратації і порушенням структурного стану актоміозинового комплексу цитоскелету при виникненні осмоупружної сполуки. Слід відзначити, що обробка клітин гемином модифікує зв'язування цитоскелету з мембраною по ділянкам, які контролюються білком 4.1 (може навіть статися дисоціація білка смуги 7). В наших експериментах ми мали справу саме зі зміненнями, які мають відношення до цих двох білків.

Обробка еритроцитів діамідом (1 мМ) модифікує стан білків. При концентраціях 0,15-0,95 М NaCl ефекти температури більш виразні порівняно з ефектами осмолярності. Експерименти свідчать про:

1) більш високий вміст білків смуги 1 і 2 при 0 °С, що особливо має місце в 0,45 М NaCl порівняно з 37 °С;

2) співвідношення білків смуг 1 і 2, смуги 3 при 0 °С має зсув в бік білків смуг 1 і 2, при 37 °С це співвідношення залежить від тоничності середовища;

3) при всіх значеннях тоничності при 0 °С відмічається більш високий відносний вміст білка смуги 5 (актин) порівняно з 37 °С;

4) при 0 °С спостерігається стале співвідношення між

вмістом білків смуги 5 і 6, а при досягненні концентрації 0,45 M NaCl при 37 °C вона обертається.

Аналіз білкового спектру ізольованих цитоскелетів виявив більш виразний вплив температури порівняно з ефектами йонної сили. При 37 °C зберігаються всі основні білки, високий вміст білка смуги 3 і 7; при 0 °C відмічається різке зростання вмісту спектрину, зменшення вмісту білка смуги 3 і зростання вмісту смуги 4, і практично повна відсутність білків смуг 6 і 7. Діамід значно більше впливає на спектрин, актин і білок 4.1, тобто на білки, що зазнають змін при температурно-осмотичних впливах.

Зміни білка 4.1, які спостерігаються при 0 °C, можна віднести до формування зшивок між білками, коли обмеження на цей процес послаблюються. Асоціація білків цитоскелету знаходиться під термодинамічним контролем. Особливості, що спостерігаються при 37 °C, пов'язані з ефектом високої йонної сили і наслідком усунення електростатичних обмежень на асоціацію білків між собою, що призводить до утворення міцних зшивок між ними. При 0 °C процес утворення міцного геля (контролюється білком 4.1) слід віднести до динамічної здатності гелю відновлюватися після перенесених впливів, тобто до тиссотропних властивостей.

Модифікація еритроцитів на попередньому етапі перед зміненням температури і осмолярності середовища виявляється не тільки в змінненні стану білків, а в змінненні бар'єрної функції меморани. Отримані результати свідчать, що звільнення йонів K^+ при поміщенні клітин в гіпертонічні розчини залежить значною мірою не від вихідних, а кінцевих значень осмолярності середовища. При цьому рівень втрат K^+ випереджає втрату гемоглобіну. Це може означати відносну незадежність механіз-

мів, що контролюють лізис клітин, з одного боку, і звільнення внутрішньоклітинних електролітів, з іншого боку. Очевидно, в контролі лізису ключова роль належить цитоскелету, а в випадку контролю за витоком йонів - модифікації мембрани.

Таким чином, отримані нами дані свідчать, що гіперосмотичний і холодовий шок контролюється складним комплексом факторів, які діють через зміни цитоскелету і мембрани. Провідним фактором в модифікації стану клітин є осмолярність. Осмоіндуцьоване видалення вільної води змінює стан білків цитоскелету, а також призводить до вклучення додаткових компонент модифікації, які виявляють себе через механізм осмопружного спряження. Температура і рН середовища впливають на спрямованість і виразність процесів модифікації.

7. ОСОБЛИВОСТІ ПОЄДНАНОЇ ДІЇ ФАКТОРІВ, ЯКІ КОНТРОЛЮЮТЬ РОЗВИТОК ОСМОТИЧНОГО І ТЕМПЕРАТУРНОГО ШОКУ

Еритроцити реагують на змінення параметрів середовища складним чином, виявляючи нелінійну залежність від цих змін. Певній комбінації зовнішніх параметрів відповідає власне досить виразний дискретний стан клітин. Можна говорити про наявність двох груп факторів, які впливають на стан клітини:

- 1) фактори, що поглиблюють змінення стану, які розгортаються в певному напрямку;
- 2) фактори, які змінюють спрямованість модифікації.

