

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукопису

ПАНТАЛЕР Олена Револьдівна

ДОСЛІДЖЕННЯ СТІЙКОСТІ ДЕГІДРАТОВАНИХ ЕРИТРОЦИТІВ
ДО ДІЇ ОСМОТИЧНОГО ТА МЕХАНІЧНОГО СТРЕСУ

03.00.22 - кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків - 1996

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00779404 (V)

АВ 33.749

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії наук України

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

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук Є.О.ГОРДІЄНКО
доктор біологічних наук Є.Е.ПЕРСЬКИЙ

Провідна установа: Харківський Державний університет
ім.О.М.Горького (Кафедра молекулярної і прикладної біофізики)

Захист відбудеться "20" лютого 1998 р. о 13³⁰ годині
на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 50.21.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії наук України (310015, м.Харків, вул.Переяславська, 23)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інститута проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії наук України

Автореферат розіслано "16" січня 1998 р.

Вчений секретар Спеціалізованої вченої ради,
доктор медичних наук, професор

А.М.ГОЛЬЦЕВ

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. Хоча існує значний об'єм експериментальних даних, які стосуються вивчення механізмів холодового пошкодження біооб'єктів, зараз багато аспектів проблеми кріопошкоджень залишаються недостатньо ясними. Це стосується, насамперед, механізмів зв'язку стійкості клітини до дії фізико-хімічних факторів кріоконсервування (зсув температури, осмолярності, рН) зі змінами її макроскопічних характеристик (об'єм, форма, деформуємість) в умовах дегідратації. Відомо, що початкові значення цих характеристик, котрі контролюються початковими умовами, в яких знаходиться клітина, мають суттєвий вплив на її поведінку при наступних змінах параметрів середовища.

Так, початкова часткова дегідратація, що проводиться при 0 °С, суттєво підвищує стійкість клітин до гіперосмотичного стресу у висококонцентрованих розчинах солей (Погдняков, 1989). Останнє дозволяє говорити про наявність у клітині певних структурних резервів, які здатні забезпечити її високу стійкість до дії осмотического фактору при оптимальній траєкторії клітинної системи у просторі значень параметрів середовища, що змінюються.

Існуючі дані вказують, що у механізми підвищення структурної стійкості в умовах часткової дегідратації залучені процеси, що охоплюють як цитоскелет, так і плазматичну мембрану.

Під час значного зсуву осмолярності та температури середовища в мембранах клітин народжуються дефекти, подальший розвиток яких здатний призвести до формування гемолітичної пори. До ряду засобів, що здатні вплинути на процес зародження, розмір та час життя трансмембранної пори, можна віднести фармакологіч-

ні препарати (Lieber, 1984), двухвалентні йони (Bashford, 1988) та ін. Інформація про характер їх дії дозволила б зробити певні висновки і відносно механізму формування пори. Така інформація також необхідна для обґрунтування засобів спрямованої регуляції стану клітин при використанні комплексних впливів, у яких застосовується дегідратація поряд з іншими факторами, що здатні забезпечити більш високу стійкість клітин в умовах, далеких від фізіологічної норми.

Мета дослідження. Вивчення взаємозв'язку між початковими осмотичними умовами, у яких знаходилися еритроцити, та їх реакцією на наступну дегідратацію і регідратацію, а також на дію факторів, здатних модифікувати макроскопічну структуру клітин (дія деформуючого фактора) та їх плазматичну мембрану (обробка амфіфільними сполуками).

Задачі дослідження. Для досягнення мети були поставлені такі задачі:

- вивчити вплив початкового ступеню дегідратації у розчинах NaCl та сахарози на стійкість еритроцитів до гіпертонічного та постгіпертонічного стресу;

- вивчити динамічну деформуємість еритроцитів в залежності від ступеня їх дегідратації у гіпертонічному середовищі, температури, а також після обробки глюкозою;

- вивчити вплив хлорпромазину на стійкість дегідратованих еритроцитів до гіпертонічного стресу при переносі в 4.0 M NaCl у температурному інтервалі 0-40 °C;

- вивчити вплив початкового ступеня дегідратації еритроцитів на структурну стабільність плазматичної мембрани при дії амфіфільних сполук (на прикладі хлорпромазіна).

Наукова новизна. У роботі показано, що при дегідратації еритроцитів час деформування клітин при втягуванні у мікропіпетку та характерні терміни як гіпертонічного кренірування так і наступної релаксації форми клітин при додаванні сироваткового альбуміну експоненціально зростають з підвищенням концентрації NaCl у середовищі. Виявлено, що динамічну жорсткість еритроцитів може бути знижено у результаті початкового насичення клітин глюкозою.

Досліджено вплив температури на динаміку розвитку гіперосмотичного лізису еритроцитів при перенесенні клітин у 4.0 М NaCl в залежності від ступеня їх початкової дегідратації. Виявлено особливості на арреніусовських залежностях швидкості та тривалості лаг-фази лізису (8-10 °C та 17-20 °C) та оцінена енергія активації процесу у температурному інтервалі 10-40 °C (40 кДж/моль для клітин, перенесених у 4.0 М NaCl з фізіологічного розчину).

