4

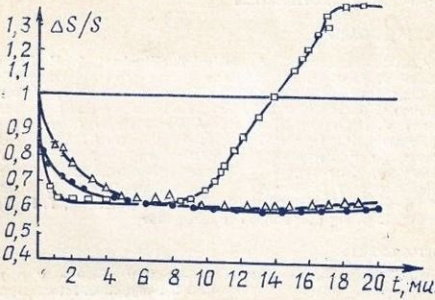
ISSN 0233-7673

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

1992

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



БЕЛОУС А.М. Роль регуляторных систем, модулирующих состояние белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии

БОНДАРЕНКО В.А., БОНДАРЕНКО Т.П., РУДЕНКО С.В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток

ГРИЩЕНКО В.И., ОСТАШКО Ф.И., ИСАЧЕНКО В.В., ИСАЧЕНКО Е.Ф., ДАХНО Ф.В., СУШКО А.Б., ПОЛЬЩИКОВ Г.Л. Получение, гипотермическое хранение, витрификация и сверхбыстрое замораживание трофобластических везикул



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

2

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

ЕРЖАНИЕ

ТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

А. М. Роль регуляторных систем, модулирующих состояние белков цито- при температурно-осмотическом воздействии 3

енко В. А., Бондаренко Т. П., Руденко С. В. Эффекты дегидратации в кон- колодовой и осмотической чувствительности клеток 14

в Л. Ф., Смольянинова Е. И. Осмотическое поведение яйцеклеток и эм- в мыши: роль цитоскелета 26

КОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

чко В. И., Осташко Ф. И., Исаченко В. В., Исаченко Е. Ф., Дахно Ф. В., А. Б., Польщиков Г. Л. Получение, гипотермическое хранение, витрифи- и сверхбыстрое замораживание трофобластических везикул 32

инцев И. П., Тарасова О. Ф. Криоконсервирование бактерий рода *Hae- ius* 36

уль Т. Ф., Тымчук Н. Ф. Влияние низкотемпературных воздействий на есть и продуктивные свойства семян сои 42

МЕДИЦИНА

ец О. Д. Гистоэнзимологическое исследование иннервации кожи и регио- го лимфоузла при заживлении кожной раны, нанесенной в условиях общей кой пролонгированной гипотермии 46

ИКА 52

ИТА ДИССЕРТАЦИЙ

ститут проблем криобиологии и криомедицины АН Украины, роблемы криобиологии», 1992 г.

A. M. BELOUS

THE ROLE OF REGULATORY SYSTEMS MODULATING THE STATE OF CYTOSKELETON PROTEINS UNDER THE TEMPERATURE AND OSMOTIC EFFECTS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences, Kharkov

An attempt has been made to assess changes in some regulatory systems (ion transporters secondary messengers, ATP and biosensors) participating in the regulation of physicochemical state of cytoskeleton proteins in the cell upon coolind to 0 °C and under the effect of osmoticaly active compounds. The mechanisms of paricipation of the sytems in the modulation of the function of cytoskeleton and cytozol proteins remain uncelear, so some suggestions are of a discussion character.

А. М. БІЛОУС

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНИХ СИСТЕМ, КОТРІ МОДЕЛЮЮТЬ СТАН БІЛКІВ ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧНОМУ ВПЛИВІ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м. Харків

Зроблено спроби оцінити зміни деяких регуляторних систем (іонтранспортерів, вторинних месенджерів, АТФ та біосенсорів), які беруть участь в регуляції фізико-хімічного стану білків цитоскелета в клітині при її охолодженні до 0 °С та дії осмотично активних сполук. Механізми участі вказаних систем у модуляції функції білків цитоскелета і цитозоля залишаються переважно не з'ясованими, тому ряд положень у статті носить теоретичний, постановчий характер.

УДК 57.043

В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко, С. В. Руденко

ЭФФЕКТЫ ДЕГИДРАТАЦИИ В КОНТРОЛЕ ХОЛОДОВОЙ И ОСМОТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК

Обзорная статья, в которой обсуждается проблема холодовой и осмотической чувствительности клеток, связанная с гелевой природой их цитоскелета. В качестве первичного фактора при холодовом и осмотическом повреждении рассматривается дегидратация. Делается вывод о том, что универсальный подход к обеспечению криоустойчивости клеток заключается в обеспечении условий, при которых клетка обладает максимальной стабильностью при осмотической дегидратации. При этом дегидратация клеток является фактором, управляющим состоянием цитоскелета. Гелевая природа цитоскелета ставит на первый план такие факторы, как осмотическое давление, ионная сила, *pH* и температура, являющиеся ключевыми для криобиологов. Делается вывод, что углубленный анализ криобиологических явлений требует новых подходов, для которых наиболее перспективными являются представления о живой клетке как системе, структура которой представляет собой гель.

Дегидратация как первичный фактор при холодовом и осмотическом воздействии. Многие годы исследователи, работающие в области криобиологии, основные усилия направляли на раскрытие механизмов того, что заключено в понятии «криоповреждение». За этим понятием скрывались представления о специфическом характере криоповреждений, т. е. о их непосредственной связи с процессами, развивающимися при замораживании. Однако в последние годы стало ясно, что специфический характер криоповреждений может являться таковым только в случае, когда повреждение вызывается собственно изменением температуры, а не действием сопутствующих факторов, таких как осмотическая дегидратация, высокая ионная сила, сдвиг pH и т. д. Это с очевидностью вытекает из того, что действие последней группы факторов может быть оценено в «модельных» экспериментах, которые легко осуществить при положительных температурах, когда отсутствует кристаллизация водной фазы [4].

Роль кристаллизации как фактора, способного непосредственно воздействовать на клетки, также могла бы рассматриваться как специфический элемент механизма криоповреждений, однако существующие данные по поводу влияния кристаллов льда на клетки чрезвычайно противоречивы, что не дает возможности однозначно высказаться не только по поводу специфичности, но и по поводу конкретной роли данного фактора. Из всего этого следует, что более адекватным для оценки криобиологических процессов является выяснение роли того или иного фактора по степени его вклада в общий уровень повреждений, а не по степени его специфичности.

