

2. Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я., Марилян Г. Г., Петросян Л. С. Биофизика (в печати).
3. Кленин В. И., Шеголов С. Ю., Лаврушин В. И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. Саратов, 1977.
4. Brunner J., Skrabal P., Hauser H. Biochim. et Biophys. Acta, 455, 322—331, 1976.
5. Farmer E., Satten J. Chem. Soc., 1, 9, 1943.
6. Holman T.: In Human R. T., Lundberg W. O., Matkin T. Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids, 2, 51, London, 19 4.
7. Inou K., Kitagawa T. Biochem. e Biophys. Acta, 237, 361—372, 1971.
8. Jackson M. L., Schmidt C. E., Lichtenberg D., Litman B. J., Albert A. D. Biochemistry, 21, 4576—4582, 1982.
9. Klein R. A. Biochim. et Biophys. Acta, 239, 454—455, 1970.
10. Lea C. H. In Popjak and Le Preton. Biochemical Problems of Lipids, Butterworths 81, London, 1955.
11. Shintsky M., Barenholz Y. J. Biol. Chem., 249, 2652, 1974.

Поступило 26 XI 1987 г.

Биол. ж. Армении, т. 41, № 4, 1988

УДК 612.118.221.346.01

КИСЛОТНЫЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ. ВЛИЯНИЕ ХЛОПРОМАЗИНА

М. М. КОРХМАЗИН, Л. Г. МИКАЕЛЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР

Показано, что кислотный гемолиз эритроцитов является сложным многостадийным процессом, связанным с нарушением целостности плазматической мембраны эритроцитов. При $\text{pH} > 3$ ХП в концентрации $3.5 \cdot 10^{-4}$ М оказывает некоторое стабилизирующее влияние на структуру эритроцитов, не предотвращая при этом гемолиза.

Քլորոմազինը և քիմիային ճնշմանը որոշ ճնշման, ազդարարման գործնական համակարգին նրա պիրմանական փուլի փուլ ճնշմանը ցույց են տալիս քիմիային ճնշմանը բարդ շնչաթիվ, որը ներառվում է մեմբրանների փոխանակման մի փուլի փուլ: Քլորոմազինը $3.5 \cdot 10^{-4}$ Մ կոնցենտրացիոն, երբ $\text{pH} > 3$, առաջ է դնում մեմբրանային կառուցվածքի որոշակի կայունացում՝ բնորոշվելով առանց փոխանակման քիմիային ճնշմանը:

Some aspects of acidic hemolysis of erythrocytes with an emphasis on initial phase of it have been studied. Results show the complex nature of acidic hemolysis, which includes various stages of erythrocytic membrane damage. $3.5 \cdot 10^{-4}$ M chlorpromazine at $\text{pH} > 3$ causes some stabilization of membrane structure without prevention of hemolysis.

Эритроциты — кислотный гемолиз — хлорпромазин.

Известно, что амфифильные лекарственные соединения при определенных концентрациях оказывают стабилизирующее влияние на устойчивость эритроцитов к осмотическому лизису [6]. Механизм осмотического гемолиза давно и интенсивно исследуется. Установлена важная роль мембраны как в процессе гемолиза, так и в модификации этого про-

Сокращения: ХП — хлорпромазин.

цесса различными лекарственными соединениями [6, 7]. В силу ряда преимуществ в клинической практике используется также и другой вид гемолиз—кислотный [1], до настоящего времени мало исследованный.

Сопоставление кинетик осмотического и кислотного гемолиза наводит на мысль о существовании различия в механизмах этих процессов. Детальное изучение кислотного гемолиза, а также влияния амфифильных лекарственных соединений на его кинетику могло бы пролить свет на понимание механизма этого типа лизиса эритроцитов и роли мембран в этом процессе.

Материал и методика. Кровь здоровых доноров хранили в цитратном консервирующем растворе примерно 1—2 часа, затем эритроциты отделяли от плазмы, дважды промывали фосфатным буфером следующего состава (мМ): NaCl —145; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ —7,6; KH_2PO_4 —2,4 (рН 7,4). Клетки осаждали при комнатной температуре 10 мин $\times 1000\text{ g}$. Отмытые эритроциты ресуспендировали в том же буфере, доводя концентрацию суспензии до $1,3 \cdot 10^9$ кл/мл. 50 мкл аликвоты клеточной суспензии добавляли в стеклянную кювету, содержащую 4 мл экспериментального раствора. Ионотонические растворы NaCl с низкими рН готовили на глицил-глициновом буфере.