Виявлено ефект блокування гіперосмотичного лізису еритроцитів хлорпромазином у концентрації 6.6×10^{-5} М. Цей ефект залежить від температури та умов початкової дегідратації клітин і реалізується безпосередньо в момент зміни осмотичних умов при перенесенні клітин в 4.0 М NaCl.

Теоретичне значення. Проведені дослідження дозволили доповнити уявлення про клітину в умовах дегідратації роллю такого фактора як цитоматрикс, основним компонентом якого є щільно упаковані (у обезводненій клітині) глобули гемоглобіну, що здатні проникати у білкову решітку, яка утворює мембранний скелет.

Обґрунтовано роль розклинюючого тиску тонких плівок роз-

чинника, який оточує білкові глобули, як фактора, що визначає неідеальність осмотичного стискування еритроцитів.

Розширено уявлення про роль катіонних амфіпатичних сполук як фактора, здатного модифікувати осмотичну та температурну чутливість клітин. Одержані експериментальні дані про особливості впливу катіонних амфіпатів на стійкість еритроцитів до гіперосмотичного стресу, які дозволяють розглядати як критичний етап гіперосмотичного пошкодження клітин фаза утворення трансмембранної пори.

Практичне значення роботи полягає у розробці нових методів направленої корекції осмотичної чутливості еритроцитів за допомогою катіонних амфіпатичних сполук, що проявляють максимальну ефективність як фактор, який захищає клітини від лізису при зміні осмотичних умов середовища.

Положення, що виносяться на захист.

1. Характер температурної залежності рівня лізису та кінетичних параметрів гіперосмотичного шоку частково дегідратованих еритроцитів вказує на існування комплексного механізму осмотичної чутливості клітин, що включає зміни асоціації компонентів мембрани один з одним, а також з білками цитоскелета.
2. Осмотична стійкість еритроцитів контролюється, принаймні, двома механізмами. Загальний механізм пов'язаний з генералізованими змінами цитоскелета та плазматичної мембрани у початкових умовах і контролює стійкість клітин до наступних змін умов оточення. Локальний механізм пов'язаний з зародженням та еволюцією трансмембранної пори при дії осмотичного стресу і реалізується безпосередньо у момент зміни осмотичних умов середовища.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи доповідались на Всесоюзній конференції "Структурная динамика биологических мембран и ее роль в регуляции фотобиологических и рецепторных процессов" (Мінськ, 1988), II Міжнародній конференції "Успехи современной криобиологии" (Харків, 1992), VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), I з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 1994), 31-му та 32-му з'їздах товариства криобіологів (Японія, 1994: США, 1995), I з'їзді Українського товариства криобіології і криомедицини (Харків, 1995).

Публікації матеріалів досліджень. За матеріалами дисертації у відкритій печаті опубліковано 16 робіт.

Об'єм та структура роботи. Дисертація викладена на 137 стор. машинописного тексту, складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, глави власних досліджень та їх обговорювання, містить 43 малюнка та 3 таблиці. Список використаної літератури включає 190 робіт.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Об'єктом дослідження були еритроцити донорської крові, тричі відмиті фізіологічним розчином (0.15 М NaCl, 0.01 М фосфатний буфер, pH=7.4).

Дегідратацію еритроцитів здійснювали, змішуючи у співвідношенні 1:10 аліквот відмитих упакованих еритроцитів з розчинами NaCl або сахарози з різним осмотичним тиском (1300-2000 мосмоль/кг).

У експериментах, які присвячені дослідженню постгіпертонічного лізису еритроцитів, клітини інкубували потрібний час (1-30 хв.) у розчинах з різним вмістом сахарози при 37 °C і потім переносили у ізотонічні розчини NaCl (0.15 М), холін-хлори-

ду (0.15 M) або сахарози (0.27 M).

Гіпертонічний шок еритроцитів здійснювали шляхом переносу рівних аліквот контрольних або початково модифікованих клітин у розчину 4.0 M NaCl.

Для дослідження структурної стабільності плазматичної мембрани дегідратованих еритроцитів при дії амфіфільних сполук клітини поміщали у відповідні розчини NaCl, які містили катіонний амфіпат хлорпромагін (3×10^{-4} та 4×10^{-4} M, відповідно).

Для вимірювання рівня гемолізу еритроцити висаджували центрифугуванням на протязі 5 хвилин при 1500 g. Кількість вийшовшого у розчин гемоглобіну визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 543 нм.

Рівень гемолізу як функцію часу визначали шляхом реєстрації змін у часі оптичної густини суспензії еритроцитів на довжині хвилі 720 нм при розходженні світлового пучка $\pm 1.5^\circ$ на установці, розробленій та атестованій в ІПКіК НАН України. При цьому кінетичні параметри лізису еритроцитів визначали таким чином: а) максимальна швидкість лізису (V_{\max}) - по максимальному нахилу дотичної до кривої, яка описує зміни у часі оптичної густини суспензії у процесі лізису клітин;

б) лаг-період розвитку лізису ($t_{\text{лаг}}$) - по відстані на шкалі часу від моменту поміщення клітин у середовище, де відбувається лізис, до крапки перегину кінетичної кривої.