Друга група факторів становить інтерес тому, що за їх допомогою можна формувати нові стани, наприклад, ті, які виявляються дуже тривкими до температурної і осмотичної дії. Вони можуть бути пов'язані зі специфічними клітинними механізмами контролю колодової і осмотичної тривкості клітин. В зв'язку з цим важливим є виявлення початкових ланок цих механізмів. Тому було проведено серія експериментів з дослідженням поєднаної дії температури і осмолярності середовища, ролі

вихідних умов и спрямованості змінень цих дій на еритроцити за умов холодового і осмотичного шоку. В ході проведених експериментів було виявлено такі закономірності:

1) звуження інтервалу між вихідним і кінцевим значеннями осмолярності характеризуються зростанням тривкості клітин до осмотичної дії, навіть якщо вихідна тонічність є високою і становить $2,0 \text{ M NaCl}$;

2) кінцевий рівень збереженості при переносі клітин в $5,0 \text{ M NaCl}$ є відносно високим і залежить від вихідних параметрів;

3) існує критична зона осмолярності ($2,0-2,5 \text{ M NaCl}$), в якій клітини різко модифікують свій стан: стан клітин в цій зоні зумовлює зміни як при прямому, так і при зворотному (постгіпертонія) переносі;

4) для кожної вихідної концентрації NaCl на графіку залежності збереженості клітин від тонічності кінцевого середовища існує плато - зона концентрацій, в якій клітини однаково реагують на прямий і зворотний перенос;

5) для того, щоб звести до мінімуму постгіпертонічний лізис, треба клітини до внесення в умови ізотонії перенести в зону плато (наприклад, з $5,0 \text{ M}$ в $4,0 \text{ M NaCl}$);

6) рівень збереженості клітин при переносі з $0,45 \text{ M NaCl}$ (зона максимальної стабільності) в $3,0$ і $4,0 \text{ M NaCl}$ відповідає такому в присутності $2,0 \text{ M NaCl}$, тобто, стан клітин, якого вони здобувають в присутності $0,45 \text{ M NaCl}$, детермінує вектор змінення стану клітин, якого здобувають в $2,0 \text{ M NaCl}$, а цей стан зумовлює спрямованість змінень при наступних змінах середовища.

*Вузлові зони $0,45$ і $2,0 \text{ M NaCl}$ детермінують максимально тривкий стан. Механізм такої детермінації може бути пов-

язаним з модифікацією цитоскелету. Ці змінення можуть відігравати важливу роль для виживання клітин в тому разі, якщо клітина буде поводити себе як проста ліпідна везикула. Виникає питання, яку роль в цих умовах грає температура. Для відповіді на це питання ми провели експерименти зі змінюванням температури вихідного і кінцевого середовища ($0 \rightarrow 0$, $37 \rightarrow 0$, $0 \rightarrow 37$ °C). В температурному режимі $37 \rightarrow 0$ °C збереженість клітин при прямому і зворотньому переносі нижче, ніж в варіантах $0 \rightarrow 0$ і $0 \rightarrow 37$ °C. Найбільш висока збереженість клітин виявлялася для режиму $0 \rightarrow 37$ °C. Особливість цього режиму є висока збереженість клітин при постгіпертонічному лізисі за умов переносу зі всіх значень тоничності (1,0-4,0 М насі). Ми провели додаткові дослідження стосовно впливу температури на тривкість еритроцитів до постгіпертонічного лізису. На основі цих досліджень можна зробити декілька висновків:

- 1) збереженість клітин мінімальна в режимі $37 \rightarrow 0$ °C, переважною компонентою є температура, роль осмотичної компоненти різко виявляється за умов концентрації нижче 0,6 М насі;
- 2) для режиму $37 \rightarrow 37$ °C переважне значення має осмотична компонента;
- 3) в режимі $0 \rightarrow 0$ °C вплив температурної і осмотичної компонент менш виявляє себе порівняно з попередніми варіантами;
- 4) максимальна збереженість клітин відзначена в режимі $0 \rightarrow 37$ °C, температурна компонента обертає спрямованість процесу і усуває осотичну компоненту;

