

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

ШПАКОВА НАТАЛИЯ МИХАЙЛОВНА

УДК: 57.043:612.111:352.462

**ТЕМПЕРАТУРНАЯ И ОСМОТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ
ЭРИТРОЦИТОВ РАЗНЫХ ВИДОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.00.19 – криобиология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант

Бондаренко Валерий Антонович

доктор биологических наук, проф.

Харьков – 2014

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	20
1.1. Современные представления о структуре и динамических характеристиках эритроцита	20
1.2. Криоповреждение клеток: теории и гипотезы.....	42
1.3. Изменение температуры и осмоляльности среды как основные факторы повреждения эритроцитов при замораживании	52
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	64
2.1. Получение эритроцитов млекопитающих	64
2.2. Методы исследования.....	65
2.2.1. Методики модельных экспериментов по изучению влияния факторов криоповреждения на эритроциты млекопитающих.	65
2.2.2. Определение уровня и динамики гемолиза эритроцитов методом спектрофотометрии.	66
2.2.3. Метод определения гематокрита эритроцитов	67
2.2.4. Ионометрический метод определения ионов калия	68
2.2.5. Атомно-абсорбционной спектрофотометрия	68
2.2.6. Капиллярный электрофорез	69
2.2.7. Исследование состояния липидного бислоя и барьерной функции мембран эритроцитов методом ЭПР спектроскопии.....	69
2.2.8. Оценка нарушения асимметрии мембраны эритроцитов методом проточной цитофлуориметрии	70
2.2.9. Исследование морфологии эритроцитов методом световой микроскопии	71
2.2.10. Осмометрия.....	71
2.2.11. Рефрактометрический метод.....	72
2.2.12. Методика использования криопротекторов (полиэтиленоксид-1500 и глицерин) при гипертоническом шоке эритроцитов	72
2.2.13. Механический шок эритроцитов	73

2.2.14. Ферментативная обработка эритроцитов	73
2.2.15. Истощение эритроцитов по АТФ.....	74
2.2.16. Вычисление максимальной антигемолитической активности, размеров плато и эффективных концентраций амфифильных соединений.....	74
2.3. Статистический анализ данных.....	75
2.4. Реактивы	76
ГЛАВА 3. ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ШОК И ГИПОТОНИЧЕСКИЙ ЛИЗИС ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	78
Выводы.....	120
ГЛАВА 4. ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ КРИОГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. ОСОБЕННОСТИ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ.....	123
4.1. Гипертоничность среды как фактор, определяющий развитие гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих	123
4.2. Значение выхода ионов K^+ в развитии гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих	141
4.3. Температурные диапазоны гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих	146
4.4. Роль продолжительности инкубирования при 37°C в развитии гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих	152
4.5. Закономерности гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих	158
Выводы.....	162
ГЛАВА 5. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ГИПЕРТОНИЧЕСКОМ ШОКЕ И ГИПЕРТОНИЧЕСКОМ КРИОГЕМОЛИЗЕ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	165
5.1. Эффективность действия хлорпромазина на разных этапах гипертонического шока и гипертонического криогемолиза эритроцитов человека	166

5.2. Амфифилы и эритроциты млекопитающих в условиях гипертонического шока и гипертонического криогемолиза	175
5.3. Возможный механизм коррекции осмотической и температурной чувствительности эритроцитов с помощью амфифильных соединений ...	202
5.3.1. Оценка роли белковых компонентов мембраны в реализации антигемолитического эффекта трифторперазина.	202
5.3.2. Влияние хлорпромазина на распределение фосфатидилсерина в эритроцитарной мембране	207
5.3.3. Влияние амфифильных соединений разных классов на структурно-динамическое состояние мембран эритроцитов	212
5.3.4. Исследование состояния липидного бислоя и барьерных свойств мембран эритроцитов в присутствии хлорпромазина	216
5.3.5. Определение роли гидрофобности и внутримембранной концентрации алкил- β ,D-глюкопиранозидов в реализации их антигемолитической активности	232
Выводы.....	243
ГЛАВА 6. ИСХОДНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ КАК ФАКТОР, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ ШОКУ	247
6.1 Обезвоживание эритроцитов как фактор, определяющий последующую гипертоническую чувствительность клеток.....	248
6.2. Влияние криопротекторов и температуры на чувствительность эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку	272
Выводы.....	295
ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	297
ВЫВОДЫ.....	310
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	315
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	378

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГШ – гипертонический шок

ГК – гипертонический криогемолиз

ГЛ – гипотонический лизис

МСН – среднее содержание гемоглобина в эритроците

МСНС – средняя концентрация гемоглобина в эритроците

Нб – гемоглобин

d – диаметр

V – объем

S – площадь поверхности

ФЛ – фосфолипид

СМ – сфингомиелин

ФХ – фосфатидилхолин

ФИ – фосфатидилинозитол

ФС – фосфатидилсерин

ФЭА – фосфатидилэтаноламин

ФК – фосфатидная кислота

ХС – холестерин

ЛФХ – лизофосфатидилхолин

С10 – децилсульфат натрия

С12 – додецилсульфат натрия

ДМ – додецил- β ,D-мальтозид

ХПР – хлорпромазин гидрохлорид

ТФП – трифторперазин

ГГП – гексил- β ,D-глюкопиранозид

ОГП – октил- β ,D-глюкопиранозид

ДГП – децил- β ,D-глюкопиранозид

P_f – коэффициент осмотической водной проницаемости мембран

P_d – коэффициент диффузионной водной проницаемости мембран

$E_{a,d}$ – энергия активации

PCMBS– p-chloromercuribenzene sulfonate

АПК – амид пальмитиновой кислоты

5-ДС – 5-доксилстеариновая кислота

16-ДС – 16-доксилстеариновая кислота

ТЕМПОН – 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил

АГ – антигемолитическая активность

$АГ_{\text{макс}}$ – максимальная антигемолитическая активность

$C_{АГ\text{макс}}$ – эффективная концентрация

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

AQP – аквапорин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Современное состояние криобиологии характеризуется повышенным интересом к исследованию процессов, протекающих на разных этапах низкотемпературного консервирования биологических объектов [222, 362, 436, 509, 528]. Это обусловлено необходимостью разработки новых методов криоконсервирования на основе четкого понимания механизмов криоповреждения и криозащиты в отличие от эмпирического подбора сред и условий замораживания-отогрева биологического объекта. Поэтому изучение механизмов криоповреждения и криозащиты является одной из актуальных проблем современной криобиологии.

Несмотря на значительные достижения в изучении причин криоповреждения [304, 473], вопрос о ведущих факторах, влияющих на жизнеспособность замороженного биологического материала, остается недостаточно изученным. Это обусловлено тем, что различные процессы происходят фактически одновременно в замораживаемом биологическом материале, и достаточно сложно в реальных условиях исключить действие каких-либо факторов криоповреждения с целью изучения действия других экстремальных факторов. До сих пор установленные причины и факторы повреждения клеток при низкотемпературном консервировании все еще остаются предметом дискуссий [433, 435].

Многие исследователи в качестве основных физико-химических факторов повреждения при криоконсервировании биологического материала рассматривают изменение температуры и концентрирование внеклеточного раствора, связанное с вымораживанием свободной воды [17, 24]. Для определения вклада каждого из факторов в общее криоповреждение клеток используют модельные эксперименты. С помощью гипертонического шока и гипертонического криогемолиза эритроцитов изучают повреждающее действие осмотического и температурного факторов [25, 145].

Устойчивость клеток к действию повреждающих факторов криоконсервирования можно изменить при использовании химических соединений, модифицирующих различные компоненты клетки. Истощение эритроцитов по АТФ, обработка модификаторами белков цитоскелета и мембраны (диамид, фенилгидразин, гемин и др.) изменяют устойчивость эритроцитов к гипертоническому шоку и гипертоническому криогемолизу [26, 45, 150, 180].

Известно, что некоторые амфифильные соединения при использовании в микромолярных концентрациях оказывают защитное действие на эритроциты человека при различных стрессовых воздействиях. Достаточно разнообразные по химическому строению амфифильные соединения снижают уровень гипотонического повреждения клеток [316]. Хлорпромазин повышает устойчивость эритроцитов к действию высокого давления [290] и мелиттина, которые индуцирует гемолиз эритроцитов [467]. Катионные производные фенотиазина защищают клетки в условиях гипертонического криогемолиза и гипертонического стресса [112].

В настоящее время использование амфифильных веществ расширяется как в криобиологических, так и других биологических и медицинских исследованиях. Однако информации о возможных механизмах действия этих соединений явно недостаточно, а это не позволяет получить целостное представление об их нтигемолитической активности.

Многочисленные работы [17, 25, 112] посвящены изучению реакции эритроцитов человека на изменение осмотических и температурных условий среды. В частности, экспериментально установлены основные закономерности явления гипертонического криогемолиза эритроцитов человека на феноменологическом уровне и создана его теоретическая модель [51, 52, 53]. Эритроциты животных в этом плане изучены недостаточно. Существуют лишь единичные и разрозненные данные о чувствительности эритроцитов разных видов животных к изменению температурных и осмотических условий среды [61, 234]. Однако это направление

криобиологических исследований является актуальным для разработки методов низкотемпературного хранения эритроцитов разных видов животных для ветеринарной практики.

Для выяснения механизмов устойчивости эритроцитов человека к действию стрессовых факторов широко используется подход, связанный с направленной модификацией различных структурных и функциональных компонентов клетки. Эти изменения не являются узкоспецифичными и могут охватывать клетку в целом, т.е. приводить к нарушению ее нативности в той или иной степени. В связи с этим для исследования температурной и осмотической чувствительности клеток целесообразно использовать нативные эритроциты разных видов млекопитающих, которые отличаются по составу цитоплазмы, способности к деформации, активности транспортных путей, фосфолипидному и белковому составу мембраны [205, 227, 294, 379, 493].

Исходя из выше изложенного, можно сделать вывод, что изучение закономерностей температурной и осмотической устойчивости эритроцитов млекопитающих и разработка подходов, обеспечивающих повышение устойчивости клеток к действию стрессовых факторов, является актуальной проблемой криобиологии.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертация выполнена в рамках бюджетных научно-исследовательских работ отдела криофизиологии клетки Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины по темам: «Исследовать механизмы изменений физико-химического состояния, барьерных свойств мембраны и метаболических систем регуляции зрелых и эмбриональных клеток при охлаждении с целью создания технологического процесса криоконсервирования» (номер государственной регистрации 01870065546), «Клеточные механизмы контроля холодовой и осмотической чувствительности» (номер государственной регистрации 01944005310);

«Факторы и механизмы регуляции стойкости клетки к изменениям температурного и осмотического параметров среды» (номер государственной регистрации 0101U003472); «Механизмы изменения осмотической и температурной чувствительности клеток при действии модификаторов цитоскелет-мембранного комплекса, амфифильных веществ и криопротекторов» (номер государственной регистрации 0104U006437); «Исследование устойчивости эритроцитов к действию осмотического и температурного шока и замораживания» (номер государственной регистрации 0109U000276).

Цель и задачи исследования. Целью работы является изучение особенностей и закономерностей устойчивости эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических параметров среды и определение условий, обеспечивающих максимальную устойчивость клеток к температурно-осмотическому воздействию путем модификации их исходного состояния под действием физико-химических факторов среды (температура, осмоляльность, криопротекторы) и при использовании амфифильных соединений различной природы с выяснением механизма их защитного действия.

В соответствии с поставленной целью предусматривалось решить следующие задачи.

1. Исследовать условия и особенности проявления гипертонического шока, гипотонического лизиса и гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих (человек, бык, лошадь, кролик, собака, крыса), оценить возможные корреляции между температурно-осмотической устойчивостью эритроцитов млекопитающих и их структурно-функциональными характеристиками.

2. Изучить закономерности гипертонического криогемолиза эритроцитов различных видов животных (бык, лошадь, кролик, собака, крыса) в сравнении с эритроцитами человека.

3. Оценить возможность повышения устойчивости эритроцитов млекопитающих к действию гипертонического шока и гипертонического криогемолиза с помощью представителей различных классов амфифильных соединений (анионные, катионные и неионные).

4. Расширить представление о механизме действия амфифильных веществ путем изучения их влияния на барьерные свойства мембран эритроцитов (по отношению к катионам калия), оценки антигемолитической активности трифторперазина в условиях гипертонического шока эритроцитов человека, модифицированных с помощью протеолитических ферментов (проназа, трипсин, папаин) и нейраминидазы, изучения влияния хлорпромазина на распределение фосфатидилсерина в мембране эритроцитов.

5. Провести сравнительное изучение эффективности представителей гомологического ряда глюкопиранозидов (гексил-, октил- и децил- β ,D-глюкопиранозид) в условиях гипертонического шока и гипертонического криогемолиза эритроцитов человека.

6. Исследовать влияние амфифильных соединений (додецил- β ,D-мальтозид, додецилсульфат натрия, хлорпромазин) на состояние липидного бислоя мембран эритроцитов человека. Оценить влияние различных концентраций хлорпромазина на барьерные свойства мембран эритроцитов человека.

7. Определить оптимальные начальные условия (температура и осмоляльность среды), при которых устойчивость эритроцитов разных видов млекопитающих к гипертоническому шоку является максимальной. Определить концентрации криопротектора и температурные условия обработки эритроцитов млекопитающих полиэтиленоксидом с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500) для обеспечения максимальной устойчивости клеток к действию гипертонического шока

8. Изучить влияние проникающего криопротектора глицерина, а также сочетанного действия глицерина и предварительного частичного

обезвоживания клеток в солевых средах (NaCl) на устойчивость эритроцитов к гипертоническому шоку.

Объект исследования – гипертонический шок, гипертонический криогемолиз, гипотонический лизис эритроцитов млекопитающих.

Предмет исследования – осмотическая и температурная устойчивость эритроцитов разных видов млекопитающих (человек, лошадь, бык, собака, кролик, крыса) при использовании амфифильных соединений, криопротекторов и предварительного частичного обезвоживания клеток.

Методы исследования. В работе использованы следующие методы исследований:

- спектрофотометрия для определения содержания гемоглобина, вышедшего из эритроцитов в супернатант;
- световая микроскопия для регистрации изменения формы эритроцитов в присутствии амфифильных соединений;
- ионометрия, атомно-абсорбционная спектрофотометрия и капиллярный электрофорез для определения содержания ионов калия и натрия в супернатанте;
- микрогематокритный метод определения гематокрита эритроцитов;
- ЭПР спектроскопия для исследования состояния липидного бислоя и барьерной функции мембран эритроцитов;
- проточная цитофлуориметрия для оценки распределения фосфатидилсерина в мембране эритроцитов;
- осмометрия для определения осмоляльности приготовленных растворов;
- рефрактометрия для определения коэффициента преломления сред с целью контроля концентрации веществ в растворах;
- ферментативная обработка эритроцитов с целью модификации белкового компонента мембраны эритроцитов;
- методы статистической обработки результатов.

Научная новизна полученных результатов. Впервые с использованием корреляционного анализа выявлена статистически значимая связь между температурно-осмотической устойчивостью эритроцитов млекопитающих (человек, бык, кролик, крыса, лошадь, собака) и их структурно-функциональными характеристиками: показатели гипотонического лизису коррелируют с поверхностно-объемным отношением и диаметром клеток; показатели гипертонического шока – с параметрами водного транспорта, содержанием воды и гидрофобностью гемоглобина; показатели гипертонического криогемолиза – с липидным составом мембран. Полученные результаты принципиально дополняют существующие представления о механизмах повреждения эритроцитов млекопитающих при изменении температурно-осмотических условий среды.

Впервые на основе всестороннего анализа экспериментально полученных результатов по изучению гипертонического криогемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих обнаружены и сформулированы основные закономерности гипертонического криогемолиза эритроцитов животных.

В диссертации впервые осуществлен комплексный научный анализ антигемолитического действия амфифильных соединений различных классов при гипертоническом шоке и гипертоническом криогемолиза эритроцитов млекопитающих. Впервые на основе экспериментальных данных раскрыт механизм защитного действия амфифильных соединений. Установлено, что защитный эффект амфифилов проявляется в момент действия стрессового фактора на эритроциты и реализуется, в первую очередь, на уровне липидного компонента их мембран. Полученная информация о механизме действия амфифильных соединений позволяет теоретически обосновать использование этих веществ при тестировании состояния мембран клеток и прогнозировать эффективность амфифильных соединений в условиях действия на клетки неблагоприятных факторов среды.

Впервые получены данные об оптимальных температурно-осмотических условиях инкубирования клеток с непроникающими веществами (криопротектор ПЭО-1500 или NaCl), которые обеспечивают максимальную устойчивость эритроцитов млекопитающих к последующему действию гипертонического шока – одного из основных факторов криповреждения клеток. Впервые установлено, что защитный эффект проникающего криопротектора (глицерин) в условиях гипертонического шока эритроцитов млекопитающих зависит как от экспериментальных условий (температура и концентрация криопротектора), так и от видовой принадлежности клеток. Впервые в условиях модельного эксперимента (гипертонический шок) показана эффективность сочетанного использования глицерина и NaCl (в умеренно гипертонических концентрациях). Полученные экспериментальные данные теоретически обосновывают оптимальные условия добавления криопротектора к клеткам на этапе, предшествующем их замораживанию.

Практическая значимость полученных результатов. Результаты диссертационной работы могут быть использованы при разработке общей теории криповреждения и криозащиты биологических объектов в условиях низкотемпературного консервирования.

Разработанные и защищенные патентами подходы направленной коррекции чувствительности эритроцитов к температурному и осмотическому стрессу (гипертонический шок и гипертонический криогемолиз) с применением амфифильных соединений (Патенты Украины № 37514 и № 38944) могут быть использованы для повышения устойчивости клеток в экстремальных условиях.

Использование гипертонического шока как экспериментальной модели одного из факторов криповреждения клеток (Патент Украины № 50069) позволяет проводить скрининг условий добавления непроникающего криопротектора на этапе, предшествующем замораживанию, и выявлять

оптимальную их комбинацию (температура, концентрация криопротектора, продолжительность экспозиции с криопротектором).

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина, Харьковской зооветеринарной академии МАП Украины, Харьковского педагогического университета имени Г. С. Сковороды.

Результаты диссертационной работы могут быть рекомендованы для использования в учебном процессе при подготовке специалистов в криобиологии, мембранологии, фармакологии и ветеринарии.

Личный вклад соискателя. Выбор темы диссертационного исследования, планирование целей и задач, определение методологических основ выполнения работы принадлежат автору. Результаты работы, изложенные в диссертации, получены под руководством автора и при его непосредственном участии. Диссертантом самостоятельно проведен патентно-информационный поиск, выдвинута основная концепция работы, осуществлен анализ полученных результатов, написаны все разделы диссертации, сформулированы выводы.

Автор выражает искреннюю благодарность коллективу отдела криофизиологии ИПКиК НАН Украины, научному консультанту д.б.н., проф. Бондаренко В.А., а также соавторам научных публикаций за помощь в проведении экспериментов, за участие в обсуждении результатов и научные дискуссии, позволившие лучше спланировать и выполнить диссертационное исследование.

В опубликованных с соавторами публикациях личный вклад соискателя заключается в следующем: в работах [71, 72, 76, 78, 133, 157, 180, 181, 182, 187, 189, 195, 209, 481, 508] в планировании экспериментов, проведении экспериментальных исследований особенностей гипертонического криогемолиза эритроцитов человека и животных, статистической обработке материала, анализе, обобщении результатов,

участии в их обсуждении; в работах [70, 125, 132, 167, 188] в обосновании постановки задачи, планировании работы, участии в экспериментальных исследованиях особенностей гипертонического шока млекопитающих, анализе и обсуждении полученных результатов, формулировании выводов, в работах [197, 198] в формулировке идеи, планировании исследования, проведении экспериментальных исследований кинетики осмотического лизиса эритроцитов млекопитающих, статистической обработке результатов, анализе и обсуждении результатов, формулировании выводов; в работах [38, 40, 119, 123, 126, 158, 172, 170, 173, 190, 503] в обосновании постановки задачи, планировании экспериментов, участии в ЭПР спектроскопических исследованиях эритроцитарных мембран, анализе, обобщении и интерпретации результатов; в работах [42, 79, 101, 178] в обосновании постановки задачи, экспериментальном обоснование концентраций амфифильных соединений и гематокрита для микроскопических исследований, участии в обсуждении полученных результатов и формулировании выводов; в работах [67, 184] в обосновании методологии экспериментов и проведении экспериментальных исследований влияния катионных амфифильных соединений, добавленных на разных этапах, на температурно-осмотический шок эритроцитов человека, обработке, анализе, обобщении результатов и формулировании окончательных выводов, в работах [43, 60, 65, 66, 113, 130, 161, 177, 179, 183, 186, 480, 500, 501] в обосновании постановки задачи, планировании исследования, экспериментальном изучении влияния катионных и неионных амфифильных соединений на температурно-осмотический шок эритроцитов человека; обработке, анализе, обобщении, интерпретации результатов и формулировании выводов, в работах [30, 33, 41, 64, 74, 75, 77, 94, 120, 121, 124, 138, 139, 140, 141, 142, 185, 191, 194, 212, 216] в формулировке идеи и планировании исследований, экспериментальном изучении эффективности амфифилов различных классов в условиях гипертонического шока и гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих, обработке,

обобщении и интерпретации результатов, формулировании выводов; в работах [4, 5, 6, 7, 129, 445] в формулировке идеи и планировании работы, участии в экспериментальных исследованиях гипертонического шока предварительно обезвоженных эритроцитов млекопитающих, анализе и интерпретации результатов, формулировании выводов, в работах [9, 10, 35, 44, 117, 134, 199] в формулировке идеи и планировании исследований, участии в экспериментальном изучении влияния криопротекторов на гипертонический шок эритроцитов млекопитающих, анализе и интерпретации результатов, формулировании выводов, в работах [8, 135, 431, 479] в формулировке идеи и планировании работы, участии в экспериментальных исследованиях механического стресса эритроцитов млекопитающих, анализе и интерпретации результатов.

Апробация результатов диссертации. Основные результаты диссертационной работы представлены на научных форумах, в том числе зарубежных: II Международной конференции ЮНЕСКО «Успіхи сучасної кріобіології» (Харьков, 1992); VI, IX Украинском биохимическом съездах (Киев, 1992; Харьков, 2006); I–IV съездах Украинского биофизического общества (Киев, 1994; Харьков, 1998; Львов, 2002; Донецк, 2006); 31, 32, 34 ежегодных совещаниях Международного общества криобиологии «CRYO-94» (Киото, Япония, 1994); «CRYO-95» (Медисон, США, 1995); «CRYO-97» (Барселона, Испания, 1997); I съезде Украинского общества криобиологии и криомедицины (Харков, 1995); XI, XIV, XVII конгрессах Европейской ассоциации исследования эритроцитов (Гозд-Мартулек, Словения, 1997; Роскоф, Франция, 2004, Милан, Италия, 2009); II съезде трансплантологов Украины (Киев, 2000); конференции молодых ученых по молекулярной биологии и генетике (Киев, 2001); I Украинской научной конференции «Проблеми біологічної і медичної фізики» (Харьков, 2004); IV, VI съездах Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования

биосистем» (Минск, Белорусь, 2004, 2006); Учредительном съезде Украинского общества клеточной биологии (Львов, 2004); конференции с международным участием «Актуальні проблеми і досягнення кріобіології і кріомедицини. Структурна і функціональна організація стовбурних клітин в умовах дії низьких температур» (Харьков, 2005); III, IV міжнародних наукових конференціях студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології» (Львів, 2007, 2008); Міжнародної науково-практичної конференції «Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине» (Ростов-на-Дону, Россия, 2007); 2 съезде Украинского общества клеточной биологии (Киев, 2007); I Міжнародної конференції «Состояние воды в биологических и модельных системах» (Тверь, Россия, 2007); Міжнародної наукової конференції, посвященої 70-літтю со дня народження О. А. Гойды «Біофізичні механізми функціонування живих систем» (Львов, 2008); наукової конференції з міжнародним участием «Нові кріобіотехнології для розв'язання фундаментальних і прикладних задач медицини» (Харьков, 2008); конференції «Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия» (Пушино, Россия, 2008); конференції «Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини» (Харьков, 2009); I Міжнародної науково-практичної конференції «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, Россия, 2010); 15 Міжнародної Пушчинської школи-конференції молодих учених (Пушино, Россия, 2011); VIII Міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії. БФФХ – 2012» (Севастополь, 2012); 3 съезде Украинского общества клеточной биологии с международным представительством (Ялта, 2012); наукової конференції з міжнародним представительством, посвященої 40-літтю ИПКиК НАН України «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины» (Харьков, 2012).

Публикации. Основные положения и научные результаты диссертационной работы опубликованы в 95 научных работах, среди которых 44 статьи в научных специализированных изданиях (9 из них цитируются в международной базе Scopus) и 9 статей в других научных изданиях, 4 декларационные патента Украины, 38 тезисов докладов международных и национальных научных конференций, а также в разделе коллективной монографии.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из вступления, обзора литературы, материалов и методов, 4 глав результатов исследований и их обсуждения, обобщения результатов, выводов, списка используемой литературы и приложений. Она содержит 392 страниц, из них – 306 страниц основного текста. Работа проиллюстрирована 63 рисунками, 5 микрофотографиями, 18 таблицами, из которых 9 рисунков, 2 микрофотографии и 1 таблица расположены на отдельных 8 страницах. Список литературы включает 532 наименования на 63 страницах. Приложения представлены на 15 страницах.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о структуре и динамических характеристиках эритроцита

Интерес к эритроциту обусловлен важностью выполняемых им функций, основной из которых является транспортировка кислорода и углекислого газа. Функциональные характеристики эритроцита обусловлены особенностями его строения. Эффективность газообмена обеспечивается большой площадью поверхности, способность проходить через узкие капилляры, размеры которых меньше размера этой клетки – эластичностью эритроцитарной мембраны, а защита от активных форм кислорода осуществляется специальной ферментативной системой [47].

Эритроциты млекопитающих являются распространенным объектом исследования. Это обусловлено доступностью получения и относительной простотой их строения (отсутствие ядра и внутриклеточных органелл), что облегчает интерпретацию получаемых результатов. В определенных случаях выбор этих клеток связан с тем, что эритроциты млекопитающих (в отличие от тромбоцитов, которые также являются безъядерными) более устойчивы к внешним воздействиям [166], поскольку в их задачу входит не активация в ответ на изменение состава окружающей среды, а устойчивость к периодическим деформациям в процессе циркуляции.

Основным структурным элементом эритроцитов млекопитающих является плазматическая мембрана, которая отделяет цитоплазму от внешней среды, контролирует проникновение в клетку и выход из нее различных соединений, создает специальные условия для протекания ферментативных реакций, осуществляемых гидрофобными мембранными белками и др.

Основными компонентами мембраны являются белки и липиды. Углеводы представлены в меньшем количестве (около 10% массы мембраны), при этом они всегда входят в состав гликолипидов и гликопротеинов.

Липиды клеточных структур эукариотических клеток представлены 3 основными группами: фосфолипиды, гликолипиды и стероиды. Основной группой структурных липидов являются фосфолипиды. Они различаются с точки зрения их полярной головной группы, остова, с которым головная группа и неполярные жирнокислотные цепи связаны (глицериновый или сфингозиновый), характера связывания с остовом (через сложноэфирную или эфирную связи), а также длины и уровня ненасыщенности жирнокислотных цепей [279, 530]. Полярные головные группы фосфолипидов представлены азотсодержащими соединениями, которые соединены эфирной связью с остатком фосфорной кислоты, – холином, этаноламином или серином. Жирнокислотные цепи фосфолипидов в эритроцитарной мембране имеют длину от 16 до 22 углеродных атома и могут быть насыщенными (например, пальмитиновая или стеариновая кислоты) или ненасыщенными (от 1 до 6 двойных связей) (например, олеиновая кислота). За исключением сфингомиелина (СМ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ) и лизофосфатидилэтаноламина, фосфолипиды имеют две жирнокислотные цепи, прикрепленные к глицериновому остову. При физиологических значениях pH большинство фосфолипидов, к которым относятся фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА) и другие, являются электронейтральными, хотя фосфатидилсерин (ФС), фосфатидная кислота (ФК) и фосфатидилинозитол (ФИ) заряжены отрицательно.

В эритроцитарной мембране группа стероидов представлена холестерином (ХС). Стероидная структура холестерина не позволяет ему пронизывать всю толщину мембраны. Похоже, что стеролы заполняют мерцающие пространства между ацильными цепями в мембранных бислоях [414].

ХС проявляет определенное сродство к фосфолипидам [46, 257]. ХС взаимодействует с холин-содержащими фосфолипидами, причем более предпочтительно с СМ как в бислоях, так и в монослоях [483]. В СМ/ХС бислоях проницаемость для воды ниже, чем в ФХ/ХС мембранах, что свидетельствует о более плотной латеральной упаковке в первой системе. Предпочтительное взаимодействие холестерина с СМ, а не с ФХ, обусловлено тем, что в состав сфингомиелинов входят более длинные насыщенные жирные кислоты по сравнению с мононенасыщенными фосфатидилхолинами. Это позволяет полностью насыщенным ацильным цепям сфинголипида взаимодействовать по всей длине со стероидным кольцом ХС [341]

Наличие небислойных компонентов (лизوليлипидов и ХС) в липидном бислое может приводить к изменению топологии мембранной системы – спонтанному появлению стабильных долгоживущих пор [89].

Следует отметить, что существенные различия в липидном составе мембран обнаружены между эритроцитами различных видов млекопитающих, в то время как индивидуальные изменения, наблюдаемые в рамках одного вида млекопитающих, являются относительно небольшими.

Несмотря на большое разнообразие фосфолипидов, характерной особенностью строения их молекул является амфифильность, т.е. наличие полярной гидрофильной «головки» и неполярного гидрофобного «хвоста». Именно эта особенность строения и физико-химических свойств определяет способность фосфолипидов и гликолипидов в гидрофильной среде самопроизвольно формировать бислой: внутри оказываются гидрофобные участки, а снаружи – гидрофильные. Такая организация липидных молекул отвечает состоянию с наименьшим значением потенциала Гиббса.

Липиды, входящие в состав эритроцитарной мембраны, распределяются асимметрично, что известно, как *транс*-асимметрия. Холин-содержащие фосфолипиды, ФХ и СМ, находятся главным образом во

внешнем монослое мембраны, в то время как аминокислоты, ФС и ФЭА, располагаются во внутреннем монослое.

Липидная асимметрия эритроцитарной мембраны обусловлена постоянным обменом фосфолипидов путем флип/флоп механизма между двумя липидными монослоями. Трансмембранное перемещение этих фосфолипидов в биологических мембранах происходит очень быстро. Мембранная фосфолипидная асимметрия является результатом баланса между активной транслокацией ФС и ФЭА и пассивным медленным двунаправленным флип/флоп движением фосфолипидов [530]. Транс-асимметрия создана и поддерживается аденозинтрифосфат (АТФ)-зависимой транспортной системой. Два важных фермента регулируют перемещение фосфолипидов: флиппаза отвечает за перемещение ФС и ФЭА из внешнего во внутренний монослой, флоппаза катализирует перемещение других липидов из внутреннего во внешний монослой бислоя.

По прочности связывания белков с эритроцитарной мембраной и, следовательно, по способам, применяемым для их выделения, белки делятся на 2 группы. Те белки, которые легко выделяются, вероятно, потому что связаны только с одной стороной мембраны, называются периферическими белками. Белки, которые могут быть экстрагированы только сильными реагентами, так как они прочно встроены в липидный бислой или даже пересекают его, относятся к интегральным белкам. Кроме того, белки эритроцитарных мембран могут быть классифицированы с точки зрения их функций: интегральные структурные белки (белок полосы 3, гликофорины, АТФазы и т.д.), белки цитоскелета (спектрин, актин, белок 4.1 и т. д.) и якорные белки (анкирин, белок 4.1, белок 4.2) [530].

Наиболее представительными интегральными белками являются белок полосы 3 и гликофорины.

Белок полосы 3 или анионный обменник (АЕ1) является основным интегральным белком эритроцитарной мембраны (10^6 копий на клетку),

многократно пересекающим ее. N-терминальный цитоплазматический домен этого белка является местом связывания цитоскелетных белков (анкирин, белок 4.2 и белок 4.1), гликолитических ферментов и гемоглобина. С-терминальный домен белка полосы 3 осуществляет анионный обмен. Основная функция данного гликопротеида заключается в обмене кислорода и углекислоты. [279].

Белок полосы 3 присутствует в эритроцитарных мембранах в виде димеров (70%), хотя он может быть также представлен в виде тетрамеров или олигомеров более высокого порядка (30%). Конфигурация белка полосы 3, как и других структурных белков, может модулироваться фосфорилированием или дефосфорилированием [408].

Гликофорины – интегральные белки, характерные исключительно для эритроцитарной мембраны. Они представлены в виде гликофоринов А, В, С, Д, относятся к классу мембранных гликопротеинов и выполняют рецепторную функцию. Гликофорин имеет три домена: цитоплазматический домен, гидрофобный домен, который существует в виде одиночной α -спирали, однократно пронизывающей липидный бислой, и внеклеточный домен, который в значительной степени гликолизирован [530]. В отличие от белка полосы 3 гликофорин имеет относительно небольшой цитоплазматический домен и один трансмембранный сегмент. Внеклеточный домен гликофорина, который в значительной степени гликолизирован, вносит определяющий вклад в формирование гликокаликса клетки и отрицательный заряд поверхности эритроцита [530].

Плотность поверхностного заряда не изменяется в эритроцитах, дефицитных по гликофору А, поскольку в этом случае белок полосы 3 характеризуется повышенным уровнем гликозилирования [279]. Эти клетки имеют нормальную форму и деформируемость, что свидетельствует в пользу того, что гликофорин А не имеет решающего значения для механической стабильности, деформируемости и изменения формы эритроцита.

Клетка представляет собой высокоинтегрированную структуру, отдельные компоненты которой тесно взаимосвязаны. Согласно существующим представлениям, интегрирующим звеном, объединяющим разные части клетки и обеспечивающим передачу сигналов как внутри одной клетки, так и между разными клетками, является цитоскелет [279, 530].

Форма эритроцитов и механические свойства их мембран (очень высокая линейная упругость и незначительная растяжимость) поддерживаются белок-белковыми и белок-липидными взаимодействиями [220, 247, 273, 280, 376, 530]. Наиболее известными среди них являются ассоциации внутри спектрин-актинового скелета (часто называемые горизонтальными взаимодействиями) и мостики между мембранным скелетом и различными мембраносвязывающими белками, липидами (часто называемые вертикальными взаимодействиями). Полагают, что горизонтальные взаимодействия ответственны за поддержание архитектуры и стабильности белковой сети [280], а вертикальные взаимодействия значимы в условиях стресса, так как они обеспечивают взаимодействие липидного бислоя с белковым скелетом [273].

Основными белками мембранного цитоскелета, участвующими в горизонтальных связях, являются спектрин, актин и белок полосы 4.1.

Спектрин – главный компонент эритроцитарного мембранного скелета, формирующий на цитоплазматической поверхности мембраны протяженную филаментную сеть, которая служит опорой для цитоплазматических белков [228]. Этот белок представляет собой продолговатый гетеродимер, состоящий из двух субъединиц α и β , длиной 100 нм. Для обеих субъединиц характерна модульная структура, которая, как полагают [499], определяет способность спектрина растягиваться и сжиматься. В свою очередь, гетеродимеры могут формировать тетрамеры длиной 200 нм и олигомеры более высокого порядка.

Для создания протяженной двумерной внутриклеточной сети, спектрин взаимодействует с большим количеством белков, таких как актин, анкирин,

аддуцин и белок полосы 4.1, что и обеспечивает механическую стабильность мембраны, лежащей над цитоскелетом [530]. Кроме того, способность спектрина связывать молекулы гемоглобина установлена в работе [343].

Важным свойством актина, который в избытке присутствует в эритроците, является его способность к полимеризации с образованием линейного полимера – F-актина [206]. Состояние полимеризации актина функционально важно для эластичности эритроцитарной мембраны, в частности увеличение его полимеризации делает мембрану более ригидной.

Существует около 160 различных актин-связывающих белков, в функции которых входит кэпирование, стабилизация, связывание и разборка филаментов [95, 206]. Актиновые филаменты полярны благодаря упорядоченному распределению асимметричных единиц. Два противоположных конца актинового филамента имеют разную скорость присоединения к ним новых субъединиц, кроме того медленно растущий (острый) и быстро растущий (тупой) отличаются по структуре и динамике полимеризации/деполимеризации. К белкам, кэпирующим быстро растущий конец, относится аддуцин [206], медленно растущий конец – тропомодулин, причем сродство последнего существенно повышается в присутствии тропомиозина [524].

Белок 4.1 является мультифункциональным компонентом цитоскелета, принимающим участие в формировании как вертикальных, так и горизонтальных связей [287]. В последнем случае взаимодействие белка 4.1 с актином и β -субъединицей спектрина облегчает спектрин-актиновые взаимодействия и очень важно для стабильности эритроцитарной мембраны [215]. Взаимодействия с обоими белками может модулироваться разными факторами, такими как фосфорилирование белка 4.1R [377] или его связывание с кальмодулином [423]. В присутствии Ca^{2+} , кальмодулин снижает сродство белка 4.1R к спектрин-актиновому комплексу и уменьшает механическую стабильность мембраны [423]. Подобным образом, фосфорилирование белка 4.1R протеинкиназой C уменьшает его способность

формировать тройной комплекс со спектрином и актином. Кроме того, фосфорилирование индуцирует диссоциацию гликофорина С от мембранного скелета. Следовательно, финальный эффект этого процесса (фосфорилирование) заключается в значительном снижении механической стабильности эритроцитарной мембраны [377].

В настоящее время полагают, что главные связи между мембранным скелетом и липидным бислоем обеспечивают взаимодействия белок полосы 3-анкирин-спектрин и гликофорин С-белок полосы 4.1-спектрин/актин [530], хотя некоторые минорные интегральные мембранные белки также участвуют в прикреплении мембранного скелета [249, 458].

Высоко аффинные белок-белковые взаимодействия, ответственные за прикрепление мембранного скелета к мембране, являлись объектом многих великолепных обзоров [207, 229, 230, 247].

Первый мостик между скелетом и мембраной представляет собой взаимодействие спектрина с трансмембранным белком полосы 3, которое обеспечивается якорным белком анкирином [207, 248]. В состав данного белка входят отдельные домены: NH_2 -терминальный домен, ответственный за связывание с интегральными мембранными белками, домен, ответственный за связывание со спектрином, а также COOH -терминальный регуляторный домен. Мембранносвязывающий домен анкирина, обеспечивающий связывание с белком полосы 3 и другими интегральными белками, состоит из 24 последовательно расположенных «повторов анкирина» и вовлекается в процесс узнавания белков [248]. Поскольку эти повторы анкирина ведут себя как пружина [418], то можно допустить вклад упругого поведения анкирина в механическую стабильность эритроцитарной мембраны.

Уровень фосфорилирования регулирует характер связывания анкирина с белками. Так, нефосфорилированный анкирин связывается преимущественно с тетрамерами или большими олигомерами спектрина, а после фосфорилирования киназой I *in vitro* – как с тетрамерами, так и с

димерами этого белка [259]. Кроме того, вследствие фосфорилирования ухудшается способность анкирина связывать белок полосы 3 [490].

Важность мостика белок полосы 3-анкирин-спектрин для механических свойств мембраны подтверждается рядом как экспериментальных данных, так и результатами генных мутаций, приводящих к изменению содержания компонентов мембраны и цитоскелета. Так, дефекты или недостаток белка полосы 3 или анкирина приводят к снижению сцепления между фосфолипидным бислоем и мембранным скелетом, что сопровождается потерей площади поверхности клетки и патологией, называемой наследственным сфероцитозом [213]. Экспериментальные работы, направленные на искусственное разрушение мостика белок полосы 3-анкирин-спектрин, также указывают на причинную связь между разрушением мостика и потерей нормальной морфологии клеток [273]. При этом наблюдается нарушение стабильности эритроцитов, что проявляется в спонтанной везикуляции и фрагментации клеточной мембраны [207, 213]. Все это свидетельствует в пользу важности мостика спектрин-анкирин-белок полосы 3 для поддержания целостности эритроцитарной мембраны.

Второй мостик, связывающий скелет и мембрану, состоит из спектрина и трансмембранного белка, гликофорина С, взаимодействие между которыми обеспечивает якорный белок 4.1 [207]. Сравнительный анализ эффективности взаимодействий белок полосы 3-анкирин- β -спектрин и гликофорин С-белок полосы 4.1-спектрин в обеспечении механической устойчивости эритроцитарной мембраны указывает на особую роль первого мостика, в то время как разрыв связи гликофорин С-белок полосы 4.1 оказывает незначительный эффект на стабильность мембраны [247]. Хотя можно допустить, что используемые экспериментальные условия, а именно недостаточная продолжительность эксперимента (2 час), не позволили адекватно оценить роль мостика гликофорин С-белок полосы 4.1-спектрин.

Кроме достаточно давно установленных и хорошо описанных вертикальных мостиков между спектринным скелетом и мембраной

эритроцита с участием якорных белков анкирина и белка полосы 4.1, недавно выявлен новый мостик белок полосы 3-аддуцин-спектрин, который связывает спектрин/актин/белок полосы 4.1 узловый комплекс с бислоем [207]. Исходя из того, что разрушение указанного мостика приводит к спонтанной фрагментации мембраны, авторы работы делают вывод об его важности для стабилизации мембраны.

Кроме того, результаты данной работы [207] позволяют объяснить некоторые ранее отмеченные особенности. В частности, ранее были выявлены три популяции белка полосы 3, отличающиеся по ротационной подвижности [463] и коэффициентам сегментации [202]. Можно, по-видимому, полагать, что эти три популяции белка полосы 3 представляют собой белок полосы 3, связанный с актином, белок полосы 3, связанный с аддуцином, а также свободно диффундирующий белок полосы 3. В результате разрушения мест связывания анкирина на белке полосы 3 наблюдается появление эритроцитов с частично сниженной стабильностью, что можно объяснить тем, что до половины мостиков белка полосы 3 со скелетом остается интактными в этих мутированных клетках (по-видимому, это мостик белок полосы 3-аддуцин) [213].

Механические свойства мембраны остаются без изменения после разрушения мостика гликофорин С-белок 4.1 [247]. С другой стороны, показано для мембран, дефектных по белку 4.1/гликофору С, что восстановление домена белка 4.1, который ответственен за связывание со спектрин-актиновым комплексом (без реконструкции мостика гликофорин С-белок 4.1), восстанавливает механические свойства мембраны [388]. В настоящее время эти факты объясняют взаимодействием белок полосы 3-аддуцин и, возможно, недавно открытым взаимодействием демантин-транспортёр глюкозы 1 [281].

Представляло интерес сравнить значимость взаимодействий, которые обеспечивают связывание цитоскелета эритроцита с белком полосы 3:

спектрин-анкирин-белок полосы 3 и спектрин-аддуцин-белок полосы 3, в обеспечении стабильности мембраны.

В работе [421] показано, что эритроциты мышей, не содержащие анкирин, спонтанно фрагментируют *in vivo*, в результате чего в периферической крови преобладают циркулирующие ретикулоциты. Эритроциты из трансгенных мышей, лишенные аддуцина, проявляют особенности, характерные при наследственном сфероцитозе, т.е. отмечается значительная потеря площади поверхности клеток, уменьшение их среднего корпускулярного объема, дегидратация и повышенная осмотическая хрупкость клеток [505]. Следовательно, можно полагать, что мостик белок полосы 3 – анкирин является более значимым для обеспечения стабильности мембраны.

С другой стороны, в пользу более важной роли взаимодействия белка полосы 3-анкирин в стабильности мембраны свидетельствует и стехиометрическая оценка компонентов. Анализ литературных данных, проведенный авторами работы [207], показал, что количество мономеров анкирина и димеров аддуцина, приходящееся на 1 клетку, составляет 100 000 и 30 000 соответственно. Если допустить, что каждая из указанных молекул должна связать 1 олигомер белка полосы 3, то мостиков белок полосы 3-анкирин будет в 3 раза больше, чем мостиков белок полосы 3-аддуцин. Таким образом, и в количественном отношении мостик белок полосы 3-анкирин является доминирующим.

Результаты работы [334] свидетельствуют о наличии тройного взаимодействия белок 4.1-белок p55-гликофорин C в цитоскелет-мембранном комплексе. Кроме того, в прикреплении цитоскелета к мембране участвует относительно недавно выявленный комплекс, вовлекающий Rh, RhAG, CD47, белок 4.2 и/или анкирин [298, 465].

Таким образом, полученные в последнее время результаты свидетельствуют о достаточно сложной организации эритроцитарного цитоскелет–мембранного комплекса.

Анализ литературы по вопросу современных представлений об архитектуре эритроцитарной мембраны и собственные результаты позволили авторам работы [207] предложить новую (обобщенную) модель мембраны эритроцитов человека. Согласно этой модели, в качестве якоря для прикрепления спектрин-актинового цитоскелета к фосфолипидному бислою рассматриваются 2 главных мембранных белковых комплекса. Первый представлен анкирин-связывающим комплексом, в состав которого входят мембранные и периферические белки. К мембранным белкам относятся белок полосы 3, гликофорин А, белки Rh комплекса (резус-фактор – это сложная система, включающая более 40 антигенов, обозначаемых цифрами, буквами и символами) и CD47. Периферические белки представлены анкирином, белком полосы 4.2 и разнообразными гликолитическими ферментами. Второй якорный комплекс – это так называемый узловый комплекс, мембранные белки которого представлены белком полосы 3, гликофорином С, белками Rh комплекса и транспортером глюкозы, а периферические – актином, тропомиозином, тропомодулином, аддуцином, белком р55, белком 4.1, белком 4.2, и различными гликолитическими ферментами [281].

По-видимому, эти два главных белковые комплекса и их мостики со спектрин/актиновым скелетом являются ответственными за известные морфологические и механические свойства клетки.

В настоящее время результаты многочисленных работ [246, 344, 491], выполненных на клетках, изолированных мембранах и модельных системах, указывают на то, что белок-липидные взаимодействия также вносят вклад в прикрепление мембранного скелета к гидрофобному домену мембраны.

Наиболее изученным в этом плане является основной белок мембранного скелета – спектрин. Авторами работы [286] установлено, что изолированные эритроцитарные мембраны, подвергнутые обработке с целью удаления белковых рецепторов (с помощью NaOH и протеаз), связывают спектрин. Сродство этих мембранных препаратов к спектрину такое же,

какое было выявлено в модельных системах, а связывание полностью ингибируется липидными везикулами. Представленные результаты указывают на наличие в нативных мембранах рецепторов для спектрина, скорее всего, липидной природы.

Ray и Chakrabarti [455] при изучении взаимодействия димеров спектрина с ФЭА показали, что константа диссоциации K_D увеличивается с повышением содержания ФЭА в везикулах из ФХ и ФЭА. Однако более сильная ассоциация между спектрином и ФЭА наблюдается в мембранах, включающих только ФЭА. Следует отметить, что для взаимодействия эритроцитарного спектрина с агрегатами, содержащими ФЭА, важна бислойная структура [342].

Результаты по поводу предпочтительного связывания спектрина с мембранными монослоями или бислоями, содержащими определенные фосфолипиды, в частности ФС, достаточно противоречивы [344]. Для объяснения этих разногласий авторы работы [344] привлекают предположение о том, что разные фосфолипиды связываются с разными участками молекулы спектрина. Кроме того, нельзя исключить, что разные экспериментальные подходы и методы позволяют измерять разные типы связывания липидов.

Изменения упорядоченности мембраны то ли в результате увеличения длины ацильных цепей липида, то ли из-за повышения содержания холестерина оказывают специфические эффекты на связывание спектрина [254].

Якорные белки, участвующие в белок-белковых взаимодействиях и обеспечивающие прикрепление цитоскелета к эритроцитарной мембране, могут взаимодействовать и с липидами. В частности, белок полосы 4.1, участвующий в формировании как вертикальных, так и горизонтальных белковых связей в составе цитоскелет-мембранного комплекса, взаимодействует и с фосфолипидами, причем предпочтительно с липидными смесями, содержащими ФС [276].

Таким образом, анализ современного состояния литературы [344, 246, 491] указывает на способность цитоскелетных белков взаимодействовать с фосфолипидами. Естественно возникает вопрос о возможном значении взаимодействий между компонентами цитоскелета и фосфолипидами.

Ап с соавторами. [439] предположили, что связывание ФС со спектрином модулирует взаимодействия спектрина с якорными белками, такими как анкирин или белок 4.1. В свою очередь, спекtrin может регулировать состояние бислоя путем образования или стабилизации ФС пэтчей [438].

Анкирин ингибирует связывание аминокфосфолипидных моно- и бислоев с одним из мест связывания на спектрине [345]. Фосфорилирование анкирина приводит к полной утрате его способности ингибировать взаимодействие между спектрином и ФЭА/ФХ монослоем [345]. Эритроциты мутантных мышей, не содержащие анкирин, (поскольку эритробласты не способны синтезировать этот белок), по-прежнему, аккумулируют около 50% спектрина [238]. Кроме того, эритроциты мышей, дефицитные по анкирину, имеют нормальные цитоскелеты, но они лишены АЕ1 тетрамеров [457]

Основываясь на выше приведенных фактах и собственных результатах, авторы работ [237, 482] предположили, что домены, обогащенные ФЭА (в меньшей степени ФС или другими анионными фосфолипидами), могут служить в качестве мембранных мест прикрепления спектрина в тех случаях, когда недостаточно анкирина или его сродство к спектрину снижено. Таким образом, домены, обогащенные аминокфосфолипидами (главным образом, ФЭА), могут рассматриваться в качестве якорей, заменяющих анкирин и гарантирующих сохранение механических свойств мембранного скелета. Таким образом, места взаимодействий спектрина с липидами выполняют функцию дополнительных точек прикрепления к мембранному бислою, повышающие его механическую стабильность.

Плазматическая мембрана является неомогенной в латеральном направлении. Ее гетерогенность заключается в образовании неоднородности на микро- и наноуровне. Идея существования в плазматической мембране липидных рафтов довольно привлекательна [241, 367], хотя до сих пор не установлено их присутствие *in vivo* [360]. Липидный рафт представляет собой участок плотно упакованного липида, «плавающего» на поверхности «жидкого» фосфолипида. Рафт, будучи обогащенным холестерином, сфингомиелином и насыщенными фосфолипидами, представляет собой достаточно гетерогенную и нестабильную структуру, которая поддерживается за счет встраивания специфических белков. При связывании лигандов с рецепторами или гликосфинголипидами, локализующимися в таких рафтах, происходит их слияние и запускается передача внутриклеточного сигнала.

Модель липидного рафта построена, в основном, на данных, полученных при выделении так называемых детергент-устойчивых мембран. Эти детергент-устойчивые мембраны обогащены холестерином, гликосфинголипидами и устойчивы к действию неионного детергента (наиболее часто используется 1% Triton X-100) при 4°C [491].

В настоящее время нет однозначного представления о взаимодействии спектрина с липидными рафтами [491]. Поскольку эти взаимодействия чувствительны к pH или ионной силе [258], то в качестве кандидатов для заякоривания спектрина на мембране могут рассматриваться белковые компоненты, которые присутствуют при выделении детергент-устойчивых мембран. С другой стороны, основываясь на результатах работы [254], которые свидетельствуют об увеличении связывающей способности спектрина с липосомами, приготовленными из «рафт-подобной» смеси липидов, нельзя исключить возможность белок-липидных взаимодействий при связывании спектрина с рафтами. В целом, прикрепление спектрина к липидным рафтам может осуществляться через взаимодействие с

фосфолипидами, а также в результате его пальмитирования благодаря наличию эритроцитарной белок-пальмитоил ацилтрансферазы [448].

Вопрос о соответствии экспериментально выделенных фракций реальным «рафтам» [322] остается открытым. Однако, если удастся установить взаимодействие спектрина с детергент-устойчивыми мембранами, то это позволит значительно расширить наши представления о роли спектрина в клетке, не только как структурного белка, но и оценить его вклад в функционирование клетки в целом.

Клеточная мембрана, отделяя цитоплазму от внешней среды, осуществляет транспорт веществ и активно участвует в создании и поддержании клеточного гомеостаза [46, 530]. Кроме того, в мембране размещаются функциональные комплексы, которые обладают удивительной согласованностью и быстротой действия [46, 530]. Эффективное выполнение биологическими мембранами разнообразных функций возможно благодаря их уникальной структуре и осуществляется благодаря структурным (конформационным) перестройкам мембранных компонентов. Такая тесная структурно-функциональная связь в биомембранах обеспечивает как динамическое равновесие внутри клетки, так и возможность взаимодействия клеток друг с другом.

Биологические мембраны являются динамическими структурами, в которых компоненты испытывают тепловое движение. Динамические свойства биологических мембран обуславливает, в первую очередь, липидный бислой. Для его компонентов характерно как движение отдельных участков липидной молекулы относительно друг друга, так и движение всей молекулы в целом. Движение углеводородных цепей, в частности гош-трансповороты их звеньев вокруг С–С связи, может приводить к возникновению изгибов и изломов, и, как следствие, появлению дефектов упаковки (так называемые «кинки и «джогги»). Липидные молекулы, находящиеся в бислое, могут совершать разнообразные движения – поступательные,

вращательные и колебательные, которые осуществляются с разными скоростями [20, 46, 86].

Латеральная диффузия (подвижность) отражает хаотическое тепловое перемещение молекул в пределах монослоя, «флип-флоп»-переход – между монослоями. По сравнению с латеральной диффузией «флип-флоп»-переход липидов происходит гораздо реже, что способствует сохранению асимметрии мембран. Молекулы белков не испытывают «флип-флоп»-переходов, а их скорость перемещения ниже, чем в случае молекул липида. Полагают, что низкая скорость перемещения белковых молекул в мембране зависит от их взаимодействия с фосфолипидами и белками. Нарушение этих связей может сопровождаться увеличением подвижности белка [46].

Основываясь на результатах по исследованию трансбислойного движения флуоресцентномеченных фосфолипидов в эритроцитарной мембране, авторы работы [315] сделали вывод о том, что непосредственный «флип-флоп» анионных фосфолипидов представляет собой электрогенное перемещение непротонированных заряженных липидов через гидрофобный барьер.

В работе [512] изучали трансбислойное движение флуоресцентных аналогов фосфолипидов в липосомах при фазовом переходе липидов. Авторы наблюдали резкое увеличение трансбислойного движения флуоресцентномеченных фосфолипидов при фазовом переходе липидов. В то же время подавление фазового перехода в результате добавления холестерина сопровождалось аннулированием быстрого трансбислойного движения липидов. Авторы полагают, что молекулярная упаковка дефектов при фазовом переходе отвечает за быстрое трансбислойное движение липидов. Таким образом, подвижность липидов («флип-флоп») зависит от состояния бислоя и существенно повышается в результате латерального фазового разделения, приводящего к образованию жидкокристаллической фазы [512].

Жидкокристаллическое состояние мембраны характеризуется способностью липидов перемешиваться в плоскости мембраны в отличие от

гелеобразного состояния, находясь в котором мембрана лишена латеральной подвижности липидов. Жидкокристаллическое состояние может спонтанно разделяться на две взаимно несмешивающиеся микрофазы: жидкое неупорядоченное и жидкое упорядоченное состояния. В первом состоянии диффузия молекул в плоскости мембраны описывается законами жидкостей, во втором состоянии происходит движение кластеров (или доменов) «слипшихся» молекул липидов как единого целого в течение какого-то времени.

Для нормального функционирования биологическая мембрана должна находиться в жидкокристаллическом состоянии, чтобы поддерживать целостность мембраны и обеспечить полноценное осуществление или протекание различных ферментативных реакций.

Одной из наиболее характерных и, по-видимому, фундаментально значимых особенностей динамики эритроцитов является тесное переплетение в ней хаотичности и регулярности. Известно, что в нормальных физиологических условиях клеточная мембрана эритроцита находится в состоянии хаотических изгибных колебаний, получивших название фликкера эритроцитов. Фликкер должен сказываться на диффузионном, механическом и гидродинамическом поведении эритроцитов, а также на их взаимодействии друг с другом и с различными поверхностями. При изучении проблемы взаимосвязи хаотичности и регулярности в динамике эритроцитов в функционально-физиологическом аспекте автор [93] установил, что амплитуда хаотических колебаний клеточной мембраны является важным диагностическим параметром, характеризующим функциональную полноценность эритроцита. В пользу этого свидетельствует наличие положительной корреляции между амплитудой фликкера мембраны в диапазоне $5 \div 10$ Гц и деформируемостью (фильтруемостью) эритроцита, а также тот факт, что оба эти показателя максимальны для физиологически нормального объёма эритроцита и убывают при отклонениях объёма клетки от нормального [93].

Классическая жидкостно-мозаичная модель Сингера и Никольсона рассматривает мембрану в виде текучего фосфолипидного бислоя со свободно диффундирующими в нем белками. Исследование природных и модельных мембран с помощью высокоэффективных физических и биофизических методов показало, что молекулярная организация мембран гораздо сложнее, чем предполагалось жидкостно-мозаичной моделью. Полученные экспериментальные данные поставили под сомнение традиционное представление об однородном распределении белков и липидов [485, 513].

В настоящее время существует несколько концепций латерального строения биологической мембраны, но, к сожалению, единой общепризнанной модели пока нет.

Концепция рафтов или гликосфинголипид-холестериновых доменов (участки мембраны, обогащенные сфингомиелином, ХС и белками) предполагает, что липиды способны формировать домены, что и лежит в основе экспериментально показанного гетерогенного распределения липидных молекул на микро- и наноуровне. в плоскости мембраны. Рафты формируют жидкостно-упорядоченную фазу, окруженную жидкостно-неупорядоченной фазой из ненасыщенных глицерофосфолипидов. Согласно этой модели [257, 305, 453], взаимодействие ХС именно со сфинголипидами обусловлено тем, что последние содержат остатки преимущественно насыщенных жирных кислот, которые могут связываться со стерольным кольцом ХС. Кроме того, возможно образование водородных связей между гидроксильной группой ХС и церамидом сфинголипидов. Однако эти взаимодействия являются неспецифическими, что следует из результатов экспериментов, выполненных на модельных мембранах [364]. Не все исследователи принимают рафтовую концепцию строения мембраны.

На основании результатов многочисленных физических и химических исследований, проведенных на модельных мембранах, была предложена суперрешетчатая модель или модель регулярного распределения (superlattice

or regular distribution model) [488]. Так, модель регулярного распределения предполагает, что ХС, как и все ФЛ, распределены в мембране регулярно, хотя при этом в мембране существуют участки с различной степенью упорядоченности [510]. Характер регулярного распределения определяется ван-дер-ваальсовыми силами, силами электростатического отталкивания и стерическими эффектами.

На основании модели регулярного распределения было предсказано латеральное распределение фосфолипидов во внешнем и внутреннем монослоях эритроцитарной мембраны [520], что хорошо согласуется с результатами химического анализа липидного состава эритроцитарных мембран. При этом учитывались размеры полярных головок фосфолипидов, заряды фосфолипидов, а также присутствие холестерина.

Авторы работы [510] полагают, что если рафты действительно существуют, то они, вероятно, также имеют суперрешетчатый тип латеральной организации.

Совсем недавно была представлена гипотеза о существовании в мембране доменов, альтернативных липидным рафтам [522]. Эти домены состоят из специфических белков и фосфолипидов, богатых полиненасыщенными жирными кислотами. Полиненасыщенные жирные кислоты, такие как докозагексаеновая кислота, содержат повторяющиеся фрагменты $=CH-CH_2-CH=$, что придает этим цепям чрезвычайную гибкость. Такая высокая степень неупорядоченности жирнокислотных цепей фосфолипидов исключает возможность непосредственной близости жесткой стероидной части молекулы холестерина, поэтому эти фосфолипиды вытесняют холестерин и латерально сегрегируют в домены, богатые полиненасыщенными жирными кислотами и свободные от холестерина и сфингомиелина.

Линг [103] на основании подробного обзора развития научной мысли о строении клетки, пришел к выводу, что роль мембраны в жизни клетки во многом преувеличена и даже искажена. Согласно мнению автора, барьерную

функцию между клеткой и средой выполняет структурированная вода, а не липидный бислой, покрывающий поверхность клетки. В основе особого состояния воды в клетке лежит простое физическое явление: возрастание дипольного момента молекулы воды при взаимодействии с фиксированными зарядами на белках, в результате чего прочность водородных связей между молекулами возрастает, что и способствует появлению обширных и упорядоченных водных структур. Линг [103] стремится перенести «центр тяжести» в понимании жизненных функций клетки с клеточной мембраны на цитоплазму, рассматривая изменение электронной плотности в макромолекулах, вызываемое внешними сигналами, как основной механизм регуляции клеточных функций. Эти представления опираются на тесную взаимосвязь белков, структурированной воды и неорганических ионов в цитоплазме клетки. Возможно столь «революционная» точка зрения относительно значения структурированной воды на фоне полного отрицания роли мембраны в обеспечении жизнедеятельности клетки не найдет широкого круга приверженцев, однако несомненно будет способствовать переосмыслению самых разнообразных проблем биологии и физиологии клетки.

Во всяком случае, роль и значение воды в биологической системе несомненно недооценены. Процессы формирования и стабилизации мембраны, как и многие ее структурно-функциональные свойства связаны с водой. Вода в составе мембраны делится на свободную, связанную и захваченную. Основную часть связанной воды представляет вода гидратных оболочек полярных групп белков и липидов. Она характеризуется минимальной подвижностью и практически не обладает свойствами растворителя. Свободная вода является хорошим растворителем, подвижная и обладает всеми свойствами жидкой воды. Захваченная вода встречается в центральной зоне мембран, между ее липидными слоями [82].

Тот факт, что бислой проницаем для воды, означает, что часть молекул воды также присутствует в гидрофобной части бислоя. Прохождение малых

молекул через липидные бислои – явление, которое не полностью понято, но которое имеет большое значение для понимания проницаемости биологических мембран. Проникновение воды через мембрану происходит через временные дефекты, производимые температурными флуктуациями. Образование свободных объемов, способных содержать молекулы воды в углеводородной области липидного бислоя, связано с дефектами упаковки жирнокислотных цепей [86, 401]. Значения коэффициентов трансбислойной диффузии воды на 4 порядка меньше, чем для объемной воды и в 10 раз меньше коэффициентов латеральной диффузии липида при тех же условиях [88].

Содержание воды в биологических системах важно для их функционирования. Изменение гидратации липидного бислоя может привести к изменению температуры фазового перехода гель – жидкий кристалл [518]. При увеличении концентрации воды толщина бислоя уменьшается, а площадь, приходящаяся на одну молекулу липида, увеличивается [328]. При пониженных концентрациях воды (менее 24 вес.%) отмечается замедление латеральной диффузии липидов [306]. Компьютерное моделирование показывает, что дегидратация бислоя приводит к систематическому упорядочиванию жирнокислотных цепей [409]. Можно полагать, что внутриклеточное содержание воды будет в значительной степени определять поведение клетки при изменении условий внешней среды.

Эритроцит обычно считают биологически неактивной клеткой, которая, по существу, не в состоянии реагировать на сигналы, поступающие из клетки, так и в клетку из окружающей среды, значимыми изменениями своих свойств. Однако, авторы работы [247] показали, что свежие интактные эритроциты действительно чувствуют изменение уровня 2,3-дифосфоглицерата, который является модулятором сродства гемоглобина к кислороду. Кроме того, содержание кальция, кислорода, величины

внутриклеточного pH и активности протеинкиназы C также оказывают влияние на состояние эритроцита. На изменения выше отмеченных факторов (сигналов) клетка отвечает путем изменения количества мостиков, соединяющих гликофорин C с мембранным скелетом, т.е. откреплением цитоскелета от мембраны в физиологических условиях.

В ряде работ [233, 366, 403, 449, 521] показано, что эритроциты обладают значительным набором сигнальных молекул, что позволяет говорить об участии этих клеток в регуляторных процессах, направленных на интеграцию функций организма.

Экспериментальный материал, полученный в последнее время, и его анализ [233, 247, 366, 403, 449, 521] свидетельствуют о достаточно сложной организации эритроцитарных мембран. Это позволяет поставить под сомнение традиционное и достаточно упрощенное представление об эритроците как весьма простой и биологически неактивной клетке.

1.2. Криоповреждение клеток: теории и гипотезы

Криоконсервирование представляет собой процесс сохранения биологической структуры и/или функции живых систем в результате замораживания и хранения при сверхнизких температурах. Это единственная современная технология, которая поддерживает *ex vivo* биологические функции и обеспечивает продолжительное хранение биологического материала.

Криоконсервирование использует положительный эффект снижения температуры для уменьшения подвижности молекул и подавления метаболических и биохимических реакций. Сами по себе криогенные температуры (температуры вблизи точки кипения азота) не представляют опасности для биологического материала, поскольку фактически все физиологические и биохимические процессы настолько замедлены, что и развитие повреждения маловероятно. В отличие от гипотермического

хранения, физиология эритроцитов, в том числе структура гемоглобина, структура мембраны и клеточная энергетика, не зависит от продолжительности хранения клеток в замороженном состоянии [214, 297]. Опасность представляют собой процессы, развивающиеся как при охлаждении биологического материала до температуры жидкого азота, так и при отогреве [17, 362, 528].

Замораживание клеток и органов часто завершается их гибелью. Образование льда сопровождается механическим повреждением биологического материала, в частности внутриклеточное формирование кристаллов льда практически всегда приводит к гибели клетки [17, 362, 528].

Лед является плохим растворителем, поэтому при его образовании большинство растворенных веществ исключается из его состава и остается в концентрированном незамерзшем растворе. Концентрации раствора могут достигать значительного уровня, при котором будут проявляться токсические свойства. Высокая концентрация соли влияет на электрические или ионные взаимодействия. Кроме того, лед и вода по-разному взаимодействуют с поверхностями мембран и макромолекул, что очень важно, потому что эти взаимодействия (через поверхностное натяжение воды и гидрофобный эффект) также участвуют в поддержании ультраструктуры клетки.

В настоящее время существует несколько стратегий, позволяющих предотвратить внутриклеточное льдообразование: переохлаждение, депрессия температуры замерзания, обезвоживание и стеклование [362, 528].

Недостатком переохлаждения, т.е. охлаждения жидкости ниже температуры кристаллизации без образования кристаллов, является неустойчивость переохлажденного раствора.

Для депрессии температуры замерзания (понижения температуры замерзания, вызванного растворением какого-либо вещества) необходима довольно высокая концентрация раствора, чтобы понизить температуру замерзания среды всего на несколько градусов.

В естественных условиях многие виды растений и животных, и в особенности их семена и споры, переживают замораживание с помощью клеточного обезвоживания. Обычно замораживание происходит вне клетки, поскольку там больше центров замерзания и внеклеточная среда имеет больший объем, чем внутриклеточный раствор. В процессе замораживания внеклеточные вещества концентрируются в небольшом количестве воды, которая остается незамерзшей. Более высокое осмотическое давление внеклеточного раствора «заставляет» воду покидать клетку (приводит к выходу воды из клетки). Обезвоживание повышает осмотическое давление внутриклеточного раствора (цитоплазмы), что снижает температуру его замерзания и способствует подавлению внутриклеточного образования льда. Обезвоживание само по себе может привести и к повреждению клетки [528].

Цель криобиологии заключается в обеспечении внутриклеточного стеклования, исключая при этом внутриклеточного образования льда и повреждения мембран [17, 362, 528]. Одним из решающих факторов развития внутриклеточного стеклования является скорость охлаждения. Охлаждение рассматривается как быстрое или медленное в зависимости от того, как изменение температуры соотносится со скоростью потери воды клеткой. При быстром охлаждении вязкость раствора резко возрастает, молекулярная диффузия фактически останавливается, что препятствует процессу кристаллизации [528].

При очень медленной скорости охлаждения клеток происходит существенное осмотическое сжатие, что может привести к летальному исходу клеток. При очень высоких показателях охлаждения осмотическое сжатие невелико, так что концентрация растворенного вещества в цитоплазме остается низкой. Это делает стеклование менее вероятным, а внутриклеточное замерзание – более вероятным. При умеренных скоростях (величина зависит от времени осмотического равновесия клетки и склонности ее цитоплазмы нуклеировать лед), некоторые нелетальные сжатия, приводящие к увеличению концентрации, настолько значительны,

что стеклование может произойти. Умеренное осмотическое сжатие может контролироваться с помощью иных средств, чем скорость охлаждения. Один метод заключается в двухступенчатом замораживании: клетки охлаждают до относительно высокой температуры замерзания и позволяют им сжаться, прежде, чем подвергнуть последующему быстрому охлаждению. Другой способ заключается в добавлении непроникающего криопротектора, т.е. внеклеточного раствора, который увеличивает внеклеточное осмотическое давление.

Ряд классических работ в области криобиологии [303, 369, 382, 383, 395] послужили экспериментальной базой для тех идей и концепций, которые были использованы для разработки современных (но далеко не полных) представлений о различных явлениях, связанных с криобиологией.

Теории (или гипотезы) криоповреждения, созданные в 50-70 гг 20 века, послужили прообразом и составной частью более поздних современных воззрений на процессы, лежащие в основе повреждения биологического материала при действии замораживания и отогрева.

Lovelock в своей основополагающей работе [369] при исследовании природы криоповреждения эритроцитов человека, находящихся в солевом растворе, установил три источника повреждения. Во-первых, действие NaCl в концентрациях, превышающих 0,8 моль/л, приводит к увеличению проницаемости клеточной мембраны для ионов натрия. Как последующее ресуспендирование таких эритроцитов (с более высокой внутриклеточной концентрацией натрия) в изотонической среде, так и их отогрев после замораживания сопровождается набуханием и последующим лизисом клеток. Во-вторых, действие NaCl в вышеуказанных концентрациях приводит к развитию чувствительности эритроцитов к тепловому и механическому шоку, причем этот механизм имеет значение только при температурах выше -10°C . В-третьих, лиотропное действие соли при использовании высококонцентрированных растворов NaCl (выше 3,0 моль/л) сопровождается разрушением эритроцитарной мембраны. Замена натрия

более лиотропными солями лития приводит к увеличению повреждения клеток. По мнению автора, этот механизм становится важным только ниже -10°C [369, 370].

Основываясь на выше приведенном экспериментальном материале, Lovelock сделал вывод, о том, что существует критическая область температур, в которой клетки необратимо повреждаются, если они остаются дольше, чем несколько секунд. Границы этого диапазона -3°C и -40°C для эритроцитов, суспендированных в 0,15 моль/л NaCl. Верхняя граница критической области представляет собой температуру замерзания 0,8 моль/л раствора NaCl, нижний предел – температура эвтектики для смеси солей и других веществ, присутствующих в эритроците. Кроме того, Lovelock связывал повреждающее действие электролитов с их лиотропным эффектом, поскольку при действии на клетки высококонцентрированных солевых растворов в надосадочной жидкости появлялись холестерин и мембранные фосфолипиды [369, 370, 407]. Исходя из этого, автор полагал, что повреждающее действие замораживания наилучшим образом можно исследовать, тестируя чувствительность клеток к гипертоническим растворам [371].

Meryman при попытке проверить концепцию солевого криоповреждения Lovelock сосредоточил свое внимание на «лиотропном» действии NaCl на эритроцитарную мембрану, по-видимому, рассматривая этот эффект в качестве главного компонента гипотезы Lovelock [395, 396]. Однако в рамках концепции, предложенной Lovelock, этот механизм является одним из трех различных механизмов повреждения. Кроме того, Lovelock отмечал важность лиотропного эффекта, когда концентрация хлорида натрия достигала 3 моль/л, а не 0,8 моль/л, в которой повреждение только начинает развиваться. Следует отметить, что Meryman не обратил должного внимания на первый механизм повреждения, реализация которого не зависит от каких-либо специфических свойств NaCl. В результате Meryman, недооценивая гипотезу Lovelock и даже отвергая ее, предложил,

основываясь на своих экспериментальных результатах, гипотезу минимального объема [303].

Meryman Н. Т [396] обнаружил, что эритроциты человека, находящиеся в растворах непроникающих веществ различной природы (электролиты и неэлектролиты), начинают повреждаться в средах, значение осмоляльности которых превышает 1300 мосмоль/кг. В этом случае наблюдается нарушение барьерных свойств эритроцитарных мембран, что проявляется в поступлении внеклеточных растворенных веществ в эритроциты, увеличении клеточного объема и гемолизе клеток при их охлаждении до 0°C или возвращении в изотонический раствор. Поскольку гемолиз эритроцитов в различных растворах начинался при одном и том же значении осмоляльности внеклеточной среды (выше 1300 мосмоль/кг), Meryman [396] предположил важность и значимость критического минимального объема эритроцитов в результате обезвоживания клеток в развитии их гемолитического повреждения

Эритроциты с пониженным внутриклеточным содержанием ионов K^+ (примерно на 50%) имеют меньший объем, чем клетки с нормальным содержанием внутриклеточных катионов при физиологическом значении осмоляльности (286 мосмоль/кг). Признаки повреждения мембраны эритроцитов, истощенных по K^+ , начинают проявляться в средах, значения осмоляльности которые в 2 раза ниже по сравнению с клетками с нормальным содержанием внутриклеточных катионов, но примерно при одинаковом объеме клеток. Проведенные расчеты показывают, что при гемолитическом объеме эритроциты, относящиеся к этим двум группам, имеют значительно различающиеся внутриклеточные концентрации катионов. Meryman делает вывод об отсутствии связи между внутриклеточной концентрацией катионов и повреждением клеток в процессе их обезвоживания. По мнению автора гипотезы "минимального клеточного объема" [396], гипертоническое повреждение эритроцитов связано с обезвоживанием и сжатием клетки до критического значения.

Эритроциты, клеточная вода которых на 50% замещена глицерином, повреждаются при таком же относительном объеме, как и клетки без криопротектора. Это свидетельствует о том, что повреждение клеточных мембран связано с уменьшением клеточного объема, а не с удалением воды [397].

Исходя из вышеизложенного, Meryman приходит к выводу о критическом гемолитическом объеме как основной причине гипертонического повреждения и криоповреждения клеток.

В процессе замораживании эритроцитов происходит рост внеклеточных кристаллов льда и, как следствие, концентрирование раствора. Эритроциты на постепенно увеличивающуюся концентрацию внеклеточного вещества отвечают потерей воды, уменьшением клеточного объема и развитием на мембране механического напряжения. При достижении некоторого предельного (критического) объема клетка не может ответить на рост осмоляльности дальнейшим его снижением, поэтому напряжение становится достаточным, чтобы вызвать внезапную потерю барьерных свойств мембраны и вход внеклеточных веществ. Предельное напряжение не связано с абсолютной концентрацией или особенностями внеклеточного растворенного вещества (при условии его нетоксичности), и не обусловлено характером внутриклеточного растворителя или концентрацией внутриклеточного раствора. Предельное напряжение на мембране зависит от минимального критического объема клетки, а не от объема удаленной из клетки воды [396]

Farrant и Woolgar [301] удалось показать, что минимальный объем, обнаруженный Meryman, на самом деле является артефактом гематокритного метода. Однако этот метод как техника для определения объема эритроцитов в неизотонических условиях был пересмотрен авторами работы [469]. Они установили, что с соответствующими поправками на захваченную плазму можно получить истинную меру объема клетки.

Развитие практической криобиологии нашло теоретическое обоснование в виде предложенной Mazur двухфакторной теории криоповреждения [382, 383], разработанной с использованием достаточно сложного математического аппарата.

Большинство зависимостей сохранности клеток от скорости охлаждения имеют оптимальные скорости охлаждения, обеспечивающие максимальную сохранность биологического материала. Это свидетельствует о том, что сохранность клеток определяется действием, по крайней мере, двух классов факторов, которые характеризуются противоположной зависимостью от скорости охлаждения. Повреждающее действие одного класса повышается с увеличением скорости охлаждения, а повреждающее действие другого класса уменьшается с увеличением скорости охлаждения.

Согласно теории Mazur [382, 383], основными повреждающими факторами при замораживании является действие на клетку гипертонических растворов и образование внутриклеточных кристаллов льда. Первый фактор приводит к гибели клеток при медленном замораживании, второй – опасен для клеток при быстром охлаждении.

Для предотвращения внутриклеточной кристаллизации необходимо снизить скорость охлаждения до такого значения, при котором переохлаждение недостаточно для инициации внутриклеточных кристаллов. Вместе с тем скорость замораживания не должна быть слишком медленной, поскольку следует стремиться сократить продолжительность неблагоприятного действия гипертонического раствора на клетки и предотвратить избыточное обезвоживание последних. Таким образом, оптимальными являются те скорости охлаждения, при которых совместное действие обоих факторов повреждения оказывает минимальный повреждающий эффект на биологический материал.

Важным выводом этой теории для практической криобиологии является то, что повреждение клеток при замораживании зависит от проницаемости клеточной мембраны для воды, что собственно и определяет

величины оптимальных скоростей замораживания для достижения высокой сохранности клеток. Таким образом, оптимальные условия замораживания того или иного типа клеток обычно подбирают экспериментально; при этом, конечно, эксперимент строится с учётом основных положений теории Mazur [382, 383].

Кроме того, следует отметить важность размеров биологических объектов для применения теории Mazur. Она хороша для объектов, радиус которых не превышает одного миллиметра и отношение площади поверхности к объёму имеет высокое значение. Границы использования данной теории ограничены предположением о линейности режима охлаждения.

В начале 70-х годов Farrant и его сотрудники на основании собственных исследований и с привлечением данных литературы сформулировали гипотезу «теплового шока». Феномен теплового шока (синонимы холодовой шок, гипертонический криогемолиз, гипертонический холодовой шок и др.) заключается в развитии повреждения эритроцитов, находящихся в гипертонических растворах, при охлаждении.

Farrant и Morris [303] вопреки мнению Lovelock [301], выдвинули гипотезу, в соответствии с которой явление теплового шока является одним из ведущих факторов криповреждения в процессе замораживания-отаивания. В рамках данной концепции [303] доминирующий эффект гипертонических растворов соли заключается в сенсibilизации клеточной мембраны к последующему охлаждению, возможно, за счёт дифференциального элюирования липидов, как ранее предположил Lovelock [369, 370]. Несмотря на то, что сжатие сопровождало индукцию теплового шока во время замораживания, авторы не рассматривали его в качестве основной причины развития чувствительности к охлаждению [303].

Morris [410], проверяя предположение Lovelock о связи явления теплового шока с частичной потерей фосфолипидов и холестерина мембранами эритроцитов [369, 370], показал отсутствие корреляции между

потерей мембранных липидов и гемолизом эритроцитов при их охлаждении в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl.

Результаты работы [277] показали, что как охлаждение до 0°C в гипертонических растворах (тепловой шок), так и замораживание до -196°C индуцируют проницаемость мембраны для сахарозы, натрия и калия. Подобные утечки не наблюдаются в гипертонических растворах, а их наличие (утечек) обусловлено стрессом в результате влияния снижения температуры на клетки, модифицированные гипертоническими средами. При медленном замораживании, следовательно, когда действие гипертоничности и снижения температуры происходят одновременно, термальный шок будет индуцировать повреждение при более низком значении осмолярности, чем то, которое необходимо для инициации утечки при постоянной температуре. Это подтверждается тем, что катионы и сахароза «текут» при охлаждении в среде с осмолярностью ниже 1800 мосмоль/кг [277], а при постоянной температуре утечка катионов (но не сахарозы) наблюдается при более высоких значениях осмолярности [302]. В работе показано, что гемолитическое повреждение клеток, охлажденных до 0°C в NaCl (1,2 моль/л), увеличивается с ростом скорости охлаждения. Кроме того, при этой скорости отмечается повышение входа натрия в клетки и выхода калия из них [277].

Pegg и Diaper [433], основываясь на оригинальной работе Lovelock [369], считали, что на самом деле, тепловой шок является слишком разрушительным, чтобы быть ответственным за повреждение эритроцитов при замораживании. Клетки, которые подвергались действию сенсibiliзирующих концентраций хлористого натрия при температуре из диапазона 20–37°C, а затем охлаждались, повреждаются в большей степени, чем клетки, которые были заморожены до температур, которые привели к тем же концентрациям. И, наконец, Takahashi и Williams [503] показали, что чувствительность эритроцитов к тепловому шоку индуцируется гипертоническим раствором натрия хлорида только в том случае, когда

экспозиция клеток осуществлялась при температуре выше 13°C. Во время же обычного замораживания клетки подвергаются действию гипертонических условий только при температурах ниже 0°C.

Суммируя вышесказанное, гипотезу Farrant можно представить в следующем виде. Во время медленного замораживания происходит формирование внеклеточного льда, в результате чего клетки подвергаются действию гипертонических растворов [369, 300]. Следствием такого контакта клеток с гипертоническими средами является развитие их чувствительности к последующему снижению температуры. Скорость охлаждения определяет продолжительность экспозиции клеточных мембран гипертоническим растворам и, следовательно, степень индуцированной чувствительности к повреждению. Снижение температуры при медленном замораживании обуславливает стресс, который повреждает клетки. Одним из проявлений этого повреждения является утечка катионов через клеточную мембрану. Кроме того, снижение температуры способствует повышению формирования льда и, как следствие, увеличению гипертоничности, что также будет оказывать влияние на клетки. Медленное замораживание, таким образом, имеет сходство с экспериментами по термальному шоку, за исключением того, что увеличивающиеся концентрации гипертонических растворов и снижение температуры действуют на клетки одновременно. На клетки оказывают влияние как внеклеточные, так и внутриклеточные гипертонические растворы, в результате чего, может происходить клеточное обезвоживание, поглощение внеклеточных растворенных веществ или образование внутриклеточного льда.

1.3. Изменение температуры и осмоляльности среды как основные факторы повреждения эритроцитов при замораживании

На разных этапах изучения проблемы криоповреждения в зависимости от доминирования тех или иных взглядов, порой взаимоисключающих,

рассматривались различные факторы в виде основных причин повреждения клеток при низкотемпературном консервировании. Анализ существующих концепций и гипотез, а также экспериментальных результатов [16, 17, 19, 24, 301] свидетельствует в пользу того, что в качестве основных факторов криоповреждения эритроцитов следует рассматривать гипертонический шок и гипертонический криогемолиз, которые действуют наряду с образующимися кристаллами льда при низкотемпературном консервировании [19, 509]. Хотя некоторые криобиологи [433] ставят под сомнение вклад ГК при криоконсервировании клеточных суспензий, однако можно утверждать, что в нарушение барьерной функции мембран в микрофазах льда и в последующее развитие гемолиза эритроцитов вносят вклад те физико-химические факторы, которые дестабилизируют клетку и в условиях ГК.

Понятие «стресс» было введено Селье Г. и рассматривалось как ответные реакции на любое сильное неблагоприятное воздействие (стрессовое воздействие) у животных и человека [159]. Позже указанный термин стали применять и широко использовать при изучении действия различных стрессовых факторов на клетки.

В настоящее время в литературе употребляют различные наименования стрессов: водный, осмотический, температурный и т. д. Правильнее называть внешние факторы, действующие на биологическую систему и вызывающие стресс, стрессорами или стрессовыми факторами, а стресс рассматривать как состояние объекта, формирующееся в ответ на их воздействие.

Гипертонический шок и гипертонический криогемолиз эритроцитов по своей сути являются стрессом, т.е. ответной реакцией клеток на воздействие стрессовых факторов: гипертонической среды и охлаждения в ней соответственно. Однако следует отметить, что в криобиологической литературе термины «гипертонический шок и гипертонический криогемолиз» часто используют как для обозначения собственно стрессовых факторов, так и для описания реакции клеток на их действие.

В работе [422] было исследовано методом ЭПР спектроскопии влияние гипертонических сред на состояние мембран эритроцитов при комнатной температуре. Автор не обнаружил существенных изменений текучести эритроцитарных мембран в средах с осмоляльностью в диапазоне от 300 до 3000 мосмоль/кг.

В то же время Takahashi с соавт. (1986) [261] при изучении методом ЭПР спектроскопии действия осмотического стресса на эритроциты человека установили, что при постоянной температуре подвижность спиновой метки в мембране падает при увеличении внеклеточной концентрации соли до 900 мосмоль/кг и не изменяется вплоть до 1800 мосмоль/кг.

Автор работы [155] изучал методом эктацитометрии влияние осмоляльности среды на упругую деформацию эритроцитов крысы. Максимальное значение индекса деформируемости эритроцитов ($0,24 \pm 0,013$) регистрировалось после инкубации этих клеток в изоосмоляльной среде (300 мосмоль/кг). При увеличении осмоляльности инкубационной среды до 450 мосмоль/кг наблюдалось постепенное снижение индекса деформируемости эритроцитов, причем в среде с осмоляльностью 450 мосмоль/кг отмечено двукратное снижение значения указанного параметра по сравнению с изоосмотическими условиями.

Информация о молекулярных механизмах, обеспечивающих чувствительность клеток к осмотическому стрессу, достаточно ограничена. Kinnunen [353], проанализировав факты о влиянии осмотического стресса на бинарные липидные смеси, сделал вывод о липидном бислое биологических мембран как осмотическом сенсоре.

Araki с соавторами [506] показали, что эритроциты человека, перенесенные в 4,0 моль/л NaCl, гемолизируют с образованием везикул. Микровезикулы со средним диаметром 200–300 нм имеют повышенное содержание холестерина, сфингомиелина и пониженное — фосфатидилэтаноламина. Снижение температуры, при которой образуются микровезикулы, вызывает изменение содержания как некоторых белковых,

так и липидных компонентов. Результаты работы показывают, что в процессе везикуляции происходит значительная, температуро-зависимая сегрегация мембранных компонентов.

Stokke с соавт. [496] развивали представление о мембранном скелете как двумерном белковом геле, состояние которого в значительной степени определяется условиями окружающей среды, в частности ее осмоляльностью. Так, при действии на клетки гипертонического шока происходит выход внутриклеточной воды, а также деформация компонентов цитоплазмы. Поэтому сопряжение между упругостью белковых филаментов и приложенным осмотическим стрессом (осмоупругое сопряжение) можно рассматривать в качестве фундаментальной основы механизма криоповреждения. По мнению авторов [25], при инкубировании эритроцитов в средах с осмоляльностью 500–800 мосмоль/кг происходит «объемная» дегидратация. При этом формируется стабильное состояние цитоскелета (вследствие повышения концентрации белка в объеме растворителя) и отсутствует упругая деформация его компонентов. При инкубировании эритроцитов в средах с более высоким значением осмоляльности происходит «структурная» дегидратация клетки, в результате чего система становится метастабильной. Система в этом состоянии обладает ограниченной устойчивостью и переходит под влиянием относительно слабых внешних воздействий в другие, более устойчивые состояния. Поэтому последующее изменение температуры или осмолярности внешней среды может приводить к срыву метастабильности и в нашем случае к развитию гемолитического повреждения (ГК или ГШ).

Эритроциты при перенесении в гипертонические среды деформируются по типу изгиба. При этом образуются мембранные участки сильного растяжения, которые представлены спикулами, и участки значительного сжатия, соответствующие сильно вогнутым участкам мембраны. Именно эти места изгибов и растяжений, где возникают неравномерные напряжения на плазматической мембране, могут

рассматриваться в качестве областей формирования трансмембранных гемолитических пор [19, 50]. При определенных значениях осмоляльности среды и продолжительности инкубации клеток (около 10 мин) изгибание плазматической мембраны может явиться причиной латерального перераспределения мембранных компонентов, что облегчает фазовое превращение в мембране и образование трансмембранных пор при последующем охлаждении.

Определенные значительные достижения в изучении эритроцитов на молекулярном уровне послужили основой для более тщательного изучения явлений ГК и ГШ с позиции роли в них цитоскелет-мембранного комплекса. Авторы работы [313] указали на участие температуро-индуцированных фазовых переходов мембранных липидов в механизме холодового гипертонического гемолиза, при этом предположили важность нарушения ассоциации мембрана-белок в гипертонической среде, предшествующего охлаждению. На роль белков в нормальной адаптации мембран при охлаждении указывают и результаты работы [333], в которой с помощью флуоресценции зонда АНС показаны сложные изменения конформации в структуре мембран в ходе различных экспериментальных этапов, ведущих к криогемолизу.

Green с соавторами [332] изучали роль цитоскелета в развитии гипертонического криогемолиза эритроцитов человека. Проведенные ими исследования, основанные на радиационно-индуцированном подавлении криогемолиза, показали необходимость для его развития нативных высокомолекулярных макрокомплексов порядка 16000000 Да. Выявленное в работах [332, 180] подавление криогемолиза эритроцитов в результате предварительной обработки клеток сульфгидрильным реагентом диамидом сопровождалось модификацией цитоскелетных белков. Полученные результаты позволили авторам [180, 332] сделать вывод об участии белков цитоскелета, включая, возможно, и их взаимодействие с фосфолипидами, в явлении гипертонического криогемолиза.

В работе [405] методом ЭПР спектроскопии с использованием жирорастворимого спинового зонда (16-dinyloxy stearic acid) показано наличие в эритроцитарной мембране термотропных структурных переходов при 8, 20 и 40°C. Переходы при 8 и 40°C обусловлены взаимодействием цитоскелетных белков с мембраной, в то время как 20 градусный переход связан исключительно с липидным компонентом.

При обработке эритроцитов глютаровым альдегидом или хлорпромазином наблюдалось как снижение уровня гипертонического криогемолиза, так и устранение 8 градусного перехода в эритроцитарной мембране. Это позволило авторам связать развитие повреждения эритроцитов при охлаждении клеток от 37 до 0°C в гипертонической среде с событиями, которые происходят при низкотемпературном переходе [405].

Minetti и Сессарини, предположив важную роль периферических белков в запечатывании мембраны [404], исследовали вклад белков цитоскелета в обеспечение структурного перехода в эритроцитарных мембранах при $8 \pm 1,5^\circ\text{C}$ [446]. Использование антител к белку 4.1 (но не к спектрину или белку полосы 3) приводило к исчезновению перехода при 8°C.

Эксперименты по дифференциальному экстрагированию цитоскелетных белков из эритроцитарной мембраны показали, что исчезновение температурного перехода при 8°C обусловлено экстрагированием белка полосы 4.1, в то время как связывание этого белка с везикулами, не содержащими его, сопровождалось восстановлением указанного перехода. Таким образом, результаты работы указывают на участие белка полосы 4.1 в реализации перехода при 8°C [404]

В работе [180] проведено электрофоретическое исследование белковых компонентов цитоскелет-мембранного комплекса эритроцитов, находящихся в гипертонических солевых средах (0,8 и 1,2 моль/л NaCl). Обработка клеток диамидом была произведена на этапе гипертонической инкубации клеток при 37°C с целью фиксации изменений в белковом скелете, вызванных высокими концентрациями солей. Электрофоретический анализ белков цитоскелет-

мембранного комплекса эритроцитов в условиях гипертонии показал элиминацию спектрина в высокомолекулярные агрегаты, а также снижение интенсивности белковых полос в области 4.1 и 4.2. Последнее свидетельствует о важной роли якорных белков в развитии чувствительности клеток к действию высококонцентрированных солевых сред.

Комплексные исследования гипертонического криогемолиза позволили установить связь событий, происходящих на клеточном и молекулярном уровнях (участие белка полосы 4.1 в поддержании дефектов структуры, которые образуются при термотропном переходе при 8°C). Участие белка полосы 4.1 в вышеуказанных процессах при гипертоническом криогемолизе и гипертоническом шоке не является удивительным, поскольку этот белок вносит свой вклад в образование как горизонтальных, так и вертикальных связей в цитоскелет-мембранном комплексе путем высокоорганизованной тонкой регуляция его сродства к другим компонентам мембраны [287].

При охлаждении эритроцитов, находящихся в изотонических растворах, до околонулевых температур не удалось выявить каких-либо существенных перестроек в эритроцитарных мембранах как методом ЭПР спектроскопии, так и методом замораживания-скалывания [261]. Однако при охлаждении клеток, предварительно проинкубированных в гипертонических растворах хлорида натрия и сахарозы (1800 мосмоль/кг), был показан резкий разрыв времени вращательной корреляции спиновой метки вблизи температуры 10°C, что свидетельствует, по мнению авторов, о фазовом превращении в мембране. При этой же температуре на замороженной-сколотой поверхности эритроцитарной мембраны наблюдалась значительная агрегация внутримембранных частиц на фоне «морщинообразования». Полученные результаты позволили авторам сделать вывод о том, что в мембране эритроцитов, находящихся в условиях ГК, происходит существенная структурная перестройка, которая, возможно, затрагивает и мембранный цитоскелет. Авторы полагают, что в процессе значительного обезвоживания эритроцитов в их мембранах образуются домены с

различным содержанием холестерина. В тех участках мембраны, в которых содержание холестерина уменьшается, структурное превращение становится более вероятным [261].

Повреждение эритроцитов при изменении осмотических и температурных условий среды (без кристаллизации жидкой фазы) связано с изменением структуры мембраны. Авторы работы [69] указали на определяющее значение исходного состояния плазматической мембраны в механизме холодового и осмотического повреждения эритроцитов. Они предположили, что механизм повреждения связан с начальным формированием дефектов в плазматической мембране, а последующий их рост и стабилизация при изменении условий среды обуславливает лизис клеток.

На основе всестороннего анализа собственных результатов и данных литературы авторы работы [18] предложили молекулярно-клеточную концепцию криоповреждения. Согласно концепции, основным механизмом повреждения клетки в условиях охлаждения, замораживания и отогрева является нарушение барьерных функций ее плазматической мембраны, проявляющееся в формировании трансмембранных дефектов, через которые осуществляется выход внутриклеточных компонентов. Появление и развитие трансмембранных дефектов может протекать в два этапа: при инкубировании клеток с осмотически активными соединениями (криопротекторы, соли) и при последующем охлаждении или замораживании-отогреве.