Динаміку зміни форми еритроцитів досліджували розробленим у роботах (Дегтярев, 1988) спектрофотометричним способом реєстрації індексу "дискоїдності". Спосіб оснований на вираженій кореляції між ступенем сферичності клітин, яка звичайно виражається у вигляді морфологічного індексу (Tanaka, 1981), та індек-

сом "дискоїдності" K , що виражається відношенням розмаху флуктуацій оптичної густини (шириною "шумової" доріжки) до середньої по часу оптичної густини суспензії на довжині хвилі 720 нм. Показник K дає усереднену по популяції кількісну міру сферичності клітин у кожний момент часу. У паралельних експериментах контролювали особливості трансформації форми клітин при різних стресових впливах методами оптичної мікроскопії.

Початкова швидкість і характеристичний час встановлення нового рівня оптичної густини при дії на клітини, яка змінює їх форму, трактувалися як кінетичні параметри трансформації форми еритроцитів v_0 і τ , відповідно.

Об'єм еритроцитів та динаміка його зміни реєструвалися методом спектроскопії імпульсів опору (CIO), який розвинуто у роботах (Akeson, Mel, 1982).

Осмотичний тиск середовища виміряли осмометром ОМКА-1Ц-01.

Ступінь осмотичного стискування еритроцитів у розчинах, що містили гіпертонічні концентрації хлориду натрію, визначали мікрогематокритним методом.

Для вивчення деформуємі окремих еритроцитів було використано метод, аналогічний [Лерхе, 1986] з деякою модифікацією. Еритроцити втягували у окляну мікропіпетку конічної форми (діаметр вхідного отвору 3 мкм) під дією перепаду гідростатичного тиску 1-2 см водн.ст. У нашій модифікації методу реєструвалася не амплітуда, а тривалість імпульсу струма при проходженні клітини через вхідний отвір капіляра, яка служила мірою динамічної деформуємі клітин.

Апроксимацію експериментальних кривих формулами, що містять лінійні параметри, проводили методом найменших квадратів,

які містили нелінійні параметри - з використанням алгоритму нелінійної оптимізації в пакету PC-Matlab.

Статистичну обробку даних проводили по методу Стюдента-Фішера.

У роботі використовувалися хлорпромазин (ХПМ) та сироватковий альбумін людини (САЛ) фірми "Serva", реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації "хч" та "чда".

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Проведені дослідження показали, що осмотичне стискування еритроцитів у гіпертонічних розчинах приводить до дуже суттєвої зміни їх динамічної поведінки. При збільшенні концентрації NaCl у середовищі від 0.15 до 0.7 М час деформації клітин до повного втягування в мікропіпетку діаметром 3 мкм зростає більш чим на 3 порядки. При концентраціях NaCl у середовищі вище 0.4 М спостерігається сильніше, ніж у області 0.15-0.3 М, приблизно експоненціальне наростання часу деформування клітин із збільшенням концентрації солі (мал. 1А).

Попередня модифікація еритроцитів глюкозою при інкубації на протязі 2-х годин у фізіологічному розчині, якій містить 0.2 М глюкози, приводить до зміщення у бік більшої гіпертонії області концентрацій NaCl, яка відповідає експоненціальному зростанню часу деформації клітин. Зріст часу деформації еритроцитів при втягуванні в мікропіпетку був мірою зростання динамічної жорсткості еритроцитів щодо осуви.

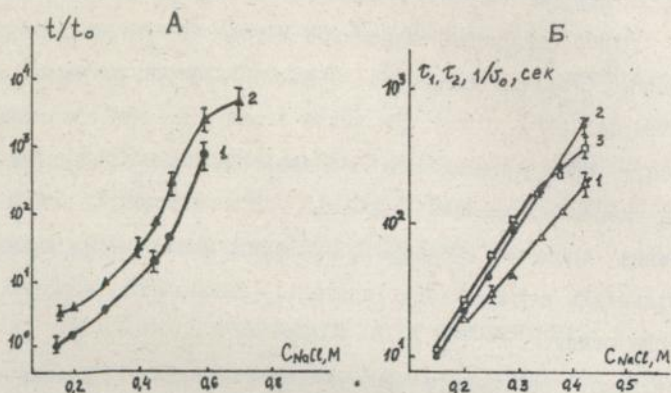
Динамічну агинну деформацію дегідратованих еритроцитів досліджували шляхом реєстрації зміни від часу оптичної густини клітинної суспензії та індексу "дискоїдності" клітин у

відповідь на дію, що викликає зміну форми (на прикладі додавання САЛ). Оцінені кінетичні параметри процесів гіпертонічного кренірування (τ_1) та зворотньої релаксації форми до дискоциту під впливом САЛ ($1/v_0$ і τ_2). Як видно з мал.1 Б, при збільшенні концентрації NaCl у середовищі спостерігається експоненціальне зростання характеристичних термінів обох процесів. Ступінь уповільнення процесів змінення форми еритроцитів можна вважати мірою збільшення в умовах дегідратації динамічної жорсткості клітин щодо згину.