В ряде случаев (отмечено в тексте) гемолиз проводили в незабуференных растворах 0,9%-ного NaCl , рН которых доводили до необходимой величины добавлением 0,1 N HCl , при этом эритроциты отмывали 0,9%-ным раствором NaCl (рН 7,4).

В опытах с XII (Львовский химико-фармацевтический завод) эритроциты предварительно инкубировали не менее 10 мин в растворе с XII в концентрации, соответствующей его концентрации в экспериментальном растворе.

О величине и кинетике гемолиза судили по изменению светопропускания суспензии эритроцитов (T) при $\lambda = 700\text{ nm}$ на СФ-26 ЛОМО, снабженном самопишущей установкой.

Изменение формы и состояния эритроцитов контролировали наблюдением в световой микроскоп МБИ-3.

Все эксперименты проводили при комнатной температуре при непрерывном перемешивании суспензии.

Результаты и обсуждение. Кислотный гемолиз эритроцитов рассмотрен в узком интервале рН (2,5—3,5). Величина рН влияет на длительность начальной стадии, на кинетику всего процесса, но не на его конечную величину. Во всех случаях гемолиз происходит полностью. На рис. 1 а приведены кривые светопропускания суспензии эритроцитов в средах с рН 2,5 и 3,5. Видно, что продолжительность начального участка кривой, как и кинетика всего процесса, различны. Собственно, разрушение клеток (обесквашивание и исчезновение при наблюдении в микроскоп) начинается с 200 (рН 2,5) и 500 с (рН 3,5), что соответствует области резкого изменения наклона кривых светопропускания.

Кислотный гемолиз является сложным процессом, включающим несколько стадий. Изучение начальной стадии, во время которой клетка претерпевает изменения, приводящие ее к разрушению, представляет наибольший интерес.

Не претендуя на полное объяснение картины начальных стадий кислотного гемолиза, необходимо тем не менее рассмотреть процессы, происходящие при помещении клеток в кислые растворы.

Одним из возможных проявлений влияния кислой среды является образование дефектов в структуре липидного бислоя мембран, что в условиях исходного неравновесного распределения ионов между клеткой

и средой, а также наличия большого количества осмотически активного гемоглобина должно привести к быстрому проникновению воды в клетку—набуханию. Дальнейшее развитие дефектов в более крупные поры приводит к лизису клеток.

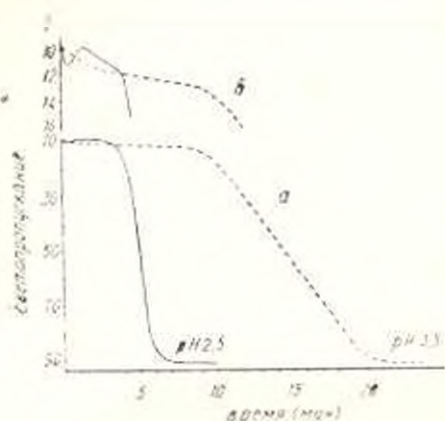


Рис. 1.

Рис. 1 а) Изменение светопропускания суспензии эритроцитов в среде с рН 2,5 и 3,5. б) Светопропускание начальной стадии кислотного гемолиза для рН 2,5 и 3,5, зарегистрированное при большей чувствительности самопишущей установки.

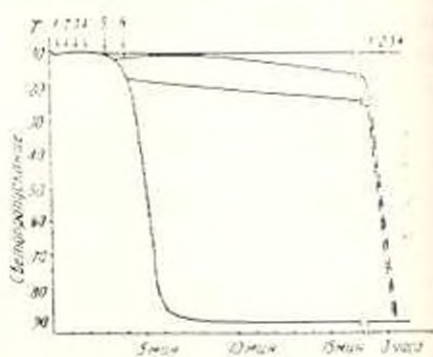


Рис. 2.