Имеющиеся данные показывают, что повреждение клетки является, в первую очередь, следствием ее дегидратации и, во вторую, следствием такого фактора, как температурный сдвиг [1]. В простейшем случае это доказывается универсальностью такого феномена, как изотермический лизис клеток [11]. В то же время повреждение, связанное с температурным сдвигом, т. е. холодовой шок, является процессом, проявляющимся в достаточно узком диапазоне температур и осмолярности среды [1]. И как это ни парадоксально, в большей степени определяющимся тем, насколько клетка устойчива к действию неблагоприятных факторов в исходных условиях перед сдвигом температуры, а не тем, насколько глубоко развиваются в ней изменения при последующем сдвиге температуры. Именно поэтому холодовой шок «снимается» в условиях, когда на предварительном этапе осмотическое воздействие становится более интенсивным. В этом случае развивается изотермический лизис и последующее охлаждение уже не вносит какого-либо дополнительного вклада в общий уровень повреждения клеток [4]. Из всего этого следует один очень важный вывод, заключающийся в том, что универсальный подход к обеспечению криоустойчивости клеток должен заключаться в обеспечении условий, при которых клетка обладает максимальной стабильностью при осмотической дегидратации.

Решение этой задачи непосредственно связано с необходимостью раскрытия механизма повреждения клеток при дегидратации, а также с выявлением исходных условий, обеспечивающих высокую устойчивость клеток к осмотическим воздействиям. При этом под осмотическим воздействием мы должны понимать такие значения осмолярности (тоничности) среды, при которых развивается изотермический лизис клеток («диапазон изотермического лизиса»). Например, в случае эритроцитов человека это соответствует значению тоничности растворов хлористого натрия выше 2,7 М [1]. С учетом этого в качестве условного содержания понятия «исходные условия» мы можем принять значения осмолярности в интервале от физиологических до 2,7 М («диапазон исходных условий»). Подобное деление является условным в том плане, что изотермический лизис клеток зависит не только от осмолярности среды, в которую попадает клетка, но и от таких факторов, как продолжительность пребывания клеток в этой среде, состав среды, температура, pH и т. д. В зависимости от комбинации условий и типа клеток диапазон исходных условий, в пределах которого не развиваются изотермические повреждения, может существенно сужаться и в ряде случаев лишь незначительно отклоняться от физиологических параметров [2]. К этому следует добавить еще один важный момент — изменение осмолярности в пределах исходного диапазона сопровождается дискретными переходами состояния клеток. Это позволяет говорить о том, что клетка в зависимости от исходных условий может последовательно переходить в состояния, которые резко отличаются от физиологической нормы по чувствительности к последующим изменениям параметров окружающей среды в широком диапазоне [1]. Следовательно, можно говорить о возможности направленного контроля и управления холодовой и осмотической чувствительностью клеток.

Влияние дегидратации на клетки. Главным следствием осмотической

клеток. В результате возникает проблема организации избыточной поверхности в новую макроскопическую структуру, которая отличается от исходной как по своей пространственной организации, так и по характеру взаимодействия с цитоскелетом. Например, в гипертонических средах на мембране клеток *Hela* наблюдается образование многочисленных складок, и в этом случае поверхностная площадь при изменении объема на 47—50 % возрастает в 2,59 раза [5]. В умеренно гипертонических средах эритроциты кренируют, а при более высоких значениях тоничности (0,7 М и выше) — трансформируются в плоские уплощенные формы, отличающиеся низкой устойчивостью к сдвиговому воздействию [1]. Важно отметить, что указанная граница тоничности представляет собой критическую область, при переходе через которую эритроциты теряют способности неидеально отвечать на изменения осмолярности среды и ведут себя как идеальные осмометры [13]. Это указывает на наличие в этих клетках «структурного» механизма, регулирующего осмотическое поведение. При переходе через критическую область осмолярности происходит нарушение механизма регуляции, и клетки теряют способность сопротивляться изменениям осмотических условий [13]. В то же время храмофинные гранулы в интервале осмолярности 300—1000 мОсм ведут себя как идеальные осмометры, что указывает на их пассивное поведение в этих условиях по сравнению с такими клетками, как эритроциты [14]

Реакция клеток на обезвоживание зависит от скорости, с которой изменяется осмолярность среды. При быстром изменении осмолярности можно говорить о гиперосмотическом шоке, степень проявления которого зависит от реакции цитоплазматических элементов и, прежде всего, компонентов цитоскелета. При быстром осмотическом сжатии клетки *Hela* не проявляют упругих свойств, и результатом такого воздействия является формирование эндоцитирующих вакуолей [5]. Быстрая скорость оттока воды при осмотическом шоке неизбежно ставит клетку в условия, когда в ней возникает сильное отрицательное давление, которое нельзя сравнить с эффектами гидростатического давления, прикладываемого снаружи, т. е. сильным положительным давлением. При этом важно отметить, что при осмотическом шоке вода удаляется посредством осмоса, а не выдавливается посредством «самокомпрессии» цитоплазмы. Следствием этого является дегидратация цитоплазматического геля, которая способна привести к коллапсу цитоплазмы. Такое состояние характеризуется появлением отчетливых границ в некоторых областях клетки, например в зоне исключения цитоплазмы вокруг микротрубочек или в непосредственной близости к периферии клетки [5].

Последнее позволяет говорить о том, что коллапс связан с фазовым разделением цитоплазматического геля, и этот процесс затрагивает как элементы цитоскелета, так и области, в которых цитоскелет взаимодействует с мембраной. Кренирование эритроцитов также сопровождается частичным откреплением цитоскелета от мембраны [19], поэтому можно говорить, что изменение поверхностно-объемного отношения, которое сопровождается формированием складок и спикул, способно привести к частичному откреплению белкового скелета от мембраны. На роли этого фактора мы остановимся ниже, добавив к сказанному только то, что во всех случаях осмотическая дегидратация приводит к возрастанию концентрации цитоплазматических компонентов в объеме внутриклеточного растворителя, что, в свою очередь, приводит к изменению числа и функциональности связей между ними. Дополнительным следствием таких изменений является изменение ионной силы внутриклеточной среды.