В качестве мест формирования трансмембранных дефектов рассматриваются границы раздела липидных доменов, находящихся в различном фазовом состоянии, причем в этот процесс, как предполагается в работе [163] вовлечены структурно-фазовые превращения фосфатидилэтаноламина, которые, по-видимому, регулируются холестерином и мембранными белками. Те физико-химические факторы, которые способствуют формированию небислойной структуры фосфатидилэтаноламина, будут приводить к нарушению барьерных свойств

мембраны в результате появления и развития мембранных дефектов. Для этого, в первую очередь, необходимо латеральное отделение данного фосфолипида от других липидных компонентов и нарушение его взаимодействия со спектрином.

Авторы работы [58] изучали морфологические особенности и кинетику изменения формы и гемолиза эритроцитов под действием ионофоров в изо- и гипертонических средах. Полученные в работе результаты позволили им предположить, что кренирование эритроцитов, наблюдаемое как в гипертонических солевых растворах под действием ионофоров, так и при холодовом шоке, имеет общую основу. При увеличении ионной силы цитогеля клеточная мембрана теряет изгибную устойчивость в результате нарушения барьерной функции, при этом происходит сокращение спектриновой сети вследствие экранирования зарядов спектрина и снижения электростатических взаимодействий.

При измерении эффективных значений коэффициента теплового расширения бислоя в зоне фазовых переходов некоторых синтетических и природных липидов [57] было установлено, что эти величины на один-два порядка выше значений, характерных для липидных бислоев в жидкокристаллическом состоянии. Поэтому авторы полагают, что изотермическая проницаемость бислоя в зоне фазового перехода определяется не наличием статистических дефектов упаковки молекул липида в области межфазных границ, а образованием динамических сквозных водных пор в жидкокристаллических доменах бислоя.

Обширный экспериментальный материал по проблеме гипертонического криогемолиза эритроцитов человека позволил сформулировать определенные закономерности на феноменологическом уровне, которые представлены в обобщенном виде в работе [52]. Попытки теоретического анализа явления ГК подготовили почву и нашли логическое завершение в работах, в которых представлены физический анализ

процессов, происходящих при гипертоническом криогемолизе, и теоретическая модель этого явления [51, 53, 90].

Чрезмерное обезвоживание эритроцитов в гипертонических растворах хлорида натрия (1,2 моль/л и выше) приводит к значительному увеличению эффективной вязкости внутриклеточного раствора гемоглобина, деформации клеточных мембран и латеральному разделению мембранных компонентов.

Изгибание клеточной мембраны при обезвоживании клеток происходит очень быстро, а затем в уже изогнутой мембране начинается более медленный процесс латерального перераспределения мембранных компонентов. Предполагается, что последнее способствует структурному превращению в этой мембране при последующем охлаждении клеточной суспензии. Структурное превращение в диапазоне температур 8–13°C может начинаться в тех участках мембраны обезвоженного эритроцита, которые обогащены фосфатидилэтаноламином, поскольку латеральная диффузия этого фосфолипида облегчена из-за его наименьшего сродства к холестерину.

Согласно этой теории [51, 53, 90], повреждение эритроцитов является результатом деформации, которая возникает в мембране клеток при обезвоживании и вследствие термотропного структурного превращения в ней, тогда как каждый из этих факторов не приводит к необратимому повреждению клеток в широком диапазоне скоростей охлаждения и концентраций внеклеточного гипертонического раствора. Численные эксперименты доказывают, что при определенных условиях (достаточно большие концентрации внеклеточного вещества и достаточно быстрые скорости охлаждения клеточной суспензии) в мембране эритроцита может образоваться макроскопический разрыв, что и приведет к необратимому повреждению клеток.

Таким образом, явление гипертонического криогемолиза вносит существенный вклад в общее повреждение эритроцитов при замораживании-оттаивании, когда внеклеточный раствор содержит только не проникающий в клетки криопротектор и охлаждение осуществляется с большой скоростью.

Данная модель гипертонического криогемолиза позволяет объяснить основные закономерности этого явления [52, 53, 90].

Выше приведенные факты, связанные с реализацией температурно-осмотических эффектов на эритроцитах человека, свидетельствуют о том, что они могут быть обусловлены определенными событиями, происходящими на различных уровнях организации биологического объекта – клеточном, мембранном и молекулярном (деление условное). Эффекты клеточного уровня представлены морфологическими изменениями клеток в гипертонических средах, а также обезвоживанием эритроцитов до минимального объема. События на уровне мембраны иллюстрируются ее деформацией, нарушением свойств полупроницаемости эритроцитарной мембраны и, как следствие, исчезновением градиента растворенных веществ на ней. Развитие событий на молекулярном уровне приводит к латеральной сепарации мембранных компонентов, термотропному структурному превращению в мембране при температуре 13–8°C, частичной потере эритроцитарными мембранами липидов и других ее компонентов, нарушению взаимодействия как внутри цитоскелета, так и между цитоскелетными белками и мембранными компонентами.

Эти эффекты как каждый в отдельности, так и при определенном сочетании (комбинации), поскольку события разного уровня организации и внутри него по своей сути связаны между собой, присутствуют в работах разных исследователей при обсуждении возможных причин и механизмов ГШ и особенно ГК. Несмотря на несомненный прогресс в понимании этих явлений, вопросов остается все же больше, чем ответов на них.

Представления, привлекаемые для обоснования возможных причин и механизмов явлений ГШ и ГК эритроцитов человека, нередко базируются, во-первых, на качественных оценках; во-вторых, на предположениях, полученных при изучении других клеток и модельных объектов, а затем перенесенных на эритроциты; в-третьих, на количественных оценках, полученных при изучении указанных явлений на изначально

модифицированных эритроцитах с целью изучения вклада того или иного компонента или системы в изучаемые явления.

Природа предоставила в качестве объекта для разнообразных экспериментальных исследований эритроцит, который в силу своей высокой дифференцируемости, направленной на обеспечение переноса кислорода, характеризуется, с одной стороны, в определенной степени упрощенностью строения (отсутствие ядра и внутриклеточных органелл), а с другой – доступностью в достаточном количестве. Эритроциты разных видов млекопитающих, характеризующиеся общностью строения и состава, имеют естественные отличия как по составу мембраны и цитоплазмы, так по функциональным характеристикам [47, 205, 218, 227, 294, 379, 493, 526].

Привлечение фактов, полученных при изучении ГК и ГШ эритроцитов разных видов млекопитающих, позволило бы с определенной долей вероятности определить значимость того или иного компонента или системы клетки в развитии ее чувствительности или же устойчивости к действию температурных и осмотических факторов внеклеточной среды. С другой стороны, подход с использованием эритроцитов млекопитающих полезен для установления особенностей и уточнения закономерностей развития ГК и ГШ этих клеток.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Получение эритроцитов млекопитающих

Для исследования использовали эритроциты, полученные из донорской крови человека (*Homo sapiens*), быка (*Bos taurus*), лошади (*Equus caballus*), собаки (*Canus familiaris*), кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и крысы (*Rattus norvegicus*), заготовленной на гемоконсерванте «Глюгидир». Кровь мужчин А (II)⁺ группы была предоставлена Харьковским областным центром службы крови. Кровь быка, лошади и собаки была предоставлена Харьковской государственной зооветеринарной академией, кролика и крысы – виварием Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

В качестве доноров крови были использованы здоровые половозрелые самцы животных, которые были иммунизированы, свободны от паразитов. Забор крови быка (2–4 года) и лошади (5–13 лет) осуществляли из яремной вены, собак (2–4 года) – из малой подкожной вены, кролика (8–16 мес.) – из ушной вены, крысы (6–12 мес.) – из хвостовой вены [47, 83]. Заготовку крови животных и все манипуляции проводили в соответствии с отечественными и международными биоэтическими нормами, материалами IV Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS 123) (Страсбург, 1986), и законодательными документами Украины по проведению экспериментов на животных. Эксперименты проводились в соответствии с методиками экспериментов, утвержденными на заседании Комитета по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

После удаления плазмы эритромассу трижды отмывали путем центрифугирования (центрифуга ОПн-ЗУ4.2, 3000 об/мин, 3 мин) в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант

удаляли аспирацией. Эритроциты хранили в виде плотного осадка не более четырех часов при температуре 0 °С. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 моль/л фосфатном буфере, pH 7,4

Исходную суспензию эритроцитов получали в результате добавления осадка клеток к физиологическому раствору в отношении 1 : 10.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методики модельных экспериментов по изучению влияния факторов криоповреждения на эритроциты млекопитающих.

Гипертонический шок эритроцитов млекопитающих (ГШ) осуществляли перенесением 50 мкл исходной суспензии клеток в 1,0 мл раствор NaCl (1,0–4,0 моль/л) при температуре 37°С или 0°С с последующей инкубацией в течение 5 мин. Конечный гематокрит – 0,4 %.

При изучении влияния предварительного обезвоживания эритроцитов на их устойчивость к гипертоническому шоку, 50 мкл клеточного осадка вносили в 0,5 мл раствора NaCl (0,15–2,0 моль/л) на 2 мин с последующим изотермическим перенесением 50 мкл полученной клеточной суспензии в 1,0 мл раствора, содержащего 4,0 моль/л NaCl, при температуре 37 или 0°С на 5 мин. Конечный гематокрит – 0,4 %.

Гипотонический лизис эритроцитов (ГЛ) осуществляли внесением аликвоты исходной суспензии клеток (50 мкл) в 1,0 мл раствора NaCl (40–120 ммоль/л) при температуре 37°С или 0°С на 5 мин. Конечный гематокрит – 0,4%.

Гипертонический криогемолиз эритроцитов (ГК) осуществляли следующим образом. 50 мкл клеточного осадка переносили в 0,5 мл раствора, содержащего разные концентрации NaCl (0,15–2,00 моль/л), на 10 мин при температуре 37°С (этап I). Затем из этой пробы 50 мкл суспензии эритроцитов переносили в 1,0 мл раствора NaCl той же концентрации, охлажденного до температуры 0°С, на 10 мин (этап II). Конечный

гематокрит – 0,4 %.

При изучении зависимости уровня ГК от продолжительности инкубирования при 37°C на первом этапе ГК продолжительность инкубирования клеток в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl, при 37°C составляла 10 или 120 мин. После чего аликвоту переносили в раствор NaCl той же концентрации, охлажденный до температуры 0°C, на 10 мин.

При исследовании зависимости уровня ГК эритроцитов в 1,2 моль/л NaCl от температуры инкубационной среды эксперимент проводили в 2-х вариантах: клетки охлаждали от разных значений температуры (из диапазона 5 ÷ 37°C) с шагом 5°C до 0°C либо клетки охлаждали от 37°C до разных значений температуры из диапазона 5 ÷ 37°C. Точность измерения температуры $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

2.2.2. Определение уровня и динамики гемолиза эритроцитов методом спектрофотометрии. Уровень гемолиза эритроцитов в результате стрессовых воздействий измеряли двумя способами.

1. Клетки осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 1000 g. Содержание вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрическим способом на спектрофотометре СФ-4А с проточной кюветой при длине волны 543 нм и выражали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов. За 100 % принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон Х-100 в концентрации 0,1 %.

2. Регистрацию динамики гипертонического гемолиза эритроцитов проводили на установке для измерения светорассеивания клеточных суспензий, созданной на базе монохроматора СФ-4А. Установка оснащена высокостабильным блоком питания лампы накаливания, усилителем фототока, магнитной мешалкой, позволяющей регулировать скорость перемешивания, вольтметром, самописцем и насосом для удаления жидкости из кюветы [55].

Уровень гемолиза эритроцитов как функцию времени определяли путем регистрации изменения во времени оптической плотности суспензии эритроцитов (длина волны 720 нм). Концентрация суспензии эритроцитов в кювете составляла $(1,7-3,5) \times 10^6$ кл/мл. В рассматриваемом концентрационном диапазоне оптическая плотность клеточной суспензии прямо пропорциональна количеству интактных клеток. Светорассеяние теней, образующихся в процессе лизиса эритроцитов, и поглощение света гемоглобином при указанной длине волны пренебрежимо малы [1]. Уровень гемолиза рассчитывали по формуле: Гемолиз = $(1 - A/A_0) \times 100\%$, где A – оптическая плотность исследуемого образца после завершения гемолиза A_0 – оптическая плотность контрольного образца, соответствующая 0% уровню гемолиза.

Скорость гемолиза эритроцитов определяли как тангенс угла наклона касательной, проведенной к кинетической кривой изменения оптической плотности суспензии эритроцитов, помещенных в высококонцентрированные солевые среды [55].

2.2.3. Метод определения гематокрита эритроцитов. Измерение величины гематокрита суспензии эритроцитов проводили по микрогематокритному методу [111] с помощью гематокритных капилляров (Radiometer, Denmark) и счётной линейки Janetsky (Germany). Стандартный гематокритный капилляр заполняли суспензией исследуемых эритроцитов на 7/8 высоты капилляра. Исходная суспензия была приготовлена в результате смешивания осадка эритроцитов и солевого раствора в отношении 1:4. После этого капилляры центрифугировали в течение 5 мин (микрогематокритная центрифуга МГЦ-8) со скоростью 8000 об/мин. Относительный объем эритроцитов (гематокрит) вычисляли, исходя из общей высоты столба жидкости в капилляре и высоты столба осевших эритроцитов.

2.2.4. Ионметрический метод определения ионов калия.

Ионметрический метод использовали для определения выхода ионов калия из эритроцитов в гипертонических средах [114]. Измерение проводили на ионметре универсальном ЭВ-74 с использованием ионселективного электрода ЭЛИС-121К и электрода сравнения ЭВЛ-1М3.1. Электрод сравнения заполняли насыщенным при 20°C раствором KCl с применением электролитического ключа, заполненного раствором 1 моль/л Li_2SO_4 . Калибровку электродной системы осуществляли непосредственно перед каждым измерением, в качестве калибровочных растворов использовали KCl с концентрацией от 10^{-5} до 10^{-1} моль/л. Измерение концентрации ионов K^+ проводили в суспензии эритроцитов (гематокрит 4 и 8%). В качестве контроля использовали суспензию эритроцитов в дистиллированной воде с соответствующим гематокритом, которую дополнительно подвергали многократному циклу замораживания-оттаивания для достижения 100% разрушения.

2.2.5. Атомно-абсорбционной спектрофотометрия. Эритроциты человека инкубировали с амфифильными соединениями (при использовании в эффективных концентрациях) в изотонических и гипертонических (4,0 моль/л NaCl) средах при 37°C в течение 10 мин. Концентрацию ионов калия, вышедших из эритроцитов человека в присутствии амфифильных соединений, определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии [148]. Измерения проводили на спектрофотометре С-115-М1 в режиме эмиссии при длине волны 766,5 нм, пламя пропан-воздух. Предел обнаружения 0,0008 мг/л. Для получения градуировочных растворов использовали соли NaCl и KCl квалификации «осч», после испарения воды при 120 °C. Градуировку перед измерением проводили с использованием градуировочных растворов, содержащих 0; 0,5; 1,0; 4,0; 10,0; 15,0; 20,0 мг/л калия. Для подавления ионизации калия все градуировочные растворы содержали 50 мг/л натрия. Разбавление исследуемых проб

проводили таким образом, чтобы концентрации разбавленных растворов соответствовали диапазону калибровки, затем эти разбавления учитывали в пересчете.

2.2.6. Капиллярный электрофорез. Эритроциты в растворе, содержащем 1,2 моль/л NaCl, инкубировали при температуре 37°C в течение 10 и 120 мин. По завершению инкубационного периода пробы дважды центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин и тщательно удаляли надосадок. Аликвоту осадка гемолизировали в дистиллированной воде, с помощью ТХУ осаждали белки на холоду, после чего в надосадке определяли концентрацию катионов Na^+ с помощью метода капиллярного электрофореза [92, 147]. В работе использовали установку капиллярного электрофореза «Капель-103Р» (НПФ «Люмэкс», Санкт-Петербург, Россия) с фотометрическим детектором (254 нм) и кварцевым капилляром диаметром 75 мкм, общей длиной 60 см и эффективной – 50 см.

Ввод пробы осуществляли пневматически давлением 30 мбар в течение 5 мин. В процессе анализа применяли напряжение +15 кВ, общее время анализа 10 мин. В состав ведущего электролита входили бензимидазол 6 ммоль/л (поглощающий катион) и винная кислота 2,5 ммоль/л. Для калибровки применяли водные растворы натрия в концентрациях 0,5–50 мг/л.

2.2.7. Исследование состояния липидного бислоя и барьерной функции мембран эритроцитов методом ЭПР спектроскопии. Структурно-динамическое состояние мембран эритроцитов исследовали методом ЭПР спиновых зондов с помощью спин-меченых жирных кислот, имеющих нитроксильные фрагменты в различных положениях вдоль гидрофобной цепи: амида пальмитиновой кислоты (АПК), 5-доксилстеариновой кислоты (5-ДС) и 16-доксилстеариновой кислоты (16-ДС). Спин-меченая суспензия эритроцитов (порядка 10^9 кл/мл) содержала 5×10^{-5} моль/л зонда (не более 2% спирта). Для определения локализации 16-ДС в мембране использовали

уширяющий агент феррицианид калия (0,1 моль/л). Барьерную функцию мембран контролировали методом добавочного уширения с использованием водорастворимого зонда 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил (ТЕМПОН) в комбинации с феррицианидом калия, не проникающим в нативные эритроциты (конечные концентрации 0,001 и 0,1 моль/л соответственно) [105, 412]. Последовательность добавления спиновых зондов и феррицианида калия к клеточной суспензии была следующей: к контрольным или модифицированным ХПР клеткам добавляли раствор зонда 16-ДС, затем исследовали доступность липидного зонда феррицианиду, который добавляли к меченой суспензии. Барьерные свойства изучали на этих образцах после добавления зонда ТЕМПОН. Изменение количества клеток с неповрежденными мембранами оценивали с помощью эмпирического параметра $h_k/h_{хпр}$, характеризующего изменения интенсивности центральной компоненты спектра ЭПР зонда ТЕМПОН в суспензии клеток, содержащей различные концентрации хлорпромазина, по отношению к контролю.

Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре «Bruker» со стандартной термоприставкой.

Частоту вращательной подвижности зондов, а также параметр анизотропии спектров вычисляли, как описано [104]. В качестве эмпирического параметра упорядоченности использовали разность значений максимального и минимального расщепления спектра ЭПР липидного зонда [110].

2.2.8. Оценка нарушения асимметрии мембраны эритроцитов методом проточной цитофлуориметрии. Для оценки числа эритроцитов с нарушенной асимметрией клеточной мембраны использовали набор Annexin V-FITC-kit («Becton Dickinson», США), включающий аннексин V, конъюгированный с флуорохромом – флюоресцеинизотиоционатом (Annexin V-FITC), и рабочий раствор буфера для окрашивания. Клетки ресуспендировали в указанном

растворе буфера для окрашивания до концентрации 1×10^6 кл/мл. В соответствии с Annexin V-FITC протоколом для окрашивания, к 100 мкл клеточной суспензии (1×10^6 кл/мл) добавляли 5 мкл Annexin V – FITC, перемешивали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. По истечению времени инкубирования в каждую пробирку добавляли по 400 мкл рабочего раствора буфера для окрашивания и проводили измерение на проточном цитофлуориметре FACS Calibur («Becton Dickinson», США) в течение 1 часа.

Интенсивность флуоресценции измеряли на флуоресцентном канале FL1 при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны испускания 530 нм. Количество аннексин-меченных клеток определяли в нижнем правом квадранте. Для минимизации ошибки в пробе анализировали 100000 событий. Результаты измерения оценивали с помощью программного обеспечения фирмы Becton Dickinson – CELLQuest Pro.

2.2.9. Исследование морфологии эритроцитов методом световой микроскопии. Изучение морфологических особенностей эритроцитов млекопитающих проводили методом световой микроскопии на микроскопе STUDAR E (производство Польша) с фотографической регистрацией морфологической картины крови цифровой фотокамерой CANON PowerShot A510. Реакцию клеток на введение амфифильных соединений оценивали в капле, которую помещали между предметным и покровным стеклом и равномерно распределяли тонким слоем. При этом эритроциты находились во взвешенном состоянии, что позволяло всесторонне наблюдать за формой клетки, начиная с 30 сек. реакции. Для морфологической оценки особенностей формы и поверхностной архитектоники эритроцитов использовали общепринятую классификацию, приведенную в работе Bessis [232].

2.2.10. Осмометрия. Определение осмоляльности растворов проводилось с помощью осмометра ОМКА 1Ц-01 (Украина, Одесса).

Определение осмоляльности основано на измерении температуры замерзания исследуемого раствора. В кювету прибора помещается 200 мкл исследуемого раствора. В холодильнике прибора жидкость охлаждается до температуры ниже, чем температура замерзания. Под действием вибрации в переохлажденной жидкости возникают первичные очаги кристаллизации, и идет процесс замерзания. При этом выделяется скрытая теплота кристаллизации и температура пробы повышается до температуры замерзания, которая определяется терморезистором типа СТЗ-14. Индикация осуществляется в единицах концентрации – ммоль/кг.

2.2.11. Рефрактометрический метод. Концентрации приготовленных растворов контролировали с помощью метода рефрактометрии [153], основываясь на табличных данных, в которых приведены показатели преломления растворов с известной концентрацией, и при необходимости пользуясь интерполированием экспериментальных данных.

2.2.12. Методика использования криопротекторов (полиэтиленоксид-1500 и глицерин) при гипертоническом шоке эритроцитов. Эритроциты млекопитающих помещали в растворы, содержащие полиэтиленоксид со средней молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500) в концентрациях от 5 до 20%, на 2 мин при температуре 37 или 0°C, после чего эти клетки подвергали гипертоническому шоку путем изотермического перенесения в 4,0 моль/л NaCl, на 5 мин (гематокрит 0,4%). Растворы криопротекторов были приготовлены на физиологическом растворе (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4).

При использовании проникающего криопротектора глицерина постановка эксперимента была следующая.

Клетки (гематокрит 8%) инкубировали в средах, содержащих 0,15–0,8 моль/л NaCl, в течение 2 мин (этап предварительного инкубации), после чего их подвергали гипертоническому стрессу перенесением в раствор,

содержащий 4,0 моль/л NaCl (гематокрит 0,4%), на 5 мин (этап гипертонического гемолиза). Температурный режим 37 или 0°C. Глицерин (0,5, 1,0 и 2,0 моль/л) присутствовал в средах на этапе предварительной инкубации клеток. Количество гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически ($\lambda=543$ нм) и выражали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии детергента тритона X-100 (0,1%).

2.2.13. Механический шок эритроцитов. Клетки подвергали действию механического шока путем перемешивания клеточной суспензии, помещенной в емкость, заполненную пластиковыми шариками диаметром 5 мм, при комнатной температуре (22°C). Перемешивание осуществлялось с помощью магнитной мешалки ММ-5, скорость вращения – 1200 об/мин. Гематокрит составлял 20%. Через различные временные интервалы (5–60 мин) производили отбор суспензии эритроцитов для определения выхода гемоглобина и ионов калия из клеток.

2.2.14. Ферментативная обработка эритроцитов. Обработку эритроцитов человека папаином проводили по методу [349]. Клетки (гематокрит 20%) инкубировали с папаином (1 мг/мл) в физиологическом растворе (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4) при 37°C в течение 60 мин, после чего отмывали однократно физиологической средой, содержащей сывороточный альбумин человека (0,1%) и фенилметилсульфонил фторид (30 мг/мл), и дважды холодным физиологическим раствором.

Обработку эритроцитов трипсином или проназой проводили согласно методу, описанному в работе [329]. Клетки (гематокрит 20%) инкубировали с трипсином (0,1 мг/мл) или проназой (0,1 мг/мл) в среде, содержащей 75 ммоль/л KCl, 50 ммоль/л Na₂SO₄, 40 ммоль/л сахарозу, 10 ммоль/л N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES), pH 7,4,

в течение 60 мин при 37°C. По завершению инкубационного периода клетки отмывали от трипсина однократно физиологическим раствором (0,150 моль/л NaCl, 0,010 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4), содержащим соевый ингибитор трипсина (0,1 мг/мл), и дважды холодным физиологическим раствором. От проназы клетки отмывали однократно физиологическим раствором (0,150 моль/л NaCl, 0,010 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4), содержащим фенилметилсульфонил фторид (1 ммоль/л), и дважды холодным физиологическим раствором.

Обработку эритроцитов (40 % гематокрит) нейраминидазой (*Vibrio cholerae* 5,5 U/ml enzyme protein (Serva)) проводили по методу [272]. Эритроциты инкубировали с ферментом в физиологической среде, содержащей глюкозу в концентрации 1 мг/мл, в течение 60 мин при 37°C в условиях постоянного перемешивания. По завершении времени инкубирования эритроциты трижды отмывали холодным физиологическим раствором.

2.2.15. Истощение эритроцитов по АТФ. Истощение клеток по АТФ проводили по методу [217]. Эритроциты инкубировали в физиологической среде (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4), содержащей 10 ммоль/л 2-дезоксиглюкозу, в течение 2 ч при 37°C. Контролем служили клетки, проинкубированные в течение 2 ч при 37°C без добавления 2-дезоксиглюкозы.

2.2.16. Вычисление максимальной антигемолитической активности, размеров плато и эффективных концентраций амфифильных соединений. Для того чтобы оценить и сравнить эффективность действия исследованных амфифильных соединений в условиях ГШ и ГК эритроцитов млекопитающих использовали понятие максимальной антигемолитической активности. Антигемолитическую активность амфифильного соединения выражали как

процент снижения гемолиза клеток в присутствии веществ по отношению к гемолизу в пробе, не содержащей амфифил.

Значение максимальной антигемолитической активности ($AG_{\text{макс}}$) амфифильного соединения рассчитывали по формуле:

$$AG_{\text{макс}} = \frac{k - a}{k} \times 100 \% \quad (2.2), \text{ где}$$

k – величина гемолиза эритроцитов в отсутствии амфифильного вещества;

a – минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии амфифильного вещества.

Значение максимальной антигемолитической активности ($AG_{\text{макс}}$) амфифильного соединения представляет собой среднюю арифметическую величину из полученных значений $AG_{\text{макс}}$ исследуемого соединения.

Плато определяли как диапазон концентраций амфифильного соединения, в пределах которого наблюдается минимальный уровень гемолиза эритроцитов, а эффективную концентрацию ($C_{AG_{\text{макс}}}$) – как концентрацию вещества, соответствующую середине плато.

2.3. Статистический анализ данных

При оценке результатов исследования, мы придерживались принципов статистического анализа медико-биологических данных и рекомендаций, изложенных в работах [48, 152, 160]. Статистическую обработку полученных числовых материалов и все виды анализа результатов проводили с помощью программы «Statistica» (версия 6.0). Экспериментальные данные представлены как среднее арифметическое значение количественных показателей (M) $\pm$ стандартная ошибка среднего арифметического (m) или как медиана результатов (Me) и степень рассеяния в виде интерквартильного интервала ($Q1-Q3$). Количество повторений в серии эксперимента была не менее 6 в двух параллельных пробах. Для проверки совпадения

распределения исследуемых количественных показателей в группах с нормальным распределением использовали критерий Шапиро-Уилки. При распределении исследуемых числовых показателей, отличным от нормального распределения, для проверки статистической значимости различий применяли критерии Манна-Уитни. При нормальном распределении исследуемых числовых показателей статистическую значимость различий проверяли с помощью непарного критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ или $p < 0,01$. Корреляционный анализ с использованием непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s) применяли для анализа связей между исследуемыми показателями. Критический уровень значимости (p) составлял 0,05.

2.4. Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: децилсульфат натрия, додецилсульфат натрия («СинтезПАВ», Россия), трифторперазин, 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил, 5-доксилстеариновая кислота, 16-доксилстеариновая кислота, 2-дезоксиглюкоза («Sigma», США), хлорпромазин гидрохлорид, додецил- β ,D-мальтозид, гексил- β ,D-глюкопиранозид, октил- β ,D-глюкопиранозид, децил- β ,D-глюкопиранозид, проназа, трипсин («Calbiochem», США), амид пальмитиновой кислоты («Reanal», Венгрия); тритон X-100, папаин («Merck», Германия), нейраминидаза, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота («Serva», Германия) и реактивы отечественного производства квалификации «хч» и «чда».

Концентрации амфифильных веществ в стоковых растворах (в ммоль/л) были следующие: децилсульфат натрия – 14, додецилсульфат натрия – 8, додецил- β ,D-мальтозид – 1,8, гексил- β ,D-глюкопиранозид – 1610,

октил- β ,D-глюкопиранозид – 268, децил- β ,D-глюкопиранозид, – 22,
хлорпромазин – 40, трифторперазин – 30.

ГЛАВА 3

ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ШОК И ГИПОТОНИЧЕСКИЙ ЛИЗИС ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Под термином «криоповреждение» понимают повреждение биологического материала, которое развивается в процессе замораживания и последующего отогрева. Процесс кристаллизации водной фазы, происходящий при замораживании, приводит к повреждению, о котором можно говорить, как о специфическом, а нарушение, обусловленное действием сопутствующих факторов (изменение осмолярности, ионной силы, pH среды и др.), характеризуется неспецифичностью.

Поскольку криоповреждение является суммарным результатом действия различных факторов, для оценки криобиологических процессов является более важным выяснение роли того или другого фактора по степени его вклада в общий уровень повреждения, а не по уровню его специфичности. Действие факторов криоповреждения может быть оценено в «модельных» экспериментах, которые проводятся при положительных температурах, когда отсутствует кристаллизация водной фазы.

В качестве одного из основных факторов повреждения биологического материала при замораживании рассматривают гипертонию, поскольку в процессе вымораживания свободной воды происходит значительное концентрирование внеклеточной среды [362, 528]. Поэтому для оценки вклада гипертонического фактора в общее криоповреждение клеток используют гипертонический шок, который осуществляют перенесением эритроцитов в гипертоническую среду при положительных температурах.

Для изучения явления гипертонического шока эритроцитов млекопитающих, клетки переносили в среды, содержащие различные концентрации NaCl при температуре 37°C (рис. 3.1). В достаточно широком диапазоне концентраций NaCl (при инкубировании в течение 5 мин) клетки не повреждаются.

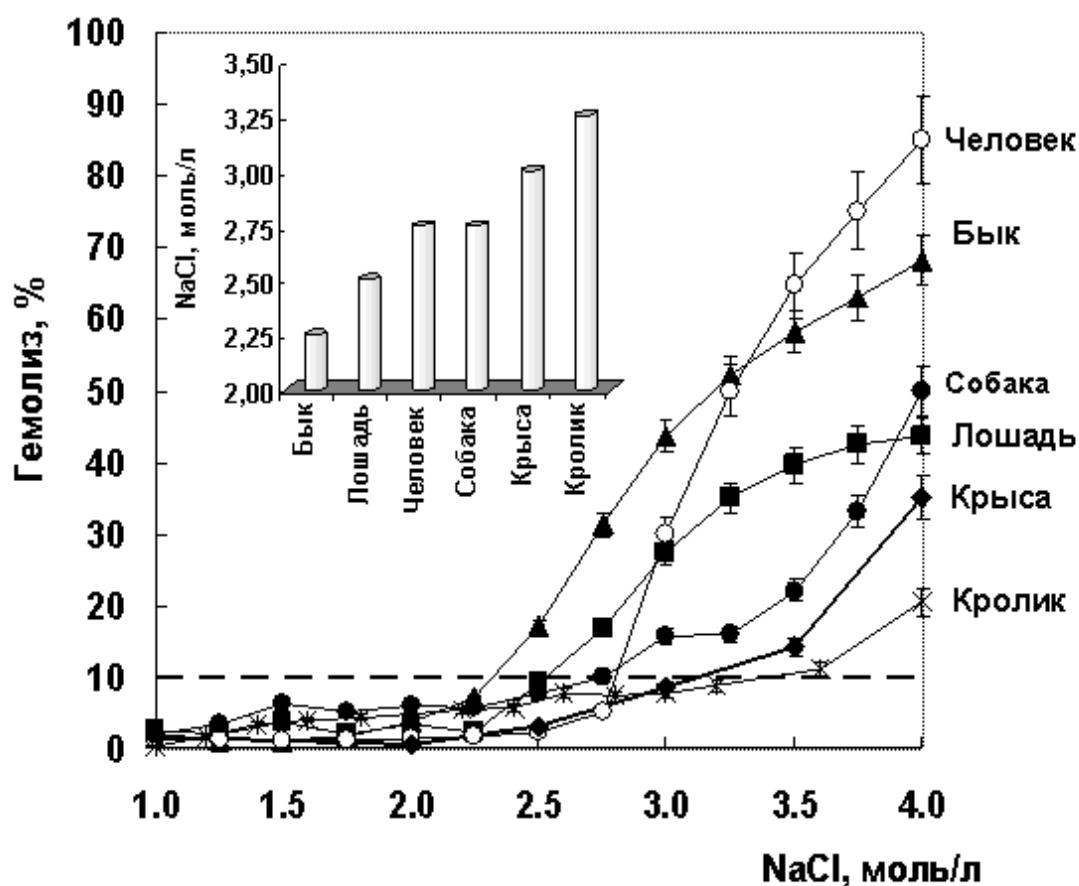


Рис. 3.1. Зависимость уровня гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих от концентрации NaCl в среде при температуре 37°C. Продолжительность инкубирования 5 мин.

— — — — 10% уровень гемолиза.

Вставка. Пороговые концентрации NaCl эритроцитов млекопитающих в условиях ГШ.

Пороговые концентрации NaCl, т.е. максимальные концентрации солевого раствора, в которых уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих не превышает 10%, представлены на вставке рис. 3.1. Видно, что эта величина для эритроцитов человека составляет 2,75 моль/л NaCl, что согласуется с результатами работы [109], и занимает промежуточное положение между значениями этого параметра для клеток крысы и кролика, с одной стороны, и для эритроцитов быка и лошади, с другой. Увеличение

концентрации соли в среде выше значений пороговых концентраций приводит к развитию гипертонического гемолиза клеток млекопитающих, выраженному в различной степени. Сравнение уровня гемолиза эритроцитов млекопитающих в высококонцентрированной солевой среде (4,0 моль/л NaCl) при 37°C (рис. 3.1) свидетельствует о более высокой гипертонической чувствительности эритроцитов человека по сравнению с клетками животных. В указанных условиях степень гемолитического повреждения эритроцитов человека в 4,25 раза выше по сравнению с гипертонически устойчивыми клетками кролика.

При температуре инкубационной среды 0°C наблюдается снижение уровня гипертонического гемолиза эритроцитов всех исследуемых млекопитающих по сравнению с 37°C (рис. 3.2). Наиболее выражено снижение для клеток лошади и быка в $3 \div 5$ раз, в то время как для эритроцитов остальных млекопитающих – в $1,3 \div 1,6$ раза. При 0°C минимальный уровень гемолиза характерен для эритроцитов быка, лошади и кролика (~5%), максимальный – для клеток человека. Таким образом, обобщая результаты, представленные на рис. 3.2, можно говорить о том, что независимо от температуры наиболее чувствительными к гипертоническому шоку являются клетки человека, наименее – эритроциты кролика.

Если при замораживании биологического материала происходит концентрирование внеклеточного раствора в результате вымораживания свободной воды, то при размораживании наблюдается обратный процесс – снижение значений осмолярности среды вследствие таяния льда. Кроме того, на этапах удаления криопротектора из суспензии после замораживания-отогрева и трансфузии деконсервированного биоматериала в организм реципиента клетки начинают контактировать с растворами, осмотическое давление которых ниже внутриклеточного. Таким образом, постгипертонический лизис можно рассматривать в качестве одного из ведущих факторов повреждения клеток на конечном этапе цикла их криоконсервирования.

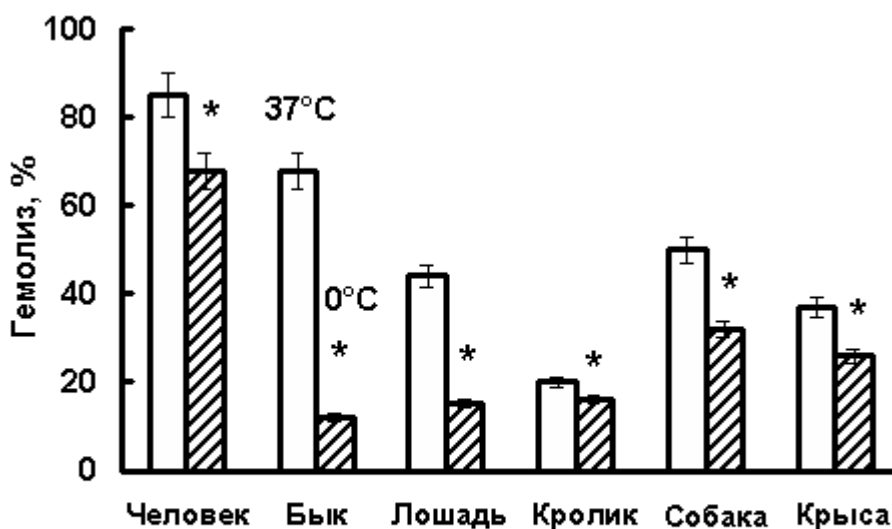


Рис. 3.2. Гипертонический гемолиз эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, при температуре 37 и 0°C.

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с показателями гемолиза клеток, инкубированных при 37°C ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 9.

В физиологических условиях эритроциты подвергаются перепаду осмотического давления при прохождении через мозговое вещество почек: сначала клетки находятся в условиях гипертонации, после чего они подвергаются влиянию снижающегося осмотического давления до достижения изотонического уровня, характерного для кровеносного русла [166].

В определенной степени влияние снижения осмолярности сред на целостность клеток находит свое отражение при изучении гипотонического лизиса эритроцитов. На рис. 3.3 представлены зависимости гипотонического гемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих от концентрации NaCl в среде при температуре 37 и 0°C. В целом, при 37°C характер зависимостей сходен для всех эритроцитов, однако имеются и некоторые видовые различия.

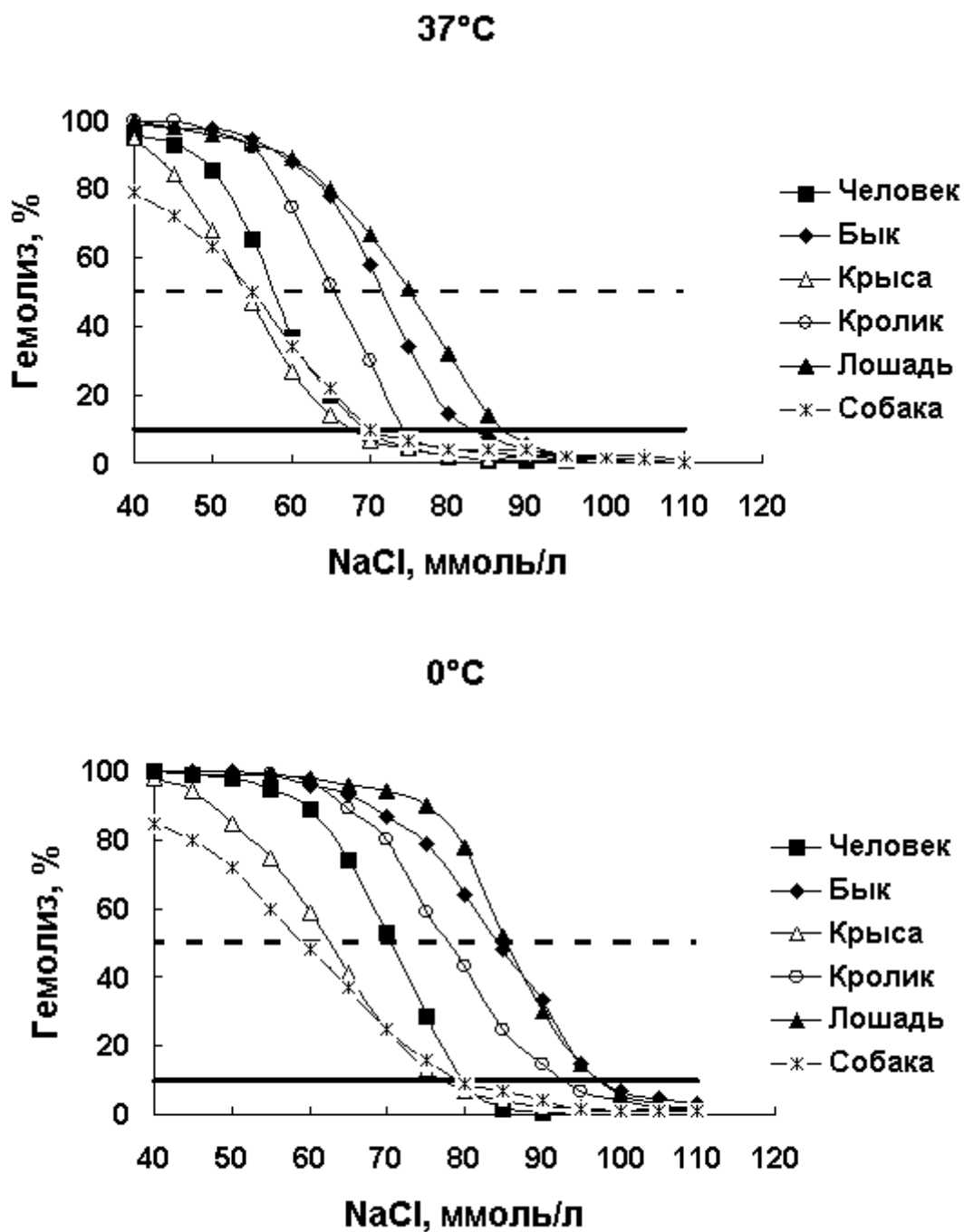


Рис. 3.3. Гипотонический гемолиз эритроцитов млекопитающих при температуре 37 и 0°C. Продолжительность инкубирования 5 мин.

— 10% уровень гемолиза; - - - 50% уровень гемолиза.

Эритроциты лошади, быка и кролика начинают лизировать в средах с более высокими значениями осмоляльности, чем клетки человека, собаки и крысы, что согласуется, в общем, с данными, представленными в работе [262]. Следует отметить, что в литературе представлена достаточно противоречивая

информация по поводу гипотонической чувствительности эритроцитов крысы. В частности, в работе [380] указано, что клетки крысы весьма чувствительны к гипотонии, в то время как авторы работы [262] говорят о высокой гипотонической устойчивости эритроцитов этого животного. При термальном гемолизе, который развивается при инкубировании эритроцитов в 0,15 моль/л NaCl при 55°C, эритроциты крысы достигают 50%-ого уровня разрушения за 30 мин, в то время как для аналогичного разрушения клеток лошади, козы, быка и овцы необходимо более продолжительное инкубирование (50, 100, 120 и 150 мин соответственно) [347]. Вероятно, отмеченные расхождения связаны с различными экспериментальными условиями (как по температуре и составу среды, так и по продолжительности инкубирования). Кроме того, следует отметить, что эритроциты крысы весьма чувствительны к механическому стрессу [164], что, несомненно, может вносить свой вклад в гипотоническую устойчивость клеток, которые выделяли из цельной крови в различных условиях.

В среде, содержащей 40 ммоль/л NaCl, максимальный уровень повреждения наблюдается для эритроцитов лошади, кролика и быка, минимальный – для клеток собаки. Тот факт, что эритроциты собаки лизируют в достаточно широком концентрационном диапазоне NaCl, позволяет говорить об их значительной гетерогенности по чувствительности к гипотоническим средам, в то время как для эритроцитов человека характерна наибольшая синхронность гипотонического повреждения.

При температуре 0°C (рис. 3.3) в среде с концентрацией NaCl 50 ммоль/л максимальное повреждение наблюдается не только для эритроцитов лошади, кролика, быка, но и человека. Наибольшая устойчивость к гипотоническому лизису характерна для клеток собаки.

Из концентрационных зависимостей гипотонического гемолиза эритроцитов млекопитающих при 37 и 0°C были определены значения пороговой концентрации NaCl (т.е. максимальная концентрация соли, после которой наблюдается увеличение уровня гемолиза клеток, превышающее

10%) и величины индекса осмотической хрупкости (концентрация NaCl, в которой регистрируется 50% повреждение клеточной суспензии) и представлены на рис. 3.4.

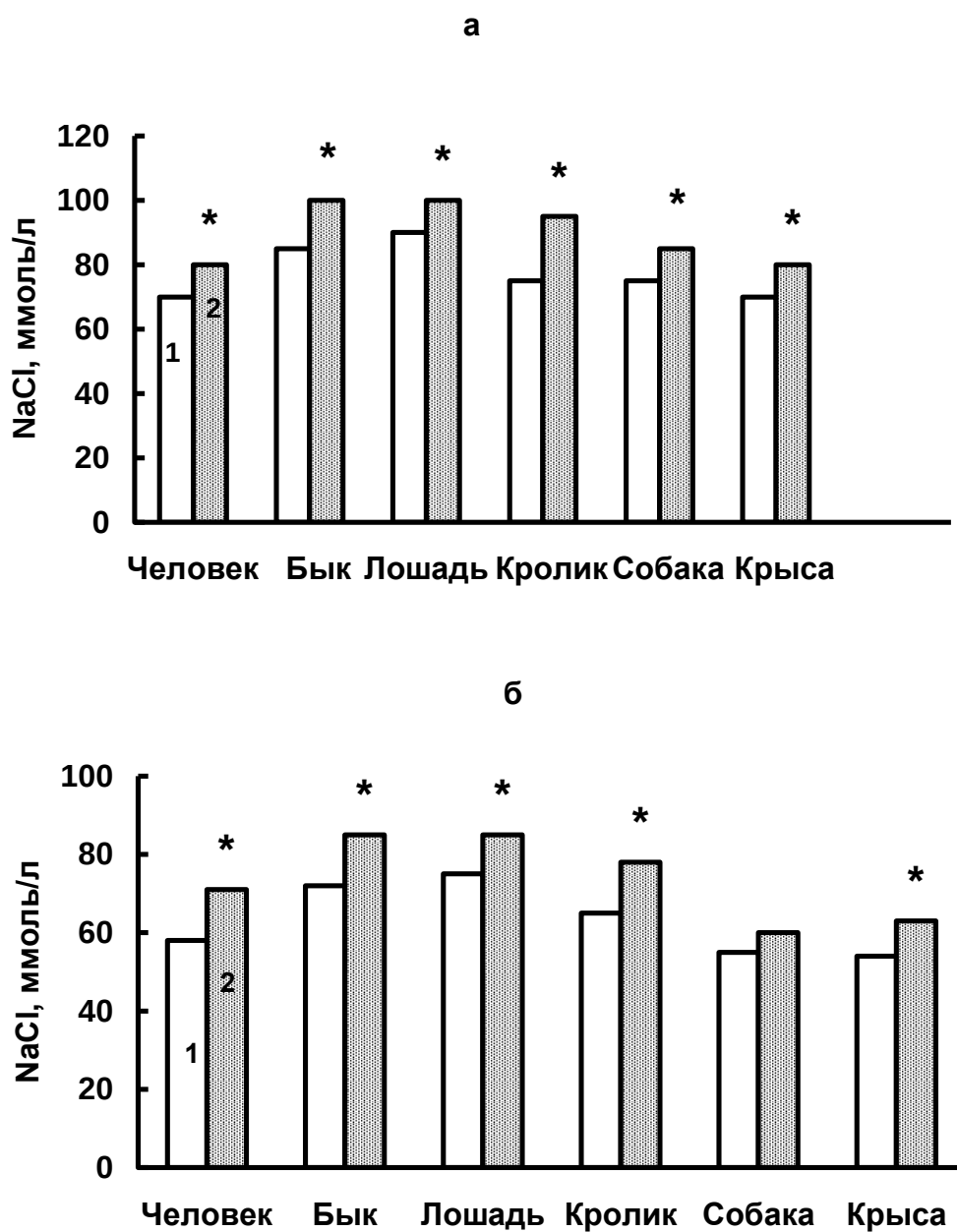


Рис. 3.4. Значения пороговых концентраций (а) и индексов осмотической хрупкости (б) эритроцитов млекопитающих при гипотоническом гемолизе при 37 (1) и 0°C (2). Продолжительность инкубирования 5 мин.

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с показателями клеток, инкубированных при 37°C ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 7.

Видно, что при низкой температуре эти показатели (значения пороговой концентрации NaCl и величины индекса осмотической хрупкости) сдвигаются в область более высоких концентраций NaCl для эритроцитов всех видов млекопитающих. Исключением является индекс осмотической хрупкости эритроцитов собаки, для которого показана правильность нулевой гипотезы, т.е. отсутствие различий между величинами, полученными при 37 и 0°C. Следовательно, индекс осмотической хрупкости эритроцитов собаки не зависит от температуры.

Выявленная температурная зависимость гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих (рис. 3.3 и 3.4) подтверждается и результатами работы [470]. Таким образом, клетки разных видов млекопитающих легче переносят гипотоническую нагрузку при 37°C.

При сравнении влияния температуры на два вида стресса: гипертонический шок (рис. 3.1 и 3.2) и гипотонический лизис эритроцитов млекопитающих (рис. 3.3 и 3.4), – следует отметить, что эффект температуры в большей степени выражен в первом случае. Таким образом, фактором, определяющим в значительной степени уровень повреждение клеток в высококонцентрированных солевых средах, является температура.

В основе лизиса эритроцитов под действием различных стрессовых факторов лежат процессы формирования и стабилизации мембранных дефектов. Осмолярность среды контролирует процессы, связанные с формированием трансмембранных дефектов [24]. Дальнейшая их эволюция, приводящая к формированию стабильной поры, зависит от температуры инкубации [361]. При 0°C процесс формирования поры затруднен (из-за усиления липид-липидных и липид-белковых взаимодействий) в отличие от 37°C. Этим можно объяснить тот факт, что при 37°C гипертонический лизис клеток достигает больших значений по сравнению с аналогичными величинами при 0°C (рис. 3.2) и наблюдается при меньших значениях приложенного осмотического стресса, чем при низкой температуре (рис. 3.5).

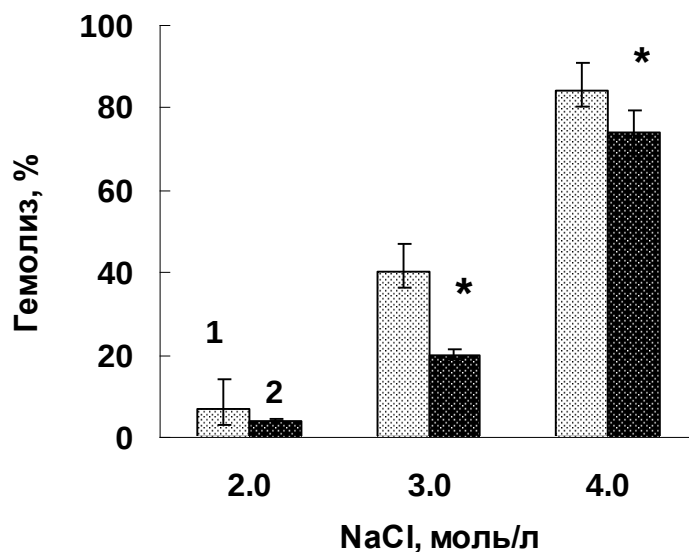


Рис. 3.5. Уровень гемолиза эритроцитов человека в гипертонических средах при 37 (1) и 0°C (2). Продолжительность инкубирования 5 мин.

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с показателями гемолиза клеток, инкубированных при 37°C ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 21.

Кроме того, скорость гипертонического лизиса эритроцитов человека в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, увеличивается в 2,5 раза с ростом температуры в диапазоне 5–20°C (рис. 3.6).

Результаты, полученные при изучении разных видов стресса эритроцитов млекопитающих, а именно гипотонического гемолиза и гипертонического шока, свидетельствуют о различной чувствительности клеток к разным видам стресса, а также о том, что в рамках определенного вида стресса проявляется различная реакция эритроцитов, относящихся к разным видам.

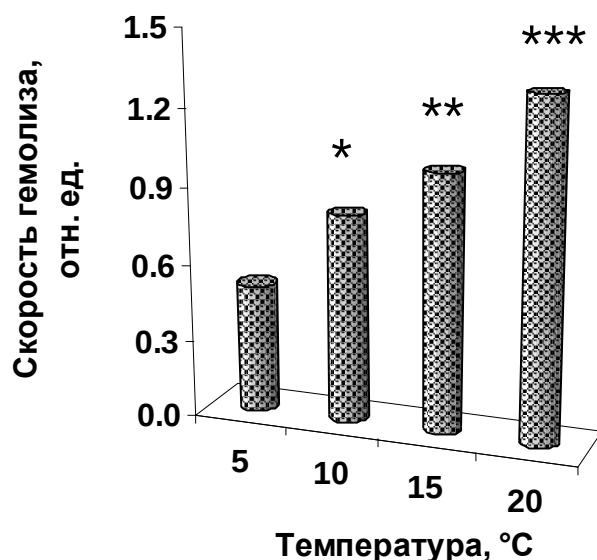


Рис. 3.6. Температурная зависимость скорости гемолиза эритроцитов человека в 4,0 моль/л NaCl.

Примечания: * – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными при 5°C, $p < 0,05$;

** – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными при 10°C, $p < 0,05$;

*** – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными при 15°C, $p < 0,05$.

Представляло интерес оценить связь между температурно-осмотическими характеристиками эритроцитов разных видов млекопитающих и геометрическими параметрами, а также характеристиками, отражающими особенности цитоплазмы и мембраны этих клеток, с помощью корреляционного анализа. Задача данного анализа состоит в установлении направления (положительное или отрицательное) и тесноты связи между варьирующими признаками, и, наконец, в проверке уровня значимости полученных коэффициентов корреляции. Поскольку распределения полученных данных часто существенным образом отличались от

нормального распределения, для корреляционного анализа был использован коэффициент ранговой корреляции Спирмена [160]. Силу корреляционной связи оценивали как слабую при значениях $r_s \leq 0,25$, умеренную при $0,25 < r_s < 0,75$ и сильную при $r_s \geq 0,75$. Для малых выборок для последующей интерпретации принято отбирать сильные корреляции на основании уровня статистической значимости. Результаты считаются неслучайными и значимыми, если количественный показатель статистической значимости не превышает 0,05.

Термин «связь» означает любые согласованные изменения, которые могут объясняться сотнями причин. Корреляционные связи не могут рассматриваться как наличие причинно-следственной связи, они свидетельствуют лишь о том, что изменениям одного признака, как правило, сопутствуют определенные изменения другого.

В литературе имеется достаточно информации относительно геометрических характеристик эритроцитов млекопитающих, особенно человека [234, 264, 325, 402, 486]. Несмотря на кажущуюся доступность этих результатов, сложность в их использовании заключается в широкой вариации данных, поскольку они были получены методами, различающимися как по принципу определения, так и по чувствительности, и в разных условиях.

В табл. 3.1 представлены значения геометрических характеристик эритроцитов разных видов млекопитающих. За основу взяты результаты, полученные для эритроцитов лошади, кролика, собаки и человека [350, 470], и дополнены данными для клеток крысы [464, 487] и быка [234, 284].

В работе [165] с использованием метода светорассеяния были определены геометрические характеристики эритроцитов большой группы млекопитающих (диаметр и объем). Несмотря на то, что эти результаты дают заниженные величины геометрических характеристик клеток (табл. 3.1) [234, 264], они весьма полезны с позиции относительных величин размеров эритроцитов разных видов. Согласно данным этой работы [165], уменьшение диаметра и объема эритроцита млекопитающих наблюдается в ряду

человек > крыса > собака > кролик > бык > лошадь, что фактически соответствует характеру изменения геометрических характеристик клеток разных видов, представленных в табл. 3.1.

Таблица 3.1

Значения геометрических характеристик эритроцитов разных видов млекопитающих [234, 350, 402, 464, 470, 486]

Размеры	Лошадь	Бык	Кролик	Крыса	Собака	Человек
Объем (V), мкм ³	43	50	66	66	68	90
Диаметр (d), мкм	5,5	5,9	7,1	7,5	7,5	8,5
Поверхностно-объемное отношение (S/V)	1,95	1,90	1,87	1,65	1,83	1,73

Таким образом, анализ результатов, представленных в работах [234, 264, 325], и сравнение с ними данных Комарова и соавт. [165] позволяют считать, что представленный в табл. 3.1 материал фактически отражает видовые особенности эритроцитов разных видов млекопитающих. Это позволило использовать указанные данные с целью установления силы корреляционной связи между температурно-осмотическими и геометрическими характеристиками эритроцитов млекопитающих.

Хорошо видно (рис. 3.3 и 3.4), что наиболее чувствительными к действию гипотонических сред при обоих температурных режимах (37 и 0°C) являются клетки лошади и быка, которые характеризуются небольшими объемами (43 и 50 мкм³) и высокими значениями поверхностно-объемного отношения (1,95 и 1,90) (табл. 3.1).

Для оценки взаимосвязи размеров эритроцитов млекопитающих и параметров их гипотонического гемолиза использовали величины диаметра (d) и поверхностно-объемного отношения (S/V) клеток, представленные в

табл. 3.1, и значения пороговых концентраций соли и индексов осмотической хрупкости при 37 и 0°C (рис. 3.4) соответственно.

Анализ силы связи между параметрами гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих и их размерами показал значимую корреляцию между пороговыми концентрациями и геометрическими характеристиками эритроцитов (d и S/V) (рис. 3.7, 3.8). Как при 37, так и при 0°C более высокие

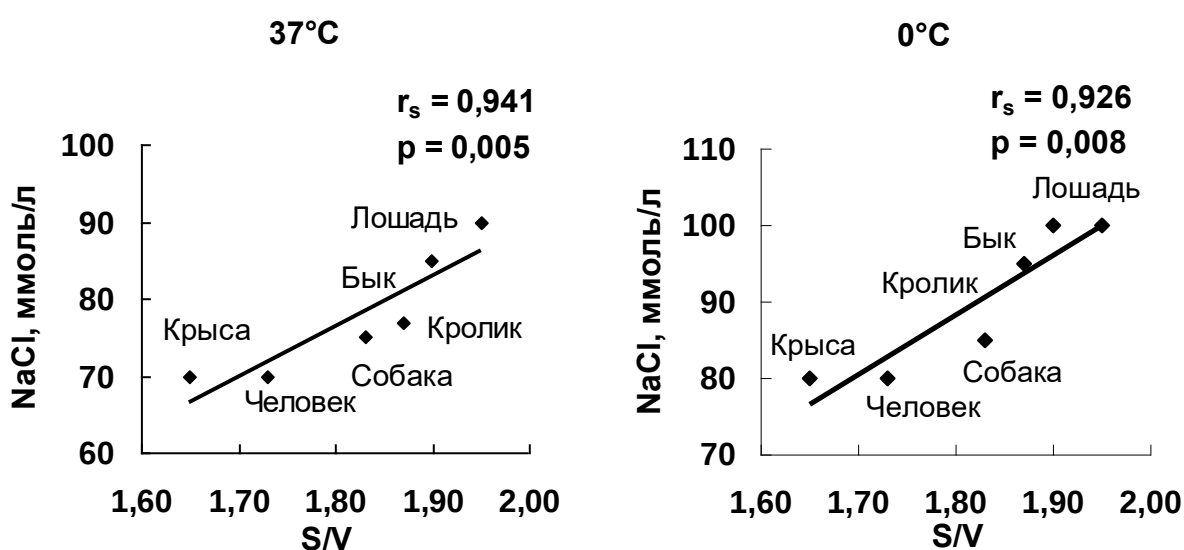


Рис. 3.7. Взаимосвязь между пороговой концентрацией NaCl при гипотоническом лизисе эритроцитов млекопитающих (37 и 0°C) и их поверхностно-объемным отношением (S/V).

значения пороговых концентраций NaCl характерны для небольших клеток ($r_s = -0,955$, $p < 0,05$ и $r_s = -0,939$, $p < 0,05$ соответственно) и для эритроцитов, характеризующихся высокими значениями поверхностно-объемного отношения (S/V) ($r_s = 0,94$, $p < 0,05$ и $r_s = 0,926$, $p < 0,05$ соответственно).

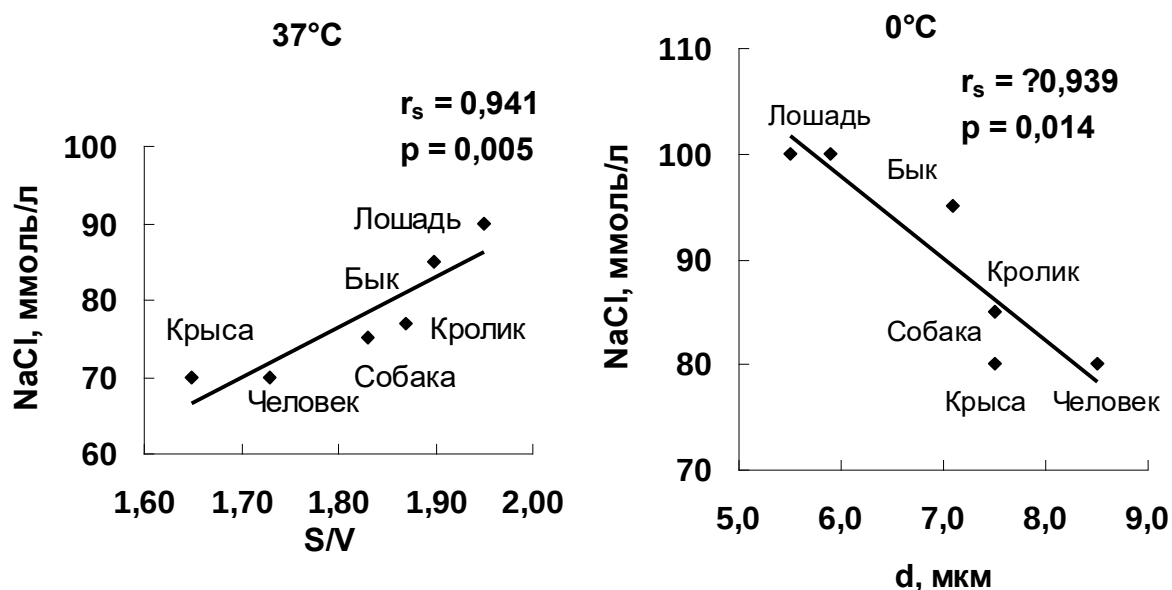


Рис. 3.8. Взаимосвязь между пороговой концентрацией NaCl при гипотоническом лизисе эритроцитов млекопитающих (37 и 0°C) и их диаметром (d).

Кроме того, если при 37°C между индексом осмотической хрупкости эритроцитов и их размерами (d и S/V) отмечается сильная значимая корреляция ($r_s = -0,812$, $p < 0,05$ и $r_s = 0,986$, $p < 0,05$ соответственно) (рис. 3.9), то при 0°C можно говорить о сильной связи ($r_s = -0,794$ $p > 0,05$, $r_s = 0,812$, $p < 0,05$ соответственно), которая является значимой в случае поверхностно-объемного отношения (табл. А. 1).

При изучении гипертонической чувствительности эритроцитов млекопитающих Betticher и Geiser [234] сделали вывод о том, что маленькие клетки более устойчивы к действию данного стресса. Если оценивать чувствительность эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку по значениям пороговой концентрации, то наиболее устойчивыми являются клетки кролика и крысы (3,25 и 3,00 моль/л NaCl) (рис. 3.1), которые

характеризуются средними значениями как объема V , так и диаметра d (табл. 3.1). Таким образом, наши результаты не только не подтверждают, а даже противоречат выводам цитируемой работы [234].

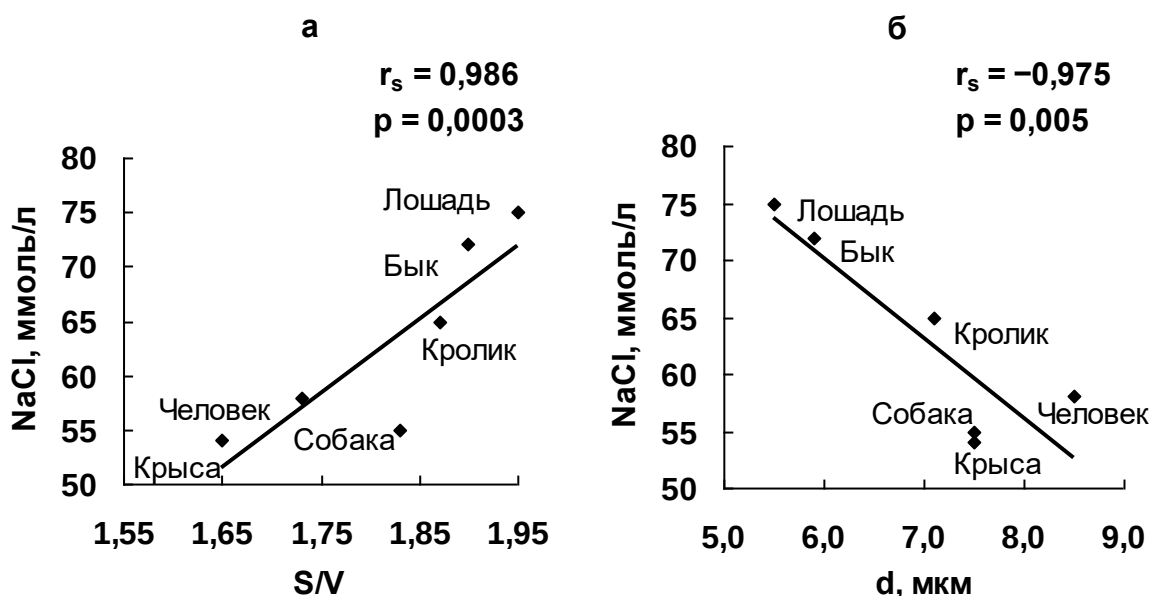


Рис. 3.9. Взаимосвязь между индексом осмотической хрупкости при гипотоническом лизисе эритроцитов млекопитающих (37°C) и поверхностно-объемным отношением (S/V) (а), диаметром эритроцитов (d) (б).

Можно полагать, что выявленные расхождения обусловлены как различными условиями эксперимента, так и выбранным для оценки критерием. Авторы работы [402] инкубировали клетки в среде, содержащей примерно 1,5 моль/л NaCl, в течение 24 час при 5°C; критерием чувствительности эритроцитов к гипертоническим средам был гемолиз на уровне 3–4%. В нашей работе среда содержала соль в концентрации 2,25–3,25 моль/л, продолжительность инкубирования клеток составляла 10 мин при 37°C.

Таким образом, устойчивость эритроцитов млекопитающих к действию гипертонических сред, где начинает развиваться гемолитическое повреждение клеток, как впрочем, и устойчивость их к

высококонцентрированным солевым средам при 37°C (рис. 3.1) сложно объяснить исключительно факторами, связанными с размерами эритроцитов млекопитающих. В то же время выявлены сильные корреляции между уровнем гемолиза в 4,0 моль/л NaCl при 0°C и геометрическими характеристиками клеток, которые являются значимыми для диаметра клеток: более высокие значения гипертонического гемолиза характерны для крупных клеток ($r_s = 0,928$, $p = 0,008$) (табл. А. 2).

Поскольку эритроциты разных видов млекопитающих, характеризующиеся различной температурно-осмотической устойчивостью (рис. 3.1–3.4), различаются по составу и свойствам внутриклеточного содержимого, представляло интерес проанализировать некоторые показатели цитоплазмы животных и человека (содержание воды, катионов, гидрофобно-гидрофильный баланс гемоглобина и др.) (табл. 3.2).

Основным белковым компонентом цитоплазмы эритроцитов млекопитающих является гемоглобин, содержание которого составляет примерно 95% [218]. Анализ аминокислотной последовательности двух цепей гемоглобина 16 исследованных видов млекопитающих (человек, собака, лошадь, верблюд, свинья, бык, кролик, крыса и другие) продемонстрировали значительную идентичность (50%) и существенное сходство (36%) [218]. Из-за высокой степени эволюционного консерватизма последовательностей гемоглобинов, только 10–13% аминокислотных остатков (что соответствует 14–17 аминокислотным остаткам в α и β цепях гемоглобина) могут отличаться по своим физико-химическим свойствам. Именно эти аминокислоты определяют межвидовые различия молекул гемоглобина эритроцитов млекопитающих. В частности, Р. Vogner с соавт. [218] показали, что гемоглобин эритроцитов верблюда, имеющий больше остатков заряженных аминокислот, более гидрофилен по сравнению с гемоглобинами человека и других млекопитающих.

Таблица 3.2

**Содержание гемоглобина, АТФ, катионов и воды в эритроцитах
млекопитающих**

	Крыса	Бык	Лошадь	Человек	Кролик	Собака
MCH, пг ^а	17,6	17,8	17,4	29,4 ^б	21,3	23,7
MCHC, г/дл ^а	37,9	34,6	38,8	33,3 ^б	33,8	38,6
гидрофобность Hb ^в	153,91	154,94	155,37	157,53	153,81	154,57
K ⁺ , ммоль/л ^г	141,2	41,6	139,8	142,5	154,8	10,8
Na ⁺ , моль/л ^г	25,1	112,2	31,7	23,4	22,3	180,4
K ⁺ +Na ⁺ , моль/л ^г	166,3	153,8	171,5	165,4	177,1	191,2
Mg ²⁺ , моль/л ^д	5,23	3,18	5,25	3,78	6,22	3,88
АТФ, моль/л ^д	1,26	0,31	0,12	1,65	3,1	0,59
H ₂ O, г воды / г сухой массы ^г	1,96	1,86	1,83	2,09	1,99	1,98
H ₂ O, % ^д	65,56	64,47	63,47	66,41	67,85	65,21

Примечания: ^а – [527], ^б – [240] ^в – [218], ^г – [493], ^д – [460]

Для характеристики белков используют гидрофобно-гидрофильные профили, которые обусловлены аминокислотными последовательностями и гидрофобно-гидрофильными свойствами индивидуальных аминокислот. В настоящее время имеется несколько различных гидрофобно-гидрофильных рейтингов аминокислот, что связано, главным образом, с использованием различных методов для определения их гидрофобности. Мы основывались на результатах Cowan и Whittaker, цитируемых в работе [218], согласно

которым более высокие показатели гемоглобинов соответствуют большим значениям их гидрофобности.

Оценка связи между показателями гипертонического шока эритроцитов млекопитающих и вышеуказанными гематологическими характеристиками этих клеток показала значимую положительную корреляцию между уровнем гемолиза эритроцитов в 4,0 моль/л NaCl (при 37°C) и гидрофобностью гемоглобина ($r_s = 0,829$, $p < 0,05$) (рис. 3.10).

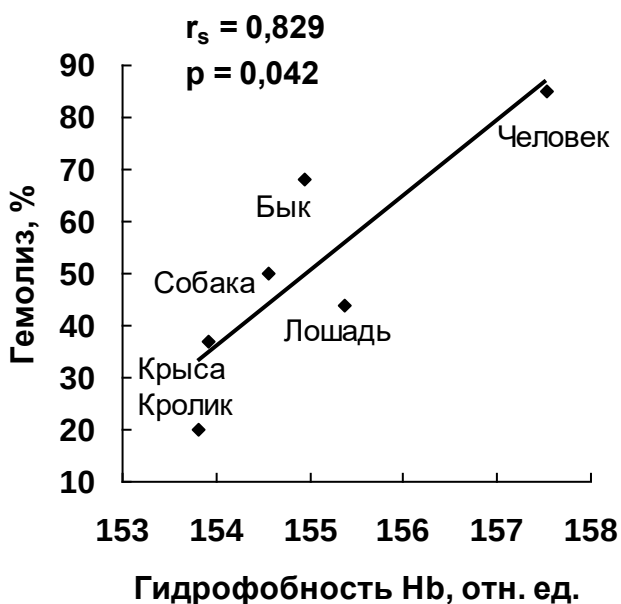


Рис. 3.10. Взаимосвязь между уровнем гемолиза эритроцитов млекопитающих в 4,0 моль/л NaCl (37°C) и гидрофобностью гемоглобина.

Таким образом, чем выше значение гидрофильно-гидрофобного баланса гемоглобина эритроцитов, отражающее большую гидрофобность белковой молекулы, тем выше уровень гипертонического повреждения клеток в высококонцентрированных солевых растворах при 37°C.

В условиях гипотонического лизиса эритроцитов разных видов корреляции между показателями лизиса эритроцитов млекопитающих и

характеристиками гемоглобина не достигают даже сильного уровня (табл. Б. 2).

Подавляющее большинство эритроцитов млекопитающих в качестве доминирующего внутриклеточного катиона содержат калий. Из используемых в работе клеток эритроциты человека, крысы, лошади и кролика относятся к K^+ -содержащим, в то время как эритроциты быка и собаки – к Na^+ -содержащим, потому что в их цитоплазме преобладают катионы натрия [493]. Эритроциты млекопитающих существенно различаются по содержанию АТФ: от 0,12 ммоль/л для клеток лошади до 3,1 ммоль/л для эритроцитов кролика [460] (табл. 3.2). По содержанию внутриклеточной воды, выраженному в процентах [460] и в г воды/г сухого вещества [493], эритроциты различаются незначительно (табл. 3.2). Однако, учитывая исключительную важность воды как универсального растворителя, а также видовые особенности количественного катионного состава цитоплазмы эритроцитов, следующая задача заключалась в определении силы корреляционной связи гипотонического лизиса и гипертонического шока с внутриклеточным содержанием воды, катионов и АТФ.

Анализ силы корреляции между показателями гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих и внутриклеточными концентрациями катионов (K^+ , Na^+ , Mg^{2+}) продемонстрировал слабые корреляционные связи, в то время как для гипертонического лизиса в основном – умеренные (табл. Б. 1, Б. 2). Следует отметить, что в условиях гипертонического шока при 37°C выявлены значимые отрицательные сильные корреляции между уровнем лизиса в 4,0 моль/л NaCl и внутриклеточной концентрацией Mg^{2+} ($r_s = -0,886$, $p = 0,019$), между пороговыми концентрациями NaCl и концентрацией АТФ ($r_s = 0,841$, $p = 0,036$), т.е. чем ниже указанные показатели цитоплазмы (табл. 3.2), тем выше гипертоническая чувствительность эритроцитов млекопитающих.

В эритроцитах млекопитающих АТФ, образующийся в процессе гликолиза, является основным энергетическим источником. Снижение его

концентрации ведет к ряду нарушений, в частности, к блокированию ионных насосов [378], к изменению реологических свойств [116].

Для данной серии экспериментов были выбраны эритроциты млекопитающих, которые по мере увеличения внутриклеточного содержания АТФ можно расположить в ряду: эритроциты лошади, эритроциты быка, эритроциты человека. Как видно из рис. 3.11, клетки с высоким содержанием АТФ более подвержены гемолитическому повреждению в 4,0 моль/л NaCl.

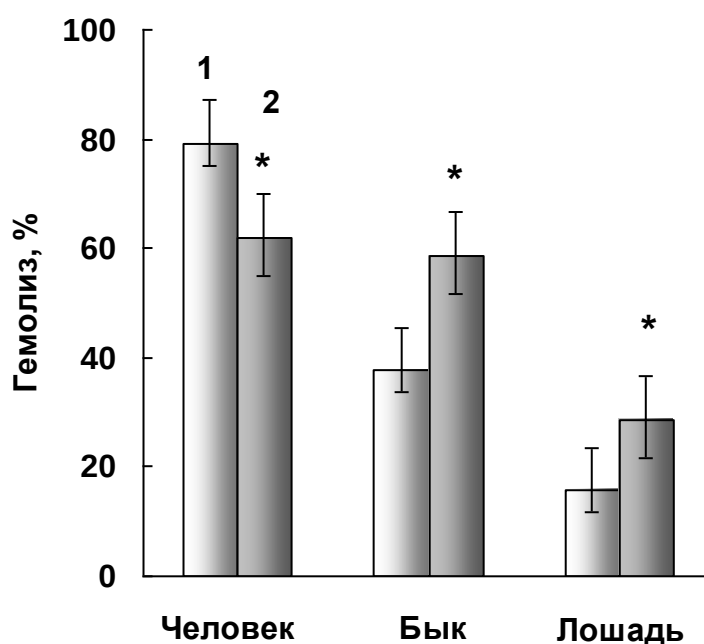


Рис. 3.11. Уровень гемолиза контрольных (1) и проинкубированных с 2-дезоксиглюкозой (10 ммоль/л) эритроцитов млекопитающих (2) в гипертонической среде (4,0 моль/л NaCl) при 22°C.

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с показателями гемолиза контрольных клеток ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 7.

При экспериментальном истощении эритроцитов млекопитающих по АТФ в результате продолжительного инкубирования (120 мин) с 2-дезоксиглюкозой (10 ммоль/л) наблюдается разнонаправленная реакция клеток на действие ГШ (рис. 3.11). Если эритроциты человека становятся более устойчивыми к 4,0 моль/л NaCl, то клетки быка и лошади

характеризуются более высоким уровнем гемолитического повреждения.

Для эритроцитов человека методом ЭПР спектроскопии показано повышение текучести мембраны [400], в то время как для клеток быка – уменьшение указанного параметра [413] в результате снижения внутриклеточного содержания АТФ. В последнем случае процесс репарации пор, образованных при гипертоническом лизисе эритроцитов, затруднен, что приводит к большему, по сравнению с контролем, повреждению клеток быка, характеризующихся низким содержанием АТФ. Наоборот, увеличение текучести мембраны эритроцитов человека в результате истощения клеток по АТФ облегчает ее реорганизацию в момент действия стрессового фактора и, таким образом, уменьшает гипертоническое повреждение клеток.

В отличие от эритроцитов человека и быка, цитоскелет эритроцитов лошади лишен белка полосы 4.2, который отвечает за механическую прочность цитоскелет-мембранного комплекса [314]. Хотя другие компоненты цитоскелета берут на себя функцию этого белка, однако в условиях дополнительной «нагрузки» на клетки проявляется нестабильность эритроцитов лошади. Так, в работе [37] показано, что в условиях гипертонического стресса клетки лошади, обработанные фенилгидразином, повреждаются гораздо в большей степени, чем эритроциты человека и быка. Процедура истощения эритроцитов лошади по АТФ также «проявляет» эту нестабильность, что отражается в повышении чувствительности клеток к гипертоническому шоку (рис. 3.11).

Нельзя исключить и того факта, что ряд физико-химических параметров, характер изменений которых является нелинейным при истощении эритроцитов млекопитающих по АТФ [525], могут определять различную чувствительность клеток человека и животных к резкому изменению осмотических условий среды.

Значимая положительная корреляционная связь между величинами пороговой концентрации соли при ГШ эритроцитов человека и животных (при 37°C) и содержанием внутриклеточной воды (%) (данные по

содержанию воды взяты из работы [460]) ($r_s = 0,841$, $p = 0,036$) (рис. 3.12) свидетельствует о том, что клетки с высоким содержанием воды являются более устойчивыми к действию гипертонических сред, в которых клетки начинают лизировать.

Сравнительный анализ тесноты корреляционных связей параметров ГШ и гипотонического гемолиза эритроцитов млекопитающих с их внутриклеточным содержанием воды показывает, что более сильные взаимосвязи характерны для гипертонического повреждения клеток (табл. Б. 2).

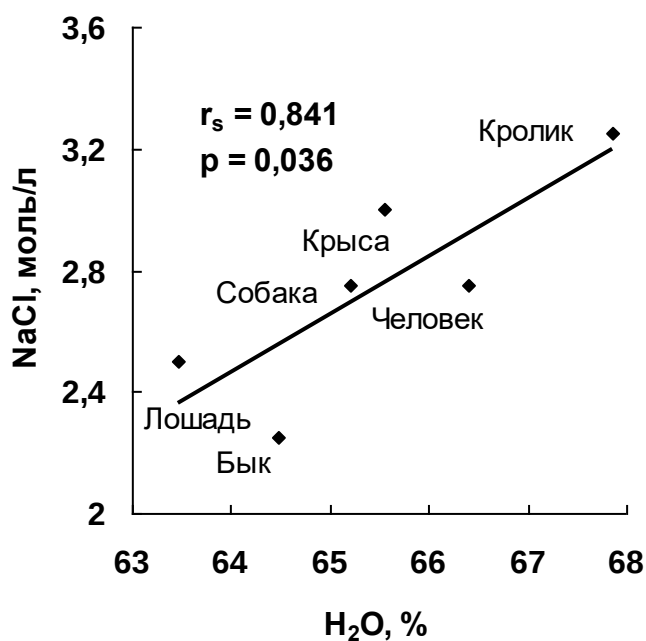


Рис. 3.12. Взаимосвязь между пороговыми концентрациями NaCl при гипертоническом шоке эритроцитов млекопитающих (37°C) и внутриклеточным содержанием воды.

Постоянство внутриклеточной среды клетки обеспечивает полупроницаемая плазматическая мембрана, отделяющая внутриклеточное содержимое от внешней среды. Для эритроцитов разных видов млекопитающих характерны различия в качественном и количественном

составе цитоплазмы, так и клеточная мембрана характеризуется целым рядом видовых особенностей.

В работе [379] проведено сравнительное исследование электрофоретических образцов белков эритроцитарных мембран человека и животных. Поскольку авторов интересовали белки, связанные с обеспечением водного транспорта через эритроцитарные мембраны, то использовали акриламид в 12% концентрации для получения хорошего разрешения в средне- и низкомолекулярной области электрофореграмм.

Хотя общий вид электрофореграмм мембранных белков характерен для эритроцитов всех млекопитающих, однако в работе [379] были выявлены некоторые качественные и количественные различия. При сравнении электрофореграмм белковых компонентов эритроцитарных мембран человека, лошади, быка, кролика и крысы было показано, что по содержанию белков группы 1+2 (спектрины) эритроциты человека, быка и крысы не отличаются, в то время как содержание этих белков в эритроцитах лошади и кролика статистически ниже (по сравнению с человеком). К выявленным различиям относительно белков полос 1 и 2 (спектрины) в эритроцитарных мембранах млекопитающих следует относиться осмотнительно, поскольку лучшее разделение высокомолекулярных белков достигается при использовании акриламида в более низкой концентрации, например 4%, как у Ballas [219]. Согласно результатам последнего автора, различий между эритроцитами человека, кролика и крысы по спектрину не выявлено.

Содержание белков групп 2.1–2.3 (анкирины) снижалось у эритроцитов кролика и крысы по сравнению с человеком (почти в 2 раза) [379], хотя у Ballas [219] указанное различие выражено в меньшей степени.

Для эритроцитов быка и кролика отмечается расщепление белка полосы 4.1 на две подгруппы. По сравнению с эритроцитами человека содержание белка 4.1 в клетках крысы и лошади выше. В последнем случае это может быть связано с тем, что белок полосы 4.2 в эритроцитах лошади имеет более низкую подвижность и иногда он накладывается на белок

полосы 4.1 [379]. Хотя в работе [221] отмечается, что эритроциты лошади лишены белка полосы 4.2, который обеспечивает гибкость и стабильность мембраны [530]. Согласно результатам работы [379], белок полосы 4.9 присутствует в большом количестве в эритроцитарных мембранах лошади и кролика. Белок полосы 6 (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа) не определяется в эритроцитарных мембранах лошади и крысы и достоверно снижается у кролика (по сравнению с человеком) [379]. Белок полосы 8 (пептидная часть глутатион-S-трансферазы) не определяется у лошади, быка и обнаруживается в большом количестве у крысы (по сравнению с человеком) [379]. Следует отметить, что представленные в указанной работе [379] результаты хорошо согласуются с данными, полученными в других лабораториях [219]. Корреляционный анализ не позволил выявить статистически значимых связей между показателями температурно-осмотической устойчивости эритроцитов млекопитающих и их циоскелетными белками [379].

Электрофоретические исследования выявили различия в молекулярном весе и степени гликозилирования белка полосы 3, основного белка эритроцитарной мембраны млекопитающих. Оказывается, что белок полосы 3 эритроцитов быка имеет более высокий молекулярный вес (около 100 кДа). Содержание белка полосы 3 в клетках лошади и кролика достоверно ниже по сравнению с клетками человека (человек, бык, крыса одинаковы), что согласуется с данными работы Ballas [219].

Под действием химотрипсина белок полосы 3 эритроцитов человека и кролика расщепляется в разных местах [267], в то время как этот фермент не оказывает никакого влияния на этот белок эритроцитов быка, лошади и овцы [516]. Для выявления структурной гомологии между белком полосы 3 из эритроцитарных мембран кролика и человека использовали моноклональные и поликлональные антитела к белку полосы 3 человека. Поскольку моноклональные антитела не узнавали cdb3 кролика, а автораддиография поликлональных антител показала слабый сигнал, то авторы [267], сделали

вывод о существенных различиях в структуре белка полосы 3 эритроцитов кролика и человека.

Эритроциты кролика не содержат гликофорина А [267]. С этим связывают меньшую способность эритроцитарной мембраны кролика связывать гемоглобин [454].

В работе [442] было высказано предположение о том, что взаимодействия гемоглобина с эритроцитарной мембраной могут обуславливать функциональные свойства, в частности приводить к селективному увеличению проницаемости мембраны для ионов K^+ . Для эритроцитов же кролика характерен гораздо более низкий уровень связывания гемоглобина с мембраной (на 65% меньшее, чем для эритроцитов человека) [454], что может лежать в основе функциональных особенностей эритроцитов кролика и обуславливать наблюдаемую устойчивость этих клеток к действию стрессовых факторов, в частности гипертонических сред (рис. 3.1).

Богатая белками поверхность эритроцита несет на себе отрицательный заряд. Обработка клеток нейраминидазой приводит к его уменьшению, в результате чего снижается электрофоретическая подвижность клеток [519]. Отрицательный заряд поверхности эритроцита обусловлен остатками сиаловых кислот, присутствующими, главным образом на гликофоре А, а также на других гликофорах, белке полосы 3 и некоторых гликолипидах [530]. Для изучения состояния поверхности эритроцитов человека и животных в работе [532] были проведены измерения электрофоретической подвижности и относительной гидрофобности эритроцитов разных видов млекопитающих.

Анализ величин электрофоретической подвижности эритроцитов собаки, крысы, человека и кролика, которые составляют $-1,28$, $-1,23$, $-1,08$ и $-0,47$ мкм/с/В/см соответственно, свидетельствует о низком поверхностном заряде эритроцитарной мембраны кролика. Метод двухфазного распределения (в системе фиколл/ декстран) эритроцитов разных видов при

нулевой ионной силе среды был использован для оценки относительной гидрофобности их клеточной поверхности, которая выражалась в виде молей CH_2 групп, приходящихся на 1 клетку. Величины относительной гидрофобности эритроцитов млекопитающих находятся в диапазоне $(-2,16 \div -3,58) \times 10^{22}$ моль/клетка. В этом случае максимальный показатель характерен для эритроцитов кролика [532].

Таким образом, представленные в работе [532] результаты свидетельствуют, что поверхность плазматической мембраны эритроцитов человека и животных имеет видовые особенности.

Изучению особенностей липидного состава плазматических мембран эритроцитов человека и животных посвящено достаточно много работ [205, 274, 440, 462, 520], в которых показаны качественные и количественные межвидовые различия. В работе Nelson [419] исследовано содержание нейтральных липидов в плазматических мембранах эритроцитов разных видов животных с помощью газовой-жидкостной и тонкослойной хроматографии, а также с использованием колоночной хроматографии в сочетании инфракрасной спектрометрией. Три используемые в работе метода, в общем, дали сходные результаты. В табл. 3.3 приведены данные по содержанию холестерина, основного нейтрального липида эритроцитарных мембран животных и человека [419, 526].

Анализ тесноты связи между параметрами осмотического стресса эритроцитов животных и содержанием холестерина (табл. 3.3) не показал значимых связей (табл. В. 1, В. 2). Однако между содержанием общих липидов (за исключением ганглиозидов) и уровнем гемолиза в 4,0 моль/л NaCl (при 0°C) выявлена значимая корреляция ($r_s = 0,900$, $p = 0,037$). В условиях гипотонического лизиса (при 0°C) установлена сильная связь между пороговыми концентрациями и индексом осмотической хрупкости эритроцитов животных, с одной стороны, и общими липидами (за исключением ганглиозидов) в их мембранах, с другой ($r_s = 0,791$, $p = 0,111$; $r_s = -0,821$, $p = 0,089$ соответственно). Обращает на себя внимание тот факт,

что сильные корреляции наблюдаются для стрессов, которые реализуются при 0°C, что свидетельствует в пользу важной роли липидного компонента мембраны при низкой температуре.

Таблица 3.3

**Содержание свободного холестерина в эритроцитах животных [419]
и человека [526]**

	Общие липиды (за исключением ганглиозидов), мг/мл упакованных клеток	Холестерин, % от общих липидов
Крыса	4,86	26,1
Бык	4,15	28,8
Лошадь	4,7	28,7
Кролик	4,42	29,9
Собака	5,16	28,2
Человек	–	23,0

Для сравнительного анализа фосфолипидного состава эритроцитарных мембран млекопитающих за основу были взяты систематизированные данные, представленные в работе Wessel [526], в которой фосфолипидные компоненты поданы в виде процентного содержания (за 100% приняты суммарные фосфолипиды эритроцитарных мембран). Обязательным атрибутом фосфолипидного состава мембран являются холин-содержащие фосфолипиды, к которым относятся ФХ, СМ и лизопроизводные ФХ. В то время как плазматическая мембрана эритроцитов человека имеет примерно равное количество ФХ и СМ, то эритроцитарные мембраны клеток большинства животных содержат больше ФХ, чем СМ (крыса, лошадь, кролик, собака). Особое положение занимают плазматические мембраны эритроцитов быка, для которых характерно высокое содержание СМ на фоне практически полного отсутствия ФХ. Лизо-производные ФХ в большем

количестве представлены в плазматической мембране эритроцитов крысы (3,8%), не выявлены у быка и человека и практически в минимальном количестве обнаружены в клетках кролика. Промежуточное положение по указанному параметру занимают эритроциты лошади и собаки (1,7 и 1,8%).

Отрицательно заряженные фосфолипиды, которые содержатся исключительно во внутреннем монослое эритроцитарных мембран, представлены ФК, ФИ и ФС. Суммарное содержание кислых фосфолипидов максимально у эритроцитов быка (22,3%) и минимально у крысы и кролика (14,6 и 15,4%). ФЭА, характеризующийся способностью образовывать небислойные фазы, преобладает у кролика и быка (29,1 и 31,9%) и минимально представлен в клетках крысы и собаки (21,5 и 22,4%) [526].

При анализе корреляционной связи характеристик осмотического гемолиза (гипотонического и гипертонического) эритроцитов млекопитающих (рис. 3.1, 3.4.) с фосфолипидным составом их плазматических мембран [526] выявлены, в основном, слабые и умеренные связи (табл. Д. 1, Д. 2). Только между пороговыми концентрациями хлорида натрия при ГШ эритроцитов млекопитающих (при 37°C) и содержанием отрицательно заряженного фосфатидилсерина показана значимая корреляция ($r_s = -0,928$, $p = 0,008$).

Сравнительное исследование гемолитической активности альфа-токсина из *Clostridium septicus* относительно эритроцитов разных видов животных (в том числе и клеток крысы, быка, лошади, кролика, собаки) при 7, 15 и 30°C позволило авторам работы [137] выявить ряд особенностей (табл. 3.4). Во-первых, гемолитическая активность данного токсина является видоспецифической. По мере снижения чувствительности эритроцитов к гемолитическому действию альфа-токсина клетки можно расположить в следующем порядке: крыса, собака, лошадь, кролик, бык. Во-вторых, активность токсина при использовании эритроцитов лошади, кролика и быка существенно снижается при 7°C по сравнению с 30°C (в 9–17 раз), в то время как для клеток крысы и собаки изменение незначительно (всего в 4 раза).

В третьих, после обработки эритроцитов протеиназой К наблюдается снижение чувствительности эритроцитов крысы, собаки, лошади и быка к действию токсина. В работе показано, что мишенью взаимодействия альфа-токсина с эритроцитами лошади и быка являются мембранные белки с молекулярной массой от 30 до 45 кДа, в то время как в эритроцитарных мембранах крысы токсин взаимодействует с 100-кДа белком.

Исходя из того, что альфа-токсин из *Clostridium septicus* характеризуется видоспецифической гемолитической активностью, которая обусловлена наличием рецепторов на поверхности эритроцитов млекопитающих, представляло интерес проанализировать корреляционную связь между концентрациями α -токсина из *Clostridium septicus*, которые вызывают 50% гемолиз эритроцитов при разных температурах (7, 15 и 30°C) (табл. 3.4), и характеристиками температурно-осмотического поведения клеток.

Таблица 3.4

Концентрации токсина (мкг/мл) из *Clostridium septicus*, вызывающие 50% гемолиз эритроцитов животных при разных температурах [461].

Млекопитающие	Температура		
	7°C	15°C	30°C
Крыса	1,3	1,15	0,28
Бык	40,0	14,3	2,39
Лошадь	19,2	8,9	1,49
Кролик	17,2	7,5	1,86
Собака	2,8	1,75	0,64

Как видно из корреляционной матрицы (табл. Ж. 1), при гипотоническом лизисе эритроцитов животных установлены не только сильные, но и сильные значимые корреляционные связи между

осмотическими показателями эритроцитов и концентрациями альфа-токсина, вызывающими 50% гемолиз эритроцитов животных при низких температурах (7, 15°C).

Уровень гипертонического гемолиза эритроцитов животных в 4,0 моль/л NaCl при 0°C значимо сильно коррелирует с концентрациями токсина, вызывающими 50% гемолиз этих клеток при низких температурах (7 и 15°C) ($r_s = -0,900$, $p = 0,037$) и отрицательно сильно – с концентрацией токсина при 30°C ($r_s = -0,800$, $p = 0,104$).

Обращает на себя внимание тот факт, что при гипотоническом лизисе эритроцитов наблюдается положительная корреляция с гемолитической активностью токсина, в то время как при ГШ – отрицательная. Таким образом, существуют некие факторы, однонаправлено влияющие на развитие гемолитического процесса эритроцитов животных, как в условиях гипотонического стресса, так и под действием альфа-токсина из *Clostridium septicus*, причем это лучше выражено при низких температурах.

Поскольку все изучаемые виды стресса являются разновидностями – осмотического, естественно предположить важность именно транспорта воды через плазматическую мембрану эритроцитов млекопитающих. Полагают [137], что повреждение клеток в этих условиях является функцией скорости водного транспорта.

