



УДК 577.352.4

© 1993 г.

## ИССЛЕДОВАНИЕ НАРУШЕНИЙ БАРЬЕРНЫХ ФУНКЦИЙ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ НЕПРЕРЫВНОМ НАГРЕВЕ

Иванов И.Т.

*Кафедра физики и биофизика, Медицинский институт, Стара Загора, Болгария*

Несколькими методами исследована зависимость нарушений барьерных функций мембран эритроцитов человека, ряда млекопитающих и птиц в области повышенных температур. Найдены два температурных диапазона таких нарушений. В первом диапазоне (47–55°C) резко нарастала проводимость клеточных мембран, а во втором (57–66°C) – резко возрастала проницаемость мембран для ионов, а затем и более крупных молекул, которая оказалась чувствительна к присутствию спиртов и не зависела от термической стабилизации анионного канала. Представленные результаты описывают независимые, термоиндуцированные мембранные процессы, связанные с необратимыми изменениями мембранных белков.

В температурном интервале 50–70°C наступает термическая денатурация большинства известных белков эритроцитов [1], сопровождающаяся нарушением барьерных свойств их мембран и сильным нарастанием проницаемости мембран для неорганических ионов, флуоресцентных зондов и неэлектролитов [2, 3]. Подобные же явления зарегистрированы и в мембранах замкнутых телей эритроцитов. Изучение таких нарушений затрудняется сопутствующим термогемоллизом [4, 5] и частичной фрагментацией мембран около 50°C [6]. В указанном температурном интервале зарегистрировано несколько фазовых переходов, в которых участвуют главные фракции мембранных белков [7]. Связь этих процессов с барьерными нарушениями при высоких температурах не установлена. С другой стороны, роль внутриклеточного содержимого в иницировании высокотемпературных нарушений барьерных функций нередко предполагается, но не является установленной.

Цель настоящей работы – исследование влияния температуры на нарушение барьерных функций мембран эритроцитов и их телей с использованием методов, чувствительных к быстрым изменениям проводимости и проницаемости мембран.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: адамантан, трипсин, сапонин, глутаровый альдегид, OsO<sub>4</sub> и DIDS (4,4'-диизотиоцианато-2,2'-стильбендисульфоновая кислота) ("Sigma", США), бычий сывороточный альбумин ("Reanal", Венгрия), соли, дисахариды и спирты максимально доступной степени чистоты.

Эритроциты выделяли из свежей крови человека или других объектов, стабилизированной цитратом натрия, и промывали 3 раза физиологическим раствором (pH 7,4). Эритроциты имели сферическую форму (сферозхиноциты), поскольку промывание проводили в большом избытке физиологического раствора [8]. Клетки восстанавливали форму дискоцитов, если конечная среда суспендирования содержала 0,2% альбумина.

Тени получали гипотоническим лизисом в среде, содержащей 3 мМ MgCl<sub>2</sub> и 5 мМ

фосфатного буфера (рН 6,7) при температуре 2°C [9]. В зависимости от объемной концентрации клеток в лизирующем буфере получали тени с разным содержанием гемоглобина, которые будем называть "розовые тени" (соотношение объемов клеток и буферного раствора 1:10) и "белые тени" (соотношение 1:60). Тоничность среды восстанавливали концентрированным раствором NaCl + сахара, который добавляли через 5 мин после лизиса клеток. Залечивание теней проводили при 37°C в течение 20 мин. Замкнутые тени промывали тем же раствором и отделяли центрифугированием при 15000 g (20 мин, 4°C). Перед использованием клетки и тени хранили при 4°C.

В процессе подогрева клеточной суспензии контролировали уровень гемолиза, утечку K<sup>+</sup> и степень везикуляции мембран. При определенных температурах из суспензии брали аликвоты по 1 мл, охлаждали до 10°C и центрифугировали при 2000 g (3 мин) для отделения целых клеток и их фрагментов. Супернатант дополнительно центрифугировали 15 мин при 15000 g с целью осадить тени и везикулы [10]. Этот супернатант в дальнейшем использовали для измерения уровня гемолиза и утечки K<sup>+</sup>. Содержание гемоглобина измеряли спектрофотометрически при 415 нм. Содержание ионов калия определяли с помощью ион-селективного электрода в анализаторе KNa-2 ("Radiometer", Дания). Результаты представлены в процентах общего содержания гемоглобина или калия, определяемого после полного лизиса клеток в результате добавления к исходной суспензии 0,5% сапонина.