Той факт, що осмотична компонента послаблюється за умов вихідної інкубації 0 °C, примушує розглянути роль вихідних умов в контролі чутливості клітин до осмотичного впливу. За умов охолодження еритроцитів в 1,2 М насі (забезпечує макси-

мальну чутливість до холодового шоку) і 0,86 М сахарозі на графіку залежності ступеню гемолізу від температури ми виявили зону перелому в інтервалі 10-15 °С. Ця особливість відображає термотропні властивості мембран еритроцитів, на які істотний вплив справляють білки цитоскелету. Вилучення білків за допомогою протеаз призводить до зникнення перелому поблизу 10 °С і втраті чутливості до криогемолізу (Klonk s., 1992). При цій температурі відбуваються фазові переходи ліпідів. Дегідратація є фактором, здатним розподілити ліпідну фазу мембран (Nunes M.A., 1991). Все це говорить на користь комплексного механізму температуро-залежних змін осмотичної тривкості клітин. Накладання двох процесів - "природного" термотропізму і осмоіндуковані змінення ліпідної фази здатно призвести до формування пори, периферичні білки можуть стабілізувати цю пору. Поява термотропізму мембрани еритроцитів повинна залежати від температурних умов перебування клітини. Для перевірки цього припущення клітини при 0 °С інкубували в 0,15, 0,45 М NaCl і 0,5 М сахарозі, після чого переносили в 2,7 М NaCl (0 °С). Таку процедуру виконували при підвищенні початкової температури інкубації в інтервалі 5-30 °С. За умов наступного холодового шоку в жодному із середовищ ми не зареєстрували явище термотропізму. Однак, якщо клітини спочатку інкубувати 5 хв при 0 °С в цих розчинах і 10 хв в 2,7 М NaCl при температурах 5-30 °С, то за умов наступного холодового шоку виявляється термотропізм. При цьому можна відзначити дві особливості:

1) локальний мінімум збереженості на температурній шкалі збігається з "класичним" варіантом холодового шоку (37→0 °С)

2) виразність термотропізму залежить від вихідного розчину; в 0,15 М NaCl клітини характеризуються виразним термо-

тропізмом з локальним мінімумом збереженості поблизу 15°C , в $0,5\text{ M}$ сахарозі збереженість клітин вище, проте при 15°C мінімум збереженості є таким, як і в випадку $0,15\text{ M}$ насі, в $0,45\text{ M}$ насі термотропізм не виявляється - збереженість клітин порядка 90% у всьому діапазоні температур, який досліджували.

В И С Н О В К И

1. Тривкість еритроцитів до температурного і осмотичного стресу контролюється осмолярністю середовища. Температура і час вносять додаткові змінення. При 37°C чутливість клітин до пошкоджуючих факторів середовища зростає за часом, при 0°C - роль часової компоненти послаблюється.

2. Лізис клітин контролюється осмолярністю середовища, а температура за умов усталеної осмолярності змінює спрямованість процесу. В діапазоні осмолярності від $0,15$ до $0,95\text{ M}$ і $2,8-3,0\text{ M}$ насі відсутній вплив температури; в інтервалі концентрацій $1,05-2,50\text{ M}$ збереженість клітин вище при 0°C , а в інтервалі $2,8-3,0\text{ M}$ насі - вище при 37°C .

3. В присутності непроникних кріопротекторів (ПЕГ-1500) за умов охолодження до 0°C спостерігається холододовий шок, ступень якого залежить від концентрації кріопротектора. Введення електролітів до складу кріопротекторного розчину ($0,3-0,45\text{ M}$ насі) знижує чутливість еритроцитів до холододового шоку і заморожування. При заморожуванні клітин в комбінованих середовищах збереженість клітин залежить від питомого вмісту високо- (ПЕГ-1500, ПЕГ-4000) і низькомолекулярних (ПЕГ-400, ПЕГ-1000) компонентів - чим вище вміст високомолекулярних компонентів, тим нижче збереженість клітин.