В ядерных клетках изменения, связанные с дегидратацией, наиболее отчетливо проявляются в модификации дисперсного состояния хроматина [5, 10]. При низкой ионной силе происходит частичное ослабление внутринуклеосомных связей, что проявляется в диспергировании хроматина, в то время как при высокой ионной силе наблюдается агре-

гация нуклеосом [10]. В гипертонических растворах наблюдается также резкое возрастание ригидности веретенных нитей в клетках, подвергающихся митозу [5]. В целом для описываемых условий характерно то, что хроматин становится более конденсированным и представлен в виде больших масс, преимущественно локализованных вблизи ядрышек и ядерной мембраны [10].

Более сложными являются процессы, связанные с модификацией цитоскелета. Наиболее впечатляющий пример таких изменений — лиганд-независимый кэппинг лимфоцитов [28]. При инкубации этих клеток в среде, содержащей удвоенную изотоническую концентрацию хлористого натрия, наблюдается образование кэпов из наиболее подвижных поверхностных рецепторов без добавления лигандов [28]. Наиболее интенсивное перераспределение рецепторов происходит в средах с осмолярностью 500—600 мОсм [28]. В основе механизма образования кэпов при инкубации лимфоцитов в гипертонических средах лежат процессы, включающие трансформацию кортикальных цитоплазматических структур. Такая трансформация может быть следствием концентрирования элементов этих структур при дегидратации клеток, а также повышения ионной силы среды [28]. Само лиганд-независимое образование кэпов в гипертонической среде является следствием обратимого взаимодействия между поверхностными рецепторами и активируемой контрактильной системой клеток, включающих актин [28]. Наиболее простое объяснение этого явления может заключаться в устранении ограничений, накладываемых электростатическим отталкиванием между элементами контрактильной системы и поверхностными рецепторами при повышении ионной силы. Однако процесс образования кэпов сопровождается аккумуляцией микровиллей в районе локализации кэпов, что указывает на более сложный механизм, в основе которого могут лежать эффекты исключенного объема [15]. Описанные динамические изменения, развивающиеся в умеренно гипертонических средах, являются обратимыми, что указывает на преимущественную модификацию состояния связей между отдельными компонентами цитоскелета, а также с плазматической мембраной. В этом случае модификация самих элементов цитоскелета отсутствует.

Развитие изотермического лизиса, в свою очередь, связано с нарушением функции мембраны как барьера, отделяющего внутреннюю среду от наружной. Сейчас становится понятным, что первичное звено этого процесса не связано с изменениями собственно мембраны, а отражает изменения упругих элементов цитоскелета, противостоящих осмотической дегидратации. Доказано, что клетки млекопитающих могут обратимо терять до 50 % внутриклеточной воды и сохранять свою жизнеспособность [5]. Именно это количество воды можно считать пределом относительно безвредной («объемной») дегидратации, за которой следует «структурная» дегидратация, охватывающая сложноорганизованные цитоплазматические элементы клеток. Именно «структурная» дегидратация может быть связана с механизмами изотермического лизиса клеток. Глубина такой «структурной» дегидратации может быть весьма значительной. В среде Игла, содержащей 4 М NaCl, клетки *Hela* достигают минимального объема — примерно 25,5 % от исходного, что соответствует примерно 8% лабильной клеточной воды или 5,6 % общей клеточной массы [5]. В таких условиях резко изменяется соотношение между объемом, занимаемым внутриклеточными компонентами, и объемом внутриклеточной воды. В результате упругие элементы цитоскелета испытывают значительную механическую нагрузку и в них возникают упругие деформации. Именно этот фактор является причиной метастабильности клеток в начальной фазе реакции на сильный осмотический стресс. Ниже мы покажем, что подобное метастабильное состояние важно не само по себе, а как фактор, определяющий направленность последующих изменений состояния цитоскелета.

Реакции на уровне цитоскелета. В макроскопическом плане цито-

ций цитоплазматические белки, ведущую роль в котором играет актин [7]. При включении в цитоскелет эффективная концентрация белков резко возрастает, в результате чего в стабилизации скелета ключевую роль приобретают слабые взаимодействия. Особенностью слабых взаимодействий является то, что их сродство друг к другу характеризуется высокой чувствительностью к микроокружению [12]. Помимо этого, компоненты, контактирующие друг с другом в участках с умеренным сродством, способны легко диссоциировать при сдвиговом стрессе [12].

В целом устойчивость цитоскелета обусловлена высокой плотностью связей между основными белками, формирующими его структуру. Из этого следует, что дегидратация клеток является фактором, управляющим состоянием цитоскелета, так как в этом случае изменяется концентрация белков в объеме растворителя и соответственно плотность связей между компонентами скелета. Более сложным является биохимический уровень регуляции, включающий индукцию появления обратимых сшивок между белками. В этом случае уровень межмолекулярных сшивок может контролироваться такими процессами, как фосфорилирование, окисление, метилирование, глутаминирование, трансглутаминирование, а также связывание ионов и метаболитов с каким-либо из компонентов скелета [12]. Понятно, что в зависимости от исходных условий, в которых находится клетка, роль биохимических факторов в контроле цитоскелета может существенно возрастать. Подобные биохимические изменения являются предметом отдельного обсуждения, и в данном случае мы на них останавливаться не будем.

Значение факторов, способных модифицировать состояние белкового скелета, наиболее удобно обсуждать с привлечением данных, полученных на эритроцитах. Цитоскелет эритроцитов — это двумерная сеть, в которой элементы ячейки состоят из спектрина, а точки ветвления сформированы из актина и белка 4.1 [20]. В клетке спектрин, по-видимому, может существовать в виде олигомерных островов с широким распределением по размерам [20]. Полимерный актин может играть определенную роль в связывании островов, но не в формировании их каркаса. В наиболее низком энергетическом состоянии спектриновая сеть, по-видимому, существует в свернутой спиралевидной или какой-нибудь другой форме. Подобное «промежуточное» состояние сети контролируется ее взаимодействием с мембраной, что делает скелет-мембранные взаимодействия одним из ключевых факторов, контролирующих стабильность скелета. Действительно, при устранении контактов скелета с мембраной он сокращается до 1/4 от его исходной площади [23]. Конденсация цитоскелета при его откреплении от мембраны устраняет пространственные ограничения, что делает возможным кооперативное кластерирование молекул спектрина в узлах ветвления за счет других точек. Это означает, что средняя функциональность узла равная 5—6 в этих условиях может резко возрастать.