Фиксирование клеток и теней глутаровым альдегидом или тетраоксидом осмия осуществляли инкубацией при 20°C (30 мин) в физиологическом растворе (рН 7,4), содержащем фиксирующий агент в указанной ниже концентрации. Фиксированные клетки и тени перед использованием промывали два раза в физиологическом растворе.

Термическую стабилизацию анионного переносчика мембран эритроцитов проводили с помощью ковалентного ингибитора DIDS по методике [11]. Клетки инкубировали при 37°C (30 мин) в среде, содержащей 125 mM NaCl, 20 mM фосфатный буфер (рН 7,4) и 30 мкМ DIDS. Перед использованием клетки промывали в физиологическом растворе. Как правило, клетки (тени) суспендировали в изотонической среде (NaCl + сахара), создавая желаемый градиент NaCl на мембранах.

Регистрацию нарушений берьерных функций мембран клеток и теней в ходе равномерного нагрева суспензии проводили двумя методами. Первый метод состоит в непрерывной регистрации производной по времени проводимости суспензии (производной термограммы проводимости суспензии). Метод чувствителен к изменениям клеточной (мембранной) проводимости, изменению клеточного объема, а также проводимости среды суспендирования. Дифференцирование термограммы по времени также позволяет учесть зависимость суспензионной проводимости от температуры (метод подробно описан в "Приложении").

Второй метод состоял в периодическом измерении среднего объема клеток (теней). При определенных температурах из подогреваемой суспензии брали аликвоты по 1 мл, быстро охлаждали до 10°C, добавляли 0,1 мл среды суспендирования, содержащей 1% глутарового альдегида. Фиксирование клеток или теней проводили при 10°C (10 мин) [12] и после этого микрогематокритными капиллярами определяли текущую величину гематокрита суспензии, которая пропорциональна текущему среднему объему клеток (теней). Гематокрит (средний объем клеток) выражали в процентах от его начальной величины. Утечка K<sup>+</sup> и уровень гемолиза при этом контролировались процедурой, описанной выше.

Уровень спонтанного гемолиза эритроцитов и их замкнутых теней определяли как отношение длин верхней (светлой) части осадка к общей длине осадка в микрогематокритном капилляре.

Около 2,3% общей площади мембран эритроцитов человека, инкубированных при 52°C, подвергается везикуляции в течение 1 ч [10]. В нашем случае везикуляцию значительно уменьшали мягкой обработкой клеток трипсином и инкубированием в среде с низкой ионной силой, содержащей 0,01% альбумина [6]. Согласно [10] ада-

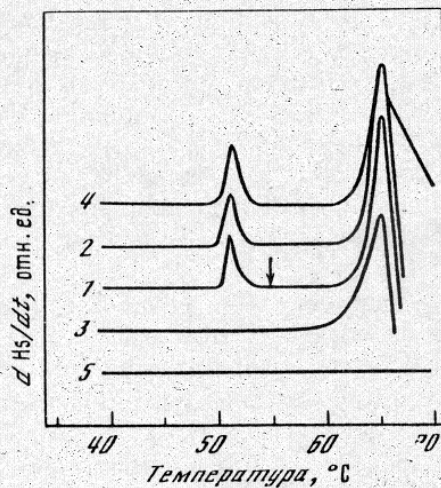


Рис. 1

Рис. 1. Термограммы производной проводимости эритроцитов человека и их теней, суспендированных в изотонической среде (40 мМ NaCl + сахароза). 1 – интактные эритроциты; 2 – белые тени, содержащие 150 мосМ NaCl и 150 мосМ сахарозы; 3 – эритроциты или розовые тени, предварительно нагретые до 55°C; 4 – эритроциты или розовые тени, фиксированные 2 мМ OsO<sub>4</sub>; 5 – белые тени, фиксированные 1 мМ глутаральдегида. Здесь и на следующих рисунках гематокрит суспензии и скорость нагрева равны 0,08 и 2,2°C/мин соответственно