4. Ефект упакування еритроцитів в гіпертонічних сольових і кріопротекторних розчинах виявляється в зниженні збереженості клітин після їх диспергування (процес моделює розвиток

пошкоджень за умов гіперосмотичного шоку і заморожування). При цьому видзначається збіг критичних зон осмолярності (600-800 мОсм), вище яких клітини набувають чутливості допошкоджучих факторів.

5. Кріопротектори (ПЕГ і ПВП) справляють виразний вплив на стан ліпідної і білкової фази мембрани, тим самим викликаючи підвищення екстрактивності ліпідів і змінюючи гідрофобні взаємодії ліпід-білкових комплексів і полярні властивості розчинника. Характер зсуву максимуму спектра поглинання свідчить про змінення стсами водневих зв'язків і збільшення внеску тирозинових залишків у флуоресценцію білків.

6. Охолодження еритроцитів в температурному діапазоні 0→30 °С при відсутності кристалізації рідкої фази має такі ж законмирності, що й холододовий шок (37→0 °С). Максимальна втрата еритроцитами K^+ і гемоглобіну, мітохондріями - K^+ і МДГ і ліпосомами - $сгO_4^-$ спостерігається при досягненні нижньої межі фазового переходу ліпідів цих мембран.

7. Гіпертонічний холододовий шок не є процесом, якому притимана кореляція між осмолярністю середовища і ступенем пошкодження клітин. Перенос еритроцитів, які спочатку інкубувалися в гіпертонічних розчинах (0,8 М сахарози або 0,9 М NaCl) при 0 °С сприяє підвищенню збереженості клітин з ростом концентрації кінцевого розчину з максимумом поблизу 2,0 М NaCl. Лізис клітин обмежується дією осмотичних сил в інтервалі концентрацій 1,5-2,0 М NaCl.

8. Холододовий і осмотичний (5,0 М NaCl) шок характеризується подібною залежністю від наступних змін температури і осмолярності середовища. Це виявляється в існуванні критичних зон осмолярності (0,45-0,85 М NaCl), вище якої клітини набувають максимальної чутливості до факторів середовища, що

змінюються. В середвищі з осмолярністю 0,45-0,80 М насі відбувається морфологічна трансформація клітин і змінення білків цитоскелету, що виявляється в змінні характеру дії зшивачого зн-реагента (1 мМ діоміда) і перерозподілом вмісту білків смуг 1, 2, 5 і 4.1. Температура визначає спрямованість цих змін.

9. Навантаження еритроцитів стабілізатором білкового цитоскелету (0,2 М глюкози) супроводжується підвищенням тривкості клітин до холодового і осмотичного шоку, а також заморожування (-196 °С). Ефект глюкози залежить від температури вихідного середовища - він є більш виразним при 37 °С.

10. Тривкість еритроцитів до змінення осмотичних умов (0,15-5,00 М насі) визначається спрямованістю змінень стану клітин в певних зонах осмолярності : 0,45 М насі забезпечує тривкий стан клітин при зростанні зовнішнього середовища. 2,0 М насі забезпечує мінімальну чутливість до гіпертонічного і постгіпертонічного лізису.

II. Змінення стану еритроцитів, що викликається осмолярністю, характеризується особливістю, яка виявляється в тенденції переходу мішаної популяції клітин в однаковий стан за умов їх експонування в зонах осмолярності 0,45 і 2,0 М насі, що забезпечує їх високу тривкість до температурних і осмотичних впливів.

СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П. Молекулярные механизмы криповреждений биомембран //Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. ВИНТИ. Москва: 1978. - 9. - С.80-114.
2. Бондаренко Т.П., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Способ определения крипротектора в биологическом материале. Авт.св. №5666181. 1977.