С учетом этого можно выделить 2 группы факторов, направленность действия которых на характер ассоциации белкового скелета с мембраной в условиях дегидратации является противоположной. Первая группа связана с изменением ионной силы внутриклеточной среды. Действительно, стабильность пространственной структуры периферической белковой решетки эритроцитов контролируется таким фактором, как отталкивание отрицательно заряженных групп молекул спектрина [24]. Соответственно повышение ионной силы внутриклеточного раствора должно привести по крайней мере к двум следствиям: а — уменьшению поверхностной площади белкового скелета; б — усилению взаимодействия скелета с мембраной. При высокой ионной силе, когда возрастает экранировка заряда, усиление взаимодействий скелета с мембраной может рассматриваться как фактор, при котором мембрана оказывает стабилизирующее действие на скелет. Такая стабилизация может быть обусловлена как взаимодействием компонентов скелета с цитоплазматическими сегмента-

ми мембранных белков, так и взаимодействием с фосфолипидами, локализованными у внутренней поверхности мембраны [17]. Таким образом, возрастание ионной силы внутриклеточной среды при дегидратации является фактором, направленным на усиление взаимодействия между элементами цитоскелета и самого скелета с мембраной.

Противоположная направленность характерна для факторов, связанных с объемными изменениями клеток и цитоскелета. Объем изолированного белкового скелета изменяется обратно пропорционально изменению ионной силы, т. е. степени экранировки заряженных групп спектрина [18]. Это означает, что при повышении ионной силы тенденция к уменьшению объема цитоскелета опережает таковую в случае изменения объема самой клетки. Фактором, ограничивающим значительные объемные изменения скелета, является его ассоциация с мембраной. Именно эта особенность лежит в основе такого процесса, как эхиноцитоз в гипертонических средах [21]. Следовательно, можно говорить о структурных ограничениях, связанных с внутренними свойствами скелета, направленных против усиления его взаимодействия с мембраной. Другая группа факторов, направленных против усиления таких взаимодействий, связана с геометрическими ограничениями, в основе которых лежит изменение поверхностно-объемного отношения при дегидратации (точнее поверхностной площади мембраны к площади скелета). В процессе эхиноцитоза, когда поверхностно-объемное отношение возрастает и формируются спикулы, возникают геометрические ограничения на взаимодействие скелета с мембраной в области спикул, и скелет частично открепляется от нее [19]. Это позволяет говорить о радикальных различиях между состоянием «гладких» клеток, в которых геометрические ограничения отсутствуют, и кренированных клеток, т. е. клеток со складками и выступами на поверхности, в которых такие ограничения могут играть существенную роль. Нарушения взаимодействий скелета с мембраной в этих областях позволяет говорить о локальных зонах модификации мембраны, в которых могут инициироваться процессы, нарушающие барьерную функцию. Значение геометрических ограничений на взаимодействие скелета с мембраной может возрастать при быстрой дегидратации («объемный сдвиг»), когда исходный объем клеток близок к изотоническому [3]. В этом случае клетки находятся в состоянии временной неустойчивости, что приводит к их лизису.

Дополнительное усложнение, цитоскелет — это гель. При включении в эритроцитарный скелет концентрация спектрина возрастает в 100 раз, и организованная структура скелета контролируется отталкиванием отрицательно заряженных групп молекул спектрина [12]. Из этого следует, что периферический белковый скелет должен вести себя как периодическая коллоидная система. Заряженный белковый слой у поверхности эритроцита имеет тиксотропные и вязкоупругие свойства, характерные для сильно заряженных мономерных коллоидных дисперсий [24]. В противоположность большинству синтетических эластомеров скелетная сеть эритроцитов зависит прежде всего от нековалентных связей, поэтому средняя по времени топология спектриновой сети определяется условиями окружающей среды. Именно гелевая природа цитоскелета ставит на первый план факторы, ключевые для криобиологических систем, такие как осмотическое давление, ионная сила, pH и температура.

В условиях, когда в геле отсутствуют значительные межмолекулярные взаимодействия, упругая свободная энергия геля имеет чисто энтропийную основу и иногда определяется как «резиновая» упругость [24]. По-видимому, нет принципиальных различий в поведении двумерного ионного белкового геля, каковым является скелет эритроцитов, и поведением трехмерных гелей. Терминологически это проявляется в том, что осмотическое поверхностное натяжение ионного двумерного белкового геля аналогично осмотическому давлению трехмерного геля [24]. Соответственно повышение ионной силы или снижение pH в сторону изоэлектрической точки спектрина способно обусловить возрастание отри-

это проявится в кренировании эритроцитов, а в структурном — в изменении характера ассоциации геля с мембраной. Зависимость состояния геля от перечисленных выше факторов чрезвычайно высока и это проявляется в существовании в гелевых структурах критических явлений и фазовых переходов [27]. Известный пример таких процессов — поведение ионных полиакриламидных гелей [27]. Считается, что фазовый переход и критические явления — внутренние свойства гелей [27]. В процессе модификации плотность распределения геля может изменяться от однородной до неоднородной [24]. При этом важно отметить, что фазовое разделение ионного геля не может иметь место без определенной сдвиговой деформации, обусловленной топологическими ограничениями, накладываемыми на гель [24]. В клетке такие ограничения могут быть связаны прежде всего с плазматической мембраной, а также с внутренним несжимающимся ядром, представленным гемоглобином, хроматином и т. д. В этом случае можно говорить о реализации принципа «молота и наковальни», когда молотом является плазматическая мембрана, оказывающая механическое воздействие на белковый гель, а наковальней — несжимающееся белковое ядро.

В условиях фазового разделения двумерный гель сохраняет свою топологию, но разделяется на две фазы, одна из которых является более плотной и в виде островков распределена более или менее однородно в менее плотной фазе [24]. Это означает, что в отдельных областях мембраны ослабляется поддерживающее действие скелета и эти зоны можно рассматривать как потенциальные зоны нестабильности. Из этих рассуждений следует также, что в условиях «структурной» дегидратации, когда мембрана оказывает механическое воздействие на упругие элементы геля, создаются условия для его сдвиговой деформации, следствием чего может стать фазовое разделение. Последняя фаза процесса зависит от целого ряда факторов, так как напряжение, которое необходимо для того, чтобы изотропно сжать ионный гель, не только зависит от энтропии молекул, формирующих его, но также от таких факторов, как величина внутри- и межмолекулярных взаимодействий геля и степень ионизации его цепей [24, 27]. Следует отметить, что осмотическая дегидратация может являться фактором, накладывающим диффузионные ограничения на реорганизацию компонентов геля.

