

**ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ - МЕДИЦИНСКИ  
ФАКУЛТЕТ – СТАРА ЗАГОРА**

**КАТЕДРА ФИЗИКА, БИОФИЗИКА, РЕНТГЕНОЛОГИЯ  
И РАДИОЛОГИЯ**



**Иван Танев Иванов**

**РОЛЯ НА КЛЕТЪЧНАТА МЕМБРАНА  
В ТОПЛИННАТА ХЕМОЛИЗА  
НА ЕРИТРОЦИТИ ОТ БОЗАЙНИЦИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на Дисертационен труд за присъждане  
на научната степен "Доктор на биологичните науки"**

**СТАРА ЗАГОРА  
2012**

**- 1 -**

Дисертационният труд е написан на 440 страници и съдържа 523 литературни източника, от които 51 на кирилица и 472 на латиница. Резултатите са представени в 56 графики и 11 таблици.

Дисертационният труд е разработен в Катедрата по физика, биофизика, рентгенология и радиология, Медицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора. Някои от експерименталните изследвания са направени в Клиничната лаборатория на Университетската болница на ТУ- Стара Загора, в Института по биофизика към БАН – София и в Max-Planck Institute of Colloids and Interfaces, Подсдам, Германия. Необходимата за експериментите кръв от човек е вземана главно от Клиничната лаборатория на Университетската болница на ТУ, а кръвта от животни е получавана главно от фермите на Ветеринарния факултет на ТУ – Стара Загора.

Дисертационният труд е обсъден на 4 април 2012 г. от Разширен катедрен съвет на Катедрата по физика, биофизика, рентгенология и радиология, Медицински факултет, ТУ - Стара Загора и насочена за защита пред Специализирано научно жури.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на..... от ..... часа в Академичната зала на Медицински факултет на ТУ – Стара Загора, ул. Армейска, № 11, Стара Загора. Материалите във връзка със защитата са на разположение в библиотеката на факултета, както и в Катедрата по физика, биофизика, рентгенология и радиология, Медицински факултет, ТУ - Стара Загора.

## СЪДЪРЖАНИЕ

Abstract (Summary) .....	1
I. Състояние и медикобиологични аспекти на проблема .....	9
II. Основни резултати, докладвани в докторската дисертация (1994 г.).....	13
III. Цел и задачи на дисертационния труд .....	16
IV. Материали и методи .....	17
V. Резултати и обсъждане .....	20
V.1. Промяна на пасивните електрични параметри на ЕМ при 49.5°C .....	20
V. 2. Топлинна хемолизата на еритроцити от бозайници .....	24
V. 3. Влияние на сфингомиелина върху топлинната мишена, отговорна за термохемолизата при еритроцити от бозайници .....	28
V. 4. Кинетичен модел, описващ разрушаването на мишената на топлината .....	30
V.5. Електрофоретично изследване на топлинната мишена (термичния преход в ЕМ) отговорна за термохемолизата .....	31
V.6. Спектрофлуорометрично и ЕПР-изследване на топлинната мишена (термичния преход в ЕМ) отговорна за термохемолизата .....	35
V.7. Микрокалориметрично изследване на топлинната мишена (термичния преход в ЕМ) отговорна за термохемолизата .....	38
V.8. Пряко доказателство, че анионният обменник участва в (термичния преход в ЕМ) отговорна за термохемолизата .....	41
V.9. Биологично значение на свързания с термохемолизата мембранен преход – мишена на топлината .....	45
V.9.1. Биофизични основи на връзката «терморезистентност – продължителност на живот» при еритроцити от бозайници .....	46
V.9.2. Използване на метода на термичен анализ на импеданса на еритроцитна суспензия за установяване на хемолитична анемия тип мембранопатия .....	50
V.9.3. Използване на метода на термичния анализ на импеданса на еритроцитна суспензия за сравняване на действието на органични разтворители върху мембранните белтъци .....	52
V.9.4. Други приложения с потенциално биологично значение .....	53
VI. Заключение и изводи .....	54
VII. Справка за научните приноси .....	54
VIII. Списък на собствените публикации, цитирани в докторската дисертация (1994 г.) .....	56
IX. Списък на собствените публикации, включени в настоящия труд .....	57
X. Справка за цитиранията на трудовете .....	58

## СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ:

*EM* – еритроцитна мембрана;  
*Еритроцити, щадящо пермеабилizирани чрез топлина* – еритроцити, необратимо пермеабилizирани за малки йони ( $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$ ) чрез инкубация в изотонична среда, съдържаща 60 mM NaCl, захароза и 18 % (об.) етанол, за 3 min при температура  $T_{90}$ , която при тази концентрация на етанола е 39.5°C.  
*Термохемолiza* – топлинна хемолiza, хемолiza в интервала 45-57°C;  
*Diamide* – diazene dicarboxylic acid bis dimethylamide;  
*DIDS* - 4,4'-diisothiocyano stilbene-2,2'-disulfonic acid;  
*DSC* – диференциална сканираща калориметрия;  
*EDTA* – етилендиамин тетраацетат;  
*EGTA* – етиленгликол ди (β-аминоетилов етер) тетраацетат;  
 $E_a$  – активационна енергия;  
*FNPS* - 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrophenylsulfone;  
*N* – брой на експериментите, измерванията, пациентите;  
*P* – големина на базалната йонна проницаемост на EM за малки йони ( $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$ ), накратко – големина на йонната проницаемост; проницаемост  
*g* – коефициент на корелация;  
*SDS* – натриев додецил сулфат;  
*SDS-PAGE* – полиакриламидна гел-електрофореза в присъствие на натриев додецил сулфат;  
 $T_g$  – средна температура на кривата, съответстваща на полуизтичане на цитозолните йони от загрявана суспензия от еритроцити и EM. Съответно  $T_{90}$  е стойността на  $T_g$  при ниска (0.5°C/min) скорост на загряване.  $T_{90}$  съответства на параметъра термостабилност на EM;  
 $t_{1/2}$  – време за 50% хемолiza на еритроцити, инкубирани при постоянна висока температура (54°C).  $t_{1/2}$  съответства на параметъра резистентност на еритроцитите срещу топлинна хемолiza;

**Апробация на дисертацията:** основните положения на дисертационния труд се съдържат в 33 съобщения, от които 23 статии и 10 доклада, публикувани в сборници на конференции. От тях в дисертацията са цитирани 20 статии, от които 2 в български списания и 18 в международни списания с общ импакт фактор 22.3. Броят на цитиранията е 58, от които 57 в международни списания с импакт-фактор и 1 в българско списание.

**Структура на дисертацията:** дисертацията се състои от следните части: Абстракт, Въведение, Обзор на литературата и терминологията по въпроса, Цел и задачи, Описание на материалите и методите за изследване, Резултати и обсъждане, Общо обсъждане и изводи, Списък на научните приноси, Библиография, Списък на собствените публикации по темата и на техните цитирания.

# Role of cell membrane in thermal hemolysis of mammalian erythrocytes

Ivan Tanev Ivanov

## Abstract (Summary)

of a thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree  
Doctor of biological sciences

High temperature is the main physical factor causing damage of tissues, or burns, due to thermal injury and electric shock (Tchervenkov and Shindarski, 1989; Nabours et al., 2000). At cellular level these burns cause necrosis and, in rare cases, apoptosis. On the other hand, hyperthermia is used as a method for healing tumors. However, the primary targets whose destruction by heat leads to cellular death are not well understood.

At temperatures between 45 and 58°C the enucleated erythrocytes of man and mammals undergo thermal hemolysis (from Greek θερμός - warm, θερμή - heat, αίμα - blood and λύσις - lysis, decomposition), that is out leakage of cytosolic content and hemoglobin from the erythrocyte membrane (EM). Thermal hemolysis exhibits all the features peculiar to thermal necrosis of cells. Another type of hemolysis occurs at other non-physiological conditions, the so called eryptosis, which demonstrates the main requisites of apoptosis (Lang et al., 2006). In this regard, thermal hemolysis of human and mammal erythrocytes provides useful cellular model with biological and medical importance.

The aim of this work was to investigate the molecular mechanism of heat-induced hemolysis of erythrocytes from human and mammals. For this purpose, the erythrocytes from 13 mammalian species as well as the resealed EMs isolated from these erythrocytes were compared, which is novelty in this kind of research. In addition to DSC, PAGE of membrane proteins, spectrofluorimetry, EPR-spectroscopy and specific binding of ligands to membrane proteins several methods, specific to this research, were also used. The latter include measuring the temperature,  $T_g$ , for half leakage of cytosolic ions upon heating, determination of the temperature dependence of the passive ion permeability of EM, of the passive electrical parameters of whole erythrocytes and isolated EM, and of the time  $t_{1/2}$  for half hemolysis. Another novelty is the isolation of EMs from erythrocytes, subjected to selective (sparing) permeabilization by heat. Specific details from literature were adopted concerning the structure and composition of EM. EM consists of lipid bilayer with intercalated integral proteins, and undermembrane cytoskeleton of peripheral proteins, mainly spectrin. EM contains three major types of proteins, spectrin (25-30 weight %), glycophorins (about 25 weight %), and the dimers and oligomers of the anion exchanger (about 25 weight %).