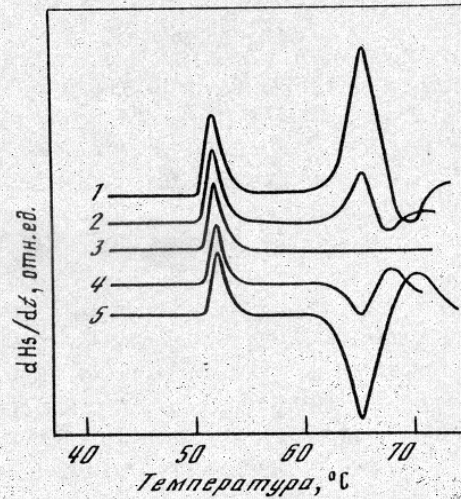


Рис. 2

Рис. 2. Термограммы производной проводимости белых теней, суспендированных в изотонической среде NaCl + сахароза. Тени содержали 150 мосМ NaCl и 150 мосМ сахарозы, их концентрации в среде составляли соответственно, мосМ: 1 – 80 и 220; 2 – 120 и 180; 3 – 150 и 150; 4 – 180 и 120; 5 – 220 и 80

мантан полностью элиминирует везикуляцию и фрагментацию эритроцитов при 50°C. С этой целью встраивание адамантана в мембраны эритроцитов, а также измерение степени везикуляции проводили по [10]. Форму клеток и наличие фрагментации регистрировали в световом микроскопе.

Концентрацию используемых спиртов в мембране эритроцитов ( $C_m$ ) вычисляли по формуле:  $C_m = K C_o$ , где  $C_o$  – концентрация спирта в среде суспендирования и  $K$  – коэффициент распределения. Значения  $K$  для отдельных спиртов взяты из работы [13].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На термограммах производной проводимости суспензии эритроцитов человека в изотонической среде (NaCl + сахароза) и их белых теней (рис. 1, кривые 1 и 2) зарегистрированы два пика, расположенные при 51,5 и 65°C. (скорость нагрева 2,2°C/мин), при уменьшении скорости нагрева с 2,5 до 1,0°C/мин положения максимумов обоих пиков линейно перемещались (данные не приводятся). С помощью экстраполяции установлено, что при скорости нагрева 0,5°C/мин эти пики расположены при 49 и 61°C соответственно. Характер процессов, вызывающих появление таких изменений был исследован более подробно.

Известно, что при нагревании эритроцитов человека около 50°C наступает резкая сферуляция клеток [14], а также частичная фрагментация и микровезикуляция клеточных мембран [6, 10]. Эти процессы объясняются термической денатурацией спектрина [7, 6, 14]. Чтобы снизить вклад сопутствующих процессов в изменение проводимости, исследовали суспензию сфероцитов со встроенным в мембраны адамантаном, который полностью устраняет упомянутые выше процессы. Однако вид зарегистрированной в этом случае термограммы, расположение и площадь пиков полностью совпадали с кривой 1 на рис. 1. Тот же результат получался и в условиях, снижающих

Таблица 1

Связь между уровнем гемолиза, утечкой  $K^+$  и изменениями объема эритроцитов человека, суспендированных в изотонической среде (40 мМ NaCl + сахараза), в ходе равномерного нагрева

$T, ^\circ C$	Средний объем клеток, % к начальному	Уровень гемолиза, %	Утечка $K^+$
45	$100 \pm 5^*$	0,1	$1,0 \pm 0,2$
55	$100 \pm 5^*$	$0,5 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,3$
61	$90 \pm 5$	$0,9 \pm 0,2$	$7,8 \pm 1,5$
64	$80 \pm 5$	$1,6 \pm 0,3$	$75 \pm 5$
66	$110 \pm 5$	$10,1 \pm 0,5$	99
69	—	100	100

\*Среднее по пяти измерениям.

Таблица 2

Средний объем розовых и белых теней (в % к начальному), суспендированных в изотонической среде (NaCl + сахараза), в ходе равномерного нагрева. Тени содержали 150 мосМ NaCl и 150 мосМ сахаразы

Концентрация NaCl в среде суспендирования, мосМ	$T, ^\circ C$				
	45	55	61	64	67
80	$100 \pm 5^*$	$100 \pm 5^*$	$90 \pm 5$	$80 \pm 5$	$110 \pm 5$
120	$100 \pm 5^*$	$100 \pm 5^*$	$95 \pm 5$	$90 \pm 5$	$110 \pm 5$
180	$100 \pm 5^*$	$100 \pm 5^*$	$105 \pm 5$	$110 \pm 5$	$90 \pm 5$
220	$100 \pm 5^*$	$100 \pm 5^*$	$110 \pm 5$	$125 \pm 5$	$80 \pm 5$

\*Среднее по пяти измерениям.