Факторы, связанные с гелевой природой цитоскелета, влияние осмотического давления, сдвига и температуры. Свойства биологических гелей являются отражением поведения в растворе такого белка, как актин [9, 25]. Филаменты актина являются обычными для периферии немышечных клеток, где они объединены в различные структуры. Цитоскелетная сеть, включающая актин, близка по своим свойствам к другим полимерным системам, для которых характерно наличие определенных механических свойств, связанных с действием на эти системы физических сил. Механические свойства полимерных сетей зависят от длины, концентрации и количества сшивок между молекулами полимера [8]. В ответ на приложенный осмотический стресс полимерные сети могут сокращаться или набухать. Гели меняют свой объем в ответ на разницу осмотического давления между внутренним объемом геля и наружной средой. *F*-актин неидеально отвечает на приложенный осмотический стресс и его ответ зависит от концентрации и длины филаментов, что, по-видимому, определяется упругими свойствами филаментов [16]. Очищенный филаментный, но не мономерный актин способен проявлять концентрационно-зависимый упругий ответ на приложенные осмотические силы [16]. Для упругого сопротивления характерно наличие критической концентрации и зависимого от осмотического стресса поведения, указывающего на фазовые переходы [16]. Именно это свойство можно считать ключевым при оценке поведения биологических гелей в условиях, когда на них действуют факторы, представляющие интерес для криобиологов — осмотическое давление, сдвиг и изменение температуры.

Осмотический стресс, действующий на отделенную мембраной полимерную систему из *F*-актина, представляет собой термодинамическую движущую силу, которая вызывает поток воды, направленный из внутренней среды в наружную. Подобный процесс можно считать определяющим в фазе «структурной» дегидратации, когда в ответ на приложенный осмотический стресс модифицируется пространственная структура белкового геля. Как показано в [16], скорость объемного потока воды при дегидратации геля возрастает при низких значениях осмотического стресса и снижается при высоких значениях. Эта особенность, по-видимому, отражает увеличение концентрации белка в объеме растворителя, возможно, небольшое, но конечное, когда концентрация белка достигает критической точки [16].

Уменьшение объемного потока при дегидратации обусловлено упругим ответом филаментов на приложенный осмотический стресс [16, 26]. Осмотический стресс деформирует филаменты, образующие гель, тем самым индуцируя упругое давление, противостоящее приложенному осмотическому давлению [16, 26]. При этом совершается осмотическая работа, которая, с одной стороны, удаляет воду через мембрану, а с другой, сжимает филаменты. Таким образом, в описываемых условиях реализуются два процесса: а — дегидратация; б — упругая деформация филаментов. Именно этот двойственный характер влияния осмотического стресса на биологические гели позволяет считать, что фундаментальной основой механизма криоповреждения является сопряжение между упругостью белковых филаментов и приложенным осмотическим стрессом — *осмоупругое сопряжение* [26]. Феномен осмоупругого сопряжения позволяет также подойти к раскрытию механизма метастабильности клеток, в частности, в условиях их сенсибилизации к холодовому шоку.

Действительно, в условиях гипертонической инкубации клеток, когда индуцируется объемный поток воды через мембрану, часть энергии диссипирует вследствие фрикционных взаимодействий между молекулами воды и мембраной, в то время как остающаяся часть хранится в виде свободной энергии деформации филаментов, что в свою очередь продуцирует упругое давление цитоплазматического геля. Упругое давление снижает разницу химического потенциала между внутренней и наружной средой, тем самым уменьшая движущую силу и потенциал для объемного потока [16]. Однако для этих условий характерна одна важная особенность, заключающаяся в том, что упругое давление актинового геля прямо пропорционально приложенному стрессу. Это означает, что при действии осмотического стресса увеличивается химический потенциал филаментов актина. Подобное повышение химического потенциала актиновых филаментов прогрессивно создает все более нестабильную ситуацию, и выше критического уровня стресса система, сформированная из изотропно распределенных филаментов, может разделиться на разбавленную изотропную фазу и концентрированную анизотропную фазу [16, 26]. В последнем случае филаменты меньше окружены растворителем и они формируют пучки из параллельно уложенных филаментов, близких по своей структуре к кристаллам [26]. Таким образом, метастабильность можно определить как состояние, при котором имеет место полная элиминация объемного потока воды при действии осмотического стресса, диффузия филаментов ингибируется и они остаются сжатыми осмотическим стрессом. В этом случае нет диссипации энергии объемного потока, а имеет место резкое возрастание упругого давления геля [16, 26].

Если анализировать ситуацию применительно к холодовому шоку, остается неясным механизм, вызывающий срыв метастабильности. В данном контексте необходимо отметить одну важную особенность, а именно то, что в случае белковых гелей имеет место гораздо более высокая устойчивость к изотропному изменению объема, чем к изменению оси филаментов под влиянием сдвиговых сил [16]. Иными словами, доста-

стресса резко изменилась и в системе произошел переход от изотропного к анизотропному распределению. Подобное изменение ориентации может происходить при охлаждении клеток.

То, что осмотическая стабильность актиновых гелей определяется их внутренней структурой, доказывается способностью актин-связывающего белка из макрофагов резко увеличивать осмотическое сопротивление геля [16]. Следует отметить, что свойства биологических гелей позволяют по-новому взглянуть на проблему анабиоза, по крайней мере, в структурном плане. Результаты, полученные на системах, сформированных из *F*-актина, показывают, что актиновая сеть может также характеризоваться как система из взаимнонепроникающих стержней [6]. В противоположность гибким цепям стержни проявляют скорее энтальпийный, чем энтропийный ответ как на механический, так и осмотический стресс без значительных изменений объема [16]. С учетом этого в условиях дегидратации, когда возрастает концентрация белка в объеме растворителя, феномен, который обычно определяется как гелеобразование (истинное затвердевание), можно рассматривать как стеклование (жидкость со свойствами твердого тела) или как стеклопереход [6]. Подобный стеклопереход может быть отражением нового устойчивого состояния, обеспечивающего длительное сохранение постоянства структуры. В структурном плане это означает приближение к принципу естественной «витрификации» без включения каких-либо экзогенных факторов, таких как криопротекторы в высоких концентрациях.