Як відомо, еритроцити стискаються у гіпертонічних середовищах у меншому ступеню, ніж це може бути завбачено, виходячи з уявлення про ці клітини як про ідеальний осмометр, які враховують значний виключений об'єм, що зайнятий гемоглобіном (Solomon, 1968, 1986). При цьому зі збільшенням осмотичного тиску зовнішнього середовища з'являється та зростає різниця між осмотичним тиском електrolітів, які сконцентрувалися у середині клітини, та осмолярністю зовнішнього середовища.

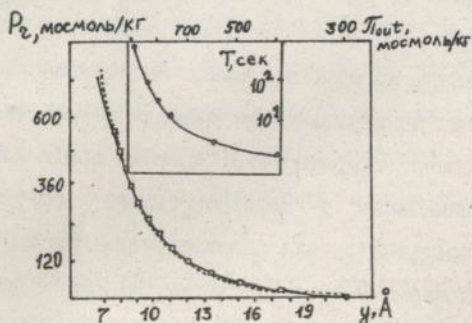
У останньому десятиріччі розвинені уяви про розклинюючий тиск у тонких плівках розчинника між крупними макромолекулами або підвійними ліпідними шарами, які з'являються при їх зближенні на малі відстані. Засновуючись на цих уявах, ми припустили, що вказана вище різниця обумовлена наявністю сил відштовхування гідратаційної природи поміж глобулами гемоглобіну та виникненням у наслідок цього об'ємної пружності білкової "решітки", яка заважає стисканню клітини. Вона може бути висловлена у вигляді "тиску решітки" формулою:

$$P_r = -2\sqrt{2\pi} \cdot R_c \cdot A_0 \cdot \delta \cdot \exp(-y/\delta) / (2R_c + y)^2 \quad (1)$$



Мал.1. Вплив концентрації NaCl у середовищі на динамічну деформувемість еритроцитів.

А - час проходження еритроцитів скрізь вхідний отвір мікропіпетки, нормований на відповідний час для еритроцитів у фізіологічному розчині при 24 °С: температура 24 °С(1) та 5 °С(2). В - кінетичні параметри процесу змінення форми еритроцитів τ_1 (1), $1/v_0$ (2), τ_2 (3).



Мал.2. Розрахункова залежність "тиску решітки" від відстані між глобулами гемоглобіну. Пунктирна лінія - результат апроксимації формулою (1). На вставці: час проходження еритроцитів скрізь вхідний отвір мікропіпетки.

де y - середня відстань між глобулами гемоглобіну; R_c - радіус сфери, яка моделює глобулу; A_0 - силовий множник; δ - характерна довжина опадання сил відштовхування.

З експериментальної залежності об'єму еритроцитів від осмотичного тиску середовища були вираховані середні міжглобулярні відстані та відповідаюча їм некомпенсована осмотична різниця осмотичних тисків поза- та внутрішньоклітинних електrolітів (з урахуванням осмотичного внеску гемоглобіну). Як результат апроксимації поданої таким чином експериментальної залежності за допомогою формули (1) (пунктирна крива на мал.2) була одержана величина характерної довжини опадання сил відштовхування 3.17 \AA . Близькі величини одержані у працях (Rand, Parsegian, 1986-92) при вимірюванні методом осмотичного стресу сил відштовхування при обліженні на відстані, менші $20-30 \text{ \AA}$, подвійних ліпідних шарів, а також таких макромолекул, як ДНК і деякі полісахариди. У рамках нашої моделі передбачена область осмотичних тисків середовища, де повинні проявитися ефекти структурування гемоглобінового цитоматрикса. Це завбачення узгоджується з результатами наших досліджень деформованості дегідратованих еритроцитів (вставка мал.2).

Досліджено вплив початкового ступеня дегідратації еритроцитів на динаміку пошкодження клітин при гіперосмотичному, постгіпертонічному та ХІМ-індукованому лізисі.

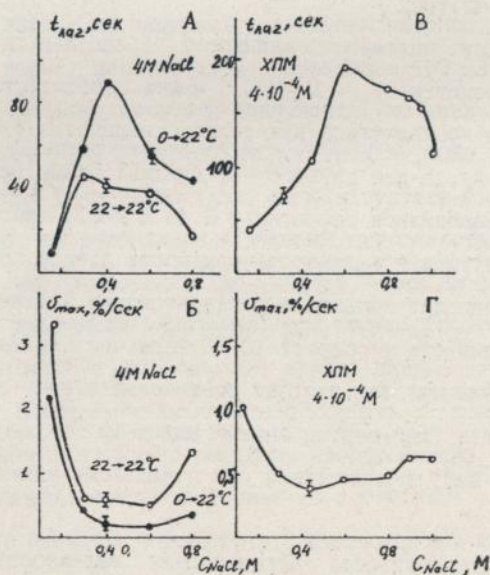
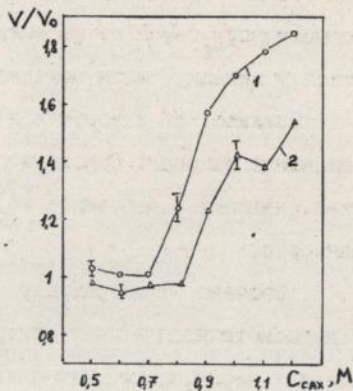
Вивчення динаміки змінення об'єму та форми еритроцитів, дегідратованих у гіпертонічних сахарозних середовищах і потім регідратованих у ізотонічних умовах показало, що пошкодження клітин при регідратації залежить як від часу інкубації у гіпертонічному середовищі, його тонічності та температури, так і від