уровень фрагментации и везикуляции (данные не приводятся). Наблюдения под микроскопом показали, что эритроциты, зафиксированные в форме дискоцита с помощью 2 мМ тетраоксида осмия, не изменяли свою форму вплоть до  $60^\circ C$ . Однако термограмма этих эритроцитов (кривая 4, рис. 1), как и в контроле, имеет пик при  $51,5^\circ C$ . Таким образом, зарегистрированное при  $51,5^\circ$  изменение проводимости не является следствием сферуляции клеток или фрагментации их мембран.

Можно предполагать, что зарегистрированные на термограмме проводимости пики демонстрируют появление изотермических нарушений барьерных свойств мембран клеток и их теней. На кривых, приведенных на рис. 2, видна корреляция между этими нарушениями и величиной градиента NaCl через мембраны белых замкнутых теней. Независимо от градиента NaCl проводимость суспензии возрастала около  $51,5^\circ C$ , что отражает нарастание проводимости мембран. Подобный результат получен и для эритроцитов человека (данные не приводятся). Согласно оценкам, проводимость мембран эритроцитов человека при этой температуре увеличивается примерно в 2 раза [16, 17]. Как видно из рис. 2, изменение проводимости всей суспензии при  $65^\circ C$  существенно больше по величине и коррелирует с градиентом NaCl. Это указывает на значительное нарушение барьерных функций мембран, сопровождающегося заметным переносом ионов через мембраны теней в ходе измерения.

Прямые измерения объема клеток (табл. 1) и теней (табл. 2) показывают, что около  $65^\circ C$  происходит изменение объема клеток и теней, коррелирующее с градиентом NaCl, что можно объяснить диффузией ионов через мембраны. Изменения объема клеток происходят в интервале порядка нескольких градусов около  $65^\circ C$ . Ниже  $65^\circ C$  изменение объема клеток и теней коррелирует с величиной градиента

NaCl на мембране, что указывает на возможное уменьшение этого градиента. Результат не изменяется после эквимольной замены NaCl другими солями (KSCN, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KClO<sub>4</sub> и MgCl<sub>2</sub>) по обе стороны мембран теней. Выше 65°C изменение объема коррелировало с градиентом сахарозы. Аналогичный результат получается и после эквимольной замены сахарозы другими дисахаридами или полиатомными спиртами (мальтоза, лактоза, маннитол и сорбитол), что указывает на возможное уменьшение градиента сахарозы в этом интервале температур.

В табл. 1 приведены уровень гемолиза и утечка K<sup>+</sup> при нагреве эритроцитов человека, суспендированных в изотонической среде (40 mM NaCl + сахароза) для термограмм, показанных на рис. 1. Как видно из этих данных, по достижении температурного интервала 62–65°C клетки сжимаются, интенсивно теряя K<sup>+</sup>, но уровень гемолиза остается все еще очень низким. Этот результат подтверждает выводы о характере барьерных нарушений мембран при 51,5 и 65°C, высказанных выше. В случае, когда клетки были суспендированы в физиологическом растворе (ионный градиент направлен внутрь), по достижении интервала 62–65°C клетки начинали набухать и спонтанно лизировать. В литературе описан процесс порогового термогемолиза эритроцитов человека, суспендированных в физиологическом растворе по достижении 62°C, в связи с чем эту температуру назвали температурой порогового термогемолиза [18]. Однако механизм этого процесса остался невыясненным. Полученные нами результаты подтверждают существование процесса порогового термогемолиза, вызывающего, по-видимому, коллоидно-осмотический лизис клеток, и объясняют его нарушением барьерных функций мембран около 65°C.