Свойства биологических гелей позволяют подойти также к пониманию того, что скрывается за терминами «температурный» или «осмотический» шок. Само понятие «шок» означает зависимость глубины изменения состояния клетки от скорости, с которой изменяются условия, в которых находится клетка. Подобная связь является относительной, так как многие данные указывают на то, что как температурный, так и осмотический шок развиваются при некоторых промежуточных скоростях, соизмеримых со скоростями, с которыми могут реорганизовываться множественные связи в пределах цитоплазматического геля. Механические свойства и стабильность биологических гелей зависят от скорости, с которой на них оказывается воздействие, в частности, от скорости деформации. Это хорошо иллюстрируется данными, полученными на системе, сформированной из актина и актин-сшивающего белка (функционально аналогичному спектрину из эритроцитов), α-актинина из *Acantamoeba* [22]. Такая система является хорошей моделью скелетного кортекса и при быстрой деформации она проявляет ригидность в 40 раз более высокую, чем в случае медленной деформации [22].

Зависимость от скорости деформации можно объяснить наличием в скелетном кортексе множественных быстро реорганизующих сшивок, которые формируются между филаментами актина и сшивающим белком α-актинином. Кортекс может упруго восстанавливаться после быстрых кратковременных воздействий и деформироваться при долговременных воздействиях [22]. Такая же закономерность наблюдается в системе, включающей актин из мышц кролика и α-актинин, в которой динамическая упругость и динамическая вязкость в несколько раз возрастает при быстрой деформации [22].

Таким образом, при повышении скорости деформации гелевые системы ведут себя как твердое тело, а при низкой скорости — как жидкое. Подобное свойство определяется тем, что в равновесии актин-сшивающие белки связываются и диссоциируют с филаментами актина быстро. Быстрота, с которой достигается равновесие при связывании α-актинина с филаментами актина, означает, что сшивки между филаментами могут быстро реорганизовываться при воздействии на гель и с учетом наличия множественных сшивок это объясняет, почему механические

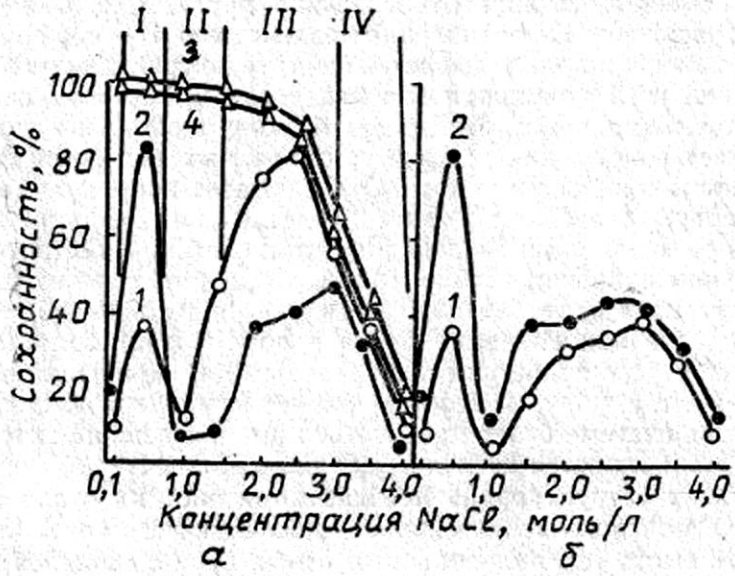
свойства геля зависят от скорости деформации [22]. Подобная закономерность очевидно характерна для любого типа актин-сшивающих белков, например спектрина и белка 4.1 в скелете эритроцитов. Когда силы прикладываются медленно, как показано в [22], сшивки α-актинина реорганизуются быстрее по сравнению со скоростью, с которой филаменты α-актинина смещаются друг относительно друга, т. е. они оказывают очень незначительное сопротивление воздействию или вообще не оказывают его. Когда сила прикладывается быстрее по сравнению со скоростью реорганизации всей популяции сшивок, тогда физическая связь между филаментами сохраняется, что делает белковую сеть ригидной [22].

Возникает вопрос, как каждое из описанных состояний согласуется со стабильностью клетки в целом? Ответ на этот вопрос может быть получен, в первую очередь, с учетом представлений об осмоупругом сопряжении при осмотической дегидратации клеток. Действительно, при промежуточном значении дегидратации, когда имеет место «объемная», а не «структурная» дегидратация, формируется стабильный гель (вследствие повышения концентрации белка в объеме растворителя), однако осмотический стресс является недостаточным для появления в нем упругого давления, т. е. упругой деформации его компонентов. В этом случае устойчивость в системе будет повышаться при повышении скорости, с которой на нее оказывается последующее воздействие.

В условиях «структурной» дегидратации система становится метастабильной и при повышении скорости последующего воздействия в ней может иметь место генерализованный ответ, проявляющийся в фазовом разделении, а не в реорганизации множественных сшивок с сохранением изотропного распределения компонентов. Из этого следует, что во всех случаях в основе чувствительности клеток к холодовому или осмотическому шоку лежит исходная метастабильность. Тот факт, что поведение гелей в зависимости от скорости воздействия контролируется реорганизацией сшивок между белками, позволяет сделать вывод о значительном влиянии такого параметра, как температура на свойства и стабильность гелей. Это доказывается тем, что скорость ассоциации и диссоциации в системе, сформированной из актина и α-актинина, является функцией температуры, и скорость реорганизации сшивок с температурой возрастает [22]. Последнее объясняет, почему ригидность смешанного геля при повышении температуры снижается. Следовательно, смесь из F-актина и актин-сшивающих белков может быть как ригидной, так и деформируемой в зависимости от скорости деформации без специфической регуляции этого процесса посредством инактивации сшивок, фрагментации или деполимерации филаментов [22]. При этом дополнительным регулирующим параметром является температура.