Рис. 2. Изменение кинетики кислотного гемолиза при добавлении к суспензии эритроцитов NaOH . На кривой светопропускания для полного гемолиза стрелками указаны моменты добавления NaOH : 1—30 сек, 2—1 мин, 3—1,5 мин, 4—2 мин, 5—3 мин, 6—4 мин.

Не исключается и другая цель событий. Возникновение большого градиента ионов H^+ через мембрану при помещении клеток в кислые растворы приведет к входу H^+ и выходу OH^- из клеток [3]. рН-метрический контроль незабуференного раствора с эритроцитами показал медленное защелачивание среды. В интервале времени, соответствующем начальной стадии гемолиза, рН изменяется от 3,05 до 3,25. Указанные процессы должны повлечь за собой вход хорошо проникающих через эритроцитарную мембрану ионов Cl^- и, соответственно, воды, что приведет к набуханию, а по достижении критического объема—к лизису клеток. Причем, повреждения мембранных структур, вызванные кислой средой, могут снизить порог чувствительности эритроцитов к осмотическим сдвигам.

Другим эффектом кислых растворов является снижение отрицательного поверхностного заряда мембран [4]. Уменьшение электростатического отталкивания эритроцитов должно способствовать их агрегации, наблюдаемой нами в микроскоп. Степень агрегации зависит от величины рН. Она уменьшается с ростом рН от 2 до 3,5. Как агрегация, так и набухание клеток в основном завершаются к 20—30 с. В последующий период вплоть до исчезновения клеток заметных изменений в их популяции не наблюдается, кроме некоторого увеличения уже образованных сфер.

Кривая светопропускания начальной стадии, зарегистрированная при большей чувствительности самопишущей установки, зависит от рН

(рис. 1 б). Область начального роста T соответствует периоду быстрого набухания клеток. Вклад остальных процессов в форму кривой светопропускания (агрегация, изменение формы клеток и др.) в настоящей работе не рассматривается.

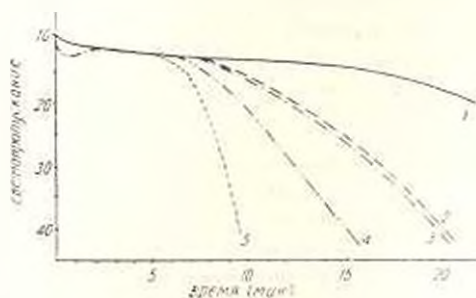
В другой серии экспериментов изучался вопрос о возможности предотвращения кислотного гемолиза с помощью быстрого восстановления pH среды. Для этого в разные промежутки времени в отдельные пробы суспензии эритроцитов в незабуференных растворах с pH 2,5 добавляли малые количества концентрированного раствора NaOH, доводя pH среды до 6,5—7. На рис. 2 приведено изменение T при добавлении NaOH к суспензии эритроцитов с исходным pH 2,5. Видно резкое изменение кинетики гемолиза сразу после добавления щелочи, причем в первые две минуты восстановление pH до нейтральных значений практически останавливает гемолиз. Этот эксперимент свидетельствует об обратимости барьерной функции мембран в первые две минуты действия кислой среды. Эти результаты коррелируют с данными об обратимости формы [5] и электрокинетической подвижности эритроцитов [4] в кислых средах.

Для оценки роли липидного матрикса в процессе кислотного гемолиза нами был использован XII в качестве стабилизирующего агента, известного из экспериментов по осмотическому гемолизу [6, 7] и электромеханической устойчивости липидных бислоев [2].

При pH 2,5 влияние различных долитических концентраций XII проявляется лишь в некотором изменении формы начального участка кривой светопропускания. Кинетика процесса остается постоянной вплоть до концентрации XII = $8 \cdot 10^{-5}$ М. Литическая концентрация XII ($2 \cdot 10^{-4}$ М) заметно ускоряет процесс.