Представленные результаты показывают, что около 65°C начинается процесс последовательной диссипации существующих градиентов осмотически активных частиц через мембраны клеток, розовых и белых теней. Интенсивные потоки частиц сквозь мембраны можно объяснить предположением, что в этом температурном интервале в мембранах возникает значительное число сквозных пор с увеличивающимся во времени диаметром. В этом смысле интервал 62–65°C можно назвать температурным интервалом порообразования. Замена внутриклеточного содержимого эритроцитов на изотонический раствор (NaCl + сахароза) никак не влияла на появление двух температурных диапазонов нарушений барьерных функций. Поэтому можно утверждать, что указанные нарушения связаны с мембранами и демонстрируют их структурные изменения. Возникает вопрос, не связаны ли оба процесса между собой, поскольку они не зависят от внутриклеточного содержимого? На рис. 1 кривая 2 является повторной термограммой клеток, предварительно нагретых до 55°C (конечная температура первого прогрева клеток указана стрелкой на кривой 1, рис. 1). После первого нагрева клетки охлаждали, отделяли от среды центрифугированием и выдерживали при 20°C от 10 мин до 2 ч. Отсутствие пика при 51,5°C на повторной термограмме (кривая 3, рис. 1) демонстрирует необратимость структурного изменения мембран, вызывающего это барьерное нарушение и, вероятно, связанную с конформационными изменениями мембранных белков. С другой стороны, наличие второго пика при 65°C в этих условиях показывает, что мембранный процесс при 51,5°C является по меньшей мере необходимым, но не достаточным условием для появления второго процесса при 65°C.

Дополнительную информацию о возможной связи между двумя мембранными процессами можно получить в опытах, когда этанол присутствует в среде суспендирования во время нагревания. Оба диапазона барьерных нарушений сдвигаются в область более низких температур с различной скоростью по мере увеличения концентрации этанола (рис. 3). Чувствительность второго нарушения к этанолу, выраженная в градусах понижения температуры на 1% спирта, была в 3,5 раза выше, чем чувствительность первого. Этанол уменьшал площадь первого пика, но не затрагивал площадь и форму второго. Эти результаты указывают на возможную структурную независимость обоих процессов. Другие алифатические спирты (метанол, изопропанол и бутанол) также линейно понижали температуру второго пика. При одинаковой

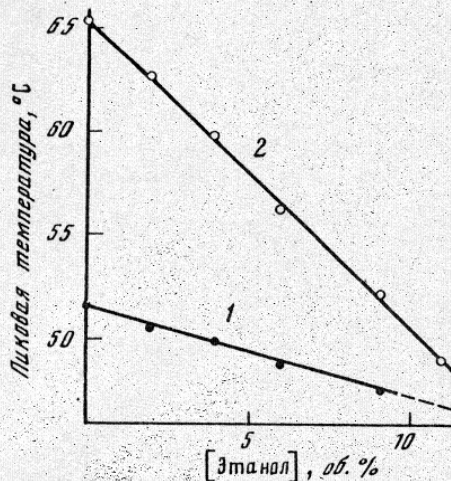


Рис. 3

Рис. 3. Влияние этанола на изотермические барьерные нарушения мембран эритроцитов человека и их белых телей. 1 – температура пика нарастания проводимости мембран, 2 – температура пика нарастания ионной проницаемости мембран

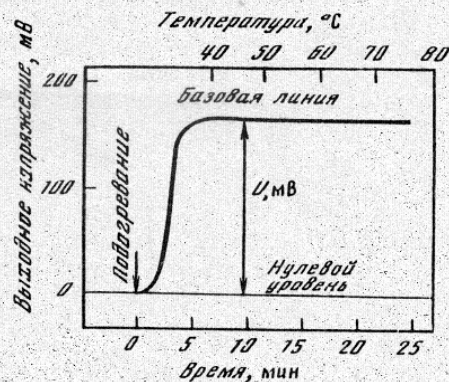


Рис. 4

Рис. 4. Выходное напряжение дифференциального усилителя, пропорциональное первой производной по времени от проводимости среды суспендирования, в ходе равномерного нагрева. Среда суспендирования содержала 150 мосМ NaCl и 150 мосМ сахарозы. Начало нагрева отмечено стрелкой. Здесь и на предыдущих рисунках начальное отклонение  $U$  термограмм одинаково

Жольной концентрации в мембране понижение температуры второго пика этими спиртами было примерно одинаково (данные не приводятся). Это показывает, что эффект понижения температуры второго нарушения является функцией концентрации спирта в мембране, что также подтверждает вывод о мембранном характере этого процесса.

Из табл. 3 видно, что описываемые температурные нарушения характерны для мембран эритроцитов всех исследованных объектов, т.е. носят универсальный характер. Площадь первого пика сильно менялась у клеток отдельных видов. Для эритроцитарных мембран некоторых жвачных и индюка площадь первого пика была намного меньше, и только у морской свинки она была в несколько раз выше по сравнению с тем же параметром для эритроцитов человека. Однако у всех исследованных видов площадь и высота второго пика при 65°C были примерно одинаковы (данные не приводятся). Расстояние на температурной оси между обоими нарушениями значительно варьировало для отдельных видов. У эритроцитов курицы и морской свинки оба пика отстояли друг от друга на 5–6°C, тогда как у жвачных это расстояние было в 3 раза больше. Перечисленные выше результаты также подтверждают структурную независимость обоих мембранных нарушений.