Значение комбинирования факторов среды в контроле осмотической и холодовой чувствительности клеток хорошо иллюстрируется данными, представленными на рисунке. Видно, что в интервале исходной осмолярности среды, когда имеет место объемная, а не структурная дегидратация (500—800 мОсм) клетки характеризуются высокой устойчивостью к переносу в сильно гипертонический раствор (4M NaCl) и охлаждению. В условиях, когда имеет место структурная дегидратация (при более высоких значениях осмолярности), наблюдается минимум устойчивости, а также переход в метастабильное состояние, срыв которого происходит при сдвиге температуры. При этом следует отметить, что клетки обладают максимальный холодовой и осмотической устойчивостью в условиях, когда исходная дегидратация (т. е. формирование геля) комбинируется с инкубацией при низкой температуре (рис.). Наличие второго максимума устойчивости при высокой осмолярности среды может объясняться диффузионными ограничениями, накладываемыми на пространственную реорганизацию компонентов геля при действии сильного осмотического стресса.

буют новых подходов, для которых наиболее перспективным является представление о живой клетке как системе, структура которой представляет собой гель. Именно гели являются наиболее чувствительными к изменениям параметров среды, являющихся ключевыми для криобиологи-



Влияние начальных осмотических и температурных условий на устойчивость эритроцитов к переносу в 4,0 М NaCl (*а*), а также к охлаждению в цикле 37—0 и 0—37—0° С (*б*); *а*: *1* — инкубация при 37 °С в присутствии 0,15—4,0 М NaCl с последующим доведением тоничности до 4,0 М NaCl, *2* — то же, но при 0 °С, *3* — инкубация при 37 °С без доведения тоничности среды, *4* — то же, но при 0 °С; *б*: *1* — инкубация при 37 °С с последующим доведением тоничности при той же температуре до 4,0 М NaCl и охлаждением до 0 °С, *2* — инкубация и доведение тоничности при 0 °С с последующим сдвигом температуры в цикле 0—37—0 °С. I — зона стабильности, II — зона нестабильности, III — зона метастабильности, IV — зона изотермического лизиса

ческих систем — осмотического давления, ионной силы и температуры. Связь между осмотической дегидратацией геля и индукцией упругой деформации формирующих его компонентов (осмоупругое сопряжение) позволяет более адекватно оценивать феномен метастабильности клеток, а также раскрыть значение эффектов дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бондаренко В. А.* Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Дисс. ... д-ра биол. наук,— Харьков, 1989,— 446 с.
2. *Песина Н. И., Бондаренко В. А.* Осмолярность среды и продолжительность инкубации как два независимых фактора, контролирующих чувствительность эритроцитов к охлаждению в средах, содержащих неэлектролит // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем.— Харьков: Б. И., 1989.— С. 19—26.
3. *Поздняков В. В., Бондаренко В. А.* Объемный сдвиг как фактор, контролирующий осмотическую устойчивость эритроцитов в растворах низкомолекулярных криопротекторов // Физико-химическое и биологическое действие криопротекторов.— Киев: Наук. думка, 1990.— С. 115—123.
4. *Поздняков В. В., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А.* Осмолярность среды как принцип устойчивости к замораживанию // Физико-химическое и биологическое действие криопротекторов.— Киев: Наук. думка, 1990.— С. 124—130.
5. *Albrecht-Buchler G., Bushnell A.* Reversible compression of cytoplasm // Exp. Cell. Res.— 1982.— **140**, N 2.— P, 173—189.
6. *Buxbaum R. E., Dennerll T., Weiss C. S.* F-actin and microtubule suspensions as inderminate fluids // Science.— 1987.— 235, N 4795.— P. 1571—1574.
7. *Carlier W. F.* Actin-protein structure and filament dynamics // J. Biol Chem.— 1991.— **266**, N 1. — P. 1—5.
8. *Clark A. H., Ross-Murphy S. B.* Structural and mechanical properties of biopolymer gels // Biopolymers.— 1987.— P. 57—192.

9. *Cortese J. D., Schwub B., Frieden C., Elson E. L.* Aktin polymerization induces a sharp change in actin-containing vesicles // Proc.Nat, Acad. Sci. Usa.— 1989.— **86**, N 15.—P. 5773—5777.
10. *Delpire E., Duchene C., Goessens G., Gilles R.* Effects of osmotic shock on the ultrastructure of different tissues and cell types // Exp. Cell. Res.— 1985.—**160**, N 1.— P. 106—116.
11. *Griffith A.* Effect of hypertonic stress on mammalian cell lines and its relevance of freeze injury // Cryobiology.— 1978. — **15**, N 5.—P. 517—530.
12. *Haest C. W. M.* Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic membrane domains // Biochim. Biophys. Acta.— 1982.— N 4.—P. 331—352.
13. *Heunbush P., Jung C. Y., Green F. A.* The osmotic response of human erythrocytes and the membrane cytoskeleton // J. Cell. Physiol.— 1985.— **122**, N 2.— P. 206—213.
14. *Holz R. W.* The role of osmotic forces in exocytosis from adrenal chromaffin cells // Ann. Rev. Physiol.— 1986.—48.— P. 175—189.
15. *Horowitz S. B., Daine P. L.* Cytoplasmic exclusion as a basis for asymmetric nucleocytoplasmic solute distributions // Nature.— 1976.— **260**, N 5547.— P. 151—153.
16. *Ito T., Zaner K. S., Stossel T. P.* Nonideality of volume flows and phase transitions of F-actin solutions in response to osmotic stress // Biophys. J.—1 987.— **37**, N 5.— P. 745—755.
17. *Lange Y., Gough A., Steck T. E.* Role of the bilayer in the shape of the isolated eryhtrocyte membrane // J. Membrane Biol.— 1982.— **69**, N 2.— P. 113—124.
18. *Lange Y., Hadesman R. A , Steck T. E.* Role of the reticulus in the stability and shape of the isolated human erythrocyte membrane // J. Cell. Biol.— 1982.— **92**, N 3.—P. 714—722.
19. *Line S. C., Derick L. H., Duquette M. A., Palek J.* Separation of the lipid bilayer from the membrane skeleton during discocyteechinocyte transformation of human erythrocyte ghosts //Eur. J. Cell. Biol.— 1989.— **49**, N 2.— P. 358—366.
20. *Marchesi V. T.* Stabilizing infrastructure of cell membranes // Ann. Rev. Cell. Biol.— 1985.— 1.— P. 531—559.
21. *Marikovsky Y., Khodadad J. K., Weinstain R. S.* Influence of red cell shape on surface cell topography // Exp. Cell. Res.— 1978.— **116**, N 1.— F. 191—199.
22. *Sato M., Schwarz W. H., Pollard T. D.* Dependence of mechanical properties of actin/L-actin gels on deformation rate // Nature.— 1987.— **325**, N 6107.—P. 827—831.
23. *Sheetz M. P.* Integral membrane protein interaction with triton cytoskeletons of erythrocytes // Biochem. Biophys. Acta.— 1979—**557**, № 1.— P. 122—134.
24. *Stokke B. T., Mikkelsen A., Elgsaeter A.* The human erythrocyte membrane skeleton maybe an ionic gel. 1. Membrane mechanochemical properties // Eur. Biophys. J.— 1986.— 13, N 4.—P. 203—219.
25. *Suzuki A., Mueda T., Ito T.* Formation of liquid crystalline phase of actin filament evolutions and its dependence on filament length as studied by optical birefringence // Biophys. J.— 1991.— **59**, N 1.— P. 25—31.
26. *Suzuki A., Yamazaki M., Ito T.* Osmoelastic coupling in biological structures: formation of parallel bundle of actin filaments in crystalline-like structures caused by osmotic stress // Biochemistry.— 1989.— **28**, N 15.— P. 6543—6547.
27. *Tanaka T., Sun S. T., Hirokava Y.* et. al. Mechanical instability of gels at the phase transition // Nature.— 1897.— 325, N 6107. — P. 796—798.
28. *Yahara Y., Kakimoto S.* Analysis of ligand-independent cap formation induced in hypertonic medium // Exp. Cell. Res..— 1979.— **119**, № 2.— P. 267—259.