Исследованию проницаемости клеточных мембран для воды посвящено достаточно много обзорных работ [227, 292, 324, 331, 373]. Эритроциты характеризуются очень высокой скоростью водного транспорта. Скорость диффузии воды такова, что все водное содержимое каждой клетки обменивается 100 раз за 1 сек [244, 355]. Особенно интерес к изучению этой проблемы возобновился после открытия белковых водных каналов [226, 394]. Полагают, что относительно высокая водная проницаемость эритроцитарных мембран связана с высоким содержанием белковых каналов. Хотя в эритроцитах их физиологическая роль не ясна.

Авторы работы [270] полагают, что белковые водные каналы обеспечивают быструю регидратацию клеток при их прохождении через мозговое вещество почек.

Kuchel и Benga [355] предоставили новые объяснения физиологического «смысла существования» аквапоринов в эритроцитах. Во-первых, авторы полагают, что аквапорины связаны с волнообразными движениями (или колебаниями) мембраны эритроцитов человека. Согласно сформулированной ими гипотезе «осциллирующего сита», высокая водная проницаемость эритроцитарной мембраны благоприятствует волнообразному движению мембраны. Подобные движения выполняют важную роль при перемещении клетки по капиллярам и потребляют минимум энергии.

Во-вторых, высокая водная проницаемость эритроцитарной мембраны делает возможным сопутствующее перемещение молекул воды при быстром обмене через эритроцитарную мембрану таких ионов, как Cl^- и HCO_3^- , растворенных веществ, например, глюкозы [355].

Несмотря на то, что результатов по водной проницаемости эритроцитарных мембран разных видов млекопитающих достаточно много, поскольку проблема остается актуальной в течение достаточно продолжительного времени, однако их анализ весьма затруднен по ряду причин. Во-первых, эти данные для клеток человека и животных получены разными методами, в существенно различающихся экспериментальных условиях, а иногда результаты в работах представлены вообще без указания конкретных условий эксперимента. Поэтому стояли перед нами следующие задачи: найти и проанализировать данные, полученные для максимального числа эритроцитов млекопитающих в аналогичных экспериментальных условиях с использованием одного и того же метода и желательно в одной лаборатории.

Для измерения водного транспорта через эритроцитарную мембрану используют две основные стратегии, основанные на использовании нестационарных и стационарных методов. С помощью нестационарных

методов измеряют осмотическую водную проницаемость, а стационарные методы используют для изучения диффузионной водной проницаемости эритроцитов.

Авторы работы [294] с помощью метода остановленного потока изучали осмотическую водную проницаемость эритроцитов млекопитающих в условиях действия на клетки осмотического градиента 250 ммоль/л раствора сахарозы при температуре 10°C. Полученные величины коэффициентов осмотической водной проницаемости P_f эритроцитов крысы, быка, человека, кролика и собаки составляют 4,0; 3,7; 2,8; 5,2 и $4,2 \times 10^{-3}$ см/сек соответственно, что, в общем, согласуется с результатами работы [517]. Однако приведенные в работе [294] значения ниже, что, по-видимому, связано с экспериментальными условиями, в частности, с более низкой температурой, при которой проводили исследования.

Оценка силы взаимосвязи коэффициента осмотической водной проницаемости эритроцитов животных (P_f) с показателями гипотонического лизиса и ГШ этих клеток показала наличие сильной связи только для ГШ. Эта корреляция между P_f эритроцитарных мембран животных и уровнем гемолиза клеток в 4,0 моль/л NaCl (при 37°C) является значимой сильной отрицательной ($r_s = -0,900$, $p = 0,037$) (табл. 3. 2).

Можно предположить, что одну из ведущих ролей в развитии гипертонического повреждения клетки играет проницаемость мембраны эритроцита для молекул воды. Высокая водная проницаемость обеспечивает быстрый отток воды из клетки при помещении ее гипертоническую среду, что уменьшает осмотическую нагрузку на клетку и, как следствие, повреждающее действие гипертонического раствора.

Изучению диффузионной водной проницаемости эритроцитов более 30 видов млекопитающих (P_d) с помощью ядерного магнитного резонанса посвящены многочисленные работы Benga и соавт. [224, 265, 266]. Основываясь на измеренных коэффициентах диффузионной водной

проницаемости эритроцитов млекопитающих, авторы работы [224] разделили их на три группы. Первую группу составили млекопитающие, эритроциты которых характеризуются значениями P_d на уровне 5×10^{-3} см/с при 25°C и 7×10^{-3} см/с при 37°C . Ко второй группе были отнесены животные, у которых значения P_d эритроцитов примерно в два раза выше, к третьей группе – ниже указанных значений. Как правило, величины энергии активации ($E_{a,d}$) процесса транспорта воды через эритроцитарную мембрану коррелировали со значениями диффузионной водной проницаемости (P_d). Для эритроцитов млекопитающих первой группы величина $E_{a,d}$ составляла примерно 26 кДж/моль. Низкие величины $E_{a,d}$ (в диапазоне от 15 до 22 кДж/моль) характерны для эритроцитов млекопитающих с относительно высокими значениями P_d . Эритроциты ехидны, представляющие третью группу, имели самую высокую величину $E_{a,d}$ (33 кДж/моль).

Benga с соавт. в работах [224, 265, 266] определяли диффузионную водную проницаемость контрольных (P_d) и обработанных ингибитором водного транспорта (p-chloromercuribenzenesulfonate, PCMBS) мембран эритроцитов млекопитающих ($P_{d \text{ PCMBS}}$) при двух температурах и рассчитывали энергию активации этого процесса.

В табл. 3.5 приведены систематизированные данные [224, 265, 266], представляющие собой коэффициенты диффузионной водной проницаемости эритроцитов человека, крысы, быка, лошади, кролика и собаки. В соответствии с вышеописанной классификацией Benga, эритроциты быка, человека, лошади с относительно низкими значениями коэффициента диффузионной водной проницаемости (P_d) относятся к первой группе, вторая группа представлена клетками кролика, крысы и собаки, характеризующимися высокими значениями P_d . Однако для эритроцитов крысы и собаки характерны сравнительно высокие значения $E_{a,d}$, что свидетельствует о высоком энергетическом барьере процесса транспорта воды через их мембрану. Таким образом, из всех исследуемых в работе

эритроцитов млекопитающих только эритроциты кролика характеризуются высокими значениями P_d и низкими величинами $E_{a,d}$.

Таблица 3.5

**Диффузионная водная проницаемость мембран эритроцитов
разных видов млекопитающих**

		Крыса ^а	Бык ^а	Человек ^а	Кролик ^а	Собака ^б	Лошадь ^в
$P_d \times 10^{-5}$, м/сек	25°C	6,32	3,32	3,96	8,04	6,5	3,5
	37°C	11,03	4,98	7	10,61	10	5,6
$P_{d \text{ PCMBBS}} \times 10^{-5}$, м/сек	25°C	2,13	1,80	1,48	2,32	2,50	1,20
	37°C	3,70	2,69	3,63	2,89	3,00	2,00
Энергия активации $E_{a,d}$, кДж/моль	контроль	26,57	22,82	24,95	17,68	23	25
$\Delta P_d =$ $(P_d - P_{d \text{ PCMBBS}}) \times 10^{-5}$, м/сек	25°C	4,19	1,52	2,48	5,72	4	2,3
	37°C	7,33	2,29	7,72	3,37	7	3,6

Приложения: ^а – [224], ^б – [265], ^в – [266]

Анализ тесноты связи между показателями ГШ и диффузионной водной проницаемостью показал значимую корреляцию между пороговыми концентрациями соли при 37°C и диффузионной проницаемостью воды P_d при 37°C ($r_s = 0,928$, $p < 0,05$) (рис. 3.13).

Величина $E_{a,d}$, как и P_d , является индикатором механизма водного транспорта через эритроцитарную мембрану. Согласно Schafer и Andreoli [441], энергия активации для диффузии воды через мембрану имеет два составляющих компонента. Первый компонент представляет собой энергию,

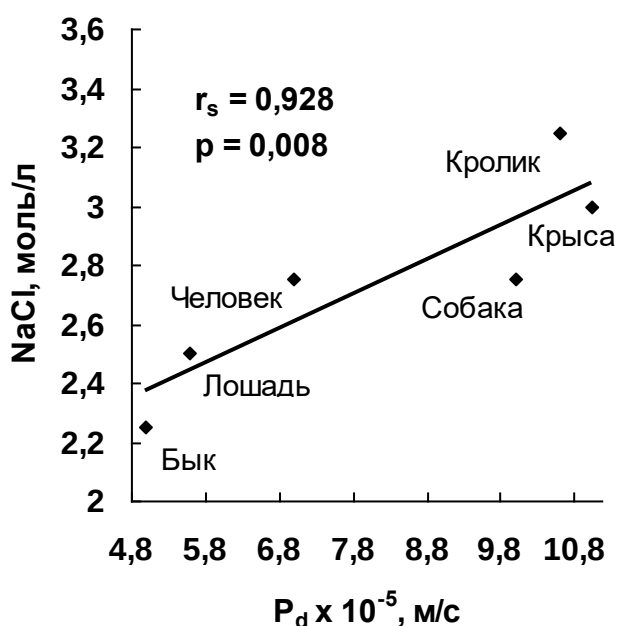


Рис. 3.13. Взаимосвязь между пороговыми концентрациями NaCl при гипертоническом шоке эритроцитов млекопитающих и коэффициентами трансмембранной диффузии воды при 37°C.

необходимую для молекул воды, чтобы разорвать водородные связи, образованные с соседними молекулами; второй – это энергия активации для диффузии воды собственно внутри мембраны. Низкое значение $E_{a,d}$ для молекулы предполагает, что диффузия молекул специализирована по отношению к гидрофобному липидному бислою. Таким специализированным путем мог бы быть канал для диффузии воды, инкорпорированный в мембранные белки [373, 523]. Следовательно, относительно высокая водная проницаемость эритроцитарной мембраны может быть из-за большого числа каналов, и поэтому для видов с высоким значением P_d следовало бы ожидать более низкую величину $E_{a,d}$. Это касается эритроцитов морской свинки, кролика, собаки, а также сумчатых малых и средних размеров [227]. С другой стороны, если белковые водные каналы не

присутствуют в эритроцитарных мембранах, то параллельно с низкими значениями P_d следовало бы ожидать высокие величины $E_{a,d}$, порядка величины водной проницаемости липидных бислоев (>30 кДж / моль). Такую ситуацию Benga [227] наблюдал для эритроцитов курицы, ехидны и утконоса.

Различная водная проницаемость эритроцитов должна коррелировать с молекулярной основой этого транспортного процесса. Использование ртути-содержащих SH-реагентов, которые блокируют транспорт воды через водные белковые каналы, позволило сделать вывод о том, что белковые водные каналы обеспечивают $\sim 90\%$ осмотической водной проницаемости и $\sim 50\%$ диффузионной водной проницаемости эритроцитов человека при 37°C (обсуждалось в [225]). В работе [456] показано, что осмотическая водная проницаемость как интактных эритроцитов, так протеолипосом со встроенным CHIP28 (AQP1) обратимо ингибируется ртутными сульфгидрильными реагентами (PCMBS и HgCl_2) и характеризуется низкой энергией активации. Поскольку величина водного потока, опосредуемого CHIP28 ($11,7 \times 10^{-14}$ см³/с на CHIP28), соответствует известному значению P_f в интактных эритроцитах, то CHIP28 рассматривается в качестве молекулярного водного канала, который в значительной степени определяет трансмембранное движение воды в эритроците [456].

AQP1 является основным белковым водным каналом в эритроцитарной мембране. Кроме того, незначительная роль отводится AQP3 и, возможно, другим транспортным белкам, основной функцией которых является транспорт других веществ (не воды). Другими словами, PCMBS-ингибируемая водная проницаемость эритроцитов соответствует главным образом воде, транспортируемой через эритроцитарную мембрану с помощью водных белковых каналов.

Ингибирование водного транспорта с помощью PCMBS отражает закрытие белковых каналов для транспорта воды [456]. Следовательно, приведенная в табл. 3.5 величина ΔP_d , которая представляет собой разность

между значениями диффузионной водной проницаемости контрольных клеток и эритроцитов, обработанных ингибитором водного транспорта PCMBs, практически отражает активность белковых водных каналов.

Высокие значения ΔP_d для эритроцитов крысы, кролика и собаки (табл. 3.5) свидетельствуют о существенной роли белковых каналов в транспорте через их мембрану. Сравнительное электрофоретическое исследование белкового компонента эритроцитарных мембран человека, лошади, кролика, быка и крысы [379] показало, что содержание белка полосы 4.5, соответствующего гликозилированной форме аквапорина I, выше в эритроцитарной мембране кролика и крысы, чем у человека и быка. В то же время в эритроцитах этих же животных отмечается присутствие и негликозилированной формы аквапорина (7 + post7). К сожалению, аналогичных результатов для эритроцитарных мембран собаки не удалось найти. Кажущееся несоответствие между относительно низкой величиной белкового водного транспорта для эритроцитов лошади ($3,6 \times 10^{-3}$ см/с) и высоким содержанием аквапорина I в гликозилированной и негликозилированной форме, вероятно, объясняется гораздо более низким содержанием других аквапоринов в эритроцитарных мембранах лошади.

Водный транспорт, обусловленный активностью белковых водных каналов, максимально выражен для эритроцитов кролика (табл. 3.5). Это может быть связано с высокой активностью и/или большим количеством водных каналов в их мембранах (по данным [507] минимум 5×10^5 копий водных каналов на эритроцит). Кроме того, среди всех изучаемых млекопитающих именно клетки кролика характеризуются максимальной степенью ингибирования водного транспорта при использовании PCMBs (73% против 46–70% для эритроцитов других млекопитающих) (табл. 3.5) [224, 265, 266].

Данные рис. 3.14 и 3.15 свидетельствуют о значимой корреляции между показателями ГШ эритроцитов млекопитающих (пороговые концентрации NaCl и гемолиз в 4,0 моль/л NaCl) и величиной ΔP_d ,

представляющей собой разность между значениями диффузионной водной проницаемости контрольных клеток и эритроцитов, обработанных ингибитором водного транспорта РСМБС (см табл. 3.5). Так, клетки с высоким значением водного транспорта, обусловленного работой белковых каналов, начинают лизировать в более концентрированных солевых средах (рис. 3.14) и характеризуются более низким уровнем гемолитического повреждения в высококонцентрированном солевом растворе (рис. 3.15). Таким образом, эритроциты млекопитающих, имеющие мембрану с высоким значением ΔP_d , (величиной, отражающей работу белковых водных каналов), более устойчивы к действию ГШ.

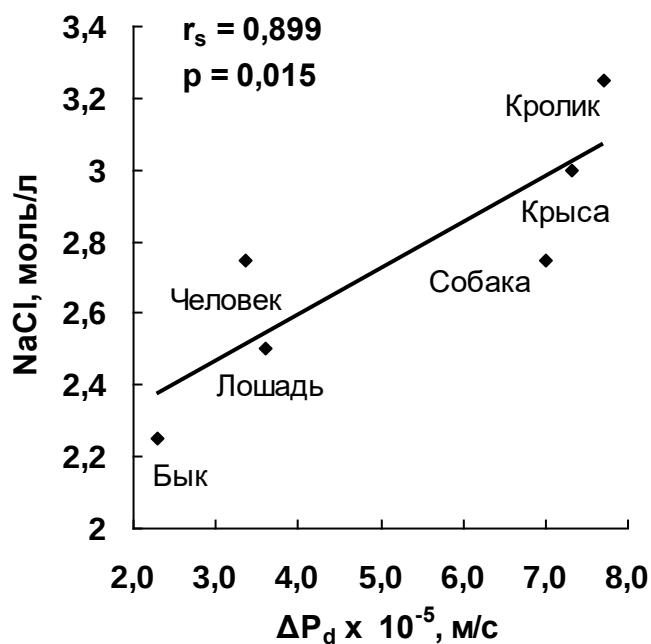


Рис. 3.14. Взаимосвязь между пороговыми концентрациями NaCl при гипертоническом шоке эритроцитов млекопитающих и коэффициентами диффузионного водного транспорта, который ингибируется РСМБС при 37°C.

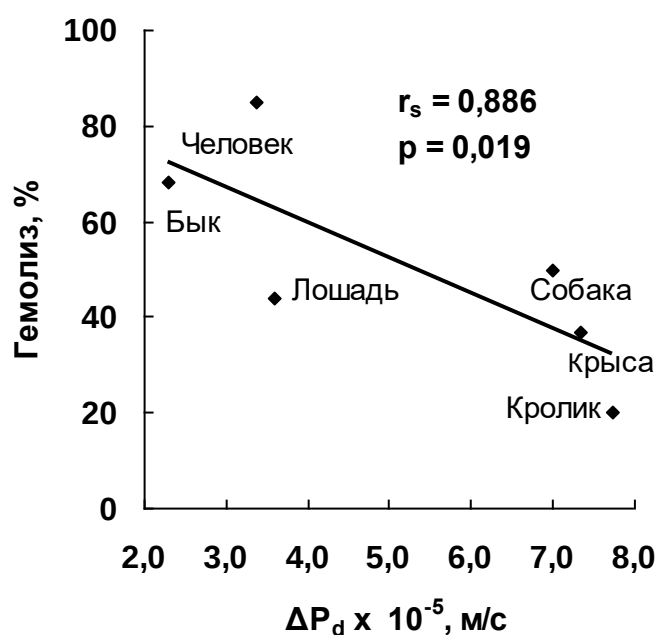


Рис. 3.15. Взаимосвязь между уровнем гемолиза эритроцитов млекопитающих в 4,0 моль/л NaCl и коэффициентом диффузионного водного транспорта, который ингибируется РСМБС, при 37°C.

Анализ силы и направления корреляционных связей свидетельствует о том, что более высокие величины пороговых концентраций соли в условиях ГШ эритроцитов млекопитающих при 37°C наблюдаются для клеток, имеющих более высокую диффузионную проницаемость для воды (рис. 3.13) и высокую активность белковых водных каналов эритроцитов млекопитающих (рис. 3.14). Клетки с отмеченными водными характеристиками имеют невысокий уровень гемолиза в 4,0 моль/л NaCl при 37°C (рис. 3.15).

Показатели гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих (при 0 и 37°C) значимо коррелируют с РСМБС-устойчивым водным транспортом в этих клетках (при 37°C) (табл. 3.6).

Таблица 3.6

**Взаимосвязь показателей гипотонического лизиса эритроцитов
млекопитающих и РСМБС-устойчивого транспорта воды**

	Пороговые концентрации (NaCl, моль/л)		Индекс осмотической хрупкости (NaCl, моль/л)	
	37°C	0°C	37°C	0°C
Коэффициент корреляции r_s	-0,926	-0,926	-0,943	-0,812
Показатель статистической значимости p	0,008	0,008	0,005	0,049

Примечание. Показатели РСМБС-устойчивого диффузионного транспорта воды – из работ [224, 265, 266]

Наличие отрицательных корреляций свидетельствует о том, что чем выше РСМБС-устойчивый водный транспорт в эритроцитах млекопитающих, тем при более низких значениях пороговых концентраций соли начинает развиваться гемолитическое повреждение клеток и при этом регистрируются меньшие величины индекса осмотической хрупкости. Таким образом, чем выше значения РСМБС-устойчивого водного транспорта через эритроцитарные мембраны, тем клетки устойчивее к действию гипотонии.

Частичное ингибирование водного транспорта в эритроцитах млекопитающих при использовании РСМБС сопровождается снижением величины водного транспорта и повышением энергии активации процесса (см табл. 3.5), что свидетельствует об участии липидного пути в обеспечении РСМБС-устойчивого транспорта воды через эритроцитарную мембрану. РСМБС-устойчивый путь может соответствовать диффузии через временные (транзиторные) дефекты в достаточно упорядоченной части липидного бислоя мембраны.

В гипотонической среде эритроциты подвергаются гемолизу, поскольку клетки набухают в результате входа воды, вследствие чего мембрана

подвергается изотропному растяжению, клетки увеличиваются в объеме и разрушаются. Существует два представления о развитии гипотонического повреждения эритроцитов человека. Первое представление основывается на том, что для гипотонического лизиса необходимы достаточно малые временные отрезки, а эритроцитарные мембраны характеризуются довольно высокой проницаемостью для воды [227, 294, 517], поэтому именно транспорт воды определяет скорость нарастания в мембранах растягивающих тангенциальных напряжений и, следовательно, наступление момента их разрыва, т.е. гемолиза [137]. Однако наши результаты не согласуются с данным представлением, поскольку не выявлено значимой корреляции между показателями гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих и характеристиками диффузионного и водного транспорта (табл. 3. 1).

Согласно другому представлению [468], основанному на микроскопических наблюдениях, время для развития гемолитического процесса в гипотонических средах непосредственно не связано со временем достижения клетками объема, при котором начинается гемолиз. Выход гемоглобина из эритроцитов происходит не мгновенно, а в течение определенного временного интервала. В нашем случае, по-видимому, характеристики водного транспорта эритроцитов млекопитающих важны на этапе набухания клеток до значения критического гемолитического объема, а на этапе формирования макроскопической поры важны иные особенности эритроцитов разных видов млекопитающих (в частности, поверхностно-объемные отношения клеток). Таким образом, определяющим при гипотоническом гемолизе является этап, связанный с формированием в мембране макроскопической поры, а не скорость достижения клетками критического гемолитического объема. В пользу такого подхода свидетельствуют и данные работы [312].

При перенесении эритроцитов в гипертонические среды происходит выход воды из клеток, что проявляется в уменьшении объема и изменении формы эритроцитов [73, 176]. Выход из эритроцитов не только свободной, но

и структурносвязанной воды приводит к нарушению конформации белковых молекул, изменению барьерных свойств эритроцитарной мембраны, что проявляется в утечке внутриклеточных катионов и выходе макромолекул гемоглобина из эритроцитов.

Повреждение клеток в высококонцентрированном солевом растворе может происходить по двум типам, различия между которыми связаны с характером изменения объема клеток непосредственно на этапе гемолитического процесса [63]. Гемолиз эритроцитов по первому типу (быстрому) развивается без изменения объема, в то время как по второму (медленному) – связан с переходом клеток в сферу.

Эритроциты при перенесении в гипертонические среды деформируются по типу изгиба. В качестве областей формирования трансмембранных гемолитических пор рассматривают мембранные участки сильного растяжения (спикулы) и значительного сжатия (вогнутые участки мембраны), где возникают неравномерные напряжения на плазматической мембране [50]. Кренирование клеток может сопровождаться локальной диссоциацией цитоскелета от плазматической мембраны [477]. Именно в этих участках, лишенных поддержки со стороны цитоскелета, возможно образование трансмембранного дефекта с последующим формированием гемолитической поры, что приведет к нестабильности клеточной мембраны [393].

В основе гемолитического повреждения эритроцитов в условиях ГЛ и ГШ лежат процессы, связанные с формированием гемолитической поры. Однако обращает на себя внимание тот факт, что эффекты температуры (37 и 0°C) при обоих видах осмотического стресса проявляются по-разному. Если в условиях гипотонии при низкой температуре (0°C) наблюдается увеличение уровня повреждения эритроцитов млекопитающих (исключение клетки собаки) (рис. 3.3, 3.4), то в условиях гипертонии – наоборот, снижение по сравнению с аналогичными показателями при 37°C (рис. 3.2). Следует отметить, что уменьшение гипертонического гемолиза эритроцитов

млекопитающих при снижении температуры выражено в разной степени, (рис. 3.1, 3.2), что, по-видимому, обусловлено особенностями эритроцитарных мембран разных видов млекопитающих [379, 205, 219, 419, 526].

Проведенный корреляционный анализ показал в ряде случаев различную направленность и тесноту связи между структурно-функциональными характеристиками эритроцитов млекопитающих и температурно-осмотическими показателями этих клеток в условиях ГШ и ГЛ (табл. А. 1–3. 1, А. 2–3. 2).

Как выявленные температурные особенности развития ГШ и ГЛ эритроцитов млекопитающих, так и результаты корреляционного анализа позволяют говорить о различном характере формирования гемолитической поры в гипертонических и гипотонических средах, причем эти различия могут проявляться как на уровне зарождения трансмембранного дефекта, так и в процессе его последующего развития до размера гемолитической поры.

Выводы

- Проведенное исследование устойчивости эритроцитов человека и животных (бык, кролик, крыса, лошадь, собака) к изменению температурных и осмотических параметров среды позволило выявить как особенности, так и закономерности устойчивости клеток млекопитающих в условиях ГЛ и ГШ.

Наиболее устойчивыми к действию ГЛ при обоих температурных режимах (0 и 37°C) являются эритроциты собаки, крысы и человека. Устойчивость клеток млекопитающих к ГШ существенно зависит от температуры. При 37°C наиболее устойчивыми к действию ГШ (по значениям пороговых концентраций NaCl и уровню гемолиза в 4,0 моль/л NaCl) являются эритроциты кролика и крысы, при 0°C (по уровню гемолиза в 4,0 моль/л NaCl) – клетки кролика, быка и лошади. Для эритроцитов всех млекопитающих уровень гемолиза в 4,0 моль/л NaCl при 0°C ниже, чем при 37°C, особенно это температурно-зависимое снижение гемолитического

повреждения выражено для эритроцитов быка.. На примере эритроцитов человека показано увеличение скорости лизиса клеток в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, в 2,5 раза с ростом температуры в диапазоне 5–20°C.

Сравнительный анализ показал, что эритроциты млекопитающих, которые устойчивы к действию гипертонического шока, достаточно чувствительны к гипотоническим средам.

- Показатели ГЛ эритроцитов человека и животных при 37 и 0°C значимо коррелируют с геометрическими характеристиками клеток: положительно с величинами поверхностно-объемного отношения (S/V) и отрицательно с диаметром клеток. Это позволяет говорить о том, что эритроциты с маленьким диаметром и высоким значением S/V чувствительны к гипотоническому лизису.

В условиях ГШ при 0°C уровень гемолиза в 4,0 моль/л NaCl коррелирует отрицательно с величинами поверхностно-объемного отношения (S/V) и положительно с диаметром клеток, что позволяет говорить о том, что при низкой температуре крупные клетки более чувствительны к действию высококонцентрированных солевых сред. Таким образом, показана обратная корреляция показателей ГЛ (при 37 и 0°C) и показателей ГШ эритроцитов млекопитающих (при 0°C) с размерами клеток.

- Показатели ГШ эритроцитов млекопитающих значимо коррелируют с показателями водной диффузионной проницаемости их мембран. Эритроциты млекопитающих более устойчивы к действию ГШ в том случае, когда их мембраны характеризуются высокими значениями диффузионной водной проницаемости и диффузионной водной проницаемости, которая ингибируется PCMBS.

При ГШ эритроцитов млекопитающих значения пороговых концентрации соли значимо коррелируют с содержанием внутриклеточной воды, уровень гемолиза эритроцитов в 4,0 моль/л NaCl – с гидрофобностью гемоглобина, основного белка эритроцитов, определяющего уровень связанной воды в клетке.

Таким образом, при оценке связи показателей температурно-осмотической устойчивости эритроцитов человека, быка, кролика, крысы, лошади и собаки со структурно-функциональными характеристиками этих клеток показано, что устойчивость клеток к ГЛ коррелирует с геометрическими характеристиками клеток (диаметр и поверхностно-объемное отношение), в то время как к действию ГШ – с проницаемостью мембраны для воды, ее внутриклеточным содержанием и гидрофобностью гемоглобина.

По материалам главы 3 опубликованы работы [6, 38, 41, 66, 70, 74, 75, 78, 125, 126, 129, 130, 167, 187, 188, 196, 197, 198, 209, 500, 501, 508].

ГЛАВА 4

ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ КРИОГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. ОСОБЕННОСТИ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ

Холодовой шок – повреждение биологического материала при быстром охлаждении, характерное для многих клеток и тканей: бактерий, эмбрионов, растительных клеток и др. [411]. Для эритроцитов человека холодовой шок наблюдается при охлаждении в изотонических условиях, когда клетки предварительно обрабатываются токсинами микроорганизмов, липазами или амфифильными соединениями [178, 411], и при суспендировании клеток в гипертонической среде с последующим охлаждением [182, 333]. В последнем случае используют термин «гипертонический криогемолиз», чтобы подчеркнуть особенности развития холодового повреждения эритроцитов человека: сдвиг температуры в определенном диапазоне и наличие гипертонической среды, которая является фактором, вызывающим сенсibilизацию клеток к последующему охлаждению до 0°C. Следует отметить, что выявленные и описанные закономерности гипертонического криогемолиза относятся к эритроцитам человека [52, 53, 503]. Поэтому представляло интерес выяснить, являются ли особенности, выявленные при изучении гипертонического криогемолиза эритроцитов человека, присущими эритроцитам других видов млекопитающих.

4.1. Гипертоничность среды как фактор, определяющий развитие гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих

Как видно из представленных данных (рис. 4.1), охлаждение эритроцитов млекопитающих в изотонических условиях не приводит к гемолитическому повреждению клеток. При достижении определенной

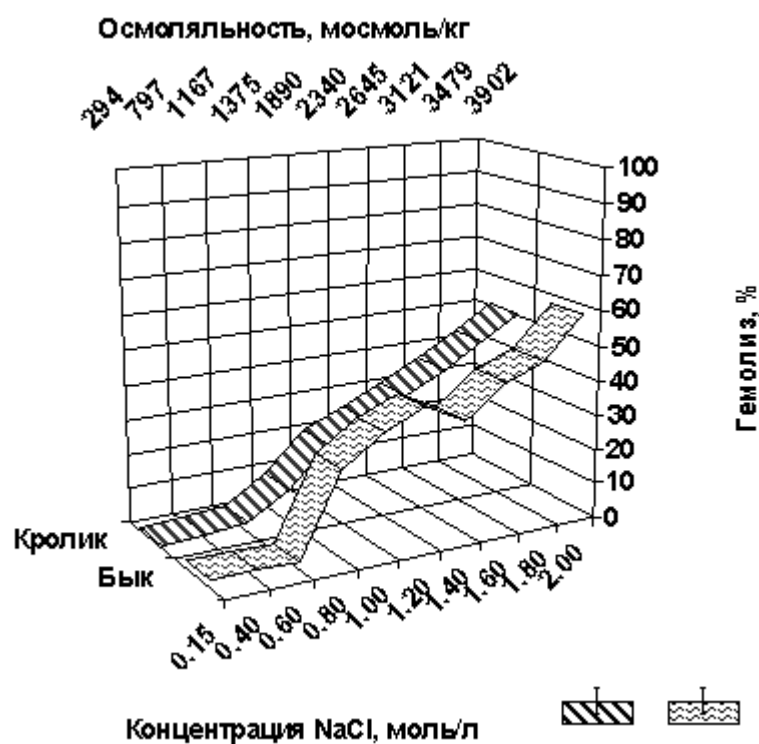
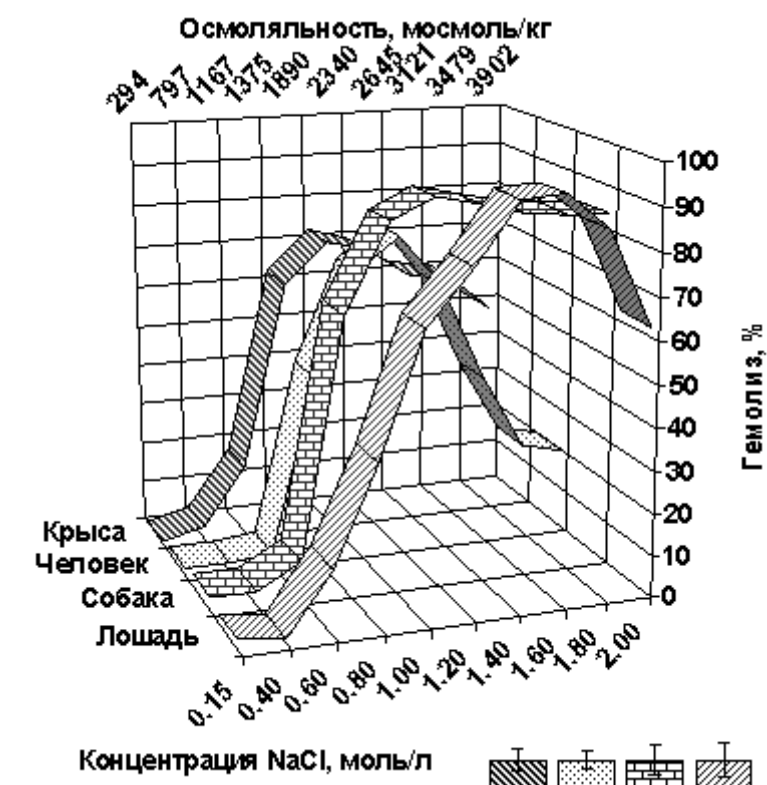


Рис. 4.1. Зависимость уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих от концентрации NaCl в среде.

концентрации соли в среде клетки при охлаждении от 37 до 0°C начинают гемолизировать, при этом видна различная реакция эритроцитов млекопитающих на действие стрессового фактора.

По значениям пороговых концентраций NaCl, (т.е. максимальные концентрации соли, при которых уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих не превышает 10%) эритроциты млекопитающих можно разделить на 2 группы. К первой группе относятся эритроциты лошади, крысы, собаки, которые начинают лизировать раньше, чем клетки человека, быка, кролика, которые составляют вторую группу. Измерение осмоляльности растворов NaCl позволило установить, что ГК эритроцитов, относящихся к первой группе, развиваются в солевых средах с осмоляльностью выше 800 мосмоль/кг, в то время как клетки второй группы гемолизуют при охлаждении в средах, осмоляльность которых превышает 1170 мосмоль/кг. Согласно результатам работы [368], верхний предел осмотической устойчивости для эритроцитов собаки составляет 1200 мосмоль/кг.

Монотонная зависимость гемолиза эритроцитов быка и кролика от концентрации соли в инкубационной среде при охлаждении от 37 до 0°C существенно отличается от зависимостей эритроцитов человека, собаки, крысы и лошади (рис. 4.1), которые характеризуются постепенным повышением уровня повреждения с последующим в большей или меньшей степени выраженным снижением. Если для эритроцитов человека максимальный уровень ГК составляет 1,2 моль/л NaCl, то клетки крысы, собаки и лошади максимально повреждаются в средах, содержащих 1,0 моль/л, 1,0–1,2 моль/л и 1,4–1,6 моль/л NaCl соответственно. Следует отметить, что эритроциты собаки, которые устойчивы к действию гипотонических и гипертонических сред (рис. 3.1–3.4), проявляют высокую чувствительность к ГК.

Особенности зависимости ГК эритроцитов человека от концентрации соли в среде авторы работ [136, 504] связывали с развитием гемолитического

процесса на первом этапе ГК. Они полагали, что наблюдаемое возрастание гемолиза эритроцитов человека при охлаждении обусловлено постепенным увеличением спонтанного (изотермического) гипертонического гемолиза при 37°C.

Однако наши данные свидетельствуют о том, что наблюдаемый рост гемолитического повреждения эритроцитов человека и животных в условиях ГК обусловлен исключительно развитием гемолитического процесса на этапе охлаждения эритроцитов до 0°C, поскольку в гипертонических средах при 37°C не регистрируется гемолитическое повреждение клеток млекопитающих (см рис. 3.1). По-видимому, на этапе гипертонического инкубирования эритроцитов при 37°C в них накапливаются скрытые повреждения, которые проявляются на последующем этапе охлаждения клеток до 0 С.

Стоит отметить, что уровень гипертонического криогемолиза эритроцитов зависит от условий эксперимента, определяющих скорость охлаждения биологического материала. В том случае, когда охлаждение суспензии эритроцитов человека в 1,2 моль/л NaCl от 37 до 0°C осуществляли перенесением пробирки (скорость 1–2 град/с), уровень гемолитического повреждения составлял $40\% \pm 5$. Гораздо более высокая скорость охлаждения достигается при перенесении аликвоты (50 мкл) из пробирки, имеющей температуру 37°C, в пробирку (1 мл) с температурой 0°C. В этом случае уровень гемолиза гораздо выше и составляет $77\% \pm 7$. В работе преимущественно использован второй вариант, поскольку гипертонический гемолиз эритроцитов рассматривается как повреждение клеток, находящихся в гипертонической среде, при резком изменении температуры.

Следует отметить, что особый характер концентрационной зависимости ГК эритроцитов кролика и быка (монотонное развитие без пиков) (рис. 4.1) сохраняется и при увеличении концентрации соли в среде до 2,4 и 2,8 моль/л NaCl соответственно [188]. Дальнейшее увеличение

концентрации соли в среде не представляется возможным из-за развития в этих средах изотермического гемолиза указанных эритроцитов.

При превышении определенной концентрации соли в среде из диапазона 1,0–1,4 моль/л (конкретная концентрационная граница зависит от вида млекопитающего) наблюдается снижение уровня гемолиза эритроцитов лошади, собаки, человека и крысы при их охлаждении. Вполне вероятно, что эту особенность ГК эритроцитов можно объяснить некой «адаптацией» клеток к ГК на этапе инкубации при температуре 37 С в растворах NaCl с концентрацией выше 1,0 моль/л (эритроциты крысы), 1,2 моль/л (клетки человека и собаки) и 1,4 моль/л (клетки лошади). «Адаптивные реакции», запускаемые высокими концентрациями соли, позволяют клеткам выдержать температурный сдвиг. Однако их эффективность гораздо выше для эритроцитов человека, лошади и крысы, чем для клеток собаки (рис. 4.1).

В основе отмеченной «адаптации» эритроцитов человека, лошади, крысы и собаки могут лежать процессы, связанные со входом катионов Na^+ в клетки, что будет приводить к снижению концентрационного градиента на мембране и, как следствие, к уменьшению уровня гемолитического повреждения эритроцитов при охлаждении.

Кроме того, на развитие гемолитического повреждения эритроцитов при охлаждении в вышеуказанных условиях могут накладываться ограничения агрегаты молекул гемоглобина, формирующиеся под действием физико-химических факторов среды. Несоответствие между размерами образовавшихся агрегатов гемоглобина и гемолитической поры не позволяет гемоглобину покинуть клетку и, как результат, ограничивает развитие гемолитического процесса, который собственно мы и регистрируем.

Представляло интерес оценить силу корреляционной связи между показателями ГК эритроцитов млекопитающих и различными параметрами, характеризующими эти клетки. В качестве показателей ГК эритроцитов были выбраны пороговые концентрации соли, значения гемолитического повреждения клеток в среде, содержащей 0,8 и 1,2 моль/л NaCl. Выбор сред

обусловлен следующим. Если в 0,8 моль/л NaCl уровень гемолиза эритроцитов всех млекопитающих невысок, поскольку клетки охлаждали в условиях невысокой осмотической нагрузки; то в 1,2 моль/л NaCl для большинства эритроцитов характерен высокий и даже максимально выраженный уровень гемолитического повреждения при охлаждении клеток в условиях достаточно сильной осмотической нагрузки. Определение силы корреляционной связи проводили между вышеуказанными показателями ГК эритроцитов разных видов млекопитающих и их клеточными характеристиками, подробно описанными в главе 3 и представленными в табличном материале к ней.

Поскольку различная чувствительность эритроцитов млекопитающих к действию осмотического фактора (гипотония и гипертония) характеризуется значимой и сильной корреляцией с геометрическими характеристиками клеток (глава 3), поэтому была проанализирована сила связи между геометрическими параметрами эритроцитов 6 видов млекопитающих (табл. 3.1) и показателями ГК клеток этих видов. Однако результаты анализа показали в основном слабую корреляцию, только уровень криогемолиза в 0,8 моль/л NaCl умеренно коррелирует с геометрическими характеристиками клеток млекопитающих (табл. А. 3). Таким образом, размеры клеток и параметры, связанные с ними, не «определяют» развитие чувствительности эритроцитов к охлаждению в гипертонических средах.

Исследование корреляционной связи характеристик гемоглобина (среднего содержания МСН (пг), средней концентрации гемоглобина МСНС (г/дл) в эритроците разных млекопитающих, а также гидрофобно-гидрофильного баланса гемоглобина), представленных в табл. 3.2, и показателей ГК показало значимую сильную отрицательную корреляцию между пороговыми концентрациями соли в условиях ГК эритроцитов млекопитающих и средней концентрацией гемоглобина МСНС (г/дл) ($r_s = -0,878$, $p = 0,021$). В то же время корреляционная оценка выявила отсутствие значимых и сильных связей ГК эритроцитов млекопитающих с

катионным составом цитоплазмы (K^+ , Na^+ , Mg^{2+}), содержанием АТФ, внутриклеточной воды в этих клетках (табл. Б. 3).

Эритроциты млекопитающих гемолизуют под действием альфа-токсина из *Clostridium septicus*, причем гемолитическая активность токсина зависит от температуры [461]. Установлены сильные корреляционные связи между концентрацией токсина, необходимой для 50% гемолиза эритроцитов животных (крыса, бык, лошадь, кролик, собака) при 30°C (табл. 3.4), и пороговыми концентрациями соли ($r_s = -0,866$, $p = 0,058$), уровнем гемолиза в 0,8 моль/л NaCl ($r_s = -0,800$, $p = 0,104$) при ГК (табл. Ж. 3).

Обращает на себя внимание тот факт, что в отличие от гипотонического лизиса эритроцитов, для которого наблюдается положительная корреляция с гемолитической активностью токсина, для ГК, как и для ГШ, – отрицательная (табл. Ж. 3). Таким образом, существуют некие факторы, однонаправленно влияющие на развитие гемолитического процесса эритроцитов животных как в условиях гипотонии, так и в присутствии альфа-токсина, и противоположно на развитие гемолиза в условиях ГК и ГШ.

В основном слабые и умеренные связи были выявлены между характеристиками водного транспорта эритроцитов млекопитающих (табл. 3.5) и показателями ГК клеток (табл. З. 3).

Содержание общих липидов (без учета ганглиозидов), выраженное в мг/мл упакованных клеток (табл. 3.3), значимо коррелирует с уровнем гемолиза в 0,8 моль/л NaCl ($r_s = 0,900$, $p = 0,037$) и сильно с уровнем повреждения в 1,2 моль/л NaCl при охлаждении от 37 до 0°C ($r_s = 0,800$, $p = 0,104$) (табл. В. 3). Положительное значение указанных коэффициентов корреляции свидетельствует о более высоком уровне ГК тех эритроцитов млекопитающих, мембраны которых характеризуются высоким содержанием липидов.

Следует отметить, что между уровнем криогемолиза эритроцитов млекопитающих в 1,2 моль/л растворе NaCl и липидным составом мембран

этих клеток сила связи слабее, чем теснота связи между гемолизом в 0,8 моль/л растворе NaCl и содержанием мембранных липидов (табл. В. 3 и Д. 3). Это, по-видимому, обусловлено тем, что в более концентрированных солевых средах происходят дополнительные события, обуславливающие повреждение клеток, и/или сила и выраженность событий, лежащих в основе повреждения биологического материала, достаточно сильна, что мешает проследить и оценить силу корреляционной связи. Кроме того, возможно, большее количество факторов определяет повреждение клеток при действии более сильного стресса, что и затрудняет отслеживание силы корреляционной связи.

Стероиды, которые являются жизненно необходимыми компонентами биологических мембран, в эритроцитах млекопитающих представлены холестерином (ХС). ХС является производным циклопентанпергидрофенантрена с разветвлённой боковой цепью из 8 углеродных атомов в положении 17, 2-х «ангулярных» метильных групп (в положении 18 и 19) и гидроксильной группы в положении 3, что позволяет его отнести к ненасыщенным спиртам (рис. 4.2).

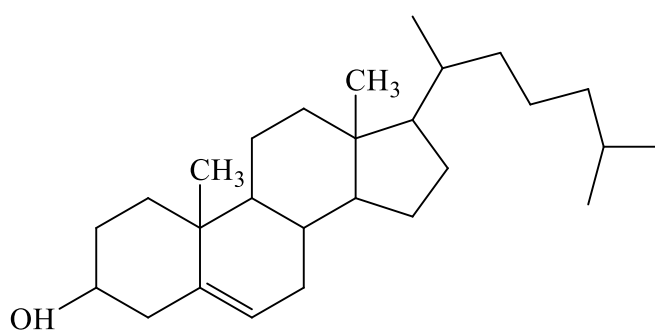


Рис. 4.2. Структура холестерина.

Молекула ХС характеризуется амфифильностью, обусловленной, с одной стороны, гидрофобным гетероциклом и гидрофобными заместителями (боковая цепь в положении 17 и двумя метильными группами в положении 18 и 19) и, с другой стороны, гидрофильной гидроксильной группой (в

положении 3). Эта группа способствует образованию водородных связей с водой и, возможно, с другими компонентами мембран [46]. Амфифильность молекул ХС позволяет им встраиваться в мембрану. Кольцевая структура ХС отличается значительной жесткостью, в то время как боковая цепь – относительной подвижностью.

В мембранный бислой ХС встраивается параллельно углеводородным цепям фосфолипидов, при этом его гидроксильная группа (в положении 3) находится в непосредственной близости от сложноэфирной карбонильной группы фосфолипидов, а алкильная боковая цепь стерина вытянута в направлении центра бислоя [46, 257]. Жесткая кольцевая структура холестерина находится в непосредственной близости от углеродов жирнокислотной цепи соседних фосфолипидов в позициях 2–10 [257], что будет приводить к упорядочиванию этой части углеводородных цепей. В то же время относительно гибкая боковая цепь стерина расположена вдоль той части жирнокислотной цепи, которая удалена от фосфолипидного остова (углероды находятся в позиции 11 и выше), и оказывает на этот домен менее выраженный упорядочивающий эффект [46, 257].

Биологические мембраны характеризуются асимметричным распределением липидных компонентов. Неравномерное распределение холестерина между двумя монослоями бислоя показано как на модельных системах (однослойные везикулы 600 Å), приготовленных из мононенасыщенных липидов [354], так на природных мембранах [255].

Количественный анализ с помощью флуоресцентных стеролов (дегидроэргостерол и холестатриенол) показал преимущественное распределение холестерина во внутреннем монослое липидного бислоя [494]. В частности, для эритроцитов человека показано, что внутренний монослой плазматической мембраны содержит 78% холестерина, причем трансбислойное распределение стерола не зависит от температуры [514].

Для биологических мембран характерна планарная гетерогенность, т.е. неравномерное распределение липидов в плоскости мембраны [175].

Поскольку в настоящее время не существует общепризнанной модели строения биологической мембраны, то поэтому имеется несколько точек зрения на распределение и роль холестерина в ней [257, 305, 453, 488, 522]. Несмотря на определенное расхождение в результатах разных авторов по содержанию холестерина в эритроцитарных мембранах млекопитающих [419, 526], можно выделить определенные закономерности. Во-первых, меньше всего содержит холестерина эритроцитарная мембрана человека, больше всех – клетки быка и особенно кролика. Расхождения по содержанию холестерина относятся к эритроцитам крысы, собаки и лошади, однако эти клетки занимают промежуточное положение между эритроцитами человека, с одной стороны, и клетками быка и кролика, с другой.

За основу были взяты данные по содержанию холестерина в эритроцитарных мембранах клеток человека [526] и животных [419], представленные в таблице 3.3. По увеличению содержания холестерина (%) в эритроцитарных мембранах клетки млекопитающих можно расположить в следующей последовательности: человек, крыса, собака, лошадь, бык и кролик (23,0; 26,1; 28,2; 28,7; 28,8 и 29,9 соответственно).

Значимая отрицательная корреляция между уровнем гемолитического повреждения эритроцитов млекопитающих в 0,8 моль/л растворе NaCl при охлаждении и содержанием ХС в плазматических мембранах этих клеток ($r_s = -0,900$, $p = 0,037$) (рис. 4.3) свидетельствует об обратной взаимосвязи между уровнем гемолиза эритроцитов млекопитающих в условиях ГК и содержанием ХС в их мембранах. Таким образом, чем выше мембранное содержание ХС, тем устойчивее клетки к охлаждению в гипертонических средах.

Вышеприведенное свидетельствует о важности ХС в развитии холодового повреждения эритроцитов млекопитающих, а также объясняет его особенности (холодового повреждения эритроцитов в условиях гипертонии).

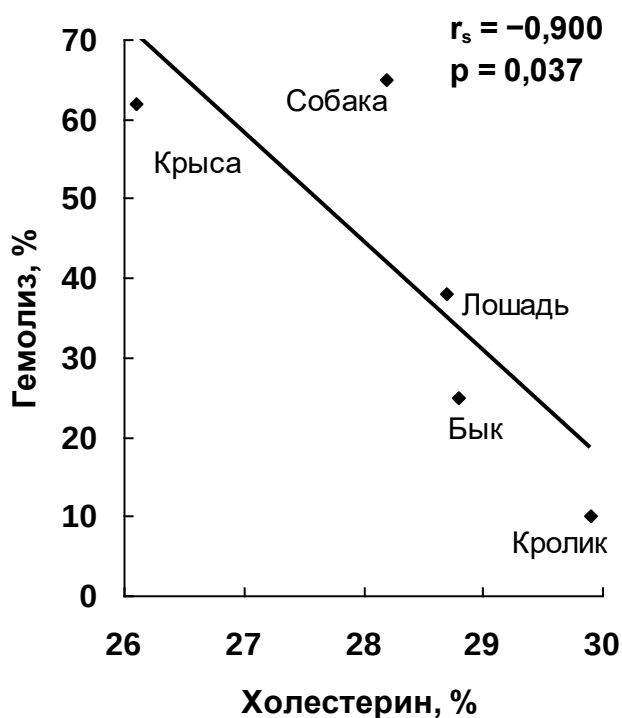


Рис. 4.3. Взаимосвязь между уровнем гемолиза в 0,8 моль/л NaCl при охлаждении клеток от 37 до 0°C и содержанием холестерина в мембранах эритроцитов млекопитающих.

Вышеприведенное свидетельствует о важности ХС в развитии холодового повреждения эритроцитов млекопитающих, а также объясняет его особенности (холодового повреждения эритроцитов в условиях гипертонии).

Наиболее важная функция ХС – его способность модулировать физико-химические свойства клеточных мембран [175, 256, 339, 531]. ХС влияет на фазовый переход бислойных фосфолипидов. ХС индуцирует «промежуточное состояние» в фосфолипидных молекулах, с которыми он взаимодействует, увеличивая текучесть углеродных цепей ниже и уменьшая текучесть выше температуры фазового перехода геля в жидкий кристалл [282]. В биологически важном жидкокристаллическом состоянии ХС увеличивает степень упорядоченности и снижает подвижность

углеводородных цепей мембранных фосфолипидов [531]. Это приводит к усилению плотности и снижению проницаемости мембран, увеличению их микровязкости [256, 483, 531]. Благодаря ХС истинные температурные фазовые переходы в плазматических мембранах клеток млекопитающих отсутствуют или крайне редки [46].

По данным, полученным с помощью ЭПР спектроскопии, увеличение концентрации ХС в мембранах эритроцитов приводит к уплотнению липидного бислоя и снижению взаимодействия между полярными головками фосфолипидов, в то время как уменьшение концентрации ХС вызывает обратный эффект [243]. Многочисленные экспериментальные данные подтверждают зависимость устойчивости эритроцитарных мембран к действию различных повреждающих факторов от содержания в них ХС [210, 337, 451].

В работе [451] при исследовании влияния мелиттина на гемолитическое повреждение эритроцитов крысы с различным мембранным содержанием холестерина показано, что истощение холестерина на 55% сопровождается трехкратным увеличением гемолитической активности мелиттина. Следовательно, можно говорить о том, что мембранный холестерин подавляет литическую активность мелиттина.

Результаты работы [337] показывают, что направленное уменьшение содержания холестерина в мембранах эритроцитов кролика приводит к дестабилизации мембран, усилению их повреждений после инкубирования с трет-бутилгидропероксидом, что проявляется в уменьшении доли фосфолипидов, ненасыщенных жирных кислот, снижении осмотической резистентности и усилении гемолиза эритроцитов. Кроме того, изменение содержания холестерина в эритроцитах кролика способствует экспонированию фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны [392].

Способность флавоноидов защищать эритроциты от окислительного стресса снижается при уменьшении содержания холестерина в

плазматических мембранах [263, 391]. Авторы работы [466] полагают, что высокая устойчивость эритроцитов к действию детергента Тритона X-100 определяется общим содержанием холестерина и сфингомиелина в исходных мембранах и, как следствие, высокой степенью упорядоченности углеводородных цепей фосфолипидов.

Таким образом, уменьшение концентрации ХС в эритроцитарной мембране сопровождается снижением осмотической устойчивости клеток, способствует увеличению чувствительности к действию детергентов и гемолитических агентов [337, 390].

Избыточное накопление холестерина в эритроцитарной мембране при ряде заболеваний может обуславливать изменение физико-химических свойств эритроцитарной мембраны: повышение ее микровязкости, ухудшение деформируемости клеток и способности к прохождению в микроциркуляторном русле. Таким образом, предрасположенность к гемолизу может быть обусловлена как недостаточным, так и избыточным содержанием ХС в мембранах.

Наблюдаемое снижение устойчивости клеток к действию различных стрессовых факторов при искусственном изменении содержания холестерина в мембране могут быть проявлением как собственно стерола, так и изменений, сопутствующих и развивающихся в процессе истощения или обогащения клеток холестерином. Использование нативных эритроцитов млекопитающих, мембраны которых характеризуются различным содержанием холестерина (табл. 3.3) позволяет делать более смелые предположения и однозначные выводы.

Значимая корреляционная связь между показателем ГК эритроцитов млекопитающих (уровень гемолиза в 0,8 моль/л NaCl) и содержанием холестерина, установленная в работе (рис. 4.3), свидетельствует в пользу ведущей роли последнего в обеспечении устойчивости клеток к охлаждению в гипертонических средах, т.е. в поддержании целостности и упорядоченности липидной фазы мембран эритроцитов.

Исходя из установленной важности состояния липидного бислоя эритроцитарной мембраны в обеспечении устойчивости клеток к действию ГК, представляло интерес проанализировать фосфолипидный состав мембран эритроцитов разных видов млекопитающих и оценить силу связи состава мембранных фосфолипидов и характеристик ГК этих эритроцитов (табл. 4.1).

Таблица 4.1

**Фосфолипидный состав мембран эритроцитов млекопитающих
[526]**

Млекопитающие	ЛФХ	СМ	ФХ	ФИ	ФС	ФЭА	ФК
Крыса	3,8	12,8	47,8	3,5	10,8	21,5	0,3
Бык	0	46,2	0	3,7	19,3	29,1	0,3
Лошадь	1,7	13,5	42,4	0,3	18,0	24,3	0,3
Человек	0	26,9	28,9	1,3	13,0	27,2	2,2
Кролик	0,3	19,0	33,9	1,6	12,2	31,9	1,6
Собака	1,8	10,8	46,9	2,2	15,4	22,4	0,5

Примечание. Данные представлены в процентах от общих фосфолипидов эритроцитарных мембран.

В работе представлены систематизированные результаты, отражающие качественно-количественные особенности состава мембранных фосфолипидов эритроцитов человека и разных видов животных. Видно (табл. 4.1), что эритроцитарные мембраны млекопитающих различаются по содержанию тех фосфолипидов, которые определяют текучесть мембраны. СМ и ФЭА приводят к снижению текучести мембраны, в то время как ФХ и ЛФХ оказывают противоположный эффект и приводят к повышению ее текучести [530].

По мере увеличения содержания мембранных фосфолипидов, вызывающих ужесточение эритроцитарной мембраны, клетки млекопитающих можно расположить следующим образом:

СМ – собака < крыса < лошадь < кролик < человек < бык;

ФЭА – крыса < собака < лошадь < человек < бык < кролик

В то же время расположение млекопитающих по мере снижения содержания фосфолипидов, обуславливающих уменьшение жесткости эритроцитарной мембраны, следующее:

ФХ – крыса > собака > лошадь > кролик > человек > бык;

ЛФХ – крыса > собака > лошадь > кролик = человек = бык.

Представленные данные в принципе позволяют говорить о совпадении последовательностей.

Анализ тесноты и направленности корреляции показателей ГК эритроцитов млекопитающих и характеристик фосфолипидного состава их эритроцитарных мембран (табл. Д. 3) свидетельствует об определенной связи мембранных фосфолипидов и чувствительности эритроцитов млекопитающих к ГК.

Пороговые концентрации NaCl при ГК эритроцитов млекопитающих значимо положительно коррелируют с мембранным содержанием СМ, ФЭА, сфингозина и значимо отрицательно с содержанием фосфатидилхолина в различных комбинациях (табл. 4.2). Таким образом, чем больше эритроцитарная мембрана содержит СМ, ФЭА и меньше ЛФХ, ФХ, СМ + ФХ, ЛФХ + СМ + ФХ, тем выше пороговая концентрация соли при ГК эритроцитов (табл. 4.2), что позволяет говорить о большей устойчивости таких клеток на начальных этапах развития ГК. Поскольку СМ и ФЭА уменьшают, а ФХ повышает текучесть мембраны [530], то установленные направленность и теснота корреляций позволяют говорить о возможной роли текучести эритроцитарной мембраны либо связанных с нею параметров в развитии гемолитического повреждения клеток на начальных этапах ГК.

**Взаимосвязи между пороговыми концентрациями NaCl при
гипертоническом криогемолизе и липидным составом плазматических
мембран эритроцитов млекопитающих**

Липиды	Коэффициент корреляции r_s	Показатель статистической значимости p
ЛФХ	-0,891	0,017
СМ	0,878	0,021
ФХ	-0,878	0,021
СМ + ФХ	-0,878	0,021
ЛФХ + СМ + ФХ	-0,878	0,021
ФЭА	0,878	0,021
Сфингозин	0,878	0,021

Кроме того, состояние насыщенности жирных кислот существенно влияет на степень текучести мембран. При увеличении степени ненасыщенности упаковка гидрофобных хвостов в ядре бислоя в большей степени нарушается, что приводит к повышению текучести мембраны. Однако сильных связей между показателями ГК и степенью ненасыщенности жирнокислотных цепей не было выявлено (табл. Д. 3).

Уровень гемолиза в 0,8 моль/л NaCl при охлаждении эритроцитов млекопитающих от 37 до 0°C значимо положительно коррелирует с содержанием холин-содержащих фосфолипидов (рис. 4.4) и значимо отрицательно с ФЭА (рис. 4.5).

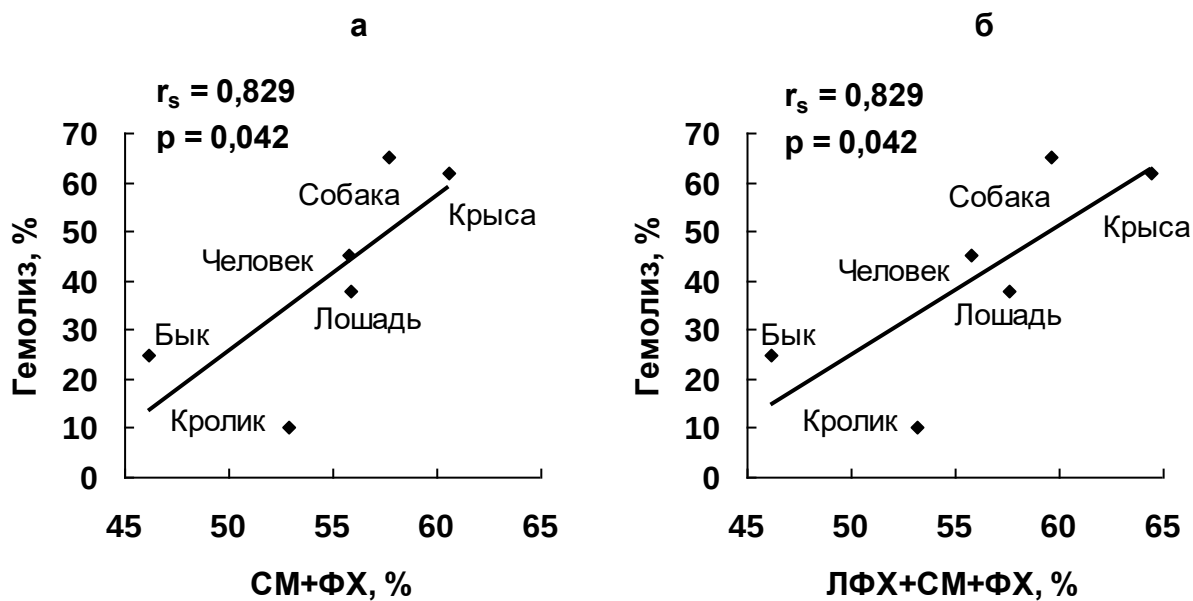


Рис. 4.4. Взаимосвязь между уровнем гемолиза в 0,8 моль/л NaCl при охлаждении клеток от 37 до 0°C и содержанием холин-содержащих фосфолипидов в мембранах эритроцитов млекопитающих:

а – сфингомиелин + фосфатидилхолин;

б – лизофосфатидилхолин + сфингомиелин + фосфатидилхолин.

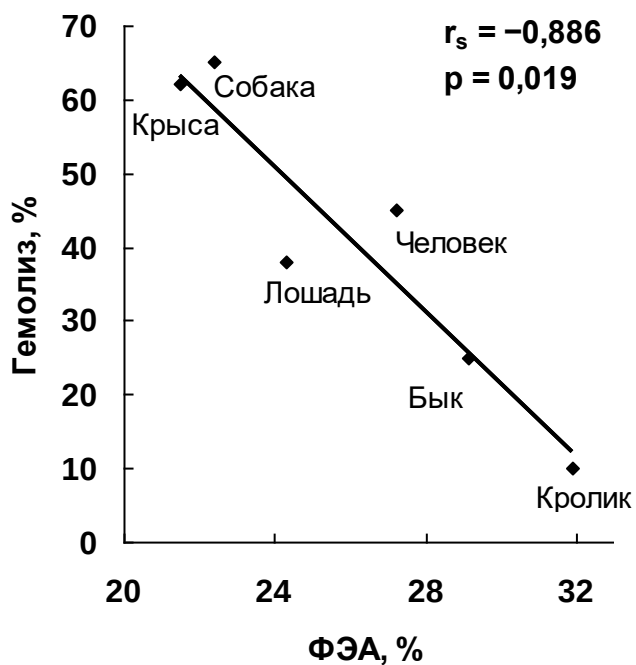


Рис. 4.5. Взаимосвязь между уровнем гемолиза в 0,8 моль/л NaCl при охлаждении клеток от 37 до 0°C и содержанием фосфатидилэтаноламина в мембранах эритроцитов млекопитающих

Таким образом, мембранное содержание таких липидов, как холестерин, ФЭА и холин-содержащие фосфолипиды (СМ и ФХ в различных комбинациях), «определяют» устойчивость эритроцитов разных видов млекопитающих к охлаждению в высококонцентрированных солевых средах. Эритроциты, характеризующиеся высоким содержанием холестерина, ФЭА и низким ФХ, более устойчивы к повреждающему действию ГК – это клетки быка и кролика.

Холин-содержащие фосфолипиды по-разному влияют на текучесть мембраны. Если ФХ и ЛФХ увеличивают, то сфингомиелин, наоборот, уменьшает ее текучесть [530]. Анализ соотношения ФХ и СМ в мембранах эритроцитов разных видов млекопитающих (табл. 4.1) [526] показал доминирование в составе мембраны ФХ (исключением являются эритроциты быка, которые фактически лишены этого фосфолипида). Исходя из этого можно полагать, что с увеличением содержания суммарных холин-содержащих липидов, будет повышаться текучесть мембраны, поскольку, как правило, это происходит за счет большего изменения содержания ФХ.

Липидный состав мембран, который определяет такой важный интегральный параметр мембраны как ее текучесть, является значимым в обеспечении устойчивости клеток к действию гипертонического криогемолиза. Эритроциты с плазматической мембраной, характеризующейся высокой текучестью, более устойчивы к повреждающему действию ГК. Текучесть мембраны, которую, в первую очередь, определяет ее липидный состав, важна для обеспечения жизнедеятельности клетки и ее адаптации к действию различных стрессовых факторов [530].

4.2. Значение выхода ионов K^+ в развитии гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих

Для проявления чувствительности эритроцитов млекопитающих к охлаждению необходим предварительный этап, который заключается в инкубировании клеток в гипертонических средах определенной осмоляльности при 37°C (рис. 3.1 и 4.1). Это позволяет предположить развитие в клетках каких-то изменений, обеспечивающих сенсibilизацию эритроцитов к последующему сдвигу температуры. В пользу этого свидетельствуют и результаты, полученные при изучении чувствительности эритроцитов человека к охлаждению в гипертонических средах. Так, показано, что эти клетки гемолизуют при охлаждении от 37 до 0°C в том случае, когда на этапе гипертонического инкубирования при 37°C наблюдается потеря клетками ионов калия [17, 69].

Исходя из вышесказанного, можно допустить, что наблюдаемые концентрационные зависимости ГК эритроцитов млекопитающих (рис. 4.1) обусловлены видовыми особенностями проницаемости мембран этих клеток для катионов K^+ в гипертонических условиях на первом этапе при 37°C.

Для проверки этого предположения с помощью метода ионселективной потенциометрии изучали выход ионов K^+ из эритроцитов человека и животных в гипертонических средах при 37°C. Полученные результаты сопоставляли с данными гемолитического повреждения клеток после их охлаждения до 0°C. Для данной серии экспериментов были выбраны эритроциты лошади, человека и кролика как клетки с доминирующим внутриклеточным катионом калия и с различной чувствительностью к ГК

На рис. 4.6 представлены зависимости выхода ионов K^+ из эритроцитов млекопитающих при температуре 37°C (1) и гемолиза этих клеток при последующем охлаждении до 0°C (2) от концентрации NaCl в среде.

Выход ионов K^+ из клеток на уровне, превышающем 10%, для эритроцитов человека начинается в средах, содержащих 0,8 моль/л NaCl, для клеток лошади и кролика – в 1,0 моль/л растворе NaCl. Потеря клетками млекопитающих катионов K^+ увеличивается по мере роста концентрации соли в среде и достигает практически максимального значения в растворе, содержащем 2,0 моль/л NaCl. Несмотря на небольшие различия, в общем, концентрационные зависимости выхода ионов K^+ из клеток человека, лошади и кролика достаточно схожи, в отличие от гемолитических зависимостей этих клеток, полученных при последующем охлаждении до 0°C.

Для эритроцитов человека и лошади (рис. 4.6 а и б) можно выделить концентрационные диапазоны соли (0,8–1,2 моль/л и 0,6–1,6 моль/л NaCl соответственно), в которых наблюдается как увеличение выхода ионов калия из клеток, так и рост уровня гемолиза при их последующем охлаждении. Следует отметить, что величины гемолитического повреждения значительно выше уровня выхода ионов K^+ из клеток. Обращает на себя внимание тот факт, что примерно 50% утечка ионов K^+ соответствует максимальному уровню гипертонического криогемолиза эритроцитов человека и лошади.

Дальнейшее увеличение концентрации соли в среде (больше 1,2 моль/л и 1,6 моль/л NaCl) приводит к постепенному снижению уровня ГК эритроцитов человека и лошади соответственно, в то время как выход ионов K^+ из клеток продолжает расти в исследуемом концентрационном диапазоне хлорида натрия.

Таким образом, для эритроцитов человека и лошади существует концентрационный диапазон соли (0,6–1,2 и 0,6–1,6 моль/л NaCl соответственно), в котором выход ионов K^+ на этапе предварительной инкубации при 37°C определяет уровень повреждения при последующем охлаждении этих клеток до 0°C, причем увеличение уровня гемолиза эритроцитов при охлаждении до 0°C опережает рост выхода ионов K^+ при 37°C.

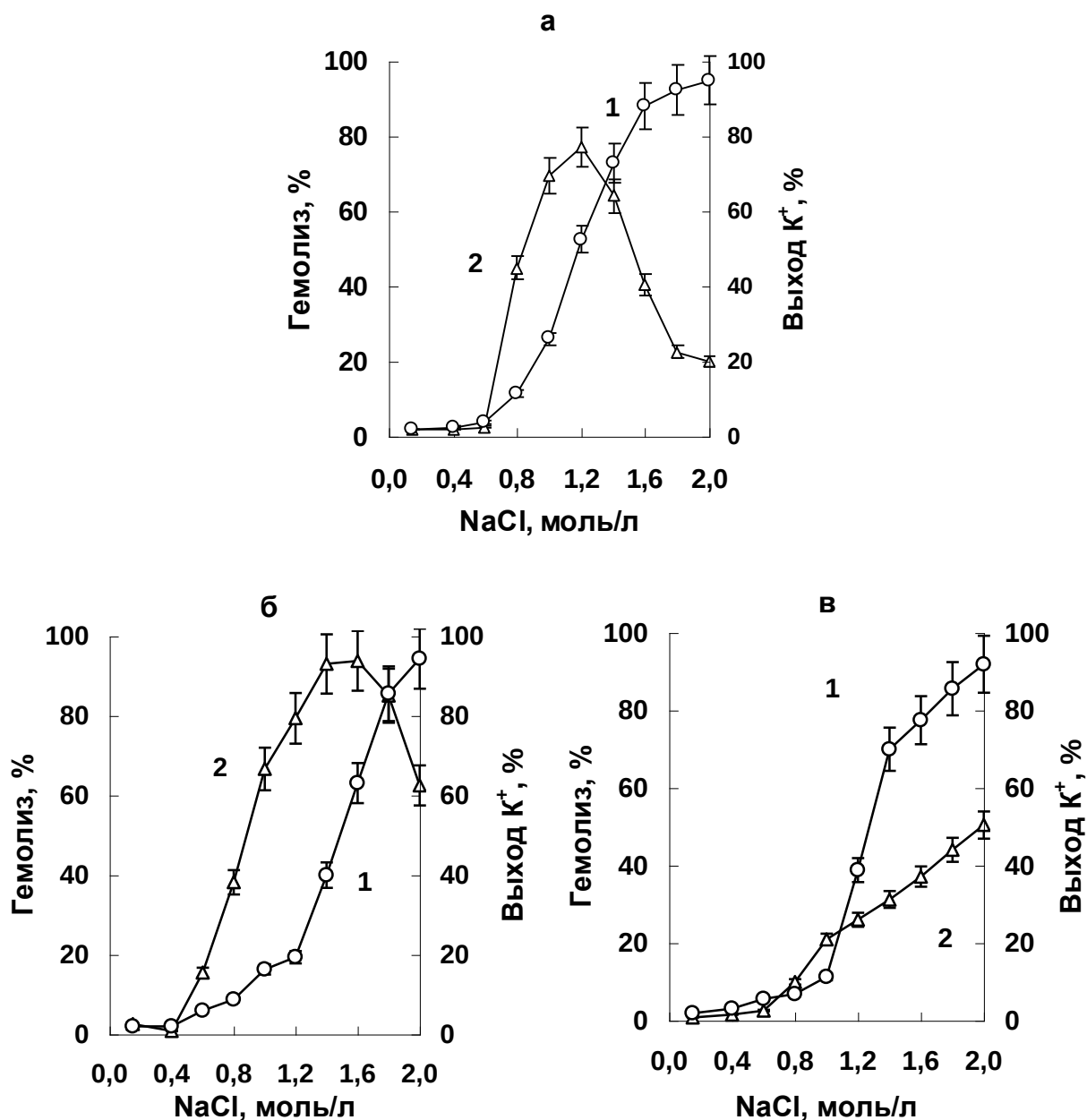


Рис. 4.6. Зависимости выхода ионов K^+ при температуре 37°C (1) и уровня гемолиза эритроцитов млекопитающих при охлаждении до 0°C (2) от концентрации NaCl в среде: а – человек, б – лошадь, в – кролик.

Эритроциты быка и кролика весьма устойчивы к действию ГК. Их концентрационные зависимости гемолиза в условиях ГК характеризуются монотонностью в отличие от клеток человека, лошади, собаки и крысы. Для изучения особенностей выхода ионов K^+ из эритроцитов, устойчивых к

действию ГК, были выбраны клетки кролика, поскольку они являются высококалиевыми в отличие от эритроцитов быка, для которого характерно низкое содержание внутриклеточного калия.

Как видно из рис. 4.6 в, для эритроцитов кролика наблюдается как увеличение выхода ионов K^+ на этапе инкубирования клеток при 37, так и рост уровня гемолиза при охлаждении клеток до 0°C во всем исследуемом концентрационном диапазоне NaCl. Интересно, что по соотношению уровня выхода ионов K^+ и величины гемолиза эритроцитов кролика весь концентрационный интервал NaCl можно разбить на 2 участка. Для первого участка, который слабо выражен по сравнению с клетками человека и лошади, характерно преобладание гемолиза над выходом ионов K^+ из клеток. На втором участке уровень потери клетками ионов K^+ явно превосходит значения гемолитического повреждения.

Полагают [17, 69], что гипертонические среды индуцируют в эритроцитарной мембране комплекс изменений, которые в итоге могут приводить к формированию или активированию микродефектов. Внутриклеточные ионы, в частности катионы K^+ , способны через эти образования покидать клетку. Процесс охлаждения, вероятно, способствует развитию этих микродефектов до размера, соизмеримого с размерами макромолекул гемоглобина, поэтому на этапе сдвига температуры от 37 до 0°C развивается гемолитическое повреждение эритроцитов.

Основываясь на этих предположениях и учитывая полученные результаты (рис. 4.6), можно говорить об одинаковой скорости формирования мембранных микродефектов в эритроцитах изучаемых млекопитающих. Однако на этапе охлаждения до 0°C проявляются различия между клетками человека и лошади, с одной стороны, и эритроцитами кролика, с другой, связанные, по-видимому, с особенностями развития процессов, лежащими в основе роста микродефекта до размера гемолитической поры. Наши данные свидетельствуют о том, что при сдвиге температуры до 0°C дальнейшая эволюция микродефектов, направленная на

увеличение их размеров, затруднена в эритроцитарных мембранах кролика по сравнению с клетками человека и лошади. По-видимому, это связано с особенностями цитоскелет-мембранного комплекса эритроцитов разных видов млекопитающих [205, 314, 520, 526].

Противоположная направленность процессов (увеличение потери внутриклеточного калия при 37°C и снижение гемолитического повреждения при последующем охлаждении до 0°C), выявленная для эритроцитов человека и лошади в определенном диапазоне концентраций соли (рис. 4.6 а и б), может быть обусловлена как состоянием мембраны, так и состоянием гемоглобина. Высокая осмоляльность среды может таким образом модифицировать эритроцитарную мембрану, что в ней будет затруднено формирование макроскопических пор, проницаемых для молекул гемоглобина. Кроме того, возможно изменение состояния внутриклеточного гемоглобина под действием физико-химических факторов среды и, как следствие, формирование крупных молекулярных агрегатов, которые не в состоянии покинуть клетку.

Таким образом, выход ионов калия из эритроцитов человека, лошади и кролика на этапе гипертонического инкубирования при 37°C является необходимым условием для развития гемолитического повреждения клеток при их последующем охлаждении до 0°C. Однако следует отметить, что это не является, пожалуй, единственным условием, определяющим характер развития гемолитического повреждения клеток по мере роста осмолярности внешней среды.

В работе [17] сформулирована одна из закономерностей, которая характерна для ГК эритроцитов человека – между уровнем освобождения K^+ из эритроцитов человека в гипертонической среде при 37°C и лизисом клеток при последующем сдвиге температуры среды до 0°C существует выраженная корреляция. Однако следует отметить, что данная формулировка не совсем конкретна и корректна, поскольку в ней как не указан концентрационный

диапазон соли в среде, так и используется термин «корреляция» без указания силы корреляционной связи и показателя статистической значимости.

Проведенная нами работа позволяет как откорректировать, так и конкретизировать вышеприведенную формулировку, при этом расширить ее применение за счет включения результатов, полученных при изучении ГК эритроцитов животных. Анализ полученных нами результатов позволяет дать эту формулировку в следующем виде. Между уровнем выхода ионов K^+ из эритроцитов млекопитающих на этапе предварительной инкубации в гипертонической среде при $37^{\circ}C$ и уровнем гемолитического повреждения клеток при их дальнейшем охлаждении до $0^{\circ}C$ установлена значимая корреляционная связь. Однако, если для достаточно устойчивых к действию ГК эритроцитов кролика корреляция наблюдается во всем используемом концентрационном диапазоне NaCl (до 2,0 моль/л) ($r_s = 1,000$), то для эритроцитов человека и лошади значимые корреляционные связи прослеживаются в том случае, когда охлаждение осуществляется в средах, содержащих 0,15–1,2 ($r_s = 0,986$, $p = 0,00031$) и 0,15–1,6 моль/л NaCl ($r_s = 0,994$, $p = 0,00002$) соответственно.

Следует отметить, что выход ионов калия из эритроцитов человека, лошади и кролика на этапе гипертонического инкубирования при $37^{\circ}C$ является необходимым условием для развития гемолитического повреждения клеток при их последующем охлаждении до $0^{\circ}C$

4.3. Температурные диапазоны гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих

Гипертонический криогемолиз эритроцитов связывают с развитием двух основных процессов: обезвоживанием клеток в гипертонической среде и изменением температуры. Если гипертоническая среда определенной осмоляльности сенсibiliзирует эритроциты к последующему охлаждению,

что проявляется в утечке ионов K^+ из клетки (рис. 4.6), то температурный диапазон, в рамках которого происходит последующее охлаждение клеток, будет определять как возможность, так и уровень гемолитического повреждения эритроцитов. Сочетанное действие гипертонии и изменения температуры в итоге детерминируют уровень ГК эритроцитов.

Ранее были проведены исследования роли температурного диапазона в развитии гипертонического криогемолиза эритроцитов человека [503], что позволило выявить и сформулировать некоторые его закономерности [52]. Так, чувствительность эритроцитов человека к процедуре ГК увеличивается при повышении температуры первой стадии ГК в диапазоне от 13 до 45°C, и при уменьшении температуры, до которой производится охлаждение на второй стадии ГК от 13 до 0°C [52].

Учитывая качественно-количественные особенности цитоплазмы и плазматической мембраны разных видов млекопитающих [205, 314, 520, 526], представляло интерес исследовать значение температурного фактора в развитии ГК эритроцитов разных видов млекопитающих. Традиционно процесс ГК эритроцитов заключается в инкубировании клеток в гипертонических условиях при 37 (первый этап) и последующем охлаждении их до 0°C без изменения осмолярности среды (второй этап).

Исследование влияния температуры на развитие ГК эритроцитов проводили в 2-х вариантах: варьировали температуру 1-го этапа ГК в диапазоне 5 ÷ 37°C при постоянной температуре 2-го этапа (0°C) или изменяли температуру 2-го этапа (5 ÷ 37°C) при постоянном температурном режиме 1-го этапа (37°C). В качестве среды инкубирования использовали 1,2 моль/л NaCl, поскольку в этом растворе эритроциты характеризуются достаточно высоким уровнем повреждения. Началом лизиса клеток считали превышение 10%-го уровня гемолиза.

На рис. 4.7 а представлены величины гемолиза эритроцитов человека и животных, регистрируемые при охлаждении клеток от 37°C до разных значений температуры. Видно, что максимальное повреждение эритроцитов

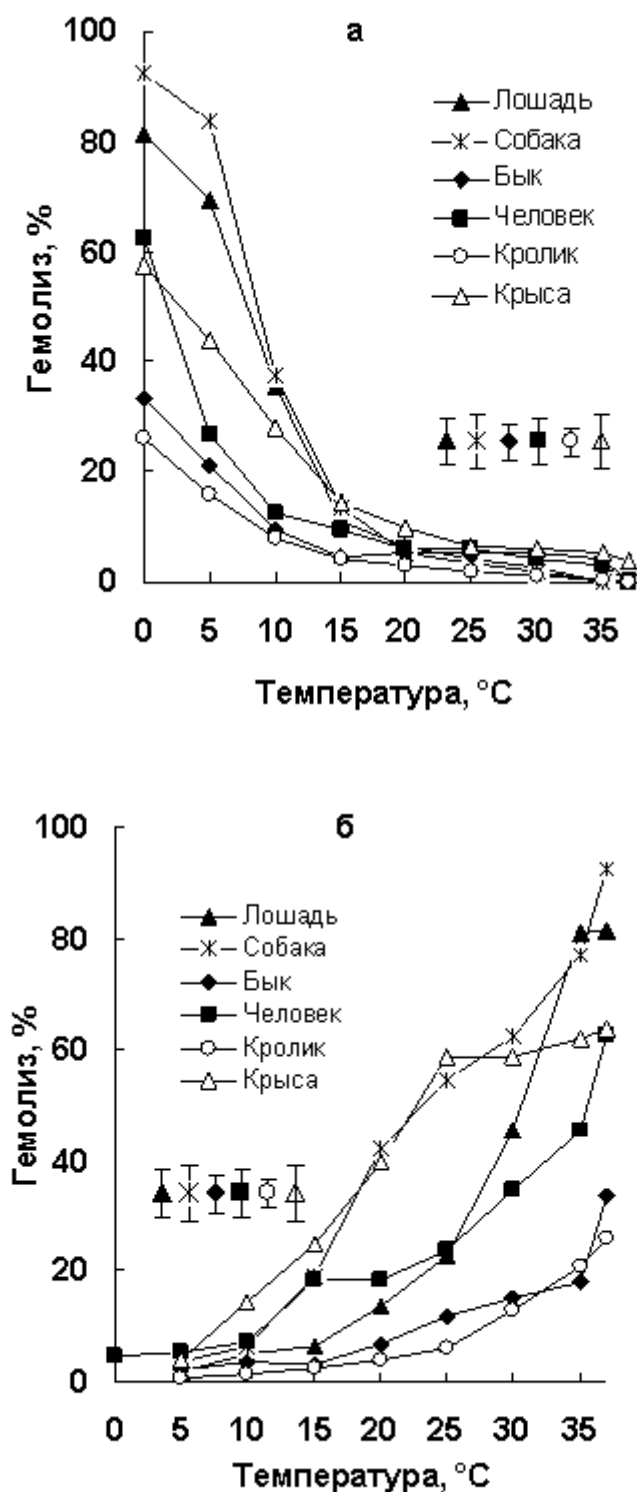


Рис. 4.7. Влияние режима охлаждения на гипертонический криогемолиза эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl: а – от 37°C до разных значений температуры, б – от разных значений температуры до 0°C.

млекопитающих наблюдается при охлаждении от 37 до 0°C. При сокращении диапазона изменения температуры за счет повышения значения температуры второго этапа ГК отмечается постепенное снижение гемолитического повреждения эритроцитов человека и животных, выраженное в разной степени. Существует критическая температура (некая температурная граница), переход через которую кардинально меняет реакцию клеток на изменение температуры гипертонической среды, что проявляется в отсутствии гемолитического повреждения эритроцитов. Во всяком случае, изменение температуры от 37 до 20 ÷ 37°C не сопровождается развитием гипертонического криогемолиза эритроцитов всех млекопитающих.

Результаты исследования развития ГК эритроцитов млекопитающих при температурном режиме, когда клетки охлаждали от разных значений температуры до 0°C, представлены на рис. 4.7 б. Повышение начальной температуры гипертонической среды выше критического значения приводит к увеличению уровня гемолиза эритроцитов при последующем их охлаждении до 0°C. Для эритроцитов человека подобный характер развития холодового повреждения был показан в работах [163, 405, 503].

Для эритроцитов человека изгиб температурной зависимости ГК наблюдается при 25°C (рис. 4.7 б). Вместе с соавторами [268] аналогичную особенность (изгиб при 25°C) выявили при изучении температурной зависимости гипотонического лизиса эритроцитов человека.

Эритроциты млекопитающих характеризуются температурными интервалами, в которых повреждение вносит значительный вклад в общее гемолитическое повреждение клеток в условиях ГК. Следует отметить, что температурные интервалы, в которых отмечаются значительные повреждения, различны для клеток млекопитающих.

Существенный вклад в суммарное повреждение эритроцитов человека при ГК вносит охлаждение клеток до 0°C от температур в диапазоне 25 ÷ 37°C. Для эритроцитов крысы определяющим является интервал охлаждения от 10 ÷ 25°C до 0°C. Для эритроцитов лошади значительный

вклад в ГК обуславливает повреждение клеток при охлаждении в температурном диапазоне от $25 \div 33^{\circ}\text{C}$ до 0°C . Это свидетельствует о том, что в эритроцитарных мембранах указанных млекопитающих происходят температурозависимые структурные изменения, которые обуславливают резкое повышение чувствительности этих клеток к ГК. Для эритроцитов крысы и лошади характерны достаточно высокие температурные интервалы, которые практически не вносят вклад в уровень гемолиза эритроцитов при ГК: для крысы – $25 \div 37^{\circ}\text{C}$, лошади – $33 \div 37^{\circ}\text{C}$. В отличие от клеток лошади, для эритроцитов быка вклад интервала $33 \div 37^{\circ}\text{C}$ в общую величину ГК составляет около 50%. Кроме того, следует отметить, что зависимость уровня ГК эритроцитов быка от температуры первого этапа характеризуется перегибом при 30°C , который характерен и для температурной зависимости осмотической хрупкости этих клеток [335].

Особенности полученных зависимостей уровня ГК эритроцитов млекопитающих от температуры первого этапа (рис. 4.7 б) позволяет отнести клетки к двум группам. Первая группа представлена эритроцитами крысы и лошади, для которых характерны резко выраженные изломы температурной зависимости ГК. Менее выраженные изломы наблюдаются для клеток собаки, человека, быка и кролика, составляющих вторую группу. Кроме того, для клеток каждой группы характерны участки температурных зависимостей ГК эритроцитов, которые практически параллельны между собой.

Анализ влияния разных температурных режимов на развитие ГК эритроцитов млекопитающих позволил в суммарном виде представить качественно-количественную картину полученных результатов. Значения критической температуры гемолитического повреждения клеток млекопитающих при различных температурных режимах ГК представлены на рис. 4.8. Началом лизиса клеток считали превышение 10%-го уровня гемолиза. В том случае, когда клетки охлаждали от 37°C до разных значений температуры, гипертонический криогемолиз эритроцитов человека, крысы, собаки и лошади наблюдается при охлаждении до температур, равных и

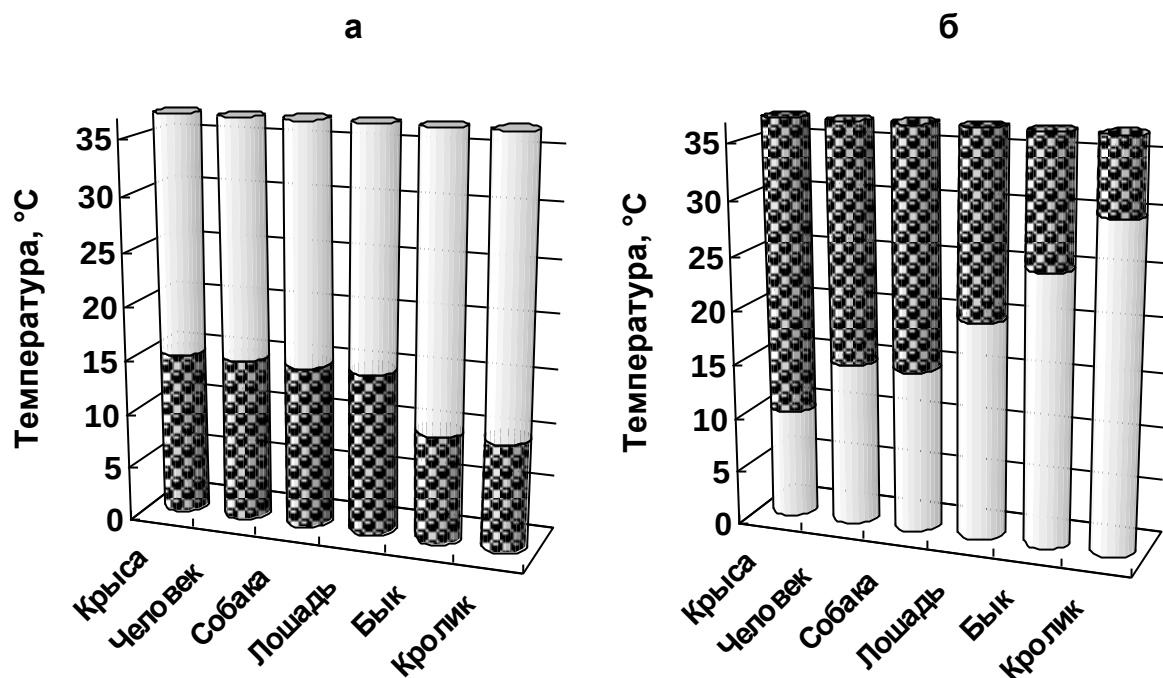


Рис. 4.8. Влияние режима охлаждения на гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl: от 37°C до разных значений температуры (а) и от разных значений температуры до 0°C (б).

- – отсутствие гемолиза
- ▣ – гемолиз эритроцитов (выше 10%)

ниже 15°C, а для клеток быка и кролика – равных и ниже 10°C. При охлаждении клеток до 0°C от разных значений температуры наблюдается следующая картина: эритроциты крысы лизируют при охлаждении от температур из диапазона 10 ÷ 37°C, человека и собаки – из диапазона 15 ÷ 37°C, клетки лошади – из диапазона 20 ÷ 37°C, а эритроциты быка – 25 ÷ 37°C, кролика – 30 ÷ 37°C. Таким образом, наиболее устойчивыми к действию вариации температуры в условиях ГК являются эритроциты быка и кролика.

Основываясь на полученных результатах (рис. 4.7, 4.8), закономерность относительно температурных режимов ГК эритроцитов человека и животных

можно сформулировать следующим образом. Эритроциты млекопитающих становятся чувствительными к ГК, если клетки охлаждают до 0°C от температуры из диапазона $10 \div 25^{\circ}\text{C}$ и выше, а при охлаждении от 37°C до температуры ниже $15 \div 20^{\circ}\text{C}$. Видно, что последний диапазон достаточно узкий, в то время как первый довольно «размыт», что свидетельствует о важности для него видовых особенностей эритроцитов.

4.4. Роль продолжительности инкубирования при 37°C в развитии гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих

Исследование явления ГК эритроцитов человека и млекопитающих позволило установить важность процессов, развивающихся в клетках на этапе инкубирования при 37°C . Тот факт, что между выходом внутриклеточных катионов K^{+} в гипертонических средах (определенной осмоляльности) при 37°C и уровнем гемолиза клеток при их последующем охлаждении до 0°C установлена значимая сильная положительная корреляция (рис. 4.6), способствовал дальнейшему исследованию этого процесса.

Эритроциты млекопитающих инкубировали в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl (продолжительность инкубирования 10 и 120 мин), а затем охлаждали до 0°C . Полученные данные представлены на рис. 4.9. Видно, что для эритроцитов человека с увеличением продолжительности инкубирования при 37°C наблюдается хорошо выраженное снижение уровня криогемолиза, что согласуется с ранее полученными результатами [503]. Для эритроцитов лошади, как и для клеток человека, выявлен такой же характер изменения уровня гемолиза клеток при охлаждении, но выраженный в несколько меньшей степени. В то же время для эритроцитов кролика и быка уровень ГК существенно выше в условиях более продолжительного инкубирования клеток на этапе, предшествующем охлаждению до 0°C .

Для хорошо изученных эритроцитов человека ранее было показано [182], что немонокотному характеру изменения уровня гипертонического криогемолиза клеток (уровня гемолиза клеток при охлаждении до 0°C) предшествует время-зависимое увеличение выхода ионов K^+ из клеток при их продолжительном инкубировании в гипертонических солевых средах при 37°C. Поэтому исходя из результатов работы [182] и различного характера развития гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих (рис. 4.9), в следующей серии экспериментов изучали выход катионов K^+ из эритроцитов разных видов млекопитающих в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl, при 37°C. Из рис. 4.10 видно, что, несмотря на изначально различный

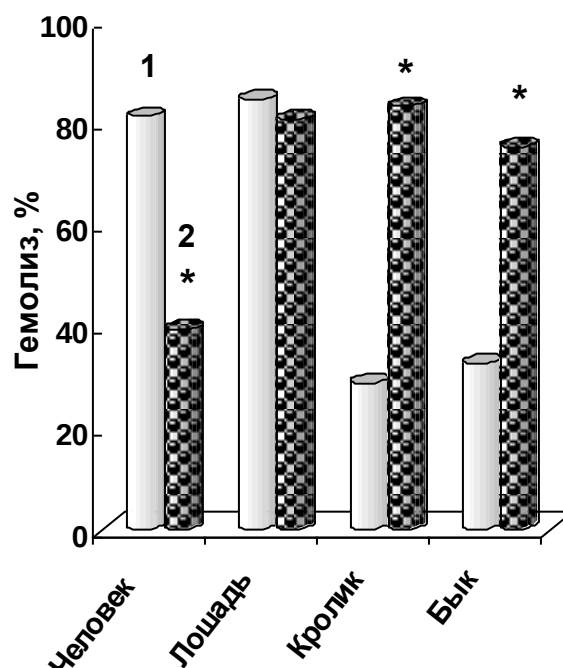


Рис. 4.9. Влияние продолжительности инкубирования эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl, при 37°C на уровень гемолиза клеток при их последующем охлаждении до 0°C: 1 – 10 мин, 2 – 120 мин.

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с результатами при 10-минутном инкубировании ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 7.

уровень выхода катионов K^+ из клеток человека, лошади, кролика и быка при 10-минутном инкубировании в гипертоническом солевом растворе, наблюдается существенное увеличение этого показателя к 120 мин для эритроцитов всех исследуемых видов млекопитающих. Следует отметить, что потеря катионов K^+ клетками человека, лошади и кролика увеличивается в 1,4–1,6 раз, а эритроцитами быка – более чем в 3 раза к 120 мин инкубирования.