складу регідратуючого середовища (NaCl, холін-хлорид або сахароза). Короткочасна (1 хв.) інкубація еритроцитів у гіпертонічних розчинах сахарози з концентрацією від 0.5 до 1.2 М не спричиняє суттєвої зміни форми та набухання клітин після регідrataції. При збільшенні тривалості інкубації еритроцитів у дегідратованому стані до 15 хв. з'являється критичний рівень дегідrataції у області 0.8-0.9 М сахарози, при перевищенні якого еритроцити сенсибілізуються до наступної регідrataції в 0.15 М NaCl. Це виражається у набуханні та лізисі клітин. При подальшому збільшенні тривалості інкубації (30 хв.) у дегідратуючому середовищі ця критична межа зсувається у бік нижчих концентрацій сахарози (0.7 М) (мал.3). При цьому методом СІО реєструються дві субпопуляції еритроцитів - клітини, які відновили свій об'єм до нормального ізотонічного, та клітини, які набухли та зазнають лізису. Об'єм еритроцитів набухшої популяції та кількість у ній клітин залежать від часу і ступеня дегідrataції та від часу, що пройшов з моменту вміщення клітин у регідратуюче середовище.

Існування критичної межі дегідrataції, при переході через яку клітини сенсибілізуються до наступної зміни умов середовища, виявляється також при дослідженні динаміки гіпертонічного та ХПМ-індукованого лізису дегідратованих еритроцитів.

Як видно з мал.4, збільшення концентрації NaCl у середовищі передінкубації схожим чином впливає на кінетичні параметри лізису, що викликаний факторами різноманітної природи. Це виявляється у зростанні тривалості лаг-фази з наступним зниженням після досягнення концентрації NaCl понад 0.5 М і у зменшенні швидкості лізису з наступним збільшенням при концентрації NaCl

Мал.3. Залежність середнього відносного об'єму еритроцитів через 12 хв. після регідратації у фізіологічному розчині від концентрації сахарози у дегідратуючому середовищі. Час інкубації у сахарозному середовищі 15 хв. (1) і 30 хв. (2).



Мал.4. Вплив концентрації NaCl у середовищі передінкубації на кінетичні параметри гіперосмотичного лізису у 4 M NaCl (А,В) та ХПМ-індукованого гемолізу еритроцитів (В,Г) : А,В - лаг-період розвитку лізису; Б,Г - максимальна швидкість лізису.

0.8-1.0 М. При цьому ефект, що спостерігається, затримки гіперосмотичного гемолізу та зменшення його швидкості більш виявляється у випадку, коли вихідна дегідратація здійснюється при 0°C.

Важливо, що ліворуч від критичної межі дегідратації, розташованої на шкалі осмолярності у області 1100 мосмоль/кг, клітини, навпаки, набувають збільшену стійкість до дії стресових факторів.

Вивчено температурну залежність кінетичних параметрів гіперосмотичного лізису еритроцитів з метою оцінити енергію активації цього процесу та виявити особливості, що мають, щодо комбінованого впливу на нього температури і ступеня вихідної дегідратації клітин.

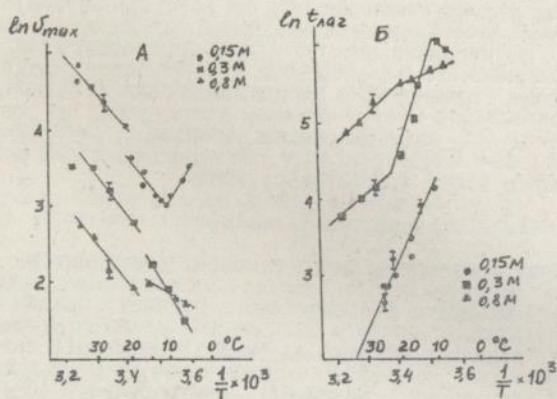
Арреніусові залежності швидкості і лаг-періоду розвинення лізису еритроцитів у 4 М NaCl мають особливість в області 17-20 °C, яка проявляється для першого параметра у вигляді розриву (мал. 5 А), а для другого - у вигляді аламу (мал.5 В). Для клітин, що знаходилися спочатку у 0.15 М NaCl, явно виявляється алам на арреніусовій залежності швидкості лізису поблизу 10 °C, тоді як у випадку початково дегідратованих клітин він відсутній. Ця особливість у області 10 °C відмічається також на арреніусовій залежності лаг-періоду розвинення лізису для контрольних еритроцитів (лаг-період зникає нижче 10 °C) та дегідратованих у 0.3 М NaCl (зменшується при подальшому зниженні температури).