Barrier function of the plasma membranes is vital property and the extent of its deterioration under adverse conditions reflects the sensitivity of cells to physical injury. At high temperatures cell membranes undergo permeabilization (Green et al., 1985; Ivanov, 2002b). The average temperature,  $T_g$ , of this permeabilization is frequently used as a measure for the thermal stability of cell membranes. It was found that a slight increase in  $T_g$  (1-2°C) is regularly accompanied by a significant (40-60%) increase in the thermoresistance of some types of cells (Wu and Walner, 1984; Ivanov et al., 1999; Hardin et al., 1999; Sibley et al., 1999), including mammalian erythrocytes (Ivanov, 1993).

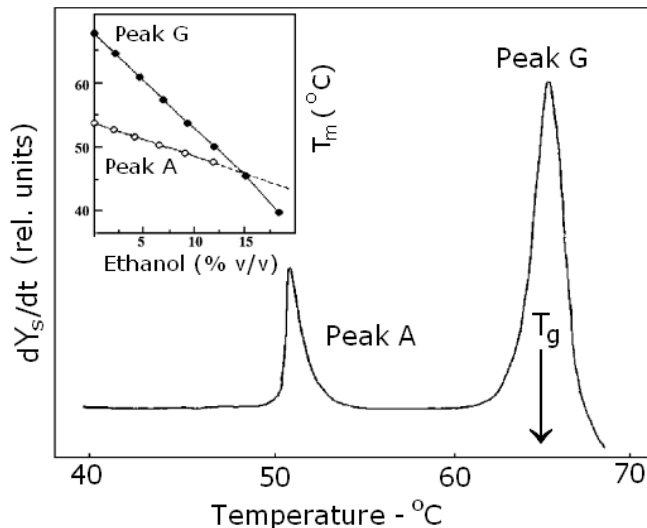
Heat hemolysis is temperature-activated process with activation energy ( $E_a$ ) of  $300 \pm 15$  kJ/mol (Juckett and Rosenberg, 1982; Gershfeld and Murayama, 1988; Chernitskiy and Yamaykina, 1989; Lepock et al., 1989). Of all temperature-activated processes (biological, chemical and physical, excluding the dehydration of ions), similar value of  $E_a$  is displayed only by the thermal denaturation of proteins ( $E_a$  between 300-350 and 800 kJ/mol) and the conformation changes in proteins ( $E_a < 300$  kJ/mol). Based on this value of  $E_a$  it could be precluded that the rate-limiting step of thermal hemolysis includes a conformational transition in a protein or in a group of similar proteins.

Ions flow mainly through the protein-mediated pathways of cell membranes, including EM, and only a small part of this flow is ascribed to the basal (residual, passive) permeability,  $P$ . Despite its small value, basal ion permeability of EM is enhanced at hyperthermia causing hemolysis. According to data obtained with different methods on human erythrocytes (Wilbrandt, 1941; Prinsze et al., 1991; Ivanov and Benov, 1992; Ivanov, 1992), the rise in ion permeability  $P$  precedes thermal hemolysis, which demonstrates colloid-osmotic character in its initial stage. The increase in  $P$ , which underlies the hemolysis, was studied in various temperature intervals: 47-65°C (Wilbrandt, 1941), 46-54°C (Prinsze et al., 1991), 50-58°C (Ivanov, 1992) and 38-57°C (Ivanov, 1999; 2005). In each of these intervals  $P$  is a temperature-activated parameter ( $P = P_o \cdot \exp(-E_a/RT)$ ) with the same  $E_a$  of  $250 \pm 15$  kJ/mol. This indicates a single mechanism for thermal activation of  $P$ , which serves as the prime target of heat in thermal hemolysis over the entire range of 38-60°C. For the high temperature (50-58°C) portion of this interval, the target was identified with the heat-induced, cytosole-independent transition in EM at 61°C ( $T_g$ ). This transition enhances ion permeability eliciting colloid-osmotic lysis at constant temperatures (Ivanov, 1992) and during heating with constant rate (Ivanov and Benov, 1992).