Структурные компоненты клеточных мембран подразделяют в общем на две группы – мембранные белки и липиды. Информацию о том, элементы какой из этих групп принимали участие в зарегистрированных структурных нарушениях мембран эритроцитов, получали, проведя предварительную модификацию этих мембран с помощью бифункциональных реагентов, которые в определенных условиях отдельно фиксируют липидную или белковую часть мембран. Обработка мембран эритроцитов человека с помощью OsO<sub>4</sub> в концентрациях от 1 до 3 мМ, при которых образуются межмолекулярные связи преимущественно между липидными молекулами [19], не влияет на местоположение и площадь обоих пиков на термограмме 4 (рис. 1). Однако после фиксации белых телей глутаровым альдегидом наблюдалось полное элиминирование обоих пиков и соответственно обоих мембранных нарушений (кривая 5 на рис. 1). Минимально действующая концентрация этого аминокрепателя составляла

Параметры термоиндуцированных нарушений барьерных функций мембран эритроцитов представителей некоторых биологических видов

Биологический вид	Температура первого нарушения ( $T_1$ )	Относительная площадь пика первого нарушения*	Температура второго нарушения ( $T_2$ )
Человек	51,1 (49)	1,00	65 (61)
Кролик	52,2 (50)	1,30	66 (62)
Овца	53,5 (51)	0,20	70 (66)
Коза	53 (50,5)	0,10	68,5 (64,5)
Корова	54,5 (52)	0,40	69,5 (65,5)
Конь	49,5 (47)	0,90	64,5 (60,5)
Крыса	51 (48,5)	1,20	63 (59)
Свинья	51 (48,5)	1,30	66,5 (62,5)
Морская свинка	54,5 (52)	2,50	61 (58)
Курица	57,5 (55)	0,80	63 (60)
Индюк	—	< 0,05	65 (61)

*Примечание.* Для каждого вида исследовано не менее трех экземпляров.

\*По сравнению с соответствующим параметром для эритроцитов человека, который принят за единицу.

1 мМ. При этом кроме спектриновых молекул начинают сшиваться и интегральные белки мембраны [20]. Результаты показывают, что зарегистрированные барьерные нарушения в основном связаны с определенными фракциями мембранных белков. Ввиду большой чувствительности к этанолу (рис. 3) и тетраоксиду осмия (рис. 1, кривая 4) нельзя исключить и участия некоторых фракций мембранных липидов в процессе нарушения целостности мембран при 65°C.

Нарушение барьерных функций при 65°C демонстрировало особенности, характерные для калориметрического мембранного перехода при 67°C [21] – чувствительность к этанолу, участие мембранных белков и, вероятно, липидов. В связи с этим участие в нем денатурации анионного канала было проверено предварительной термической стабилизацией этого белка. Как известно, ингибирование анионного канала при помощи DIDS скачком смещает температуру перехода от 67 до 80°C [11]. Однако в нашем случае модификация мембран DIDS не повлияла на температуру барьерного нарушения при 65°C (данные не показаны), что ставит под сомнение участие анионного переносчика в этом процессе. С другой стороны, для мембран эритроцитов человека барьерное нарушение при 51,5°C совпадает по температуре с денатурацией спектринина [7]. Тем не менее прямую связь между этими двумя событиями нельзя считать очевидной, поскольку большие разбросы в значениях площади и температуры максимума первого пика ( $T_1$ ) у различных объектов (табл. 3) противоречат установленному постоянству количественного и качественного состава спектринина у большинства исследованных нами видов [24, 25].