При pH 3,5 картина эффекта XII иная. В зависимости от его концентрации по-разному изменяются как форма начального участка кривой светопропускания, так и кинетика всего процесса (рис. 3). Стаби-

Рис. 3. Изменение кинетики гемолиза эритроцитов, вызванное XII в концентрациях: 1— $3,5 \cdot 10^{-5}$ М; 2—контроль, без XII; 3— $2 \cdot 10^{-5}$ М; 4— $6 \cdot 10^{-5}$ М; 5— $2 \cdot 10^{-4}$ М (литическая концентрация).



лизирующая в случае осмотического гемолиза концентрация $3,5 \cdot 10^{-5}$ М и в данном случае оказывает аналогичное влияние, с той лишь разницей, что не предотвращая гемолиза, резко замедляет его. Близкая по величине концентрация $2 \cdot 10^{-5}$ М не влияет на кинетику процесса, а $6 \cdot 10^{-5}$ М несколько меняют общую картину кислотного гемолиза. Сужение области эффективной концентрации XII в растворах с низким pH может свидетельствовать в пользу нарушения мембранной структуры и соответственно ослабления эффекта местного анестетика, действующего на мембранном уровне.

Все рассмотренные факторы воздействия—кислая среда, восстановление pH до нейтральных значений, влияние ХП—оцениваются с позиций нарушения билипидного слоя мембран эритроцитов. Однако процесс кислотного гемолиза, несомненно, включает в себя и нарушения белкового компонента мембран, цитоскелета, что также может привести к образованию дефектов в структуре мембран. Роль этих факторов в кислотном гемолизе требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гителъзон И. Н., Терская И. А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови, Красноярск, 1959 г.
2. Микаелян Н. Г., Алексюк С. А., Карапетян А. К. Биолог. ж. Армении. 39, 3, 241—243, 1986.
3. Crandall E. D., Kloebe R. A., Forster R. E. J. Gen. Physiol., 57, 6, 664—683, 1971.
4. James A. M. Chem. Soc. Rev., 8, 3, 389—418, 1979.
5. Rand R. P., Burton A. C., Canham P. Nature, 205, 4975, 977—978, 1965.
6. Seeman P. Pharmacol. Rev., 24, 4, 583—655, 1972.
7. Sheetz M. P., Singer S. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 11, 4457—4461, 1974.

Поступило 10.III 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 4, 1988

УДК 612.352.3.647.963

ИЗМЕНЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ «ОСТАТОЧНОЙ» ФРАКЦИИ ХРОМАТИНА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭСТРАДИОЛА

А. Ш. АБРАМЯН, Э. С. ГЕВОРКЯН, П. О. ВАРЛЕВИАН, Г. А. НАНОСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Показано, что «остаточная» фракция белков хроматина, экстрагируемая при обработке 3М NaCl и 5М мочевиной, увеличивается после введения животным эстрадиола. Методом плавления выявлена общая стабилизация структуры этой фракции при гормональной активации генома. Вместе с тем показано небольшое снижение ее термостабильности при относительно низких температурах плавления. Некоторая дестабилизация структуры может быть непосредственно связана с процессами эстрадиоловой депрессии определенных участков генетического аппарата.

Ցույց է տրված, որ բրոմատինի սպիտակուցների «մնացորդային» ֆրակցիան, որ էքստրակցվում է 3 Մ նատրիումի քլորիդի և 5 Մ միզանյութի լուծույթով, բանախափա տնում է կենդանիներին էստրադիոլ ներարկելուց հետո: Փենումի հորմոնայ սկտիվացման ժամանակ հալման մեթոդով նկատվում է «մնացորդային» ֆրակցիայի ընդհանուր կայունացում: Դրա հետ մեկտեղ նախնադրված է նաև ջերմակայունության որոշ իջեցում հալման համեմատաբար ցածր ջերմաստիճաններում: Կառուցվածքի այս որոշ աղակալանացումը կարող է որ անմիջականորեն կապված լինել գենետիկական ապարատի որոշակի հատվածների էստրադիոլային ղեկավարման հետ:

It has been shown that "residual" fraction of protein of chromatin, extracted during the treatment with 3M NaCl and 5M urea increases in the quantity after the administration of estradiol to animals. By the melting-

Сокращения: ПСНБ—лабильно связанные нистоновые белки, ПСНБ—прочны связанные нистоновые белки, ОСНБ—«остаточные» нистоновые белки.