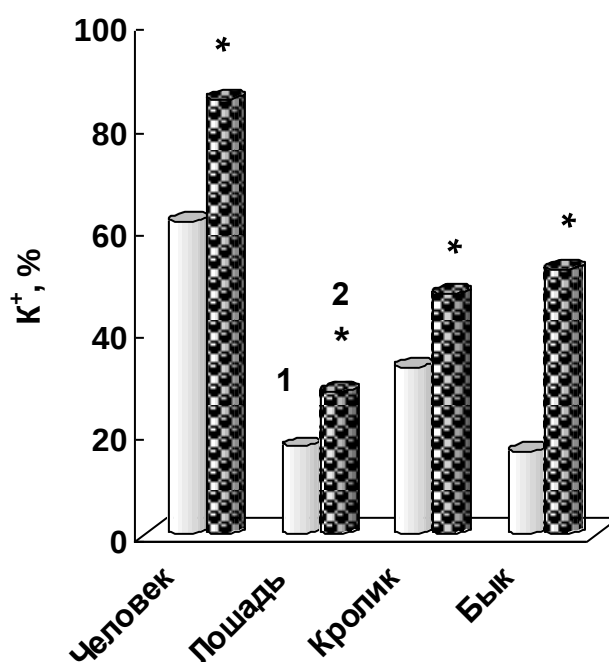


Рис. 4.10. Влияние продолжительности инкубирования эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl, при 37°C на выход катионов K^+ из клеток: 1 – 10 мин, 2 – 120 мин.

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с результатами при 10-минутном инкубировании ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 7.

Таким образом, суммируя результаты, представленные на рис. 4.9 и 4.10, характерное для человека и животных увеличение выхода катионов K^+

из клеток со временем сопровождается при их охлаждении различным характером развития гемолитического повреждения.

При непродолжительном инкубировании (5 мин) в гипертонической среде большинство эритроцитов приобретают форму уплощенного гладкого диска и именно эти клетки лизируют при охлаждении [56]. Авторы работы [69] считают, что такие эритроциты характеризуются нестабильностью, и воздействие любого характера будет приводить к развитию гемолитического повреждения эритроцитов.

Для нативных клеток характерно асимметричное распределение ионов натрия и калия по обе стороны плазматической мембраны. Стабильное поддержание ионного неравновесия важно и для транспорта метаболитов через клеточную мембрану и для регуляции внутриклеточных реакций обмена веществ. Процессы первично-активного транспорта в регуляции клеточных функций занимает ведущее место. В результате работы систем первично-активного транспорта в клетке создается ионный состав, резко отличающий ее от окружающей среды. Асимметричное распределения ионов натрия и калия по обе стороны клеточной мембраны (внутри клеток высокая концентрация K^+ и вне клеток высокая концентрация Na^+) в значительной степени обеспечивает Na/K-АТФаза. [23]. Некоторые сердечные гликозиды, в частности убаин (строфантин G), ингибируют Na/K-АТФазу, присоединяясь к ней с наружной стороны плазматической мембраны. Фуросемид является ингибитором Na / K котранспорта [420].

Эритроциты после инкубирования с убаином (0,1 моль/л) и фуросемидом (1 ммоль/л) в физиологическом растворе при 37°C в течение 20 мин [420] подвергали действию ГК. Клетки переносили в 1,2 моль/л NaCl на 10 или 120 мин (37°C) и охлаждали до 0°C. Ингибиторы присутствовали на первой стадии ГК. Полученные данные представлены в табл. 4.3.

Проведенный статистический анализ полученных данных (табл. 4.3) с использованием критерия Манна-Уитни показал отсутствие статистически значимых различий между контролем и опытом (при использовании

ингибиторов) на уровне значимости 0,05. Причем принимается нулевая гипотеза, согласно которой отсутствуют различия между контролем и опытом (при применении ингибиторов) как при кратковременном, так и продолжительном инкубировании эритроцитов в гипертонической среде (табл. 4.3).

Таблица 4.3.

Влияние убаина (0,1 ммоль/л) и фуросемида (1 ммоль/л) на уровень гипертонического криогемолиза эритроцитов человека в зависимости от продолжительности инкубирования клеток в 1,2 моль/л NaCl при 37°C (Me, Q1–Q3, n = 9).

Продолжительность инкубирования	Контроль	Опыт (убаин, фуросемид)
10 мин	83,5 [69,5–87,9]	82,3* [73,2–83,9]
120 мин	41,3 [24,8–41,9]	37,8** [25,7–40,6]

Примечание. *, ** – статистически значимо не различаются по сравнению с соответствующим контролем ($p > 0,05$).

Таким образом, в представленных экспериментальных условиях, т.е. в присутствии убаина и фуросемида (для ингибирования Na-K-АТФазы и Na / K котранспорта соответственно), потеря клетками катионов калия обусловлена исключительно пассивным транспортом калия, движущей силой которого является электрохимический градиент на клеточной мембране. Активный транспорт не вносит вклад в наблюдаемые события.

В клеточной системе, находящейся в условиях высокой осмоляльности внешней среды по катионам Na^+ , градиент по K^+ направлен в противоположную сторону. Катионы калия покидают клетку по градиенту через микродефекты, которые образуются и/или активируются под

действием высококонцентрированных растворов хлорида натрия, что подтверждается результатами рис. 4.6.

Наблюдаемые особенности развития гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих (рис. 4.9) могут быть связаны с характеристикой их плазматической мембраны как барьера. В частности, если катионы Na^+ могут пересекать эритроцитарную мембрану по концентрационному градиенту, то это приведет к его снижению на мембране и, как следствие, к уменьшению гемолитического повреждения клеток при охлаждении.

Для проверки этого предположения были выбраны эритроциты человека и быка, которые имеют различный характер развития ГК (рис. 4.1) Методом капиллярного электрофореза определяли внутриклеточное содержание ионов Na^+ в эритроцитах, которые инкубировались в 1,2 моль/л растворе NaCl при 37°C в течение 10 и 120 мин. Данные представлены на рис. 4.11. Видно, что для клеток человека наблюдается повышение

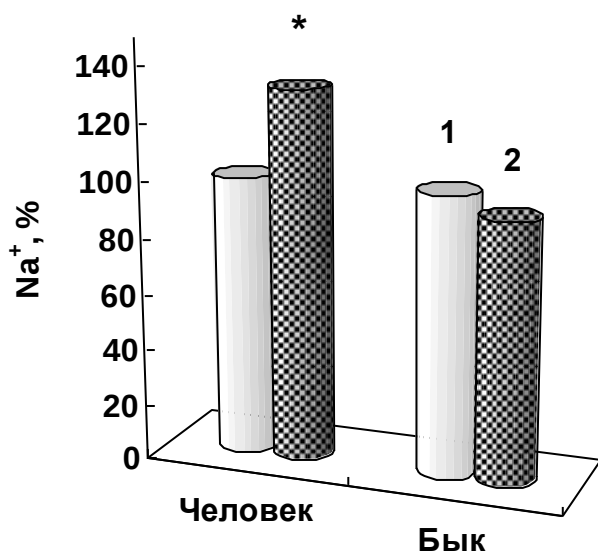


Рис. 4.11. Внутриклеточное содержание катионов Na^+ в эритроцитах человека (1) и быка (2) при инкубировании в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl , при 37°C в течение 10 и 120 мин. За 100% принято внутриклеточное содержание ионов натрия в эритроцитах человека и быка при 10-минутном инкубировании.

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с результатами при инкубировании в течение 10 мин ($p < 0,05$); количество наблюдений в каждой группе – 7.

внутриклеточного содержания Na^+ со временем в отличие от эритроцитов быка, для которых статистически значимых различий выявить не удалось. Кроме того, при исследовании эритроцитов быка в выше указанных условиях (1,2 моль/л NaCl , 10 и 120 мин) методом ЭПР спектроскопии с использованием гидрофильного зонда ТЕМПОН показано отсутствие статистически значимого различия параметра вращательной подвижности зонда (h_0/h_{-}) при продолжительном инкубировании клеток [174], что свидетельствует об отсутствии значительной модификации водно-белковых взаимодействий в цитоплазме эритроцитов быка.

Таким образом, наблюдаемое угнетение ГК эритроцитов человека при продолжительном инкубировании в гипертонических условиях при 37°C (на первом этапе) (рис. 4.9) может быть обусловлено снижением концентрационного градиента катионов Na^+ через эритроцитарную мембрану в результате входа катионов натрия в клетку на этапе, предшествующем охлаждению. В пользу этого свидетельствуют и результаты работы [301, 302].

4.5. Закономерности гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих

Эритроциты разных видов животных, находящиеся в физиологических условиях, как и клетки человека, не повреждаются при охлаждении от 37 до 0°C (см рис. 4.1). Для проявления чувствительности эритроцитов млекопитающих к охлаждению в области положительных температур необходима сенсibilизация клеток. Фактором, сенсibilизирующим эритроциты млекопитающих к охлаждению, является гипертоническая среда определенной осмоляльности. Эритроциты млекопитающих, находящиеся в гипертонических растворах NaCl определенной осмоляльности, лизируют при охлаждении в области положительных температур ($37 \rightarrow 0^\circ\text{C}$) (рис. 4.1), хотя в изотермических условиях лизис клеток не наблюдается (см рис. 3.1).

Граничная осмоляльность среды, при превышении которой развивается ГК эритроцитов разных видов животных, составляет 800–1170 мосмоль/кг (см рис. 4.1). Следует отметить, что граничная осмоляльность среды, при превышении которой развивается ГК эритроцитов человека находится в пределах указанного диапазона.

Значения осмоляльности, при которых наблюдается выход катионов калия из клеток млекопитающих на этапе гипертонического инкубирования при 37°C, являются пороговыми для развития гемолитического повреждения эритроцитов при последующем охлаждении до 0 С (рис. 4.6). Между уровнем выхода ионов K^+ из эритроцитов млекопитающих в гипертонической среде при 37°C и значением гемолитического повреждения клеток при их дальнейшем охлаждении до 0°C существует значимая корреляционная связь. Если для эритроцитов кролика значимая корреляция наблюдается во всем используемом концентрационном диапазоне NaCl (0,15–2,0 моль/л), то для эритроцитов человека и лошади – в средах, содержащих 0,15–1,2 и 0,15–1,6 моль/л NaCl соответственно (рис. 4.6).

Уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих в условиях ГК увеличивается с ростом осмоляльности внеклеточной среды (см рис. 4.1). По характеру зависимостей криогемолиза эритроцитов млекопитающих от концентрации хлорида натрия в среде клетки можно отнести к двум группам. Первая группа представлена эритроцитами человека, коня, собаки и крысы, зависимости гемолиза которых от концентрации соли характеризуются определенным максимумом с последующим снижением этого показателя. Ко второй группе относятся клетки быка и кролика, аналогичные зависимости которых имеют практически монотонный характер.

В условиях продолжительного инкубирования эритроцитов человека, быка, кролика и лошади в гипертонической среде (1,2 моль/л NaCl) при 37°C наблюдается увеличение выхода K^+ из клеток всех исследуемых млекопитающих (рис. 4.10), в то время как характер развития гемолитического повреждения на этапе последующего охлаждения этих

клеток до 0°C зависит от вида млекопитающего (рис. 4.9). Уровень ГК снижается для эритроцитов человека, не изменяется для клеток лошади и повышается для эритроцитов быка и кролика.

Криогемолиз эритроцитов млекопитающих в 1,2 моль/л NaCl развивается при охлаждении от 37 до 0°C. Варьирование температуры каждого из этапов ГК позволило установить граничную температуру первого и второго этапа, выше и ниже которой наблюдается ГК эритроцитов млекопитающих соответственно, и выявить различную устойчивость эритроцитов млекопитающих к охлаждению (рис. 4.7, 4.8). Экспериментальные результаты показали, что при охлаждении от 37°C гемолитическое повреждение эритроцитов быка и кролика начинается при достижении более низкой температуры (10°C), чем для эритроцитов человека, крысы, собаки и лошади (15°C). Для проявления гемолитического повреждения эритроцитов при охлаждении до 0°C температура, от которой должно начинаться охлаждения, снижается в ряду: кролик (30°C) > бык (25°C) > конь (20°C) > человек, собака (15°C) > крыса (10°C). Таким образом, наиболее устойчивыми к изменению температур в условиях ГК являются эритроциты кролика и быка.

Анализ представленных результатов по исследованию чувствительности эритроцитов разных видов млекопитающих к охлаждению от 37 до 0°C в гипертонических средах при варьировании осмоляльности и температуры инкубационной среды, а также продолжительности инкубирования клеток в условиях ГК свидетельствует о высокой устойчивости клеток кролика и быка. Эритроциты крысы, лошади и собаки, как и клетки человека, более чувствительны к действию ГК.

Обобщение полученных результатов, представленных в подглавах 4.1–4.4, позволили сформулировать закономерности ГК эритроцитов млекопитающих. Закономерности, установленные на основании результатов, полученных для эритроцитов человека, в целом согласуются с закономерностями, представленными в работах [52, 53, 503].

Закономерности ГК эритроцитов млекопитающих можно представить в следующем виде.

1. Эритроциты млекопитающих, находящиеся в изотонической среде, не повреждаются при охлаждении в области положительных температур ($37 \rightarrow 0^\circ\text{C}$).

2. Эритроциты млекопитающих становятся чувствительными к ГК (к охлаждению от 37 до 0°C) при инкубировании в растворах хлорида натрия, осмоляльность которых превышает $800\text{--}1170$ мосмоль/кг.

3. Эритроциты млекопитающих, находящиеся в гипертонических растворах NaCl определенной осмоляльности, лизируют при охлаждении в области положительных температур ($37 \rightarrow 0^\circ\text{C}$), хотя в изотермических условиях лизис клеток не наблюдается.

4. Значения осмоляльности, при которых наблюдается выход катионов калия из клеток млекопитающих при 37°C , является пороговыми для развития гемолитического повреждения эритроцитов при последующем охлаждении до 0°C .

5. Уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих в условиях ГК увеличивается с ростом осмоляльности внеклеточной среды, причем может наблюдаться снижение уровня гемолиза эритроцитов некоторых млекопитающих при превышении определенной концентрации NaCl в среде (конкретная концентрационная граница зависит от вида млекопитающего).

6. Выход ионов калия из эритроцитов млекопитающих на этапе гипертонического инкубирования при 37°C является необходимым условием для развития гемолитического повреждения клеток при их последующем охлаждении до 0°C . Между уровнем выхода ионов K^+ из эритроцитов млекопитающих в гипертонической среде при 37°C и значением гемолитического повреждения клеток при их дальнейшем охлаждении до 0°C существует значимая корреляционная связь.

7. Эритроциты млекопитающих проявляют чувствительность к ГК, если температура инкубирования клеток на первом этапе равна 37°C , а

значение температуры на втором этапе, до которой происходит охлаждение клеток, ниже граничной величины, которая для эритроцитов человека, собаки, лошади, крысы составляет 20°C и для клеток кролика, быка – 15°C. Эритроциты млекопитающих проявляют чувствительность к гипертоническому криогемолизу, если температура первого этапа выше граничной величины, которая для клеток крысы составляет 5°C, собаки и человека – 10°C, лошади – 15°C, быка – 20°C, кролика – 25°C, а температура второго этапа равна 0°C.

8. В условиях продолжительного инкубирования эритроцитов (120 мин) в гипертонической среде (1,2 моль/л NaCl) при 37°C наблюдается увеличение выхода K^+ из клеток всех исследуемых млекопитающих, в то время как характер развития гемолитического повреждения на этапе охлаждения клеток до 0°C зависит от вида млекопитающего.

Выводы

- По характеру зависимостей криогемолиза эритроцитов млекопитающих от концентрации хлорида натрия в среде клетки можно отнести к двум группам. Первая группа представлена эритроцитами человека, коня, собаки и крысы, зависимости гемолиза которых от концентрации соли характеризуются определенным максимумом с последующим снижением этого показателя. Ко второй группе относятся клетки быка и кролика, аналогичные зависимости которых имеют практически монотонный характер.
- Корреляционный анализ выявил статистически значимые связи между показателями гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих и липидным составом мембран эритроцитов.

Пороговые концентрации NaCl при ГК эритроцитов млекопитающих положительно коррелируют с мембранным содержанием СМ, ФЭА, сфингозина и отрицательно с содержанием фосфатидилхолина в различных комбинациях (ФХ, СМ + ФХ, ЛФХ + СМ + ФХ).

Уровень гемолиза в 0.8 моль/л NaCl при охлаждении эритроцитов млекопитающих от 37 до 0°C положительно коррелирует с содержанием холин-содержащих фосфолипидов и отрицательно с содержанием холестерина и ФЭА.

- Выход ионов калия из эритроцитов млекопитающих на этапе гипертонического инкубирования при 37°C сопровождается развитием гемолитического повреждения клеток при их последующем охлаждении до 0°C. Между уровнем выхода ионов K^+ из эритроцитов млекопитающих в гипертонической среде при 37°C и значением гемолитического повреждения клеток при их дальнейшем охлаждении до 0°C существует значимая корреляционная связь.

- В условиях продолжительного инкубирования эритроцитов в гипертонической среде при 37°C наблюдается увеличение выхода K^+ из клеток всех исследуемых млекопитающих, в то время как характер развития гемолитического повреждения на этапе последующего охлаждения клеток до 0°C зависит от вида млекопитающего. Уровень ГК снижается для эритроцитов человека, не изменяется для клеток лошади и повышается для эритроцитов быка и кролика. Угнетение ГК эритроцитов человека может быть обусловлено снижением концентрационного градиента катионов Na^+ через эритроцитарную мембрану в результате входа катионов натрия в клетку на этапе, предшествующем охлаждению.

- Варьирование температуры каждого из этапов ГК позволило выявить различную устойчивость эритроцитов млекопитающих к охлаждению в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl. Показано, что при охлаждении от 37° С гемолитическое повреждение эритроцитов быка и кролика начинается при достижении более низкой температуры (10°C), чем для эритроцитов человека, крысы, собаки и лошади (15°C).

Для проявления гемолитического повреждения эритроцитов при охлаждении до 0°C температура, от которой должно начинаться охлаждения, снижается в ряду: кролик (30°C) > бык (25°C) > конь (20°C) > человек, собака

(15°C) > крыса (10°C). Таким образом, наиболее устойчивыми к изменению температур в условиях ГК являются эритроциты кролика и быка.

- На основании полученных экспериментальных результатов сформулированы основные закономерности гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих.

По материалам главы 4 опубликованы работы [38, 71, 72, 76, 78, 157, 158, 161, 178, 180, 181, 182, 187, 189, 195, 196, 209, 481, 503, 508].

ГЛАВА 5

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ГИПЕРТОНИЧЕСКОМ ШОКЕ И ГИПЕРТОНИЧЕСКОМ КРИОГЕМОЛИЗЕ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

На изменение условий внешней среды клетки реагируют комплексом изменений, которые могут выходить за рамки приспособительных реакций и приводить к гибели клетки. В модельных экспериментах было установлено, что использование амфифильных соединений позволяет защитить клетки от повреждения. Так, алкилглюкопиранозиды с длиной алкильной цепи от 5 до 8 углеродных атомов полностью ингибируют цитолиз HL-60 клеток *in vitro*, вызванный действием ультразвука (1,057 MHz) [417]. Кроме того, амфифильные соединения снижают повреждение эритроцитов, вызванное действием повышенного давления 2,0 кбар [290] и холодового шока [177]. Гемолиз эритроцитов, вызванный Sendai вирусом, также модулируется амфифильными веществами, в частности хлорпромазин ингибирует его развитие [372].

Группой финских исследователей была изучена большая группа амфифильных соединений, которые, несмотря на различия их физико-химических свойств, способны снижать гипотонический гемолиз эритроцитов человека [316]. Указанный защитный эффект амфифильных соединений связывают со способностью амфифилов влиять на состояние плазматической мембраны, при этом авторы [316] предполагают, что встраивание амфифильных молекул сопряжено с быстрой реорганизацией эритроцитарной мембраны.

Действие амфифильных веществ на клетки характеризуется бимодальностью. При использовании в невысоких концентрациях эти соединения проявляют защитный эффект [316], в то время как в высоких — приводят к повреждению биологических объектов [143]. Полагают [143], что

повреждающее действие связано с локальным концентрированием амфифильных молекул в мембране до уровня детергентных концентраций.

При низкотемпературном консервировании эритроцитов в плазматической мембране происходят структурные изменения, приводящие к формированию макроскопических пор и лизису клеток. Амфифильные соединения, которые способны модифицировать структуру мембраны [357, 489], могут повышать ее адаптивные возможности в различных стрессовых условиях [177, 290, 372, 417]. Поэтому использование различных амфифильных веществ в условиях резкого изменения осмотических и температурных параметров среды (гипертонический шок и гипертонический криогемолиз) могло бы повысить устойчивость клеток к действию повреждающих факторов, а также приблизить к пониманию процессов, ответственных за криоповреждение и криозащиту биологических объектов.

5.1. Эффективность действия хлорпромазина на разных этапах гипертонического шока и гипертонического криогемолиза эритроцитов человека

Хлорпромазин (ХПР) является первым синтезированным антипсихотиком (устар. нейролептиком), который послужил основой для синтеза других фенотиазиновых и нефенотиазиновых препаратов, а также и антидепрессантов. Будучи производным фенотиазина с химической формулой 2-хлор-10-[3-(диметиламинопропил)]фенотиазина гидрохлорид ($C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$), хлорпромазин является амфифильным соединением. Амфифильность или дифильность молекул ХПР, которую удачно охарактеризована Гартли, как «раздвоение личности», обусловлена наличием у них полярной (гидрофильной) и неполярной (гидрофобной) частей [168]. Гидрофобная часть молекулы ХПР представлена структурой фенотиазина, в

то время как гидрофильная – четвертичным пропиламином. При физиологических значениях pH пропиламинная цепь является катионной.

Ранее было показано, что ХПР оказывает защитное действие при различных видах стрессового воздействия на эритроциты [290, 316, 467]. В частности, ХПР способен протектировать клетки в условиях мелитин-индуцированного гемолиза [467], повреждения, вызванного давлением [290], а также гипотонического лизиса клеток [316]. Вышеизложенное позволяет предположить, что положительно заряженное амфифильное соединение ХПР может снижать уровень гемолиза эритроцитов человека в условиях гипертонического стресса и гипертонического криогемолиза.

Результаты влияния ХПР в концентрации $6,6 \times 10^{-5}$ моль/л на ГШ и ГК эритроцитов человека представлены на рис. 5.1. В том случае, когда клетки находятся в 4,0 моль/л NaCl, эффект ХПР зависит от температуры инкубационной среды. Если при 37°C ХПР способен снижать гипертонический лизис эритроцитов в 7 раз, в то при 0°C защитное действие этого соединения при использовании в выше указанной концентрации не проявляется. В условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов ХПР снижает уровень повреждения клеток, находящихся в 1,2 моль/л NaCl, в 3 раза. Отмеченный эффект в общем согласуется с ранее полученными результатами [333, 405]. Таким образом, ХПР снижает чувствительность клеток к указанным видам стресса (ГШ и ГК).

Результаты, представленные на рис. 5.1, были получены в следующих экспериментальных условиях. Сначала эритроциты, находящиеся в физиологическом растворе, инкубировали с ХПР ($6,6 \times 10^{-5}$ моль/л) в течение 30 мин, а затем подвергали действию стресса. В случае гипертонического шока клетки перенесения в раствор 4,0 моль/л NaCl, который содержал ХПР в такой же концентрации.

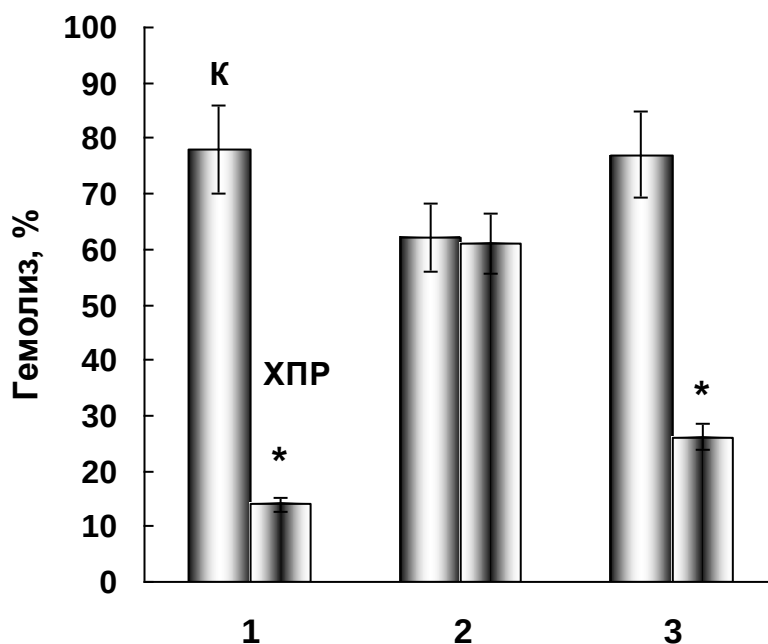


Рис. 5.1. Влияние хлорпромазина ($6,6 \times 10^{-5}$ моль/л) на гемолиз эритроцитов человека в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, при 37 (1), 0°C (2) и при охлаждении от 37 до 0°C в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl (3): К – контроль, ХПР – присутствие хлорпромазина в среде.

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с показателями гемолиза контрольных клеток ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 21.

Собственно гипертонический криогемолиз эритроцитов состоит из двух этапов, главным различием которых является температура. Первый этап заключается в инкубировании эритроцитов в гипертонической среде определенной осмоляльности при 37°C, второй – при 0°C (без изменения осмоляльности). При изучении влияния ХПР на ГК эритроциты после 30-минутного инкубирования в физиологическом растворе подвергали действию собственно гипертонического криогемолиза, причем ХПР присутствовал в среде в одной и той же концентрации на каждом из выше указанных этапов.

Перенесение эритроцитов в каждую следующую среду, содержащую ХПР в одной и той же концентрации, сопровождается разведением клеток, в результате чего увеличивается количество амфифильных молекул, приходящееся на одну клетку. Таким образом, на границе «среда – клетка» появляется концентрационный градиент ХПР, который является движущей силой для дополнительного включения амфифильных молекул в мембрану в момент каждого последующего перенесения клеток. Можно полагать, что в таком случае протектирующий эффект ХПР обусловлен наличием «свободного» пула ХПР.

С другой стороны, достаточно продолжительное предварительное инкубирование эритроцитов в физиологической среде с ХПР делает достаточно вероятным реализацию защитного механизма ХПР через ингибирование кальмодулина [29]. Этот белок, посредством связывания со спектринном, способен оказывать влияние на состояние эритроцитарного цитоскелета. [29]. Кальмодулиновая сигнальная система, взаимодействуя с другими сигнальными системами клетки, участвует в формировании клеточного ответа на внешние воздействия [97]. ХПР как ингибитор кальмодулина может модифицировать кальмодулин-зависимые системы клетки, изменяя либо взаимодействие кальмодулина с компонентами цитоскелета, либо активность кальмодулин-зависимых киназ, в частности, спектринкиназы. Блокирование кальмодулина приводит к изменению уровня фосфорилирования белков цитоскелета, их ионного окружения и уровня АТФ в клетке [29].

Для того, чтобы приблизиться к пониманию механизма защитного действия ХПР, был проведен эксперимент, целью которого было выяснение значения присутствия вещества на каждом из этапов (этап предобработки и собственно стресс) в реализации защитного действия ХПР. Для этого ХПР присутствовал в составе инкубационных сред на разных этапах стрессового воздействия в различных комбинациях.

Результаты экспериментов по гипертоническому шоку эритроцитов представлены на рис. 5.2. Присутствие ХПР только на предварительном этапе (0,15 моль/л NaCl) не оказывает защитного эффекта, поскольку статистически значимого различия между значениями гипертонического гемолиза эритроцитов, которые предварительно обрабатывали и не обрабатывали ХПР, не выявлено. Введение амфифильного вещества в 4,0 моль/л NaCl приводит к резкому снижению уровня гемолитического повреждения клеток, при этом статистически значимого различия между уровнем гипертонического гемолиза клеток, которые инкубировали на

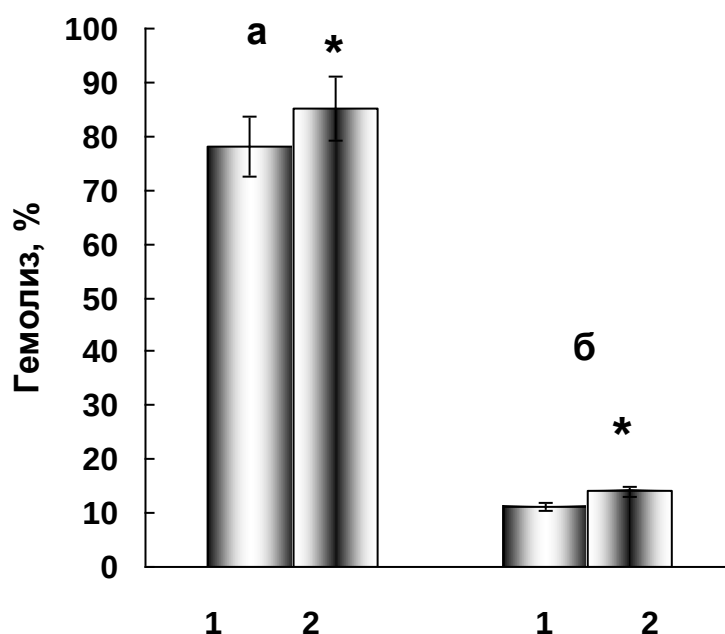


Рис. 5.2. Влияние ХПР ($6,6 \times 10^{-5}$ моль/л), добавленного на этапе предварительного инкубирования в 0,15 моль/л NaCl, на уровень гемолиза эритроцитов человека в 4,0 моль/л NaCl при 37°C:

1 – отсутствие ХПР в 0,15 моль/л NaCl, 2 – наличие ХПР в 0,15 моль/л NaCl;

а – отсутствие ХПР в 4,0 моль/л NaCl, б – наличие ХПР в 4,0 моль/л NaCl.

Примечание. * – статистически значимо не различаются значения гемолиза эритроцитов, проинкубированных в 0,15 моль/л NaCl с ХПР и без него ($p > 0,05$).

предварительном этапе с ХПР и без него, не выявлено. Поскольку защитное действие ХПР наблюдается и без предварительной обработки клеток ХПР в физиологической среде, поэтому можно полагать, что защитный эффект ХПР реализуется непосредственно в момент действия гипертонического стресса при перенесении клеток в 4,0 моль/л NaCl.

Гипертоническому криогемолизу подвергали клетки, которые предварительно инкубировали с ХПР в физиологической среде (рис. 5.3 а). Видно, что присутствие ХПР исключительно на первом этапе ГК (при 37°) не оказывает влияния на концентрационную зависимость гемолиза эритроцитов при охлаждении. В том случае, когда вещество присутствует в гипертонической среде на втором этапе (при 0°С), наблюдается выраженное снижение уровня гипертонического криогемолиза, независимо от того, содержала ли гипертоническая среда на первом этапе (37°С) ХПР.

Результаты присутствия ХПР на этапах собственно ГК (без предварительного инкубирования клеток с ХПР в физиологической среде) представлены на рис. 5.3 б. Защитный эффект ХПР выражен в том случае, когда амфифильное вещество находится в гипертонической среде при 0°С (второй этап ГК). Присутствие вещества только в гипертонической среде при 37°С (первый этап ГК) не способно изменить характер гемолитической зависимости контрольных клеток. Таким образом, определяющим в реализации защитных свойств ХПР является второй этап ГК (гипертоническая среда, 0°С).

Сравнительный анализ результатов рис. 5.3 а и 5.3 б показывает, что характер концентрационных зависимостей гемолитического повреждения эритроцитов человека в любом случае не зависит от присутствия ХПР на этапе предварительной обработки клеток.

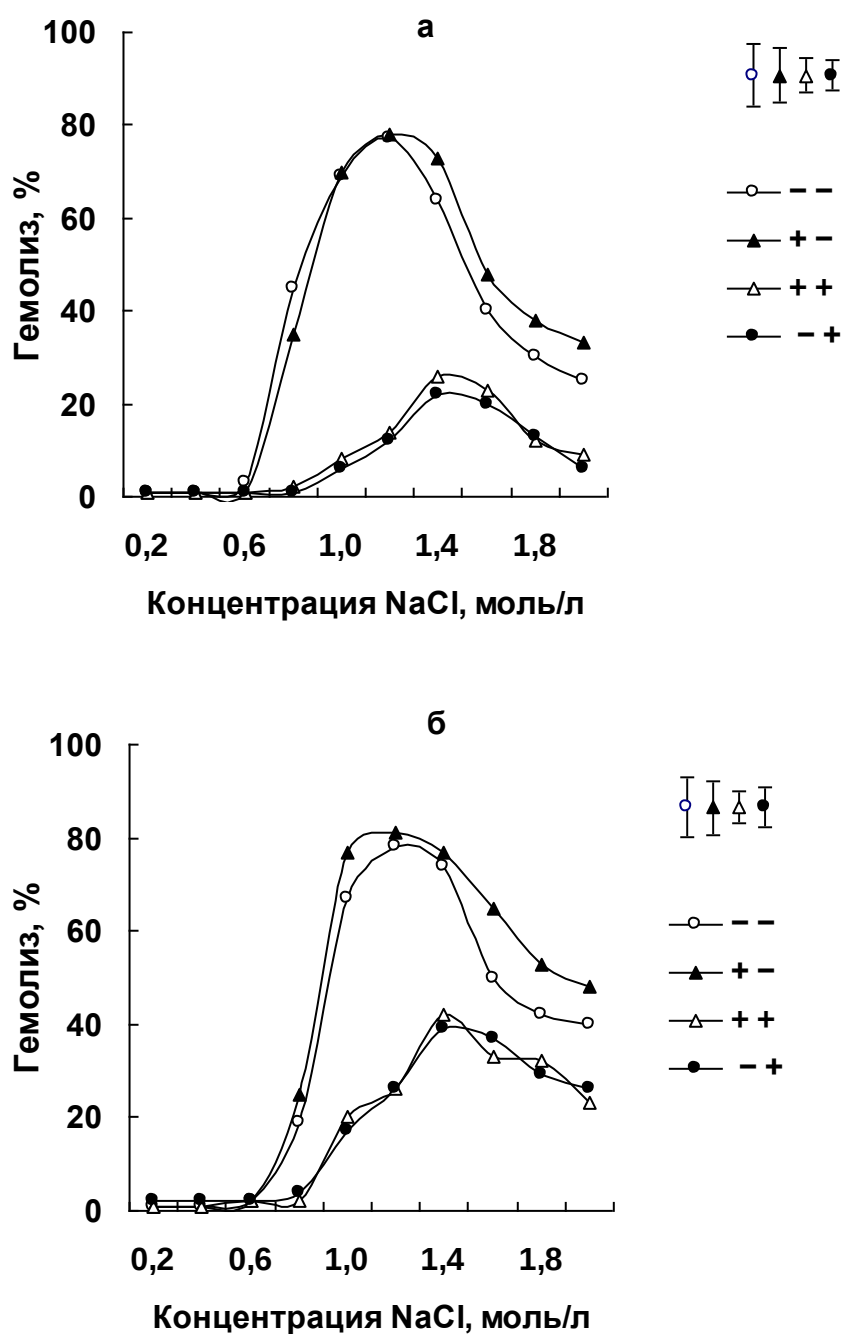


Рис. 5.3. Влияние ХПР ($6,6 \times 10^{-5}$ моль/л), добавленного на разных этапах эксперимента, на уровень гемолиза эритроцитов человека при охлаждении от 37 до 0°C. Легенда отражает присутствие (+) или отсутствие (–) ХПР на этапах ГК; а - предобработка клеток ХПР, б – без предобработки клеток ХПР.

В условиях ГШ и ГК эритроцитов для реализации механизма протекции ХПР через ингибирование кальмодулина необходимо относительно продолжительное инкубирование клеток с ХПР, предшествующее действию стресса. Тот факт, что этап предварительной обработки клеток ХПР не является необходимым (рис. 5.2 и 5.3), свидетельствует в пользу того, что механизм протекции ХПР, связанный со способностью последнего ингибировать кальмодулин, не играет ведущей роли при гипертоническом шоке и гипертоническом криогемоллизе эритроцитов.

Степень защиты клеток ХПР не зависит от предобработки клеток этим соединением, что было показано и для другого производного фенотиазина – трифторперазина [67]. Наибольшая эффективность достигается при одновременном действии на клетки стрессового фактора и молекул амфифильных соединений, в частности ХПР (рис. 5.2. и 5.3) или ТФП [67]. Поскольку отмеченный феномен наблюдался и в случае гипотонического гемолiza эритроцитов [316], есть основания предполагать, что механизм защиты амфифильными соединениями при осмотических воздействиях на клетки имеет универсальный характер.

Таким образом, стадией, определяющей уровень гемолiza эритроцитов в условиях ГШ в присутствии амфифильного соединения, является собственно перенесение клеток в гипертонический раствор, а не предшествующие ему этапы. Представляло интерес изучить возможность амфифильного вещества защищать эритроциты от повреждения после начала литического процесса.

Эритроциты переносили в 4,0 моль/л раствор NaCl, а затем через определенные временные промежутки добавляли в среду аликвоты ХПР. Величины антигемолитической активности ХПР в зависимости от времени внесения их в лизирующую среду представлены на рис. 5.4.

Максимальный защитный эффект ХПР наблюдается в том случае, когда амфифильное соединение присутствует в гипертонической среде в

момент внесения в нее эритроцитов. Этот факт согласуется с полученным ранее эффектом снижения повреждения эритроцитов в присутствии алкил- β ,D-глюкопиранозидов [162]. В случае, когда добавление вещества в гипертоническую среду производится после начала лизиса эритроцитов, защитный эффект амфифила постепенно снижается. В виду гетерогенности популяции эритроцитов, а также из-за вероятностного характера зарождения мембранных дефектов, клетки лизируют неодновременно.

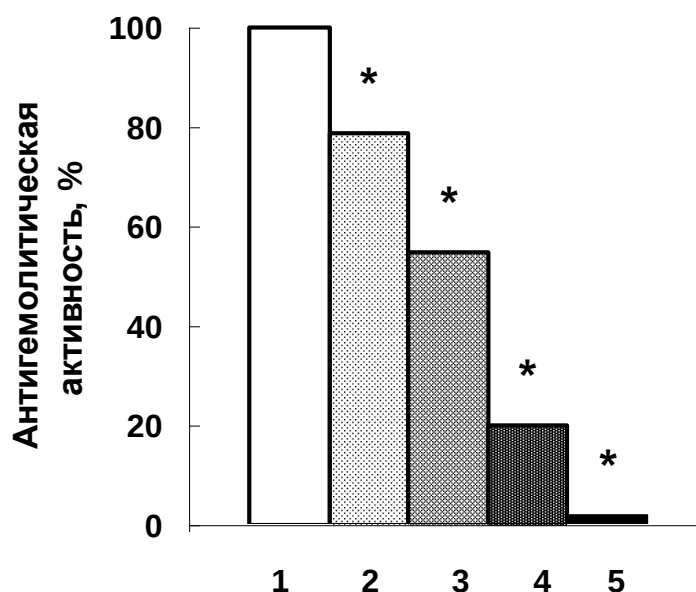


Рис. 5.4. Динамика уровня антигемолитической активности ХПР при гипертоническом шоке эритроцитов в 4,0 моль/л NaCl (22°C), в зависимости от времени добавления ХПР. За 100% принята антигемолитическая активность ХПР, регистрируемая при внесении клеток в гипертонический раствор, содержащий ХПР (1); 2–5 – время добавления ХПР после внесения клеток в 4,0 моль/л NaCl через 5, 10, 25, 50 с соответственно.

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с предыдущим результатом ($p < 0,05$).

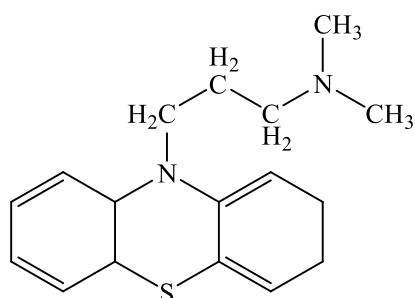
В основе гипертонического лизиса и гипертонического криогемолиза эритроцитов лежат процессы, связанные с формированием трансмембранных дефектов, которые развиваются до размера гемолитических пор [69, 508]. ХПР может изменять структурное состояние как липидных, так и белковых компонентов мембраны и модифицировать белок-липидные взаимодействия [204, 252, 352, 406]. Протектирующее действие ХПР, по-видимому, имеет комплексный характер и осуществляется через влияние на ассоциацию белков цитоскелета с мембраной и через действие молекул ХПР на процессы, сопровождающие увеличение дефектов бислоя.

Встраивание амфифильных молекул в мембраны эритроцитов, доля которых сокращается по мере увеличения временного интервала с момента внесения клеток в гипертонический раствор, по всей вероятности, приводит к прекращению роста дефекта до размеров, соизмеримых с величиной молекулы гемоглобина.

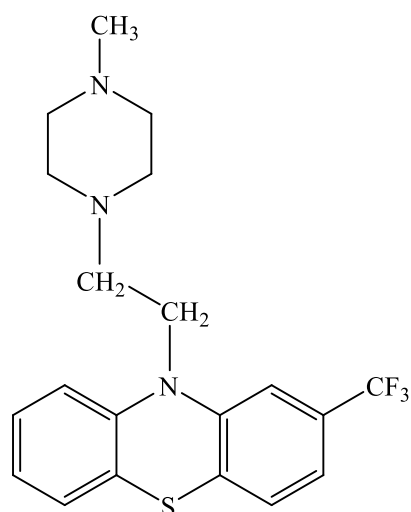
5.2. Амфифилы и эритроциты млекопитающих в условиях гипертонического шока и гипертонического криогемолиза

Амфифильные соединения, согласно общепринятой классификации, делятся на классы в соответствии с их физико-химическими свойствами: катионные, анионные, неионные, цвиттерионные [2]. При изучении ГШ и ГК эритроцитов млекопитающих с целью коррекции чувствительности клеток к действию выше указанных видов стресса использовали следующие амфифильные вещества, структурные формулы которых представлены на рис. 5.5. Хлорпромазин (ХПР) и трифторперазин (ТФП) являются производными фенотиазана и относятся к катионным амфифильным веществам, децил- и додецилсульфат натрия (C10 и C12) представляют класс анионных амфифилов, Из неионных амфифилов в

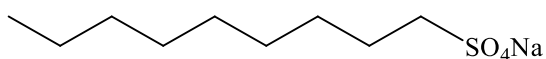
работе использовали додецил- β ,D-мальтозид (ДМ).



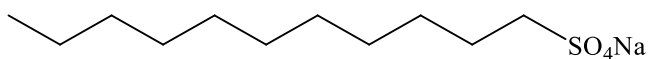
Хлорпромазин (ХПР)



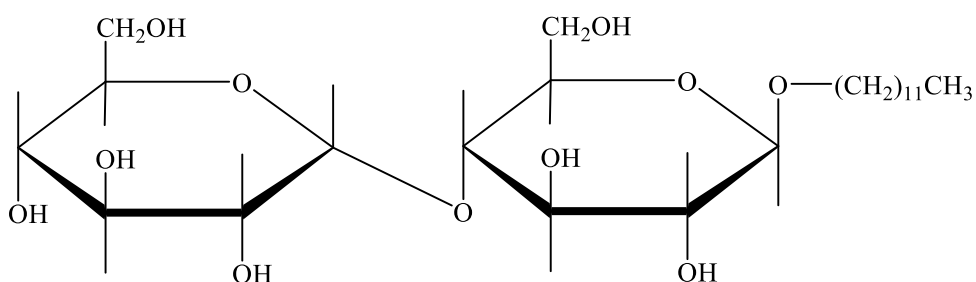
Трифторперазин (ТФП)



Децилсульфат натрия (C10)



Додецилсульфат натрия (C12)



Додецил- β ,D- мальтозид (ДМ)

Рис. 5.5. Структурные формулы амфифильных соединений

Хлорпромазин (ХПР) и трифторперазин (ТФП) являются производными фенотиазана и относятся к катионным амфифильным веществам. Гидрофобная часть молекулы ХПР и ТФП представлена структурой трициклического кольца, в то время как гидрофильная –

четвертичным пропиламином и боковой цепью, содержащей пиперазин, замещённый при атоме азота в положении 4 группой $-\text{CH}_3$ соответственно. Гидрофильная часть молекулы имеет положительный заряд у атома азота.

Децилсульфат и додецилсульфат натрия (C10 и C12) являются производными алкилсульфата натрия с длиной алкильной цепи 10 и 12 углеродных атомов. Гидрофобная часть данных молекул представлена алифатической цепью, а гидрофильная – сульфатной группой, несущей отрицательный заряд.

Из неионных амфифилов в работе использовали додецил- β ,D-мальтозид (ДМ). Гидрофобная часть молекулы ДМ представлена предельной алифатической цепью с 12 атомами углерода, гидрофильная часть – остатками молекул глюкозы, соединённых эфирной связью. ДМ не диссоциирует в воде, его растворимость обусловлена наличием в молекуле гидроксильных групп.

В качестве материала для исследования были выбраны эритроциты человека, лошади, быка и кролика. Эритроциты исследуемых видов млекопитающих отличаются размерами [234, 165, 325, 350], доминирующим внутриклеточным катионом [493], а также составом цитоскелет-мембранного комплекса [314, 379, 419, 526].

Для изучения влияния амфифильных веществ в условиях гипертонического шока эритроцитов млекопитающих клетки переносили в среду, содержащую 4,0 моль/л NaCl и разные концентрации амфифила, при температуре 37 и 0°C. Типичная зависимость гипертонического гемолиза эритроцитов от концентрации амфифильного вещества представлена на рис. 5.6. Она характеризуется наличием трех участков. При увеличении концентрации амфифила происходит постепенное снижение уровня гипертонического лизиса клеток (фаза 1), затем, несмотря на дальнейшее увеличение концентрации амфифила, уровень гемолитического повреждения, достигший минимального значения, не изменяется (фаза 2) и в последующем наблюдается повышение уровня повреждения клеток до исходного уровня и

выше (фаза 3). В низких концентрациях амфифильное соединение защищает эритроциты от повреждения при ГШ, в то время как в высоких – оказывает литическое действие на клетки. Подобная двойственность действия амфифильных веществ описана в работах [122, 138, 346, 375].

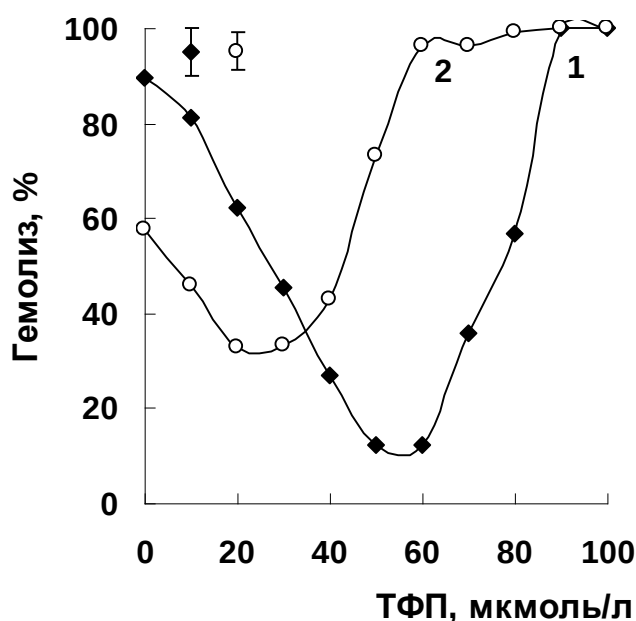


Рис. 5.6. Влияние ТФП на гипертонический гемолиз эритроцитов человека в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, при температуре 37 (1) и 0°C (2).

Из полученных концентрационных зависимостей гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих были рассчитаны величины максимальной антигемолитической активности ($АГ_{\text{макс}}$), размеры плато, значения эффективных концентраций ($С_{АГ_{\text{макс}}}$), которые характеризуют эффективность действия исследуемых амфифильных соединений. Антигемолитическую активность амфифильного соединения выражали как процент снижения гемолиза клеток в присутствии веществ по отношению к гемолизу в пробе, не содержащей амфифил. Размеры плато отражают диапазон концентраций амфифильного вещества, в пределах которых

наблюдается минимальный лизис клеток. За эффективную концентрацию амфифильного соединения принимали концентрацию, соответствующую середине плато. В этой концентрации амфифил оказывает максимальное антигемолитическое действие.

Данные о влиянии амфифильных соединений, относящихся к различным классам, на развитие гипертонического гемолиза эритроцитов человека при 37 и 0°C представлены в табл. 5.1. Все исследуемые вещества проявляют защитное действие при перенесении клеток человека в высококонцентрированный солевой раствор (4,0 моль/л NaCl). Сравнительный анализ эффективности используемых амфифильных соединений в условиях гипертонического гемолиза эритроцитов (табл. 5.1) свидетельствует о высокой антигемолитической активности всех амфифилов при 37°C, однако максимальный защитный эффект характерен для анионного C10 и катионного ТФП.

Эффективность амфифильных соединений в значительной степени зависит от температуры, поскольку при 37°C значения антигемолитической активности и величины эффективных концентраций всех исследуемых амфифильных веществ выше, чем при 0°C (табл. 5.1).

При изучении влияния амфифилов на уровень гемолиза эритроцитов человека при охлаждении в гипертонической среде, т.е. в условиях ГК, серию экспериментов проводили в следующей постановке. Эритроциты помещали в среду, содержащую 1,2 моль/л NaCl, при 37°C. После 10-минутного инкубирования аликвоту переносили в раствор NaCl той же осмолярности, охлажденный до 0°C, на 10 мин (этап II). Амфифильное соединение в разных концентрациях находилось на этапе II. Клетки вносили в охлажденную среду, уже содержащую амфифил. Такая постановка эксперимента позволяет максимально повысить скорость охлаждения клеточной суспензии, а также изучить действие амфифилов на этапе охлаждения клеток, когда эритроциты переносят в охлажденный раствор 1,2 моль/л NaCl, в который уже добавлено исследуемое вещество.

Таблица 5.1.

Значения максимальной антигемолитической активности ($АГ_{\text{макс}}$) и эффективных концентраций ($С_{АГ\text{макс}}$) амфифильных соединений при гипертоническом шоке и гипертоническом криогемолизе эритроцитов человека ($M \pm m, n = 7$)

Вещество	Гипертонический шок, 4,0 моль/л NaCl				Гипертонический криогемолиз, 1,2 моль/л NaCl	
	37°C		0°C		37 → 0°C	
	$АГ_{\text{макс}},$ %	$С_{АГ\text{макс}},$ мкмоль/л	$АГ_{\text{макс}},$ %	$С_{АГ\text{макс}},$ мкмоль/л	$АГ_{\text{макс}},$ %	$С_{АГ\text{макс}},$ мкмоль/л
С10	86 ± 3	45 ± 4	51 ± 3	10 ± 1	46 ± 3	105 ± 5
С12	76 ± 4	25 ± 3	33 ± 6	15 ± 8	12 ± 5	$2,5 \pm 2$
ТФП	87 ± 3	55 ± 6	42 ± 6	25 ± 6	80 ± 6	50 ± 10
ХПР	77 ± 2	124 ± 8	60 ± 6	20 ± 1	70 ± 3	120 ± 20
ДМ	76 ± 4	8 ± 1	47 ± 3	2 ± 1	0	–

Из полученных зависимостей гипертонического криогемолиза эритроцитов человека от концентрации амфифильного вещества в среде рассчитывали величины максимальной антигемолитической активности ($АГ_{\text{макс}}$) и определяли значения эффективных концентраций ($С_{АГ\text{макс}}$), которые характеризуют эффективность действия исследуемых амфифильных соединений

Полученные данные о влиянии амфифильных соединений, относящихся к различным классам, на развитие гипертонического криогемолиза эритроцитов человека в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl, представлены в табл. 5.1. Анализ эффективности амфифилов в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов человека (табл. 5.1) позволяет говорить о способности заряженных амфифилов защищать

клетки от гемолитического повреждения в отличие от неионного ДМ, для которого не выявлено антигемолитической активности. Показана высокая эффективность положительно заряженных производных фенотиазина (ХПР и ТФП) при охлаждении эритроцитов человека в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl.

Таким образом, установленное протектирующее действие ХПР в условиях ГШ и ГК эритроцитов человека (рис. 5.1) не является специфическим и присущим исключительно этому соединению. Расширение спектра изучаемых амфифилов за счет представителей иных классов показывает, что защитное действие в условиях ГШ эритроцитов человека характерно не только для катионных, но присуще и для анионных и неионных представителей поверхностно-активных соединений.

Основываясь на полученных результатах о различной чувствительности эритроцитов разных видов млекопитающих к ГШ и ГК (рис. 3.1 и рис. 4.1) и учитывая структурно-функциональные особенности этих клеток [165, 234, 314, 325, 350, 379, 419, 493, 526], представляло интерес исследовать влияние амфифильных веществ, являющихся представителями различных классов поверхностно-активных соединений, на развитие гемолитического повреждения эритроцитов млекопитающих в выше указанных условиях. В данной серии экспериментов для изучения влияния амфифилов на чувствительность эритроцитов к ГШ и ГК были использованы клетки лошади, быка и кролика. Полученные результаты представлены в табл. 5.2 и 5.3.

Все используемые в работе амфифильные соединения защищают эритроциты быка и лошади от повреждения в гипертонической среде при 37°C (табл. 5.2). Межвидовое сравнение эффективности соответствующих амфифильных соединений не демонстрирует существенных различий в величинах антигемолитической активности (в отличие от значений эффективных концентраций амфифилов).

Эффективность амфифильных соединений в значительной степени зависит от температуры. Если в условиях ГШ эритроцитов быка и лошади амфифилы характеризуются протектирующим эффектом при 37°C, то при 0°C амфифилы либо не проявляют защитного действия, как в случае анионных и неионного амфифилов, либо оно очень слабо выражено, как в случае катионных веществ (табл. 5.2).

Таблица 5.2.

Значения максимальной антигемолитической активности ($АГ_{\text{макс}}$) и эффективных концентраций ($С_{АГ\text{макс}}$) амфифильных соединений при гипертоническом шоке эритроцитов быка и лошади в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, при температуре 37 и 0°C ($M \pm m$, $n=7$)

Вещество	Бык		Лошадь			
	37°C		37°C		0°C	
	$АГ_{\text{макс}}$, %	$С_{АГ\text{макс}}$, мкмоль/л	$АГ_{\text{макс}}$, %	$С_{АГ\text{макс}}$, мкмоль/л	$АГ_{\text{макс}}$, %	$С_{АГ\text{макс}}$, мкмоль/л
С10	83 ± 5	65 ± 7	84 ± 3	40 ± 2	0	–
С12	31 ± 7	50 ± 7	42 ± 8	20 ± 2	0	–
ТФП	80 ± 7	50 ± 3	77 ± 6	40 ± 5	60 ± 4	20 ± 3
ХПР	76 ± 7	70 ± 5	86 ± 8	90 ± 5	38 ± 4	20 ± 5
ДМ	65 ± 5	14 ± 3	71 ± 4	9 ± 1	0	–

Сравнительный анализ эффективности амфифилов для эритроцитов животных и человека в условиях ГШ (37°C) показывает высокие значения антигемолитической активности С10, ДМ, ХПР и ТФП. Наиболее выраженные различия касаются анионного амфифильного соединения

C12, величины АГ активности которого различаются примерно в 2 раза для эритроцитов человека и животных.

Следует отметить, что в условиях ГШ (при 37 и 0°C) амфифильные вещества не протектируют эритроциты кролика, которые характеризуются изначально низким уровнем гипертонического повреждения клеток (рис. 3.1), поэтому данные не представлены. Отсутствие эффективности амфифилов может быть связано с высоким содержанием холестерина в эритроцитарных мембранах кролика [419], а также обусловлено особенностями их фосфолипидного состава (высокое содержание СМ и ФЭА, низкое ФХ [526]) что затрудняет как встраивание амфифила, так и процесс реорганизации мембраны под его действием.

Проведенные исследования и полученные результаты свидетельствуют о том, что эффект ХПР не является специфическим, поскольку аналогичное действие проявляют и другие соединения, причем общим в строении их молекул является амфифильность, т.е. наличие гидрофобной и гидрофильной частей. Это позволяет молекулам встраиваться в плазматическую мембрану и распределяться в ней в соответствии с физико-химическими характеристиками этих соединений.

Величины АГ активности и значения эффективных концентраций амфифильных соединений в условиях ГК эритроцитов животных представлены в табл. 5.3. Все амфифилы проявляют защитное действие, однако большей эффективностью характеризуются заряженные соединения: анионный С12 и катионные ТФП, ХПР. Следует отметить особенность эффекта неионного ДМ в условиях ГК эритроцитов млекопитающих: достаточно низкая активность для клеток животных (АГ на уровне 24–36%) (табл. 5.3) и отсутствие защитного действия для эритроцитов человека (табл. 5.1). Кроме того, наблюдаются различия в проявлении защитного действия анионных амфифилов для клеток человека и животных, которые проявляются в более высокой эффективности алкилсульфатов для эритроцитов последних (примерно в 2–4 раза для С12 и в 1,4–1,6 раз для

Таблица 5.3

Значения максимальной антигемолитической активности ($АГ_{\text{макс}}$) и эффективных концентраций ($С_{АГ\text{макс}}$) амфифильных соединений при гипертоническом криогемоллизе эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl ($M \pm m$, $n = 7$)

Амфифильное соединение	Бык		Лошадь		Кролик	
	$АГ_{\text{макс}}$, %	$С_{АГ\text{макс}}$, мкмоль/л	$АГ_{\text{макс}}$, %	$С_{АГ\text{макс}}$, мкмоль/л	$АГ_{\text{макс}}$, %	$С_{АГ\text{макс}}$, мкмоль/л
С 10	68 ± 7	180 ± 9	75 ± 8	170 ± 10	66 ± 5	215 ± 10
С12	55 ± 8	25 ± 1	27 ± 6	20 ± 7	51 ± 6	25 ± 8
ТФП	65 ± 6	60 ± 2	64 ± 7	60 ± 6	85 ± 4	60 ± 4
ХПР	70 ± 4	155 ± 5	76 ± 2	240 ± 7	70 ± 3	145 ± 10
ДМ	30 ± 4	4 ± 2	24 ± 6	8 ± 3	36 ± 2	10 ± 2

С10). Различия в реализации защитного действия исследуемых амфифилов между эритроцитами человека и животных в условиях ГК, по-видимому, связаны с особенностями их плазматических мембран, поскольку местом приложения действия амфифильных веществ является клеточная мембрана, качественно-количественный состав, которой может определять характер их распределения. Тем более в ряде работ [236, 352] показано, что амфифилы характеризуются различным сродством к липидам.

Учитывая особенности зависимости гипертонического криогемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих от концентрации NaCl в среде (рис. 4.1), в частности более низкий уровень гемолитического повреждения клеток человека в более концентрированной среде при изменении температуры от 37 до 0°C, представлялось целесообразным изучить антигемолитическую активность амфифильных соединений в средах различной осмоляльности. Действию гипертонического криогемолиза подвергали эритроциты млекопитающих, которые различаются по характеру концентрационной зависимости криогемолиза. К первой группе относятся клетки человека и лошади, которые характеризуются наличием максимума повреждения в условиях ГК. Представителем второй группы являются эритроциты быка, которые характеризуются практически монотонным развитием криогемолиза с ростом концентрации соли в среде (рис. 4.1).

На рис. 5.7 в сравнительном аспекте представлены величины антигемолитической активности амфифильных соединений в условиях ГК эритроцитов млекопитающих в средах, содержащих 1,2 и 2,1 моль/л NaCl. Для эритроцитов животных приведены данные по эффективности четырех амфифилов, в то время как для эритроцитов человека – только трех амфифильных веществ, поскольку неионный ДМ не проявляет антигемолитической активности в условиях ГК этих клеток (табл. 5.1).

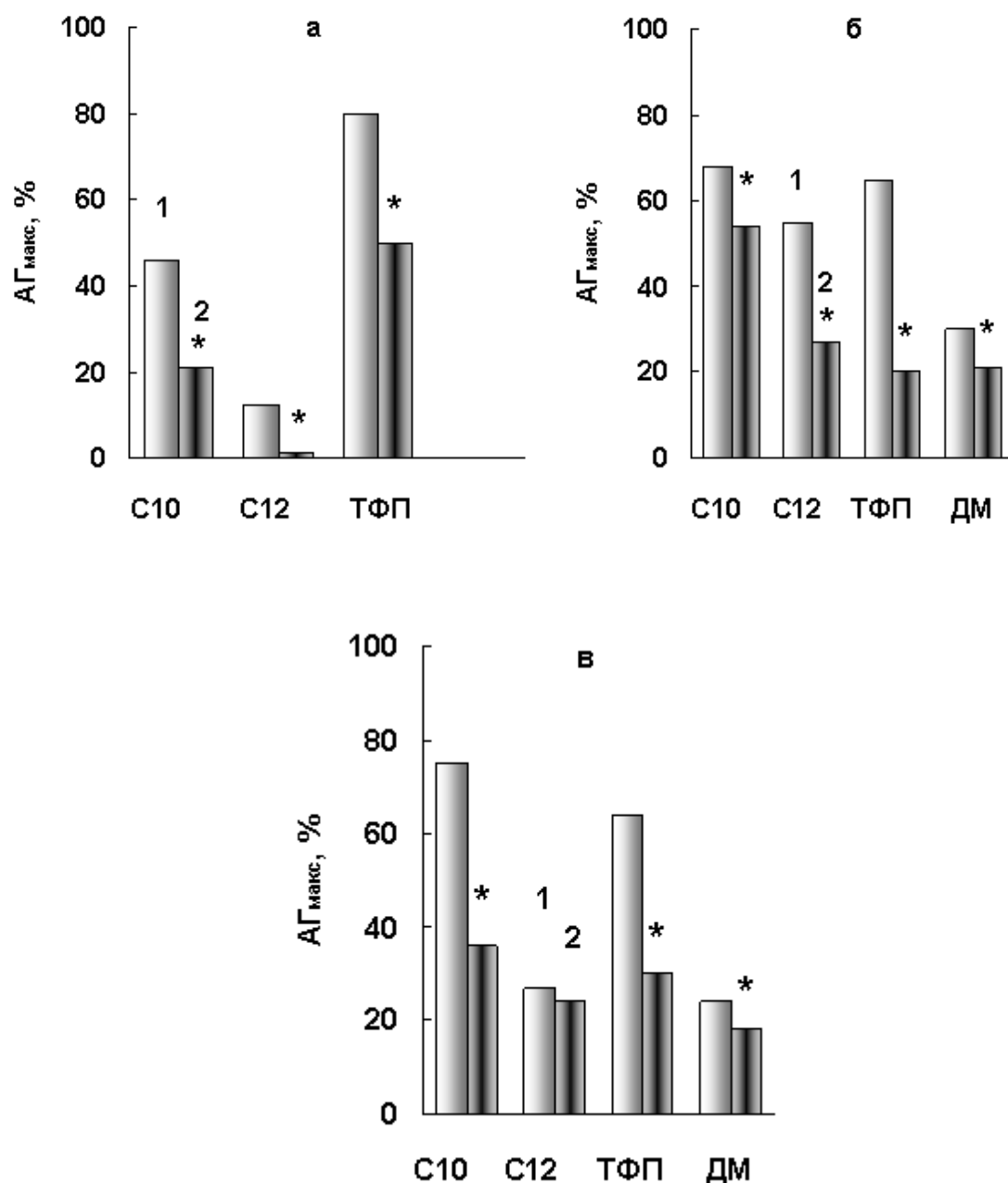


Рис. 5.7. Максимальная антигемолитическая активность амфифильных соединений в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов человека, быка и лошади (а, б и в соответственно) в среде, содержащей 1,2 (1) и 2,1 моль/л NaCl (2). Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с показателями $АГ_{\text{макс}}$ клеток в 1,2 моль/л NaCl, ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 7.

Для эритроцитов быка, для которых характерно концентрационно-зависимое практически монотонное увеличение криогемолиза (т.е. уровень

повреждения в 2,1 моль/л растворе NaCl выше, чем в 1,2 моль/л растворе NaCl) (рис. 4.1), наблюдается снижение эффективности всех используемых амфифилов в более концентрированной солевой среде (рис. 5.7 б). Наиболее выраженное падение антигемолитической активности характерно для катионного ТФП (в 3,25 раза) в отличие от других амфифилов, для которых отмечается снижение в 1,3–2,0 раза.

Несмотря на то, что клетки человека и лошади характеризуются большей устойчивостью к охлаждению в среде, содержащей 2,1 моль/л NaCl, по сравнению с 1,2 моль/л NaCl (рис. 4.1), эффект снижения значений антигемолитической активности амфифилов в более концентрированных средах отмечается и в этом случае. Однако обращает на себя внимание тот факт, что изменение эффективности С12 для клеток человека и лошади выражены в разной степени. Если для эритроцитов лошади снижение эффективности С10 проявляется на уровне тенденции, то в случае клеток человека АГ активность вообще не регистрируется. В условиях ГК эритроцитов человека и лошади в среде, содержащей 2,1 моль/л NaCl, наблюдается снижение АГ активности С10 и ТФП примерно в 2 раза.

Тот факт, что в более концентрированных средах наблюдается снижение эффективности амфифилов в условиях ГК эритроцитов млекопитающих (рис. 5.7) независимо от характера развития их гемолитического повреждения (рис. 4.1), свидетельствует в пользу развития нарушений плазматической мембраны с ростом концентрации соли в среде. Это подтверждает ранее высказанное предположение о том, что снижение уровня гемолитического повреждения эритроцитов некоторых млекопитающих при увеличении концентрации соли в среде (рис. 4.1) не является результатом адаптации, а связаны, по-видимому, с тем, что гемоглобин не может покинуть клетку из-за несоответствия его размеров и геометрии гемолитических пор, формирующихся в конкретных условиях.

Амфифильные соединения встраиваются в эритроцитарную мембрану и оказывают выраженное пертурбирующее действие на нее

[330, 489], поэтому весьма вероятно, что эффекты этих веществ связаны с нарушением барьерных свойств плазматической мембраны. Кроме того, показано [437], что многие амфифильные соединения при использовании их в концентрациях, обеспечивающих защиту эритроцитов человека от гипотонического лизиса, могут вызывать утечку внутриклеточных катионов.

Методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии оценивали барьерные свойства плазматических мембран эритроцитов человека по выходу ионов K^+ из клеток в присутствии амфифильных веществ. Амфифилы были использованы в концентрациях, соответствующих их эффективным концентрациям в условиях гипертонического стресса эритроцитов при температуре $37^\circ C$ (см. табл. 5.5–5.7). Выход K^+ из эритроцитов определяли при инкубировании клеток в средах, содержащих 0,15 или 4,0 моль/л NaCl, в течение 10 мин. Полагали, что в среде, в которой развивается 100% гемолиз эритроцитов: дистиллированная вода + тритон X-100 (0,1 %), происходит и максимальный выход ионов калия из клеток ($11,97 \pm 1,20$ мг/л).

В табл. 5.4 представлены данные о содержании калия в супернатанте после инкубации эритроцитов человека с амфифильными веществами в физиологическом растворе и в растворе, содержащем 4,0 моль/л NaCl. Исследуемые амфифильные вещества в используемых концентрациях не влияют на выход ионов калия из клеток в физиологической среде. Таким образом, можно говорить о том, что в присутствии амфифилов в изотонических условиях барьерные свойства эритроцитарных мембран не изменяются.

Введение амфифилов в среду, содержащую 4,0 моль/л NaCl, существенно не влияет на утечку ионов калия из клеток. Таким образом, выявленная способность амфифилов, относящихся к разным классам, снижать уровень гипертонического гемолиза эритроцитов человека (табл. 5.1), но при этом не оказывать влияние на выход ионов калия из клеток в 4,0 моль/л растворе NaCl свидетельствует о том, что

амфифильные вещества не оказывают влияния на формирование либо проявление микродефектов, а предотвращают их дальнейшее развитие до размера гемолитических пор.

Таблица 5.4.

Содержание калия в супернатанте после инкубирования эритроцитов человека в средах, содержащей 0,15 моль/л и 4,0 моль/л NaCl, в присутствии амфифильных веществ в эффективных концентрациях ($C_{AG\text{макс}}$)

$M \pm m, n = 6$

Вещество	$C_{AG\text{макс}}$, мкмоль/л	Содержание калия в средах, мг/л	
		0,15 моль/л NaCl	4,0 моль/л NaCl
Контроль	0	$0,24 \pm 0,03$	$10,97 \pm 1,06$
ДМ	6	$0,21 \pm 0,02^*$	$11,12 \pm 1,11^{**}$
C12	20	$0,20 \pm 0,02^*$	$10,73 \pm 0,91^{**}$
C10	40	$0,22 \pm 0,02^*$	$10,52 \pm 0,89^{**}$
ХПР	120	$0,25 \pm 0,03^*$	$11,05 \pm 1,10^{**}$

Примечания: * – статистически значимо не различаются по сравнению с контролем в 0,15 моль/л NaCl ($p > 0,05$); ** – статистически значимо не различаются по сравнению с контролем в 4,0 моль/л NaCl ($p > 0,05$).

Выявленная высокая антигемолитическая активность амфифильных соединений, относящихся к различным классам, в условиях ГШ и ГК эритроцитов животных, привела к необходимости изучения выхода ионов K^+ из клеток в присутствии амфифилов с целью оценки барьерной функции плазматической мембраны. Для этого использовали метод ионселективной потенциометрии. Амфифилы добавляли в исследуемую среду в концентрациях, при которых наблюдался максимальный защитный эффект данных соединений в стрессовых условиях. За 100 % принимали выход

ионов K^+ из эритроцитов в среде, содержащей дистиллированную воду с 0,1% тритоном X-100.

В работе [269] было проведено сравнительное измерение выхода калия из эритроцитов разными методами: пламенной фотометрией, селективным электродом и атомно-абсорбционной фотометрией. Результаты измерения выхода калия из эритроцитов, полученные этими тремя методами, не показали различий в том случае, когда концентрация калия превышала значение 4×10^{-5} моль/л.

В табл. 5.5 представлены данные о содержании калия в супернатанте после инкубации эритроцитов млекопитающих с амфифильными веществами в среде, содержащей 0,15 или 4,0 моль/л NaCl в течение 10 мин. В используемых концентрациях амфифильные вещества не вызывают нарушение барьерной функции мембраны, поскольку не наблюдается увеличение выхода ионов K^+ из клеток млекопитающих, находящихся в изотонической среде. Таким образом, в физиологических условиях барьерные свойства мембран эритроцитов млекопитающих для ионов K^+ не изменяются в присутствии амфифильных соединений.

Исходный уровень выхода ионов K^+ из эритроцитов млекопитающих, находящихся в 4,0 моль/л NaCl, очень высок (90% и более) и при этом не наблюдается видовых различий. При добавлении амфифилов в гипертоническую среду уровень выхода ионов K^+ из эритроцитов млекопитающих статистически значимо не отличается от значений потери K^+ контрольными эритроцитами. Таким образом, и в условиях гипертонического шока амфифильные соединения не способны оказывать влияние на барьерные свойства мембран эритроцитов исследуемых видов млекопитающих, оцениваемые по выходу внутриклеточных катионов

Исходя из вышеизложенного, можно полагать, что антигемолитическое действие амфифильных соединений в условиях ГШ эритроцитов разных видов млекопитающих (4,0 моль/л NaCl) (табл. 5.5–5.7) реализуется на уровне уже сформировавшегося

микродефекта, проницаемого для катионов K^+ . Действие амфифилов направлено на предотвращение роста этого трансмембранного микродефекта до размера гемолитической поры. Несомненно,

Таблица 5.5

Выход ионов калия из эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 0,15 моль/л и 4,0 моль/л NaCl, при 37°C в присутствии амфифильных соединений в эффективных концентрациях ($C_{AG\text{макс}}$)

$M \pm m, n = 9$

Вещество	Лошадь			Бык		
	$C_{AG\text{макс}}$, мкмоль/л	K^+ , %		$C_{AG\text{макс}}$, мкмоль/л	K^+ , %	
		0,15 моль/л NaCl	4,0 моль/л NaCl		0,15 моль/л NaCl	4,0 моль/л NaCl
контроль	0	3 ± 2	93 ± 4	0	$3 \pm 1^*$	$94 \pm 3^{**}$
C10	40	$3 \pm 2^*$	$91 \pm 5^{**}$	65	$4 \pm 2^*$	$94 \pm 5^{**}$
C12	25	$3 \pm 2^*$	$92 \pm 3^{**}$	50	$4 \pm 1^*$	$94 \pm 3^{**}$
ДМ	8	$3 \pm 1^*$	$93 \pm 3^{**}$	14	$3 \pm 1^*$	$92 \pm 5^{**}$
ТФП	55	$3 \pm 2^*$	$93 \pm 4^{**}$	50	$3 \pm 1^*$	$94 \pm 3^{**}$

Примечание: * – статистически значимо не различаются по сравнению с контролем в 0,15 моль/л NaCl ($p > 0,05$); ** – статистически значимо не различаются по сравнению с контролем в 4,0 моль/л NaCl ($p > 0,05$).

дальнейшая судьба микродефекта и клетки в целом будет зависеть от используемого амфифильного соединения на фоне действия других физико-химических факторов внешней среды (температура, осмоляльность, pH). Кроме того, следует отметить, что эффективность амфифила зависит и от эндогенных клеточных факторов. В частности, особенности цитоскелет-мембранного комплекса эритроцитов разных видов млекопитающих [314, 379, 419, 526] может определять эволюцию

их трансмембранных дефектов и, как следствие, целостность эритроцитарной мембраны.

Изменение формы эритроцитов человека под влиянием разнообразных амфифильных соединений происходит по двум основным направлениям: от дискоцита к эхиноциту и от дискоцита к стоматоциту [492]. Характер трансформации эритроцитов человека главным образом зависит от физико-химических свойств используемых амфифильных молекул.

В данной работе мы исследовали изменение формы эритроцитов человека и животных под влиянием амфифильных соединений, относящихся к различным классам: анионного C10, катионного ТФП и неионного ДМ. Для описания формы эритроцитов использовали классификацию, предложенную в работе Bessis [232].

В силу того, что удаление белков плазмы сопровождается трансформацией эритроцитов и появлением эхиноцитарных форм клеток, поэтому эритроциты помещали в аутологичную плазму с тем, чтобы получить изначально форму клеток, характерную для нативных эритроцитов (рис. 5.8). Видно, что все исследуемые эритроциты имеют дискоцитарную форму. Сравнительный анализ показывает выраженную в разной степени способность клеток человека, лошади и кролика образовывать «монетные столбики», в то время как для эритроцитов быка агрегация не характерна: они представлены одиночными дискоцитами.

Морфологический ответ эритроцитов млекопитающих на введение амфифильных соединений в аутологичную плазму в концентрациях, при которых наблюдались уже значительные изменения формы клеток, представлен микрофотографиями на рис. 5.9–5.12.

Эритроциты животных, как и клетки человека, демонстрируют одинаковую реакцию на присутствие в среде амфифильных соединений. Под действие отрицательно заряженного C10 развивается хорошо выраженный эхиноцитоз эритроцитов млекопитающих (рис. 5.9 а–5.12 а).

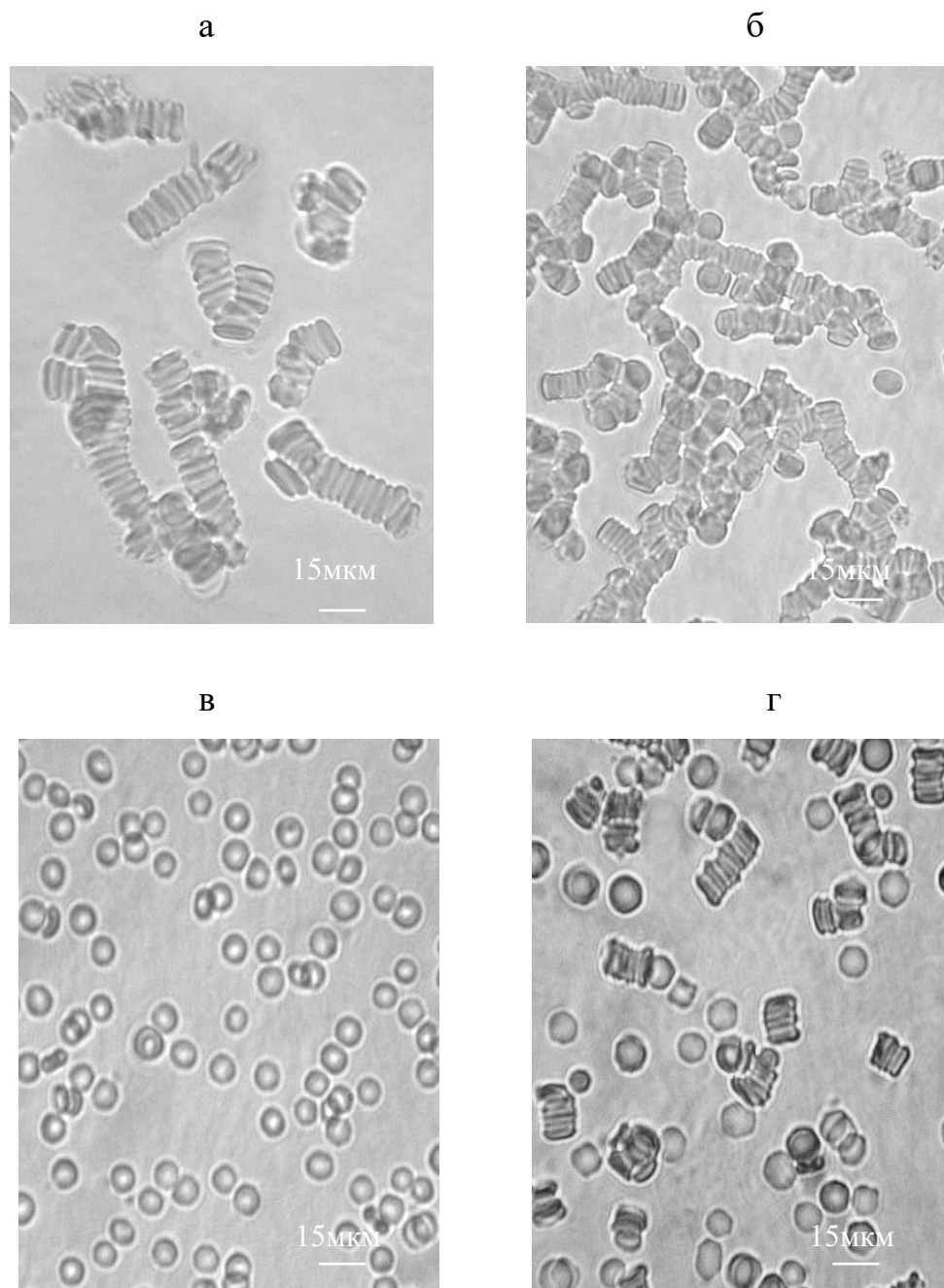


Рис. 5.8. Морфология intactных эритроцитов млекопитающих в плазме: а – человек; б – лошадь; в – бык; г – кролик.

Аналогичный ответ на присутствие в среде неионного ДМ (трансформация дискоцит – стоматоцит) показан для эритроцитов человека и животных. Морфологический ответ эритроцитов животных на присутствие в среде положительно заряженного ТФП проявляется в развитии стоматоцитоза.

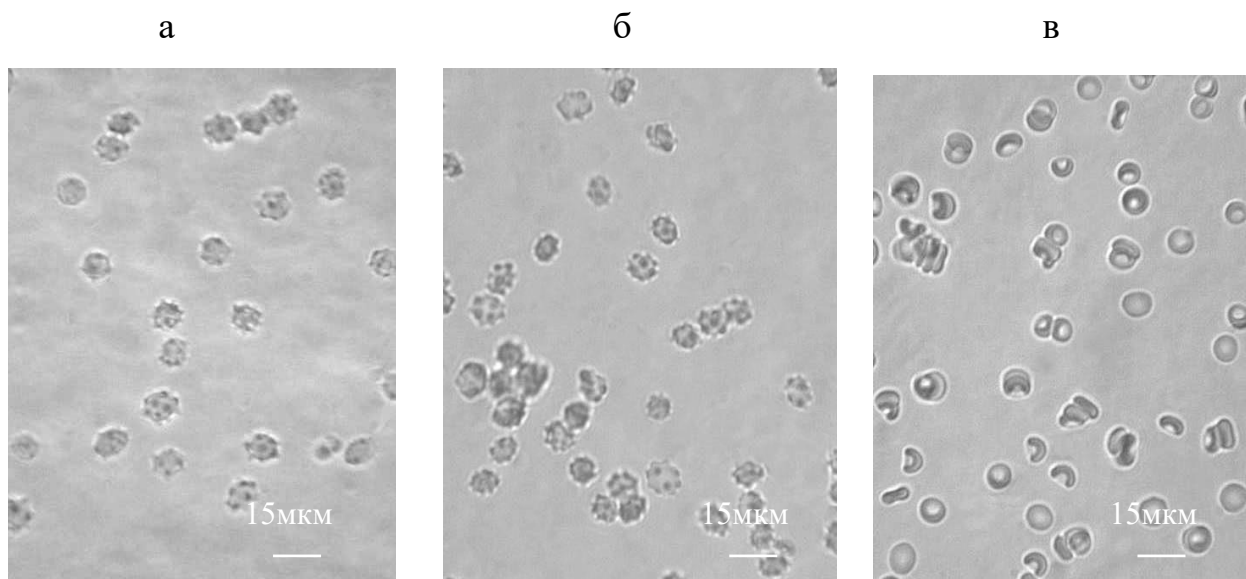


Рис. 5.9. Морфология эритроцитов человека в присутствии амфифильных соединений: а – С10 (350 мкмоль/л); б – ДМ (32 мкмоль/л); в – ТФП (50 мкмоль/л).

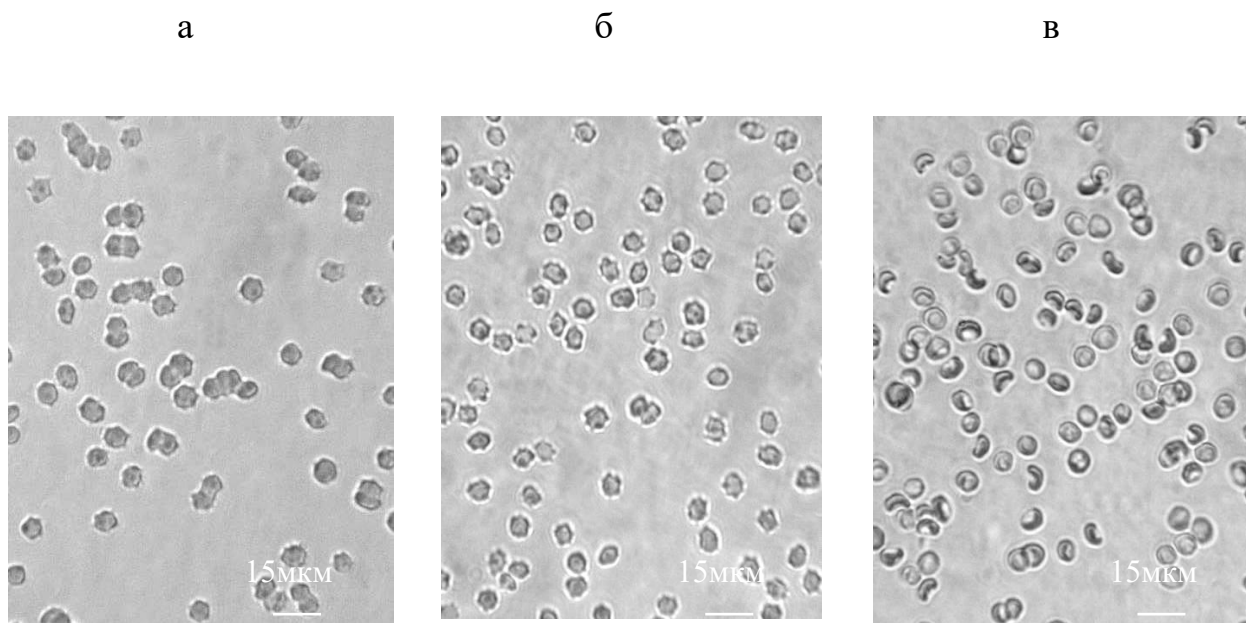


Рис. 5.10. Морфология эритроцитов лошади в присутствии амфифильных соединений: а – С10 (255 мкмоль/л); б – ДМ (8 мкмоль/л); в – ТФП (60 мкмоль/л).

Следует отметить, что амфифильные вещества использовали в более высоких концентрациях, чем антигемолитические. Это обусловлено тем, что белки плазмы могут связывать амфифильные молекулы, а также адсорбция компонентов плазмы на поверхности клетки может ограничивать доступность поверхности клетки молекулам вещества и, как результат, препятствовать их распределению в мембране.

В работе [101] при исследовании изменения формы эритроцитов человека, находящихся в плазме, была показана трансформирующая активность только для положительно заряженного ХПР в отличие от ДМ и С10. Можно допустить, что в последнем случае белки плазмы сорбировали молекулы амфифила, поэтому амфифильного вещества в используемой концентрации было недостаточно для проявления трансформирующего эффекта.

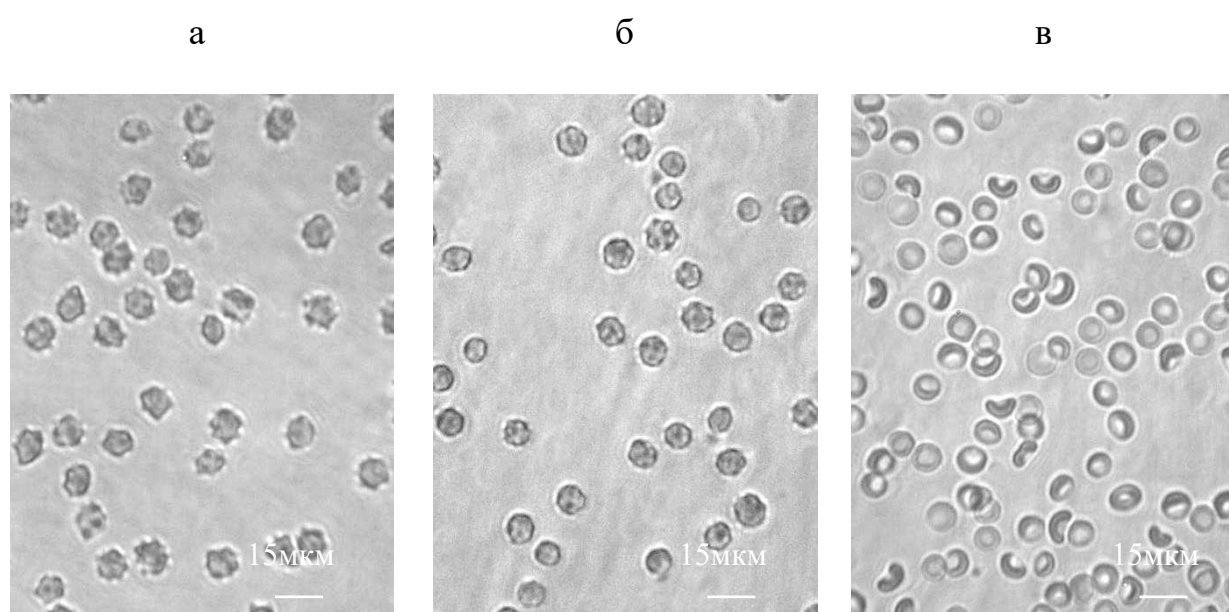


Рис. 5.11. Морфология эритроцитов быка в присутствии амфифильных соединений: а – С10 (180 мкмоль/л); б – ДМ (16 мкмоль/л); в – ТФП (60 мкмоль/л).

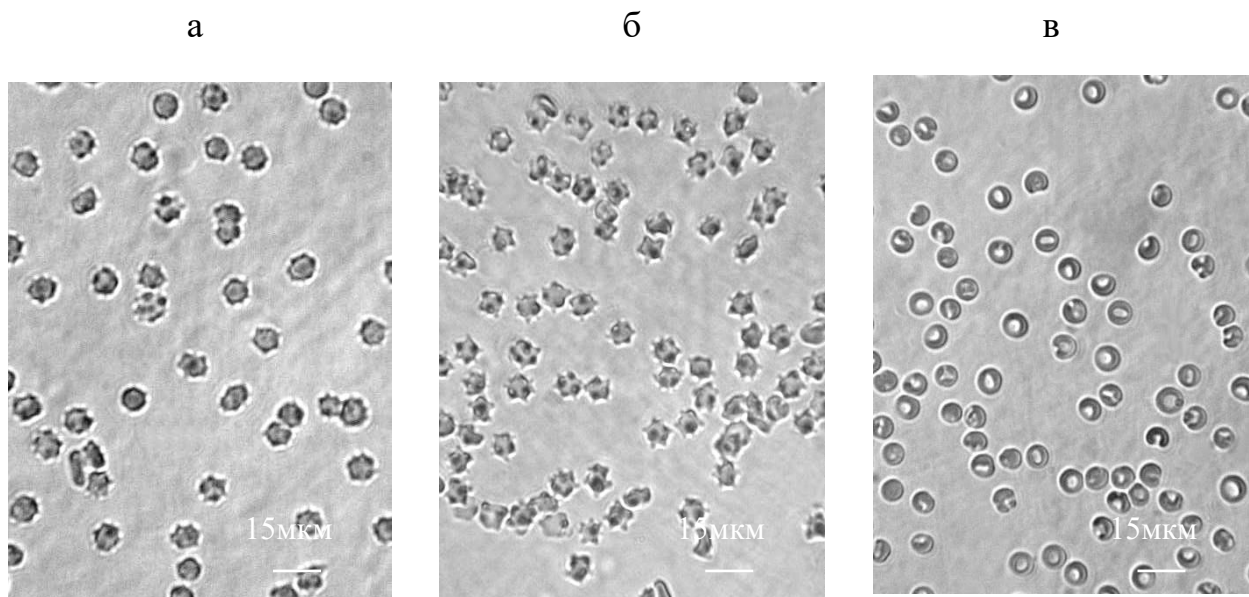


Рис. 5.12. Морфология эритроцитов кролика в присутствии амфифильных соединений: а – С10 (215 мкмоль/л); б – ДМ (12 мкмоль/л); в – ТФП (60 мкмоль/л).

Общим для молекул всех изучаемых соединений является их амфифильность, обусловленная наличием в молекуле как гидрофобной, так и гидрофильной частей. Именно эта характерная особенность позволяет молекулам веществ проникать в мембрану и распределяться в ней. Морфологический анализ клеток, обработанных амфифильными соединениями, позволяет делать вывод о внутримембранной локализации исследуемых соединений, а точнее об их трансмембранном распределении, основываясь на гипотезе сопряженных монослоев бислоя [478]. Липидный бислой эритроцитарной мембраны рассматривается в виде двух монослоев, связанных между собой гидрофобными связями. Гипотеза заключается в том, что предпочтительное распределение веществ в одном из монослоев липидного бислоя приводит к увеличению площади поверхности этого монослоя относительно площади поверхности другого монослоя. Нарушения баланса между площадями

монослоев бислоя на клеточном уровне проявляется в трансформации эритроцитов. В зависимости от предпочтительной локализации вещества в том или ином монослое может наблюдаться как стоматоцитоз, так и эхиноцитоз эритроцитов [478].

Наблюдаемый стоматоцитоз эритроцитов всех млекопитающих в присутствии ТФП (рис. 5.9 в–5.12 в) свидетельствует о том, что молекулы этих соединений при встраивании в эритроцитарную мембрану способны пересекать сердцевину липидного бислоя и распределяться во внутреннем монослое. Эхиноцитоз эритроцитов млекопитающих под влиянием С10 и ДМ (рис. 5.9 а,б–5.12 а, б) свидетельствует в пользу их локализации во внешнем монослое.

Согласно данным работы [295], изменение формы эритроцитов по типу дискоцит-стоматоцит и дискоцит-эхиноцит зависит от трансмембранного потенциала клеток, поскольку положительный потенциал на внутренней стороне мембраны приводит к образованию стоматоцитов, тогда как отрицательный способствует формированию эхиноцитов. Авторы работы [295] полагают, что влияние амфифилов на форму эритроцита может происходить в результате изменения трансмембранного потенциала клеток.

В работе [502] показано отсутствие противоречия между гипотезой сцепленного бислоя и теорией двойного электрического слоя, если последняя будет учитывать влияния адсорбции противоионов на напряженность мембраны. Разработанная в указанной работе количественная модель может быть применена для прогнозирования индекса формы клеток при трансформации стоматоцит-дискоцит-эхиноцит в условиях изменения состава внешней среды.

Трансмембранный потенциал клетки влияет на флип-флоп процессы и, таким образом, на асимметрию мембранных компонентов, что может быть одним из возможных механизмов потенциал-индуцированного изменения формы эритроцитов [321]. При исследовании стоматоцитоза эритроцитов человека, вызванного винбластином и хлорпромазином, Schrier с соавт. [472]

выявили транслокацию спинмеченных холин-содержащих фосфолипидов (ФХ и СМ) во внутренний монослой мембраны.

Кроме того, трансформация эритроцита может быть следствием изменения конформации интегральных белков мембраны, в частности белка полосы 3 [271, 311, 529]. В работе [271] показано, что площадь, занимаемая белками (белком полосы 3) на внешней поверхности мембраны эритроцитов человека, изменяется при трансформации клетки. При эхиноцитозе площадь внешнего монослоя мембраны увеличивается на 7,3%, а при стоматоцитозе уменьшает на 10,4% по сравнению с площадью, занимаемая белками на внешней поверхности мембраны эритроцита в дискоидной форме.

Предложенные механизмы трансформации эритроцитов можно условно отнести к трем группам: перераспределение липидов, модификация Доннановского равновесия и взаимодействие белка полосы 3 с различными внешними факторами. Многочисленные работы, направленные на изучение механизмов трансформации эритроцитов [271, 295, 321, 363, 502, 529], в значительной степени дополнили более раннюю фундаментальную работу Sheetz и Singer [478].