Виявлені особливості арреніусових залежностей кінетичних параметрів гіпертонічного лізису співпадають з відомими раніше особливостями температурних залежностей різних структурних і функціональних характеристик еритроцитів, які поєднують з тер-

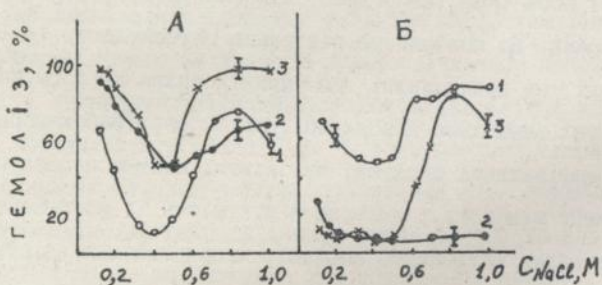
мोटропними структурними переходами еритроцитарних мембран. Вважається, що перший з них (17-20 °C) призводить до зміни ліпід-білкових взаємодій у площині мембрани (Wallach, 1979), а у другий (8-10 °C) залучена аміна асоціації цитоскелет-мембрана за допомогою білка 4.1 (Minetti, 1986).

Оцінена з температурної залежності швидкості лізису енергія активації гіпертонічного гемолізу еритроцитів, які перенесені у 4.0 M NaCl з фізіологічного розчину, склала 40 кДж/моль. Одержана величина близька до енергії активації латеральної дифузії у ліпідному матриці еритроцитів 43-48 кДж/моль (Kapitza, 1982). Енергія активації латеральної рухливості інтегральних білків, що занурені у ліпідний матрикс, яка контролюється у нормі цитоскелетом, перевищує 100 кДж/моль (Peters, 1986). Це дозволяє вказати припущення, що швидкість-лімітуючою стадією у розвитку гіпертонічного гемолізу може бути формування ліпідної пори (яка, вирогідно, стабілізується білками) в області мембрани, що погбавлена підтримки цитоскелета.

Далі, ми припустили, що учинити вплив на формування, час життя та замикання народженої при стресі трансмембранної пори можуть амфіпатичні сполуки, які здатні швидко перерасподілятися у клітинну мембрану і змінювати рухомість її компонентів. Досліджено вплив катіонного амфіпату хлорпромазина на рівень гемолізу еритроцитів при перенесенні до 4.0 M NaCl у залежності від вихідних та кінцевих параметрів середовища при такій стресовій дії. Вихідними параметрами, що варіювалися, були склад (NaCl або сахароза), осмолярність (300-2000 мосмоль/кг) і температура (0-40 °C) середовища передінкубації, кінцевими - температура (0-40 °C) та концентрація ХПМ у стресуючому гіпертонічному се-



Мал. 5. Арреніусові залежності кінетичних параметрів гіперосмотичного лізису еритроцитів при переносі клітин у 4 М NaCl після попередньої інкубації у середовищах з різним вмістом солі при 0 °С. А - максимальна швидкість лізису; Б - лаг-період розвитку лізису.



Мал. 6. Вплив ХПМ та концентрації NaCl у вихідному середовищі на рівень гемолізу еритроцитів при переносі у 4 М NaCl при різних комбінаціях температурних умов передінкубації та лізису: 0 - 0 °С (1), 0 - 35 °С (2), 35 - 35 °С (3). А - контроль; Б - ХПМ, $6.6 \cdot 10^{-5} M$.

редовищі. Крім того, застосовували два температурних режими попередньої дегідратації та наслідуючого гіпертонічного стресу:

1) дегідратація клітин при 0 °С та перенесення у 4 М NaCl при різних температурах, 2) ізотермічне перенесення у 4 М NaCl при різних температурах.

Виявлено значний антигемолітичний ефект ХПМ при його додаванні у концентраціях $5-7 \cdot 10^{-5}$ М у лізуюче гіперосмотичне середовище до поміщення в нього клітин. Ефект ХПМ не залежить від складу середовища передінкубації і від присутності цієї сполуки на раніших етапах експерименту - при інкубації у фізіологічному розчині чи в дегідратуючих середовищах. Останнє вказує на те, що захисна дія ХПМ не є результатом попередньої модифікації мембран еритроцитів, не зв'язано прямо з впливом амфіпату на регуляторні системи клітини, а реалізується безпосередньо у момент різкої зміни умов оточення.

У випадку помірної дегідратації (до 0.5 М NaCl) ефект блокування гемолізу спостерігається, починаючи з 15 °С, зростає при подальшому звищенні температури лізуючого середовища і не залежить від температурного режиму початкової дегідратації (мал. 6 Б, криві 2,3). У випадку міцної дегідратації, відповідаючої переходу через критичну межу, яка згадувалася вище, значний захисний ефект ХПМ спостерігається тільки для клітин, дегідратованих при 0 °С. При цьому підвищення температури стресуючого середовища від 15 до 35 °С призводить до майже повного подавлення гемолізу (мал. 6 Б, крива 3).