3. Грек А.М., Луговой В.И., Бондаренко Т.П. Исследование некоторых структурных особенностей мембран эритроцитов при низкотемпературном консервировании // Актуальные вопросы криобиологии: Сб.н.тр. - Киев: Наук.думка. - 1974. - С.43-45.
4. Грек А.М., Луговой В.И., Бондаренко Т.П. Влияние криопротекторов на белковую флуоресценцию мембран эритроцитов // Криобиология и криомедицина. - 1975, №1. - С.42-45.
5. Бондаренко Т.П. Влияние низкотемпературного консервирования на фосфолипидный состав митохондрий клеток печени белых крыс // Современные вопросы криобиологии: Сб.н.тр. - Киев: Наук.думка. - 1976. - С.35-38.
6. Белоус А.М., Бондаренко Т.П. Изменение липидного состава мембран митохондрий после действия низких температур // Укр. биохим.журн. - 1977, 49, №2. - С.30-33.
7. Белоус А.М., Лемешко В.А., Бондаренко Т.П. и др. Структурно-функциональные изменения мембран клеток при действии низких температур // В сб. Общие механизмы клеточных реакций на повреждающие воздействия. - Л.: 1977. - С.133-137.
8. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П. Биохимические изменения фосфолипидного состава биомембран под влиянием низких температур // Вестник АН УССР. - 1977. - №9. - С.54-65.
9. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П. Температурозависимые изменения свойств биологических мембран при воздействии низких температур // Сб.н.тр. Молекулярные механизмы криозащиты и криоповреждений биологических структур. Киев: Наук.думка. - 1977. - С.3-4.
10. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П. Биохимическая модификация липидов биомембран как причина гибели клеток при низкотемпературном консервировании // Криобиология и

криомедицина. - 1978. - №4. - С.3-6.

11.Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Белоус А.М. Взаимодействие полиэтиленоксидов с искусственными и митохондриальными мембранами // Криобиология и криомедицина. - 1978. - №4. - С. 7-9.

12.Бондаренко Т.П. Анализ уровня холестерина в мембранах митохондрий после низкотемпературного воздействия // Сб.н.тр. Вопросы криоконсервирования биологических систем. - Киев: Наук.думка. - 1978. - С.15-18.

13.Белоус А.М., Бондаренко Т.П., Бондаренко В.А. Влияние замораживания-оттаивания на липидный состав митохондрий // Биохимия. - 1978. - 43, №12. - С.2175-2182.

14.Belous A.M., Bondarenko T.P., Babijchuk L.A. Effect of cooling on the state of erythrocyte membranes with different cholesterol contents. I. Resistent of normal and cholesterol depleted erythrocyte to cooling in the range of 37 to 0 °C. // Cryo-Letters. - 1981. - №2. - P.217-224.

15.Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П. Механизм развития холодового повреждения мембран клеток // Криобиология и криомедицина. 1981. - №9. - С.3-17.

16.Тонконог Л.А., Бондаренко Т.П., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Проницаемость липосом с различным содержанием холестерина под влиянием низких температур // Укр. биохим.журн. - 1982. - 54, №3. - С.293-296.

17.Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Бабийчук Л.А., Белоус А.М. Температурозависимые изменения структуры эритроцитов // Криобиология и криомедицина. 1983. - №12. - С.13-24.

18.Белоус А.М., Бондаренко Т.П., Бондаренко В.А. и др. Единый механизм повреждения клеток при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология. 1985. - №2.

- С. 25-32.

19.Бондаренко Т.П., Семенченко А.Ю., Белоус А.М. Влияние переохлаждения на митохондрии печени крысы: освобождение калия и малатдегидрогеназы при температурах фазовых переходов липидов // Биохимия. - 1982. - 47, №4. - С.594-599.

20.Бондаренко Т.П. Эффект упаковки эритроцитов в водно-солевых растворах высокомолекулярных криопротекторов // Сб.н.тр. Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. - К.: Наук.думка. - 1990. - С.9-15.

21.Бондаренко Т.П., Киروشка В.В. Модифицирующее действие низкомолекулярных компонентов среды на устойчивость эритроцитов к охлаждению в спедах, содержащих непроницающий криопротектор // Там же, С.16-20.

22.Бондаренко Т.П., Мельникова О.В. Модифицирующее действие глюкозы на эритроциты в условиях охлаждения и замораживания // Сб.н.тр. Физико-химические процессы в криобиологических системах. - Харьков: Наук.думка. - 1991. - С.68-78.

23.Бондаренко Т.П., Мельникова О.В., Песина Н.И. Вклад осмотической и температурной компоненты в развитие криогемолиза при отрицательных температурах. // Там же. - С.3-14.

24.Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Руденко С.В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток // Проблемы криобиологии. - 1992. - №4. - С.14-26.

25.Бондаренко Т.П. Комбинированное действие температуры и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к гипертоническому стрессу // Проблемы криобиологии. - 1993. - №2. - С. 11-16.