В настоящее время можно считать, что все агенты, изменяющие форму клетки (химические, биологические и даже физические), действуют исключительно или большей частью через изменение площади одного монослоя плазматической мембраны относительно другого. Так, любое влияние, которое способствует расширению наружного монослоя относительно внутреннего, создает тенденцию к формированию эхиноцитов, и наоборот, расширение внутреннего монослоя относительно наружного благоприятствует образованию стоматоцитов [363].

Для выяснения возможного механизма трансмембранного распределения амфифилов были проведены исследования на модельных системах (монослой Ленгмюра, везикулы), направленные на изучение характера и особенностей взаимодействия разных амфифильных соединений

с мембранными липидами [2, 236]. Большинство работ выполнено с использованием катионных амфифильных соединений, в частности ХПР.

На монослоях Ленгмюра показано, что ХПР в микромолярных концентрациях существенно расширяет площадь поверхности кислых фосфолипидов (дипальмитоилфосфатидилсерин, дипальмитоилфосфатидилглицерол, дипальмитоилфосфатидная кислота) и не оказывает влияния на нейтральные фосфолипиды (дипальмитоилфосфатидилхолин и дипальмитоилфосфатидилэтаноламин). Так как одновалентные катионы Li^+ , K^+ , Na^+ , Rb^+ и Cs^+ не оказывают аналогичного влияния на кислые фосфолипиды, можно полагать, что наблюдаемый эффект положительно заряженного ХПР обусловлен взаимодействием его молекул и с ацильными цепями липидов [253]. В работе [476] установлено, что преимущественные места связывания для ХПР во внутреннем монослое мембраны обеспечивают полифосфоинозитиды.

Амфифильные вещества, в частности ХПР, снижают температуру перехода фосфолипидов, и этот эффект более выражен в случае кислого фосфатидилглицерина по сравнению с нейтральным фосфатидилхолином. Способность амфифилов разжижать мембрану коррелирует с увеличением их коэффициента распределения в системе октанол-вода [319].

По-видимому, распределение катионных амфифильных соединений во внутренний монослой эритроцитарной мембраны, который обогащен кислыми фосфолипидами [46], осуществляется в значительной степени по электростатическому механизму. Кроме того, положительно заряженные амфифильные молекулы могут взаимодействовать с белками цитоскелета [406].

Встраивание амфифильных молекул в значительной степени зависит от состояния монослоя липидного бислоя. Если встраивание ХПР в монослой из ненасыщенного диолеилфосфатидилсерина незначительно, то в монослой из насыщенного дистеароилфосфатидилсерина – максимально [208].

При изучении взаимодействия ХПР с лентгмюровскими монослоями цвиттерионного дипальмитоилфосфатидилхолином и анионного дипальмитоилфосфатидилглицеролом показано [443], что нейтральный ХПР преимущественно найден в области гидрофобных хвостов, в то время как протонированная форма ХПР локализована на поверхности раздела липид-вода. Специфические взаимодействия (водородные связи) между протонированной формой ХПР и головными группами фосфолипидов найдены как для цвиттерионных, так и анионных монослоев.

При изучении связывания положительно заряженного ХПР с фосфолипидными монослоями показано предпочтительное накопление вещества вблизи температуры перехода соответствующего липида [235].

Введение холестерина в состав липидных мембран, состоящих из чистого фосфатидилхолина и смеси фосфатидилхолин : фосфатидилсерин (9:1), значительно снижает сродство ХПР к бислою с точки зрения количества ХПР, ассоциированного с мембраной, и энтальпии взаимодействия [352]

Неионные, катионные и анионные амфифилы расширяют монослой, состоящий из ФС и ФХ, в большей степени (в 1,7–2,4 раза) и с более высокой начальной скоростью (в 1,7–20,4 раза), чем монослой из ФХ [236]. Авторы работы предполагают, что встраивание амфифилов в монослой регулируется, с одной стороны, гидрофобными взаимодействиями, а с другой – зависит от упаковки монослоя, модулируемой взаимодействиями между головными группами фосфолипидов и насыщенностью алкильных цепей.

Исходя из того, что в модельных экспериментах показана зависимость распределения амфифильных соединений как от вида фосфолипида [236], так и от его состояния, степени насыщенности жирнокислотных цепей и взаимодействиями между головными группами фосфолипидов [208, 235, 352], то естественно допустить гетерогенность распределения молекул амфифильных веществ в латеральной плоскости плазматической мембраны эритроцитов млекопитающих. Это может

лежать в основе различной эффективности амфифила (эффективная концентрация и антигемолитическая активность) при использовании эритроцитов разных видов млекопитающих, мембраны которых характеризуются качественно-количественными различиями по липидному составу [419, 526].

Амфифильные соединения, которые являются стоматоцитогенными, и эхиноцитогенными, проявляют высокую антигемолитическую активность в условиях температурно-осмотического стресса эритроцитов млекопитающих (табл. 5.1–5.3). Это позволяет сделать вывод о том, что эффективность амфифильных веществ не определяется характером трансформации клеток (дискоцит-стоматоцит и дискоцит-эхиноцит) и, следовательно, не зависит от особенностей трансмембранного распределения амфифильных молекул.

В основе проявления антигемолитической активности амфифильных соединений, по-видимому, лежит их способность пертурбировать (разупорядочивать) эритроцитарную мембрану, что препятствует трансмембранному дефекту, образовавшемуся или активированному под влиянием повышенной осмоляльности среды, развиваться до размера гемолитической поры. Характер и сила пертурбации зависит как от физико-химических свойств амфифильных соединений, так и особенностей и состояния эритроцитарной мембраны. Поэтому любое воздействие на мембрану, которое стабилизирует ее структуру, приводит к снижению антигемолитической активности амфифила [74, 123, 124, 191].

В условиях ГШ эритроцитов при 0°C наблюдается снижение эффективности амфифильных соединений, что проявляется в уменьшении как антигемолитической активности, так и эффективных концентраций вещества (табл. 5.1–5.2). Это обусловлено уплотнением структуры мембраны под действием околонулевых температур [16], что в значительной степени ограничивает возможность амфифильных соединений при встраивании в такую модифицированную температурой мембрану, пертурбировать ее.

При изучении влияния температуры в диапазоне 5–20°C на уровень

гипертонического гемолиза эритроцитов человека в присутствии алкилглюкопиранозидов с длиной алкильной цепи 6, 8 и 10 углеродных атомов температурная зависимость была выявлена только для короткоцепочечного глюкопиранозида в отличие от длинноцепочечных [501]. Это возможно связано с высокой способностью октил- и децилглюкопиранозидов возмущать структуру мембраны при встраивании в нее как при 20, так и 5°C. Снижение эффективности указанных веществ с уменьшением температуры литической среды наблюдается в случае дополнительной обработки клеток фенилгидразином [501], эффект которого реализуется на уровне цитоскелета [387].

Обработка эритроцитов млекопитающих диамидом, фенилгидразином и инкубирование клеток при температуре 49°C в значительной степени снижают эффективность амфифильных веществ в условиях ГК и ГШ (даже при 37°C) [74, 124, 140, 191, 501]. Методом ЭПР спектроскопии показано, что данные модификаторы изменяют параметры динамической структуры мембраны, в частности ее текучесть [123, 289]. Можно предположить, что одной из причин отмеченного снижения антигемолитической активности амфифилов в условиях температурно-осмотического стресса эритроцитов является взаимодействие амфифильных веществ с мембраной, имеющей дефекты упаковки ее компонентов.

5.3. Возможный механизм коррекции осмотической и температурной чувствительности эритроцитов с помощью амфифильных соединений

5.3.1. Оценка роли белковых компонентов мембраны в реализации антигемолитического эффекта трифторперазина. Эффективность амфифильных соединений в условиях температурно-осмотического стресса эритроцитов может определяться скоростью встраивания их молекул в клеточную мембрану, что, в свою очередь, возможно, зависит

от величины поверхностного заряда эритроцита. Этот эффект будет более выраженным для положительно заряженных амфифильных соединений, так как гликокаликс эритроцитов характеризуется отрицательным зарядом, обусловленным сиаловыми кислотами, входящими в его состав.

Для изучения роли поверхностного заряда эритроцита в проявлении АГ активности амфифильных соединений при гипертоническом стрессе клеток использовали, с одной стороны, катионный ТФП, характеризующийся высокой эффективностью, и ферментативный подход, позволяющий удалять сиаловые кислоты эритроцитарной мембраны с помощью нейраминидазы – фермента, относящегося к подклассу гликозил-гидролаз. Ферментативное десиалирование таких субстратов, где сиаловые кислоты занимают терминальное положение в полимере, приводит к изменению их свойств, сопровождается нарушением основных функций. В частности, при уменьшении поверхностного заряда эритроцитов кролика после обработки нейраминидазой показано снижение деформируемости и индекса ориентации клеток [340].

После обработки эритроцитов нейраминидазой клетки переносили в раствор, содержащий 4,0 моль/л NaCl при 37°C. Следует отметить, что сама по себе ферментативная обработка клеток не приводит к гемолитическому повреждению (не более 1,5%), хотя в указанных экспериментальных условиях происходит освобождение сиаловых кислот на уровне 3,5 мкмоль/мл упакованных клеток [239]. Полученные данные свидетельствуют, что уровень гипертонического гемолиза клеток, обработанных нейраминидазой ($84 \pm 6\%$), не отличается от величины лизиса эритроцитов, несущих поверхностный заряд ($82 \pm 5\%$). Исследования, проведенные на нативных клетках и эритроцитах, частично лишенных гликокаликса, не выявили различий и в величинах антигемолитической активности ТФП (3×10^{-5} моль/л) при гипертоническом стрессе ($90 \pm 4\%$ и $91 \pm 6\%$ соответственно) (рис. 5.13).

Следовательно, уменьшение поверхностного заряда эритроцитов в результате обработки клеток нейраминидазой не оказывает влияния на проявление антигемолитической активности положительно заряженного ТФП в условиях ГШ эритроцитов при 37°C.

Клетки, лишенные сиаловых кислот, сохраняют способность к изменению формы под действием амфифильных соединений и по характеру трансформации не отличаются от контрольных эритроцитов [424]. Авторы этой работы полагают, что электрический потенциал, обусловленный сиаловыми кислотами на поверхности бислая, очень мал по сравнению с z-потенциалом клетки.

При изучении эффективности ХПР в условиях гипотонического лизиса эритроцитов авторами работы [239] установлена зависимость антигемолитической активности амфифила от состояния гликокаликса клеточной мембраны, что проявляется в снижении защитного эффекта вещества в результате ферментативной обработки клеток. Однако в условиях гипертонического шока эритроцитов не выявлено изменения антигемолитической активности ТФП, что позволяет полагать, что гликокаликс не вовлекается в механизм, ответственный за встраивание амфифила в клеточную мембрану и ее пертурбацию.

О способности ХПР взаимодействовать с белковыми компонентами эритроцитов сообщалось в работах [406, 459]. Результаты, изложенные в подглаве 5.1, позволили сделать вывод о том, что антигемолитическая активность амфифильного соединения не связана с его способностью влиять на кальмодулин, относящийся к цитозольным белкам. Представляло интерес исследовать роль белковых компонентов эритроцитарной мембраны в развитии гипертонического повреждения клеток и в реализации защитного действия амфифильных веществ.

Для этого эритроциты обрабатывали ферментами (трипсин, проназа, папаин), которые модифицируют белковые компоненты плазматической

мембраны, а затем клетки подвергали действию гипертонического шока при их перенесении в 4,0 моль/л NaCl.

Используемые в работе ферменты являются представителями подкласса пептидгидролаз. Их особенностью является выборочный, селективный характер действия на пептидные связи в белковой молекуле. Трипсин, являясь высокоспецифичным ферментом, действует только на связь между аргинином и лизином, специфичность папаина гораздо ниже: он гидролизует пептидные связи, соседние с гидрофобными аминокислотными остатками [149].

Обработка эритроцитов протеолитическими ферментами приводит к незначительному изменению чувствительности клеток к ГШ (на уровне 5–7%) при 37°C. В работе [60] в сравнительном аспекте изучено влияние температуры на развитие гипертонического шока эритроцитов, модифицированных трипсином, проназой и папаином. Если при 0°C отмечается существенное снижение гипертонического гемолиза (в 1,6 раза), то при 37°C эффект протеолитической обработки фактически не проявляется [60]. Это свидетельствует о значительно меньшем значении состояния мембранных гликопротеинов в гипертонической чувствительности эритроцитов, у которых текучесть липидного бислоя достаточно высока (при 37°C). В работе [59] отмечается значительное снижение чувствительности к холодовому шоку клеток, обработанных проназой, в отличие от эритроцитов, модифицированных трипсином или папаином. Авторы связывают полученные результаты со степенью модификации белка полосы 3 протеолитическими ферментами. Чувствительность эритроцитов к действию высокого давления повышается в результате обработки клеток трипсином и нейраминидазой [290], в то время как при гипотоническом [239] и гипертоническом шоке ферментативная обработка клеток не сопровождается повышением уровня гемолитического повреждения эритроцитов.

ТФП проявляет высокую антигемолитическую активность при ГШ контрольных клеток при 37°C (рис. 5.13) Оценка эффективности ТФП в условиях ГШ эритроцитов, обработанных ферментами, показала отсутствие статистически значимых различий от контрольных величин антигемолитической активности ТФП.

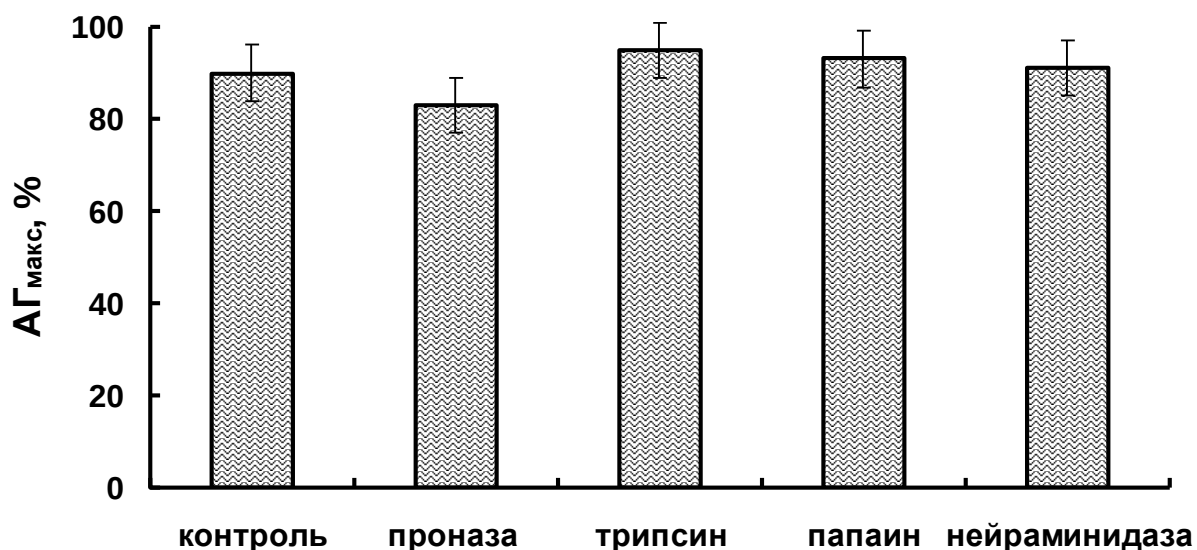


Рис. 5.13. Влияние протеолитических ферментов и нейраминидазы на значение антигемолитической активности трифторперазина ($4,5 \times 10^{-5}$ моль/л) в условиях гипертонического шока эритроцитов человека (4,0 моль/л NaCl, 37°C).

Папаин нарушает первичную структуру белка полосы 3 эритроцитов человека, отщепляя от него небольшие фрагменты, что сопровождается ингибированием его транспортной функции анионов [348, 349]. Проназа и папаин оказывают влияние на холинэстеразу, разделяя ее гидрофобный и гидрофильный фрагменты [288]. Трипсин не нарушает

целостность белка полосы 3, однако влияет на гликопротеины и гликолипиды, в результате чего отщепляются сиаловые кислоты [239].

Таким образом, после обработки эритроцитов протеолитическими ферментами (трипсин, проназа, папаин), которые существенно различаются по характеру действия на мембранные белки, реакция эритроцитов на перенесение в гипертоническую среду, а также на действие ТФП весьма схожа (табл. 5.6). Следовательно, есть основания полагать, что особенности гипертонической чувствительности эритроцитов с модифицированными белковыми компонентами обусловлены неспецифическим действием протеолитических ферментов на клетки.

Кроме того, обращает на себя внимание тот факт, что эффективность амфифильного соединения практически не изменяется при ГШ клеток, обработанных протеолитическим ферментами, по сравнению с контрольными эритроцитами. Это позволяет делать вывод о незначительной роли мембранных белков, которые подвергались протеолизу, в механизме защитного действия ТФП.

5.3.2. Влияние хлорпромазина на распределение фосфатидилсерина в эритроцитарной мембране. Растворимые амфифилы, как известно, оказывают целый ряд структурных и динамических эффектов на мембраны, даже в концентрациях ниже тех, которые вызывают ее солюбилизацию [283, 346, 359]. Амфифильные соединения ускоряют трансбислойное движение фосфолипидов в модельных [283, 351, 512] и эритроцитарных мембранах [338, 359, 430, 495].

При изучении влияния анестетиков и производных гексана с различными полярными головными группами на медленное пассивное трансбислойное движение флуоресцентно-меченого фосфатидилхолина в эритроцитарных мембранах человека было установлено [427], что неполярный гексан, который в основном распределяется в гидрофобную часть

мембраны, гораздо менее эффективен и для того, чтобы он вызвал ускорение «флип»-перехода фосфатидилхолина, его следует использовать в весьма высоких концентрациях. Авторы сделали вывод, что для ускорения «флипа» фосфолипидных молекул необходима локализация амфифильного соединения на границе раздела липид/вода.

В работе [430] изучали влияние амфифильных соединений, относящихся к различным классам, на трансбислойное движение фосфолипидов в эритроцитарных мембранах, в частности оценивали скорость движения фосфатидилхолина, меченного флуорофором (7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole-4-yl (NBD)), из внешнего во внутренний монослой эритроцитарной мембраны («флип»-процесс). Авторы показали, что нейтральные, цвиттерионные, анионные и катионные детергенты с различной длиной алкильных цепей (C6–C14) при использовании в антигемолитических концентрациях ускоряют медленное, не опосредованное «флип»-движение NBD-меченого фосфатидилхолина.

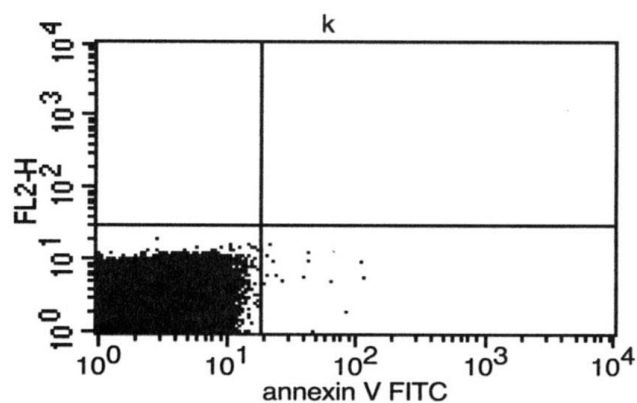
Так как амфифилы не снижают высокой температурной зависимости процесса «флипа», то исследователи [430] полагают, что амфифил-индуцированный «флип» обусловлен увеличением возможности формирования транзитных гидрофобных структурных дефектов в мембранном барьере, которые могут быть результатом пертурбации межфазной области бислоя при встраивании молекул детергента. Ранее было предположено, что барьерные дефекты в нативных и пертурбированных мембранах, которые действуют как пути утечки и сайты «флипа», являются результатом образования флуктуирующих гидрофобных пор [285].

Исходя из физико-химических свойств молекулы ХПР, в которой достаточно сбалансированы гидрофобная и гидрофильная части, и учитывая данные о распределении указанного амфифила и его локализации в эритроцитарной мембране, представляло интерес изучить степень асимметрии мембраны, обработанной ХПР.

Оценка степени нарушения асимметрии мембраны основана на определении экспрессии на поверхности клеток фосфатидилсерина, который является маркерным фосфолипидом внутреннего монослоя липидного бислоя. С этой целью используют Ca^{2+} -зависимый белок аннексин V (молекулярная масса 35-36 кДа), который обладает высоким сродством к фосфатидилсерину [299]. Аннексин V, конъюгированный с флуорохромом флюоресцеинизотиоционатом (аннексин V-ФИТЦ), сохраняет высокое сродство к данному фосфолипиду и таким образом используется как чувствительная метка для анализа клеток с нарушенной асимметрией мембраны методом проточной цитофлуориметрии.

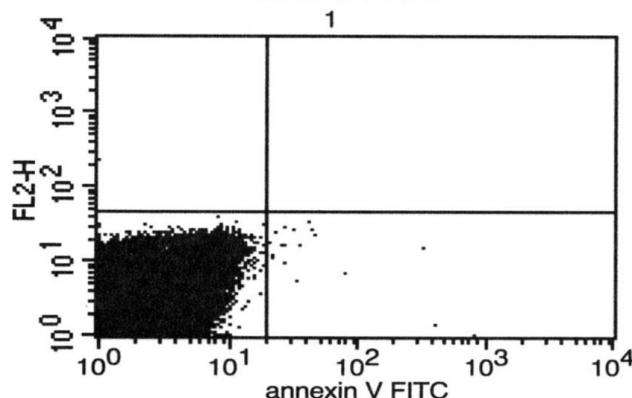
Эритроциты человека инкубировали в физиологическом растворе (конечный гематокрит 0,4%) с хлорпромазином (100, 200 и 300 мкмоль/л) при 37°C в течение 10 мин. Затем осадок эритроцитов, полученный в результате центрифугирования, анализировали методом проточной цитофлуориметрии

Проведенные нами исследования эритроцитов человека методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексина V – белка, который имеет высокое сродство к ФС и связывается с клетками, экспрессирующими его только на наружной поверхности мембраны, показали, что содержание нативных (контрольных) эритроцитов, связавших аннексин V, составляет 0,01% (рис. 5.14). В том случае, когда клетки были проинкубированы с ХПР (в концентрации от 50 до 300 ммоль/л), содержание позитивно меченых клеток практически не изменяется и составляет 0,02–0,03%. Это свидетельствует о том, что в присутствии ХПР в выше указанных концентрациях и при 10 минутном инкубировании сохраняется



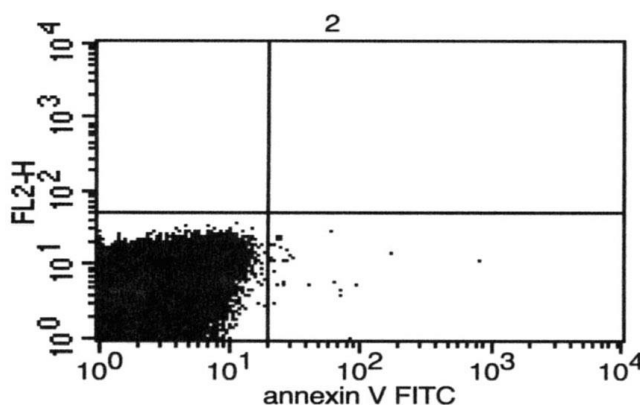
Total Events: 100000
X Parameter: annexin V FITC (Log)
Y Parameter: FL2-H (Log)

Quad	Events	% Total
UL	0	0.00
UR	0	0.00
LL	99986	99.99
LR	14	0.01



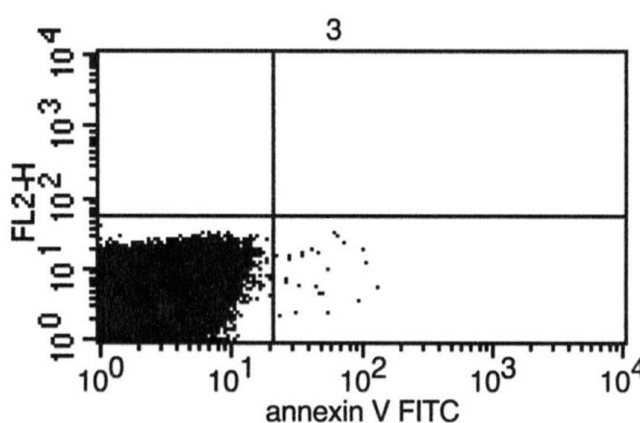
Total Events: 100000
X Parameter: annexin V FITC (Log)
Y Parameter: FL2-H (Log)

Quad	Events	% Total
UL	0	0.00
UR	0	0.00
LL	99978	99.98
LR	22	0.02



Total Events: 100000
X Parameter: annexin V FITC (Log)
Y Parameter: FL2-H (Log)

Quad	Events	% Total
UL	0	0.00
UR	0	0.00
LL	99972	99.97
LR	28	0.03



Total Events: 100000
X Parameter: annexin V FITC (Log)
Y Parameter: FL2-H (Log)

Quad	Events	% Total
UL	0	0.00
UR	0	0.00
LL	99972	99.97
LR	28	0.03

Рис. 5.14. Цитограмма эритроцитов человека после обработки хлорпромазином (по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции аннексинV-ФИТЦ в относительных единицах): k – контроль; 1, 2 и 3 – хлорпромазин в концентрации 50, 100 и 300 μ моль/л соответственно. Приведены данные одного из трех экспериментов.

асимметричное распределение фосфатидилсерина в эритроцитарной мембране.

Полученные результаты согласуются с данными исследования Hagerstrand с соавт. [211]. В указанной работе было установлено, что положительно заряженные амфифильные соединения в отличие от амфифилов, относящихся к классам неионных и отрицательно заряженных, не вызывают нарушения асимметрии эритроцитарной мембраны при использовании ингибитора аминоксфополипидтранслоказы (N-этилмалеимид).

С другой стороны, авторы работ Lang с соавт. [495 338] сообщили, что хлорпромазин вызывает эриптоз эритроцитов как мыши, так и человека. Так как целью этой работы было установление эриптозных изменений клеток, которые развиваются при продолжительном инкубировании эритроцитов, клетки выдерживали с хлорпромазином в течение 48 час. За это время экспонирование фосфатидилсерина на внешней поверхности даже контрольных клеток значительно увеличивалось (примерно в 4–5 раз). Целью нашей работы было изучение состояния мембраны при действии ХПР в тех же концентрациях и при тех же временных интервалах, при которых амфифил способен защищать клетку от осмотического стресса. Поэтому продолжительность инкубирования эритроцитов с ХПР составляла 10 мин и выбранный клеточный гематокрит соответствовал таковому, как и в экспериментах по коррекции осмотического и температурного шока эритроцитов человека.

Таким образом, хлорпромазин при использовании в концентрации 50–300 мкмоль/л в условиях непродолжительного инкубирования с эритроцитами человека не вызывает трансбислойного перераспределения фосфатидилсерина.

5.3.3. Влияние амфифильных соединений разных классов на структурно-динамическое состояние мембран эритроцитов. Способность биологической мембраны выполнять многообразные функции обусловлена ее динамической структурой. Структурно-динамические свойства мембраны могут изменяться при действии физико-химических факторов внешней среды [46]. В частности, изменение температуры и осмолярности внеклеточного раствора приводит к модификации динамических свойств плазматической мембраны [171].

Эффекты исследуемых амфифильных соединений в условиях температурно-осмотического стресса эритроцитов млекопитающих (табл. 5.1–5.3) реализуются, в первую очередь, на уровне плазматической мембраны. В пользу этого свидетельствует и данные о трансформация клеток под действием этих веществ (рис. 5.9–5.12). Можно полагать, что проявление антигемолитического эффекта будет определяться структурно-динамическим состоянием эритроцитарной мембраны.

Методом ЭПР спектроскопии с использованием спиновых зондов исследовали динамическую структуру мембраны эритроцитов человека при действии амфифильных соединений, обладающих антигемолитической активностью. Для данного исследования были выбраны мицеллообразующие амфифильные вещества, обладающие высокой антигемолитической активностью и являющиеся представителями различных классов: катионный ХПР, неионный ДМ и анионный С12.

Обработку клеток амфифильными соединениями осуществляли инкубированием клеток в физиологическом растворе, содержащем амфифил, при температуре 37°C. Концентрации веществ соответствовали их оптимальным антигемолитическим концентрациям при гипертоническом гемолизе эритроцитов с учетом гематокрита (табл. 5.1)

Исследование структурно-функционального состояния мембран эритроцитов проводили с помощью спин-меченых жирных кислот, содержащих нитроксильные фрагменты в различных положениях вдоль

гидрофобной цепи: амида пальмитиновой кислоты (АПК), 5-доксилстеариновой кислоты (5-ДС) и 16-доксилстеариновой кислоты (16-ДС). Зонд АПК, меченный в первом положении вдоль углеродной цепи, является удобным инструментом для изучения состояния полярной поверхности мембраны. Зонды 5-ДС и 16-ДС дают информацию о структуре гидратированной анизотропной зоны мембраны (на расстоянии около $10 \text{ \AA}$ от поверхности) и более гидрофобной области (удаленной от поверхности мембраны на расстояние около $20 \text{ \AA}$) соответственно. Использование такого набора зондов позволило изучить параметры микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов в трансмембранном направлении.

Типичные спектры ЭПР зондов АПК, 5-ДС и 16-ДС в мембране эритроцитов при 20°C представлены на рис. 5.15. Спектры ЭПР зондов

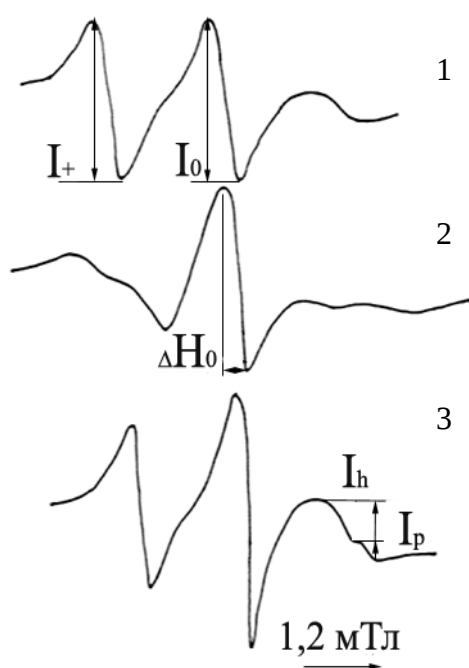


Рис. 5.15. Спектры ЭПР спин-меченых жирных кислот в мембране эритроцитов: 1 – амид пальмитиновой кислоты, 2 – 5-доксилстеариновая кислота, 3 – 16-доксилстеариновая кислота.

АПК и 16-ДС свидетельствуют о сравнительно быстром вращении нитроксидов на поверхности и в гидрофобной зоне бислоя, в то время как спектр ЭПР зонда 5-ДС отражает существенно анизотропное вращение радикала. Кроме того, спектр ЭПР зонда 16-ДС демонстрирует суперпозицию сигналов в высоком поле (наложение сигналов от зондов, находящихся в различных микроокружениях), что свидетельствует о локализации нитроксидов в микроокружениях с различной полярностью. Параметр перераспределения зонда в этих микрообластях, вычисляемый по отношению интенсивностей «гидрофобного» и «полярного» сигналов (I_h/I_p рис. 5.15) может служить характеристикой динамической структуры мембраны. При использовании одинаковых концентраций эритроцитов во всех экспериментах эмпирический параметр встраивания (диффузии) зонда в мембрану, пропорциональный интенсивности «гидрофобного» сигнала ЭПР, зависит от состояния липидных областей, сорбирующих молекулы зонда.

В табл. 5.6 представлены значения параметров зондов АПК, 5-ДС и 16-ДС в мембранах эритроцитов, обработанных амфифильными веществами. Исследование влияния амфифилов на липидный бислой мембран с использованием зонда АПК показало, что все вещества значительно уменьшают частоту вращательной подвижности спинового зонда, что свидетельствует об увеличении микровязкости водно-липидной поверхности мембраны. Максимальным действием характеризуется неионный ДМ.

Тенденция увеличения значения параметра ΔH_0 , соответствующая снижению частоты вращения нитроксильного радикала зонда 5-ДС, наблюдается для эритроцитов, проинкубированных с ДМ. Увеличение микровязкости в анизотропной зоне мембраны может объясняться проникновением двух гексозных циклов молекул ДМ в область глицериновых остатков молекул фосфолипидов

Таблица 5.6

Параметры вращательной подвижности зондов АПК и 16-ДС (ν_+), зонда 5-ДС (ΔH_0) и параметр распределения зонда 16-ДС (I_h/I_p) в мембране эритроцитов, обработанных амфифильными веществами (Me, Q1–Q3, $n = 7$).

Зонд Параметр		Амфифильные вещества			
		Контроль	ДМ	С12	ХПР
АПК	$\nu_+ \times 10^{-8}, \text{с}^{-1}$	7,92 (7,65–8,32)	5,66 * (5,34–6,10)	6,76 * (6,11–7,05)	6,02 * (5,61–7,00)
5-ДС	$\Delta H_0, \text{Г}$	3,51 (3,32–3,85)	3,77 (3,57–3,94)	3,38 (3,26–4,05)	3,64 (3,35–4,25)
16-ДС	I_h/I_p	3,0 (2,2–3,7)	2,8 (2,0–3,9)	2,2 (1,7–3,3)	4,6 * (3,4–5,0)
	$\nu_+ \times 10^{-8}, \text{с}^{-1}$	4,98 (4,40–5,93)	4,18 * (3,68–4,78)	4,52 * (3,95–5,12)	5,38 * (5,06–6,12)

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с показателями контрольных клеток ($p < 0,05$)

Величины частоты вращательной подвижности нитроксильного радикала зонда 16-ДС (табл. 5.6) свидетельствуют об увеличении микровязкости гидрофобной зоны мембраны под действием ДМ и С12. Принимая во внимание строение молекулы ДМ (см рис. 5.5), иммобилизацию водно-липидной поверхности можно объяснить стабилизацией структуры при образовании водородных связей между полярными «головами» фосфолипидов и гидроксильными группами гексозных циклов амфифильной молекулы. Гидрофобная часть ДМ, насчитывающая 12 углеродных атомов, обеспечивает, по-видимому, эффективное встраивание вещества в бислой. Это подтверждается близким эффектом (увеличение микровязкости по сравнению с контролем) в гидрофобной зоне эритроцитарной мембраны алкилсульфата С12, длина углеводородного «хвоста» которого 12 углеродных атомов (табл. 5.6).

При исследовании влияния амфифилов на перераспределение молекул зонда 16-ДС (I_h/I_p) в бислое мембран эритроцитов (табл. 5.6) обнаружено, что наиболее заметное действие оказывают молекулы ХПР, что проявляется в практически полном исчезновении сигнала от зонда в полярном микроокружении.

В отличие от ДМ и С12, выявленные особенности влияния ХПР на гидрофобные области мембраны (параметры динамической структуры и физико-химическое состояние эритроцитарных мембран) могут быть связаны со способностью ХПР при встраивании в мембрану пересекать ее и распределяться во внутреннем монослое [101].

Таким образом, показана способность амфифильных веществ изменять структурно-динамическое состояние эритроцитарной мембраны, что отражает неспецифическое нарушение баланса гидрофильно-гидрофобных взаимодействий и, как результат, возможное изменение упаковки липидов в латеральном и трансмембранном направлениях.

5.3.4. Исследование состояния липидного бислоя и барьерных свойств мембран эритроцитов в присутствии хлорпромазина. Эффект ХПР на биологические мембраны зависит от концентрации амфифила. Вместе с тем имеются лишь единичные данные о характере изменений структурно-динамического состояния и функции мембран при действии ХПР в широком концентрационном интервале. Можно предположить, что бимодальное влияние ХПР на клетки (способность вещества защищать клетки в условиях стресса или оказывать литический эффект в зависимости от концентрации ХПР) вызвано изменением характера модификации мембраны при увеличении концентрации вещества [283, 471].

Особенности структурно-динамического состояния эритроцитарной мембраны при действии хлорпромазина в широком концентрационном диапазоне (50–700 мкмоль/л) исследовали с помощью метода ЭПР

спектроскопии с использованием 16-доксилстеариновой кислоты (16-ДС) и 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксила (ТЕМПОН).

Анализ ЭПР спектров липидных зондов в биомембранах требует учета параметров, отражающих частоту и амплитуду движения нитроксильного фрагмента зонда. Параметр анизотропии спектров ЭПР спин-меченных жирных кислот, пропорциональный отношению частот вращения радикала, рассчитанных по разным компонентам спектра (ν_- и ν_+), связан с несферичностью вращения радикала и отражает различие частот вращательной подвижности зонда вокруг оси симметрии молекулы и перпендикулярных к ней направлений [104]. Вследствие параллельной ориентации главной оси нитроксильного фрагмента доксильных жирных кислот относительно оси симметрии молекулы, совпадающей с осью симметрии молекул фосфолипидов в бислое, параметр упорядоченности вращения характеризует анизотропию вращения радикала и, в определенной мере, отражает упорядоченность липидного микроокружения зонда [110]. Увеличение частоты вращения вокруг направлений, перпендикулярных оси симметрии фосфолипидов, или увеличение амплитуды движения (например, вследствие относительного увеличения гибкости сегментов жирнокислотных цепей) могут приводить к качественно подобным изменениям вида спектра ЭПР спин-меченных жирных кислот [110].

Эритроциты человека инкубировали в физиологическом растворе с разными концентрациями ХПР (50–700 мкмоль/л) при 37°C в течение 10 мин, причем инкубация не сопровождалась гемолизом эритроцитов. После этого методом ЭПР спиновых зондов была исследована структурно-динамическое состояние и барьерные свойства мембран эритроцитов.

Характеристики вращательной подвижности нитроксильного фрагмента липидного зонда 16-ДС (частоты вращательной подвижности и параметр анизотропии спектра зонда) в мембранах эритроцитов, обработанных ХПР, представлены на рис. 5.16 и 5.17. При небольших концентрациях ХПР (до 200 мкмоль/л) выявлены немонотонные зависимости

частоты вращательной подвижности зонда, рассчитанной по низкопольной компоненте спектра (ν_+) (рис. 5.16), и параметра анизотропии спектра (ϵ) (рис. 5.17). Высокопольный параметр вращения ν_- практически не изменялся при небольших концентрациях амфифила (см рис. 5.16). В присутствии 100 мкмоль/л ХПР уменьшение частоты вращательной подвижности (ν_+) зонда сопровождалось увеличением параметра анизотропии (рис. 5.16, 5.17). Скачкообразное изменение параметра анизотропии спектра 16-ДС отмечено в интервале концентраций 100–200 мкмоль/л ХПР (рис. 5.17), причем при 200 мкмоль/л выявлены увеличение низкопольного параметра ν_+ (рис. 5.16). Свыше этой концентрации наблюдалось резкое растормаживание вращения зонда вокруг различных осей (рис. 5.16), сопровождающееся уменьшением параметра анизотропии спектра (рис. 5.17).

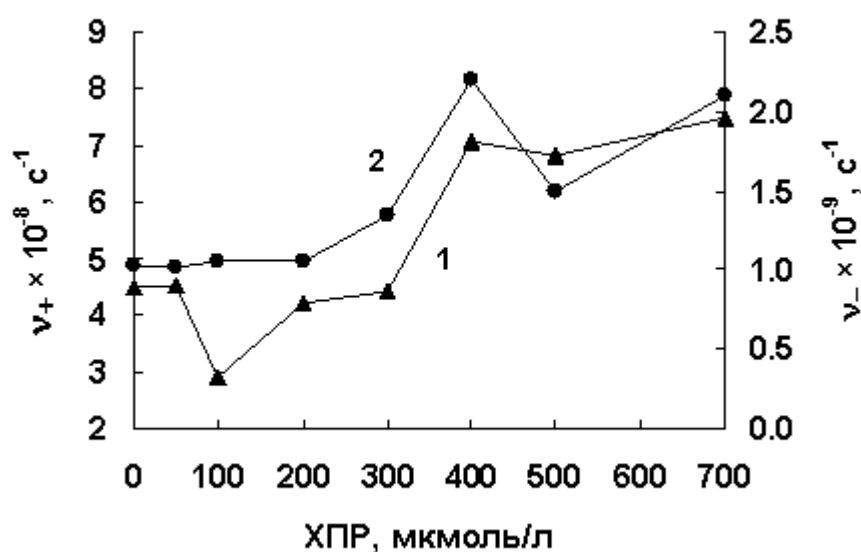


Рис. 5.16. Зависимость параметров вращательной подвижности зонда 16-ДС (5×10^{-5} моль/л) в мембране эритроцитов от концентрации хлорпромазина в суспензии клеток (10^9 кл/мл) при температуре 37°C: 1 – ν_+ ; 2 – ν_- .

Анализ вида спектров зонда 16-ДС в эритроцитарной мембране в присутствии ХПР показал, что при небольших концентрациях вещества (до 200 мкмоль/л) наблюдается немонокотное изменение интенсивности «гидрофобного» сигнала в спектре ЭПР. При концентрации ХПР 300 мкмоль/л и выше в суспензии клеток отмечено резкое уменьшение интенсивности «полярного» сигнала (до исчезновения), что свидетельствует об увеличении диффузии молекул зонда в мембрану и отражает видимое увеличение ее гидрофобной емкости.

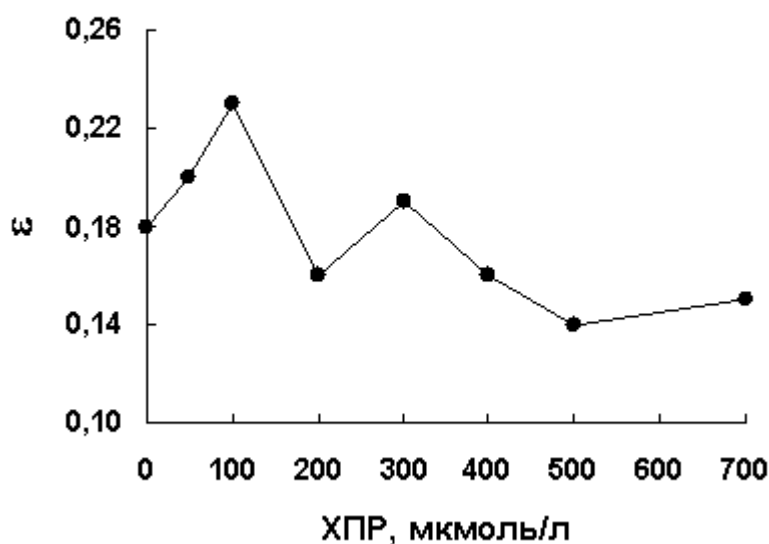


Рис. 5.17. Влияние различных концентраций хлорпромазина на параметр анизотропии спектра ЭПР зонда 16-ДС (5×10^{-5} моль/л) в мембране эритроцитов (10^9 кл/мл) при температуре 37°C.

Для оценки состояния барьерных свойств эритроцитарных мембран в присутствии ХПР использовали водорастворимый зонд ТЕМПОН и феррицианид калия, которые при эмпирически подобранных концентрациях [412] позволяют регистрировать сигнал только от зондов, находящихся в

клетках (рис. 5.18). Трансформация спектра зонда ТЕМПОН (уменьшение интенсивности и уширение компонент вплоть до исчезновения) зависит от доступности внутриклеточных зондов для ионов феррицианида [99, 412], что может характеризовать степень повреждения мембран.

На рис. 5.18 представлены зависимости параметров, характеризующих интенсивность $\ln(h_K/h_{ХПР})$ и ширину $\ln(\Delta H_{OK}/\Delta H_{OXПР})$ центральной компоненты спектра ЭПР зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов человека, от концентрации ХПР.

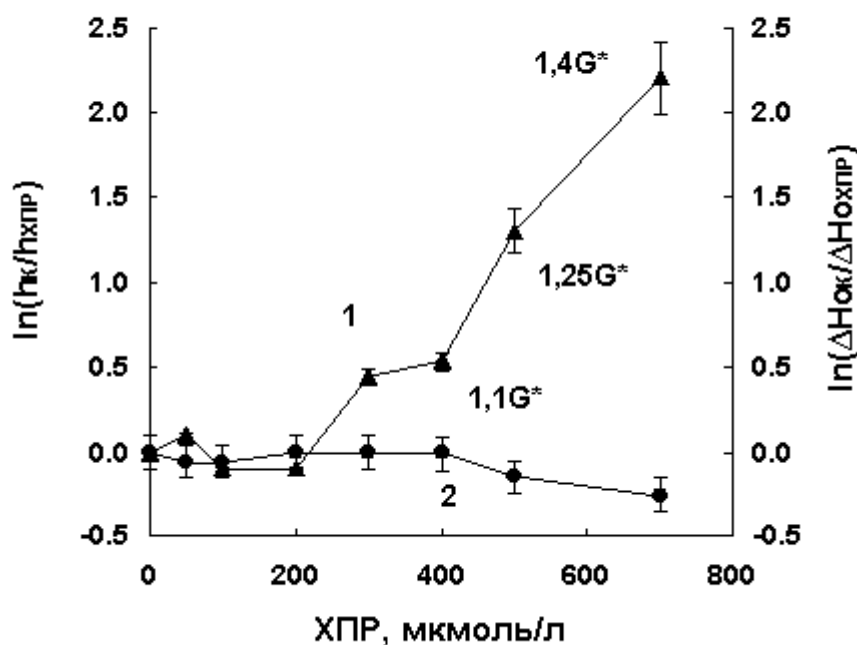


Рис. 5.18. Относительные изменения интенсивности $h_K / h_{ХПР}$ (1) и ширины $\Delta H_{OK}/\Delta H_{OXПР}$ (2) центральной компоненты спектра ЭПР зонда ТЕМПОН (1 ммоль/л) в цитоплазме эритроцитов (10^9 кл/мл) в присутствии ионов феррицианида калия (0,1 моль/л) в зависимости от концентрации хлорпромазина при температуре 37°C.

Примечание. * – значения ширины спектра.

Характер изменения указанных зависимостей параметров позволяет выделить два концентрационных диапазона ХПР: 50–200 мкмоль/л и 300–700 мкмоль/л. В первом диапазоне концентраций ХПР не регистрируется изменения значений выше указанных параметров, во втором – наблюдается резкое изменение параметра интенсивности при постепенно изменяющемся параметре ширины. В последнем случае резкое уменьшение интенсивности остаточного сигнала ЭПР зонда ТЕМПОН и нарастающее уширение триплета (рис. 5.18) свидетельствует о нарушении проницаемости эритроцитарных мембран по отношению к ионам феррицианида.

Таким образом, при возрастании концентрации хлорпромазина в диапазоне от 300 до 700 мкмоль/л происходит концентрационно-зависимое увеличение проницаемости мембран эритроцитов для внеклеточных ионов феррицианида.

Полученные в работе данные позволяют выделить интервалы концентраций ХПР, в которых мембраны претерпевают обратимые и деструктивные изменения. При низких концентрациях ХПР (до 300 мкмоль/л) изменения динамической структуры мембран регистрируются при сохранении их целостности. При более высоких концентрациях вещества структурные перестройки мембраны сопровождаются нарушением ее барьерных свойств. Эти результаты позволяют предположить различный характер модификации динамической структуры эритроцитарных мембран в зависимости от концентрации ХПР.

Особенности изменений динамической структуры мембраны, вызываемые высокими концентрациями ХПР, были исследованы с применением зонда 16-ДС и парамагнитных ионов феррицианида, не проникающих через мембрану. При этом мы исходили из предположения, что нарушение барьерной функции мембран по отношению к внеклеточным ионам феррицианида связано со значительным нарушением упаковки

липидов, что может быть зарегистрировано по увеличению доступности липидного зонда 16-ДС для ионов феррицианида.

Установлено, что введение феррицианида калия в суспензию клеток, обработанных ХПР, оказывает влияние на параметры вращательной подвижности зонда 16-ДС в эритроцитарных мембранах, рассчитанные по разным компонентам спектра (рис. 5.16, 5.19). Так, в присутствии ионов феррицианида наблюдается разнонаправленное изменение значений параметров вращения при 500 и 700 мкмоль/л ХПР.

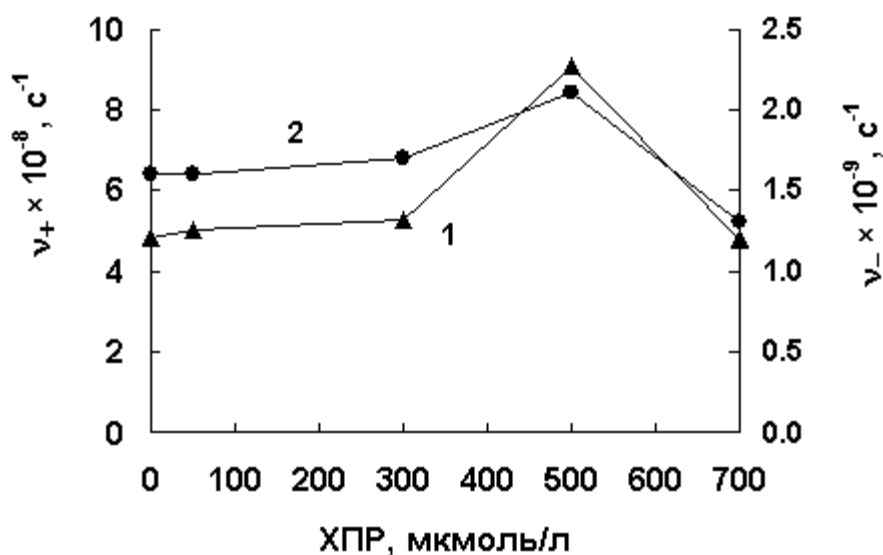


Рис. 5.19. Зависимость параметров вращательной подвижности зонда 16-ДС (5×10^{-5} моль/л) в мембране эритроцитов (10^9 кл/мл) от концентрации хлорпромазина в присутствии ионов феррицианида калия (0,1 моль/л) при температуре 37°C : 1 – ν_+ ; 2 – ν_- .

Данные рис. 5.19, 5.20 показывают, что в присутствии феррицианида повышение концентрации ХПР до 300 мкмоль/л не приводит к существенному изменению частоты вращения и величины параметра упорядоченности зонда в мембране, в то время как добавление

парамагнитных ионов в суспензию, содержащую 500 и 700 мкмоль/л ХПР, сопровождается различными эффектами. Последнее свидетельствует о разном характере структурных перестроек мембран эритроцитов, что определяет и разную реакцию эритроцитарных мембран на воздействие ХПР и ионов феррицианида.

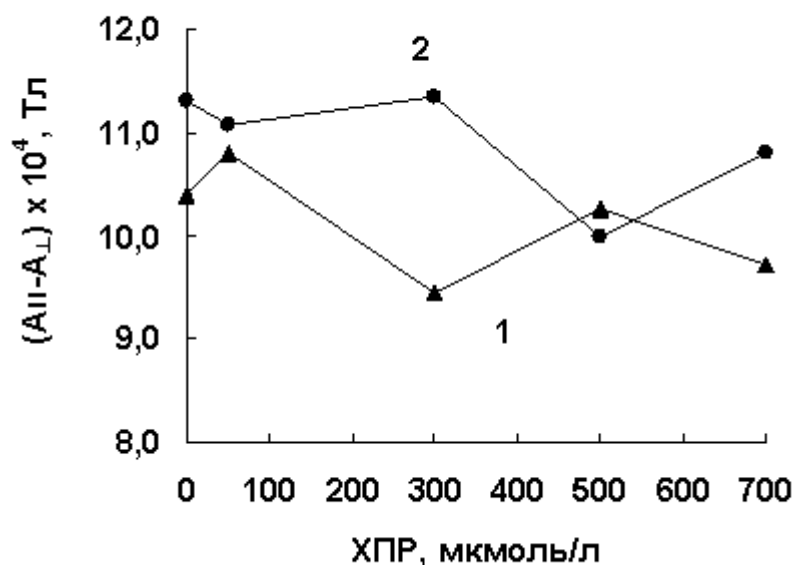


Рис. 5.20. Зависимость параметра упорядоченности зонда 16-ДС (5×10^{-5} моль/л) в мембране эритроцитов (10^9 кл/мл) от концентрации хлорпромазина при температуре 37°C : 1 – без феррицианида калия; 2 – в присутствии феррицианида калия (0,1 моль/л).

Доступность гидрофобной зоны мембран эритроцитов, модифицированных ХПР, для внеклеточных ионов феррицианида определяли по их влиянию на изменение ширины центральной компоненты спектра ЭПР липидного зонда 16-ДС (рис. 5.21). Дополнительное уширение компонент спектра спиновых зондов может быть обусловлено

взаимодействием нитроксидов при концентрировании зонда либо увеличением доступности нитроксидов для ионов феррицианида [99]. Видно, что величина данного параметра незначительно изменяется при повышении концентрации вещества до 500 мкмоль/л, причем введение ионов феррицианида практически не изменяет вид зависимости (рис. 5.21). Некоторое уширение спектра при действии 500 мкмоль/л ХПР без феррицианида может быть обусловлено динамическими эффектами (см рис. 5.16, 5.21). В присутствии 700 мкмоль/л ХПР и феррицианида калия обнаружены значительное уменьшение вращательной подвижности зонда 16-ДС (см. рис. 5.19) и уширение спектра (рис. 5.21).

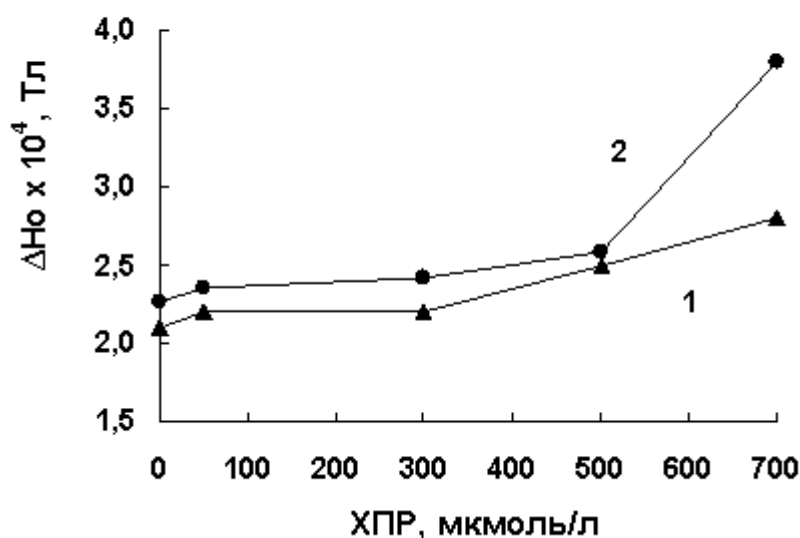


Рис. 5.21. Влияние хлорпромазина на ширину центральной компоненты спектра ЭПР зонда 16-ДС (5×10^{-5} моль/л) в мембране эритроцитов (10^9 кл/мл) при температуре 37°C: 1 – без феррицианида калия; 2 – в присутствии феррицианида калия (0,1 моль/л).

Таким образом, при действии ХПР (500 мкмоль/л) и ионов феррицианида наблюдаются резкое растормаживание вращения (см.рис. 5.19) и уменьшение параметра упорядоченности (рис. 5.20) при отсутствии дополнительного уширения (рис. 5.21) компонент спектра ЭПР зонда 16-ДС. Это свидетельствует о перестройке динамической структуры эритроцитарной мембраны, не приводящей, по-видимому, к увеличению взаимодействия нитроксидов или увеличению доступности нитроксидов для ионов феррицианида в гидрофобной зоне мембраны.

При максимальной концентрации ХПР (700 мкмоль/л) в присутствии ионов феррицианида отмечены значительное уменьшение подвижности (см рис. 5.19) и увеличение упорядоченности вращения радикальных фрагментов 16-ДС (см рис. 5.20) на фоне резкого уширения спектра (рис. 5.21). Сравнительный анализ изменения характеристик вращения липидного зонда в эритроцитарных мембранах (700 мкмоль/л ХПР) в присутствии феррицианида калия и без него свидетельствует о структурной перестройке мембраны, сопровождающейся, вероятнее всего, увеличением взаимодействия нитроксильных фрагментов зонда в гидрофобной зоне мембраны. Полученные данные дают основание полагать, что увеличение проницаемости всех мембран при действии высоких концентраций ХПР обусловлено структурной перестройкой эритроцитарных мембран, причем ее характер изменяется в зависимости от концентрации вещества.

Известно, что катионный амфифил ХПР практически мгновенно встраивается в мембраны эритроцитов, вызывая стоматоцитоз, свидетельствующий о преимущественном распределении молекул амфифила во внутреннем монослое мембраны, содержащем кислые фосфолипиды [250]. Ограничение смешиваемости молекул амфифила с липидами при определенной концентрации вещества может приводить к увеличению гетерогенности динамической структуры, т.е. появлению областей, обогащенных молекулами амфифила [471]. Возможно, этим обусловлено наблюдаемое нами немонотонное изменение эмпирического параметра

диффузии зонда 16-ДС в мембрану при небольших концентрациях ХПР в суспензии клеток.

Учитывая размер и строение молекулы ХПР, можно заключить, что при концентрациях до 100 мкмоль/л встраивание молекул амфифила в фосфолипидный бислой приводит, главным образом, к увеличению упорядочивающего влияния липидов на движение зонда (см. рис. 5.16, 5.17) вследствие уменьшения сегментальной гибкости и/или амплитуды движения сегментов жирнокислотных цепей фосфолипидов [357]. В интервале концентраций ХПР 100–200 мкмоль/л уменьшение анизотропии спектра (см рис. 5.17) и увеличение частоты вращения зонда (ν_+) (см рис. 5.16) до значений, близких к контрольным (при отсутствии ХПР), позволяют предположить, что влияния молекул амфифила на упаковку липидов в бислое уменьшается. Это косвенно может отражать перераспределение амфифильных молекул, приводящее к появлению в мембране областей, обогащенных молекулами хлорпромазина. Можно предположить, что при определенных концентрациях ХПР структурно-функциональная целостность эритроцитарных мембран сохраняется в результате образования в мембране смешанных мицелл или эндовезикуляции [317]. Немонотонные зависимости параметров встраивания и вращательной подвижности зонда 16-ДС в эритроцитарных мембранах при возрастании концентрации ХПР до 200 мкмоль/л отражают, по-видимому, изменения гетерогенности динамической структуры мембран при сохранении их барьерных свойств.

Несмотря на общепринятые представления о плазматических мембранах как бислоях с ламеллярной упаковкой липидов, некоторые структурно-функциональные характеристики биомембран могут быть объяснены существованием в бислое неизоморфных жидкокристаллических структур [275]. Возможно, что присутствие в бислое неламеллярных фаз не является уникальным свойством немногих природных мембран, а скорее, обусловлено необходимостью сохранять структурно-функциональную целостность при значительной гетерогенности компонентного состава, в том

числе в присутствии модификаторов упаковки липидов (белков и стероидов), свободных жирных кислот и ионов [223, 278].

Структурный полиморфизм изучен в основном на искусственных мембранах, образованных из одного или двух фосфолипидов, при действии факторов, влияющих на динамический объем молекул липидов. Так, в модельных мембранах, построенных из фосфолипидов, характерных для эритроцитарных мембран, методами ^{31}P -ЯМР и ЭПР исследованы неизоморфные жидкокристаллические структуры и показана зависимость полиморфных переходов от температуры и модификации водно-липидных взаимодействий [31, 32, 100]. Предположения об участии небислойных структур, в том числе изотропных фаз, в механизмах воздействия амфифильных агентов на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов (участие гексагональных фаз в трансбислойном переносе фосфолипидов и амфифилов, конкурентно-везикулярный механизм гемолиза эритроцитов) приведены в работах [154, 316].

Методом ЭПР спектроскопии с помощью спин-меченого амида пальмитиновой кислоты была показана модификация динамической структуры водно-липидной поверхности эритроцитарной мембраны при действии различных концентраций ХПР, при этом выявлен экстремальный характер зависимости параметра несферичности вращения зонда в интервале концентраций 100–200 мкмоль/л ХПР [119]. Таким образом, модификация хлорпромазином структуры эритроцитарных мембран затрагивает как водно-липидную поверхность, так и гидрофобную зону мембраны. По-видимому, лимитирующей стадией обратимой (с сохранением барьерных свойств) перестройки динамической структуры эритроцитарных мембран является включение в мембрану определенного количества амфифильных молекул без нарушения преимущественно бислойной упаковки фосфолипидов. Мы допустили, что в интервале концентраций 150–300 мкмоль/л ХПР существенную роль в перестройке динамической структуры мембран, по крайней мере, внутреннего монослоя, могут играть неизоморфные фазы,

взаимопревращения которых должны зависеть как от исходного состояния мембран, температуры и ионного состава среды, так и концентрации амфифильного агента. Как было отмечено, 200 мкмоль/л ХПР является пороговой концентрацией, при которой происходит нарушение барьерных свойств мембран. Исключение сигнала части цитозольного зонда из суммарного спектра ТЕМПОН при достижении 200 мкмоль/л ХПР в суспензии клеток свидетельствует об образовании достаточно крупных трансмембранных пор, что можно интерпретировать как полную доступность цитозольных зондов ионам феррицианида в некоторых клетках. Повреждение мембран части эритроцитов согласуется с представлениями об исходной гетерогенности клеток, что отмечено также авторами [154] при исследовании действия додецилсульфата натрия.

Наиболее существенные различия в параметрах вращательной подвижности липидного зонда 16-ДС в эритроцитарных мембранах при действии 50–200 и 300–700 мкмоль/л ХПР на клетки при отсутствии феррицианида калия заключаются в резком растормаживании вращения зонда вокруг различных осей при высоких концентрациях ХПР в суспензии эритроцитов (см. рис. 5.16).

Важным представляется подтверждение мембранной локализации молекул липидного зонда при столь значительных изменениях параметров его вращения. Нельзя исключить, что резкое растормаживание подвижности зонда при действии 300 мкмоль/л ХПР обусловлено его включением в эндовезикулы, образование которых [317] может быть защитной реакцией мембран [154].

«Узкий» спектр зонда 16-ДС исчезает при добавлении феррицианида калия к суспензии контрольных клеток, причем параметры вращения зонда практически не изменяются. Это свидетельствует о доступности радикальных фрагментов зонда 16-ДС (пренебрежимо малого количества, практически не сказывающегося на суммарном спектре мембранных зондов) для ионов феррицианида во внеклеточной среде в суспензии клеток.

Учитывая, что параметр ширины спектра 16-ДС содержит как динамическую, так и концентрационную составляющие [99], количество зонда в образце (количество радикальных центров [99]) можно оценивать по спектрам ЭПР, по-видимому, только в интервале концентраций ХПР до 300 мкмоль/л. Для этих концентраций характерно незначительное и монотонное влияние феррицианида на параметр ширины спектров. Отсутствие суперпозиции сигналов ЭПР, обусловленной различной полярностью микроокружения радикального фрагмента 16-ДС, свидетельствует о гидрофобном микроокружении радикалов при действии ХПР в концентрации 300 мкмоль/л. Это свидетельствует о внутримембранной локализации молекул 16-ДС, и, возможно, частичной эндовезикуляции. Добавление феррицианида калия в суспензию клеток приводило к резкому затормаживанию вращения липидного зонда. Уменьшение интенсивности сигнала ЭПР в этом случае было сравнимо с уменьшением компонент спектра, наблюдаемым при добавлении феррицианида в суспензию эритроцитов, не содержащую ХПР. Следовательно, приведенное объяснение не исключает влияния ионов феррицианида на характер вызываемых ХПР изменений структуры мембран, что приводит к доступности части радикальных фрагментов зонда 16-ДС для уширителя. Таким образом, структура неламеллярной фазы может зависеть как от концентрации ХПР, так и дополнительного действия ионов феррицианида.

Поскольку добавление феррицианида калия не сопровождается существенным увеличением числа клеток с поврежденной мембраной, затормаживание вращения зонда, вероятнее всего, не обусловлено проникновением ионов феррицианида в клетки. Это позволяет говорить о том, что параметры динамической структуры эритроцитарных мембран при действии 300 мкмоль/л ХПР и феррицианида характеризуют в основном неповрежденные мембраны.

Результаты исследования доступности зондов для ионов феррицианида при более высоких концентрациях ХПР дают основание полагать, что увеличение повреждения мембран связано с влиянием феррицианида на характер упаковки липидов. Например, показано влияние ионов феррицианида (0,3 моль/л) на гидрофобную зону и температурно-зависимые перестройки модельных мембран [87]. Несмотря на то, что мы применяли феррицианид калия в более низкой концентрации, полученные результаты свидетельствуют о возможном действии ионов феррицианида как одного из дополнительных факторов, влияющих на динамику мембран.

Показанное в работе сохранение барьерных свойств эритроцитарных мембран для ионов феррицианида при низких концентрациях амфифила (50–150 мкмоль/л) свидетельствует в пользу достаточной адекватности метода контроля структурно-функционального состояния мембраны, поскольку согласуется с данными об отсутствии изменений проницаемости эритроцитарных мембран для ионов калия в присутствии 120 мкмоль/л ХПР, что было показано методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии (табл. 5.4).

Таким образом, на основании полученных результатов сложно разграничить ситуации, приводящие к частичному и полному нарушению структурно-функционального состояния мембран при варьировании концентрации ХПР. Анализируя характер и степень наблюдаемых изменений параметров вращательной подвижности липидных зондов, можно говорить пока лишь об изменении характера структурной перестройки эритроцитарных мембран, сопровождающейся различным нарушением ее барьерных свойств, при совместном действии ХПР и феррицианида калия.

В рамках проведенного анализа изменения спектров ЭПР мембранного и цитозольного зондов, индуцированных высокими концентрациями ХПР в присутствии ионов феррицианида, можно сделать следующие предположения относительно структуры дефектов упаковки липидов в мембране эритроцитов. Резкое увеличение частот вращательной

подвижности и уменьшение упорядоченности вращения липидного зонда при действии ХПР в концентрации 500 мкмоль/л и ионов феррицианида, сопровождаемое увеличением проникновения внеклеточных ионов во все клетки, обусловлено, очевидно, генерализованным изменением упаковки липидов. При действии ХПР (500 мкмоль/л) спин-меченные группы зонда 16-ДС находятся, по-видимому, в гидрофобном микроокружении липидных хвостов эритроцитарных мембран и недоступны ионам феррицианида. Эта модель согласуется с предположением о появлении в мембране гексагональной фазы и гидрофильных каналов небольшого размера [293, 320], образованных полярными головками молекул липидов и зонда, вследствие чего слабо увеличивается доступность цитозольного зонда ТЕМПОН для ионов феррицианида.

Обращение значений параметров микроокружения зонда 16-ДС в мембранах при концентрации ХПР 700 мкмоль/л, наблюдаемое при дополнительном воздействии ионов феррицианида, и увеличение (по сравнению с концентрацией ХПР 500 мкмоль/л) доступности внутриклеточного зонда ТЕМПОН для ионов феррицианида свидетельствуют в пользу изменения структуры дефектов. Значительное уширение спектра и уменьшение вращательной подвижности зонда 16-ДС позволяют заключить, что определенную роль в увеличении проницаемости мембран могут играть дефекты упаковки липидов, представляющие большие по диаметру водные каналы, поверхность которых образована полярными головками липидов и молекул зонда. При этом радикальные фрагменты 16-ДС сближены и находятся в более плотном микроокружении гидрофобных хвостов фосфолипидов. Возможно также, что подобная реорганизация упаковки липидов характерна для части мембран при более низких концентрациях и включается в механизм быстрого генерализованного нарушения барьерной функции мембраны.

Очевидно, что полученные данные не позволяют пока сделать более определенные выводы о природе фазово-структурных перестроек мембран

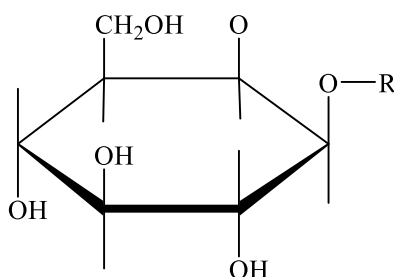
эритроцитов при действии ХПР. Следует отметить, что значения антигемолитических концентраций ХПР, полученные при изучении гипертонического шока и гипертонического криогемолиза эритроцитов человека (табл. 5.1), попадают в диапазон низких концентраций амфифила (до 200 мкмоль/л). Это позволяет рассматривать выявленные нами перестройки динамической структуры мембраны при действии небольших концентраций амфифила как адаптивные; важная роль в которых может принадлежать изменению степени полиморфизма мембраны [154]. Можно полагать, что дальнейшие исследования влияния физико-химических факторов на динамическую структуру мембран с привлечением методов, регистрирующих полиморфные переходы, позволят получить однозначные данные о возможной роли небислойных фаз в неспецифическом изменении структурно-функционального состояния плазматических мембран.

5.3.5. Определение роли гидрофобности и внутримембранной концентрации алкил- β ,D-глюкопиранозидов в реализации их антигемолитической активности. Представленные в работе результаты свидетельствуют, что защитный эффект амфифильных соединений, относящихся к различным классам, характерен не только для эритроцитов человека, но и животных. Величины антигемолитической активности амфифилов зависят от состояния эритроцитарных мембран, которое определяется как внутренними, так и внешними факторами. К внутренним факторам относится состав эритроцитарных мембран, а внешние факторы – температура, осмолярность среды и различные модификаторы. Кроме того, следует отметить, что эффективность амфифильных веществ естественно зависит и от их физико-химических свойств.

Тот факт, что амфифильные вещества при использовании в значительно различающихся концентрациях характеризуются сравнимыми величинами антигемолитической активности в условиях

стресса эритроцитов того или иного вида млекопитающих (табл. 5.1–5.3), ставит вопрос о внутримембранной концентрации этих соединений.

Для решения этой проблемы были использованы представители гомологического ряда глюкопиранозидов, которые относятся к классу неионных амфифильных соединений. Алкилглюкопиранозиды, молекулы которых различались длиной алкильной цепи при неизменной гидрофильной части, представлены гексил-, октил- и децил- β ,D-глюкопиранозидами (далее ГГП, ОГП и ДГП соответственно). Их структурные формулы приведены на рис. 5.22.



Гексил- β ,D-глюкопиранозид (ГГП) $R = C_6$

Октил- β ,D-глюкопиранозид (ОГП) $R = C_8$

Децил- β ,D-глюкопиранозид (ДГП) $R = C_{10}$

Рис. 5.22. Структурные формулы алкил- β ,D-глюкопиранозидов.

Концентрационные зависимости влияния неионных амфифилов на уровень гипертонического гемолиза эритроцитов человека при температуре 37°C представлены кривыми 1 на рис. 5.21. Добавление алкил- β ,D-глюкопиранозидов в среду, содержащую 4,0 моль/л NaCl, позволяет существенно снизить уровень лизиса клеток. Зависимости имеют перевернутую колоколообразную форму: по мере повышения концентрации амфифилов в среде наблюдаются сначала снижение уровня гемолиза, выход

на плато, а затем увеличение уровня повреждения клеток, причем последнее связано с детергентным эффектом амфифилов.

Поскольку гипертонический криогемолиз эритроцитов человека развивается при охлаждении клеток от 37 до 0°C в гипертонической среде, причем этот эффект максимально выражен в растворе, содержащем 1,2 моль/л NaCl (рис. 4.1), поэтому эритроциты помещали в 1,2 моль/л NaCl при 37°C, а затем переносили их в среду той же тоничности, имеющую температуру 0°C. Такая постановка эксперимента позволяет максимально повысить скорость охлаждения клеточной суспензии, а также изучить действие амфифилов на этапе охлаждения клеток, когда эритроциты переносят в охлажденный раствор 1,2 моль/л NaCl, в который уже добавлено исследуемое вещество.

Зависимости уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов от концентрации алкил-β, D-глюкопиранозидов представлены кривыми 2 на рис. 5.23. Как видно, все исследуемые вещества эффективно защищают клетки при охлаждении в 1,2 моль/л растворе NaCl, однако в более высоких по сравнению с гипертоническим шоком концентрациях. Следует отметить, что при использовании ДГП в высоких концентрациях, превышающих 0,13 ммоль/л, наблюдается опалесценция растворов, содержащих 1,2 моль/л NaCl при 0°C, поэтому не удалось получить типичную колоколообразную форму концентрационной зависимости (рис. 5.23 в, кривая 2).

Защитное действие алкил-β, D-глюкопиранозидов при гипертоническом криогемолизе эритроцитов отмечается в более широком концентрационном диапазоне, который лежит правее концентрационного оптимума для гипертонического лизиса клеток (рис. 5.23).

Из полученных концентрационных зависимостей гипертонического гемолиза и гипертонического криогемолиза эритроцитов человека (рис. 5.23) были определены величины максимальной антигемолитической активности глюкопиранозидов ($АГ_{\text{макс}}$), концентрации веществ при которых наблюдается

максимальная ($АГ_{\text{макс}}$) и полумаксимальная ($АГ_{50}$) антигемолитическая активность амфифилов ($С_{АГ_{\text{макс}}}$ и $С_{АГ_{50}}$ соответственно) (табл. 5.7).

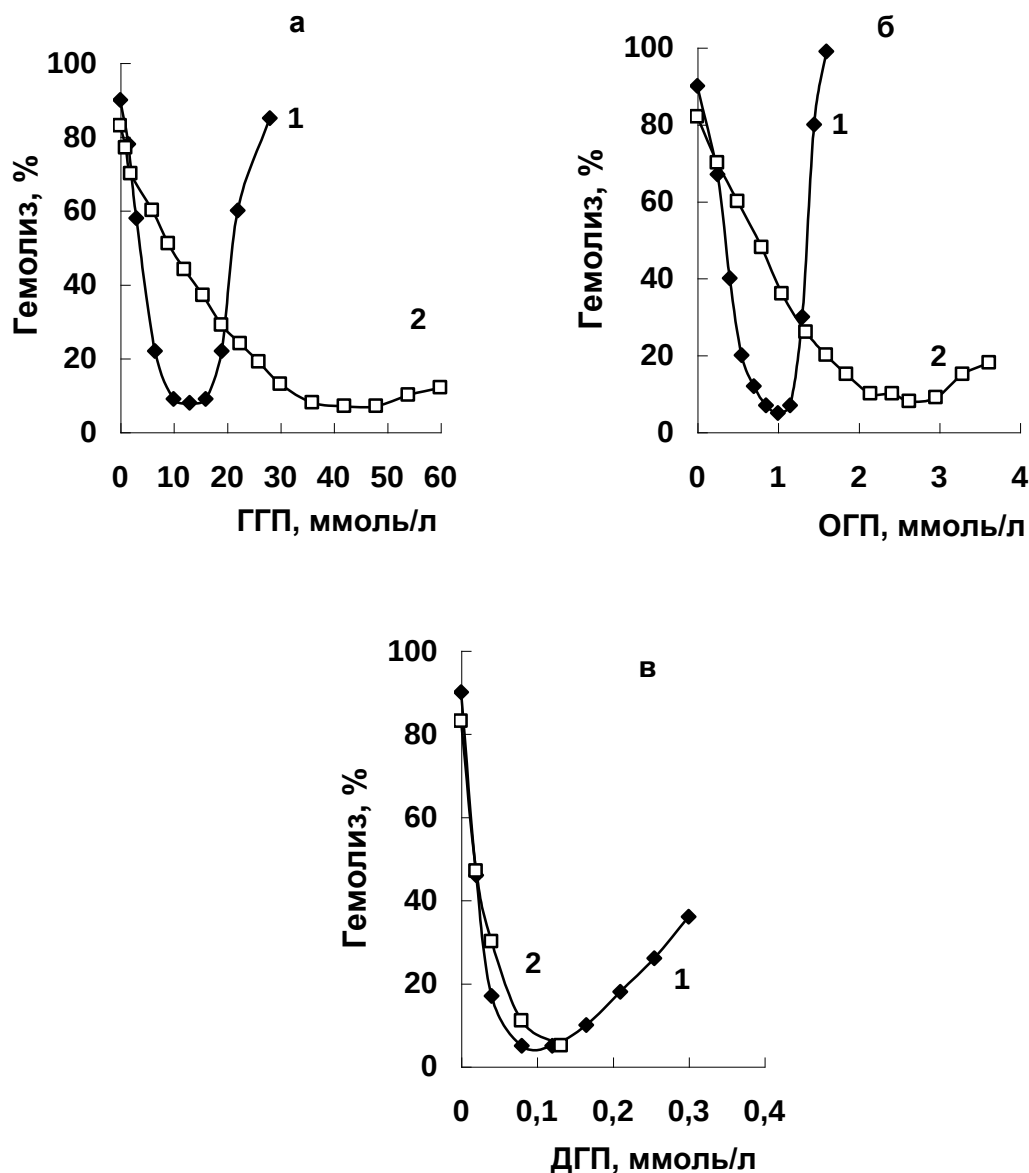


Рис. 5.23. Концентрационные зависимости влияния алкил-β,D-глюкопиранозидов на гемолиз эритроцитов в условиях гипертонического шока (1) и гипертонического криогемолиза (2): а – ГГП, б – ОГП, в – ДГП.

Концентрация, при которой наблюдается максимальная протекция клеток в условиях стресса, определяется как эффективная концентрация амфифила, соответствующая середине плато концентрационной зависимости.

Так как при гипертоническом криогемоллизе для ДГП из-за развития процесса мицеллообразования в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl при 0°C, плато не было достигнуто, то в табл. 5.7 представлены и значения концентраций гомологов, которые соответствуют началу плато ($C_{AG\text{нач. плато}}$).

Таблица 5.7

Величины максимальной антигемолитической активности ($AG_{\text{макс}}$) и концентрации алкил- β ,D-глюкопиранозидов ($C_{AG\text{макс}}$), соответствующие максимальной и полумаксимальной протекции эритроцитов в условиях гипертонического шока (4,0 моль/л NaCl, 37°C) и гипертонического криогемоллиза (1,2 моль/л NaCl, 37 $\rightarrow$ 0°C)

$M \pm m, n = 16$

Вещества	Гипертонический шок				Гипертонический криогемоллиз			
	$AG_{\text{макс}}, \%$	$C_{AG\text{макс}}$	$C_{AG\text{нач. плато}}$	C_{AG50}	$AG_{\text{макс}}, \%$	$C_{AG\text{макс}}$	$C_{AG\text{нач. плато}}$	C_{AG50}
ГГП	$90 \pm 7^*$	13	10	4	$91 \pm 7^{**}$	42	36	12,1
ОГП	$94 \pm 5^*$	1	0,85	0,37	$90 \pm 8^{**}$	2,63	2,15	0,87
ДГП	$94 \pm 5^*$	0,1	0,08	0,019	$94 \pm 5^{**}$	—	0,132	0,023

Примечания: *, ** — статистически значимо не различаются при гипертоническом шоке и гипертоническом гемоллизе соответственно ($p > 0,05$).

Концентрация, при которой наблюдается максимальная протекция клеток в условиях стресса, определяется как эффективная концентрация амфифила, соответствующая середине плато концентрационной зависимости. Так как при гипертоническом криогемоллизе для ДГП из-за развития процесса мицеллообразования в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl при 0°C, плато не

было достигнуто, то в табл. 5.7 представлены и значения концентраций гомологов, которые соответствуют началу плато ($C_{\text{АГнач. плато}}$).

Следует отметить, что концентрации алкил- β ,D-глюкопиранозидов в среде, при которой вещества защищают клетки от гипертонического повреждения и гипертонического криогемолиза, снижаются с ростом длины алкильной цепи в ряду ГГП > ОГП > ДГП. Концентрации гомологов глюкопиранозида, при которых наблюдается максимальная защита клеток от гипертонического лизиса и гипертонического криогемолиза, с удлинением алкильной цепи на каждые две CH_2 -группы снижаются более чем в 10 и 15 раз соответственно (табл. 5.7).

Характерная особенность строения молекул амфифильных веществ – наличие в их составе полярной (гидрофильной) и неполярной (гидрофобной) частей. При определенной концентрации амфифильных веществ их молекулы собираются в мицеллы. Термодинамической движущей силой мицеллообразования являются гидрофобные взаимодействия: углеводородная часть амфифильной молекулы выталкивается из водной среды, в результате чего образуются мицеллы, внутренняя часть которых состоит из углеводорода, а внешняя, обращенная к водному раствору, – из полярных групп. Концентрации амфифильных веществ в растворе, при которых образуются в заметных количествах устойчивые мицеллы, называют критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). Величины ККМ амфифилов зависят от длины алкильной цепи и существенно снижаются с ее ростом [2].

Известно, что зависимость $\lg(\text{ККМ})$ в гомологичных рядах разных детергентов от числа атомов углерода в их алкильной цепи имеет линейный характер [2]:

$$\lg(\text{ККМ}) = A - Bn, \quad (5.1)$$

где n - число атомов углерода в алкильной цепи амфифильных веществ, A и B – константы. В соответствии с физическим смыслом величина B – это свободная энергия мицеллообразования, приходящаяся на 1 атом углерода

(на 1 метиленовую группу), связанная с переносом молекулы сурфактанта из истинного раствора в мицеллы.

Зависимость ККМ алкил- β ,D-глюкопиранозидов от длины алкильной цепи n представлена прямой 1 на рис. 5.24 в полулогарифмических координатах (величины ККМ взяты из работы [143]). В тех же координатах представлены для гипертонического шока и гипертонического криогемолиза эритроцитов зависимости концентраций алкилглюкопиранозидов, соответствующих началу плато, и для гипертонического лизиса эритроцитов зависимость эффективных концентраций от числа углеродных атомов в алкильной цепи гомологов алкилглюкопиранозидов.

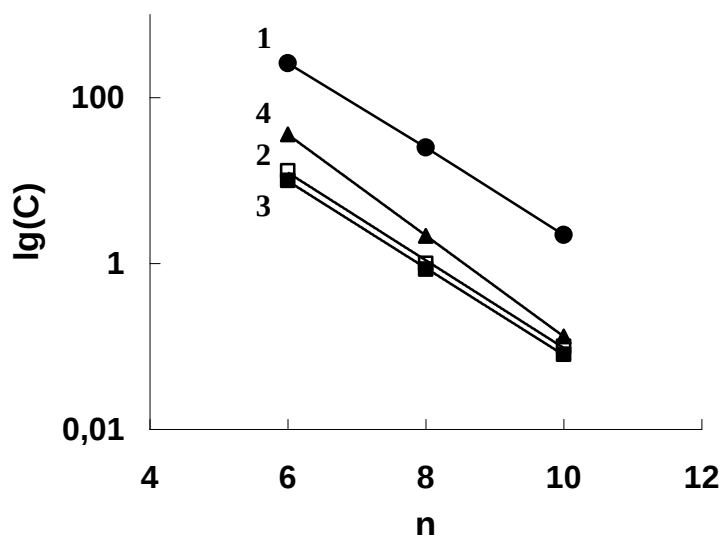


Рис. 5.24. Полулогарифмическая зависимость ККМ (1), концентраций при гипертоническом шоке $C_{AG\max}$ и $C_{AG\text{нач.плато}}$ (2 и 3 соответственно) и гипертоническом криогемолизе $C_{AG\text{нач.плато}}$ (4) от числа углеродных атомов в алкильной цепи алкил- β ,D-глюкопиранозидов.

Все представленные зависимости характеризуются линейностью с высоким значением достоверности аппроксимации, $R \geq 0,999$ (рис. 5.24).

При гипертоническом лизисе эритроцитов зависимости $\lg C_{AG_{\text{макс}}}$ и $\lg C_{AG_{\text{нач.плато}}}$ глюкопиранозидов от длины их алкильной цепи параллельны. Это позволяет допустить, что при гипертоническом криогемолизе представленная зависимость $\lg K_{AG_{\text{нач.плато}}}$ может в определенной степени отражать характер зависимости эффективных концентраций ($C_{AG_{\text{макс}}}$) алкилглюкопиранозидов от числа углеродных атомов в гидрофобной части молекулы.

Углы наклона прямых зависимостей $\lg C_{AG_{\text{макс}}}$ и $\lg C_{AG_{\text{нач.плато}}}$ при гипертоническом лизисе в точности совпадают с коэффициентом B в уравнении (5.1), а зависимость $\lg C_{AG_{\text{нач.плато}}}$ для гипертонического криогемолиза также имеет угол наклона, близкий к величине B (рис. 5.24). Это значит, что доминирующую роль в эффективности алкил- β ,D-глюкопиранозидов при гипертоническом лизисе и гипертоническом криогемолизе эритроцитов, как и при мицеллообразовании, играет гидрофобный эффект.

Следует отметить, что на самом деле с увеличением осмолярности среды наблюдается снижение величин ККМ неионных детергентов [511]. Исходя из того, что зависимости $\lg$ ККМ децил- и додецилмальтозида, а также октилглюкопиранозидов от концентрации NaCl в среде (на основании результатов работы [511]) параллельны, можно допустить, что подобный характер зависимостей $\lg$ ККМ от осмолярности раствора свойственен и представителям гомологического ряда алкилглюкопиранозидов. Поэтому можно полагать, что величины ККМ гексил-, октил- и децилглюкопиранозидов будут достаточно синхронно изменяться с увеличением осмолярности среды.

Следует отметить, что одинаковые по величине защитные эффекты амфифилов реализуются при использовании веществ в различных концентрациях (табл. 5.1–5.3). Предполагалось, что, несмотря на отличающиеся в десятки раз протектирующие концентрации амфифильных

соединений в водных растворах, их концентрации в мембране примерно одинаковы для равного по величине эффекта [475].

Для проверки этого предположения была предпринята попытка оценить величину R , равную количеству молекул липида, приходящемуся на 1 молекулу детергента, при максимальной ($AG_{\text{макс}}$) и полумаксимальной (AG_{50}) защите клеток при различных типах лизиса. Для этого необходимы значения коэффициентов распределения (K_p) алкилглюкопиранозидов в системе мембрана/вода. К сожалению, доступна была лишь величина коэффициента распределения ОГП в этой системе для везикул из яичного фосфатидилхолина ($K_p = 63$ [426]). Однако как для сложных эфиров, так и для других производных алифатического ряда зависимости $\lg K_p$ от числа углеродных атомов в алкильной цепи гомологов n характеризуются линейностью [2]:

$$\lg K_p = A' + B'n \quad (5.2)$$

Кроме того, для достаточно большого числа гомологических рядов детергентов существует обратная зависимость между $\lg K_p$ и $\lg K_{KM}$ (с коэффициентом -1), откуда следует, что $B' = B$. Вышеизложенное позволяет экстраполировать зависимость $\lg K_p$ от n прямой линией для того, чтобы приблизительно оценить коэффициенты распределения ДГП и ГГП: 730 и 5,5 соответственно.

Поскольку в работе использовали неионные детергенты, то во внимание не принимали возможное влияние ионной силы на коэффициенты распределения и полагали, что детергенты распределяются только в липидные области мембраны [425, 474].

Для оценки отношения количества липида, приходящегося на молекулу амфифильного вещества в эритроцитарной мембране, R , были использованы следующие величины: $5,2 \times 10^{-13}$ г липида/тень [251], 0,658 л/моль — парциальный молярный объем липидной фазы эритроцитарной мембраны [374]. При расчете объема неполярной фазы исходили из того, что плотность липида 1 г/мл [307].

Полученные величины R для максимального и полумаксимального защитного эффекта алкилглюкопиранозидов для исследуемых типов гемолиза эритроцитов представлены в табл. 5.8. Видно, что при использовании алкил- β ,D-глюкопиранозидов в концентрациях, при которых проявляется их максимальная защита ($AG_{\text{макс}}$ 90–94%), величина R действительно мало зависит от длины алкильной цепи n . Величины R при максимальной протекции ($AG_{\text{макс}}$) и при использовании эффективных концентраций составляют 21,0–24,1 и 6,6–9,2 для гипертонического гемолиза и гипертонического криогемолиза эритроцитов соответственно. Величины R при максимальной протекции ($AG_{\text{макс}}$), но при использовании концентраций амфифилов, соответствующих началу плато, составляют для гипертонического шока и гипертонического криогемолиза 26,3–28,4 и 7,7–15,8 соответственно.

Таблица 5.8.

Отношение липид/амфирил в эритроцитарной мембране при максимальной ($AG_{\text{макс}}$) протекции эритроцитов в условиях гипертонического шока и гипертонического криогемолиза

Вещества	Гипертонический шок		Гипертонический криогемолиз	
	$CA_{G\text{макс}}$	$CA_{G\text{нач. плато}}$	$CA_{G\text{макс}}$	$CA_{G\text{нач. плато}}$
ГГП	21,2	27,6	6,6	7,7
ОГП	24,1	28,4	9,2	9,7
ДГП	21,0	26,3		15,8

Защитный эффект амфифилов в условиях гипотонического шока эритроцитов известен и описан для многих структурно-разнородных соединений [296, 310, 316, 475]. Механизм, лежащий в основе

антигемолитического эффекта амфифилов при гипотоническом стрессе эритроцитов, полностью не выяснен. Чаще всего антигемолитическое действие веществ в данном случае объясняют расширением площади мембраны при встраивании молекул этих соединений в липидный бислой и увеличением значения отношения площадь поверхности/объем клетки, что позволяет эритроциту достигать большего объема в гипотонической среде прежде, чем будет превышено критическое мембранное натяжение [475]. Однако тот факт, что антигемолитическая активность амфифильных соединений наблюдается также при гипертоническом шоке и гипертоническом криогемолизе эритроцитов непосредственно в момент действия стрессового фактора (рис. 5.2 б, 5.3), т.е. перед тем, как клетки начинают набухать, ставит под сомнение правомерность такого объяснения в качестве универсального. Кроме того, такая точка зрения противоречит данным работ [231, 296], в которых было показано, что различные амфифилы, оказывающие существенный антигемолитический эффект, уменьшают величину критического гемолитического объема или не оказывают на нее никакого влияния.

Известно, что встраивание различных инородных амфифильных молекул в мембрану способно изменить подвижность жирнокислотных цепей липидов [425], нарушить липидную упаковку в мембранном бислое и систему водородных связей между полярными головками фосфолипидов [318], изменить взаимодействия на границах мембранных доменов [291] и вызвать трансмембранное перераспределение фосфолипидов [430]. Перераспределение амфифильных молекул в мембранах также может сопровождаться образованием транзиторных небислойных структур, которые, как предполагают, представляют собой гексагональные фазы (H_{11} фазы) или инвертированные мицеллы [316].

Данные о взаимодействии алкил- β ,D-глюкопиранозидов с биологическими мембранами и липидными везикулами главным образом доступны для ОГП. Этот детергент широко используется при

реконструировании функциональных мембран и, следовательно, интенсивно изучается [365, 425, 511]. ОГП и его гомологи уменьшают температуру фазового перехода липидов [68]. С помощью метода ^2H -ЯМР и ^{31}P -ЯМР спектроскопии было показано [389, 425], что добавление ОГП существенно увеличивает флуктуацию сегментов жирнокислотных цепей фосфолипидов, находящихся во внутренней части липидного бислоя, но почти не оказывает влияния на область их полярных голов. Пертурбирующий эффект ОГП отличается от структурно – родственного, но имеющего большую гидрофильную голову монододецилового эфира октаэтилена, который вызывает общее разупорядочивание на всех его уровнях [425].

Можно полагать, что механизм антигемолитического действия амфифилов при различных типах стрессов является универсальным. Протектирующее действие амфифилов, вероятно, связано с большим или меньшим неспецифическим нарушением мембранной структуры эритроцитов при быстром распределении амфифильных молекул в липидном бислое. В результате такой пертурбации происходит изменение мембранной структуры, что позволяет ей лучше адаптироваться к действию стресса. Между тем конкретное проявление антигемолитической активности зависит как от типа стресса, так и от особенностей влияния амфифильного вещества на эритроцитарную мембрану.

Выводы

- Защитный эффект ХПР в условиях ГШ и ГК эритроцитов не является результатом предобработки клеток хлорпромазином и, следовательно, не связан с его непосредственным влиянием на регуляторные системы клетки. ХПР защищает эритроциты в момент стрессового воздействия, т.е. во время переходной фазы, связанной с реагированием клеток на резкое изменение условий окружающей среды.
- Амфифильные соединения, относящиеся к различным классам (катионные, анионные и неионные), проявляют антигемолитическую

активность при ГК и ГШ эритроцитов млекопитающих. Их эффективность зависит как от видовой принадлежности эритроцитов, физико-химических характеристик амфифильных молекул и вида стрессового фактора.

В условиях ГШ и ГК эритроцитов млекопитающих большую эффективность проявляют катионные амфифильные соединения (ХПР, ТФП), кроме того, при охлаждении клеток животных в гипертонических средах высокой антигемолитической активностью характеризуется анионный С 10.

Эффективность амфифильных соединений зависит от вида стрессового фактора и, как правило, снижается в ряду ГШ (37°C), ГК, ГШ (0°C).

- В условиях гипертонического шока амфифильные соединения, проявляющие антигемолитическую эффективность, не оказывают влияние на барьерные свойства мембран эритроцитов исследуемых видов млекопитающих, оцениваемые по выходу внутриклеточных катионов K^+ . Таким образом, антигемолитическая активность амфифильных соединений реализуется на этапе роста трансмембранного дефекта до размера гемолитической поры и в значительной степени зависит от состояния эритроцитарной мембраны и физико-химических свойств амфифильных соединений.

- Ферментативная обработка эритроцитов человека (трипсин, проназа, папаин, нейраминидаза) не влияет на способность ТФП защищать эритроциты человека в условиях ГШ (37°C). Таким образом, эффективность амфифильных соединений не зависит от состояния белковых компонентов эритроцитарной мембраны, которые модифицировались в результате ферментативной обработки.

- Оценка асимметрии клеточной мембраны методом проточной цитофлуориметрии не показала дополнительного экспонирования фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны в результате кратковременной обработки (10 мин) эритроцитов человека хлорпромазином (50–300 мкмоль/л).