В настоящей работе показано, что нарушения барьерных функций эритроцитарных мембран при высоких температурах наступают в виде двух термоиндуцированных мембранных процессов, которые не зависят от состава внутриклеточного содержимого и, вероятно, не связаны между собой. Первое нарушение проявляется как повышение проводимости мембран, в то время как второе представляет собой гигантское нарастание проницаемости мембран для ионов, а впоследствии и для больших частиц. Можно ожидать, что эти нарушения играют важную роль в обеспечении термоустойчивости мембран эритроцитов, что является сейчас предметом интенсивных исследований.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Кондуктометрические измерения проводили в стеклянной кювете, помещенной в водяную баню термостата. Константа кондуктометрической кюветы имела значение  $5,1 \text{ см}^{-1}$ , и при частоте измерения 1 кГц межэлектродная емкость серьезно не влияла на величину импеданса кюветы. С другой стороны, частота измерения была достаточно низка, чтобы клеточная проводимость суспендированных эритроцитов определялась главным образом активной проводимостью их мембран [15]. Проводимость суспензии ( $H_s$ ) измеряли при непрерывном перемешивании на частоте 1 кГц. Выходное напряжение кондуктометра ( $U_k$ ) подавали на вход дифференциального усилителя через низкочастотный фильтр, удаляющий сигналы с частотой ниже 1 Гц, порождаемые крупными неоднородными включениями в движущейся суспензии [22]. Далее сигнал кондуктометра дифференцировался по времени усилителем, выходное напряжение которого выводилось на самописец.

При неизменной температуре в термостате  $H_s$  является постоянной величиной. При этом регистрировали нулевой уровень выходного напряжения усилителя  $U_{\text{вых}}$  (рис. 4). В режиме равномерного нагрева появляется постоянное отклонение от нулевого уровня  $U$ . Эта величина, как показывает нижеследующий анализ, в определенных условиях предоставляет информацию о нарушениях барьерных функций мембран суспендированных клеток и их теней. В узком интервале температур ( $\Delta t$ ) зависимость  $H_s$  выражается следующим образом:

$$H_s = H_{s0}(1 + K_s \Delta t), \quad (1)$$

где  $H_{s0}$  – проводимость суспензии в начале нагрева,  $K_s$  – температурный коэффициент  $H_s$  ( $1/^\circ\text{C}$ ). Выходное напряжение кондуктометра пропорционально  $H_s$ :

$$U_k = bH_s. \quad (2)$$

Функциональная связь между входным и выходным напряжением дифференциального усилителя [23] в этом случае выражается следующим образом:

$$U_{\text{вых}} = \frac{1}{RC} \cdot \frac{dU_k}{d\theta}, \quad (3)$$

где  $1/RC$  – коэффициент усиления ( $\text{мин}^{-1}$ ) и  $\theta$  – время (мин). Подставляя (1) и (2) в (3), получаем:

$$U = U_{k0} \frac{1}{RC} K_s V_\theta, \quad (4)$$

в котором  $U_{k0}$  – выходное напряжение кондуктометра в начале нагрева и  $V_\theta = dt/d\theta$  – скорость нагрева ( $^\circ\text{C}/\text{мин}$ ). Правильность конечного выражения проверена экспериментально.

В ходе нагрева параметры  $U_{k0}$ ,  $1/RC$  и  $V_\theta$  остаются неизменными, а  $K_s$  меняется в зависимости от состояния клеточных мембран (при отсутствии значительной фрагментации и агрегации клеток). Согласно уравнению Фрике [16, 17],  $K_s$  является функцией трех аргументов: собственная проводимость клеток, средний объем клеток и проводимость среды суспендирования. В наших условиях изменения последних двух аргументов взаимосвязаны. Если существующие на мембранах градиенты ионов и других осмотически активных частиц начнут диссипировать, оба аргумента также начнут изменяться таким образом, что их влияние на  $H_s$  и  $K_s$  совпадает. Этим объясняется большая чувствительность метода к нарастанию мембранной проницаемости, поскольку изменения объема клеток и проводимости среды, вызванные диффузией сквозь мембраны, влияют одинаково на значения  $H_s$  и  $K_s$ . При изменении низкочастотной проводимости клеток, которая определяется главным образом проводи-

мостью клеточной мембраны [15],  $K_s$  тоже изменится, но серьезных изменений объема клеток не будет.

Метод применяется при следующих условиях.

1. Регистрируется производная термограммы  $H_s$  при разной величине и направленности ионного градиента на мембране. Изменения  $K_s$  при данной температуре указывают на нарушение барьерных свойств клеточных мембран. Если эти изменения коррелируют с ионным градиентом через мембраны, зарегистрированный эффект соответствует нарастанию ионной проницаемости мембран, в противном случае он соответствует изменению клеточной (мембранной) проводимости.