The same mechanism of thermal hemolysis was found in mammalian erythrocytes (Ivanov, 1993, 2005). As for human erythrocytes, the  $E_a$  of activation of  $P$  was again  $250 \pm 15$  kJ/mol. The value of  $T_g$ , however, demonstrated species differences in respect to the sphingomyelin content of EMs. The higher the EM content of sphingomyelin the higher the value of  $T_g$ , as well as the greater was the resistance of erythrocytes against thermal hemolysis.

Electric impedance of a cell suspension contains information about the dielectric polarization and barrier function of the plasma membranes. Derivative

thermogram of a suspension containing erythrocytes or their resealed EM (Fig. 1) shows the rate at which the impedance of the plasma membrane changes during heating. Peaks A and G on the thermogram revealed two independent thermally-induced transition in EM. The top temperatures of both peaks were shifted upwards due to the heating rate. For slower heating rate (0.5°C/min) the peak temperatures tended to the values of 49.5°C and 61°C ( $T_{g0}$ ), respectively.



**Fig. 1. Derivative thermogram of the admittance,  $Y_s$ , of suspension containing human erythrocytes or resealed EMs, isolated from them. EMs contain 150 mM NaCl and are suspended in isotonic medium of 60 mM NaCl and sucrose, pH 7.0. Hematocrit, frequency and heating rate are 0.07, 10 kHz and 2.0°C/min, respectively. Peak A corresponds to the denaturation of spectrin and peak G to the permeability transition in EM at  $T_g$ . Insert shows the dependence of peak temperatures on the concentration of ethanol present in the suspension medium.**

A-peak corresponds to the threshold decrease in electric capacity of EM, associated with the denaturation and dephosphorylation of spectrin (Ivanov, 1997; 1999a), which occurred at 49.5°C (Brandts et al., 1977; Coakley et al., 1980; Mohandas et., 1978). This peak is independent on the transmembrane gradient of ion concentration. The corresponding transition in EM was not

associated with the temperature activation of ion permeability and thermal hemolysis. The G peak depicted the collapse of the gradient of ion concentration due to the permeability transition, induced in EM at 61°C ( $T_g$ ) (Иванов, 1995; Ivanov et al., 2007a). The  $T_g$  permeability transition represented the inactivation (destruction) of the primary target of heat during the temperature activation of ion permeability and thermal hemolysis (Ivanov, 1993, Ivanov et al., 2007a).

Deuterium oxide, D<sub>2</sub>O, and glycerol are universal thermal stabilizers of proteins and protectors of cells against hyperthermia. Hemolysis of erythrocytes, exposed to a temperature of 55°C, is subdued by D<sub>2</sub>O (Wenzel, 1976). In this study the substitution of 90% of water by D<sub>2</sub>O in erythrocyte suspension increased  $T_g$  with  $1.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$  (Ivanov et al., 2011). Similar increase in  $T_g$  (1.0 - 1.5°C), accompanied by a significant increase in the time,  $t_{1/2}$ , for half hemolysis (50-60%) was found in the presence of glycerol (10-20 % v/v) and after incorporation of sphingomyelin in the membranes of erythrocytes (Ivanov, 2002a). These data support the involvement of conformational change in EM protein during the permeability transition at  $T_g$  and thermal hemolysis.

Direct investigation of the  $T_g$  transition in EM, however, is impeded by the foregoing heat denaturation of spectrin, which is not involved in this transition, but induces concomitant changes in the structure and dynamics of EM. This difficulty was circumvented by using the different sensitivity of these transitions to the presence of ethanol, whereat the inducing temperature,  $T_g$ , of the second peak is reduced 3.5 times greater than that of the first one (fig. 1). Thus, in the presence of 18 % (v/v) ethanol the permeability peak is recorded at  $T_g = 39.5^\circ\text{C}$  that is 6°C in front of the spectrin denaturation peak (Ivanov and Benov, 1992; Ivanov, 1996; 2005; Ivanov et al., 1999). Erythrocytes, incubated for 3 min at 39.5°C ( $T_g$ ) in isotonic medium containing 18% ethanol, 50 mM NaCl and sucrose as osmotic protector, became irreversibly permeabilized for NaCl, but retained their diffusion barrier to sucrose. This effect is called irreversible sparing permeabilization of EM by heat, in contrast to the thermal permeabilization of EM at 61°C whereby spectrin is denatured. After the removal of ethanol and hyperthermia the induced permeabilization persisted, which confirms the involvement of a conformational change of protein in it. However, if the incubation was conducted a few °C lower than the  $T_g$  (for example 37°C instead of 39.5°C), the induced permeabilization was transient as the removal of ethanol and the reduction of temperature restored the diffusion barrier to ions (Ivanov, 1996). This result is in line with the data of Prinsze et al., (1991), that the high level of EM ion permeability, induced at hyperthermia, is restored to normal upon the reduction of temperature. This result suggests that the initial stage of the permeability transition in EM at  $T_g$  includes an initially reversible change in membrane protein, followed by the stage of irreversibility.