- Методом ЭПР спектроскопии с использованием спин-меченых зондов, содержащих нитроксильный радикал в различных положениях вдоль жирнокислотной цепи, показано, что действие амфифильных соединений (неионный ДМ, анионный C12, катионный ХПР) проявляется в изменении микровязкости мембран эритроцитов и при этом трансмембранный локализация эффекта определяется физико-химическими свойствами амфифильных молекул. Тот факт, что исследуемые амфифильные вещества, относящиеся к разным классам, изменяют микровязкость мембраны, позволяет полагать, что в основе неспецифического действия катионных, анионных и неионных амфифилов на клетки в условиях стресса лежит способность этих амфифилов оказывать влияние на состояние липидного бислоя мембраны.

- Методом ЭПР спектроскопии с использованием спин-меченых зондов изучено влияния ХПР в широком концентрационном диапазоне на состояние мембран эритроцитов. Полученные результаты позволили выделить интервалы концентраций ХПР, в которых мембраны эритроцитов претерпевают обратимые и деструктивные изменения. Высокие концентрации хлорпромазина (300-700 мкмоль/л) вызывают нарушения барьерных свойств мембран эритроцитов (по отношению к ионам феррицианида), а в присутствии низких концентраций вещества (50-200 мкмоль/л) барьерная функция мембран сохраняется.

- Исследование влияния ХПР в широком концентрационном диапазоне на состояние мембран эритроцитов методом ЭПР спектроскопии позволило выделить интервалы концентраций ХПР, в которых мембраны эритроцитов претерпевают обратимые и деструктивные изменения. С помощью зонда ТЕМПОН в комбинации с феррицианидом калия, который не проникает в нативные клетки, показано, что высокие концентрации ХПР (300–700 мкмоль/л) вызывают нарушения барьерных свойств мембран эритроцитов (по отношению к ионам феррицианида), а в присутствии низких

концентраций вещества (50–200 мкмоль/л) барьерная функция мембран сохраняется.

- Использование гомологического ряда глюкопиранозидов позволило показано доминирующую роль в эффективности алкил- β ,D-глюкопиранозидов, как и при мицеллообразовании, гидрофобного эффекта. Установлено, что величины максимальной антигемолитической активности гомологов глюкопиранозидов (гексил-, октил- и децил- β ,D-глюкопиранозид) составляют 90–94% при ГШ и ГК эритроцитов человека. Значения эффективных концентраций алкил- β ,D-глюкопиранозидов снижаются в 10–15 раз при увеличении длины алкильного цепи молекулы на каждые 2 углеродных атома. Рассчитанные величины отношения липид/амфифил в мембране имеют близкие значения и составляют 26,3–28,4 при ГШ и 7,7–15,8 при ГК эритроцитов человека. Таким образом, при использовании алкил- β ,D-глюкопиранозидов в концентрациях, при которых проявляется максимальная защита (90–94%) в условиях ГШ и ГК эритроцитов человека, величина соотношения липид/амфифилов практически не зависит от длины алкильной цепи.

По материалам главы 5 опубликованы работы [30, 33, 38, 40, 43, 42, 60, 64, 65, 67, 70, 74, 75, 77, 79, 94, 101, 113, 119, 120, 121, 123, 124, 130, 132, 133, 138, 139, 140, 141, 142, 170, 172, 178, 179, 181, 183, 184, 185, 190, 191, 192, 194, 212, 216, 480, 498, 500].

ГЛАВА 6

ИСХОДНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ КАК ФАКТОР, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ ШОКУ

Идеи и концепции, которые лежат в основе современных представлений о повреждении клеток при их низкотемпературном консервировании [369, 382, 383, 396], рассматривают гипертонический шок в качестве основного фактора криоповреждения эритроцитов.

Как показано в разделе 3, гипертонический шок эритроцитов демонстрирует значимую корреляцию с характеристиками транспорта воды через плазматическую мембрану. При низкотемпературном замораживании клеток повреждения развиваются во время двух фаз – при замораживании (фаза гипертонических растворов) и при размораживании (постгипертоническая фаза) [415, 509]. Следует отметить, что повреждение в обеих фазах низкотемпературного воздействия в значительной степени зависит от транспорта воды через эритроцитарную мембрану [17].

Таким образом, связь между транспортом воды, с одной стороны, и гипертоническим шоком и замораживанием, с другой, позволяет говорить о связи процессов, лежащих в основе повреждений, развивающихся при указанных типах воздействия. Это еще одно подтверждение в пользу значимости гипертонического стресса как фактора, определяющего повреждение клеток при замораживании.

Многочисленные работы [14, 62, 144, 434] показывают, что исход криоконсервирования биологического материала в значительной степени зависит от его состояния на этапе, предшествующем замораживанию. Так, установлено, что как скорость добавления криопротектора, так и температура инкубирования эритроцитов с криозащитным веществом существенно влияют на сохранность клеток после замораживания и последующего отогрева [14, 62]. Немаловажным фактором является и продолжительность

инкубирования клеток с криопротектором при положительных температурах на этапах, предшествующих процедуре замораживания [14]. В условиях гипертонического шока уровень гемолиза эритроцитов человека так же зависит от ряда параметров внеклеточной среды, таких как температура, качественный состав, pH [12, 27, 118, 120, 127, 131, 146].

6.1 Обезвоживание эритроцитов как фактор, определяющий последующую гипертоническую чувствительность клеток

Если эритроциты человека предварительно проинкубировать в слабо и умеренно гипертонических средах (0,2–1,0 моль/л NaCl), а затем перенести в раствор, содержащий 4,0 моль/л NaCl, то наблюдается изменение уровня гемолиза эритроцитов по сравнению с контрольными клетками (рис. 6.1). В качестве контроля рассматриваются клетки, перенесенные в 4,0 моль/л NaCl после инкубирования в 0,15 моль/л NaCl.

При обоих температурных режимах (37 и 0°C) с ростом концентрации соли на предварительном этапе наблюдается сначала снижение, а затем повышение уровня гипертонического гемолиза. Минимальный уровень гемолитического повреждения в 4,0 моль/л NaCl отмечен для клеток, которые предварительно находились в среде, содержащей 0,4 моль/л NaCl. (осмоляльность этого раствора составляет 700 мосмоль/кг). Это минимальное значение гипертонического гемолиза клеток зависит от температуры раствора. Обезвоживание эритроцитов человека в выше указанной среде при 0°C сопровождается падением уровня гипертонического гемолиза в 5,7 раза, в то время как инкубирование при 37°C приводит к снижению гемолитического повреждения клеток в 2,65 раза по сравнению с контрольными эритроцитами. В общем, полученные результаты хорошо согласуются с данными, представленными в работах Позднякова [145, 144] и Бондаренко [25].

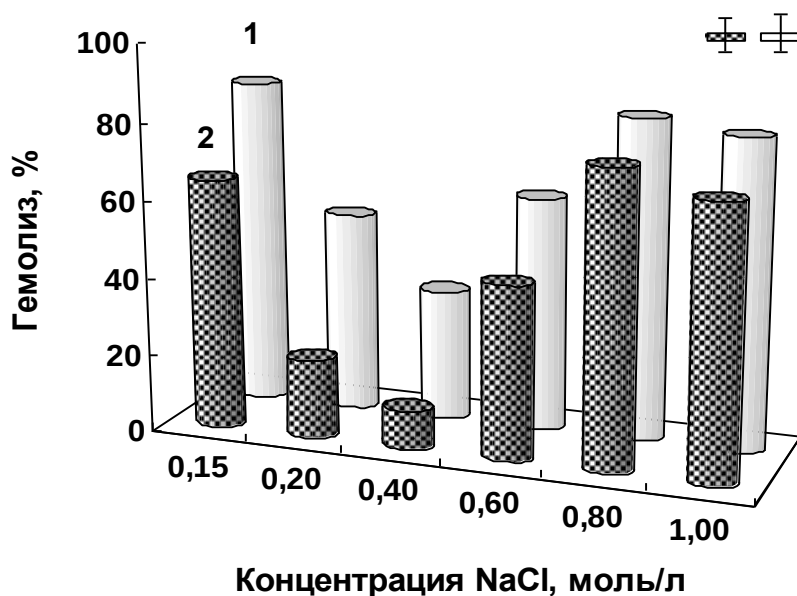


Рис. 6.1. Уровень гемолиза эритроцитов человека в 4,0 моль/л NaCl после предварительной инкубации в средах, содержащих 0,15–1,0 моль/л NaCl, при температуре 37 (1) и 0°C (2).

Выявленный эффект повышения устойчивости эритроцитов человека к гипертоническому шоку связывают с тем, что в умеренно гипертонических средах (0,4–0,45 моль/л NaCl) формируется особое состояние клеток, которое характеризуется как стабильное [25]. В этом состоянии клетка наиболее устойчива к действию неблагоприятного фактора внешней среды – к гипертоническому шоку. При изменении внешних условий (температура, осмолярность и pH среды) клетка может переходить в состояние метастабильности. Эритроцит, находясь в таком состоянии, еще не гемолизует, однако незначительное увеличение, как силы, так и продолжительности стрессового воздействия приводит к гибели клетки [28, 39, 102]. Формирование метастабильного состояния эритроцитов человека осуществляется в средах, содержащих 0,6 моль/л NaCl и выше, поскольку

перенесение этих клеток в 4,0 моль/л NaCl сопровождается развитием значительного уровня гемолитического повреждения.

Авторы работ [25, 145, 144] связывают повреждение эритроцитов человека в высококонцентрированной солевой среде (4,0 моль/л NaCl) с потерей устойчивости мембраны непосредственно в фазе изменения объема клетки, когда происходят динамические изменения структуры цитоскелета. Снижение амплитуды «объемного сдвига» обуславливает большую устойчивость предварительно обезвоженных клеток к действию гипертонического шока.

Для изучения роли предварительного обезвоживания эритроцитов животных в формировании их ответа на последующее действие высококонцентрированной солевой среды были выбраны клетки лошади, крысы и быка, которые характеризуются достаточно высокой гипертонической чувствительностью хотя бы при одном из температурных режимов (рис. 3.1 и 3.2).

Как и клетки человека (рис. 6.1), эритроциты лошади демонстрируют максимальную устойчивость к перенесению в раствор, содержащий 4,0 моль/л NaCl, после предварительного инкубирования в 0,4 моль/л NaCl (рис. 6.2). При этом уровень минимального гемолиза эритроцитов при 0 ниже, чем при 37°C. Метастабильное состояние эритроцитов формируется при инкубировании в среде, содержащей 0,6 моль/л NaCl.

Для эритроцитов крысы оптимальное обезвоживание, которое обеспечивает минимальное гемолитическое повреждение в 4,0 моль/л NaCl, осуществляется при инкубировании клеток в 0,3 и 0,3–0,4 моль/л NaCl (550 и 550–700 мосмоль/кг) при 0 и 37°C, соответственно (рис. 6.3). Метастабильное состояние клеток формируется в 0,4 или 0,6 моль/л NaCl в зависимости от температуры. При 37°C повреждение «метастабильных» клеток превышает уровень гемолиза контрольных эритроцитов.

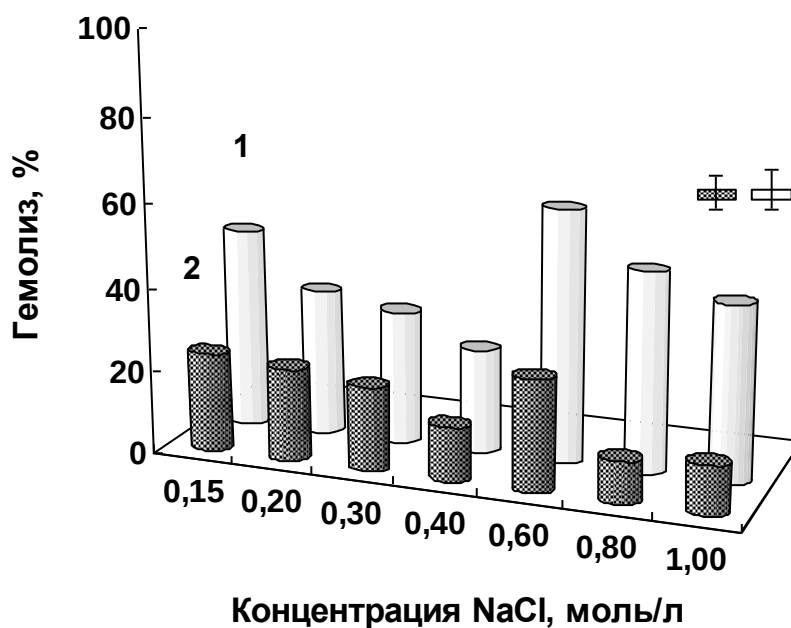


Рис. 6.2. Уровень гемолиза эритроцитов лошади в 4,0 моль/л NaCl после предварительной инкубации в средах, содержащих 0,15–1,0 моль/л NaCl при температуре 37 (1) и 0°C (2).

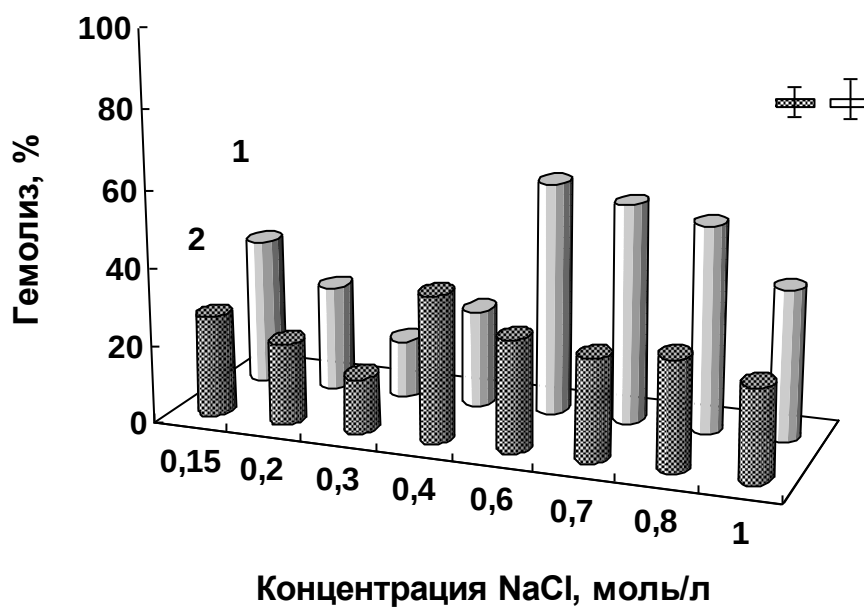


Рис. 6.3. Уровень гемолиза эритроцитов крысы в 4,0 моль/л NaCl после предварительной инкубации в средах, содержащих 0,15–1,0 моль/л NaCl при температуре 37 (1) и 0°C (2).

Поскольку при изучении эритроцитов быка предварительная инкубация клеток при 37°C в средах, содержащих NaCl в концентрации до 1,0 моль/л, не позволяла достигнуть зоны метастабильности клеток, поэтому пришлось расширить диапазон концентрации соли в средах прединкубации до 2,0 моль/л NaCl (рис. 6.4). Дальнейшее увеличение концентрации NaCl было нецелесообразно из-за развития в этих средах изотермического гемолиза эритроцитов (рис. 3.1). При 37°C, по мере повышения концентрации NaCl на этапе предварительной инкубации до 1,0 моль/л (около 1760 мосмоль/кг), уровень гипертонического гемолиза эритроцитов быка значительно снижается (примерно в 3,5 раз) и достигает минимального значения. Характерной особенностью гипертонического гемолиза эритроцитов быка при 37°C является отсутствие хорошо выраженного увеличения уровня гипертонического гемолиза эритроцитов, предварительно проинкубированных в средах с концентрацией NaCl выше 1,0 моль/л. Таким образом, клетки быка фактически не достигают метастабильного состояния.

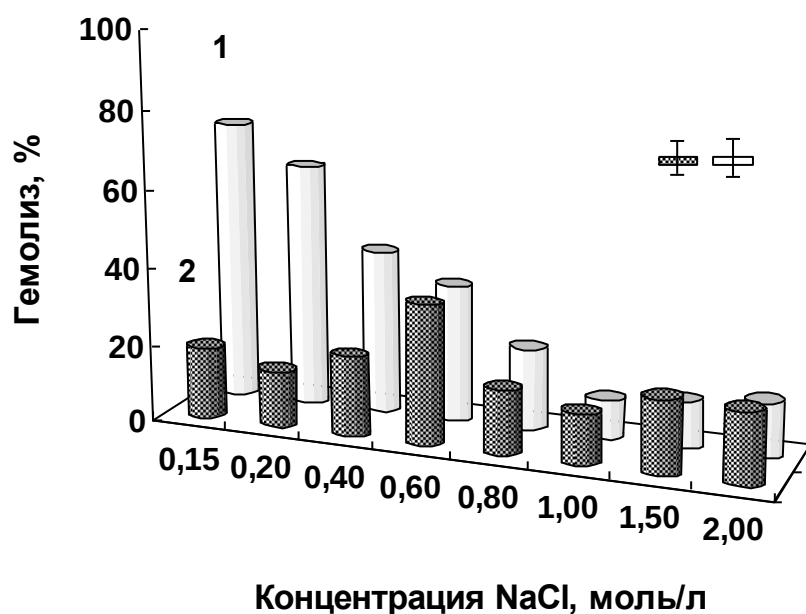


Рис. 6.4. Уровень гемолиза эритроцитов быка в 4,0 моль/л NaCl после предварительной инкубации в средах, содержащих 0,15–1,0 моль/л NaCl, при температуре 37 (1) и 0°C (2).

Следует отметить, что снижение температуры эксперимента до 0°C приводит к существенной модификации характера ответа предварительно обезвоженных клеток животных на действие 4,0 моль/л NaCl (рис. 6.2–6.4). Наблюдается «всплеск», т.е. резкое повышение гипертонической чувствительности клеток после пребывания в среде, содержащей 0,4 моль/л (крыса) или 0,6 моль/л NaCl (лошадь, бык). Для эритроцитов человека указанная особенность не выявлена.

Таким образом, не только эритроциты человека, но и клетки крысы, лошади и быка обладают способностью к формированию стабильного состояния в условиях ГШ при инкубировании клеток в средах с относительно невысокой осмоляльностью. Однако несомненно для эритроцитов человека этот эффект выражен в большей степени. Следовательно, можно говорить о некоторой универсальности подхода, связанного с частичным обезвоживанием клеток, в формировании состояния стабильности эритроцитов млекопитающих. Однако насколько эта стабильность проявляется и проявляется ли вообще при иных типах стресса, отличных от осмотического, является задачей следующего экспериментального подхода, связанного с изучением влияния механического шока на эти клетки.

Для изучения механического воздействия на эритроциты предложены разные методы и способы. Некоторые из них позволяют оценить деформацию только одного или нескольких эритроцитов [128], другие дают информацию о клеточной суспензии в целом [144, 164]. К группе последних относится способ механического шока эритроцитов человека, который осуществляется многократным продавливанием клеточной суспензии через медицинскую иглу с диаметром 0,3 мм [144, 164]. Его основным недостатком является низкая воспроизводимость результатов и небольшой объем суспензии, который недостаточен для полной и всесторонней характеристики клеток после действия стресса.

В нашей работе эритроциты млекопитающих подвергали действию механического шока по предложенному нами способу [135]. Клеточную

суспензию, помещенную в емкость, заполненную пластиковыми шариками, перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре (20–22°C) в течение 60 мин. После чего отбирали аликвоту клеточной суспензии для определения содержания K^+ и гемоглобина. Данный способ обеспечивает достаточно высокий уровень гемолиза эритроцитов и хорошую воспроизводимость результатов при существенном снижении трудоемкости процесса деструкции.

Эритроциты млекопитающих после перенесения в среды с различной концентрацией NaCl подвергали действию механического шока. Выбор сред обезвоживания 0,4 и 0,6 моль/л NaCl связан с тем, что после инкубирования в них эритроциты человека, крысы и лошади приобретают минимальную и максимальную чувствительность к действию 4,0 моль/л NaCl при 37°C.

На рис. 6.5 представлены значения гемолиза эритроцитов млекопитающих, которые находились в средах с различным содержанием NaCl и подвергались действию механического шока. В физиологической по тоничности среде наибольшую устойчивость к механическому шоку проявляют клетки быка и лошади. При сочетанном действии 0,4 моль/л NaCl и механического шока устойчивыми остаются клетки лошади, в то время как эритроциты быка теряют устойчивость, а клетки крысы характеризуются максимальным уровнем гемолитического повреждения.

Комбинированное действие механического шока и 0,6 моль/л NaCl проявляет большую устойчивость клеток человека и лошади по сравнению с эритроцитами быка и крысы.

Механический шок эритроцитов в 0,15 моль/л NaCl приводит к потере клетками млекопитающих катионов K^+ , выраженной в разной степени: от 30% для эритроцитов лошади до 60% для клеток быка (рис. 6.6). При осмотической нагрузке (0,4 моль/л NaCl) потеря ионов калия эритроцитами человека, крысы, быка увеличивается до 70–80% и клетками лошади до 45%. При повышении осмотической нагрузки до 0,6 моль/л NaCl, уровень потери K^+ эритроцитами всех исследованных млекопитающих составляет более 90%.

Таким образом, механический шок с дополнительной осмотической нагрузкой (0,4 и 0,6 моль/л NaCl) значительно увеличивает выход K^+ из клеток всех млекопитающих (по сравнению с физиологическим раствором).

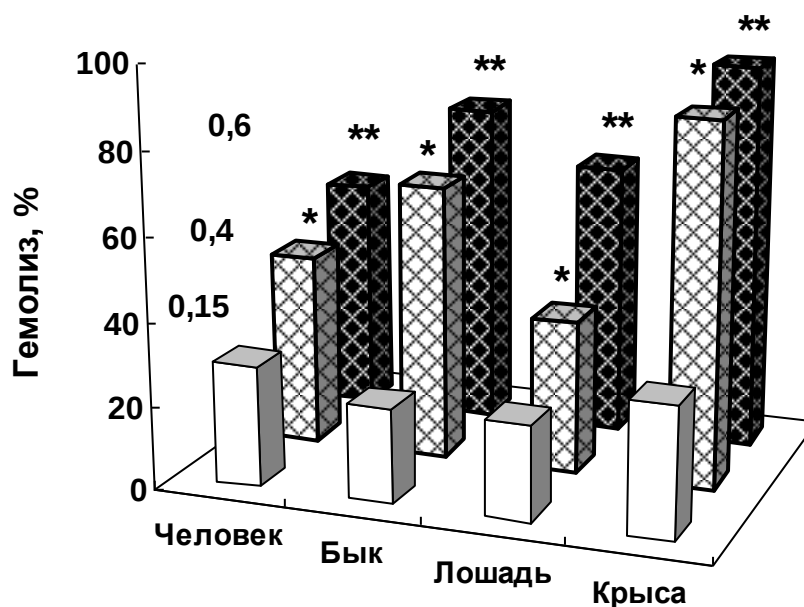


Рис. 6.5. Уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих в средах, содержащих 0,15, 0,4 и 0,6 моль/л NaCl, при действии механического шока. Концентрации NaCl указаны в моль/л.

Примечание: *, ** – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными в 0,15 и 0,4 моль/л NaCl, соответственно ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 9.

Эритроциты человека в растворах, содержащих 0,4 и 0,6 моль/л NaCl, оказались менее устойчивыми к механическому шоку по сравнению с клетками в физиологической среде (рис. 6.5 и 6.6), что практически согласуется с результатами, полученные другими методами [131]. Кроме того, такая же закономерность характерна и для эритроцитов других видов млекопитающих, поэтому можно предположить, что процессы, происходящие в исследованных нами клетках, сходны.

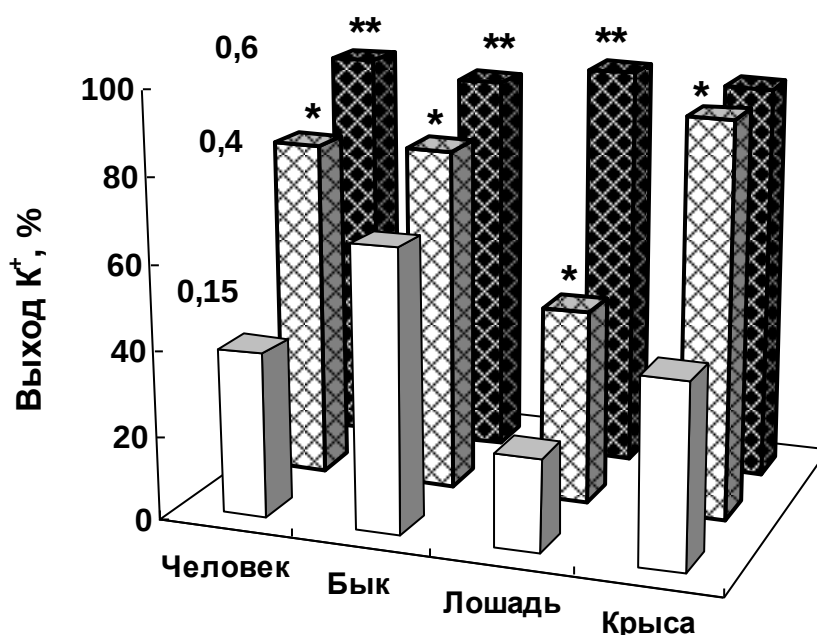


Рис. 6.6. Уровень выхода K^+ из эритроцитов млекопитающих в средах, содержащих 0,15, 0,4 и 0,6 моль/л NaCl, при действии механического шока. Концентрации NaCl указаны в моль/л.

Примечание: *, ** – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными в 0,15 и 0,4 моль/л NaCl, соответственно ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 9.

Панталер [131] методом микропипеточной аспирации изучала динамическую деформируемость эритроцитов человека в гипертонических солевых средах. По оценке времени релаксации клеток после их втягивания через микропипетку автор рассматривает втягивание эритроцита в среде, содержащей 0,15–0,3 моль/л NaCl, подобно втягиванию жидкой капли с упругой оболочкой, а поведение клетки в диапазоне концентрации NaCl 0,5–0,9 моль/л оценивает как поведение сплошного вязкоупругого тела. Автор [131] связывает полученные данные по увеличению времени прохождения эритроцитов через отверстие микропипетки с увеличением значений динамической жесткости клеточных мембран в условиях гипертонических сред

Анализ изменения уровня гемолиза и потери катионов K^+ эритроцитами млекопитающих по мере увеличения концентрации соли в среде позволил выявить следующие особенности. При сочетанном действии осмотической нагрузки и механического шока эритроцитов млекопитающих, видовые особенности в потере клетками катионов K^+ либо не выражены, либо выражены в меньшей степени, чем таковые в уровне гемолитического повреждения. Статистически значимое повышение уровня гемолиза эритроцитов, так и выхода катионов K^+ из клеток разных видов млекопитающих наблюдается при повышении концентрации соли в среде до 0,4 и 0,6 моль/л по сравнению с уровнем гемолитического повреждения в 0,15 и 0,4 моль/л NaCl соответственно. Таким образом, частичное обезвоживание эритроцитов млекопитающих (кроме клеток быка) в 0,4 моль/л NaCl, которое приводит к формированию стабильного состояния эритроцитов к действию ГШ, не обеспечивает устойчивость клеток к механическому шоку, т.е. стабильное состояние не является универсальным.

Таким образом, состояния «стабильности» и «метастабильности» клеток, выявленные в условиях гипертонического шока, не являются универсальными. Если частичное удаление внутриклеточной воды защищает эритроциты от гипертонического повреждения, то в случае механического шока защитный эффект частичного обезвоживания эритроцитов не проявляется.

Даже небольшие отклонения значения осмоляльности внеклеточной среды от изотонического как в сторону увеличения, так и снижения приводят к изменению объема эритроцитов [182, 399]. Исходя из вышеизложенного, представляло интерес изучить изменение объемных характеристик эритроцитов млекопитающих в гипертонических солевых растворах, в которых происходит формирование как стабильного, так и метастабильного состояния клеток относительно NaCl в концентрации 4,0 моль/л.

Понятие «гематокрит» изначально было введено в медицинской практике как часть объема крови, приходящаяся на долю форменных

элементов крови. Затем было внесено уточнение и гематокрит связывали с объемным содержанием эритроцитов в крови. В научно-исследовательских работах под гематокритом понимают объемным содержанием эритроцитов в клеточной суспензии и выражают в процентах. Таким образом, гематокрит является суммарной объемной характеристикой всех клеток и иначе его можно называть относительным объемом клеток.

Для оценки изменения относительного объема эритроцитов млекопитающих в средах, содержащих NaCl в диапазоне концентраций 0,2–1,0 моль/л, проводили измерение гематокрита микрогематокритным методом. Для сопоставления результатов изменения гематокрита эритроцитов при предварительном обезвоживании и реакций клеток на последующий гипертонический шок приведены величины гемолиза после перенесения эритроцитов млекопитающих из сред обезвоживания в 4,0 моль/л NaCl (рис. 6.7–6.10). Контролем служили эритроциты, которые инкубировали в физиологическом растворе при 37°C, их гематокрит принимали за 100%.

Эритроциты человека демонстрируют нелинейную зависимость гематокрита от концентрации NaCl в среде предварительной инкубации (рис. 6.7). Повышение концентрации соли до 0,4 моль/л приводит снижению величины гематокрита при 37 и 0°C, которое более выражено в последнем случае (при низкой температуре). При последующем повышении концентрации соли в среде наблюдается увеличение уровня гематокрита при обоих температурных режимах. Последнее связывают с потерей барьерных свойств эритроцитарной мембраны, в результате чего внеклеточные катионы Na^+ входят в клетку [301].

Сравнение характера изменения гематокрита эритроцитов человека в слабо и умеренно гипертонических средах (NaCl 0,2–1,0 моль/л) и уровня последующего гемолитического повреждения этих клеток в 4,0 моль/л NaCl свидетельствует о достаточно выраженном сходстве. Таким образом, можно отметить, что в данных экспериментальных условиях эритроциты человека с

минимальным значением гематокрита являются наиболее устойчивыми к повреждающему действию гипертонического шока.

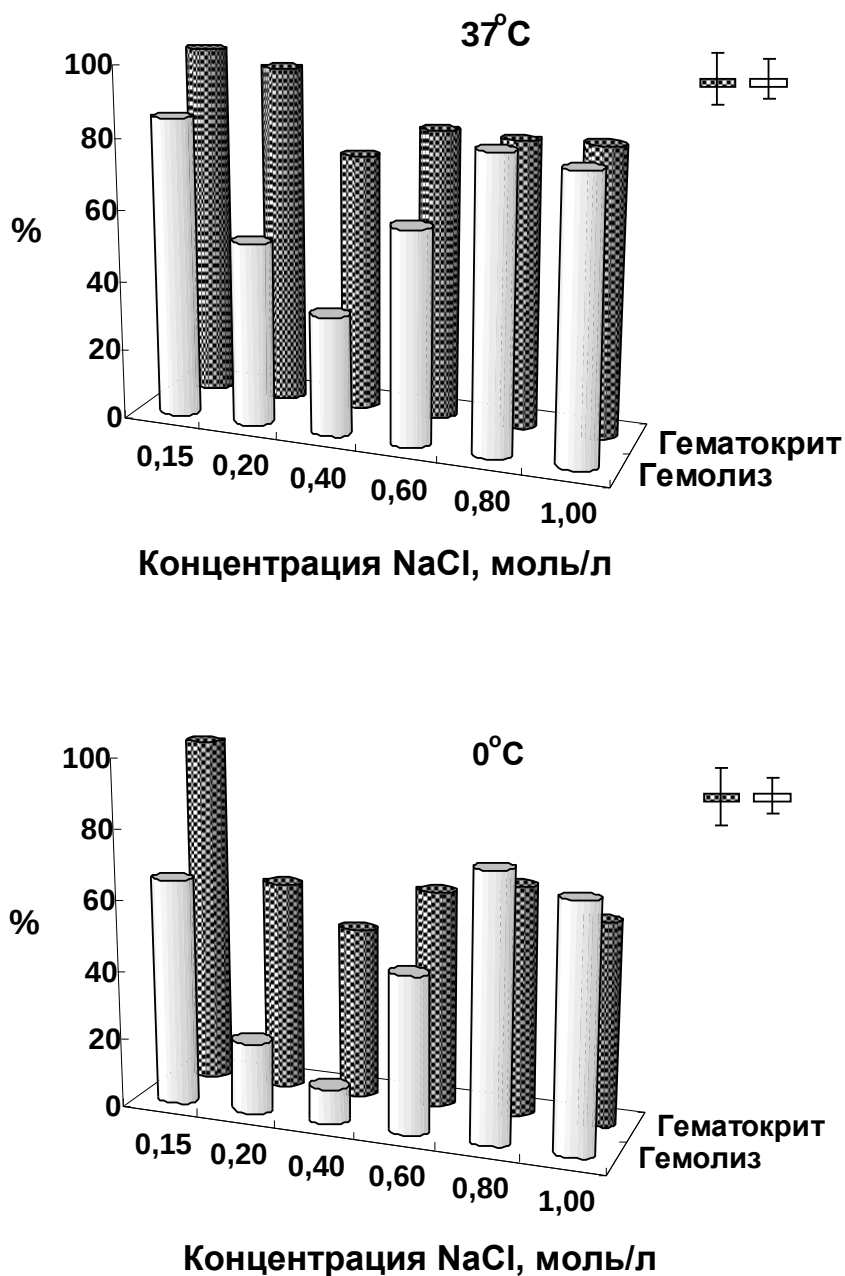


Рис. 6.7. Значения гематокрита эритроцитов человека в средах с различной концентрацией NaCl и величины гемолиза клеток при последующем перенесении в 4,0 моль/л NaCl при температуре 37 и 0°C. Гематокрит клеток в 0,15 моль/л NaCl при 37°C принят за 100%.

Характер изменения гематокрита эритроцитов лошади в общих чертах напоминает особенности изменения гематокрита эритроцитов человека (рис. 6.8). Минимальное значение гематокрита эритроцитов лошади

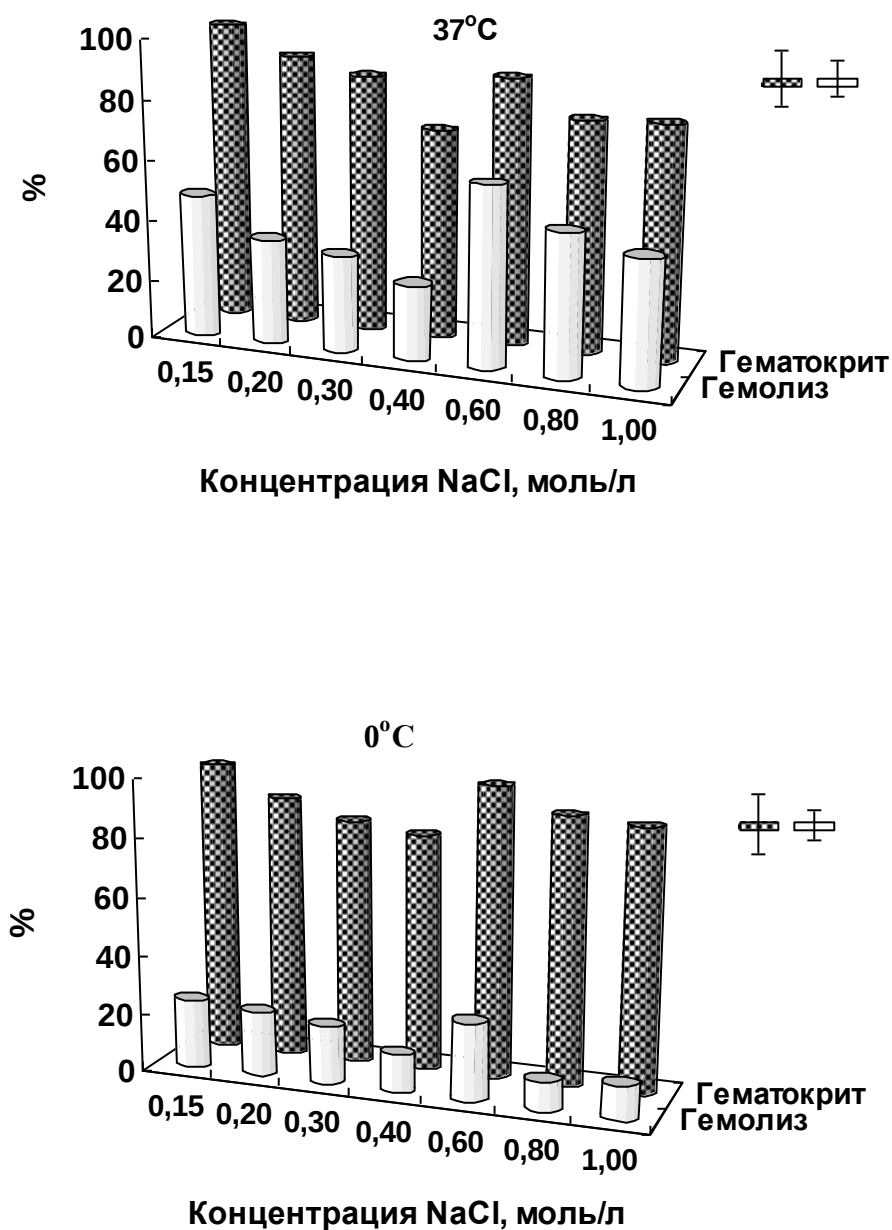


Рис. 6.8. Значения гематокрита эритроцитов лошади в средах с различной концентрацией NaCl и величины гемолиза клеток при последующем перенесении в 4,0 моль/л NaCl при температуре 37 и 0°C. Гематокрит клеток в 0,15 моль/л NaCl при 37°C принят за 100%.

регистрируется в среде, содержащей 0,4 моль/л NaCl, при 37 и 0°C. Последующее повышение концентрации соли (0,6–1,0 моль/л NaCl) приводит к увеличению значения клеточного гематокрита.

Сравнительная оценка динамики гематокрита эритроцитов лошади в слабо и умеренно гипертонических средах и уровня последующего гемолитического повреждения этих клеток при их перенесении в 4,0 моль/л NaCl (при обеих температурах) указывает на их синхронность. Таким образом, клетки лошади, проинкубированные в 0,4 моль/л, характеризуются минимальным значением гематокрита и максимальной устойчивостью к последующему действию 4,0 моль/л NaCl при 37 и 0°C.

Характер изменения гематокрита крысы при изменении осмолярности среды в общих чертах сходен с изменением относительного объема клеток лошади и человека в аналогичных условиях (рис. 6.9). При обоих температурных режимах (при 37 и 0°C) с ростом осмолярности среды наблюдается снижение величины гематокрита эритроцитов крысы, а затем его повышение. Минимальное значение гематокрита наблюдается при инкубировании эритроцитов крысы в средах, содержащих 0,3–0,4 моль/л NaCl, а в 0,6 моль/л NaCl отмечается резкое повышение гематокрита при 37 и 0°C.

При перенесении клеток крысы из указанных сред в 4,0 моль/л NaCl проявляются различия в гемолитическом повреждении клеток при выбранных температурных режимах. При 37°C клетки, проинкубированные в 0,3–0,4 моль/л NaCl и имеющие минимальное значение гематокрита, характеризуются наиболее низким уровнем гемолиза при перенесении этих клеток в 4,0 моль/л NaCl.

Однако при 0°C только эритроциты, подвергнутые гипертоническому шоку после инкубирования в 0,3 моль/л NaCl, характеризуются минимальным уровнем гемолиза, т.е. можно говорить о формировании в указанной солевой среде стабильного состояния клеток крысы. Увеличение концентрации соли до 0,4 моль/л не сопровождается значительным

изменением гематокрита клеток, однако их гемолитическое повреждение существенно увеличивается после перенесения этих клеток в 4,0 моль/л NaCl.

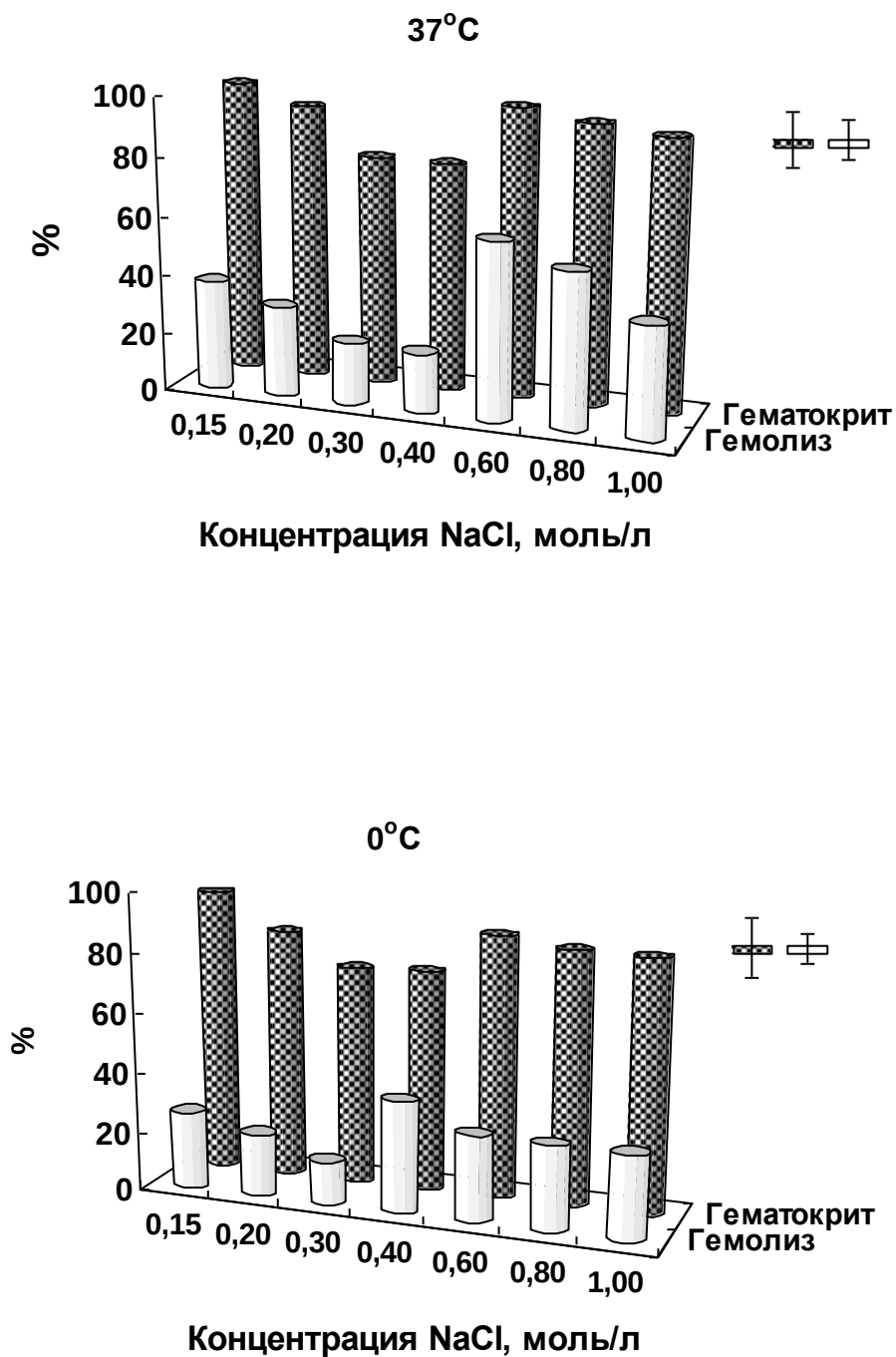


Рис. 6.9. Значения гематокрита эритроцитов крысы в средах с различной концентрацией NaCl и величины гемолиза клеток при последующем перенесении в 4,0 моль/л NaCl при температуре 37 и 0°C. Гематокрит клеток в 0,15 моль/л NaCl при 37°C принят за 100%.

Таким образом, инкубирование эритроцитов человека, лошади и крысы в средах умеренной тоничности приводит к формированию различных состояний клеток по отношению к последующему действию ГШ. Стабильное состояние формируется в диапазоне концентраций NaCl 0,3–0,4 моль/л, а метастабильное – 0,6 моль/л. Можно сказать, что эритроциты, характеризующиеся минимальным значением гематокрита, как правило, весьма устойчивы к последующему действию NaCl в концентрации 4,0 моль/л.

Устойчивое состояние эритроцитов крысы формируется при их инкубировании в среде с осмоляльностью 550–700 мосмоль/кг NaCl при 37°C и 550 мосмоль/кг NaCl при 0°C, а для клеток человека и лошади – 700 мосмоль/кг NaCl при обоих температурных режимах.

Анализ изменения гематокрита эритроцитов человека, лошади и крысы (при помещении в умеренно гипертонические среды) свидетельствует о незначительной его зависимости от температуры экспериментальных растворов (рис. 6.7–6.9).

Из рис. 6.10 видно, что характер изменения гематокрита эритроцитов быка в умеренно гипертонических средах при 37°C подчиняется ранее выявленной закономерности для клеток человека, лошади, крысы: наблюдается снижение величины гематокрита с последующим его повышением. Однако имеется несколько отличий. Во-первых, минимальное значение гематокрита эритроцитов быка наблюдается в среде с более высокой концентрацией соли (1,0 моль/л NaCl, осмоляльность 1760 мосмоль/кг), во вторых, последующее повышение гематокрита в средах с более высоким значением осмоляльности выражено в меньшей степени по сравнению с клетками других млекопитающих.

Сравнение динамики гематокрита эритроцитов быка в умеренно гипертонических средах и изменения гемолитического повреждения этих клеток при перенесении в 4,0 моль/ NaCl при 37°C позволяет говорить о высокой степени сходства. Клетки быка, характеризующиеся минимальным

значением гематокрита в среде, содержащей 1,0 моль/л NaCl, проявляют максимальную устойчивость при последующем перенесении в 4,0 моль/л NaCl.

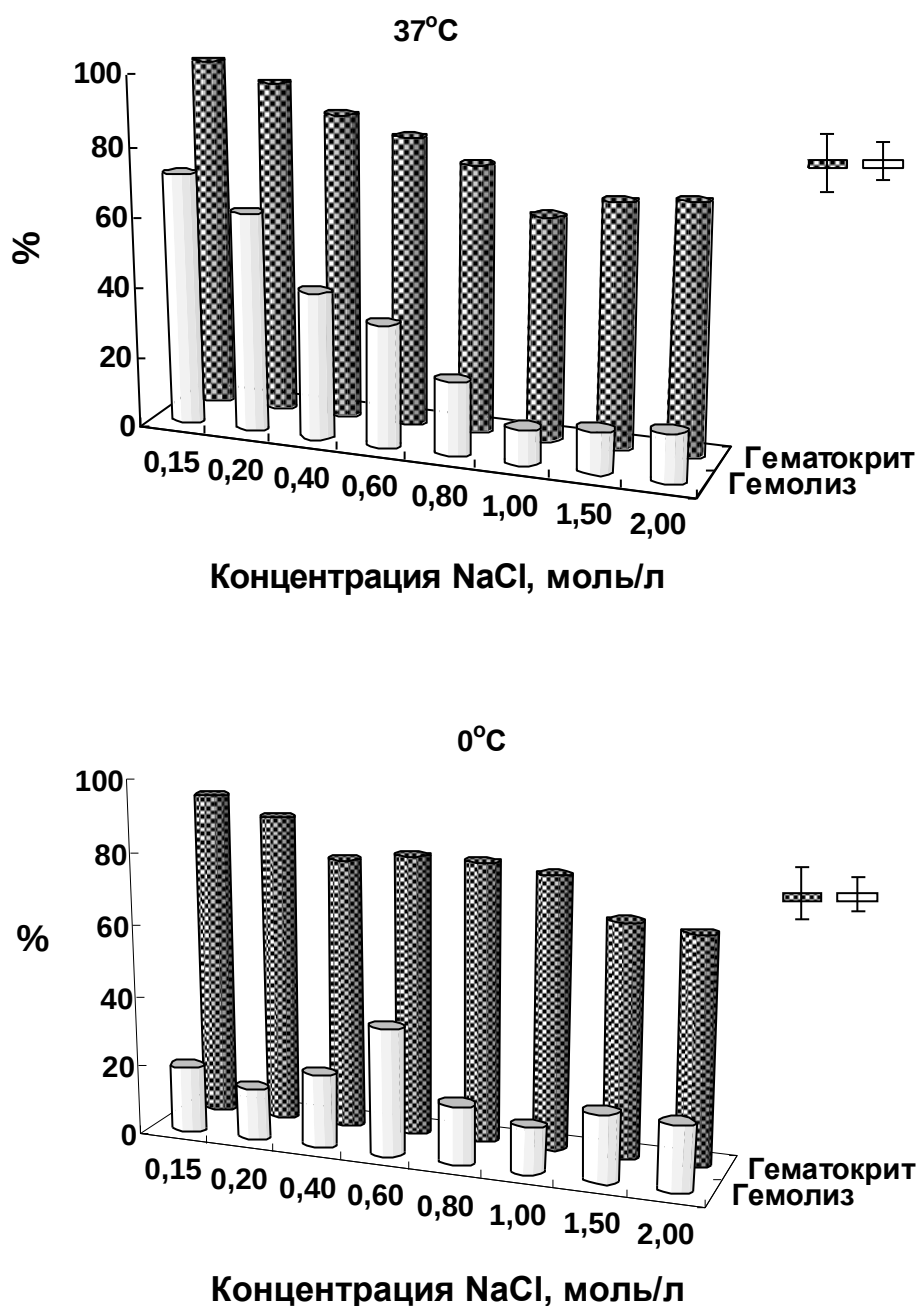


Рис. 6.10. Значения гематокрита эритроцитов быка в средах с различной концентрацией NaCl и величины гемолиза клеток при последующем перенесении в 4,0 моль/л NaCl при температуре 37 и 0°C. Гематокрит клеток в 0,15 моль/л NaCl при 37°C принят за 100%.

При 0°C с увеличением концентрации NaCl в среде до 0,6 моль/л и выше 1,0 моль/л наблюдается снижение значений гематокрита эритроцитов быка, т.е. динамика гематокрита эритроцитов в гипертонических средах при низкой температуре несколько отличается от таковой при 37°C. Кроме того, следует отметить, что при низкой температуре изменения гематокрита эритроцитов выражены в меньшей степени. Клетки, которые характеризуются минимальным уровнем гемолитического повреждения при перенесении в 4,0 моль/л NaCl, имеют гематокрит (в 1,0 моль/л NaCl), величина которого в 1,5 ниже по сравнению с контрольными эритроцитами.

Проведенные исследования показали фактически общность в характере изменения гематокрита эритроцитов млекопитающих при увеличении осмоляльности среды инкубирования. Резкое снижение значения гематокрита до минимального значения в среде 0,4 моль/л NaCl, сопровождающееся его последующим повышением, хорошо выражено для эритроцитов человека, лошади и крысы при обоих температурных режимах. Исключением являются клетки быка, гематокрит которых достигает минимального значения в 1,0 моль/л NaCl

Гематокрит является интегральным показателем эритроцитов, значение которого зависит как от объема отдельно взятых клеток, их морфологических характеристик, так и особенности упаковки этих клеток, т.е. их взаимного расположение.

В работе, в которой измерение объема клеток проводили с помощью электронного счетчика частиц [515], показано значительно изменение объема клетки в более широком концентрационном диапазоне по сравнению с нашими данными. Если минимальное значение гематокрита регистрируется в средах, содержащих фактически 0,3–0,4 моль/л NaCl, что соответствует осмоляльности 550–700 мосмоль/кг, то резкое изменение объема клетки человека регистрируется в более широком диапазоне вплоть до 1349 мосмоль/кг, после чего наблюдаются и дальнейшие незначительные (менее выраженные) изменения. В работе [469] показана возможность

использования гематокритного метода для измерения объема эритроцитов с введением соответствующих поправок.

В среде, содержащей NaCl в концентрации 0,6 моль/л и выше, наблюдается рост суммарного объема эритроцитов (что собственно и является гематокритом). Наблюдаемое увеличение гематокрита не обусловлено ростом объема отдельно взятых эритроцитов, поскольку в этих средах, наоборот, отмечается снижение объема клеток [515]. Кроме того, было проведено исследование морфологических особенностей эритроцитов млекопитающих (человек, лошадь, крыса, кролик и бык) в гипертонических средах (0,4 моль/л и 0,6 моль/л NaCl) методом световой микроскопии [11]. Выявлено практически одинаковое изменение формы клеток быка, с одной стороны, и эритроцитов остальных млекопитающих, с другой, хотя минимальное значение гематокрита эритроцитов указанных млекопитающих и последующее его повышение регистрируется при различных значениях осмоляльности среды (рис. 6.7–6.10).

Исходя из выше изложенного, определяющее значение в величине гематокрита может отводиться особенностям упаковки клеток, которые не зависят от их морфологических характеристик, а определяются модификацией некоторых физико-химических свойств клеток. Так, в гипертонических солевых средах внеклеточные катионы Na^+ могут входить в клетки по концентрационному градиенту [301], а внутриклеточные катионы K^+ могут покидать их (рис. 4.3), что свидетельствует о нарушении барьерных свойств мембраны

Таким образом, можно допустить, что в результате нарушения барьерных свойств эритроцитарной мембраны может происходить ряд изменений, которые в совокупности оказывают влияние на характер упаковки клеток. Это находит свое проявление в относительном увеличении гематокрита эритроцитов в среде определенной осмоляльности (рис. 6.7–6.10).

Анализ характера изменения гематокрита эритроцитов млекопитающих в слабо и умеренно гипертонических средах (NaCl 0,2–1,0 моль/л) и уровня последующего гемолитического повреждения этих клеток при их перенесении в 4,0 моль/л NaCl показывает достаточно выраженное сходство. Эритроциты человека и животных с минимальным значением гематокрита являются наиболее устойчивыми к повреждающему действию гипертонического шока. Снижение гематокрита эритроцитов до минимально возможного значения приводит к концентрированию белков и повышению вязкости цитоплазмы [398, 399].

В работе [5] при исследовании изменения гематокрита эритроцитов млекопитающих в слабо и умеренно гипертонических растворах сахарозы (0,2–1,2 моль/л), приготовленных на физиологическом растворе, и уровня гемолиза при последующем перенесении клеток в 4,0 моль/л NaCl установлено, что клетки с минимальным значением гематокрита максимально устойчивы к последующему действию ГШ. Анализ наших результатов и данных работы [5] позволяет полагать, что ведущая роль в формировании стабильного состояния клеток млекопитающих отводится осмоляльности среды предварительной инкубации клеток млекопитающих, а не ионной силе раствора.

Когда эритроциты млекопитающих, находящиеся в изотонической среде, переносят в 4,0 моль/л NaCl , то клетки подвергаются резкому изменению объема в результате быстрого выхода внутриклеточной воды, что и оказывает существенное влияние на целостность мембраны и цитоскелета. По мере роста осмоляльности среды на этапе предварительной инкубации клетки теряют свободную воду, следствием чего является резкое уменьшение их объема (рис. 6.7–6.10). При перенесении таких обезвоженных эритроцитов в 4,0 моль/л NaCl амплитуда так называемого «объемного сдвига» снижается в момент действия гипертонического стресса (по сравнению с контрольными необезвоженными клетками).

По-видимому, в среде с осмоляльностью порядка 700 мосмоль/кг (0,4 моль/л NaCl) объем клеток человека, лошади, крысы уменьшается до такого значения, которое обеспечивает максимально возможное устранение объемного сдвига при последующем перенесении эритроцитов в 4,0 моль/л NaCl, что и проявляется в минимальном уровне гипертонического гемолиза. При этом следует отметить, что при 0°C значения гипертонического гемолиза предварительно обезвоженных эритроцитов человека (0,4 моль/л NaCl) в основном ниже, чем при 37°C (рис. 6.1). Поскольку значение гематокрита эритроцитов в 0,4 моль/л NaCl при 0 ниже, чем при 37°C, то в первом случае клетки подвергаются меньшей амплитуде объемных изменений при их перенесении в 4,0 моль/л NaCl и, как следствие, фиксируется более низкий уровень их гемолитического повреждения.

Дальнейшее повышение концентрации среды этапа предварительного инкубирования ($> 0,4$ моль/л NaCl) приводит к тому, что клетки уже не способны реагировать на увеличение осмолярности дополнительным уменьшением объема. В этом случае может происходить потеря эритроцитами не только свободной, но и части связанной воды [201]. Это приводит к формированию такого состояния клеток, метастабильность которого проявляется при перенесении эритроцитов в 4,0 моль/л NaCl в повышении уровня гемолиза клеток.

При помещении эритроцитов в среду, содержащую непроникающее в клетку вещество, клетка ведет себя как осмометр: сжимается или набухает в гипертоническом или гипотоническом растворе соответственно. Однако тщательный анализ показал, что эритроцит ведет себя не как идеальный осмометр, что свидетельствует о наличии внутриклеточной фракции воды, которая является осмотически неактивной [309]. Оценка клеточного объема эритроцитов человека при замораживании до -40°C , осуществленная методом дифференциальной сканирующей калориметрии, составляет 53%, а его минимальная величина в гипертонических средах (осмоляльность 3186 мосмоль/кг), измеренная с помощью электронного счетчика частиц

(Multisizer 3, Beckman Coulter Inc, США) – 57% [515]. Оба результата показывают, что 34–40% внутриклеточной воды является связанной и не участвует в осмотическом ответе. Эти результаты согласуются с существующими данными [493]. Авторы работы [201] полагают, что в клетках различного типа фракция осмотически активной воды составляет меньше половины от общего содержания внутриклеточной воды. Скорость самодиффузии воды, измеренная в клетках разных типов, составляет примерно половину от аналогичной величины в «объемной воде», что указывает на то, что значительная часть клеточной воды в этих клетках медленнее по сравнению с объемной водой [201].

Предполагается, что главным источником неидеального осмотического поведения и подвижности внутриклеточной воды является взаимодействие вода-вещество. Для поддержания определенного количества объемной воды в клетке необходимы условия, которые вызывают разрушение структурированной воды. К ним могут относиться изменение подвижности веществ (полимеризация-деполимеризация или адсорбция-десорбция к более крупному веществу или элементу цитоскелета), увеличение температуры, изменение pH в сторону изоэлектрической точки белка, фосфорилирование-дефосфорилирование органических соединений или изменение концентрации веществ, которые структурируют и деструктурируют воду (например, K^+ и гидрофильные аминокислоты деструктурируют воду). Кроме вышесказанного, конформационное состояние белков значительно изменяет долю осмотически неактивной воды [201, 242].

Исходя из этого, можно полагать, что в результате инкубирования эритроцитов в средах с NaCl 0,6 моль/л и выше происходит выход не только объемной воды, но и частичное удаление структурносвязанной (вокруг белка может быть от 2 до 8 слоев структурносвязанной воды [201]). В результате этого на молекулярном уровне может происходить нарушение нативной конфигурации эритроцитарных белков, а на клеточном – нарушение барьерных свойств мембраны по отношению к катионам. Последующее

резкое изменение осмотических условий (перенесение клеток в 4,0 моль/л NaCl) проявляет нарушения, развивающиеся на этапе предварительной инкубации и лежащие в основе метастабильного состояния эритроцитов, что выявляется в развитии гемолитического повреждения клеток (рис. 6.1–6.4).

Поскольку 95% эритроцитарных белков представлено гемоглобином, поэтому основная роль в связывании воды отводится именно этому белку [309]. Сравнительный анализ гидрофильности молекул гемоглобина эритроцитов разных видов млекопитающих показал высокую гидрофильность гемоглобина верблюда. Эти клетки верблюда характеризуются необычайно высокой осмотической устойчивостью. Авторы работы [428] объясняют эту особенность способностью высокогидрофильных молекул гемоглобина связывать внутриклеточную воду. Фракция осмотически неактивной воды в эритроцитах верблюда почти в 3 раза больше, чем в эритроцитах человека (~65 vs ~20%). В то же время в растворе гемоглобина верблюда *in vitro* количество осмотически неактивной воды только в 2 раза выше по сравнению с гемоглобином человека. Проведенная оценка водной диффузии методом ЯМР спектроскопии показала, что кажущийся коэффициент диффузии в эритроцитах верблюда примерно на 15% ниже, чем в эритроцитах человека. В том случае, когда эритроциты человека подвергаются обезвоживанию до уровня, характерного для эритроцитов верблюда, то их диффузионные и осмотические свойства воды становятся схожими. Это показывает, что более низкое значение кажущегося коэффициента диффузии связано с более выраженным увеличением осмотически неактивной водной фракции. Авторы [428] полагают, что повышенная гидрофильность гемоглобина верблюда позволяет не только более обширное связывание воды, но и более плотную упаковку гемоглобина *in vivo*, что, в свою очередь, обуславливает более низкое значение кажущегося коэффициента диффузии и повышенную осмотическую устойчивость. Предполагается [428], что изменения аминокислотной последовательности гемоглобина верблюда может быть частью процесса

естественного отбора, направленного на защиту этих животных от осмотической дегидратации в условиях засухи.

Сравнительный анализ первичной структуры гемоглобина, гидрофобности-гидрофильности гемоглобина и содержания воды в эритроцитах различных видов млекопитающих показал положительную линейную корреляцию между величиной осмотически неактивной водной фракции эритроцитов и гидрофильностью гемоглобина [428].

Оценка гидрофильности гемоглобина и величины осмотически неактивной водной фракции эритроцитов быка и человека показала как более высокую гидрофильность макромолекул быка [327], так и более высокое содержание фракции осмотически неактивной воды в его клетке [218]. Возможно выявленные в работе особенности эритроцитов быка, а именно формирование стабильного состояния клеток при инкубировании в 1,0 моль/л NaCl (рис. 6.4, 6.10) в отличие от клеток других млекопитающих обусловлены более высоким содержанием осмотически неактивной воды (33,2%) по сравнению с клетками человека (25,8%) [218].

Несколько слов о гипотезе минимального объема Меримена [395]. Автор данной гипотезы связывал развитие повреждения эритроцитов человека при замораживании с достижением клетками критического минимального гематокрита. Он указывал, что клетки при этом достигают объема примерно 57% от нормального [396]. Полученная нами оценка минимального гематокрита эритроцитов человека при 0°C дает примерно такую величину, однако эти клетки очень устойчивы к последующему действию основного фактора криоповреждения – ГШ. Клетки становятся чувствительными к ГШ в том случае, когда их предварительно инкубировали в среде с более высокой концентрацией NaCl (0,6 моль/л), когда наблюдается увеличение гематокрита. Таким образом, наши результаты, которые связывают между собой гематокрит и уровень последующего гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих, не вписываются в рамки предложенной гипотезы криоповреждения Меримена и ставят ее под

сомнение, что приводит к появлению вопросов и проблем, нуждающихся в последующем исследовании.

6.2. Влияние криопротекторов и температуры на чувствительность эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку

Для успешной разработки методов криоконсервирования необходима информация, касающаяся геометрических параметров клеток (объем и площадь поверхности), содержания осмотически активной воды и проницаемости клеточных мембран для криопротекторов [17, 19]. Последний из указанных биофизических параметров определяется как свойствами биологических мембран, так и зависит от особенностей криопротекторных молекул. Эти знания, в определенной степени, облегчают задачу криобиологов при разработке метода криоконсервирования достаточно хорошо изученного биологического материала. Но для новых объектов до сих пор приходится эмпирически подбирать криопротекторы, состав криозащитных сред, а также оптимальные режимы охлаждения и замораживания.

Наибольшую опасность при замораживании представляет механическое повреждение мембран клеток образующимися кристаллами льда [362]. Образуюсь как вне, так и, что гораздо опаснее, внутри клеток, они разрывают эти мембраны. Для защиты клеток от повреждения при замораживании используют криопротекторы [222]. Большое количество веществ обладает криопротекторными свойствами, но в медико-биологической и лабораторной практике используют не более десятка соединений. Они относятся к двум группам: проникающие внутрь клетки (например, диметилсульфоксид, ацетамид, пропиленгликоль, глицерин, этиленгликоль) и не проникающие (полиэтиленоксиды, фиколл, сахароза, трегалоза и др.). Механизм действия непроникающих криопротекторов

заключается в обезвоживании клетки, в результате чего снижается вероятность образования кристаллов внутриклеточного льда. Однако удаление воды приводит к повышению концентрации внутриклеточных солей вплоть до значений, при которых происходит денатурация белка. Криопротекторы же первого типа (проникающие) снижают не только температуру замерзания, но и степень концентрирования внутриклеточных солей, образующуюся при кристаллизации, что предотвращает денатурацию белков [19, 222, 362].

В любом случае общим в механизмах действия криопротекторов является их способность оказывать влияние на воду, что в итоге приводит к замедлению роста кристаллов льда. Это предупреждает быстрое нарастание концентрации солей во внеклеточной среде и повреждение клеток в результате осмотического шока.

От правильного выбора криопротектора, его концентрации, условий добавления к клеточной суспензии (температура и скорость добавления), продолжительности экспонирования на этапе, предшествующем замораживанию, зависит в значительной мере успех криоконсервирования биологического объекта.

Подбор оптимальных условий осуществляется непосредственно с использованием процедуры замораживания. Криопротектор в той или иной концентрации с различной скоростью при определенной температуре (в различных комбинациях) добавляют, например, к суспензии эритроцитов, после чего ее замораживают до -196°C и лишь после размораживания возможно оценить эффективность той или иной используемой комбинации факторов, определяющих исходное состояние клетки перед замораживанием. Это огромная работа, трудоемкая, которая требует определенных материальных затрат. Разработка подходов, которые позволили бы осуществить скрининг оптимальных условий добавления криопротекторов путем оценки состояния эритроцитов, минуя этап замораживания-отогрева биологического материала, без сомнения является целесообразной.

Поскольку одним из основных факторов криповреждения является концентрирование солей при вымораживании внеклеточной воды, в работе использовали модельный подход, заключающийся в перенесении эритроцитов в раствор, содержащий 4,0 моль/л NaCl, при положительной температуре, т.е. гипертонический шок.

Некоторые из полиэтиленоксидов, представляющие собой искусственные полимерные соединения с мономерным звеном $(-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-)$ и различной степенью полимеризации, используется в криобиологических исследованиях [3, 13, 96, 98]. В частности, полиэтиленоксид с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500), который является непроникающим, применяется при низкотемпературном хранении эритроцитов человека, поскольку обеспечивает высокую сохранность клеток после размораживания, хотя и отмечается их нестабильность при последующем перенесении в физиологические условия [14, 62, 106, 444].

Эффекты полиэтиленоксидов (ПЭО) или в иностранной литературе полиэтиленгликолей (ПЭГ) связаны с их способностью влиять на состояние водной среды. Так, известно, что ПЭО-1500 изменяет диэлектрическую проницаемость ($\epsilon = 70,5$ для раствора ПЭО-1500 по сравнению с $\epsilon = 76,5$ для 150 ммоль/л NaCl [81]). Известно, что под влиянием физических воздействий и химических компонентов изменяется структура воды, а, следовательно, и ее динамика. В работе [34] исследовали влияние относительно малых концентраций ПЭГ-1500 (0,1–2%) на характеристики динамики воды. При концентрации 0,1% (мас.) наблюдается максимальное значение роли коллективных движений при минимальном значении роли одночастичных движений. При всех концентрациях ПЭГ-1500 длина прыжка молекул воды в растворах ПЭГ превышает значение прыжка для самой воды.

Согласно данным работы [115], при повышении концентрации ПЭГа происходит увеличение числа молекул воды, связывающихся с мономерным звеном полимера. При достижении концентрации ПЭГа $38 \div 45\%$ вся вода становится структурированной.

В работе [62] показана целесообразность использования данного криопротектора (ПЭО-1500) при охлаждении эритроцитов млекопитающих до -196°C , а также выявлены видовые различия сохранности клеток после их замораживания-отогрева в зависимости от условий предварительной инкубации клеток с криопротектором.

В данной серии экспериментов изучали влияние непроникающего криопротектора ПЭО-1500 на чувствительность эритроцитов разных видов млекопитающих к действию ГШ при 37 и 0°C . Были использованы клетки человека, быка и лошади, которые различаются между собой как по значениям поверхностно-объемного отношения, доминирующему внутриклеточному катиону, так и составу цитоскелет-мембранного комплекса [205, 260, 493].

Эритроциты человека и лошади содержат в качестве доминирующего катиона K^{+} , а быка – Na^{+} [493]. Особенностью цитоскелет-мембранного комплекса исследуемых эритроцитов является отсутствие в эритроцитах лошади белка полосы 4.2, который относится к якорным белкам, связывающим интегральные белки с цитоскелетным комплексом [260]. Эритроцитарные мембраны быка, в отличие от эритроцитов человека и лошади, обогащены сфингомиелином и характеризуются высоким содержанием холестерина [205].

На этапе, предшествующем действию ГШ, эритроциты млекопитающих инкубировали в растворах ПЭО-1500, приготовленных на физиологической среде, при определенной температуре в течение 2 мин (после чего производили измерение гематокрита). На этапе собственно ГШ клетки переносили на 5 мин в раствор, содержащий 4,0 моль/л NaCl , без изменения температуры (после чего определяли уровень гемолитического повреждения клеток). Использовали два температурных режима – 0 и 37°C .

На рис. 6.11–6.13 представлены величины гипертонического гемолиза эритроцитов человека, лошади и быка, которые предварительно были

проинкубированы в средах, содержащих разные концентрации ПЭО-1500, при 37 и 0°C.

При 37°C наблюдается снижение уровня гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих по мере увеличения концентрации ПЭО-1500. Минимальный уровень повреждения эритроцитов человека и лошади отмечается после обработки клеток ПЭО-1500 в концентрации 20%, и он ниже, чем для клеток быка.

При 0°C также отмечается концентрационно-зависимое снижение уровня гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих. Эта зависимость хорошо выражена для эритроцитов человека. Несмотря на изначально низкий уровень гипертонического гемолиза эритроцитов лошади и быка при 0°C (около 20%), предобработка клеток ПЭО-1500 позволяет снизить и его.

Следует отметить, что по сравнению с 37°C при 0°C минимальное значение гемолиза млекопитающих ниже и достигается раньше, т.е. при более низких концентрациях криопротектора. При использовании ПЭО-1500 в диапазоне высоких концентраций (15–20%) различия в уровне гипертонического гемолиза эритроцитов при обеих температурах (37 и 0°C) тем меньше, чем выше концентрация криопротектора.

Поскольку ПЭО-1500 является непроникающим криопротектором, то было целесообразно исследовать изменение значения гематокрита эритроцитов человека, лошади и быка в растворах криопротектора при 37 и 0°C (рис. 6.11–6.13, заштрихованные столбики). Показания гематокрита являются отражением изменения относительного объема клеток в суспензии. Видно, что при 37°C по мере увеличения концентрации ПЭО-1500 в среде

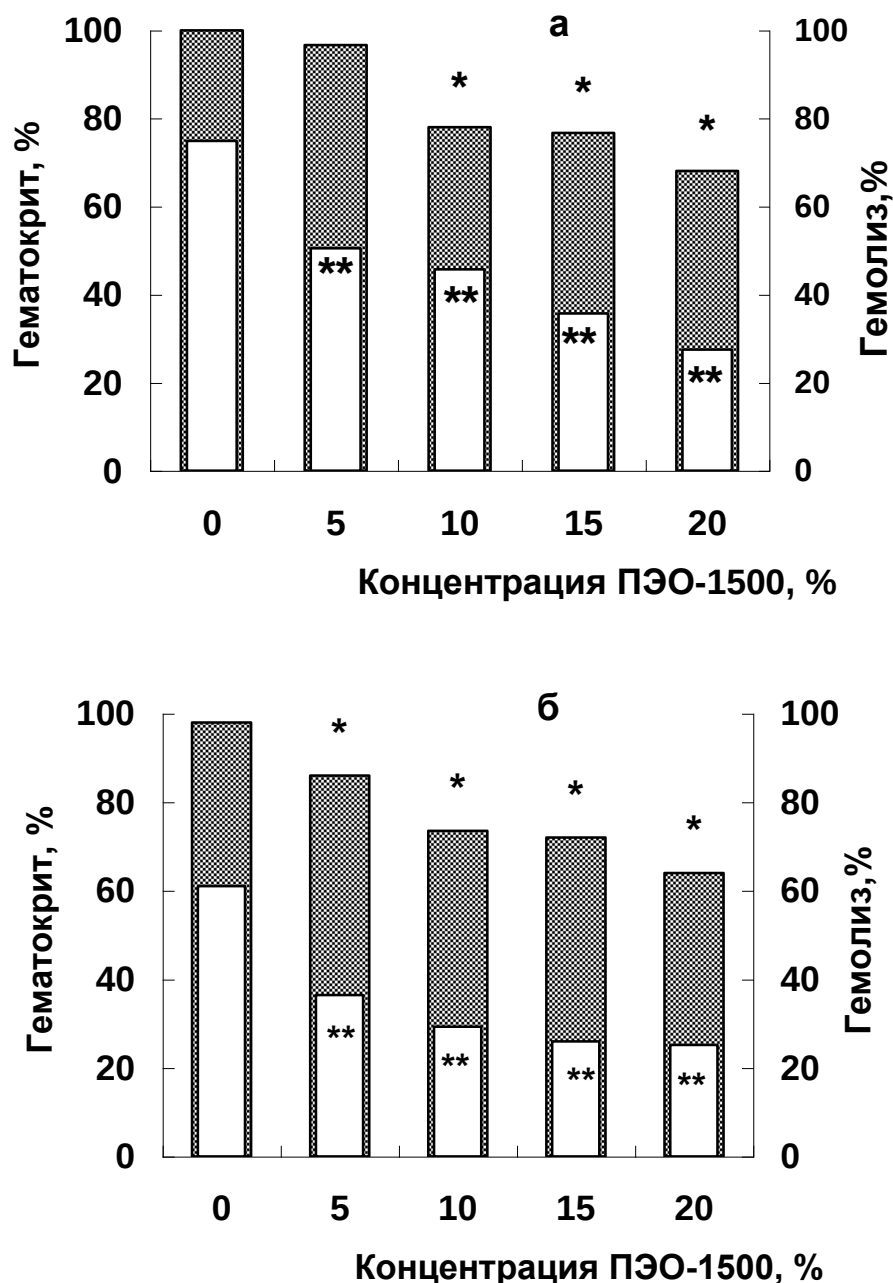


Рис. 6.11. Влияние ПЭО–1500 на значения гематокрита эритроцитов человека () и уровень гемолиза этих клеток при последующем перенесении в 4,0 моль/л NaCl () при температуре 37 (а) и 0°C (б). Гематокрит клеток в 0,15 моль/л NaCl при 37°C принят за 100%.

Примечание. *, ** – статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p < 0,05$.

гематокрит эритроцитов млекопитающих снижается и достигает минимальных значений при 20% ПЭО-1500. При 0°C минимальное значение

гематокрита клетки достигают при более низкой концентрации криопротектора (15%).

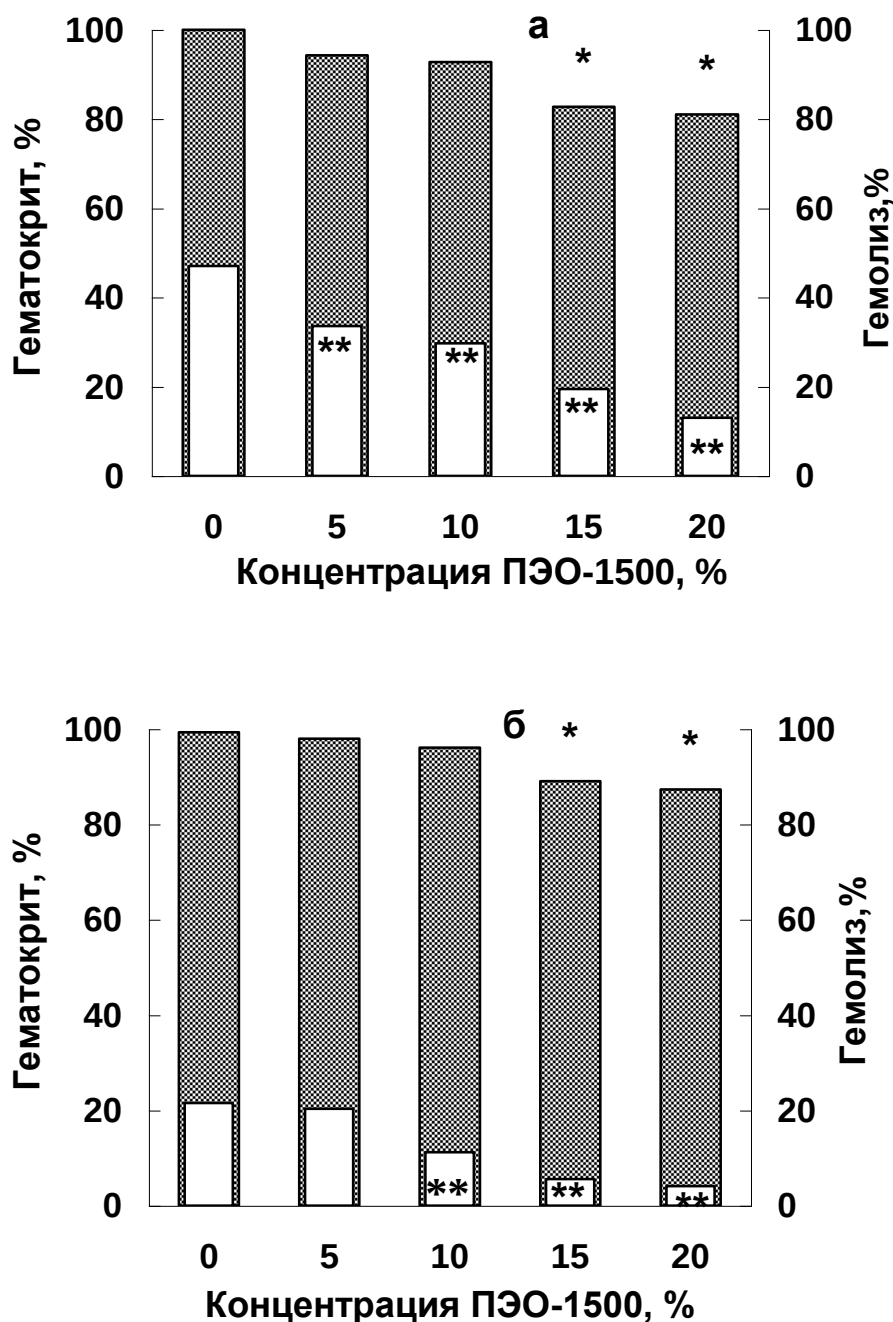


Рис. 6.12. Влияние ПЭО–1500 на значение гематокрита эритроцитов лошади (■) и уровень гемолиза этих клеток при последующем перенесении в 4,0 моль/л NaCl (□) при температуре 37 (а) и 0°C (б). Гематокрит клеток в 0,15 моль/л NaCl при 37°C принят за 100%.

Примечание. *, ** – статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p < 0,05$;

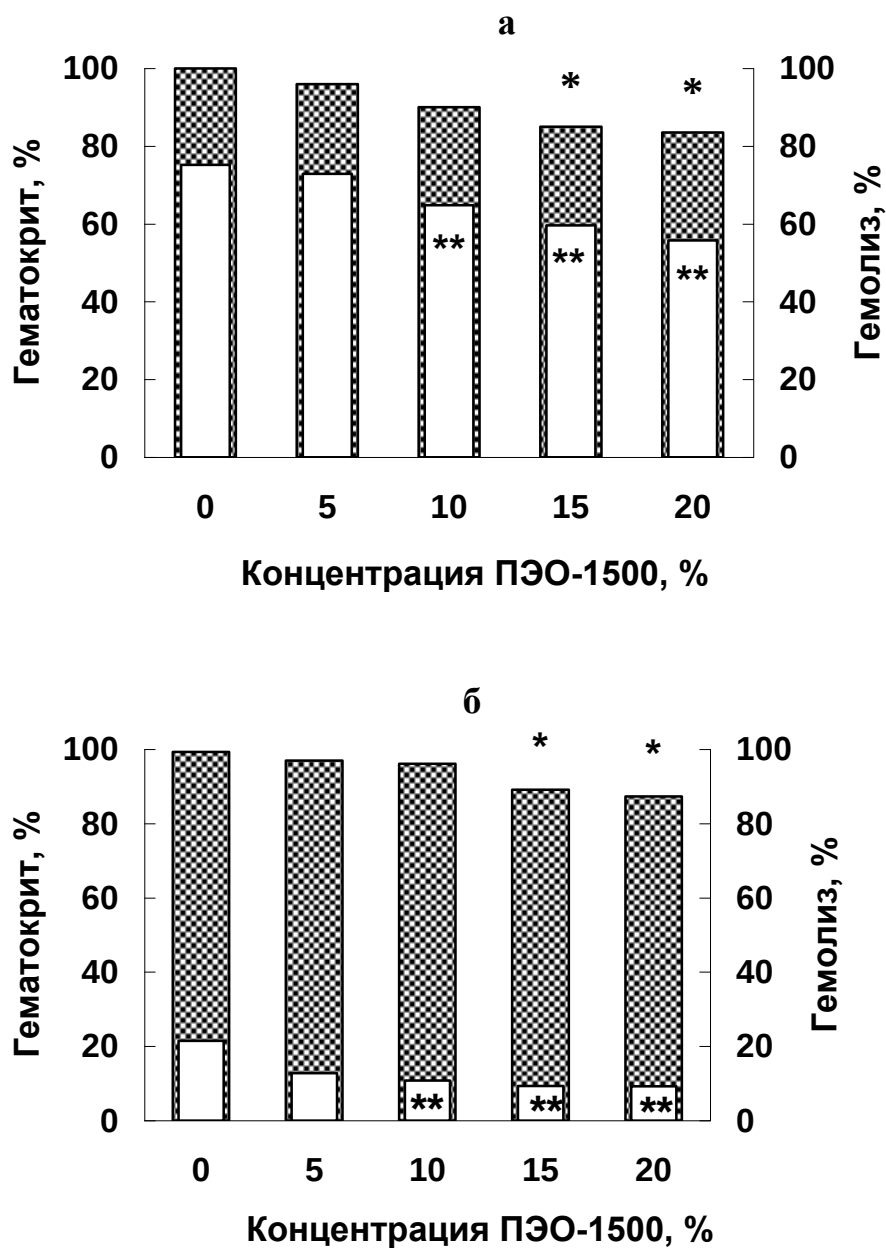


Рис. 6.13. Влияние ПЭО–1500 на значение гематокрита эритроцитов быка (■) и уровень гемолиза этих клеток при последующем перенесении в 4,0 моль/л NaCl (□) при температуре 37 и 0°C. Гематокрит клеток в 0,15 моль/л NaCl при 37°C принят за 100%.

Примечание. *, ** – статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p < 0,05$;

Следует отметить, что уменьшение клеточного объема эритроцитов млекопитающих в концентрированных растворах криопротектора сопровождается снижением уровня гипертонического гемолиза этих клеток в 4,0 моль/л NaCl (рис. 6.11–6.13).

Представленные результаты свидетельствуют, что защитный эффект ПЭО-1500 (15%) в условиях гипертонического шока эритроцитов млекопитающих выражен в большей степени при 0°C, чем при 37°C. При 0°C максимальная устойчивость эритроцитов человека и лошади к гипертоническому шоку (4,0 моль/л NaCl) формируется в криопротекторной (ПЭО-1500) среде, осмоляльность которой (700 мосмоль/кг) соответствует значениям осмоляльности солевых (рис. 6.1, 6.2) и сахарозных сред [11], после инкубации в которых клетки становятся максимально устойчивыми к последующему действию гипертонического шока.

Таким образом, независимо от качественного состава среды, в которой происходит предварительное обезвоживание клеток человека и лошади, наблюдаются максимальное изменение клеточного объема и минимальный уровень гипертонического повреждения этих эритроцитов при перенесении в 4,0 моль/л NaCl.

Следует отметить, что при использовании непроникающего криопротектора ПЭО-1500 (5–20%) наблюдается снижение гематокрита и уровня последующего гипертонического гемолиза эритроцитов быка в 4,0 моль/л NaCl (рис. 6.13). Однако тех минимальных значений клеточного объема и уровня гипертонического повреждения клеток, полученных при использовании в качестве среды обезвоживания 1,0 моль/л NaCl (рис. 6.10), не удастся достигнуть. Эритроциты быка достигают устойчивого состояния в среде с осмоляльностью около 1760 мосмоль/кг (1,0 моль/л NaCl) (рис. 6.10), однако использовать растворы ПЭО-1500 подобной осмоляльности для работы с биологическим материалом не предоставляется возможным.

Полиэтиленгликоли в определенных условиях вызывают преципитацию белков [447], и в частности гемоглобина [450]. Влияние

ПЭГ-1500 на молекулярном уровне проявляется в увеличении уровня агрегации белков цитоскелет-мембранного комплекса, которое усиливается при замораживании-отогреве эритроцитов собаки [84]. Криоконсервирование эритроцитов человека с данным криопротектором сопровождается повышением экстрагируемости α -спектрина [85]. При изучении ионной проницаемости липидных бислойных мембран из дипальмитоилфосфатидилхолина при температурах фазового перехода в растворе LiCl (1 моль/л) после добавления полиэтиленгликолей разной молекулярной массы показано, что ПЭГи с молекулярной массой 1450 и выше уменьшают колебания тока до базального уровня шума [21]. Авторы полагают, что наблюдаемая полная блокада проводимости липидных ионных каналов связана с обезвоживанием зазора (устья) поры и превращением гидрофильных пор в гидрофобные поры.

При исследовании с помощью флуоресцентного кальциевого индикатора фура-2АМ влияния изотонического раствора ПЭГ-1500 на потоки кальция в АТР-истощенные эритроциты человека установлено, что 20-минутная инкубация клеток в растворе полимера приводит к 10-кратному усилению потока кальция в эритроциты по сравнению с клетками в физиологической среде [356]. Однако методом ^1H -ЯМР-спектроскопии не выявлено непосредственного взаимодействия молекул ПЭГа с эритроцитарной мембраной [356].

В табл. 6.1 представлены в сравнительном аспекте результаты влияния ПЭО-1500 в концентрации 15% на уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих в 4,0 моль/л NaCl и, согласно данным работ [14, 62], после замораживания до -196°C и последующего отогрева.

При замораживании эритроцитов млекопитающих под защитой ПЭО-1500 [14, 61, 62] эритроциты человека, лошади и быка инкубировали с криопротектором в концентрации 15% при разных температурах (0 и 22°C), а затем подвергали быстрому замораживанию до -196°C . Была показана более высокая сохранность клеток человека [14] и быка [61, 62] в случае введения

криопротектора при околонулевой температуре. Эритроциты лошади после размораживания характеризуются очень низким уровнем повреждения ($< 1\%$), поэтому влияние температуры не удалось выявить [61, 62].

Анализ полученных нами экспериментальных данных по гипертоническому гемолизу эритроцитов млекопитающих при использовании криопротектора в концентрации 15% (рис. 6.11–6.13, табл.6.1) свидетельствует, что повреждение клеток ниже, если криопротектор вводили в среду при более низкой температуре (0°C).

Таблица 6.1.

Влияние ПЭО-1500 (15%) на уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих в 4,0 моль/л NaCl ($n = 10$) и после замораживания до -196°C и последующего отогрева (%).

	Гипертонический шок		Замораживание до -196°C [14, 62]	
	37°C	0°C	22°C	0°C
Эритроциты человека	36 ± 6	26 ± 5	$11,8 \pm 3,8$	$3,0 \pm 0,3$
Эритроциты быка	60 ± 7	9 ± 3	$8,2 \pm 2,6$	$2,0 \pm 0,2$
Эритроциты лошади	20 ± 5	6 ± 3	$0,8 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$

Автор работы [14] полагает, что повреждение эритроцитов в результате криоконсервирования в присутствии ПЭО-1500 определяется характером взаимодействия этого криопротектора с клеткой на этапе, предшествующем замораживанию. Так, снижение температуры инкубации клеток с криопротектором до 0°C приводит к уменьшению количества криопротектора, связавшегося с клетками, и повышению устойчивости эритроцитов к действию криоконсервирования [14]. Более низкий уровень

гипертонического повреждения эритроцитов человека, лошади и быка (предварительно проинкубированных в растворах ПЭО-1500) при 0°C также может быть связан как с особенностями взаимодействия криопротектора с эритроцитами, так и с метаболическими и структурными перестройками клетки.

Таким образом, использование модельного эксперимента ГШ позволяет проводить скрининг условий добавления непроникающего криопротектора на этапе, предшествующем замораживанию клеток, и выявлять оптимальную их комбинацию (температура, концентрация криопротектора, продолжительность эквilibрации с криопротектором) [134]. Кроме того, предложенный подход [134] позволяет упростить поиск эффективных условий добавления криопротектора и сократить время его осуществления, поскольку процедура инкубирования эритроцитов в растворе 4,0 моль/л NaCl занимает всего 5–10 мин. Данный подход не требует специального оборудования и материалов.

Следует отметить, что ГШ используют для тестирования эритроцитов пациентов с определенными психическими заболеваниями [326]. Так, гипертонический гемолиз эритроцитов повышается у пациентов с маниакальным психозом и снижается у больных с тяжелым депрессивным синдромом. Наследственный сфероцитоз диагностируется с помощью криогемолиза эритроцитов [497].

Перенесение в физиологическую среду эритроцитов, замороженных под защитой ПЭО-1500, приводит к развитию гемолитического повреждения клеток [14, 62]. Для поиска условий, позволяющих снизить данное повреждение, необходима разработка модельного эксперимента – постгипертонического лизиса клеток, при котором эритроциты переносят из гипертонических сред в исходную среду с физиологической тоничностью [36].

При низкотемпературном хранении эритроцитов человека под защитой проникающих криопротекторов достаточно широко используют глицерин [19, 222, 308]. Для эритроцитов разных видов млекопитающих использование

одного и того же криопротектора (например, глицерина) требует использования разных режимов консервирования (температура, скорость замораживания, продолжительность инкубирования), что вероятно связано с видовыми особенностями клеток, в частности различиями в проницаемости эритроцитарных мембран млекопитающих для криопротектора [62, 526].

Глицерин, являющийся проникающим криопротектором, существенно уменьшает степень повреждения эритроцитов человека при замораживании-отогреве за счет снижения эффективной концентрации солей при данной субнулевой температуре [200, 432, 435]. Однако глицерин может быть и потенциальным повреждающим агентом [452].

Для того чтобы оценить влияние глицерина на чувствительность эритроцитов млекопитающих к ГШ, одному из главных повреждающих факторов при замораживании-отогреве биологического материала, клетки после кратковременного инкубирования (2 мин) с разными концентрациями глицерина переносили в 4,0 моль/л NaCl (5 мин) при 0 или 37°C. Выбор продолжительности инкубирования эритроцитов с глицерином (2 мин) основан на результатах работы [385], в которой показано, что концентрация внутриклеточного глицерина в эритроцитах человека достигает 90% от равновесного уровня через 1,2 мин при 0°C и через 0,6 мин при 20°C.

На рис. 6.14–6.16 представлены результаты влияния глицерина на уровень гипертонического гемолиза (4,0 моль/л NaCl) эритроцитов млекопитающих при 37 и 0°C.

Для эритроцитов человека наблюдается концентрационно-зависимое снижение уровня гипертонического гемолиза при обоих температурных режимах (рис. 6.14), с достижением минимального значения при использовании 1,0 моль/л глицерина. В этом случае уровень гемолиза эритроцитов человека снижается более чем в 9 раз при 37°C и в 7 раз при 0°C по сравнению с соответствующим контролем.

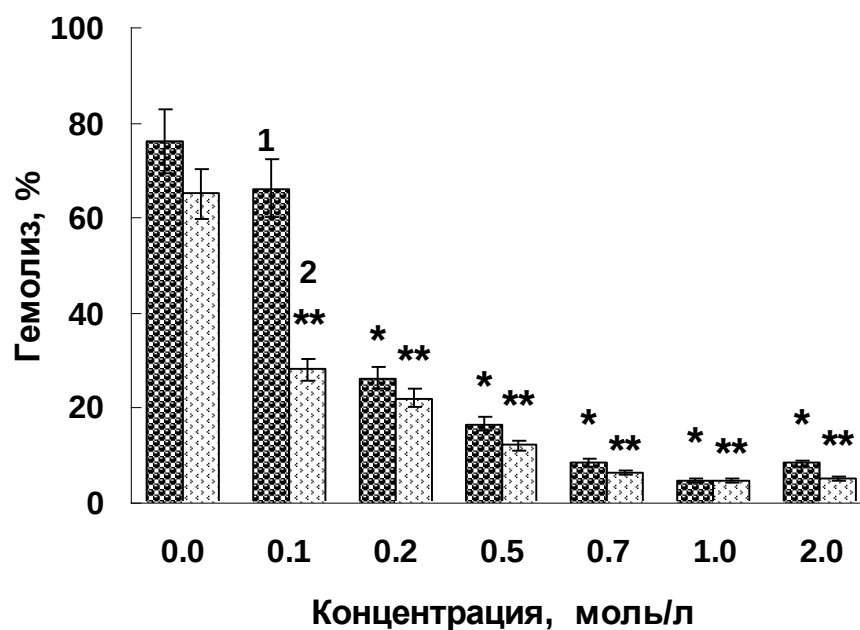


Рис. 6.14. Влияние глицерина на уровень гемолиза эритроцитов человека в 4,0 моль/л NaCl при температуре 37 (1) и 0°C (2). Время инкубации в растворах глицерина 2 мин

Примечания: *, ** – статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p < 0,05$; количество наблюдений в каждой группе – 7.

Статистически значимые различия между значениями гемолиза клеток при 37 и 0°C не выявлены при использовании глицерина в концентрации 0,2 моль/л и выше (рис. 6.14).