26.Белоус А.М., Бондаренко Т.П., Тонконог Л.А., Пашенко В.Г. Влияние охлаждения, факторов инкубации среды и криопротекто-

- ров на стабильность липосом // Сб н.тр. Липосомы. Взаимодействие с клетками и тканями". - М.: 1980. - С. 80-86.
- 27.Белоус А.М., Бондаренко Т.П., Кудокочева Е.В. Биохимические изменения биомембран под воздействием низких температур // Мат.Всесоюзн. конф. по холоду. Ташкент: 1977. - С.7-8.
- 28.Белоус А.М., Бондаренко Т.П., Бондаренко В.А. Молекулярные механизмы криповреждения мембран эритроцитов // Мат. I Всесоюзного съезда гематологов и трансфузиологов. - Баку: 1979. - С. 458-459.
- 29.Белоус А.М., Бондаренко Т.П. Механизмы повреждения мембран эритроцитов // Мат. I Укр. съезда гематологов и трансфузиологов. Харьков: 1980. - С.169-170.
- 30.Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П. Biochemical mechanisms of cold degradation of rat mitochondrial membrane phospholipid components // In: Cryobiology 15 Annual Meeting Tokyo. - 1978. - P. 77.
- 31.Бондаренко Т.П. Факторы, контролируемые устойчивость эритроцитов к охлаждению в смешанных средах, содержащих крипротектор и электролит // Мат. Всесоюзн. симп. "Реконструкция, стабилизация и репарация биомембран". - Благовещенск: 1989. - С.62.
- 32.Бондаренко Т.П. Барьерные свойства эритроцитов в условиях охлаждения и замораживания в присутствии непроникающих крипротекторов // Мат. II Междунар. конф. ЮНЕСКО "Успехи современной криобиологии". - Харьков: 1992. - С.23.
- 33.Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Шпакова Н.М. et al. Alternative principle of cryobiology: elaboration of cellular mechanisms of cold and osmotic stability // 31-st Annual meeting of society for cryobiology. - Kyoto. - 1994. - P.27

Бондаренко Т.П. Осмолярность и температура среды как факторы, регулирующие чувствительность эритроцитов к охлаждению и осмотическому стрессу.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.22 - криобиология, ИПКИК НАН Украины, Харьков, 1994 г.

Защищается 43 научные работы и I авторское свидетельство, которые содержат подробный анализ связи между исходными и конечными условиями среды относительно направленности и степени изменения температурной и осмотической устойчивости эритроцитов и динамики их гибели в нефизиологических условиях.

Установлено, что процессы, способствующие лизису клеток, связаны с модификацией цитоскелета. Стабильное состояние клеток характеризуется снижением относительного содержания белка полосы 3 и увеличением белка полосы 4.1. Использование модификатора цитоскелета (глюкозы) повышает устойчивость клеток к охлаждению и замораживанию.

Bondarenko T.P. Osmolarity and temperature of the media as factors which regulate RBC sensibility to cooling and osmotic stress.

Thesis for degree of doctor of biological sciences by speciality 03.00.22 - cryobiology, IPCaC NAS Ukraine, Kharkov, 1994.

It have been defended 43 scientific papers and I personal certificate, which contain detailed analysis of interrelations between initial and final conditions of the media due to direction and degree of changes of temperature and osmotic RBC sensitivity and dynamics of their death under unphysiological conditions.

It have been estimated that processes with leading to cell

lysis correlate with cytoskeletal modification. Stable cells state is realized through the decrease of relative content of protein band 3 and increasing band 4.I. Using of cytoskeleton modifiсator (glucose) elevates cell resistance to cooling and freezing.

Ключові слова: еритроцит, осмолярність, температура, охолодження, дегідратація, чутливість контролювання стану клітин.

Відповідальний за випуск - ГРИШЕНКО В.І.

Підпис. до друку 20.12.94. Формат 60 x 84 1/16.

Папір тип. Друк офсетний. Усл. др.арк. 2,0.

Тираж 100 екз. Зак. 56.

Безкоштовно

Ротапринт ФТІНТ НАН України, Харків, ЗІОІ64,

пр-т Леніна, 47

115712 81

AB 31.737

AB 31.737