2. Параллельно с кондуктометрическими измерениями независимо контролируется объем клеток и утечка  $K^+$ .

Описанный метод является не очень чувствительным к везикуляции или агрегации клеток, но независимо от этого их нужно контролировать и по возможности устранить.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Privalov P.L. // Pure and Appl. Chem. 1980. V. 52. P. 479–497.
2. Цымбал Л.В., Мусеев В.А. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 2. С. 190–194.
3. Levitt J. The cell and environmental temperature. N.Y.: Pergamon Press, 1977. 269 p.
4. Черницкий Е.А., Ямайкина И.В. // Биофизика. 1988. Т. 33. С. 319–323.
5. Lepock J.R., Frey H.E., Wayne H., Markus J. // Biochim. et biophys. acta. 1989. V. 980. P. 191–201.
6. Coakley W.T., Deeley J.O.T. // Biochim. et biophys. acta 1980. V. 602. P. 355–375.
7. Brandts J.F., Erickson L., Lysko K., Schwartz A.T., Taverna R.D. // Biochemistry 1977. V. 16. № 15. P. 3450–3454.
8. Bessis M. Cytology of the Blood and Blood forming organs. N.Y.: Grune & Stratton, 1956. 251 p.
9. Schwock G., Passow A. // Mol. Cell. Biochem. 1973. V. 2. P. 197–218.
10. Herrmann A., Leutzsch P., Lassmann G., Ladhoff A., Donath E. // Biochim. et biophys. acta 1985. V. 812. P. 277–285.
11. Cabantchik Z.I., Rothstein A. // J. Membrane Biol. 1974. V. 15. P. 207–226.
12. White J.D. // Thromb. Diath. Haemorrh. 1957. V. 18. P. 745–753.
13. Seeman Ph. // Pharmacol. Rev. 1972. V. 24. P. 583–655.
14. Rakow A.L., Hochmuth R.M. // Biophys. J. 1975. V. 15. P. 1095–1100.
15. Bothwell T.P., Schwan H.P. // Nature. 1956. V. 178. P. 265–266.
16. Ivanov I.T., Lyutskanov V.G. // Mol. Cryst. and Liquid Cryst. 1987. V. 152. P. 327–332.
17. Ivanov I.T., Lyutskanov V.G. // Rep. Bulg. Acad. Sci. 1988. V. 41. P. 131–134.
18. Coakley W.T., Bater A.I., Crum L.A., Deeley I.O. // J. Thermal Biol. 1979. V. 4. P. 85–95.
19. Carstensen E.L., Coopersmith A., Ingram M., Child S.Z. // J. Cell. Biol. 1969. V. 42. P. 565–570.
20. Heusinkveld R.S., Goldstein D.A., Weed R.J., Lacell P.L. // Blood Cell. V. 3. P. 175–182.
21. Davio St.R., Low Ph.S. // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 3585–3493.
22. Иванов И.Т., Танева В.Т. // Биофизика. 1991. Т. 36. С. 858–862.
23. Херни М. Аналоговые интегральные схемы: Пер. с англ. М.: Радио и связь. 1983. С. 339.
24. Акоев В.Р., Бобровский Р.В., Жадан Г.Г., Салия Ц.Х., Багелева Я., Шныров В.Л. // Биол. мембраны. 1991. Т. 8. С. 78–84.
25. Tillack T.W., Marchesi S.L., Marshesi V.T., Steers E. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 200. P. 125–131.

Поступила в редакцию  
17.VI.1992

**INVESTIGATION OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANE BARRIER  
DISTURBANCES DURING TRANSIENT HEATING**

**Ivanov I.T.**

*Department of Physics and Biophysics, Medical Institute of Stara Zagora,  
Stara Zagora, Bulgaria*

The temperature dependence of the barrier disturbances of human, mammalian and bird erythrocyte membranes has been investigated at high temperatures using several methods. These barrier disturbances were found to be centered around two well separated temperatures different for most species. The first membrane barrier disturbance taking place at 49°C – 56°C was registered as a sharp rise in membrane conductivity with very different amplitude for different species. The second disturbance was centered at 57°C – 66°C during which the membrane permeability dramatically increased first for ions and then for larger particles. The second disturbance was strongly sensitive to ethanol but it was not shifted by thermal stabilization of the anion channel. The results reveal both these barrier disturbances as cytosole-independent, thermo-induced membrane processes in which irreversible membrane protein changes are implicated.