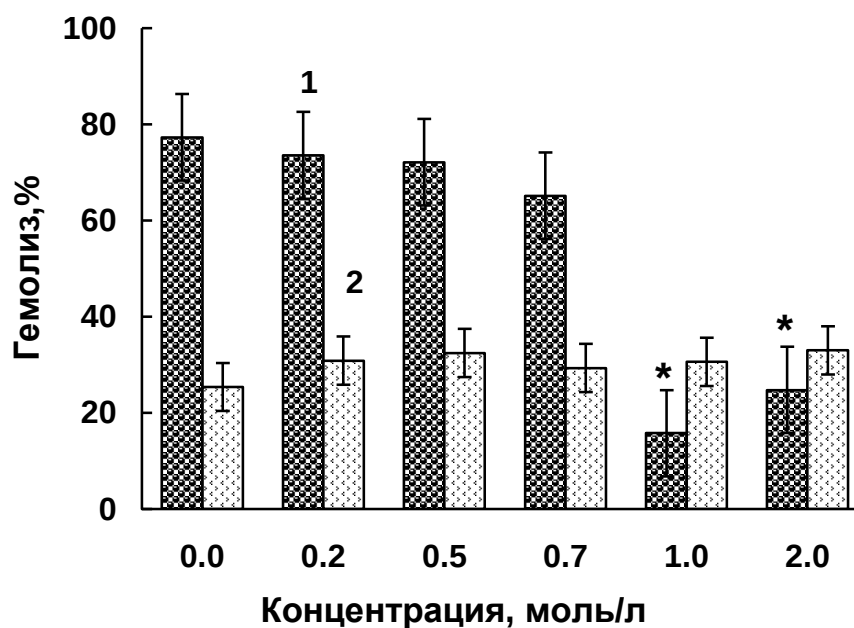


Рис. 6.15. Влияние глицерина на уровень гемолиза эритроцитов быка в 4,0 моль/л NaCl при температуре 37 (1) и 0°C (2). Время инкубации в растворах глицерина 2 мин.

Примечания: *, ** – статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p < 0,05$; количество наблюдений в каждой группе – 7.

При 37°C снижение уровня гипертонического гемолиза эритроцитов быка (рис. 6.15) происходит при использовании глицерина в концентрации 0,7–1,0 моль/л NaCl, т.е. защитное действие глицерина начинает развиваться при использовании его в более высокой по сравнению с клетками человека концентрации (рис. 6.14). Резкое снижение уровня гемолиза и достижение минимального значения гипертонического повреждения эритроцитов быка наблюдается в том случае, когда клетки переносили в 4,0 моль/л NaCl из 1,0 моль/л NaCl. Таким образом, при 37°C глицерин в концентрации 1,0 моль/л максимально защищает клетки быка и человека от гипертонического гемолиза.

При 0°C глицерин не оказывает защитного действия в условиях ГШ эритроцитов быка, а даже несколько стимулирует повреждение клеток.

Результаты, полученные для эритроцитов лошади (рис. 6.16), существенно отличаются от результатов для клеток других млекопитающих.

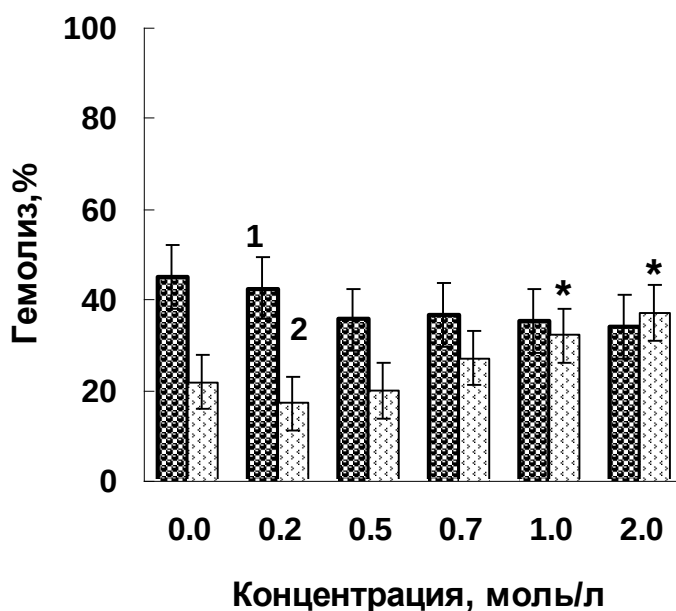


Рис. 6.16. Влияние глицерина на уровень гемолиза эритроцитов лошади в 4,0 моль/л NaCl при температуре 37 (1) и 0°C (2). Время инкубации в растворах глицерина 2 мин.

Примечания: *, ** – статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, $p < 0,05$; количество наблюдений в каждой группе – 7.

При 37°C для эритроцитов лошади, в отличие от клеток человека и быка, характерно лишь незначительное снижение уровня гипертонического гемолиза в присутствии глицерина, и минимальное повреждение регистрируется при использовании криопротекторного вещества в концентрации 0,5 моль/л и выше.

При 0°C глицерин в концентрации 0,7 моль/л и выше вызывает выраженный рост повреждения эритроцитов лошади в условиях ГШ, при

этом 2,0 моль/л глицерин повышает гипертонический гемолиз клеток в 2,5 раза.

После быстрого замораживания до -196°C и отогрева эритроцитов млекопитающих в присутствии глицерина в концентрации 15% (что соответствует 1,6 моль/л) гемолиз эритроцитов быка и лошади составляет порядка 90%, в то время клеток человека – около 20% [80]. Таким образом, попытка криоконсервирования эритроцитов лошади и быка под защитой глицерина показала неэффективность данного криопротектора [80].

Коэффициент проницаемости мембран для криопротекторов является важным биофизическим параметром клеток, который необходим для научно обоснованной оптимизации методов криоконсервирования биологических объектов. Основываясь на этом, авторы [80] связывают выявленный эффект (низкая сохранность эритроцитов животных при криоконсервировании с глицерином) с особенностями проницаемости эритроцитарных мембран разных видов млекопитающих для этого криопротектора. Поскольку для эритроцитов человека [49] коэффициент проницаемости мембран для глицерина на порядок выше по сравнению с эритроцитами животных [80], то низкая сохранность эритроцитов домашних животных при их криоконсервировании с глицерином может быть связана с ограничением проницаемости их мембран для данного криопротектора.

Глицерин является высоко гидрофильным соединением, о чем свидетельствует его коэффициент распределения в системе *n*-октанол-вода ($K = 0,005$) [49]. Исходя из этого, значимая роль транспорта молекул глицерина через липидный бислой путем диффузии маловероятна. Скорее всего, глицерин проникает в эритроциты млекопитающих по гидрофильному пути, вероятно по акваглицеропоринам (AQP3, AQP7, AQP9 и AQP10), которые в разной степени проницаемы не только для воды, но и для глицерина.

Поскольку экспрессия изоформ аквапорина в эритроцитах является видовой характеристикой, авторы работы [358] выбрали для сравнительного

исследования эритроциты человека и быка в связи со значительной разницей в проницаемости их мембран для глицерина. Измеренная в работе величина проницаемости глицерина (P_{gly}) для эритроцитов человека $((1,37 \pm 0,26) \times 10^{-5} \text{ см с}^{-1})$ отличалась на три порядка от величины проницаемости глицерина для эритроцитов быка $((5,82 \pm 0,37) \times 10^{-8} \text{ см с}^{-1})$, которые также показали более высокие значения энергии активации для транспорта глицерина. При этом с помощью иммунофлуоресцентного анализа было показано отсутствие AQP3 в эритроцитарных мембранах быка.

В заключение авторы делают вывод о том, что отсутствие AQP3 в эритроцитах быка указывает на липидный путь в качестве ответственного за проникновение глицерина и объясняет низкую проницаемость глицерина и высокое значение E_a для транспорта, наблюдаемые у жвачных животных.

Таким образом, показанное отсутствие AQP3 в эритроцитах быка [358] и, возможно, лошади, обуславливающие низкую проницаемость их эритроцитарных мембран для глицерина, является причиной низкой сохранности этих клеток при замораживании в присутствии глицерина.

Выявленный защитный эффект глицерина (в концентрации 1–2 моль/л) в условиях ГШ эритроцитов быка при 37°C вероятнее всего связан с очень низкой проницаемостью эритроцитарных мембран для данного криопротектора, и, как следствие, реализацией защитного эффекта глицерина как «непроникающего» в данных временных условиях криопротектора.

Когда клетки помещают в среду, содержащую глицерин, они немедленно сжимаются, поскольку скорость выхода внутриклеточной воды значительно превышает скорость входа глицерина в клетку. Потеря воды вызывает последующее увеличение концентрации непроникающих растворимых веществ в клетках (главным образом, ионов). Диффузия глицерина в клетку сопровождается входом воды и, следовательно, уменьшением концентрации внутриклеточных непроникающих веществ. Так как общая осмоляльность в клетке в любое время постоянна и равна внешней осмоляльности, то осмоляльная концентрация внутриклеточных

непроникающих веществ представляет собой просто общую осмоляльность минус осмоляльность внутриклеточного глицерина в этот момент.

В пользу этого свидетельствуют данные работы [384]. Mazur с соавт. показали, что при медленном замораживании до -196°C эритроцитов быка в присутствии глицерина степень сохранности клеток одинакова при их кратковременном (до 2 мин) и 30 мин инкубировании с глицерином. Для промежуточных времен экспонирования характерно падение уровня сохранности эритроцитов быка, причем этот эффект выражен сильнее при 20 и 15°C , чем при 0°C . Авторы [384] полагают, что снижение сохранности клеток связано каким-то образом с частичным проникновением глицерина до замораживания.

Ранее представленные данные (рис. 6.1–6.4) свидетельствуют о том, что в результате предварительного инкубирования эритроциты млекопитающих в средах, содержащих непроникающие в клетку компоненты в определенных концентрациях, приобретают устойчивость к последующему действию ГШ. С другой стороны, показан защитный эффект глицерина, хорошо проникающего в эритроциты человека, при перенесении этих клеток в 4,0 моль/л NaCl при обоих температурных режимах (37 и 0°C) (рис. 6.14). Поэтому представляло интерес исследовать сочетанное действие глицерина и предварительного обезвоживания эритроцитов человека на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку.

Из данных рис. 6.17 видно, что присутствие глицерина в средах предварительной инкубации снижает уровень гипертонического гемолиза эритроцитов человека по сравнению с контрольной зависимостью, причем это снижение не зависит от концентрации криопротектора. В том случае, когда клетки переносили в 4,0 моль/л NaCl из физиологической среды, содержащей глицерин, наблюдается резкое снижение уровня гемолиза эритроцитов до 20%. Этот уровень повреждения клеток сохраняется при повышении концентрации соли в средах предварительной инкубации до 0,6 моль/л (рис. 6.17, кривые 2–4). Уровень гемолиза эритроцитов в 4,0 моль/л NaCl увеличивается,

если клетки предварительно инкубируются в средах, содержащих NaCl в диапазоне от 0,7 до 0,8 моль/л в присутствии глицерина, однако величины гипертонического гемолиза ниже по сравнению со значениями контрольной зависимости.

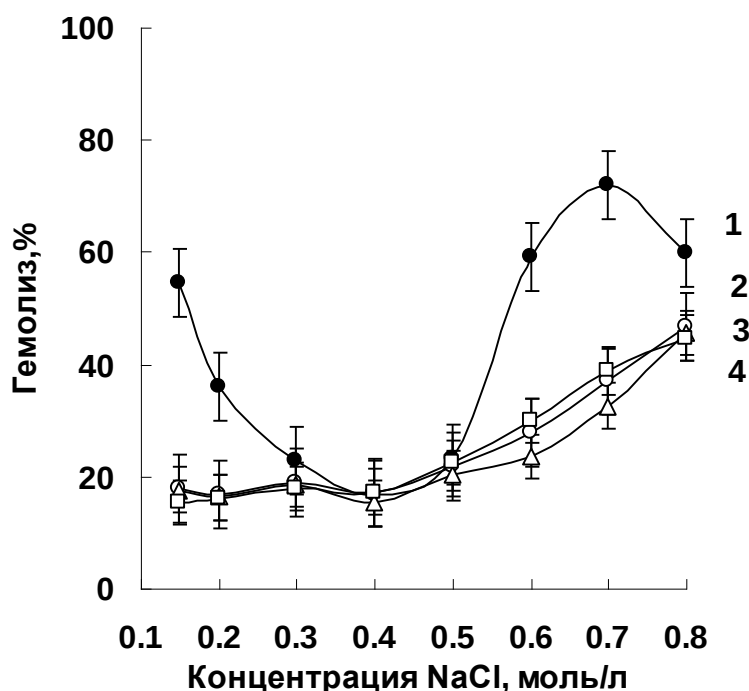


Рис. 6.17. Влияние глицерина на зависимость гемолиза эритроцитов в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, от концентрации NaCl в средах предварительной инкубации клеток при 0°C ($M \pm m$, $n = 6$): 1 – контроль; 2 – 0,5 моль/л; 3 – 1,0 моль/л; 4 – 2,0 моль/л глицерин.

В момент внесения клеток в высококонцентрированный солевой раствор, не содержащий глицерин, происходит сначала резкий отток воды из клеток, а затем уже выход глицерина по осмотическому градиенту, потому что проницаемость эритроцитов человека для воды в 3000 раз выше, чем проницаемость для глицерина [385]. В этом случае амплитуда изменения объема клетки практически такая же, как для контрольных клеток (не содержащих глицерин), потому что при такой постановке эксперимента

(гематокрит 0,4 %) можно ожидать, что весь глицерин будет выходить из клетки. Таким образом, наблюдаемое резкое снижение гипертонического повреждения клеток, по-видимому, обусловлено не столько тем, насколько происходит уменьшение клеточного объема при перенесении эритроцитов в 4,0 моль/л раствор NaCl, а скорее продолжительностью этого процесса.

При 37°C присутствие глицерина во всех средах на этапе обезвоживания позволяет снизить уровень гемолиза эритроцитов при их перенесении в 4,0 моль/л NaCl по сравнению с контрольной зависимостью (рис. 6.18), причем это снижение зависит от концентрации криопротектора.

Криопротектор снижает уровень гипертонического гемолиза эритроцитов, которые были перенесены из изотонического (по NaCl) раствора, примерно в 5–6 раз. Следует отметить, что при 37°C глицерин снижает чувствительность к 4,0 моль/л раствору NaCl и тех клеток, состояние которых отмечается как стабильное (формируется в результате предварительного инкубирования в 0,4 моль/л NaCl), т.е. криопротектор действует в синергизме с слабо и умеренно гипертоническими средами. Если клетки переносили в 4,0 моль/л NaCl из сред, содержащих NaCl в концентрации 0,6 моль/л и выше, то наблюдается повышение уровня гипертонического гемолиза, зависящее от концентрации глицерина: чем выше концентрация глицерина, тем ниже уровень гипертонического повреждения эритроцитов. При замораживании эритроцитов человека показано аналогичная зависимость сохранности клеток от концентрации вещества [386].

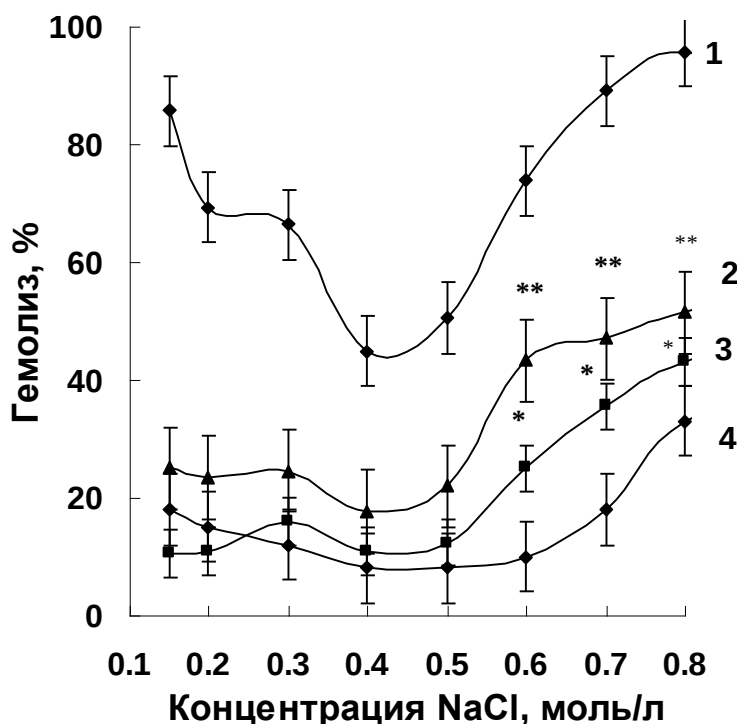


Рис. 6.18. Влияние глицерина на зависимость гемолиза эритроцитов в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, от концентрации NaCl в средах предварительной инкубации клеток при 37°C: 1 – контроль; 2 - 0,5 моль/л; 3 – 1,0 моль/л; 4 – 2,0 моль/л глицерин.

Примечания: * – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными с 2,0 моль/л глицерином ($p < 0,05$);

** – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными с 1,0 моль/л глицерином ($p < 0,05$);

Глицерин снижает уровень гемолиза эритроцитов при перенесении их в раствор, содержащий 4,0 моль/л NaCl, как при 37, так и при 0°C. При 0°C в присутствии глицерина наблюдается снижение гипертонического повреждения эритроцитов, предварительного проинкубированных в средах, содержащих 0,15–0,2 моль/л и 0,6–0,8 моль/л NaCl. При 37°C глицерин способствует формированию стабильного состояния эритроцитов, проинкубированных во всех средах предварительной инкубации (0,15–0,8 моль/л NaCl), что проявляется в снижении уровня гипертонического повреждения эритроцитов в

4,0 моль/л NaCl. В основе защитного действия глицерина лежит способность этого вещества ограничивать скорость сжатия и амплитуду «объемного сдвига» клеток при резком изменении тоничности среды.

Таким образом, сочетанное использование глицерина, как проникающего вещества, и гипертонического NaCl, как непроникающего (точнее непроникающими являются катионы), на предварительном этапе, позволяет в значительной степени снизить уровень гипертонического гемолиза эритроцитов человека в 4,0 моль/л NaCl.

Межидов на основании собственных результатов [108] сделал вывод, что 1,2-пропандиол и глицерин при 20°C не защищают эритроциты человека от повреждающего действия осмотического давления. Однако он использовал криопротекторы в концентрации 35%, которую в более поздней работе [107] отнес к разряду токсических. В этой же работе показано, что проникающие криопротекторы проявляют максимальный защитный эффект при использовании в концентрации 10–15%, а при более высоких концентрациях (20% и выше) проявляется их цитотоксичность. Следует отметить, что предложенный Межидовым подход для определения цитотоксичности криопротекторов с использованием гипертонического хлорида натрия (3,2 моль/л), вызывающего 50% разрушение эритроцитов человека, представляет собой достаточно длительную и сложно воспроизводимую процедуру [107].

В настоящее время разрабатываются и успешно применяются комбинированные консерванты, состоящие из проникающих и непроникающих криопротекторов, для низкотемпературного консервирования эритроцитов человека. Такой подход позволяет объединить и усилить положительные свойства проникающих и непроникающих компонентов в процессе замораживания биологического материала.

Использование комбинированных консервантов эффективно при низкотемпературном консервировании тромбоцитов [22], эритроцитов [151], гранулоцитов, лейкоцитов [156], стволовых клеток периферической крови

[203], гемопоэтических стволовых клеток костного мозга [156], клеток поджелудочной железы человека [484]. Тот факт, что комбинированные криоконсерванты, в состав которых входят криопротекторы с различным механизмом действия, успешно используются при низкотемпературном хранении клеток различного типа, свидетельствует об общности причин, лежащих в основе криоповреждения этих клеток.

Выводы

- Устойчивое состояние эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку (4,0 моль/л NaCl) формируется в условиях предварительного инкубирования клеток в умеренно концентрированных солевых средах. При 37°C осмоляльность этих сред составляет для клеток крысы – 550–700 мосмоль/кг NaCl; человека и лошади – 700 мосмоль/кг NaCl. Формирование устойчивого состояния эритроцитов быка наблюдается в средах с более высокой осмоляльностью NaCl 1760 мосмоль/кг.
- Минимальные значения гематокрита эритроцитов крысы, лошади, человека и быка в растворах предварительного обезвоживания соответствуют минимальному уровню гемолиза при перенесении этих клеток в 4,0 моль/л NaCl.
- В присутствии непроникающего криопротектора ПЭО-1500 наблюдается снижение гематокрита эритроцитов человека, быка и лошади и уменьшение уровня гемолиза этих клеток при последующем перенесении в 4,0 моль/л NaCl. При 0°C максимальная устойчивость эритроцитов человека и лошади к гипертоническому шоку (4,0 моль/л NaCl) формируется в криопротекторной (15%, ПЭО-1500) среде, осмоляльность которой соответствует значениям осмоляльности солевых сред, после инкубации в которых клетки становятся устойчивыми к последующему гипертоническому шоку.

- Защитный эффект глицерина зависит как от экспериментальных условий, так и от видовой принадлежности клеток. Если при 37°C глицерин вызывает существенное снижение гипертонического гемолиза (4,0 моль/л NaCl) эритроцитов человека и быка, то при 0°C защитный эффект наблюдается только для клеток человека. Использование глицерина при гипертоническом шоке эритроцитов лошади при обоих температурных режимах оказалось неэффективным.

- Глицерин снижает уровень гемолиза эритроцитов человека при перенесении их в раствор, содержащий 4,0 моль/л NaCl, как при 37, так и при 0°C. Если при 0°C в присутствии глицерина наблюдается снижение гипертонического повреждения эритроцитов, предварительного проинкубированных в средах, содержащих 0,15–0,2 моль/л и 0,6–0,8 моль/л NaCl, то при 37°C глицерин способствует формированию стабильного состояния эритроцитов, проинкубированных во всех средах предварительной инкубации (0,15–0,8 моль/л NaCl), что проявляется в снижении уровня гипертонического повреждения эритроцитов в 4,0 моль/л NaCl.

Показано, что при комбинированном действии глицерина (0,5–2,0 моль/л) и NaCl (0,15–0,7 моль/л) на этапе предварительной обработки эритроцитов человека наблюдается значительное снижение гипертонического лизиса эритроцитов: до 10 раз при 37°C и до 4 раз при 0°C.

По материалам главы 6 опубликованы работы [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 35, 44, 65, 117, 120, 129, 134, 135, 186, 193, 199, 431, 445, 479].

ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гипертонический шок, гипертонический криогемолиз и гипотонический лизис эритроцитов являются моделями, позволяющими изучать действие на клетки факторов криоповреждения, таких как изменение температуры и осмоляльности среды. Исследование температурно-осмотической устойчивости эритроцитов млекопитающих позволило определить как их особенности, так и закономерности. Для оценки связи между температурно-осмотическими показателями эритроцитов разных видов млекопитающих и геометрическими параметрами, а также характеристиками, отражающими особенности цитоплазмы и мембраны этих клеток, использовали корреляционный анализ.

Результаты, полученные при изучении гипертонического шока, гипертонического криогемолиза и гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих (человек, бык, кролик, крыса, лошадь, собака), свидетельствуют, что существует видоспецифичность чувствительности эритроцитов млекопитающих как по отношению ко всем изучаемым видам стрессового воздействия, так и в рамках одного определенного вида стресса.

Явление гипотонического лизиса эритроцитов используют в криобиологических исследованиях в качестве модели повреждения клеточных мембран, приводящего к гибели клетки. Это явление, в определенной степени, реализуется на этапе отогрева замороженных клеточных суспензий, особенно в присутствии проникающих криопротекторов.

Экспериментальное изучение гипотонического гемолиза эритроцитов человека и животных (бык, кролик, крыса, лошадь, собака) позволило выявить особенности развития повреждения клеток млекопитающих при снижении осмоляльности среды. Оценивая гипотоническую чувствительность эритроцитов млекопитающих по таким параметрам, как пороговые значения соли и индекс осмотической хрупкости, установлено,

что наиболее устойчивыми являются эритроциты собаки, крысы и человека при обоих температурных режимах (37 и 0°C) (рис. 3.4). На основании результатов корреляционного анализа установлена статистически значимая сильная связь между гипотонической устойчивостью клеток и их геометрическими характеристиками, т.е. величиной диаметра и значением поверхностно-объемного отношения (рис. 3.7-3.9). Более устойчивыми к действию гипотонического стресса являются эритроциты млекопитающих с большим диаметром и низким значением поверхностно-объемного отношения, т.е. клетки собаки, крысы и человека.

При резком повышении осмоляльности среды развивается гипертонический шок эритроцитов, который рассматривается в качестве одного из основных факторов повреждения клеток при их низкотемпературном консервировании.

Результаты, полученные в работе, указывают на важность воды в развитии гипертонического шока эритроцитов млекопитающих. Статистически значимая положительная сильная связь установлена между значениями пороговых концентраций хлорида натрия при гипертоническом шоке эритроцитов и величинами коэффициентов диффузионного транспорта воды (рис. 3.13), содержанием внутриклеточной воды (рис. 3.12), а гидрофобность гемоглобина отрицательно коррелирует с уровнем гемолитического повреждения клеток в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl (рис.3.10).

Таким образом, гипертонически устойчивые клетки на начальных этапах гипертонического шока характеризуются высоким содержанием внутриклеточной воды, а их мембраны – высоким значением диффузионного транспорта воды. Кроме того, гемоглобин этих клеток характеризуется низкой гидрофобностью, что свидетельствует в пользу более высокой его способности связывать внутриклеточную воду. Это клетки кролика и крысы.

В момент внесения эритроцитов в гипертоническую среду происходит выход воды из клеток. Обезвоживание сопровождается сильным сжатием

эритроцитов и значительной деформацией их плазматической мембраны, в результате чего зарождаются трансмембранные дефекты, которые мгновенно эволюционируют до размера гемолитической поры. Исходя из того, что гипертоническое повреждение клеток выражено в меньшей степени в том случае, когда процесс обезвоживания происходит очень быстро, можно полагать, что гемолитическое повреждение происходит в неравновесных условиях выхода воды из клетки. Чем быстрее завершается процесс выхода внутриклеточной воды, тем благоприятнее судьба клеток, поскольку сокращается время формирования и эволюции трансмембранной поры.

Следует отметить, что гипотоническая и гипертоническая чувствительность эритроцитов разных видов млекопитающих зависит от температуры: при 0°C клетки легче повреждаются, чем при 37°C. Это свидетельствует о вовлечении липидного компонента мембраны в механизм повреждения клеток.

Многие биологические объекты повреждаются при изменении температуры в положительном диапазоне [15, 54, 91]. Эритроциты разных видов млекопитающих достаточно устойчивы к охлаждению от 37 до 0°C. Для их сенсibilизации к изменению температуры необходима обработка клеток токсинами, амфифильными веществами и др. [177, 245, 323] либо инкубирование в гипертонической среде (рис. 4.1). В результате инкубирования эритроцитов млекопитающих в гипертонических растворах при 37°C происходит дестабилизация плазматической мембраны, что проявляется в потере клетками внутриклеточных катионов калия. Как показано (рис. 4.6), именно выход катионов калия из клеток является необходимым условием для развития гемолитического повреждения клеток при последующем охлаждении от 37 до 0°C.

Результаты, представленные в работе, демонстрируют важность именно липидного компонента мембраны в развитии гипертонического криогемолиза эритроцитов. В пользу этого свидетельствуют данные, полученные при исследовании температурного диапазона охлаждения клеток

млекопитающих в процессе гипертонического криогемолиза (рис. 4.7). Анализ температурных диапазонов, при охлаждении в пределах которых наблюдается повреждение клеток разных видов млекопитающих, показал значительную гетерогенность верхней температурной границы (от которой проводили охлаждение) при достаточно однородном значении нижней температурной границы (до которой охлаждали клетки) (рис. 4.8). Зависимость явления гипертонического криогемолиза от температуры свидетельствует о вовлечении липидного компонента мембраны в вышеуказанный процесс

Полагают, что развитие повреждения эритроцитов человека при гипертоническом криогемолизе происходит следующим образом. На первом этапе гипертонического криогемолиза эритроцитов при 37°C развивается латеральное разделение мембранных компонентов в результате обезвоживания клеток. На втором этапе в процессе охлаждения этих клеток до 0°C происходят фазовые переходы липидов в бесхолестериновых областях эритроцитарной мембраны. На границе раздела фаз образуются дефекты, через которые происходит утечка внутриклеточного содержимого. Представленная точка зрения развития гипертонического криогемолиза эритроцитов человека базируется на данных, полученных с использованием модельных систем [257, 381] либо при истощении клеточных мембран по холестерину [336]. Анализ экспериментальных результатов [381] показал, что введение холестерина в смесь фосфолипидов сопровождается исчезновением фазовых переходов липидов.

В представленной работе с использованием природных биологических объектов, таких как эритроциты человека, быка, лошади, кролика, крысы и собаки показана определяющая роль холестерина в развитии гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих. Проведенный корреляционный анализ показал значимую сильную связь между показателями гипертонического криогемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих и внутримембранным содержанием холестерина (рис. 4.3).

Клетки с высоким уровнем внутримембранного холестерина, более устойчивы к повреждающему действию охлаждения в гипертонической среде – это клетки кролика и быка. Представленные в работе результаты, полученные на природных объектах (клетках), свидетельствуют в пользу того, что фазовые переходы, лежащие в основе повреждения клеток в условиях гипертонического криогемолиза, развиваются в бесхолестериновых участках мембранного бислоя. Чем больше холестерина, тем меньше таких участков в мембране, где может происходить фазовый переход липидов, и, следовательно, ниже вероятность образования трансмембранного дефекта, доступного для выхода внутриклеточного содержимого.

В ранее предложенном механизме гипертонического криогемолиза авторы [163] связывали повреждение клеток при охлаждении с содержанием неламеллярного ФЭА, полагая, что этот фосфолипид участвует в формировании трансмембранных дефектов. Однако наши результаты, выявившие отрицательную связь между значением пороговых концентраций соли при гипертоническом криогемолизе эритроцитов и содержанием неламеллярных фосфолипидов (фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин) в клеточной мембране (табл. 4.2), свидетельствует об иной их роли. Неламеллярные фосфолипиды, наоборот, обеспечивают устойчивость клеток к гипертоническому криогемолизу, вероятно, за счет образования гексагональной структуры в ламеллярной упаковке липидов. В результате этого происходит сброс напряжения на мембране (значительное изотропное натяжение жидких липидных участков мембраны при охлаждении) и, как следствие, большие трансмембранные поры, доступные для внутриклеточных молекул гемоглобина, не могут формироваться.

Исходя из наших результатов, можно полагать, что одним из определяющих факторов в развитии гемолитического повреждения клеток на начальных этапах гипертонического криогемолиза является текучесть эритроцитарной мембраны. Показано, чем больше эритроцитарная мембрана содержит СМ, ФЭА и меньше холин-содержащих фосфолипидов в

различных комбинациях (ЛФХ, ФХ, СМ+ ФХ, ЛФХ+СМ+ФХ), тем выше пороговая концентрация соли при гипертоническом криогемолизе эритроцитов (табл. 4.2). Это позволяет говорить о большей устойчивости таких клеток на начальных этапах развития гипертонического криогемолиза. Поскольку СМ и ФЭА уменьшают, а ФХ повышает текучесть мембраны [530], то установленные направленность и сила корреляций позволяют говорить о возможной роли текучести эритроцитарной мембраны либо связанных с нею параметров, в развитии гемолитического повреждения клеток на начальных этапах гипертонического криогемолиза.

Анализ экспериментальных данных, полученных при изучении устойчивости эритроцитов человека и животных к изменению температурно-осмотических условий среды, показал зависимость устойчивости не только от видовых особенностей исследуемых эритроцитов, но и от исходного состояния клеток, формирующегося под действием определенной комбинации факторов внешней среды (температуры, осмоляльности). Таким образом, совокупность эндогенных и экзогенных факторов могут влиять прямо или опосредованно на устойчивость клеток к действию стресса.

Варьирование осмоляльности и температуры среды на этапе, предшествующем действию самого стрессового фактора, позволило выявить для эритроцитов разных вида животных условия, в которых формируется исходное состояние клеток, обеспечивающее их максимальную устойчивость к последующему действию гипертонического шока. Установлено, что ведущим фактором является именно показатель осмоляльности, а не состав среды инкубации. В работе было показано, что осмоляльность сред предварительной инкубации, обеспечивающих максимальную сохранность эритроцитов млекопитающих в условиях гипертонического шока, составляет для клеток крысы 550–700; лошади – 700, быка – 1760 мосмоль/кг при 37°C. Основываясь на вышеприведенных результатах, полученных для сред с использованием хлорида натрия различной осмоляльности, были проведены эксперименты по гипертоническому шоку эритроцитов с применением

ПЭО 1500, который используется в качестве непроникающего криопротектора при замораживании биологического материала. Полученные результаты позволили определить оптимальные концентрационные (15%, 700 мосмоль/кг) и температурные (0°C) условия обработки эритроцитов человека, лошади и быка криопротектором ПЭО-1500, которые обеспечивают максимальную устойчивость клеток к гипертоническому шоку (рис. 6.11–6.13). Следует отметить, что полученные результаты соответствуют оптимальным условиям добавления криопротектора при криоконсервировании эритроцитов с ПЭО-1500 [14, 61, 62].

Наряду с непроникающим криопротектором ПЭО-1500 в работе были проведены исследования с использованием проникающего криопротектора глицерина. Было показано, что глицерин в условиях гипертонического шока снижает уровень повреждения эритроцитов млекопитающих.

Известно, что при замораживании биологических объектов часто применяют комбинации проникающих и непроникающих веществ. В работе показано, что использование проникающего криопротектора глицерина (0,5–2,0 моль/л) в комбинации с непроникающим в норме хлоридом натрия (вернее непроникающим является катион натрия) (0,15–0,8 моль/л) на этапе предварительной обработки клеток человека удастся существенно снизить уровень гипертонического лизиса клеток при обоих температурных режимах 37 и 0°C (рис. 6.17, 6.18).

Таким образом, экспериментальная модель (гипертонический шок) может служить для скрининга условий обработки клеток криопротекторами на этапе, предшествующем их замораживанию. Как следует из результатов работы, наиболее близкое соответствие между модельным экспериментом и условиями замораживания найдено при использовании непроникающего криопротектора ПЭО-1500. Для проникающих криопротекторов, а также для комбинации проникающих и непроникающих веществ требуются дополнительные экспериментальные разработки для эритроцитов человека и животных.

Амфифильные соединения, относящиеся к катионным, анионным и неионным, при использовании в микромолярных концентрациях позволяют модифицировать чувствительность эритроцитов млекопитающих к действию гипертонического шока и гипертонического криогемолиза. Экспериментально установлено, что антигемолитическая активность амфифильных соединений зависит от видовой принадлежности эритроцитов млекопитающих и от вида стрессового фактора.

В условиях гипертонического шока эритроцитов млекопитающих при 37°C все амфифильные соединения демонстрируют высокую антигемолитическую активность (табл. 5.1, 5.2). При 0°C для эритроцитов человека эффективными являются все исследуемые вещества, в то время как для клеток лошади – только катионные. Следует отметить, что в условиях гипертонического шока эритроцитов млекопитающих антигемолитическая активность амфифильных соединений при 0°C ниже, чем при 37°C (табл. 5.1, 5.2).

В условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов человека, лошади, быка и кролика высокую защитную активность проявляют катионные соединения (табл. 5.3). Анионный C10 достаточно эффективен по отношению к эритроцитам животных в отличие от клеток человека (табл. 5.3).

Проведенный анализ экспериментальных результатов по исследованию эффективности амфифилов в условиях температурно-осмотического стресса эритроцитов млекопитающих показывает, что протектирующие свойства амфифилов повышаются, как правило, в ряду: гипертонический шок (0°C), гипертонический криогемолиз, гипертонический шок (37°C). Это обусловлено состоянием мембраны эритроцитов в условиях конкретного вида стресса: чем выше жесткость мембраны, тем ниже эффективность амфифила.

Механизм защитного действия амфифилов связывают с их способностью влиять на кальмодулин [112]. Основанием для такой точки

зрения служила способность положительно заряженных амфифилов (ХПР, ТФП) ингибировать кальмодулин и таким образом влиять на кальмодулин-зависимые белки, определяющие уровень фосфорилирования компонентов цитоскелета [29]. Это предположение об участии кальмодулин-зависимых белков в реализации защитного эффекта положительно заряженного хлорпромазина не нашла подтверждения в работе. Наши результаты показали, что максимальный защитный эффект ХПР проявляется в момент приложения стрессового фактора (рис. 5.2-5.4). Поскольку эффект амфифилов не является результатом предварительной обработки клеток, то едва ли он реализуется через сигнальную систему, связанную с кальмодулином, поскольку для цепи биохимических превращений необходим определенный временной интервал.

Вторая точка зрения относительно механизма защитного действия амфифильных соединений заключается в способности катионных амфифилов пересекать липидный бислой эритроцитарной мембраны и распределяться на границе внутренней поверхности мембраны и цитоскелетными белками [112]. Такое накопление вещества позволяет пространственно разнести липидный бислой и белки цитоскелета, что приводит к быстрому заживлению мембранных пор, лишенных стабилизирующего действия со стороны цитоскелетных белков. Однако экспериментально установлено, что антигемолитическая активность характерна не только для катионных соединений, которые вызывают стоматоцитоз эритроцитов и распределяются во внутреннем монослое мембраны, но и для представителей анионных и неионных соединений, приводящих к эхиноцитозу эритроцитов в результате накопления во внешнем монослое (табл. 5.1, 5.2). Таким образом, защитный эффект амфифилов не обусловлен их характером распределения в эритроцитарной мембране в трансмембранном направлении. Интересно отметить, что амфифилы при использовании в антигемолитических концентрациях в условиях гипертонического шока эритроцитов

млекопитающих проявляют антигемолитический эффект, но при этом не оказывают влияния на выход катионов калия из клеток.

Таким образом, суммируя вышесказанное, можно сказать, что, эффект амфифилов реализуется на уровне эритроцитарной мембраны максимально в момент приложения стрессового фактора. Амфифилы влияют на мембранный дефект, предотвращая его развитие до размера гемолитической поры. Эффективность амфифильных соединений зависит от вида стресса. Это обусловлено состоянием мембраны эритроцитов в условиях конкретного вида стресса: чем выше жесткость мембраны, тем ниже эффективность амфифила. Именно поэтому максимальная эффективность наблюдается в условиях гипертонического шока эритроцитов при 37°C, в то время как в условиях осмотического стресса при 0°C, когда мембрана при околонулевой температуре становится более жесткой [19, 169, 416], антигемолитическая активность соединений и значения эффективных концентраций снижается (табл. 5.1, 5.2).

Исходя из данных литературы [204, 252, 352, 406], амфифильные соединения взаимодействуют как с липидами, так и с белками. В работе с использованием катионного трифторперазина показано, что в условиях гипертонического шока эритроцитов человека (при 37°C) его эффективность не зависит от состояния белковых компонентов мембраны, модифицированных протеолитическими ферментами (проназа, трипсин, папаин) и нейраминидазой. Исходя из этого, можно предположить, что действие амфифильных соединений реализуется, в первую очередь, на липидном компоненте мембраны.

Эксперименты с использованием жирнокислотных зондов с различной локализацией нитроксильного радикала вдоль алкильной цепи выявили изменение микровязкости мембраны различной локализации в присутствии амфифильных соединений в антигемолитических концентрациях (табл. 5.6).

Показана концентрационная зависимость влияния ХПР на структурно-динамическое состояние эритроцитарной мембраны. На основе анализа

зависимостей параметров, характеризующих интенсивность и ширину центральной компоненты спектра ЭПР зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов человека, от концентрации ХПР (рис. 5.18) установлено, что структурно-динамические перестройки эритроцитарной мембраны, вызванные хлорпромазином, имеют обратимый и адаптивный характер при использовании вещества в низких концентрациях (50–200 мкмоль/л) и деструктивный – в высоких (300–700 мкмоль/л).

Выявленное нарушение барьерной функции мембран по отношению к внеклеточным ионам феррицианида при действии высоких концентраций ХПР (300–700 мкмоль/л) может быть связано со значительным нарушением упаковки липидов в мембране. Сравнительный анализ изменения характеристик вращения липидного зонда (16-ДС) в эритроцитарных мембранах (700 мкмоль/л ХПР) в присутствии феррицианида калия и без него (рис. 5.21) свидетельствует о структурной перестройке мембраны, сопровождающейся, вероятнее всего, увеличением взаимодействия нитроксильных фрагментов зонда в гидрофобной зоне мембраны в присутствии только максимальной концентрации ХПР (700 мкмоль/л). Полученные в работе результаты дают основание полагать, что увеличение проницаемости мембран при действии высоких концентраций ХПР обусловлено изменением структурно-динамического состояния эритроцитарных мембран, причем его характер зависит от концентрации вещества.

На основании вышесказанного можно сделать вывод, что защитное действие амфифильных соединений в условиях температурно-осмотического стресса реализуется на уровне эритроцитарной мембраны в результате предотвращения увеличения трансмембранного дефекта до размера гемолитической поры. Тот факт, что эффективность амфифила зависит от видовой принадлежности эритроцитов, а клеточные мембраны характеризуются гетерогенностью, ставит вопрос об особенностях распределения молекул веществ в мембране в латеральном направлении и о

сродстве этих молекул к определенным фосфолипидам. Это требует дальнейшего изучения.

Важным направлением при изучении амфифильных веществ является их использование как средства для исследования биологических мембран. Применение амфифильных соединений в условиях гипертонического криогемолиза в работе наглядно демонстрирует эту возможность.

В условиях гипертонического криогемолиза гемолитические зависимости эритроцитов человека и лошади от концентрации соли в среде характеризуются постепенным повышением уровня повреждения с последующим снижением (рис. 4.1), в то время как зависимость клеток быка имеет монотонный характер (рис. 4.2). Значения гипертонического криогемолиза эритроцитов человека и лошади в 2,1 моль/л NaCl ниже, чем в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl, в то время как для клеток быка, наоборот, наблюдается рост гемолитического повреждения с увеличением концентрации соли в среде.

Использование амфифильных соединений позволило опосредованно оценить состояние эритроцитарных мембран в условиях охлаждения клеток от 37 до 0°C в 1,2 и 2,1 моль/л NaCl. Выявлена более низкая антигемолитическая активность амфифильных соединений, относящихся к разным классам, в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих (человек, лошадь, бык) в средах с более высокой концентрацией соли, независимо от характера их гемолитических зависимостей (рис. 5.7). Снижение эффективности амфифильных веществ при охлаждении клеток от 37 до 0°C в среде, содержащей 2,1 моль/л (по сравнению с 1,2 моль/л NaCl), по-видимому, связано с уменьшением способности амфифильных молекул встраиваться в мембрану, состояние которой существенно изменяется в средах с высоким значением осмоляльности.

Следовательно, амфифилы можно рассматривать в качестве инструмента для изучения состояния мембран эритроцитов в различных

условиях внешней среды при варьировании температуры, осмоляльности, качественного состава. Этот подход позволяет получить дополнительную информацию относительно строения и свойств мембраны в тех или иных условиях.

Таким образом, в работе изучены особенности и закономерности температурной и осмотической устойчивости эритроцитов млекопитающих; определены условия, обеспечивающие максимальную устойчивость клеток к температурно-осмотическому воздействию в результате модификации исходного состояния под действием физико-химических факторов среды (температура, осмоляльность, криопротекторы) и использования амфифильных соединений различной природы, предложен на основании экспериментальных результатов механизм защитного действия амфифильных веществ.

Подытоживая весь теоретический и экспериментальный материал, представленный в работе, можно заключить, что цель работы достигнута и решены все поставленные задачи.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе представлены теоретическое, экспериментальное обобщение и новое решение проблемы раскрытия механизмов повышения устойчивости клеток к осмотическому и температурному воздействию. Установлены закономерности температурно-осмотической устойчивости эритроцитов разных видов млекопитающих и определены условия, обеспечивающие максимальную устойчивость эритроцитов к температурно-осмотическому воздействию путем изменения исходного состояния клеток в результате комбинированного действия температуры, осмоляльности, криопротекторов и добавления к клеточной суспензии амфифильных соединений.

1. Установлено, что показатели гипотонического гемолиза эритроцитов человека и животных значимо коррелируют с общеизвестными геометрическими характеристиками клеток. Пороговые концентрации NaCl при гипотоническом лизисе эритроцитов млекопитающих (человек, бык, кролик, крыса, лошадь, собака) при 37 и 0°C отрицательно коррелируют с диаметром клетки ($r_s = -0,955$ и $-0,939$ соответственно, $p < 0,05$) и положительно со значениями поверхностно-объемного отношения ($r_s = 0,941$ и $0,926$ соответственно, $p < 0,05$). Значение индекса осмотической хрупкости эритроцитов при 37°C отрицательно коррелирует с диаметром ($r_s = -0,975$, $p < 0,05$) и положительно – с поверхностно-объемным отношением ($r_s = 0,986$, $p < 0,05$). Более устойчивыми к действию гипотонического шока являются эритроциты млекопитающих с большим диаметром и низким значением поверхностно-объемного отношения.

2. Выявлено, что пороговые концентрации NaCl при гипертоническом шоке эритроцитов млекопитающих положительно коррелируют с коэффициентом трансмембранной диффузии воды ($r_s = 0,928$, $p < 0,05$) и с содержанием внутриклеточной воды ($r_s = 0,841$, $p < 0,05$). Уровень гипертонического гемолиза эритроцитов в 4,0 моль/л NaCl положительно

коррелирует с гидрофобностью гемоглобина ($r_s = 0,829$, $p < 0,05$). Более устойчивыми к действию гипертонического шока являются эритроциты млекопитающих с высокими значениями диффузионной водной проницаемости мембраны, содержания внутриклеточной воды и низким значением гидрофобности гемоглобина.

3. Установлено, что пороговые концентрации NaCl при гипертоническом криогемолизе эритроцитов млекопитающих положительно коррелируют с мембранным содержанием сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина, сфингозина ($r_s = 0,878$, $p < 0,05$) и отрицательно – с содержанием фосфатидилхолина ($r_s = -0,878$, $p < 0,05$). Уровень гемолиза в 0,8 моль/л NaCl при охлаждении эритроцитов млекопитающих от 37 до 0°C положительно коррелирует с содержанием холин-содержащих фосфолипидов ($r_s = 0,829$, $p < 0,05$) и отрицательно – с содержанием холестерина и фосфатидилэтаноламина ($r_s = -0,900$ и $-0,886$ соответственно, $p < 0,05$). Более устойчивыми к действию гипертонического криогемолиза являются эритроциты млекопитающих, мембраны которых характеризуются высоким содержанием холестерина, сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина и низким содержанием фосфатидилхолинов.

4. Показано, что эритроциты разных видов животных (бык, кролик, крысы, лошадь, собака) и человека начинают гемолизировать в условиях гипертонического криогемолиза при экспозиции в растворах хлорида натрия, осмоляльность которых превышает 800–1170 мосмоль/кг. Значения осмоляльности, при которых наблюдается выход катионов калия из клеток млекопитающих при 37°C, являются пороговыми для развития гемолитического повреждения эритроцитов при последующем охлаждении.

5. Выявлено, что в условиях продолжительной экспозиции эритроцитов человека, лошади, кролика и быка в гипертонических растворах (1,2 моль/л NaCl) при 37°C наблюдается увеличение выхода K^+ из клеток, в то время как характер развития гемолитического повреждения на этапе последующего охлаждения клеток до 0°C зависит от вида млекопитающего.

6. При охлаждении от 37°C гемолитическое повреждение эритроцитов быка и кролика начинается при достижении более низкой температуры (10°C), чем для эритроцитов человека, крысы, собаки и лошади (15°C). Для проявления повреждения эритроцитов при охлаждении до 0°C температура, от которой должно начинаться охлаждение, снижается в ряду: кролик (30°C) > бык (25°C) > лошадь (20°C) > человек, собака (15°C) > крыса (10°C).

7. Амфифильные соединения различных классов (катионные, анионные и неионные) проявляют антигемолитическую активность при гипертоническом криогемолизе и гипертоническом шоке эритроцитов млекопитающих. При всех типах стресса более эффективны катионные амфифильные соединения. Эффективность амфифильных соединений зависит от видовой принадлежности эритроцитов и, как правило, повышается в ряду: гипертонический шок (0°C), гипертонический криогемолиз, гипертонический шок (37°C).

8. Показано, что использование амфифилов разных классов в антигемолитических концентрациях не приводит к изменению барьерной функции эритроцитарной мембраны (по отношению к катионам K^+). Эффективность катионного трифторперазина в условиях гипертонического шока эритроцитов человека, не зависит от состояния белковых компонентов мембраны, модифицированных протеолитическими ферментами (проназа, трипсин, папаин) и нейраминидазой. Катионный хлорпромазин (50–300 мкмоль/л) не оказывает влияния на распределения фосфатидилсерина в мембране.

9. Показано, что величины максимальной антигемолитической активности гомологов глюкопиранозида (гексил-, октил- и децил- β ,D-глюкопиранозид) составляют 90–94% при гипертоническом шоке и гипертоническом криогемолизе эритроцитов человека. Значения эффективных концентраций алкил- β ,D-глюкопиранозидов снижаются в 10–15 раз при удлинении алкильной цепи молекулы на каждые 2 углеродных

атома. Рассчитанные величины отношения липид/амфифил в мембране имеют близкие значения и составляют 26,3–28,4 при гипертоническом шоке и 7,7–15,8 при гипертоническом криогемоллизе эритроцитов человека.

10. Действие амфифильных соединений (додецил- β ,D-мальтозид, додецилсульфат натрия, хлорпромазин) проявляется в изменении микровязкости мембран эритроцитов, при этом трансмембранная локализация эффекта определяется физико-химическими свойствами амфифильных молекул. Высокие концентрации хлорпромазина (300–700 мкмоль/л) вызывают нарушения барьерных свойств мембран эритроцитов (по отношению к ионам феррицианида), а в присутствии низких концентраций вещества (50–200 мкмоль/л) барьерная функция мембраны сохраняется

11. Показано, что исходное состояние эритроцитов млекопитающих в значительной степени определяет их устойчивость к гипертоническому шоку. Для эритроцитов каждого вида млекопитающих определены осмотические условия, в которых формируется исходное состояние клеток, обеспечивающее их максимальную устойчивость к последующему действию гипертонического шока: осмоляльность сред для клеток крысы составляет 550–700; лошади – 700, быка – 1760 мосмоль/кг при 37°C.

12. Определены оптимальные концентрационные (15%, 700 мосмоль/кг) и температурные (0°C) условия обработки эритроцитов человека, лошади и быка непроникающим криопротектором (полиэтиленоксид с молекулярной средней массой 1500), которые обеспечивают максимальную устойчивость клеток к гипертоническому шоку.

13. Защитный эффект глицерина зависит как от экспериментальных условий, так и от видовой принадлежности клеток. При 37°C предварительная экспозиция клеток с глицерином вызывает существенное снижение гипертонического гемолиза эритроцитов человека и быка, для эритроцитов лошади эффект данного криопротектора слабо выражен. При

0°C защитное действие глицерина наблюдается только для клеток человека. Показано, что при комбинированном действии глицерина (0,5–2,0 моль/л) и NaCl (0,15–0,8 моль/л) на этапе предварительной обработки эритроцитов человека наблюдается существенное снижение гипертонического лизиса эритроцитов: до 10 раз при 37°C и до 4 раз при 0°C.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. А.с. 1573429 СССР, МКИ ⁴ G 01 N 33/483. Устройство для определения оптической плотности биологических суспензий / А. В. Дегтярев, С. В. Руденко, Т. П. Бондаренко (СССР). – № 4284159/28-14; заявл.15.07.83; опубл. 23.06.90, Бюл. № 23.
2. Абрамзон А. А. Поверхностно-активные вещества. Свойства и применение / А. А. Абрамзон. – Л. : Химия, 1975. – 248 с.
3. Актуальные проблемы криоконсервирования костного мозга / Н. С. Пушкарь, А. М. Белоус, А. А. Цуцаева [и др.] // Криобиология и криомедицина : [Республиканский межведомственный сборник / отв.ред. Н. С. Пушкарь]. – К. : Наук. думка, 1976. – Вып. 2.– С. 3–16.
4. Александрова Д. И. Сравнительное исследование чувствительности предварительно обезвоженных эритроцитов человека и быка к гипертоническому стрессу / Д. И. Александрова, Н. В. Орлова., Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 4. – С. 327–334.
5. Александрова Д. И. Влияние прединкубации эритроцитов человека и быка в растворах сахарозы на устойчивость клеток к гипертоническому шоку / Д. И. Александрова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Вісник Харківського університету. Серія: біологія. – 2007. – Вип. 6, № 788. – С. 110–115.
6. Александрова Д. И. Гиперосмотический шок эритроцитов лошади / Д. И. Александрова, О. А. Олейник, Н. М. Шпакова // Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине: междунар. науч.-практ. конф., 10–12 октября 2007 г. : тезисы докл. – Ростов-на-Дону, 2007. – С. 47.
7. Александрова Д. И. Влияние предварительного обезвоживания эритроцитов человека и быка на устойчивость к гипертоническому шоку

- при разных температурах / Д. И. Александрова, Н. М. Шпакова // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – № 1. – С. 73–77.
8. Александрова Д. І. Механічний стрес еритроцитів людини, щура, кроля / Д. І. Александрова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Біофізичні механізми функціонування живих систем : міжнар. наук. конф., присвячена 70-річчю від народження О.А. Гойди, 16–18 жовтня 2008 р.: тези доповід. – Львів, 2008. – С. 29–30.
 9. Александрова Д. И. Исходное состояние эритроцитов – фактор, определяющий их чувствительность к гипертоническому стрессу: Роль ПЭО-1500 и температуры / Д. И. Александрова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2009. – № 4. – С. 406–412.
 10. Александрова Д. И. Влияние криопротекторов на гипертоническую устойчивость эритроцитов млекопитающих / Д. И. Александрова, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова // Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия : междунар. конф., Пущино, 28–30 октября 2008 г.: материалы конф. – Биофизика живой клетки. – 2009. – Т. 9. – С. 9–10.
 11. Александрова Д. И. Влияние начальных осмотических и температурных условий на устойчивость эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку : дисс. ... канд. биол. наук : спец 03.00.19 / Дарья Ивановна Александрова. – Харьков, 2011. – 172 с.
 12. Бабийчук Л. А. Криогемолиз эритроцитов: влияние начальной температуры инкубации, тоничности и рН среды / Л. А. Бабийчук // Криоповреждение и криозащита биологических объектов : [сб. науч. трудов / отв. ред. А. А. Цуцаева]. – К. : Наук. думка. – 1988. – С. 10–16.
 13. Бабийчук Л. А. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 / Л. А. Бабийчук, Н. Г. Землянских // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 35–41.
 14. Бабийчук Л. А. Механизмы температурно-осмотической стабильности эритроцитов при охлаждении и замораживании в присутствии

- непроникающего криопротектора : дис. ... доктора биол. наук : спец. 03.00.19 / Любовь Александровна Бабийчук. – Харьков, 2002. – 299 с.
15. Баснакьян И. А. Стресс у бактерий : монография / И. А. Баснакьян. – М.: Медицина, 2003. – 136 с.
 16. Белоус А. М. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко – К. : Наукова думка, 1982. – 255 с.
 17. Белоус А. М. Замораживание и криопротекция / А. М. Белоус, Е. А. Гордиенко, Л. Ф. Розанов – М. : Высшая школа, 1987. – 81 с.
 18. Белоус А. М. Молекулярно-клеточная концепция криоповреждения клетки: роль трансмембранных дефектов / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, А. К. Гулевский // Проблемы криобиологии. – 1987. – № 2. – С. 3–10.
 19. Белоус А. М. Криобиология / А. М. Белоус, В. И. Грищенко. – Киев: Наукова думка, 1994. – 432 с.
 20. Биофизика : учебник для студ. высш. учеб. заведений / В. Ф. Антонов, А. М. Черныш, В. И. Пасечник [и др.], ред. В.Ф.Антонов. – М. : Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 1999. – 288 с.
 21. «Блокирование» полиэтиленгликолем одиночных липидных пор, возникающих в немодифицированных бислойных липидных мембранах при фазовых переходах / В. Ф. Антонов, Е. Ю. Смирнова, А. А. Аносов [и др.] // Биофизика. – 2008. – Т. 53, № 5. – Р. 802–809.
 22. Богданчикова О. А. Криоконсервирование тромбоцитов. 1. Разработка криоконсервантов на основе комбинаций криопротекторов и исследование их эффективности / О. А. Богданчикова, А. М. Компаниец // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 3. – С. 324–337.
 23. Болдырев А. А. Биомембранология : учебное пособие / А. А. Болдырев, Е. И. Кяйвярайнен, В. А. Илюха. – Петрозаводск : Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.

24. Бондаренко В. А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов : дисс. ... д-ра биол. наук : 03.00.22 / Валерий Антонович Бондаренко. – Харьков, 1988. – 446 с.
25. Бондаренко В. А. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток / В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко, С. В. Руденко // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 4. – С. 14–26.
26. Бондаренко Т. П. Роль липидов в повреждении мембраны митохондрий и эритроцитов при охлаждении : автореф. дис. ... канд. биол. наук. : спец. 03.00.22 «Криобиология» / Т. П. Бондаренко – Харьков, 1981. – 16 с.
27. Бондаренко Т. П. Комбинированное действие температуры и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к гипертоническому стрессу / Т. П. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 1993. – № 2. – С. 11–16.
28. Бражкин В. В. Метастабильные фазы, фазовые превращения и фазовые диаграммы в физике и химии // Успехи физических наук. – 2006. – Т. 176, № 7. – С. 745–750.
29. Бужурина И. М. Механизмы формирования клеточного ответа на внешние воздействия / И. М. Бужурина, М. А. Панов // Итоги науки и техники. Серия Общие проблемы физико-химической биологии. – М. : ВИНТИ, 1986. – Т. 3. – 268 с.
30. Влияние амфифильных соединений на гипертонический криогемолиз эритроцитов, модифицированных фенилгидразином / Н. М. Шпакова, Н. А. Писаренко, Н. В. Орлова [и др.] // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине : I международная научно-практическая конференция, 23–26 ноября 2010 г. : [сб. трудов / ред. А. П. Кудинов, Б. В. Крылов]. – Санкт Петербург, Розсип, 2010. – С. 235–240.

31. Влияние антиоксиданта фенозана и нейропептида адренокортикотропного гормона на структурное жидкокристаллическое состояние липидного бислоя и толщину фосфатидилхолиновых мембран / И. Л. Погорецкая, Г. В. Архипова, Л. М. Байдер, Е. Б. Бурлакова // Биофизика. – 1999. – Т. 44, № 5. – С. 852–861.
32. Влияние водорастворимых немембранных белков на структурную организацию фосфолипидов / Г. М. Сорокоумова, А. А. Селищева, О. П. Тюрин [и др.] // Биофизика. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 268–277.
33. Влияние додецил- β ,D-мальтозида и хлорпромазина на гипертонический стресс эритроцитов лошади и кроля / Н. А. Писаренко, С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине : междунар. науч.-практ. конф., 10–12 октября 2007 г. : тезисы докл. – Ростов-на-Дону, 2007. – С. 32–33.
34. Влияние малых концентраций полиэтиленгликолей-1500 и 4000 на механизмы диффузии молекул воды по данным нейтроноскопии / Т. В. Кармазина, В. И. Слисенко, А. А. Василькевич [и др.] // Доповіді Національної академії наук України. – 2008. – № 2. – С. 80–85.
35. Влияние предварительной инкубации в растворах глицерина на гипертонический гемолиз эритроцитов быка / Д. И. Александрова., Н. А. Писаренко, Е. Е. Нипот [и др.] // Биология – наука XXI века : 15 международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, 18–22 апреля 2011, тезисы докл. – Пущино, 2011. – С. 62–63.
36. Влияние состава среды регидратации и ионофора нигерицина на уровень постгипертонического лизиса эритроцитов человека / О. А. Олейник, В. В. Рамазанов, И. В. Бондаренко, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 292–293.
37. Влияние фенилгидразина на чувствительность эритроцитов млекопитающих к гипотоническому и гипертоническому шоку / Н. М. Шпакова, Е. Е. Нипот, О. А. Олейник, Д. И. Александрова

// Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. – 2009. – Т. 2, № 19 (2). – С. 160–165.

38. Влияние хлорпромазина на осмотическую и температурную чувствительность эритроцитов и на структурно-динамическое состояние эритроцитарных мембран / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, С. С. Ершов, В. А. Бондаренко // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / ред А. Н. Гольцев. – Харьков : Издательский дом «Райдер», 2012. – С. 207-228.
39. Вода и водные растворы при температурах ниже 0°C / ред. Ф. Франкс. – пер с англ. – Киев: Наукова думка, 1985. – 388 с.
40. Возможная роль полиморфизма биологических мембран в реакции клеток на физико-химические воздействия / Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова, Я. О. Нардид // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : международная научная конференция, IV съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, 6–8 октября 2004 г. : сборник статей. – Минск, 2004. – С. 281–283.
41. Возрастные особенности устойчивости эритроцитов крыс к гипертоническому воздействию под влиянием хлорпромазина / Е. А. Матвиенко, Л. В. Коба, Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 1. – С. 19–23.
42. Воинова М. В. Катионные амфипаты: электростатический контроль формы эритроцитов / М. В. Воинова, Н. М. Шпакова // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии [сб. науч. трудов / отв. ред. М. И. Шраго]. – Киев : Наук. думка, 1989. – С. 3–6.
43. Воинова М. В. Влияние хлорпромазина на устойчивость и деформацию мембран эритроцитов в условиях температурного и осмотического стресса / М. В. Воинова, Н. М. Шпакова. // Успехи современной криобиологии : II Международная конференция, 21–25 апреля 1992 г. : тезисы докл. – Харьков, 1992. – С. 31–32.

44. Вплив гліцерину на гіпертонічний стрес еритроцитів людини і коня / Н. М. Шпакова, О. Є. Ніпот, Д. І. Александрова [та ін.] // З з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 16–20 травня 2012 р. : тези доповід. – Ялта, 2012. – С. 47.
45. Вплив фенілгідразину на гіпертонічну чутливість попередньо зневоднених еритроцитів ссавців / Н. М. Шпакова, Д. І. Александрова, О. О. Олійник, В. А. Бондаренко // Біологія тварин. – 2008. – Т. 10, № 1–2. – С. 156–163.
46. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции / Р. Геннис : пер. с англ. Л. И. Барсукова, А. Я. Мулкиджаняна, А. Л. Семейкиной, В. Д. Следя. – М. : Мир, 1997. – 624 с.
47. Гильмутдинов Р. Я. Сравнительная гематология животных / Р. Я. Гильмутдинов, Р. Г. Ильязов, А. В. Иванов. – Казань : Изд-во «Фэн» Академии наук РТ, 2005. – 288 с.
48. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц : пер. с англ.. Ю. А. Данилова под ред Н. Е. Бузикашвили и Д. В. Самойлова. – М. : Практика, 1999. – 459 с.
49. Гордієнко О. І. Проникність мембран еритроцитів людини для гліцерину та його ефірних похідних / О. І. Гордієнко, С. В. Кошій, Т. П. Лінник // Фізика живого. – 2003. – Т.11, № 2. – Р. 29–36.
50. Гордиенко Е. А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е. А. Гордиенко, Н. С. Пушкарь. – Киев : Наук. думка, 1994. – 141 с.
51. Гордиенко Е. А. Биофизическая модель явления гипертонического криогемолиза / Е. А. Гордиенко, С. Е. Коваленко // Проблемы криобиологии. – 1996. – № 4. – С. 24–32.
52. Гордиенко Е. А. Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза / Е. А. Гордиенко, С. Е. Коваленко // Проблемы криобиологии. – 1997. – № 3. – С. 3–7.

53. Гордієнко Є. О. Фізика біомембран : підручник / Є. О. Гордієнко, В. В. Товстяк – К. : Наук. думка, 2009. – 272 с.
54. Гулевский А. К. Стратегии холодоустойчивости беспозвоночных / А. К. Гулевский, Л. И. Релина // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2011. – Т. 21, № 3. – С. 239–250.
55. Дегтярев А. В. Исследование особенностей холодового шока фосфолипидных везикул и эритроцитов : дис. ... канд. биол. наук : спец. 03.00.22 / Александр Васильевич Дегтерев. – Харьков, 1988. – 106 с.
56. Дегтярев А. В. Механохимическая модель холодового шока эритроцитов / А. В. Дегтярев // Криповреждение и криозащита биологических объектов : [сб. науч. трудов / отв. ред. А. А. Цуцаева]. – К. : Наук. думка, 1988. – С. 3–6.
57. Дегтярев А. В. Холодовой шок фосфолипидных везикул. Термоупругий механизм нарушения барьерной функциями мембраны / А. В. Дегтярев, В. А. Бондаренко // Криобиология. – 1989. – № 3. – С. 30–35.
58. Дегтярев А. В. Кинетика кренирования и гемолиза эритроцитов под действием ионофоров в изо- и гипертонических средах / А. В. Дегтярев, Е. Р. Панталер // Физико-химические процессы в криобиологических системах : [сб. науч. трудов / отв. ред. В. А. Моисеев]. – Харьков, 1991. – С. 19–31.
59. Действие протеолитической обработки на холодовой шок эритроцитов / В. В. Рамазанов, А. Ю. Семенченко, Е. Л. Воловельская [и др.] // Проблемы криобиологии. – 1998 – № 2. – С. 46–49.
60. Действие трифторперазина на гемолиз эритроцитов в гипертонических растворах электролитов / Н. М. Шпакова, О. Н. Дунаевская, О. П. Сынчикова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 3. – С. 7–15.
61. Денисова О. М. Кріоконсервування еритроцитів тварин під захистом поліетиленоксиду / О. М. Денисова, Г. Ф. Жегунов, Л. О. Бабійчук // Біологія тварин. – 2004. – Т. 6, № 1–2. – С. 104–110.

62. Денисова О. Н. Криочувствительность эритроцитов разных видов млекопитающих : дисс. ... канд. биол. наук : спец. 03.00.19 / Ольга Николаевна Денисова. – Харьков, 2006. – 169 с.
63. Динамический анализ морфологических изменений эритроцитов в процессе гипертонического гемолиза / О. П. Сынчикова, Н. М. Шпакова, Т. А. Стрелкова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 2. – С. 62–63.
64. До питання про механізми захисної дії катіонних та неіонних сполук в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів / В. А. Бондаренко, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова [та ін.] // II з'їзд трансплантологів України, 18–20 жовтня 2000 р. : тези доповід. – Київ, 2000. – Трансплантологія. – 2000. – Т. 1, № 1. – С. 298–299.
65. Дунаєвська О. М. Можливості управління стійкістю еритроцитів до гіперосмотичного стресу: роль початкового стану клітин та катіонних амфіпатів / О. М. Дунаєвська, О. Р. Панталер, Н. М. Шпакова // I з'їзд Українського біофізичного товариства, 21–24 червня 1994 р. : тези доповід. – Київ, 1994. – С. 93.
66. Дунаевская О. Н. Гипертонический стресс эритроцитов и антигемолитическая активность трифторперазина / О. Н. Дунаевская, Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 1997. – № 4. – С. 28–32.
67. Дунаевская О. Н. Защитный эффект трифторперазина при гиперосмотическом шоке эритроцитов / О. Н. Дунаевская, Н. М. Шпакова // Украинский биохимический журнал. – 1997. – Т. 69, № 2. – С. 30–35.
68. Дюпортай Г. Вплив алкілглюкопіранозидів на термотропні властивості ліпосом різного складу і мембран еритроцитів / Г. Дюпортай, А. С. Козлов // II з'їзд Українського біофізичного товариства, 29 червня – 3 липня 1998 р. : тези доповідей. – Харків, 1998. – С. 99.
69. Единый механизм повреждения клеток при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе / А. М. Белоус,

- В. А. Бондаренко, Л. А. Бабийчук [и др.] // Криобиология. – 1985. – № 2. – С. 25–32.
70. Ершов С. С. Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2004. – № 3. – С. 51–57.
 71. Ершов С. С. Участие ионтранспортных систем в развитии чувствительности эритроцитов млекопитающих к холодовому шоку / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // IX Український біохімічний з'їзд, 24–27 жовтня 2006 р. : тези доповід. – Харків, 2006. – Т. 2. – С. 54.
 72. Ершов С. С. Гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих в средах с различным катионным составом / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 3. – С. 243–250.
 73. Ершов С. С. Осмотическая и температурная чувствительность эритроцитов млекопитающих : дис. ... канд. биол. наук : спец. 03.00.19 / Сергей Сергеевич Ершов. – Харьков, 2009. – 187 с.
 74. Ершова Н. А. Влияние фенилгидразина и алкилсульфатов на осмотическую чувствительность эритроцитов млекопитающих / Н. А. Ершова, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова // Доповіді Національної академії наук України. – 2012. – № 6. – С. 129–133.
 75. Ершов С. С. Вплив хлорпромазину на чутливість еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології, 25–28 квітня 2004 р. : тези доповід. – Львів, 2004. – С. 63.
 76. Ершов С. С. Порівняльний аналіз гіпертонічного криогемолізу еритроцитів різних видів тварин при зміні осмотичних і температурних умов середовища / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Біологія тварин. – 2006. – Т. 8, № 1–2. – С. 123–129.

77. Єршов С. С. Вплив катіонних та аніонних амфіфільних сполук на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів ссавців / С. С. Єршов, Н. А. Писаренко, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Фізіологічний журнал. – 2007. – Т. 53, № 6. – С. 78–84.
78. Єршов С. С. Вплив попередньої інкубації при температурі 49°C та обробки фенілгідразином на рівень гіпертонічного шоку та гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців / С. С. Єршов, Н. М. Шпакова // 2 з'їзд Українського товариства клітинної біології, 23–26 жовтня 2007 р. : тези доповід. – Київ, 2007. – С. 62.
79. Єршов С. С. Вплив амфіфілів різних класів на морфологію еритроцитів ссавців / С. С. Єршов, Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова // Молодь та поступ біології : IV міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів, 7–10 квітня 2008 р. : тези доповід. – Львів, 2008. – С. 28–29.
80. Жегунов Г. Ф. Проницаемость эритроцитов млекопитающих для молекул глицерина и ДМСО и степень сохранности клеток после замораживания-оттаивания / Г. Ф. Жегунов, О. Н. Денисова // Доповіді Національної академії наук України. – 2010. – № 12. – С. 139–143.
81. Жиликова Т. А. Температурозависимые изменения состояния воды в биологических мембранах по данным методов ЯМР и СВЧ-диэлектрметрии : дисс. ... канд. биол. наук : спец. 03.00.22 / Татьяна Александровна Жиликова. – Харьков, 1991. – 170 с.
82. Жмакин А. И. Физические основы криобиологии / А. И. Жмакин // Успехи физ. химии. – 2008. – Т. 178, № 3. – С. 243–266.
83. Западнюк И. П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария. – [2-е изд.]. – К. : Издательское объединение «Вища школа», 1974. – 304 с.
84. Землянских Н. Г. Изменения в мембранно-цитоскелетном комплексе эритроцитов, индуцированные диметилсульфоксидом,

- полиэтиленгликолем и низкой температурой / Н. Г. Землянских, О. Н. Денисова // Биофизика. – 2009. – Т. 54, № 4. – С. 693–703.
85. Зубов П. М. Изменение содержания спектрина в изолированных цитоскелетах эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500 и замораживания-отогрева / П. М. Зубов, Н. Г. Землянских, Л. А. Бабийчук // Гематологія і переливання крові. – 2006. – № 33. – С. 109–113.
 86. Ивков В. Г. Динамическая структура липидного бислоя / В. Г. Ивков, Г. Н. Берестовский. – М. : Наука, 1981. – 293 с.
 87. Изучение влияния KCl и $K_3Fe(CN)_6$ на структуру липосомальных мембран, модифицированных спиновыми зондами при 5–50°C / Ю. Б. Гребенщиков, К. Н. Тимофеев, Г. И. Лихтенштейн, Ю. Ш. Мошковский // Биофизика. – 1983. – Т. 28, № 4. – С. 637–643.
 88. Исследование методом ЯМР температурной зависимости коэффициента самодиффузии воды через липидные бислойные мембраны / А. М. Хакимов, М. М. Дорогиницкий, М. А. Рудакова, А. В. Филиппов // Биофизика. – 2008. – Т. 53, № 2. – С. 271–280.
 89. Карпунин Д. В. Формирование пор в плоских липидных мембранах, содержащих лизолипиды и холестерин / Д. В. Карпунин, С. А. Акимов, В. А. Фролов // Биологические мембраны. – 2005. – Т. 22, № 5. – С. 429–432.
 90. Коваленко С. Є. Причина та механізм явища гіпертонічного кріогемолізу : автореф. дис. ... канд. біол. наук : спец. 03.00.19 «Кріобіологія і кріомедицина» / С. Є. Коваленко. – Харків, 1999. – 13 с.
 91. Колесниченко А. В. Белки низкотемпературного стресса растений / А. В. Колесниченко, В. К. Войников. – Иркутск : Арт-Пресс, 2003. – 196 с.
 92. Комарова Н. В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ» / Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев. – СПб. : ООО «Веда», 2006. – 212 с.

93. Конененко В. Л. Фликкер эритроцитов. 2. Результаты экспериментальных исследований / В. Л. Конененко // Биологические мембраны. – 2009. – Т. 26, № 6. – С. 451–467.
94. Корекція гіпертонічного криогемолізу еритроцитів людини і бика за допомогою аніонних амфіфільних сполук / Н. М. Шпакова, Н. А. Писаренко, Н. В. Орлова, В. М. Хмельков // Біологія тварин. – 2007. – Т. 9, № 1–2. – С. 146–151.
95. Костюкова А. С. Формирование кэпирующего комплекса на медленно растущем конце актиновых филаментов / А. С. Костюкова // Успехи биол. химии. – 2008. – Т. 48. – С. 253–266.
96. Кочережская И. А. Электрические и структурные параметры эритроцитов в криозащитных растворах, содержащих полиэтиленоксид : дис. ... канд. биол. наук : спец. 03.00.22 / Ирина Александровна Кочережская. – Харьков, 1984. – 216 с.
97. Коэн Ф. Регуляция ферментативной активности / Ф. Коэн, пер. с англ. Л. М. Гинодмана. – М. : Мир, 1986. – 144 с.
98. Криопротекторы / Н. С. Пушкарь, М. И. Шраго, А. М. Белоус, Ю. В. Калугин – К. : Наук. думка, 1978. – 204 с.
99. Кузнецов А. И. Метод спинового зонда (основы и применение) / А. И. Кузнецов. – М. : Наука, 1976. – Глава 11.8. Концентрационные эффекты и бирадикалы. – С. 95–106.
100. Кузурман П. А. О механизме полиморфных превращений в фосфатидилхолиновых мембранах / П. А. Кузурман, Г. В. Архипова, Е. Б. Бурлакова // Биофизика. – 2002. – Т. 47, № 5. – С. 842–847.
101. Кулешова Л. Г. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений / Л. Г. Кулешова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 9–15.
102. Ландау Л. Д. Статистическая физика. Часть 1 / Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц. – 5-е изд. – М.: Физматлит, 2005. – 616 с.

103. Линг Г. Физическая теория живой клетки: незамеченная революция / Г. Линг, пер. с англ. А. Б. Иванюка. – СПб. : Наука, 2008. – 376 с.
104. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии / Г. И. Лихтенштейн. – М.: Наука, 1974. – Глава 1 : Влияние вращательной диффузии на спектры ЭПР иминоксильных радикалов. – С. 10–29.
105. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии / Г. И. Лихтенштейн. – М. : Наука, 1974. – Глава 4 : Исследование микроструктуры белков методом «спиновый зонд – спиновая метка». – С. 74–94.
106. Мартыненко А. А. Влияние ПЭО-1500 и низких температур на изоосмотическую резистентность эритроцитов человека / А. А. Мартыненко, В. И. Луговой // Криобиология и криомедицина : [Республиканский межведомственный сборник / отв.ред. Н. С. Пушкаръ]. – 1981. – Вып. 8. – С. 22–24.
107. Межидов С. Х. Подход к оценке цитотоксичности криопротекторов / С. Х. Межидов // Проблемы криобиологии. – 1997. – № 3. – С. 59–60.
108. Межидов С. Х. О роли осмотических факторов в повреждении клеток при их замораживании / С. Х. Межидов // Проблемы криобиологии. – 1996. – №1. – С. 54–57.
109. Мельникова О. В. Модифицирующие действие глюкозы на эритроциты в условиях охлаждения и замораживания / О. В. Мельникова, Т. П. Бондаренко // Физико-химические процессы в криобиологических системах : [сб. науч. трудов / отв. ред. В. А. Моисеев]. – 1991. – С. 68–78.
110. Метод спиновых меток. Теория и применение / ред. Л. Берлинер, пер. с англ. Р. И. Жданова, В. К. Кольтовера, В. А. Лившица. – М. : Мир, 1979. – Глава 12 : Липидные спиновые метки в биологических мембранах / О. Гриффит, П. Джост. – С. 489–569.
111. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник / ред. проф. И. П. Кондрахин. – М. : КолосС, 2004. – 520 с.

112. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовому и гиперосмотическому воздействию при использовании катионных амфипатов / О. Н. Дунаевская, Е. Р. Панталер, Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 1995. – № 1. – С. 21–27.
113. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовому и гиперосмотическому воздействиям при использовании катионных амфипатов / О. Н. Дунаевская, Е. Р. Панталер, Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 1995. – № 1. – С. 21–27.
114. Никольский Б. П. Ионоселективные электроды / Б. П. Никольский, Е. А. Матерова. – Л. : Химия, 1980. – 240 с.
115. О роли фактора сольватации в стабилизации дисперсных систем, содержащих водо-растворимые полимеры / А. А. Баран, И. М. Соломенцева, В. В. Манк, О. Д. Куриленко // Доклады Академии наук СССР. – 1972. – Т. 207, № 2. – С. 363–366.
116. Овчинникова О. А. Реологические свойства крови в условиях модификации энергетического баланса эритроцитов / О. А. Овчинникова, И. А. Тихомирова // Ярославский педагогический вестник. – 2012. – Т. III (Естественные науки), № 3. – С. 134–139.
117. Оптимізація етапу обробки еритроцитів ПЕО-1500 перед заморожуванням / Н. М. Шпакова, Д. І. Александрова, О. М. Денисова, Н. В. Орлова // 3 з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 16–20 травня 2012 р. : тези доповід. — Ялта, 2012. – С. 48.
118. Орлова Н. В. Действие двухвалентных катионов на чувствительность эритроцитов к гиперосмотическому стрессу и холодовому шоку / Н. В. Орлова., Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 1998. – № 1. – С. 30–35.

119. Орлова Н. В. Действие хлорпромазина на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов / Н. В. Орлова, Л. В. Цымбал, Н. М. Шпакова // Биологический вестник. – 1999. – Т. 3, № 1–2. – С. 71–75.
120. Орлова Н. В. Влияние амфифильных соединений на чувствительность частично обезвоженных эритроцитов к гипертоническому стрессу / Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2003. – № 1. – С. 59–64.
121. Орлова Н. В. Влияние температуры на проявление антигемолитической активности амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов / Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Актуальные проблемы медицины и биологии, № 1. Киев, 2004. – С. 181–184.
122. Орлова Н. В. Действие алкилдиметиламмоний пропансульфанатов на гипертонический гемолиз эритроцитов / Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2004. – № 2. – С. 11–16.
123. Орлова Н. В. Влияние диамида на проявление антигемолитической активности амфифильных соединений при гипертоническом гемолизе эритроцитов / Н. В. Орлова, Л. В. Цымбал, Н. М. Шпакова. // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 536–537.
124. Орлова Н. В. Механізм захисної дії амфифільних сполук в умовах гіпертонічного гемолізу еритроцитів / Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Фізіологічний журнал. – 2006. – Т. 52, № 5. – С. 55–61.
125. Осмотическая чувствительность эритроцитов млекопитающих после их истощения по АТФ / Н. М. Шпакова, Е. Е. Нипот, Н. В. Орлова [и др.] // Доповіді Національної академії наук України. – 2013. – № 1. – С. 151–156.
126. Особенности динамической структуры цитоплазмы эритроцитов различных видов животных / С. С. Ершов, Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // IV з'їзд Українського біофізичного товариства, 19–21 грудня 2006 р.: тези доповід. – Донецьк, 2006. – С. 49–50.

127. Пакулова О. К. Влияние анионов ряда Гофмейстера на гипертонический лизис эритроцитов человека / О. К. Пакулова, В. А. Бондаренко // Вісник проблем біології і медицини .– 2008. – Вип. 3. – С. 23–26.
128. Панталер Е. Р. Динамическая деформация одиночных эритроцитов в гипертонических средах / Е. Р. Панталер, А. В. Дегтярев, И. А. Жутченко // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии [сб. науч. трудов / отв. ред. М.И.Шраго]. – Киев : Наук. думка, 1989. – С. 6–9.
129. Панталер О. Р. Вплив початкового ступеню дегідратації цитоматриксу та температури на кінетичні параметри гіперосмотичного лізису еритроцитів / О. Р. Панталер, М. В. Воїнова, Н. М. Шпакова // І з'їзд Українського біофізичного товариства, 21–24 червня 1994 р. : тези доповід. – Київ, 1994. – С. 184–185.
130. Панталер О. Р. Температурная и фармакологическая коррекция эволюции трансмембранной поры в условиях гиперосмотического шока / О. Р. Панталер, Н. М. Шпакова., В. А. Бондаренко // І з'їзд Українського товариства криобіології і кріомедицини, 18–20 жовтня 1995 р : тези доповід. – Харків, 1995. – С. 191–193.
131. Панталер Е. Р. Исследование устойчивости дегидратированных эритроцитов к действию осмотического и механического стресса : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.22 «Криобиология» / Е. Р. Панталер. – Харьков, 1996. – 24 с.
132. Пат. 37514 Україна, МПК⁸ G 01 N 33/49. Спосіб зниження гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини / Н. М.Шпакова, Н. В. Орлова, В. А. Бондаренко; заявник і патентовласник Інститут проблем криобіології і кріомедицини Національної академії наук України. – № u 2008 09235; заявл. 15.07.2008; опубл. 25.11.2008, Бюл. № 22.
133. Пат. 38944 Україна, МПК⁸ A 01 N 1/00. Спосіб зниження холодового шоку еритроцитів людини / Н. М.Шпакова , Н. В. Орлова,

- В. А. Бондаренко; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України. – № у 2008 10779; заявл. 01.09.2008 опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2.
134. Пат. 50069 Україна, МПК⁸ G 01 N 33/48. Спосіб визначення температурних умов інкубування еритроцитів з ПЕО-1500 / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, Д. І. Александрова, О. М. Денисова; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України. – № у 2009 11892; заявл. 20.11.2009; опубл. 25.05.2010, Бюл. № 10.
135. Пат. 52701 Україна, МПК⁸ G 01 N 33/48. Спосіб деструкції еритроцитів / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, Д. І. Александрова; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № у 2010 00983; заявл. 01.02.2010; опубл. 10.09.2010, Бюл. № 17.
136. Песина Н. И. Развитие чувствительности эритроцитов к охлаждению в средах, содержащих неэлектролиты / Н. И. Песина // Проблемы криобиологии. – 1993. – № 4. – С. 56–57.
137. Петренко Ю. М. Изменение размеров эритроцитов при набухании в гипоосмотических средах / Ю. М. Петренко, Ю. А. Владимиров // Биофизика. – 1987. – Т. 32, № 3. – С. 448–453.
138. Писаренко Н. А. Влияние амфифильных соединений на гипертонический стресс эритроцитов человека и быка / Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова // Вісник Харківського університету. Серія : біологія. – 2007. – Вип. 5, № 768. – С. 145–149.
139. Писаренко Н. А. Вплив амфифільних сполук на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів кроля / Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова // Молодь та поступ біології: міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів, 23–27 квітня 2007 р.: тези допов. – Львів, 2007. – С. 483–484.
140. Писаренко Н. А. Антигемолитическая активность амфифильных соединений в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих,

модифицированных фенилгидразином / Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова // Вісник Харківського університету. Серія : біологія. – 2009. – Вип. 9, № 856. – С. 166–172.

141. Писаренко Н. А. Антигемолитическая активность амфифильных соединений в условиях гипертонического шока эритроцитов млекопитающих, модифицированных фенилгидразином / Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова // Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия: междунар. конф., Пущино, 28–30 октября 2008 г.: материалы конф. – Биофизика живой клетки. – 2009. – Т. 9. – С. 103.
142. Писаренко Н. А. Влияние амфифильных веществ на гипертонический гемолиз эритроцитов, модифицированных температурой 49°C / Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 4. – С. 388–395.
143. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах / К. Холмберг, Б. Йёнссон, Б. Кронберг, Б. Линдман; пер с англ. Г. П. Ямпольской. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 527 с.
144. Поздняков В. В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.22 «Криобиология» / В. В. Поздняков. – Харьков, 1989. – 16 с.
145. Поздняков В. В. Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4.0 М NaCl / В. В. Поздняков, В. А. Бондаренко // Криобиология. – 1989. – № 1. – С. 47–49.
146. Поздняков В. В. «Объемный сдвиг» как фактор, контролирующий осмотическую устойчивость эритроцитов в растворах низкомолекулярных криопротекторов / В. В. Поздняков, В. А. Бондаренко // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов : [сб. науч. трудов / отв. ред. В. И. Луговой]. – К. : Наук. думка, 1990. – С. 115–123.

147. Полякова Е. В. Определение катионов калия, натрия, магния и кальция в сыворотке крови методом капиллярного электрофореза / Е. В. Полякова, О. В. Шуваева, Е. М. Полянская // Аналитика и контроль. – 2005. – Т. 9, № 1. – С. 70–73.
148. Прайс В. Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия / В. Прайс. – М. : Мир, 1967. – 355 с.
149. Практическая химия белка / ред. А. Дарбре : пер. с англ. Н. А. Алдановой, И. В. Назимова, П. Д. Решетова. – М. : Мир, 1989. – 623 с.
150. Рамазанов В. В. Действие гемина и ДИДС на холодовой и гипертонический шок эритроцитов / В. В. Рамазанов, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 1996. – № 2. – С. 13–17.
151. Рамазанов В. В. Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с проникающими и непроникающими криопротекторами / В. В. Рамазанов, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 1. – С. 47–57.
152. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : Медиа Сфера, 2002. – 312 с.
153. Рефрактометрический метод анализа : учебно – методическое пособие / ред. Е. А. Краснов. – Томск, 2002 – 36 с.
154. Розин В. В. Влияние температуры на гемолиз и везикуляцию эритроцитов, индуцированные додецилсульфатом натрия / В. В. Розин, О. А. Сенькович, Е. А. Черницкий // Биологические мембраны. – 2001. – Т. 18, № 4. – С. 294–298.
155. Сайфиев Р. Р. Исследование деформируемости эритроцитов млекопитающих с использованием усовершенствованного эктацитометра : автореф. дис. ... канд. биол. наук : спец. 03.00.13 «Физиология» / Р. Р. Сайфиев. – Тюмень, 2002. – 22 с.

156. Сведенцов Е. П. Криоконсерванты для живых клеток / Е. П. Сведенцов. – Сыктывкар : Коми научный центр УрО РАН, 2010. – 80 с.
157. Связь между выходом ионов K^+ и гипертоническим криогемолизом эритроцитов разных видов млекопитающих / С. С. Ершов, Н. М. Шпакова, Е. Е. Нипот [и др.] // Актуальні питання біологічної фізики та хімії. БФФХ – 2012 : VIII Міжнар. наук.-техн. конф., 23–27 квітня 2012 р. : тези доповід. – Севастополь, 2012. – С. 28–30.
158. Связь явления холодового шока со структурными переходами в мембране эритроцитов собаки / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова, Л. В. Цымбал // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : международная научная конференция, VII съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, 21–23 июня 2006 г. : сборник статей. – Минск, 2006. – Т. 1. – С. 241 – 243.
159. Селье Г. Стресс без дистресса / Г. Селье. – М. : Прогресс, 1982. – 128 с.
160. Сидоренко Е. В. Методы математической обработки в психологии / Е. В. Сидоренко. – СПб. : ООО «Речь», 2003 – 350 с.
161. Сынчикова О. П. Влияние алкил- β ,D-глюкопиранозидов на температурозависимый гипертонический гемолиз эритроцитов, модифицированных фенилгидразином / О. П. Сынчикова, Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Биологический вестник. – 2001. – Т. 5, № 1–2. – С. 81–86.
162. Сынчикова О. П. Влияние амфифильных соединений на гипертонический гемолиз эритроцитов : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.19 / Ольга Петровна Сынчикова. – Харьков, 2003. – 151 с.
163. Температурозависимые изменения структуры эритроцитов. Сообщение 1. Роль ионов и фазовых переходов в индукции процессов криогемолиза / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко, Л. А. Бабийчук // Криобиология и криомедицина. : [Республиканский

- межведомственный сборник / отв.ред. Н. С. Пушкаръ]. – 1983. – № 12. – С. 13–24.
164. Федосова С. Н. Модифицирующее влияние курантила на осмотическую чувствительность эритроцитов / С. Н. Федосова, Е. В. Кудокоцева // Проблемы криобиологии. – 1995. – № 1 – С. 27–31.
 165. Физико-химические свойства эритроцитов крови человека и животных в норме и при некоторых эндогенных и экзогенных воздействиях на организм : учебно-методическое пособие для студентов и аспирантов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии / Н. К. Комарова, Т. Г. Свиридова, Л. В. Степовик., А. Б. Хайруллина, Оренбургский государственный аграрный университет. – Оренбург, 2003. – 20 с.
 166. Физиология человека : учебник / ред. В. М. Покровский, Г. Ф. Коротько. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 2003. – 656 с.
 167. Физическая модель гипертонического гемолиза / О. П. Сынчикова, Н. М. Шпакова, Т. А. Стрелкова, В. А. Бондаренко // Вісн. Харк. ун-ту. Біофізичний вісник. – 2002. – Вип. 1 (10), № 560. – С. 78–81.
 168. Фридрихсберг Д. А. Курс коллоидной химии : учебник для вузов / Д. А. Фридрихсберг. – [3-е изд., исправл.]. – СПб : Химия, 1995. – Глава XVII : Мицеллярные системы. – С. 349–359.
 169. Харакоз Д. П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах / Д. П. Харакоз // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – Р. 334–364.
 170. Цымбал Л. В. Влияние антигемолитических агентов на структурно-динамическое состояние мембран эритроцитов / Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Вісник Харківського університету. Біофізичний вісник. – 2002. – Вип. 1 (10), № 560. – С. 68-72.
 171. Цымбал Л. В. Немонотонность температурно-зависимых параметров динамической структуры мембран эритроцитов. Влияние модификации SH-групп белков / Л. В. Цымбал, Я. О. Нардид. // Вісник Харківського

університету. Біофізичний вісник. – 2004. – Вип. 1–2 (14), № 637 – С. 76–84.

172. Цымбал Л. В. Влияние температуры и хлорпромазина на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов / Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблеми біологічної і медичної фізики : І Українська наукова конференція, 20–22 вересня 2004 : тези доповід. – Харків, 2004. – С. 114.
173. Цымбал Л. В. Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов / Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Биологические мембраны. – 2005. – Т. 22, № 4. – С. 327–335. P11
174. Цымбал Л. В. Влияние хлорида натрия на динамическую структуру водно-белковой матрицы цитоплазмы эритроцитов быка / Л. В. Цымбал, Н. М. Шпакова, С. С. Ершов, Н. В. Орлова // Состояние воды в биологических и модельных системах : материалы 1 международной конференции, Тверь, 20–21 декабря 2007 г. – С. 72–73.
175. Черницкий Е. А. Структура и функции эритроцитарных мембран / Е. А. Черницкий, А. В. Воробей. – Минск: Наука и техника, 1981. – 216 с.
176. Шпакова Н. М. Действие криопротекторов и амфипатических соединений на состояние эритроцитов, подвергнутых холодовому и осмотическому шоку : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.22 / Наталия Михайловна Шпакова – Харьков, 1988. – 191 с.
177. Шпакова Н. М. Действие хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов / Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Биохимия. – 1991. – Т. 56, № 12. – С.2125–2130.
178. Шпакова Н. М. Механизм криогемолиза эритроцитов, индуцированного катионными амфипатами: синергизм индукции перехода "дискоцит – стоматоцит III" при действии хлорпромазина и тоничности среды

- / Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Украинский биохимический журнал. – 1991. – Т. 60, № 6. – С. 83–88.
179. Шпакова Н. М. Модифицирующее влияние хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов / Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Биохимические аспекты холодовой адаптации [сб. науч. трудов / отв. ред. Гулевский А. К.]. – К.: Наук. думка, 1991. – С. 152–158.
 180. Шпакова Н. М. Модифицирующий эффект конканавалина А и диамида на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку / Н. М. Шпакова, А. Ю. Семенченко, В. А. Бондаренко // Биохимия. – 1991. – Т. 56, № 5. – С. 923–929.
 181. Шпакова Н. М. Модификация плазматической мембраны и устойчивость эритроцитов к холодовому шоку / Н. М. Шпакова // Успехи современной криобиологии : II Международная конференция, 21–25 апреля 1992 г. : тезисы докл. – Харьков, 1992. – С. 205–206.
 182. Шпакова Н. М. Чувствительность эритроцитов к холодовому шоку в средах, содержащих соли и неэлектролиты / Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 3. – С. 15–20.
 - Шпакова Н. М. Чувствительность модифицированных хлорпромазином эритроцитов к холодовому шоку / Н. М. Шпакова, Л. В. Шеремет // Украинский биохимический журнал. – 1993. – Т. 65, № 1. – С. 69–74.
 184. Шпакова Н. М. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов / Н. М. Шпакова, Е. Р. Панталер, В. А. Бондаренко // Биохимия. – 1995. – Т. 60, № 10. – С. 1624–1631.
 185. Шпакова Н. М. Ефекти катіонних і неіонних амфифільних сполук при холодовому та гіперосмотичному стресі еритроцитів / Н. М. Шпакова, О. Р. Панталер, Н. В. Орлова // II з'їзд Українського біофізичного товариства, 29 червня – 3 липня 1998 р. : тези доповід. – Харків, 1998. – С. 198.