Поступила 06.02.92

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины АН Украины, г. Харьков

V. A. BONDARENKO, Y. P. BONDARENKO, S. V. RUDENKO

DEHYDRATION EFFECTS IN CONTROLLING THE COLD AND OSMOTIC SENSITIVITY OF CELLS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences, Kharkov

A review is presented on the problem of cold and osmotic sensitivity of cells related to the gel nature of their cytoskeleton. Dehydration is considered as a primary factor of cold and osmotic injury. It has been concluded that the universal approach to provide the cold resistence of cells suqgests conditions of maximum stability of the cell under osmotic dehydration. Dehydration in this case is a factor controllirg the state of cytoskeleton. Taking into account the qel nature of cytoskeleton, such factors as osmotic pressure, ionic strength, pH and temperature are of primary importance. The conception of the living cell as a system whose structure is gel seems to be promising for a more comprehensive analysis of cryobiological phenomena.

В. А. БОНДАРЕНКО, Т. П. БОНДАРЕНКО, С. В. РУДЕНКО

ЕФЕКТИ ДЕГІДРАТАЦІЇ У КОНТРОЛІ ХОЛОДОВОЇ І ОСМОТИЧНОЇ ЧУТТЄВОСТІ КЛІТИН

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м. Харків

Оглядова стаття, у якій обговорюється проблема холодової і осмотичної чутливості клітин, яка пов'язана з гелевою природою їх цитоскелета. Як первинний фактор при холодовому і осмотичному пошкодженні розглядається дегідратація. Зроблено висновок про те, що універсальний підхід до забезпечення кріостійкості клітин полягає в забезпеченні умов, при яких клітина має максимальну стабільність при осмотичній дегідратації. При цьому дегідратація клітин є фактором, який керує станом цитоскелета. Гелева природа цитоскелета ставить на перший план такі фактори, як осмотичний тиск, іонсила, pH і температура, які є ключовими для кріобіологів. Зроблено висновок про те, що поглиблений аналіз кріобіологічних явищ вимагає нових підходів, для яких найперспективнішими є уявлення про живу клітину як систему, структурою якої є гель.

УДК 57.043:576.33.04

Л. Ф. Розанов, Е. И. Смольянинова

ОСМОТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ЯЙЦЕКЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ МЫШИ: РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТА

С помощью волюметрического метода проведено сравнительное изучение кинетики осмотического поведения яйцеклеток и эмбрионов мыши в растворах проникающих криопротекторов с различным содержанием внеклеточной соли. Особенности осмотического поведения клеток, трудно объяснимые с позиций мембранной теории, находят объяснение с точки зрения современных представлений о значении внутриклеточного матрикса в регуляции клеточного объема.

Анализ кинетики осмотических реакций позволяет криобиологам получать необходимую для прогнозирования оптимальных условий криоконсервирования информацию о коэффициентах проницаемости клеток для молекул воды и криопротекторов [10, 11]. Особенности кинетики, в частности достигаемый уровень обезвоживания, время нахождения клеток в обезвоженном состоянии до начала набухания и другие параметры дают полезную информацию для изучения механизмов разрушения клеток под действием осмотического фактора — одного из ведущих факторов криоповреждения [6, 12].

В основе анализа кинетики осмотических реакций лежит мембранная теория строения клеток [1], согласно которой поведение цитоплазмы описывается в приближении идеального раствора [10]. Тем не менее существует достаточно обширный экспериментальный материал, свидетельствующий как об отклонении осмотического поведения клеток от идеального [5, 7], так и о наличии у клеток выраженной внутренней структуры — цитоскелета [3, 9].

Исходя из предпосылки, что цитоскелет должен вносить коррекцию в прогнозируемые мембранной теорией осмотические реакции клеток на контакт со средами различного состава, проведены исследования, направленные на выявление особенностей предполагаемой коррекции цитоскелетом изменений объема яйцеклеток и эмбрионов мыши в растворах проникающих криопротекторов с различным содержанием непроникающей внеклеточной добавки (NaCl).

В работе использовались яйцеклетки и 2-клеточные эмбрионы мыши линии CBWa, полученные по стандартной методике [9]. Исследования проводились на интерференционно-поляризационном микроскопе МПИ-5 с криоприставкой [4]. Регистрация изучаемых процессов проводилась с помощью техники покадровой микрокиносъемки. Кинетику изменения клеточного объема в процессе эквилибрации клеток