Аналіз одержаних результатів приводить до висновку, що особливості, які спостерігаються, щодо умов попередньої дегідратації, температури та ХПМ на динаміку і рівень пошкодження

еритроцитів при гіперосмотичному стресі пов'язані з процесом формування трансмембранної пори. Цей процес слід вважати критичним етапом пошкодження клітин при температурному та осмотичному впливі. З'явлення стійкого стану при певній комбінації початкових параметрів середовища (мал. 4 та 6 А), очевидно, відображає різке зниження вигогідності зародження пори, що може бути обумовлено реорганізацією периферичних білків, які контролюють безперервність ліпідного бішару. У той же час, ефект ХІМ на кінцевому етапі осмотичного впливу може бути обумовлений прямою дією амфіпату на пору, що формується, тобто є локальним ефектом. Пору, що формується, є динамічним створенням і може замикатися при оптимальній комбінації параметрів початкового та кінцевого середовища.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено вплив ступеня дегідратації клітин на динамічну зсувну та згинну деформуємість еритроцитів. Одержана експоненціальна залежність від концентрації NaCl у середовищі часу деформації еритроцитів при входженні у мікропіпетку (у області концентрацій NaCl 0.3-0.7 М) та характерного часу трансформації ехіноцит-дискоцит (у області концентрацій NaCl 0.15-0.42 М). Насичення еритроцитів глюкозою приводить до зміщення у бік більшої гіпертонії області концентрацій NaCl, яка відповідає експоненціальному наростанню часу деформації клітин.

2. Проведено моделювання цитоматриксу дегідратованих еритроцитів щільною шаровою упаковкою гемоглобінових глобул, які оточені розклинюючою плівкою розчинника. У результаті апроксимації згідно моделі експериментальної залежності об'єму клітин від осмотичного тиску середовища одержана величина характерної

довжини спадання сил відштовхування 3.17 \AA . Останнє може свідчити про переважний вклад структурної складової розклинюючого тиску у межглобулярні взаємодії гемоглобіна як фактора, який визначає неідеальність осмотичного стискування еритроцитів.

3. Дослідження динаміки зміни об'єму та форми еритроцитів при регідратації з гіпертонічних сахарозних розчинів показало, що існує критична межа ступеня дегідратації у сахарозному середовищі, до котрої стискування клітини є оборотним. Вона залежить від часу інкубації у дегідратуючому середовищі та температури. Так, значне набухання та лізис клітин при регідратації спостерігаються після інкубації у розчинах, які містять більш 0.9 M сахарози на протязі 15 хвилин та більш 0.7 M - на протязі 30 хвилин, при 37°C .

4. Досліджено вплив початкового ступеню дегідратації на динаміку розвитку гіперосмотичного лізису та викликаного хлорпромазином гемолізу еритроцитів. Для обох типів лізису спостерігається зростання тривалості лаг-фази при збільшенні концентрації NaCl у початковому середовищі до $0.4\text{-}0.5 \text{ M}$ з наступним значним зниженням, а також зменшення швидкості лізису з невеликим підвищенням при досягненні концентрації NaCl 1.0 M . Зниження температури початкової дегідратації до 0°C посилює ефект затримки початку гемолізу та уповільнення лізису клітин при наступному переносі у 4.0 M NaCl і збільшує кількість виживших клітин.

5. Виявлено особливості на арреніусовських залежностях кінетичних параметрів гіпертонічного гемолізу еритроцитів у 4.0 M NaCl в області $8\text{-}10^\circ \text{C}$ та $17\text{-}20^\circ \text{C}$, які співпадають з відомими особ-

ливостями температурних залежностей різних структурних та функціональних характеристик еритроцитів, що зумовлені термоліпопними структурними переходами у еритроцитарних мембранах.

6. Виявлено ефект блокування хлорпромазином ($6.6 \times 10^{-5} \text{M}$) гемолізу еритроцитів при гіперосмотичному шоці в 4.0 M NaCl , який залежить від ступеня початкової дегідратації клітин та температури, при котрій вона здійснюється, а також від температури, при якій клітина зазнає стрес. При оптимальній комбінації початкових ($0 \text{ }^{\circ}\text{C}$) і кінцевих ($25-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$) температурних умов середовища досягається протектування клітин у всьому інтервалі початкових концентрацій NaCl . При цьому дія хлорпромазина реалізується безпосередньо у момент різкої зміни осмотичних умов середовища.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Панталер Е.Р., Дегтярев А.В., Жутченко И.Л. Динамическая деформация одиночных эритроцитов в гипертонических средах// Теоретические и практические аспекты современной криобиологии/Сб. науч. тр. -К.: Наук. думка, 1989.-С.6-9.
2. Панталер Е.Р., Дегтярев А.В., Бондаренко В.А. Взаимодействие между глобулами гемоглобина как фактор, контролирующий объем и динамическую жесткость дегидратированных эритроцитов// Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем/Сб. науч. тр. -Харьков, 1989.-С.19-25.
3. Поадняков В.В., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Осморезистентность как принцип устойчивости к замораживанию//Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов/Сб. науч. тр. -Харьков, 1990.-С.124-130.
4. Панталер Е.Р., Руденко С.В. Влияние глюкозы на динамическую деформируемость одиночных эритроцитов в гипертонических средах

//Холодовой анабиоз/Об.науч.тр.-К.:Наук.думка, 1991.-С.42-46.

5. Дегтярев А.В., Панталер Е.Р. Кинетика кренирования и гемолита эритроцитов под действием ионофоров в изо- и гипертонических средах//Физико-химические процессы в криобиологических системах/Об.науч.тр.-Харьков, 1991.-С.19-31.