186. Шпакова Н. М. Влияние додецил- β ,D-мальтозида на устойчивость предварительно дегидратированных эритроцитов к гиперосмотическому и холодовому шоку / Н. М. Шпакова, Е. Р. Панталер, Н. В. Орлова // Проблемы криобиологии. – 1999. – № 3. – С. 10–15.
187. Шпакова Н. М. Гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих / Н. М. Шпакова, С. С. Ершов // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 3. – С. 286–291.
188. Шпакова Н. М. Реакция эритроцитов человека, быка и кроля на изменение осмотических и температурных параметров среды / Н. М. Шпакова, С. С. Ершов, Н. В. Орлова // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – № 4. – С. 81–85.
189. Шпакова Н. М. До питання про можливу кореляцію між виходом іонів K^+ і розвитком гемолітичного пошкодження еритроцитів ссавців в умовах гіпертонічного криогемолізу / Н. М. Шпакова, С. С. Єршов, О. Є. Ніпот // Біологія тварин. – 2008. – Т. 10, № 1–2. – С. 164–170.
190. Шпакова Н. М. К вопросу о механизме антигемолитического действия хлорпромазина при изменении осмотических и температурных параметров среды / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, Л. В. Цымбал // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 180.
191. Шпакова Н. М. Влияние инкубации эритроцитов лошади при 49°C на эффективность амфифильных веществ в условиях гипертонического стресса / Н. М. Шпакова, Н. А. Писаренко, Н. В. Орлова // Проблемы криобиологии. – 2009. – № 1. – С. 49–55.
192. Шпакова Н. М. Возможный механизм коррекции осмотической и температурной чувствительности эритроцитов человека с помощью алкил- β ,D-глюкопиранозидов / Н. М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 4. – С. 449–60.
193. Шпакова Н. М. Роль глицерина в коррекции гипертонической чувствительности эритроцитов человека / Н. М. Шпакова // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – № 1. – С. 43–47.

194. Шпакова Н. М. Влияние алкилсульфатов на гипертонический гемолиз эритроцитов млекопитающих / Н. М. Шпакова., Н. А. Писаренко, Е. Е. Нипот // Проблемы зооинженерії та ветеринарної медицини. – 2010. – Вип. 21, Ч. 2, Т. 2. – С. 89–96.
195. Шпакова Н. М. Гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів ссавців в електролітному та неелектролітному середовищі / Н. М. Шпакова, С. С. Єршов, О. Є. Ніпот // Біологія тварин. – 2010. – Т. 12, № 2. – Р. 498–504.
196. Шпакова Н. М. Осмотичний і температурний стрес еритроцитів різних видів ссавців / Н. М. Шпакова // Біологія тварин – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 382–391.
197. Шпакова Н. М. Особенности динамики развития гипотонического гемолиза эритроцитов млекопитающих в присутствии хлорида ртути / Н. М. Шпакова, Е. Е. Нипот, Н. В. Орлова // Актуальні питання біологічної фізики та хімії. БФФХ – 2012 : VIII Міжнар. наук.-техн. конф., 23–27 квітня 2012 р. : тези доповід. – Севастополь, 2012. – С. 27–28.
198. Шпакова Н. М. Влияние хлорида ртути на развитие гипотонического гемолиза эритроцитов млекопитающих / Н. М. Шпакова, Е. Е. Нипот., Н. В. Орлова // Актуальные проблемы ветеринарной биологии. – 2012. – 3 (15). – С. 8–12.
199. Шпакова Н. М. Сочетанное действие глицерина и предварительного обезвоживания на гипертонический шок эритроцитов человека / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, Е. Е. Нипот [и др.] // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины : научная конференция с международным участием, посвященная 40-летию создания Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 18–19 октября 2012 г. : тезисы докладов. – Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, № 3. – С. 344.

200. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation / H. Kim, S. Tanaka, S. Une [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 2004. – Vol. 66, № 12. – P. 1543–1547.
201. A mechanistic view on the non-ideal osmotic and motional behavior of intracellular water / I. L. Cameron, K. M. Kanal, C. R. Keener, G. D. Fullerton // Cell Biol. Int. – 1997. – Vol. 21, № 2. – P. 99–113.
202. A new method for the reconstitution of the anion transport system of the human erythrocyte membrane / U. Scheuring, K. Kollewe, W. Haase, D. Schubert // J. Membr. Biol. – 1986. – Vol. 90, № 2. – P. 123–135.
203. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch / S. D. Rowley, Z. Feng, L. Chen [et al.] // Bone Marrow Transplant. – 2003. – Vol. 31, № 11. – P. 1043–1051.
204. A spin label study of the membrane effect of various psychoactive drugs in human erythrocytes / M. Lejoyeux, D. Daveloose, J. C. Mazière [et al.] // Life Sci. – 1993. – Vol. 52, № 2. – P. PL7–PL11.
205. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes / J. Florin-Christensen, C. E. Suarez, M. Florin-Christensen [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, № 14. – P. 7736–7741.
206. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments / C. G. dos Remedios, D. Chhabra, M. Kekic [et al.] // Physiol. Rev. – 2003. – Vol. 83, № 2. – P. 433–473.
207. Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion / W. A. Anong, T. Franco, H. Chu [et al.] // Blood. – 2009. – Vol. 114, 9. – P. 1904–1912.
208. Agasoster A. V. Chlorpromazine associates with phosphatidylserines to cause an increase in the lipid's own interfacial molecular area--role of the fatty acyl composition / A. V. Agasoster, H. Holmsen // Biophys. Chem. – 2001. – Vol. 91, № 1. – P. 37–47.

209. Alternative principle of cryobiology: elaboration of cellular mechanisms of cold and osmotic stability / V. Bondarenko, T. Bondarenko, N. Shpakova [et al.] // 31st Annual Meeting of Society for Cryobiology “CRYO-94”, August, 21–26, 1994 : Abstracts. – Kyoto (Japan), 1994. – P. 27.
210. Amount of cholesterol in host membrane affects erythrocyte invasion and replication by *Babesia bovis* / K. Okubo, N. Yokoyama, N. Takabatake [et al.] // *Parasitol.* – 2007. – Vol. 134, № 5. – P. 625–630.
211. Amphiphile-induced phosphatidylserine exposure in human erythrocytes / H. Hägerstrand, T. H. Holmström, M. Bobrowska-Hägerstrand [et al.] // *Mol. Membr. Biol.* – 1998. – Vol. 15, № 2. – P. 89–95.
212. Amphiphilic substances increase the stability of erythrocytes to the action of cold and hyperosmotic stress / N. M. Shpakova, L. V. Koba, V. A. Bondarenko [et al.] // 34th Annual Meeting of the Society for Cryobiology “CRYO-97”, June, 8–12, 1997 : Abstracts book. – Barselona (Spain), 1997. – P. 160.
213. An 11-amino acid beta-hairpin loop in the cytoplasmic domain of band 3 is responsible for ankyrin binding in mouse erythrocytes / M. Stefanovic, N. O. Markham, E. M. Parry [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104, № 35. – P. 13972–13977.
214. An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at -80 degrees C for up to 37 years / C. R. Valeri, G. Ragno, L. E. Pivacek [et al.] // *Vox Sang.* – 2000. – Vol. 79, № 3. – P. 168–174.
215. Analysis of the ternary interaction of the red cell membrane skeletal proteins spectrin, actin, and 4.1 / V. Ohanian, L. C. Wolfe, K. M. John [et al.] // *Biochemistry.* – 1984. – Vol. 23, № 19. – P. 4416–4420.
216. Antihemolytic effect of amphiphilic compounds at cold and hyperosmotic stress of erythrocytes / N. M. Shpakova, E. R. Pantaler, O. N. Dunayevskaya, V. A. Bondarenko // XI Meeting of the European Association for Red Cell Research, 17–21 April 1997 : Abstracts. – Gozd Martuljek (Slovenia), 1997. – P. 62.

217. ATP dependence is not an intrinsic property of Na⁺/H⁺ exchanger NHE1: requirement for an ancillary factor / O. Aharonovitz, N. Demaurex, M. Woodside, S. Grinstein // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 276, № 6, Pt 1. – P. C1303-C1311.
218. Augmented water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camelids / P. Bogner, P. Csutora, I. L. Cameron [et al.] // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 75, № 6. – P. 3085–3091.
219. Ballas S. K. Comparative distribution of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity in human, guinea-pig, rabbit and mouse erythrocytes / S. K. Ballas // *Comp. Biochem. Physiol. B.* – 1987. – Vol. 87, № 4. – P. 837–842.
220. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men / E. van den Akker, T. J. Satchwell, R. C. Williamson, A. M. Toye // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2010. – Vol. 45, № 1. – P. 1–8.
221. Baskurt O. K. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study / O. K. Baskurt, R. A. Farley, H. J. Meiselman // *Am. J. Physiol. – Heart Circ. Physiol.* – 1997. – Vol. 273, № 6, Pt.2. – P. H2604–H2612.
222. Baust J. G. Cryopreservation. An emerging paradigm change / J. G. Baust, D. Gao, J. M. Baust // *Organogenesis.* – 2009. – Vol. 5, № 3. – P. 90–96.
223. Benga G. Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function / G. Benga, R. P. Holmes // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 1984. – Vol. 43, № 3. – P. 195–257.
224. Benga G. Diffusional water permeability of mammalian red blood cells / G. Benga, T. Borza // *Comp. Biochem. Physiol. B.* – 1995. – Vol. 112, № 4. – P. 653–659.
225. Benga G. Comparative NMR studies of diffusional water permeability of red blood cells from different species XV. Agile wallaby (*Macropus agilis*), rednecked wallaby (*Macropus rufogriseus*) and Goodfellow's tree kangaroo

- (*Dendrolagus goodfellowi*) / G. Benga, B. E. Chapman, P. W. Kuchel // *Comp. Biochem. Physiol. A.* – 2009. – Vol. 154, № 1. – P. 105–109.
226. Benga G. Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future / G. Benga // *IUBMB Life.* – 2009. – Vol. 61, № 2. – P. 112–133.
227. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel / G. Benga // *Eur. Biophys. J.* – 2013. – Vol. 42, № 1. – P. 33–46.
228. Bennett V. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane / V. Bennett, D. M. Gilligan // *Annu. Rev. Cell Biol.* – 1993. – Vol. 9. – P. 27–66.
229. Bennett V. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues / V. Bennett, A. J. Baines // *Physiol. Rev.* – 2001. – Vol. 81, № 3. – P. 1353–1392.
230. Bennett V. Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin / V. Bennett, J. Healy // *Trends Mol. Med.* – 2008. – Vol. 14, № 1. – P. 28–36.
231. Beresford R. A. Effects of some S-alkylthiuroniums and related compounds on the osmotic fragility and the membrane expansion of human erythrocytes / R. A. Beresford, F. N. Fastier // *Br. J. Pharmacol.* – 1980. – Vol. 71, № 1. – P. 253–258.
232. Bessis M. Red cell shapes an illustrated classification and its rationale / M. Bessis // *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* – 1972. – Vol. 12, № 6. – P. 721–746.
233. Beta-adrenergic agonists regulate cell membrane fluctuations of human erythrocytes / S. Tuvia, A. Moses, N. Gulayev [et al.] // *J. Physiol.* – 1999. – Vol. 516, Pt 3. – P. 781–792.
234. Betticher D. C. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu / D. C. Betticher, J. Geiser // *Comp. Biochem. Physiol. A.* – 1989. – Vol. 93, № 2. – P. 429–432.

235. Beurer G. Anaesthetic--phospholipid interaction. The effect of chlorpromazine on phospholipid monolayers / G. Beurer, H. J. Galla. // *Eur. Biophys. J.* – 1987. – Vol. 14, № 7. – P. 403–408.
236. Białkowska K. Expansion of phosphatidylcholine and phosphatidylserine/phosphatidylcholine monolayers by differently charged amphiphiles / K. Białkowska, M. Bobrowska-Hägerstrand, H. Hägerstrand // *Z. Naturforsch. C.* – 2001. – Vol. 56, № 9–10. – P. 826 –830.
237. Białkowska K. Ankyrin inhibits binding of erythrocyte spectrin to phospholipid vesicles / K. Białkowska, A. Zembroń, A. F. Sikorski // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – Vol. 1191, № 1. – P. 21–26.
238. Bodine D. M. 4th Spectrin deficient inherited hemolytic anemias in the mouse: characterization by spectrin synthesis and mRNA activity in reticulocytes / D. M. Bodine 4th, C. S. Birkenmeier, J. E. Barker // *Cell.* – 1984. – Vol. 37, № 3. – P. 721–729.
239. Born G. V. R. Effects of modification of the membranes of intact erythrocytes on the antihaemolytic action of chlorpromazine / G. V. R. Born., G. M. Housley // *Brit. J. Pharmacol.* – 1983. – Vol. 79, № 2. – P. 481–487.
240. Brugnara C. Effect of cell age and phenylhydrazine on the cation transport properties of rabbit erythrocytes / C. Brugnara, L. de Franceschi // *J. Cell. Physiol.* – 1993. – Vol. 154, № 2. – P. 271–280.
241. Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin / U. Salzer, P. Hinterdorfer, U Hunger [et al.] // *Blood.* – 2002. – Vol. 99, № 7. – P. 2569–2577.
242. Cameron I. L. Role of protein conformation and aggregation in pumping water in and out of a cell / I. L. Cameron, K. M. Kanal, G. D. Fullerton // *Cell Biol. Int.* – 2006. – Vol. 30, № 1. – P. 78–85.
243. Cassera M. B. Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron

- paramagnetic resonance (EPR) spin label study / M. B. Cassera, A. M. Silber, A. M. Gennaro // *Biophys. Chem.* – 2002. – Vol. 99, № 2. – P. 117–127.
244. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels / M. Borgnia, S. Nielsen, A. Engel, P. Agre // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – Vol. 68. – P. 425–458.
245. Ceramide-enriched membrane domains in red blood cells and the mechanism of sphingomyelinase-induced hot-cold hemolysis / L. R. Montes, D. J. López, J. Sot [et al.] // *Biochemistry.* – 2008. – Vol. 47, № 43. – P. 11222–11230.
246. Chakrabarti A. Spectrin organization and dynamics: new insights / A. Chakrabarti., D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay // *Biosci. Rep.* – 2006. – Vol. 26, № 6. – P. 369–386.
247. Chang S. H. Regulation of the glycophorin C-protein 4.1 membrane-to-skeleton bridge and evaluation of its contribution to erythrocyte membrane stability / S. H. Chang, P. S. Low // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 25. – P. 22223–22230.
248. Chang S. H. Identification of a critical ankyrin-binding loop on the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3 by crystal structure analysis and site-directed mutagenesis / S. H. Chang, P. S. Low // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 9. – P. 6879–6884.
249. Characterization of cytoskeletal protein 4.1R interaction with NHE1 (Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1) / W. Nunomura, S. P. Denker, D. L. Barber [et al.] // *Biochem. J.* – 2012. – Vol. 446, № 3. – P. 427–435.
250. Chen J. Y. Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes / J. Y. Chen, W. H. Huestis // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1323, № 2. – P. 299–309.
251. Chi L.-M. Effective bilayer expansion and erythrocyte shape change induced by monopalmitoyl phosphatidylcholine. Quantitative light microscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements / L. M. Chi, W.-G. Wu // *Biophys. J.* – 1990. – Vol. 57, № 6. – P. 1225–1232.

252. Chlorpromazine binding to Na^+ , K^+ -ATPase and photolabeling: involvement of the ouabain site monitored by fluorescence / E. A. Guevara, M. de Lourdes Barriviera, A. Hassón-Voloch, S. R. Louro // *Photochem. Photobiol.* – 2007. – Vol. 83, № 4. – P. 914–919.
253. Chlorpromazine-induced increase in dipalmitoylphosphatidylserine surface area in monolayers at room temperature / A. V. Agasoster, L. M. Tungodden, D. Cejka [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 61, № 7. – P. 817–825.
254. Cholesterol affects spectrinphospholipid interactions in a manner different from changes resulting from alterations in membrane fluidity due to fatty acyl composition / W. Diakowski, Ł. Ozimek, E. Bielska [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1758, № 1. – P. 4–12.
255. Cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes / W. G. Wood, U. Igbavboa, W. E. Müller, G. P. Eckert // *J. Neurochem.* – 2011. – Vol. 116, № 5. – P. 684–689.
256. Cholesterol dynamics in membranes / P. L. Yeagle, A. D. Albert, K. Boesze-Battaglia [et al.] // *Biophys. J.* – 1990. – Vol. 57, № 3. – P. 413–424.
257. Cholesterol interaction with phospholipids in membranes / H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J. P. Slotte // *Prog. Lipid Res.* – 2002. – Vol. 41, № 1. – P. 66–97.
258. Ciana A. Detergent-resistant membranes in human erythrocytes and their connection to the membrane-skeleton / A. Ciana, C. Balduini, G. Minetti // *J. Biosci.* – 2005. – Vol. 30, № 3. – P. 317–328.
259. Cianci C. D. Phosphorylation of ankyrin down-regulates its cooperative interaction with spectrin and protein 3 / C. D. Cianci, M. Giorgi, J. S. Morrow // *J. Cell. Biochem.* – 1988. – Vol. 37, № 3. – P. 301–315.
260. Cohen C. Human erythrocyte membrane protein band 4.2 (pallidin) / C. Cohen, E. Dotimas, C. Korsgren // *Semin. Hematol.* – 1993. – Vol. 30, № 2. – P. 119–137.

261. Cold shock hemolysis in human erythrocytes studied by spin probe method and freeze-fracture electron microscopy / T. Takahashi, S. Noji, E. F. Erbe [et al.] // *Biophys. J.* – 1986. – Vol. 49, № 2. – P. 403–410.
262. Coldman M. F. The osmotic fragility of mammalian erythrocytes in hypotonic solutions of sodium chloride / M. F. Coldman., M. Gent, W. Good // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1969. – Vol. 31, № 4. – P. 605–609.
263. Comparative antioxidant capacities of quercetin and butylated hydroxyanisole in cholesterol-modified erythrocytes damaged by tert-butylhydroperoxide / J. I. Sánchez-Gallego, A. López-Revuelta, A. Hernández-Hernández [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2011. – Vol. 49, № 9. – P. 2212–2221.
264. Comparative hemolytic effectiveness of 1 MHz ultrasound on human and rabbit blood in vitro / J. S. Abramowicz, M. W. Miller, L. F. Battaglia, S. Mazza // *Ultrasound Med. Biol.* – 2003. – Vol. 29, № 6. – P. 867–873.
265. Comparative NMR studies of diffusional water permeability of red blood cells from different species: XVI Dingo (*Canis familiaris dingo*) and dog (*Canis familiaris*) / G. Benga, B. E. Chapman, H. Matei [et al.] // *Cell. Biol. Int.* – 2010. – Vol. 34, № 4. – P. 373–378.
266. Comparative nuclear magnetic resonance studies of diffusional water permeability of red blood cells from different species. XI. Horses introduced to Australia and European horses (*Equus caballus*) / Gh. Benga, H. Matei, L. Frentescu [et al.] // *Comp. Hematol. Int.* – 2000. – Vol. 10. – P. 138–143.
267. Comparative study of the cytoplasmic domain of band 3 from human and rabbit erythrocyte membranes / F. Ligi, C. Ciacci, F. Palma, F. Palma // *Comp. Biochem. Physiol. B.* – 1998. – Vol. 121, № 3. – P. 265–271.
268. Comparative study of transition temperature in adult and newborn human red blood cells / S. Imre, B. Sári, I. Török. E. Dvorácsek // *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* – 1982. – Vol. 59, № 4. – P. 311–315.
269. Comparison of three methods for oxidative stress-induced potassium efflux measurement / J.-J. Lahet, F. Lenfant, C. Courderot-Masuyer [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2007. – Vol. 61, № 7. – P. 423–426.

270. Concurrent expression of erythroid and renal aquaporin CHIP and appearance of water channel activity in perinatal rats / B. L. Smith, R. Baumgarten, S. Nielsen [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1993. – Vol. 92, № 4. – P. 2035–2041.
271. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells / T. Betz, U. Bakowsky, M. R. Müller [et al.] // *Bioelectrochemistry.* – 2007. – Vol. 70, №.1. – P. 122–126.
272. Contribution of glycoproteins to fibrinogen-induced aggregation of erythrocytes / N. Maeda, M. Sieke, T. Nakajima [et. al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1990. – Vol. 1022, № 1. – P. 72–78.
273. Contribution of the band 3-ankyrin interaction to erythrocyte membrane mechanical stability / P. S. Low, B. M. Willardson, N. Mohandas [et al.] // *Blood.* – 1991. – Vol. 77, № 7. – P. 1581–1586.
274. Crowell K. M. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin: the influence of sphingomyelin on binding and cation permeability increase in mammalian erythrocytes / K. M. Crowell, F. Lutz // *Toxicon.* – 1989. – Vol. 27, № 5. – P. 531–540.
275. Cullis P. R. Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes / P. R. Cullis, M. J. Hope, C. P. Tilcock // *Chem. Phys. Lipids.* – 1986. – Vol. 40, № 2–4. – P. 127–144.
276. Cytoskeletal protein binding kinetics at planar phospholipid membranes / A. E. Mc Kiernan, R. I. MacDonald, R. C. MacDonald, D. Axelrod // *Biophys. J.* – 1997. – Vol. 73, № 4. – P. 1987–1998.
277. Daw A. Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing / A. Daw, J. Farrant, G. J. Morris // *Cryobiology.* – 1973. – Vol. 10, № 2. – P. 126–133.
278. de Kruijff B. Lipid polymorphism and biomembrane function / B. de Kruijff // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 1997. – Vol. 1, № 4. – P. 564–569.
279. de Oliveira S. An overview about erythrocyte membrane / S. de Oliveira, C. Saldanha // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2010. – Vol. 44, № 1. – P. 63–74.

280. Defective spectrin integrity and neonatal thrombosis in the first mouse model for severe hereditary elliptocytosis / N. J. Wandersee, A.N. Roesch, N. R. Hamblen [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 97, № 2. – P. 543–550.
281. Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1 / A. A. Khan, T. Hanada, M. Mohseni [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 21. – P. 14600–14609.
282. Demel R. A. The function of sterols in membranes / R. A. Demel, B. de Kruijff // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1976. – Vol. 457, № 2. – P. 109–132.
283. Detergent effects on membranes at subsolubilizing concentrations: transmembrane lipid motion, bilayer permeabilization, and vesicle lysis/reassembly are independent phenomena / H. Ahyayauch, M. Bennouna, A. Alonso, F. M. Goñi // *Langmuir*. – 2010. – Vol. 26, № 10. – P. 7307–7313.
284. Deuticke B. Changes of nonelectrolyte permeability in cholesterol-loaded erythrocytes / B. Deuticke, C. Ruska // *Biochem. Biophys. Acta*. – 1976. – Vol. 433, № 3. – P. 638–653.
285. Deuticke B. Erythrocyte membrane barrier function: Role of bilayer polarity and skeletal proteins / B. Deuticke, S. Klonk, C. W. M. Haest // *Biochem. Soc. Trans.* – 1992. – 20, № 4. – P. 769–773.
286. Diakowski W. Occurrence of lipid receptors inferred from brain and erythrocyte spectrins binding NaOH-extracted and protease-treated neuronal and erythrocyte membranes / W. Diakowski, J. Szopa, A. F. Sikorski // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2003. – Vol. 1611, № 1–2. – P. 115–122.
287. Diakowski W. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily / W. Diakowski, M. Grzybek, A. F. Sikorski // *Folia Histochem. Cytobiol.* – 2006. – Vol. 44, № 4. – P. 231–248.
288. Dutta-Choudhury T. A. Human erythrocyte acetylcholinesterase is an amphipathic protein whose short membrane-binding domain is removed by

- papain digestion / T. A. Dutta-Choudhury, T. L. Rosenberry // J. Biol. Chem. – 1984. – Vol. 259, № 9. – P. 5653–5660.
289. Effect of phenylhydrazine-induced structural alterations of human erythrocytes on basic drug penetration / T. Ogiso, Y. Ito, M. Iwaki [et. al.] // Chem. Pharm. Bull. (Tokio). – 1989. – 37, № 2. – P. 430–434.
290. Effects of drugs, salts, and phospholipid vesicles on hemoglobin release from hydrostatic pressure-treated human erythrocytes / T. Yamaguchi, K. Kuranoshita, T. Harano, E. Kimoto // J. Biochem. – 1993. – Vol. 113, № 4. – P. 513–518.
291. Effects of the anesthetic dibucaine on the kinetics of the gel-liquid crystalline transition of dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar vesicles / W. W. van Osdol, Q. Ye, M. L. Tohnson, R. L. Biltonen // Biophys. J. – 1992. – Vol. 63, № 4. – P. 1011–1117.
292. Elmoazzen H. Y. The effect of temperature on membrane hydraulic conductivity / H. Y. Elmoazzen, J A. W. Elliott, L. E. McGann // Cryobiology. – 2002. – Vol. 45, № 1. – P. 68–79.
293. Epand R. M. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions / R. M. Epand // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – Vol. 1376, 3. – P. 353–368.
294. Erythrocyte permeability to urea and water: comparative study in rodents, ruminants, carnivores, humans, and birds / L. Liu, T. Lei, L. Bankir [et al.] // J. Comp. Physiol. B. – 2011. – Vol. 181, № 1. – P. 65–72.
295. Erythrocyte shape dynamics: influence of electrolyte conditions and membrane potential / R. Glaser, T. Fujii, P. Müller [et al.] // Biomed. Biochim. Acta. – 1987. – Vol. 46, № 2–3. – P. 327–333.
296. Eskelinen S. The hypotonic hemolysis and the protective action of lysophosphatidylcholine / S. Eskelinen, P Saukko // Biorheology . – 1984. – Vol. 21, № 3. – P. 363–377.
297. Evaluation of red blood cells stored at -80 degrees C in excess of 10 years / J. Lecak, K. Scott, C. Young [et al.] // Transfusion. – 2004. – Vol. 44, № 9. – P. 1306–1313.

298. Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47 / I. Mouro-Chanteloup, J. Delaunay, P. Gane [et al.] // *Blood*. – 2003. – Vol. 101, № 1. – P. 338–344.
299. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization / H. O. van Genderen, H. Kenis, L. Hofstra // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008. – Vol. 1783, № 6. – P. 953–963.
300. Farrant J. Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinylpyrrolidone and glycerol during freezing? / J. Farrant // *Nature*. – 1969. – Vol. 222, № 5199. – P. 1175–1176.
301. Farrant J. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage. 1. Sodium chloride / J. Farrant, A. E. Woolgar // *Cryobiology*. – 1972. – Vol. 9, № 1. – P. 9–15.
302. Farrant J. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage. 2. Sucrose / J. Farrant, A. E. Woolgar // *Cryobiology*. – 1972. – Vol. 9, № 1. – P. 16–21.
303. Farrant J. Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury / J. Farrant, G. J. Morris // *Cryobiology*. – 1973. – Vol. 10, № 2. – P. 134–140.
304. Fertility Cryopreservation /eds R. C. Chian, P. Quinn. – Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2010. – Chapter 1 : Cryobiology: an overview / R. C. Chian. – P. 1–9.
305. Filippov A. The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers / A. Filippov, G. Orädd, G. Lindblom // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 84, № 5. – P. 3079–3086.
306. Filippov A. Influence of cholesterol and water content on phospholipid lateral diffusion in bilayers / A. Filippov, G. Orädd, G. Lindblom // *Langmuir*. – 2003. – Vol. 19, № 16. – P. 6397–6400.
307. Franks N. P. Is membrane expansion relevant to anaesthesia? / N. P. Franks, W. R. Lieb // *Nature*. – 1981. – Vol. 292, № 5820. – P. 248–251.

308. Fuller B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state / B. J. Fuller // *CryoLetters*. – 2004. – Vol. 25, № 6. – P. 375–388.
309. Fullerton G. D. On the osmotically unresponsive water compartment in cells / G. D. Fullerton, K. M. Kanal, I. L. Cameron // *Cell Biol. Int.* – 2006. – Vol.30, № 1. – P. 74–77.
310. Gemini (dimeric) surfactant perturbation of the human erythrocyte / M. Dubnickova, M. Bobrowska-Hagerstrand, T. Soderstrom [et al.] // *Acta Biochim. Pol.* – 2000. – Vol. 47, № 3. – P. 651–660.
311. Gimsa J. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? / J. Gimsa, C. Ried // *Mol. Membr. Biol.* – 1995. – Vol. 12, № 3. – P. 247–254.
312. Gordienko E. A. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon / E. A. Gordienko, Yu .E. Gordienko, O. I. Gordienko // *Cryo Letters*. – 2003. – Vol. 24, № 4. – P. 229–244.
313. Green F. A. Cold induced haemolysis in a hypertonic milieu / F. A. Green, C. Y. Jung // *J. Membr. Biol.* – 1977. – Vol. 33, № 3–4. – P. 249–262.
314. Guerra-Shinohara E. M. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species / E. M. Guerra-Shinohara, O. C. Barretto // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1999. – Vol. 32, № 6. – P. 683–687.
315. Haest C. W. Nonmediated flip-flop of anionic phospholipids and long-chain amphiphiles in the erythrocyte membrane depends on membrane potential / C. W. Haest, A. Oslender, D. Kamp // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36, № 36. – P. 10885–10891.
316. Hagerstrand H. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation / H. Hagerstrand, B Isomaa // *Chem.-Biol. Inter.* – 1991. – Vol. 79, № 3. – P. 335–347.
317. Hägerstrand H. Morphological characterization of exovesicles and endovesicles released from human erythrocytes following treatment with

- amphiphiles / H. Hägerstrand, B. Isomaa // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – Vol. 1109, № 2. – P. 117–126.
318. Hanpft R. Influence of cationic amphiphilic drugs on the phase-transition temperature of phospholipids with different polar headgroups / R. Hanpft, K. Mohr // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – Vol. 814, № 1. – P. 156–162.
319. Harder A. Changes of transition temperatures of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol in presence of amphiphilic drugs / A. Harder, H. Debusch // *Chem. Phys. Lipids.* – 1986. – Vol. 39, № 1–2. – P. 65–71.
320. Hardman P. D. Spin-label characterisation of the lamellar-to-hexagonal (HII) phase transition in egg phosphatidylethanolamine aqueous dispersions / P. D. Hardman // *Eur. J. Biochem.* – 1982. – Vol. 124, № 1. – P. 95–101.
321. Hartmann J. The Influence of chlorpromazine on the potential-induced shape change of human erythrocyte / J. Hartmann, R. Glaser // *Bioscience Reports.* – 1991. – Vol. 11, № 4. – P. 213–221.
322. Heerklotz H. Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures / H. Heerklotz // *Biophys. J.* – 2002. – Vol. 83, № 5. – P. 2693–2701.
323. Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase / M. Oda, M. Takahashi, T. Matsuno [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1798, № 6. – P. 1073–1080.
324. Herbst M. D. A review of water diffusion measurement by NMR in human red blood cells / M. D. Herbst, J. H. Goldstein // *Am. J. Physiol.* – 1989. – Vol. 256, № 5, Pt 1. – P. C1097–C1104.
325. High-speed mass analysis of whole erythrocytes by charge-detection quadrupole ion trap mass spectrometry / Z. Nie, F. Cui, Y. K. Tzeng [et al.] // *Anal. Chem.* – 2007. – Vol. 79, № 19. – P. 7401–7407.
326. Hoeksema T. Hypertonic hemolysis in patients with a mood disorder / T. Hoeksema, J. G. Goekoop, G. M. van Kempen // *Biol. Psychiatry.* – 1996. – Vol. 39, № 1. – P. 11–15.

327. Hopp T. P. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences / T. P. Hopp, K. R. Woods // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1981. – Vol. 78, № 6. – P. 3824–3828.
328. Hristova K. Determination of the hydrocarbon core structure of fluid dioleoylphosphocholine (DOPC) bilayers by x-ray diffraction using specific bromination of the double-bonds: effect of hydration / K. Hristova, S. H. White // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 74, № 5. – P. 2419–2433.
329. Hsu L. The interaction of human erythrocyte Band 3 with cytoskeletal components / L. Hsu, M. Morrison // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1983. – Vol. 227, № 1. – P. 31–38.
330. Human cells and cell membrane molecular models are affected in vitro by chlorpromazine / M. Suwalsky, F. Villena, C. P. Sotomayor [et al.] // *Biophys. Chem.* – 2008. – Vol. 135, № 1–3. – P. 7–13.
331. Human red blood cells' physiological water exchange with the plasma / M. Kargol, A. Kargol, M. Przystalski [et al.] // *Rocz. Akad. Med. Białymst.* – 2005. – Vol. 50. – P. 237–240.
332. Hypertonic cryohemolysis and the cytoskeletal system / F. A. Green, C. Y. Jung, J. Cuppoletti, N. Owens // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1981. – Vol. 648, № 2. – P. 225–230.
333. Hypertonic cryohemolysis of human red blood cells / T. M. Dubbelman, A. W. de Bruijne, K. Christianse, J. van Steveninck // *J. Membr. Biol.* – 1979. – Vol. 50, № 3–4. – P. 225–240.
334. Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte / N. J. Hemming, D. J. Anstee, M. A. Staricoff [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270, № 10. – P. 5360–5366.
335. Imre S. Comparative study of the transition temperature of calf and adult cattle erythrocytes / S. Imre // *Blut.* – 1983. – Vol. 46, № 5. – P. 289–293.
336. In situ assessment of erythrocyte membrane properties during cold storage / W. F. Wolkers, L. M. Crowe, N. M. Tsvetkova [et al.] // *Mol. Membr. Biol.* – 2002. – Vol. 19, № 1. – P. 59–65.

337. Increase in vulnerability to oxidative damage in cholesterol-modified erythrocytes exposed to t-BuOOH / A. López-Revuelta, J. I Sánchez-Gallego, A. Hernández-Hernández [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol. 1734, № 1. – P. 74–85.
338. Influence of chlorpromazine on eryptosis, parasitemia and survival of *Plasmodium berghe* infected mice / S. Koka, C. Lang, K. M. Boini [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2008. – Vol. 22, № 1–4. – P. 261–268.
339. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity / A. Chabanel, M. Flamm, K. L. Sung [et al.] // *Biophys. J.* – 1983. – Vol. 44, № 2. – P. 171–176.
340. Influence of neuraminidase on the characteristics of microrheology of red blood cells / Z. Wen, W. Yao, L. Xie [et al.] // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2000. – Vol. 23, № 1. – P. 51–57.
341. Interaction of cholesterol with sphingomyelin in monolayers and vesicles / R. Bittman, C.R. Kasireddy, P. Mattjus, J.P. Slotte // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33, № 39. – P. 11776–11781.
342. Interaction of erythrocyte spectrin with some nonbilayer phospholipids / K. Michalak, M. Bobrowska, K. Białkowska [et al.] // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1994. – Vol. 13, № 1. – P. 57–62.
343. Interaction of erythroid spectrin with hemoglobin variants: implications in beta-thalassemia / P. Datta, S. B. Chakrabarty, A. Chakrabarty, A. Chakrabarti // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2003. – Vol. 30, № 3. – P. 248–253.
344. Interaction of membrane skeletal proteins with membrane lipid domain / A. F. Sikorski, B. Hanus-Lorenz, A. Jezierski [et al.] // *Acta Biochim. Pol.* – 2000. – Vol. 47, № 3. – P. 565–578.
345. Interaction of spectrin with phospholipids is inhibited by isolated erythrocyte ankyrin / K. Białkowska, J. Leoeniewski, M. Nietubyc, A. F. Sikorski // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 1999. – Vol. 4, № 2. – P. 203–218.

346. Isomaa B. Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes / B. Isomaa, H. Hagerstrand, G. Paatero // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1987. – Vol. 899, № 1. – P. 93–103.
347. Ivanov I. T. Allometric dependence of the life span of mammal erythrocytes on thermal stability and sphingomyelin content of plasma membranes / I. T. Ivanov // *Comp. Biochem. Physiol. A.* – 2007. – Vol. 147, № 4. – P. 876–884.
348. Jennings M. L. Anion transport across the erythrocyte membrane, in situ proteolysis of band 3 protein, and cross-linking of proteolytic fragments by 4,4'-diisothiocyano dihydrostilbene-2,2'-disulfonate / M. L. Jennings, H. Passow // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – Vol. 554, № 2. – P. 498–519.
349. Jennings M. L. Modification by papain of the structure and function of band 3, the erythrocyte anion transport protein / M. L. Jennings, M. F. Adams // *Biochemistry.* – 1981. – Vol. 20, № 25. – P. 7118–7123.
350. Jones D. A. The importance of surface area/volume ratio to the rate of oxygen uptake by red cells / D. A. Jones // *J. Gen. Physiol.* – 1979. – Vol. 74, № 5. – P. 643–646.
351. Khan A. Flip-flop in adsorbed bilayers / A. Khan, W. A. Ducker, M. Mao // *Phys. Chem. B.* – 2006. – Vol. 110, № 46. – P. 23365–23372.
352. Kinetics and thermodynamics of chlorpromazine interaction with lipid bilayers: effect of charge and cholesterol / P. T. Martins, A. Velazquez-Campoy, W. L. Vaz, [et al] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134, № 9. – P. 4184–4195.
353. Kinnunen P. K. Lipid bilayers as osmotic response elements / P. K. Kinnunen // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2000. – Vol. 10, № 5–6. – P. 243–250.
354. Kucerka N. Asymmetric distribution of cholesterol in unilamellar vesicles of monounsaturated phospholipids / N. Kucerka, M. P. Nieh, J. Katsaras // *Langmuir.* – 2009. – Vol. 25, № 23. – P. 13522–13527.

355. Kuchel P. W. Why does the mammalian red blood cell have aquaporins? / P. W. Kuchel, G. Benga // *Biosystems*. – 2005. – Vol. 82, № 2. – P. 189–196.
356. Kucherenko Yu. V. The study of Ca^{2+} influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500 (PEG-1500) and sucrose media / Yu. V. Kucherenko, I. Bernhardt // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – Т. 78, № 6. – С. 46–52.
357. Kursch B. Influence of various cationic amphiphilic drugs on the phase-transition temperature of phosphatidylcholine liposomes / B. Kursch, H. Lulimann, K. Mohr // *Biochem. Pharmacol.* – 1983. – Vol. 32, № 17. – P. 2589–2594.
358. Lack of Aquaporin 3 in bovine erythrocyte membranes correlates with low glycerol permeation / E. Campos, T. F. Moura, A. Oliva [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – Vol. 408, № 3. – P. 477–481.
359. Lang F. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes / F. Lang, S. M. Qadri // *Blood Purif.* – 2012. – Vol. 33, № 1–3. – P. 125–130.
360. Lichtenberg D. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts / D. Lichtenberg, F. M. Goni, H. Heerklotz // *Trends Biochem. Sci.* – 2005. – Vol. 30, № 8. – P. 430–436.
361. Lieber M. R. Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts / M. R. Lieber, T. D. Steck // *J. Biol. Chem.* – 1982. – Vol. 257, № 19. – P. 11660–11666.
362. Life in the frozen state / edited by B. J. Fuller, N. Lane, E. E. Benson. – Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. : CRC Press, 2004 – 672 p.
363. Lim H. W. G. Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics / H. W. G. Lim, M. Wortis, R. Mukhopadhyay // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – Vol. 99, № 26. – P. 16766–16769.

364. Lindblom G. Lipid lateral diffusion in bilayers with phosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol. An NMR study of dynamics and lateral phase separation / G. Lindblom, G. Orädd, A. Filippov // *Chem. Phys. Lipids.* – 2006. – Vol. 141. № 1-2. – P. 179–184.
365. Lipid bilayer elasticity measurements in giant liposomes in contact with a solubilizing surfactant / C. Ménager, D. Guemghar, R. Perzynski [et al.] // *Langmuir.* – 2008. – Vol. 24, № 9. – P. 4968–4974.
366. Lipid rafts and malaria parasite infection of erythrocytes / S. C Murphy, N. L. Hiller, T. Harrison [et al.] // *Mol. Membr. Biol.* – 2006. – Vol. 23, № 1. – P. 81–88.
367. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes / D. Lingwood, H. J. Kaiser, I. Levental, K. Simons // *Biochem. Soc. Trans.* – 2009. – Vol. 37, pt 5. – P. 955–960.
368. Liu J. Canine RBC osmotic tolerance and membrane permeability / J. Liu, J. A. Christian, J. K. Critser // *Cryobiology.* – 2002. – Vol. 44, № 3. – P. 258–268.
369. Lovelock J. E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing / J. E. Lovelock // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1953. – Vol. 10, № 3. – P. 414–426.
370. Lovelock J. E. Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells / J. E. Lovelock // *Proc. R. Soc. Med.* – 1954. – Vol. 47, № 1. – P. 60–62.
371. Lovelock J. E. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol / J. E. Lovelock, C. Polge // *Biochem. J.* – 1954. – Vol. 58, № 4. – P. 618–622.
372. MacDonald R. I. Trifluoperazine inhibits Sendai virus-induced hemolysis / R. I. MacDonald // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1986. – Vol. 856, № 2. – P. 337–348.
373. Macey R. I. Transport of water and urea in red blood cells / R. I. Macey // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 246, № 3, Pt 1. – P. C195–C203.

374. Malheiros S. V. P. Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis / S. V. P. Malheiros, E. de Paula, N. C. Merelles // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1373, № 2. – P.332–340.
375. Malheiros S. V. Pathways involved in trifluoperazine-, dibucaine- and praziquantel-induced hemolysis / S. V. Malheiros, N. C. Meirelles, E. De Paula // *Biophys. Chem.* – 2000. – Vol. 83, № 2. – P. 89–100.
376. Mankelow T. J. Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane / T. J. Mankelow, T. J. Satchwell, N. M. Burton // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2012. – Vol. 49, № 1. – P. 1–10.
377. Manno S. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation / S. Manno, Y Takakuwa, N. Mohandas // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, 9. – P. 7581–7587.
378. Marjanovic M. ATP dependence of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump of cold sensitive and cold tolerant mammalian red blood cells / M. Marjanovic, J. S. Willis // *J. Physiol.* – 1992. – Vol. 456, № 1. – P. 575–590.
379. Matei H. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species / H. Matei, L. Frentescu, Gh. Benga // *J. Cell. Mol. Med.* – 2000. – Vol 4, № 4. – P. 270–276.
380. Matsuzawa T. Haemolysis of various mammalian erythrocytes in sodium chloride, glucose and phosphate-buffer solutions / T. Matsuzawa, Y. Ikarashi // *Lab. Anim.* – 1979. – Vol. 13, № 4. – P. 329–331.
381. Maulik P. R. Interactions of N-stearoyl sphingomyelin with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine in bilayer membranes / P. R. Maulik, G. G. Shipley // *Biophys. J.* – 1996. – Vol. 70, № 5. – P. 2256– 2265.
382. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing / P. Mazur // *J. Gen. Physiol.* – 1963. – Vol. 47. – P. 347–369.
383. Mazur P. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells / P. Mazur, S. P. Leibo, E. H. Chu // *Exp. Cell Res.* – 1972. – Vol. 71, № 2. – P. 345–355.

384. Mazur P. Permeability of the bovine red cell to glycerol in hyperosmotic solutions at various temperatures / P. Mazur, S. P. Leibo, R. H. Miller // *J. Membr. Biol.* – 1974. – Vol. 15, № 2. – P. 107–136.
385. Mazur P. Permeability of the human erythrocyte to glycerol in 1 and 2 M solutions at 0 or 20°C / P. Mazur, P. H. Miller // *Cryobiology.* – 1976. – Vol. 13, № 5. – P. 507–522.
386. Mazur P. Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes / P. Mazur, W. F. Rall, N. Rigopoulos // *Biophys. J.* – 1981. – Vol. 36, № 3. – P. 653–675.
387. Mechanism of spectrin degradation induced by phenylhydrazine in intact human erythrocytes / A. Arduini, S. Storto, M. Belfigilo [et. al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – 979, № 1. – P. 1– 6.
388. Mechanochemistry of the alternatively spliced spectrin-actin binding domain in membrane skeletal protein 4.1 / D. Discher, M. Parra, J. G. Conboy, N. Mohandas // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, № 10. – P. 7186–7195.
389. Meier M. Lipid and peptide dynamics in membranes upon insertion of n-alkyl- β -D-glucopyranosides / M. Meier, J. Seelig // *Biophys. J.* – 2010. – Vol. 98, №. 8. – P. 1529–1538.
390. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress / A. Lopez-Revuelta, J. I. Sanchez-Gallego [et al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2006. – Vol. 161, № 1. – P. 79–91.
391. Membrane cholesterol contents modify the protective effects of quercetin and rutin on integrity and cellular viability in oxidized erythrocytes / J. I. Sánchez-Gallego, A. López-Revuelta, J. L. Sardina [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 8, № 10. – P. 1444–1454.
392. Membrane cholesterol in the regulation of aminophospholipid asymmetry and phagocytosis in oxidized erythrocytes / A. López-Revuelta, J. I. Sánchez-Gallego, A. C. García-Montero [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 42, № 7. – P. 1106–1118.

393. Membrane perturbations of erythrocyte ghosts by spectrin release / T. Yamaguchi, S. Ozaki, T. Shimomura, S. Terada // *J. Biochem.* – 2007. – Vol. 141, № 5. – P. 747–754.
394. Membrane water transport and aquaporins: looking back / P. Agre // *Biol. Cell.* – 2005. – Vol. 97, № 6. – P. 355–356.
395. Meryman H. T. Modified Model for the Mechanism of Freezing Injury in Erythrocytes / H. T. Meryman // *Nature.* – 1968. – Vol. 218, № 5139. – P. 333–336.
396. Meryman H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury / H. T. Meryman // *Cryobiology.* – 1971. – Vol. 8, № 2. – P. 489–500.
397. Meryman H. T. A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration / H. T. Meryman, M. Hornblower // *Transfusion.* – 1972. – Vol. 12, № 3. – P. 145–156.
398. Meryman H. T. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection / H. T. Meryman, R. J. Williams, M. S. Douglas // *Cryobiology.* – 1977. – Vol. 14, № 3. – P. 287–302.
399. Meryman H. T. Cryopreservation of living cells: principles and practice / H. T. Meryman // *Transfusion.* – 2007. – Vol. 47, № 5. – P. 935–945.
400. Metabolic dependence of the fluidity of intact erythrocyte membrane / T. Kamada, S. Setoyama, Y. Chuman, S. Otsuji // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1983. – Vol. 116, № 2. – C. 547–554.
401. Milhaud J. New insights into water-phospholipid model membrane interactions / J. Milhaud // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1663, № 1–2. – P. 19–51.
402. Miller M. W. The relevance of cell size on ultrasound-induced hemolysis in mouse and human blood in vitro / M. W. Miller, L. F. Battaglia // *Ultrasound Med. Biol.* – 2003. – Vol. 29, № 10. – P. 1479–1485.
403. Minetti G. Erythrocyte signal transduction pathways and their possible functions / G. Minetti, P. S. Low // *Curr. Opin. Hematol.* – 1997. – Vol. 4, № 2. – P. 116–121.

404. Minetti M. Protein-dependent lipid lateral phase separation as a mechanism of human erythrocyte ghost resealing / M. Minetti, M. Ceccarini // J. Cell. Biochem. – 1982. – Vol. 19, № 1. – P. 59–75.
405. Minetti M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells / M. Minetti, M. Ceccarini, A. M. Di Stasi // J. Cell. Biochem. – 1984. – Vol. 25, № 2. – P. 61–72.
406. Minetti M. Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines / M. Minetti, A. M. M Di Stasi // Biochemistry. – 1987. – Vol. 26, № 25. – P. 8133–8137.
407. Mitchell C. D. Solubilization of certain proteins from human erythrocyte stroma / C. D. Mitchell, D. J. Hanahan // Biochemistry. – 1966. – Vol. 5, № 1. – P. 51–57.
408. Modulation of erythrocyte hemorheological properties by band 3 phosphorylation and dephosphorylation / C. Saldanha, A. S. Silva, S. Gonçalves, J. Martins-Silva // Clin. Hemorheol. Microcirc. – 2007. – Vol. 36, 3. – P. 183–194.
409. Molecular simulation of dioleoylphosphatidylcholine lipid bilayers at differing levels of hydration / R. J. Mashl, H. L. Scott, S. Subramaniam, E. Jakobsson // Biophys. J. – 2001. – Vol. 81, № 6. – P. 3005–3015.
410. Morris G. J. Lipid loss and haemolysis by thermal shock link of correlation / G. J. Morris // Cryobiology. – 1975. - Vol. 12, № 3. – P. 192–201.
411. Morris G. J. Cold shock injury – a comprehensive bibliography / G. J. Morris, P. F. Watson // CryoLetters. – 1984. – Vol. 5, № 6. – P. 352–372.
412. Morse P. D. 2nd. Use of the spin label tempamine for measuring the internal viscosity of red blood cells / P. D. Morse 2nd // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1977. – Vol. 77, № 4. – P. 1486–1491.
413. Mosior M. The effect of ATP on the order and the mobility of lipids in the bovine erythrocyte membrane // M. Mosior, A. Mikołajczak, J. Gomułkiewicz // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – Vol. 1022, № 3. – P. 361–364.

414. Mouritsen O. G. Dynamical order and disorder in lipid bilayers / O. G. Mouritsen, K. Jorgensen // *Chem. Phys. Lipids.* – 1994. – Vol. 73, № 1–2. – P. 3–25.
415. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis / K. Muldrew // *Cryobiology.* – 2008. – Vol. 57, № 3. – P. 251–256.
416. Murata N. Membrane Fluidity and Temperature Perception / N. Murata, D. A. Los // *Plant Physiol.* – 1997. – Vol. 115, № 3. – P. 875–879.
417. n-Alkyl glucopyranosides completely inhibit ultrasound-induced cytolysis / J. Z. Sostaric, N. Miyoshi, P. Riesz [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 39, № 12. – P. 1539–1548.
418. Nanospring behaviour of ankyrin repeats / G. Lee, K. Abdi, Y. Jiang [et al.] // *Nature.* – 2006. – Vol. 440, № 7081. – P. 246–249.
419. Nelson G. J. Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals / G. J. Nelson // *J. Lipid Researsh.* – 1967. – Vol. 8, № 4. – P. 374–379.
420. Ney P. A. Synergistic Effects of Oxidation and Deformation on Erythrocyte Monovalent Cation Leak / P. A. Ney, M. M. Christopher, R. P. Hebbel // *Blood.* – 1990. – Vol. 75, № 5. – P. 1192–1198.
421. Novel roles for erythroid Ankyrin-1 revealed through an ENU-induced null mouse mutant / G. Rank, R. Sutton, V. Marshall [et al.] // *Blood.* – 2009. – Vol. 113, № 14. – P. 3352–3362.
422. Nunes M. d'A. A spin label study of erythrocyte membrane during simulation of freezing / M. d'A. Nunes // *J. Membr. Biol.* – 1982. – Vol. 60, № 2. – P. 155–162.
423. Nunomura W. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca^{2+} and calmodulin / W. Nunomura, Y. Takakuwa // *Front. Biosci.* – 2006. – Vol. 11. – P. 1522–1539.
424. Nwafor A. Drug-induced shape change in erythrocytes correlates with membrane potential change and is independent of glycocalyx charge

- / A. Nwafor, W. T. Coakley // *Biochem. Pharmacol.* – 1985. – Vol. 34, № 18. – P. 3329–3336.
425. Octyl-beta-D-glucopyranoside partitioning into lipid bilayers: thermodynamics of binding and structural changes of the bilayer / M. R. Wenk, T. Alt, A. Seelig, J. Seelig // *Biophys. J.* – 1997. – Vol. 72, № 47. – P. 1719–1731.
426. Ollivon M. Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside / M. Ollivon, O. Eidelman // *Biochemistry.* – 1988. – Vol. 27, № 5. – P. 2839–2846.
427. On the mechanism of drug-induced acceleration of phospholipid translocation in the human erythrocyte membrane / A. Bootsvelde, R. Degenhardt, D. Kamp [et al.] // *Mol. Membr. Biol.* – 2004. – Vol. 21, № 5. – 315–322.
428. Osmotic and diffusive properties of intracellular water in camel erythrocytes: Effect of hemoglobin crowdedness / P. Bogner, A. Miseta, Z. Berente [et al.] // *Cell Biol. Int.* – 2005. – Vol. 29, № 9. – P. 731–736.
429. Oyewale J. O. Changes in osmotic resistance of erythrocytes of cattle, pigs, rats and rabbits during variation in temperature and pH / J. O. Oyewale // *Zentralbl. Veterinarmed. A.* – 1992. – Bd. 39, № 2 – P. 98–104.
430. Pantaler E. Acceleration of phospholipid flip-flop in the erythrocyte membrane by detergents differing in polar head group and alkyl chain length / E. Pantaler, D. Kamp, C. W. M. Haest // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – 1509, № 1–2. – P. 397–408.
431. Pantaler E. R. Mechanical stress and hemin pretreatment effects on kinetic parameters of erythrocytes response to hyperosmotic shock / E. R. Pantaler, N. M. Shpakova // *Cellular & Molecular Biology Letters.* – 1998. – Vol. 3, № 2. – P. 193.
432. Pegg D. E. Red cell volume in glycerol/sodium chloride/water mixtures / D. E. Pegg // *Cryobiology.* – 1984. – Vol. 21, № 2. – P. 234–239.

433. Pegg D. E. On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes / D. E. Pegg, M. P. Diaper // *Biophys J.* – 1988. – Vol. 54, № 3. – P. 471–488.
434. Pegg D. E. The effect of initial tonicity on freeze/thaw injury to human red cells suspended in solutions of sodium chloride / D. E. Pegg, M. P. Diaper // *Cryobiology.* – 1991. – Vol. 28, № 1. – P. 18–35.
435. Pegg D. E. Principles of cryopreservation / D. E. Pegg // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 368 – P. 39–57.
436. Pegg D. E. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs / D. E. Pegg // *Cryobiology.* – 2010. – Vol. 60, № 3 (Suppl). – P. S36–S44.
437. Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes / B. Isomaa, H. Hagerstrand, G. Paatero, A. C. Engblom // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1986. – Vol. 860, № 3. – P. 510–524.
438. Phosphatidylserine binding sites in erythroid spectrin: location and implications for membrane stability / X. An, X. Guo, H. Sum [et al.] // *Biochemistry.* – 2004. – Vol. 43, № 2. – P. 310–315.
439. Phosphatidylserine binding sites in red cell spectrin / X. An, X. Guo, Y. Wu, N. Mohandas // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2004 – Vol. 32, № 3. – P. 430–432.
440. Phospholipid composition of erythrocyte membranes and plasma of mammalian blood including Australian marsupials; quantitative ³¹P NMR analysis using detergent / M. H. Nouri-Sorkhabi, N. S. Agar, D. R. Sullivan [et al.] // *Comp. Biochem. Physiol. B.* – 1996. – Vol. 113, № 2. – P. 221–227.
441. Physiology of membrane disorders / T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil (eds). – New York, London : Plenum Medical Book Company, 1978. – Chapter 9 : Principles of water and nonelectrolyte transport across membranes / T. E. Andreoli, J. A. Schafer. – P. 165–184.
442. Physiology of membrane disorders / T. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Fanestil (eds). – New York, London : Plenum Medical Book Company,

1978. – Chapter 37: Disorders of ion transport in red blood cells / J. C. Parker, E. P. Orringer, T. J. McManusr. – P. 773–800.
443. Pickholz M. Interactions of chlorpromazine with phospholipid monolayers: Effects of the ionization state of the drug / M. Pickholz, O. N. Oliveira Jr., M. S. Skaf // *Biophys. Chem.* – 2007. – Vol. 125, № 2–3. – P. 425–434.
444. Polyethylene glycols interact with membrane glycerophospholipids: is this part of their mechanism for hypothermic graft protection / D. Dutheil, G. Underhaug, I. Petit-Paris [et al.] // *J. Chem. Biol.* – 2009. – Vol. 2, № 1. – P. 39–49.
445. Preconditioning effects on cells' structural reactivity under hyperosmotic stress / E. R. Pantaler, N. M. Shpakova., T. P. Bondarenko [et al.] // 34th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO-97», June, 8-12, 1997 : Abstracts book. – Barselona (Spain), 1997. – P. 119.
446. Protein 4.1 is involved in a structural thermotropic transition of the red blood cell membrane detected by a spin-labeled stearic acid / T. Forte, T. L. Leto, M. Minetti, V. T. Marchesi // *Biochemistry.* – 1985. – Vol. 24, № 27. – P. 7876–7880.
447. Protein precipitation by polyethylene glycol: a generalized model based on hydrodynamic radius / S. L. Sim, T. He, A. Tscheliessnig [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 157, № 2. – P. 315–319.
448. Purification and biochemical characterization of a protein-palmitoyl acyltransferase from human erythrocytes / A. K. Das, B. Dasgupta, R. Bhattacharya, J. Basu // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 17. – P. 11021–11025.
449. Purification and properties of insulin-activated nitric oxide synthase from human erythrocyte membranes / S. Bhattacharya, P. S. Chakraborty, R. Basu. [et al.] // *Arch. Physiol. Biochem.* – 2001. – Vol. 109, № 5. – P. 441–449.
450. Quijano J. C. Hemoglobin precipitation by polyethylene glycols leads to underestimation of membrane pore sizes / J. C. Quijano, V. V. Lemesko // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1778, № 12. – P. 2775–2780.

451. Raghuraman H. Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes / H. Raghuraman, A. Chattopadhyay // Chem. Phys. Lipids. – 2005. – Vol. 134, № 2. – P. 183–189.
452. Rall W. F. Physical-chemical basis of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol / W. F. Rall, P. Mazur, H. Souzu // Biophys. J. – 1978. – Vol. 23, № 1. – P. 101–120.
453. Ramstedt B. Membrane properties of sphingomyelins / B. Ramstedt, J. P. Slotte // FEBS Lett. – 2002. – Vol. 531, № 1. – P. 33–37.
454. Rauenbuehler P. B. Identification of the haemoglobin binding sites on the inner surface of the erythrocyte membrane / P. B. Rauenbuehler, K. A. Cordes, J. M. Salhany // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – Vol. 692, № 3. – P. 361–370.
455. Ray S. Membrane interaction of erythroid spectrin: surface-density-dependent high-affinity binding to phosphatidylethanolamine / S. Ray, A. Chakrabarti // Mol. Membr. Biol. – 2004. – Vol. 21, № 2. – P. 93–100.
456. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein / M. L. Zeidel, S. V. Ambudkar, B. L. Smith, P. Agre // Biochemistry. – 1992. – Vol. 31, № 33. – P. 7436–7440.
457. Red cell membranes of ankyrin-deficient *nb/nb* mice lack band 3 tetramers but contain normal skeletons / S. Yi, S.-C. Liu, L. H. Derick [et al.] // Biochemistry. – 1997. – Vol. 36, № 31. – P. 9596–9604.
458. Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca^{2+} and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction / W. Nunomura, Y. Takakuwa, R. Tokimitsu [et al.] // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, № 48. – P. 30322–30328.
459. Regulation of erythrocyte ghost membrane mechanical stability by chlorpromazine / A. Enomoto, Y. Takakuwa, S. Manno [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – Vol. 1512, № 2. – P. 285–290.
460. Relationship between cellular ATP, potassium, sodium and magnesium concentrations in mammalian and avian erythrocytes / A. Miseta, P. Bogner,

- E. Berenyi [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1993. – Vol. 1175, № 2. – P. 133–139.
461. Relationship between *Clostridium septicus* alpha-toxin activity and binding to erythrocyte membranes / M. B. Hang'ombe, T. Kohda, M. Mukamoto, S. Kozaki // *J. Vet. Med. Sci.* – 2005. – Vol. 67, № 1. – P. 69–74.
462. Relationship between the intra-erythrocyte sodium composition and the membrane lipoprotein composition among different mammal species / M. Garnier, G. de Preville, P. Pilardeau, D. Boudia // *Comp. Biochem. Physiol. A.* – 1984. – Vol. 77, № 2. – P. 315–317.
463. Restriction by ankyrin of band 3 rotational mobility in human erythrocyte membranes and reconstituted lipid vesicles / A. Che, I. E. G. Morrison, R. Pan, R. J. Cherry // *Biochemistry.* – 1997. – Vol. 36, № 31. – P. 9588–9595.
464. Reversible sodium pump defect and swelling in the diabetic rat erythrocyte: Effects on filterability and implications for microangiopathy / R. Kowluru, M. W. Bitensky, A. Kowluru [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86, № 9. – P. 3327–3331.
465. Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation / V. Nicolas, C. Le Van Kim, P. Gane [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, 28. – P. 25526–25533.
466. Rodi P. M. Factors determining detergent resistance of erythrocyte membranes / P. M. Rodi, V. M. Trucco, A. M. Gennaro // *Biophys. Chem.* – 2008. – Vol. 135, № 1–3. – P. 14–18.
467. Rudenko S. V. Protection by chlorpromazine, albumin and bivalent cations against haemolysis induced by melittin [Ala-14] melittin and whole bee venom / S. V. Rudenko, E. E. Nipot // *Biochem. J.* – 1996. – Vol. 317, Pt. 3. – P. 747–754.

468. Saari J. T. Hypotonic hemolysis of human red blood cells: a two-phase process / J. T. Saari, J. S. Beck // *J. Membr. Biol.* – 1975. – Vol. 23, № 3–4. – P. 213–226.
469. Savitz D. Osmotic properties of human red cells / D. Savitz, V. W. Sidel, A. K. Solomon // *J. Gen. Physiol.* – 1964. – Vol. 48, № 1. – P. 79–94.
470. Schmidt-Nielsen K. Scaling: Why is Animal Size so Important? / K. Schmidt-Nielsen. – Cambridge : Cambridge University Press, 1984. – P. 118–119.
471. Schreier S. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspect / S. Schreier, S. V. Malheiros, E. de Paula // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1508, № 1–2. – P. 210–234.
472. Schrier S. L. Mechanisms of amphipath-induced stomatocytosis in human erythrocytes / S. L. Schrier, A. Zachowski, P. F. Devaux // *Blood.* – 1992. – Vol. 79, № 3. – P. 782–786.
473. Scott K. L. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future / K. L. Scott J. Lecak, J. P. Acker // *Transfus. Med. Rev.* – 2005. – Vol. 19, № 2. – P. 127–142.
474. Seddon A. M. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera / A. M. Seddon, P. Curnow, P. J. Booth // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1666, № 1–2. – P. 105–117.
475. Seeman P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers / P. Seeman // *Pharmacol. Rev.* – 1972. – Vol. 24, № 4. – P. 586–655.
476. Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers / J. Y. Chen, L. S. Brunauer, F. C. Chu [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – Vol. 1616, № 1. – P. 95–105.
477. Separation of the lipid bilayer from the membrane skeleton during discocytoechinocyte transformation of human erythrocytes ghosts / S. C. Liu, L. H. Derick, M. A. Duquette [et al.] // *Eur. J. Cell Biol.* – 1989. – Vol. 49, № 2. – P. 358–366.

478. Sheetz M. P. Biological membranes as bilayer couples. A mechanism of drug erythrocyte interaction / M. P. Sheetz, S. J. Singer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1974. – Vol. 71, № 11. – P. 4457–4461.
479. Shpakova N. Comparative analysis of mammalian erythrocyte resistance to mechanical stress / N. Shpakova, D. Alexandrova, N. Orlova // 17 International Symposium of the European Association for Red Cell Research, 23–27 April 2009. – Milano (Italy), 2009. – P. 67.
480. Shpakova N. M. Antihemolytic activity of trifluoperazine during hypertonic shock of erythrocytes / N. M. Shpakova, O. N. Dunayevskaya, O. P. Synchykova // *On molecular biology and genetics : conference for students, PhD students and young scientists, September 20–22, 2001 : abstracts.* – Kyiv (Ukraine), 2001. – P. 170.
481. Shpakova N. M. Hypertonic cryohemolysis in bovine, equine, canine and human erythrocytes: osmotic and temperature peculiarities / N. M. Shpakova, S. S. Ershov, N. V. Orlova // *Біологія тварин.* – 2011. – Т. 13, № 1–2. – С. 320–328.
482. Sikorski A. F. Interactions of spectrins with intrinsic membrane domain / A. F. Sikorski, K. Białkowska // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 1996. – Vol. 1, № 1. – P. 97–104.
483. Simons K. Model systems, lipid raft, and cell membranes / K. Simons, W. L. C. Waz. // *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Structure,* – 2004. – Vol. 33. – P. 269–295.
484. Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants / M. Maruyama, T. Kenmochi, K. Sakamoto [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2004. – Vol. 36, № 4. – P. 1133–1134.
485. Simson R. Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis / R. Simson, E. D. Sheets, K. Jacobson // *Biophys. J.* – 1995. – Vol. 69, № 3. – P. 989–993.

486. Single cell volume measurement by quantitative phase microscopy (QPM): a case study of erythrocyte morphology / C. L. Curl, C. J. Bellair, P. J. Harris [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2006. – Vol. 17, № 5–6. – P. 193–200.
487. Smith J. E. Variability in erythrocyte deformability among various mammals / J. E. Smith, N. Mohandas, S. B. Shoet // *Am. J. Physiol. – Heart Circ. Physiol.* – 1979. – Vol. 5, № 5. – P. H725–H730.
488. Somerharju P. Lateral organisation of membrane lipids. The superlattice view / P. Somerharju, J. A. Virtanen, K. H. Cheng // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1440, № 1. – P. 32–48.
489. Song C. Existence of lipid microdomains in bilayer of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and 1-stearoyl-2-docosahexenoyl phosphatidylserine (SDPS) and their perturbation by chlorpromazine: A ^{13}C and ^{31}P solid-state NMR study / C. Song, H. Holmsen, W. Nerdal // *Biophys. Chem.* – 2006. – Vol. 120, № 3. – P. 178–187.
490. Soong C. J. Analysis of band 3 cytoplasmic domain phosphorylation and association with ankyrin / C. J. Soong, P. W. Lu, M. Tao // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1987. – Vol. 254, № 2. – P. 509–517.
491. Spectrin–phospholipid interactions Existence of multiple kinds of binding sites? / M. Grzybek, A. Chorzalska, E. Bok [et al.] // *Chem. Phys. Lipids.* – 2006. – Vol. 141, № 1–2. – P. 133–141.
492. Stasiuk M. Transformations of erythrocytes shape and its regulation / M. Stasiuk, G. Kijanka, A. Kozubek // *Postepy Biochem.* – 2009. – Vol. 55, № 4. – P. 425–433.
493. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes / P. Bogner, K. Sipos, A. Ludany [et al.] // *Eur. Biophys. J.* – 2002. – 31, № 2. – P. 145–152.
494. Sterols are mainly in the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane and the endocytic recycling compartment in CHO cells / M. Mondal, B. Mesmin, S. Mukherjee, F. R. Maxfield // *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – Vol. 20, № 2. – P. 581–588.

495. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine / A. Akel., T. Hermle, O. M. Niemoeller [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 532, № 1-2. – P. 11–17.
496. Stokke B. T. Human erythrocyte membrane free energy / B. T. Stokke, A. Mikkelsen, A. Elgsaeter // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – Vol. 816, № 1. – P. 102–111.
497. Streichman S. Hypertonic cryohemolysis: a diagnostic test for hereditary spherocytosis / S. Streichman, Y. Gesheidt, I. Tatarsky // *Am. J. Hematol.* – 1990. – Vol. 35, № 2. – P. 104–109.
498. Structural and functional state of erythrocyte membranes under the effect of amphiphilic compounds / O. P. Synchykova., N. V. Orlova, L. V. Tsymbal [et al.] // III з їзд Українського біофізичного товариства, 8–11 жовтня 2002. – тези доповід. – Львів, 2002. – С. 92.
499. Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility / V. L. Grum, D. Li, R. I. MacDonald, A. Mondragón // *Cell.* – 1999. – Vol. 98, № 4. – P. 523–535.
500. Synchykova O. P. Correction of the temperature-dependent hypertonic haemolysis of erythrocytes by alkyl- β ,D-glucopyranosides / O. P. Synchykova, N. M. Shpakova, V. A. Bondarenko // 14th Meeting of the European Association for Red Cell Research, April 24–28 2003 : Theses. – Roscoff (France), 2003. – P. 47–48.
501. Synchykova O. P. Effect of alkyl- β ,D-glucopyranosides on hypertonic haemolysis of erythrocytes / O. P. Synchykova, N. M. Shpakova, V. A. Bondarenko // *Bioelectrochemistry.* – 2004. – Vol. 62, № 2. – P. 163–167.
502. Tachev K. D. On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model / K. D. Tachev, K. D. Danov, P. A. Kralchevsky // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* – 2004. – Vol. 34, № 2. – P. 123–140.

503. Takahashi T. Thermal shock hemolysis in human red cells the effects of temperature, time, and osmotic stress / T. Takahashi, R. J. Williams // *Cryobiology*. – 1983. – Vol. 20, № 5. – P. 507–520.
504. Takahashi T. Thermal shock in red cells / T. Takahashi, R. J. Williams // *Cryobiology*. – 1979. – Vol. 16, №. 6. – P. 588–589.
505. Targeted deletion of alpha-adducin results in absent beta- and gamma-adducin, compensated hemolytic anemia, and lethal hydrocephalus in mice / R.. F. Robledo, S. L. Ciciotte, B. Gwynn [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 112, № 10. – P. 4298–4307.
506. Temperature-dependent vesiculation of human erythrocytes caused by hypertonic salt: a phenomenon involving lipid segregation / T. Araki, B. Roelofsen, J. A. Op den Kamp, L. L. van Deenen. // *Cryobiology*. – 1982. – Vol. 19, № 4. – P. 353–361.
507. The aqueous pore in the red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, non-electrolytes, and water / A. K. Solomon, B. Chasan, J. A. Dix [et al.] : // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1983. – Vol. 414. – P. 97–124
508. The formation and development of a transmembrane pore as a decisive event in the thermal and osmotic effect / V. Bondarenko, E. Pantaler, T. Bondarenko [et al.] // 32nd Annual Meeting of Society for Cryobiology «CRYO-95», July, 6–11, 1995 : Abstracts. – Madison Wisconsin (USA), 1995. – P. 54.
509. The possible influence of osmotic poration on cell membrane water permeability / K. Muldrew, J. Schachar, P. Cheng [et al.] // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 58, № 1. – P. 62–68.
510. The superlattice model of lateral organization of membranes and its implications on membrane lipid homeostasis / P. Somerharju, J. A. Virtanen, K. H. Cheng, M. Hermansson // *Biochim. Biophys. Acta*, – 2009. – Vol. 1788, № 1. – P. 12–23.
511. The vesicle-to-micelle transition of phosphatidylcholine vesicles induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea / A. Walter,

- G. Kuehl, K. Barnes, G. VanderWaerdt // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1508, № 1–2. – P. 20–33.
512. Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes: implications for rapid flip-flop in biological membranes / K. John, S. Schreiber, J. Kubelt [et al.] // *Biophys. J.* – 2002. – Vol. 83, № 6. – P. 3315–3323.
513. Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane / E. D. Sheets, G. M. Lee, R. Simson, K. Jacobson – *Biochemistry.* – 1997. – Vol. 36, № 41. – P. 12449–12458.
514. Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte / F. Schroeder, G. Nemecz, W. G. Wood [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – Vol. 1066, № 2. – P. 183–192.
515. Trapped water of human erythrocytes and its application in cryopreservation / G. Zhao, L. He, H. Zhang [et al.] // *Biophys. Chem.* – 2004. – Vol. 107, № 2. – P. 189–195.
516. Triplett R. B. Proteolytic digestion of erythrocyte, resealed ghosts, and isolated membranes / R. B. Triplett, K. L. Carraway // *Biochemistry.* – 1972. – Vol. 11, № 15. – P. 2897–2901.
517. Tsai S.-T. High Channel-mediated water permeability in rabbit erythrocytes: characterization in native cells and expression in *Xenopus* oocytes / S. T. Tsai, R. Zhang, A. S. Verkman // *Biochemistry.* – 1991. – Vol. 30, № 8. – P. 2087–2092.
518. Ulrich A. S. Molecular response of the lipid headgroup to bilayer hydration monitored by ²H-NMR / A. S. Ulrich, A. Watts // *Biophys. J.* – 1994. – Vol. 66, № 5. – P. 1441–1449.
519. Various topochemical arrangements of sialic acids on human erythrocytes as detected by partition in aqueous two-polymer phase systems / B. Yu. Zaslavsky, L. M. Miheeva, S. V. Rogozhin [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – Vol. 597, № 1. – P. 53–63.

520. Virtanen J. A. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model / J. A. Virtanen, K. H. Cheng, P. Somerharju // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95, № 9. – P. 4964–4969.
521. Wan J. Red blood cell dynamics: from cell deformation to ATP release / J. Wan, A. M. Forsyth, H. A. Stone // *Integr. Biol. (Camb.).* – 2011. – Vol. 3, № 10. – P. 972–981.
522. Wassall S. R. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes / S. R. Wassall, W. Stillwell // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1788, № 1. – P. 24–32.
523. Water exchange through erythrocyte membranes: biochemical and nuclear magnetic resonance studies re-evaluating the effects of sulfhydryl reagents and of proteolytic enzymes on human membranes / G. Benga, O. Popescu, V. Borza [et al.] // *J. Membr. Biol.* – 1989. – Vol. 108, № 2. – P. 105–113.
524. Weber A. Tropomodulin increases the critical concentration of barbed end-capped actin filaments by converting ADP.P(i)-actin to ADP-actin at all pointed filament ends / A. Weber, C. R. Pennise, V. M. Fowler // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 4. – P. 34637–34645.
525. Weed R. I. Metabolic dependence of red cell deformability / R. I. Weed, P. L. LaCelle, E. W. Merrill // *J. Clin. Invest.* – 1969. – Vol. 48, № 5. – P. 795–809.
526. Wessels J. M. C. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species / J. M. C. Wessels, J. H. Veerkamp // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – Vol. 291, № 1. – P. 190–196.
527. Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data / U. Windberger, A. Bartholovitsch, R. Plasenzotti [et al.] // *Exp. Physiol.* – 2003. – Vol. 88, № 3. – P. 431–440.

528. Wolfe J. Cryobiology and anhydrobiology of cells / J. Wolfe, G. Bryant – The University of New South Wales, Sydney, 2004. – Режим доступа: <http://www.phys.unsw.edu.au/~jw/cryoblurb.html>.
529. Wong P. Mechanism of control of erythrocyte shape: a possible relationship to band 3 / P. Wong // J. Theor. Biol. – 1994. – Vol. 17, № 2. – P. 197–205.
530. Yawata Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model / Y. Yawata. – Weinheim : Copyright WILEY–VCH Verlag GmbH &Co. KGaA, 2003. – 448 p.
531. Yeagle P. L. Cholesterol and the cell membrane / P. L. Yeagle // Biochim. Biophys. Acta, – 1985. – Vol. 882, № 3–4. – P. 267–287.
532. Zaslavsky B. Y. Relative hydrophobicity of surfaces of different species as measured by partition in aqueous two-polymer phase systems / B. Y. Zaslavsky, L. M. Miheeva, S. V. Rogozhin // Biochim. Biophys. Acta. – 1979. – Vol. 588, № 2. – P. 89–101.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Коэффициенты корреляции температурно-осмотических показателей и геометрических характеристик эритроцитов разных видов млекопитающих (крыса, бык, лошадь, человек, кролик, собака)

Таблица А. 1

Коэффициенты корреляции показателей гипотонического лизиса эритроцитов разных видов млекопитающих и их геометрических характеристик (n = 6)

Геометрические характеристики	Пороговые концентрации NaCl, моль/л				Индекс осмотической хрупкости, моль/л			
	37°C		0°C		37°C		0°C	
	r _s	p	r _s	p	r _s	p	r _s	p
d, мкм	–0,955	0,005	–0,939	0,005	–0,975	0, 005	–0,794	0,059
S/V	0,941	0,005	0,926	0,008	0,986	0,0003	0,812	0,049

Примечание. Геометрические показатели – по данным работ [234, 284, 350, 464, 470, 487]

Таблица А. 2

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического шока эритроцитов разных видов млекопитающих и их геометрических характеристик (n = 6)

Геометрические характеристики	Пороговые концентрации NaCl, моль/л		Гемолиз в 4,0 моль/л NaCl, %			
	37°C		37°C		0°C	
	r _s	p	r _s	p	r _s	p
d, мкм	0,456	0,364	0,319	0,538	0,928	0,008
S/V	–0,580	0,228	–0,029	0,957	–0,771	0,072

Примечание. Геометрические показатели – по данным работ [234, 284, 350, 464, 470, 487]

Таблица А. 3

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического криогемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих и их геометрических характеристик (n=6)

Геометрические характеристики	Пороговые концентрации, моль/л		Гемолиз в 0,8 моль/л NaCl, %		Гемолиз в 1,2 моль/л NaCl, %	
	r _s	p	r _s	p	r _s	p
d, мкм	0,099	0,852	0,174	0,742	0,580	0,228
S/V	–0,098	0,854	–0,029	0,957	–0,600	0,208

Примечание. Геометрические показатели – по данным работ [234, 284, 350, 464, 470, 487]

Приложение Б

Коэффициенты корреляции температурно-осмотических показателей и характеристик цитоплазмы эритроцитов разных видов млекопитающих (крыса, бык, лошадь, человек, кролик, собака)

Таблица Б. 1

Коэффициенты корреляции показателей гипотонического лизиса эритроцитов разных видов млекопитающих и характеристик их цитоплазмы
(n = 6)

Цитоплазматические показатели	Пороговые концентрации NaCl, моль/л		Индекс осмотической хрупкости, моль/л	
	37°C	0°C	37°C	0°C
	r_s p	r_s p	r_s p	r_s p
гидрофобность Нб	0,152 0,774	0,123 0,816	0,371 0,468	0,290 0,577
K ⁺ , ммоль/л	-0,091 0,864	-0,123 0,816	-0,029 0,957	0,116 0,827
Na ⁺ , моль/л	0,091 0,864	0,123 0,816	0,029 0,957	-0,116 0,827
K ⁺ +Na ⁺ , моль/л	-0,152 0,774	-0,247 0,637	-0,200 0,704	-0,464 0,354
Mg ²⁺ , моль/л	0,213 0,686	0,093 0,861	0,086 0,872	0,029 0,957
АТФ, моль/л	-0,577 0,231	-0,555 0,252	-0,486 0,329	-0,406 0,425
H ₂ O, г воды / г сухой массы	-0,698 0,123	-0,679 0,138	-0,486 0,329	-0,522 0,288
H ₂ O, %	-0,577 0,231	-0,555 0,252	-0,486 0,329	-0,406 0,425

Примечание. Цитоплазматические показатели – по данным работ [218, 240, 460, 493, 527]

Таблица Б. 2

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического шока эритроцитов разных видов млекопитающих и характеристик их цитоплазмы (n = 6)

Цитоплазматические показатели	Пороговые концентрации NaCl, моль/л	Гемолиз в 4,0 моль/л NaCl, %	
	37°C	37°C	0°C
	r_s / p	r_s / p	r_s / p
гидрофобность Нб	-0,696 $p = 0,125$	0,829 $p = 0,042$	0,143 $p = 0,787$
K^+ , ммоль/л	0,667 $p = 0,148$	-0,371 $p = 0,468$	0,200 $p = 0,704$
Na^+ , моль/л	-0,667 $p = 0,148$	0,371 $p = 0,468$	-0,200 $p = 0,704$
$K^+ + Na^+$, моль/л	0,493 $p = 0,321$	-0,543 $p = 0,266$	0,257 $p = 0,623$
Mg^{2+} , моль/л	0,638 $p = 0,173$	-0,886 $p = 0,019$	-0,086 $p = 0,871$
АТФ, моль/л	0,841 $p = 0,036$	-0,257 $p = 0,623$	0,543 $p = 0,266$
H ₂ O, г воды / г сухой массы	0,609 $p = 0,200$	0,143 $p = 0,787$	0,771 $p = 0,072$
H ₂ O, %	0,841 $p = 0,036$	-0,257 $p = 0,623$	0,543 $p = 0,266$

Примечание. Цитоплазматические показатели – по данным работ [218, 240, 460, 493, 527]

Таблица Б. 3

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического криогемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих и характеристик их цитоплазмы
(n = 6)

Цитоплазматические показатели	Пороговые концентрации NaCl, моль/л	Гемолиз в 0,8 моль/л NaCl, %	Гемолиз в 1,2 моль/л NaCl, %
	r_s / p	r_s / p	r_s / p
гидрофобность Нв	0,098 / 0,854	0,143 / 0,787	0,486 / 0,329
K ⁺ , ммоль/л	0,488 / 0,326	-0,486 / 0,329	-0,600 / 0,208
Na ⁺ , моль/л	-0,488 / 0,326	0,486 / 0,329	0,600 / 0,208
K ⁺ +Na ⁺ , моль/л	-0,488 / 0,326	0,257 / 0,623	0,371 / 0,468
Mg ²⁺ , моль/л	-0,293 / 0,573	-0,257 / 0,623	-0,143 / 0,787
АТФ, моль/л	0,488 / 0,326	-0,143 / 0,787	-0,486 / 0,329
H ₂ O, г воды / г сухой массы	0,488 / 0,326	0,086 / 0,872	-0,143 / 0,787
H ₂ O, %	0,326 / 0,488	-0,143 / 0,787	-0,486 / 0,329

Примечание. Цитоплазматические показатели – по данным работ [218, 240, 460, 493, 527]

Приложение В

Коэффициенты корреляции температурно-осмотических показателей и содержания холестерина в мембранах эритроцитов млекопитающих (крыса, кролик, бык, лошадь, собака, человек)

Таблица В. 1

Коэффициенты корреляции показателей гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих и содержания холестерина в их мембранах

	Пороговые концентрации NaCl, моль/л		Индекс осмотической хрупкости, моль/л	
	37°C	0°C	37°C	0°C
	r_s p	r_s p	r_s p	r_s p
Общие липиды (за исключением ганглиозидов), мг/мл упакованных клеток (n = 5)	-0,667 0,219	-0,791 0,111	-0,600 0,285	-0,821 0,089
Холестерин, % от общих липидов (n = 6)	0,564 0,322	0,632 0,252	0,600 0,285	0,564 0,322

Примечание. Содержание общих липиды и холестерина – по данным работ [419, 526]

Таблица В. 2

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического шока эритроцитов
млекопитающих и содержания холестерина в их мембранах (n = 6)

	Пороговые концентрации NaCl, моль/л		Гемолиз в 4,0 моль/л NaCl, %			
	37°C		37°C		0°C	
	r _s	p	r _s	p	r _s	p
Общие липиды (за исключением ганглиозидов), мг/мл упакованных клеток (n = 5)	0,300	0,624	-0,100	0,873	0,900	0,037
Холестерин, % от общих липидов (n = 6)	0,000	1,000	-0,100	0,873	-0,600	0,285

Примечание. Содержание общих липиды и холестерина – по данным работ
[419, 526]

Таблица В. 3

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического криогемолиза
эритроцитов млекопитающих и содержания холестерина в их мембранах
(n = 6)

	Пороговые концентрации NaCl, моль/л		Гемолиз в 0,8 моль/л NaCl, %		Гемолиз в 1,2 моль/л NaCl, %	
	r _s	p	r _s	p	r _s	p
Общие липиды (за исключением ганглиозидов), мг/мл упакованных клеток (n = 5)	-0,866	0,058	0,900	0,037	0,800	0,104
Холестерин, % от общих липидов (n = 6)	0,866	0,058	-0,900	0,037	-0,700	0,188

Примечание. Содержание общих липиды и холестерина – по данным работ
[419, 526]

Приложение Д

Коэффициенты корреляции температурно-осмотических показателей и характеристик фосфолипидного состава мембран эритроцитов разных видов млекопитающих (крыса, бык, лошадь, человек, кролик, собака)

Таблица Д. 1

Коэффициенты корреляции показателей гипотонического лизиса эритроцитов разных видов млекопитающих и характеристик липидного состава их мембран (n = 6)

Липидные компоненты	Пороговые концентрации NaCl, моль/л		Индекс осмотической хрупкости, моль/л	
	37°C	0°C	37°C	0°C
	r_s p	r_s p	r_s p	r_s p
ЛФХ	-0,308 0,553	-0,247 0,637	-0,551 0,257	-0,574 0,234
СМ	0,395 0,439	0,494 0,320	0,543 0,266	0,696 0,125
ФХ	-0,395 0,439	-0,494 0,320	-0,600 0,208	-0,638 0,173
СМ+ ФХ	-0,516 0,295	-0,617 0,192	-0,657 0,156	-0,696 0,125
ЛФХ+СМ+ФХ	-0,516 0,295	-0,617 0,192	-0,657 0,156	-0,696 0,125
ФИ	-0,213 0,686	-0,061721 0,908	-0,371 0,468	-0,174 0,742
ФС	0,638 0,173	0,679 0,138	0,714 0,111	0,580 0,228
ФЭА	0,455 0,364	0,525 0,285	0,600 0,208	0,609 0,200
ФК	-0,484 0,331	-0,492 0,322	-0,213 0,686	-0,339 0,511
Ненасыщенные жирные кислоты	0,516 0,295	0,401 0,431	0,371 0,468	0,203 0,700
Сфингозин	0,395 0,439	0,494 0,320	0,543 0,266	0,696 0,125

Примечание. Содержание индивидуальных ФЛ представлено в процентах от общих фосфолипидов эритроцитарных мембран, ненасыщенных жирных кислот – в процентах от общего содержания жирных кислот [526]

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического шока
эритроцитов разных видов млекопитающих и характеристик липидного
состава их мембран

Липидные компоненты	Пороговые концентрации NaCl, моль/л	Гемолиз в 4,0 моль/л NaCl, %	
	37°C	37°C	0°C
	r_s p	r_s p	r_s p
ЛФХ	0,397 0,436	-0,580 0,228	0,174 0,742
СМ	-0,377 0,461	0,4299 0,397	-0,371 0,468
ФХ	0,354 0,46	-0,543 0,266	0,314 0,544
СМ+ ФХ	0,319 0,538	0,257 0,623	0,486 0,329
ЛФХ+СМ+ФХ	0,319 0,538	0,257 0,623	0,486 0,329
ФИ	-0,087 0,870	0,0286 0,957	-0,257 0,623
ФС	0,928 0,008	0,543 0,266	-0,543 0,266
ФЭА	-0,029 0,957	0,0286 0,957	-0,371 0,468
ФК	0,462 0,356	0,213 0,686	0,698 0,123
Ненасыщенные жирные кислоты	0,174 0,742	-0,714 0,111	-0,371 0,468
Сфингозин	-0,377 0,461	0,429 0,397	-0,371 0,468

Примечание. Содержание индивидуальных ФЛ представлено в процентах от общих фосфолипидов эритроцитарных мембран, ненасыщенных жирных кислот – в процентах от общего содержания жирных кислот [526]

Таблица Д. 3

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического криогемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих и характеристик липидного состава их мембран

Липидные компоненты	Пороговые концентрации NaCl, моль/л		Гемолиз в 0,8 моль/л NaCl, %		Гемолиз в 1,2 моль/л NaCl, %	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p
ЛФХ	-0,891	0,017	0,609	0,200	0,377	0,461
СМ	0,878	0,021	-0,714	0,111	-0,600	0,208
ФХ	-0,878	0,021	0,657	0,156	0,429	0,397
СМ+ ФХ	-0,878	0,021	0,829	0,042	0,600	0,208
ЛФХ+СМ+ФХ	-0,878	0,021	0,829	0,042	0,600	0,208
ФИ	0,098	0,854	0,086	0,872	-0,371	0,468
ФС	0,098	0,854	-0,200	0,704	0,257	0,623
ФЭА	0,878	0,021	-0,886	0,019	-0,657	0,156
ФК	0,518	0,292	-0,030	0,954	-0,030	0,954
Ненасыщенные жирные кислоты	-0,488	0,326	-0,200	0,704	0,143	0,787
Сфингозин	0,878	0,021	-0,714	0,111	-0,600	0,208

Примечание. Содержание индивидуальных ФЛ представлено в процентах от общих фосфолипидов эритроцитарных мембран, ненасыщенных жирных кислот – в процентах от общего содержания жирных кислот [526]

Приложение Ж

Коэффициенты корреляции температурно-осмотических показателей эритроцитов животных и концентраций токсина из *Clostridium septicus*, вызывающих 50 % гемолиз эритроцитов животных (крыса, бык, лошадь, кролик, собака) при разных температурах

Таблица Ж. 1

Коэффициенты корреляции показателей гипотонического лизиса эритроцитов животных и концентраций токсина из *Clostridium septicus*, вызывающих 50% гемолиз эритроцитов животных (крыса, бык, лошадь, кролик, собака) при разных температурах (n = 5)

Температура	Пороговые концентрации NaCl, моль/л				Индекс осмотической хрупкости, моль/л			
	37°C		0°C		37°C		0°C	
	r _s	p	r _s	p	r _s	p	r _s	p
7°C	0,872	0,054	0,949	0,014	0,900	0,037	0,872	0,054
15°C	0,872	0,054	0,949	0,014	0,900	0,037	0,872	0,054
30°C	0,667	0,219	0,791	0,111	0,700	0,188	0,718	0,172

Примечание. Концентрации токсина (мкг/мл) из *Clostridium septicus*, вызывающих 50% гемолиз эритроцитов животных – по данным работы [461]

Таблица Ж. 2

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического гемолиза эритроцитов животных и концентраций токсина из *Clostridium septicus*, вызывающих 50 % гемолиз эритроцитов животных (крыса, бык, лошадь, кролик, собака) при разных температурах (n = 5)

Температура	Пороговые концентрации NaCl, моль/л		Гемолиз в 4,0 моль/л NaCl, %			
	37°C		37°C		0°C	
	r _s	p	r _s	p	r _s	p
7°C	-0,700	0,188	0,500	0,391	-0,900	0,037
15°C	-0,700	0,188	0,500	0,391	-0,900	0,037
30°C	-0,400	0,505	0,300	0,624	-0,800	0,104

Примечание. Концентрации токсина (мкг/мл) из *Clostridium septicus*, вызывающих 50% гемолиз эритроцитов животных – по данным работы [461]

Таблица Ж. 3

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического криогемолиза эритроцитов животных и концентраций токсина из *Clostridium septicus*, вызывающих 50 % гемолиз эритроцитов животных (крыса, бык, лошадь, кролик, собака) при разных температурах (n = 5)

Температура	Гипертонический криогемолиз					
	Пороговые концентрации NaCl, моль/л		Гемолиз в 0,8 моль/л NaCl, %		Гемолиз в 1,2 моль/л NaCl, %	
	r _s	p	r _s	p	r _s	p
7°C	0,577	0,308	-0,600	0,285	-0,300	0,624
15°C	0,577	0,308	-0,600	0,285	-0,300	0,624
30°C	0,866	0,058	-0,800	0,104	-0,600	0,285

Примечание. Концентрации токсина (мкг/мл) из *Clostridium septicus*, вызывающих 50% гемолиз эритроцитов животных – по данным работы [461]

Приложение 3

Коэффициенты корреляции температурно-осмотических показателей и характеристик водного транспорта эритроцитов млекопитающих

Таблица 3. 1

Коэффициенты корреляции показателей гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих и характеристик водного транспорта эритроцитов млекопитающих

Показатели водного транспорта	Пороговые концентрации NaCl, моль/л		Индекс осмотической хрупкости, моль/л	
	37°C	0°C	37°C	0°C
	r_s p	r_s p	r_s p	r_s p
$P_f \times 10^{-5}$, м/с	0,112 0,858	0,112 0,858	-0,100 0,873	-0,200 0,747
$P_d \times 10^{-5}$, м/сек 37°C	-0,679 0,138	-0,679 0,138	-0,771 0,072	-0,696 0,125
ΔP_d = контроль – РСМБС 37°C	-0,339 0,510	-0,339 0,510	-0,429 0,397	-0,435 0,389
РСМБС 37°C	-0,926 0,008	-0,926 0,008	-0,943 0,005	-0,812 0,049

Примечания: Показатели осмотического транспорта воды – по данным работы [294], n = 5; показатели транспорта воды – по данным работ [224, 265, 266], n = 6.

Таблица 3. 2

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического шока эритроцитов
млекопитающих и характеристик водного транспорта эритроцитов

млекопитающих

	Пороговые концентрации NaCl, моль/л	Гемолиз в 4,0 моль/л NaCl, %	
	37°C	37°C	0°C
	r_s	r_s	r_s
	p	p	p
$P_f \times 10^{-5}$ м/с	0,667 0,219	-0,900 0,037	-0,300 0,624
$P_d, \times 10^{-5}$ м/сек 37°C	0,928 0,008	-0,657 0,156	0,486 0,329
$\Delta P_d = \text{контроль} - \text{PCMBS}$ 37°C	0,899 0,015	-0,886 0,019	0,200 0,704
PCMBS 37°C	0,580 0,228	0,029 0,957	0,771 0,072

Примечания: Показатели осмотического транспорта воды – по данным работы [294], $n = 5$; показатели транспорта воды – по данным работ [224, 265, 266], $n = 6$.

Таблица 3. 3

Коэффициенты корреляции показателей гипертонического криогемолиза
эритроцитов млекопитающих и характеристик водного транспорта
эритроцитов млекопитающих

Показатели водного транспорта	Пороговые концентрации, моль/л	Гемолиз в 0,8 моль/л NaCl, %	Гемолиз в 1,2 моль/л NaCl, %
	r_s / p	r_s / p	r_s / p
$P_f \times 10^{-5}$ м/с	-0,289 / 0,638	-0,100 / 0,873	-0,300 / 0,624
$P_d, \times 10^{-5}$ м/сек 37°C	-0,293 / 0,573	0,314 / 0,544	-0,143 / 0,787
$\Delta P_d = \text{контроль} - \text{PCMBS}$ 37°C	-0,293 / 0,573	0,029 / 0,957	-0,200 / 0,704
PCMBS 37°C	-0,098 / 0,854	0,600 / 0,208	0,029 / 0,957

Примечания: Показатели осмотического транспорта воды – по данным работы [294], $n = 5$; показатели транспорта воды – по данным работ [224, 265, 266], $n = 6$.