6. Дунаевская О.Н., Панталер Е.Р., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодному и гиперосмотическому воздействию при использовании катионных амфиатов//Проблемы криобиологии.- 1995.- N 1.- С.21-27.

7. Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромаина при гиперосмотическом и холодном шоке эритроцитов//Биохимия.-1995.-60, N 10.-С.1624-1631.

8. Дегтярев А.В., Бондаренко В.А., Семенченко А.Ю., Панталер Е.Р. Конформационная метастабильность цитоскелета эритроцитов и критические явления при холодном шоке//Тез. Всесоюз. конф. "Структурная динамика биологических мембран и ее роль в регуляции фотобиологических и рецепторных процессов".- Минск, 1988.-С.46.

9. Руденко С.В., Панталер Е.Р. Проблема регидратации при криоконсервировании клетки//Тез. докл. II Междунар. конф. "Успехи современной криобиологии".-Харьков, 1992.-С.156-157.

10. Панталер Е.Р., Дегтярев А.В. Механо-химические следствия дегидратации цитоматрикса эритроцитов в гипертонической среде// Там же, С.137.

11. Шпакова Н.М., Панталер Е.Р. Інгібітори кальмодуліну та холодний шок еритроцитів//Тез. доп. VI Укр. біохім. з'їзду.-Київ, 1992.-Ч.1.-С.107.

12. Дунаєвська О.М., Панталер Е.Р., Шпакова Н.М. Можливості уп-

равління стійкості еритроцитів до гіперосмотичного стресу: роль початкового стану клітин та катіонних амфіпатів//Тез. доп. І з'їзду Укр. біофіз. тов.-Київ, 1994.-С.93.

13. Панталер О.Р., Воїнова М.В., Шпакова Н.М. Вплив початкового ступеня дегідратації цитоматриксу та температури на кінетичні параметри гіперосмотичного лізису еритроцитів// Там же.-С.184-185.

14. Bondarenko V., Bondarenko T., Shpakova N., Pesina N., Kudokotseva E., Pantaler E. Alternative principle of cryobiology: elaboration of cellular mechanisms of cold and osmotic stability//31-st Annual Meeting of Society for Cryobiology.- Kyoto, Japan, 1994.-P.27.

15. Bondarenko V., Pantaler E., Shpakova N. et al. The formation and development of a transmembrane pore as a decisive event in the thermal and osmotic effect//32-nd Annual Meeting of society for Cryobiology.-Madison, USA, 1995.-P2-54.

16. Панталер Е.Р., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Температурная и фармакологическая коррекция эволюции трансмембранной поры в условиях гиперосмотического шока//Тез доп. І з'їзду Укр. тов. кріобіології і кріомедицини.-Харків, 1995.-С.191-193.

Панталер Е.Р. "Исследование устойчивости дегидратированных эритроцитов к действию осмотического и механического стресса". Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22. - кріобіологія. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії Наук України, Харків, 1996.

Работа посвящена изучению взаимосвязи между исходным уров-

нем дегидратации эритроцитов и их реакции на последующий осмотический стресс, деформирующее воздействие и обработку амфифильными соединениями. Показано, что динамическая жесткость эритроцитов возрастает экспоненциально с увеличением осмотического давления внеклеточной среды и может быть снижена в результате предварительного насыщения клеток глюкозой. Обнаружены особенности арениусовских зависимостей кинетических параметров гиперосмотического гемолиза в области 8-10 °С и 17-20 °С и оценена энергия активации этого процесса (40 кДж/моль). Обнаружен антигемолитический эффект хлорпромаина при гиперосмотическом шоке. Показано, что этот эффект зависит от температуры и условий исходной дегидратации клеток и реализуется непосредственно в момент резкого изменения осмотических условий среды.

Pantaler E.R. Study Of The Resistance Of Dehydrated Red Blood Cells To The Effect Of Osmotic And Mechanical Stress. Manuscript. Thesis for obtaining scientific degree of Candidate of Biological Sciences on the 03.00.22. speciality - cryobiology. Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine, 1995.

This work is devoted to the investigation of relationship between initial level of red blood cells dehydration and their response to following osmotic stress, deforming effect and treatment by amphiphilic compounds. It has been demonstrated that dynamic rigidity of red blood cells increases exponentially by the increase of osmotic pressure of extracellular medium and may be decreased as the result of

preliminary cell saturation by glucose. The peculiarities of Arrhenius dependences of kinetic parameters of hyperosmotic hemolysis in the region of 8-10 °C and 17-20 °C were revealed and this process activation energy (40 kJ/mol) was estimated. Antihemolytic effect of chlorpromazine at hyperosmotic shock was determined. It was shown that this effect depended on temperature and conditions of initial cell dehydration and realized directly in the moment of sharp change in environmental osmotic

Ключові слова: еритроцит, деформуємість, гемоліз, осмотичний стрес, катіонні амфіпати.

Відповідальний за випуск акад. НАН України
В.І. ГРИЦЕНКО

Підписано до друку 25.II.95 р. Об'єм фіз.п.л. 1,5, умов.л.1,5
Замовлення № 47, тираж 100 прим.

Ротапринт ФТІНТ НАН України, Харків-164, пр. Леніна, 47

453114

AB 33.749