EMs of sparingly permeabilized erythrocytes were isolated and studied in respect to the EMs of intact erythrocytes and to these of control erythrocytes, processed as explained for the sparingly permeabilized ones, but at a lower temperature (27°C). Microcalorimetric and SDS-PAGE profiles of sparingly

permeabilized EMs were identical to those of intact and control EMs (Ivanov, 1996; Ivanov et al., 1999, 2005). This testifies for the absence of protein denaturation, i.e., for the preservation of the secondary and tertiary structure of membrane proteins during the  $T_g$  transition. This conclusion is consistent with the results of Brandts et al. (1977) and Lysko et al. (1981) evidencing for the lack of strong calorimetric effects, lack of intermolecular S-S aggregation and invariability of optical activity (helical content) of EM in the 55-61°C temperature interval located close to the permeabilization temperature,  $T_g$  (61°C).

At  $T_g$  the method of DSC was able to distinguish changes in the membrane protein, responsible for the anion transport in EM, the anion exchanger. These changes had a milder, pre-denaturational character. For example, the well known ability of DIDS, a highly specific inhibitor of the EM anion exchanger, to increase step-wisely the denaturational temperature of this protein by 13°C (Cabantchik and Rothstein, 1974; Cabantchik and Greger, 1992; Snow et al., 1978; Ivanov et al., 2007b) was preserved in permeabilized EMs (Ivanov et al., 2005). In addition, the denaturational temperature of this protein in both permeabilized EMs and in DIDS-treated permeabilized EMs was reduced by 2.5°C in respect to that in intact and DIDS-treated EM, respectively (Ivanov et al., 1999; 2005).

FNPS is highly lipophilic, bifunctional and membrane impermeable reagent capable to covalently bind and cross-link pairs of amino groups, if they are distanced apart in less than 9 nm. At low concentrations (10-100  $\mu$ M) FNPS was able to bind and cross-link the proteins of sparingly permeabilized EMs, mainly anion exchanger, while it was not able to react with the proteins of intact and control EMs (Ivanov, 1996). The above results indicate that an EM protein, mainly the anion exchanger, sustained a mild, initially reversible and later irreversible, pre-denaturation transition at  $T_g$  causing its association and clusterization.

Fluorescent marker N-(3-pyrene) maleimid binds to the SH-groups of proteins and reports for the association of these proteins. The marker forms excimers when two pyrene groups get closer and superimposed to each other at a distance of 4 to 10 Å. Excimerization of the marker, bound to EMs, increased by 67% after their permeabilization indicating a substantial increase in the clusterization of membrane proteins. The maximum efficiency for energy transfer from the tryptophan residues of membrane proteins to pyrene, located in the proximal lipid milieu of annular lipids decreased from 0.95 for intact EM (Kowalska and Cierniewski, 1983) and 0.92 for control EM to 0.70 for the permeabilized EM (Ivanov et al., 1999). This result again evidenced that the EM transition at  $T_g$  was accompanied by association and clusterization of EM proteins whereat a part of their annular lipids were removed.

Similar results were obtained with continuously heated suspensions of isolated EMs, pretreated by the highly lipophilic maleimid derivatives N-(3-Pyrenyl)maleimid (mentioned above) and 3-maleimido-proxyl (spin-label). Both reagents bind to the SH-groups of EM proteins, primarily spectrin and the anion exchanger (Wyse and Butterfield, 1988; Kłopotcka, 2008; Taylor et al., 2001) as the glycophorin does not contain SH-groups (Lutz et al., 1979). As it might be

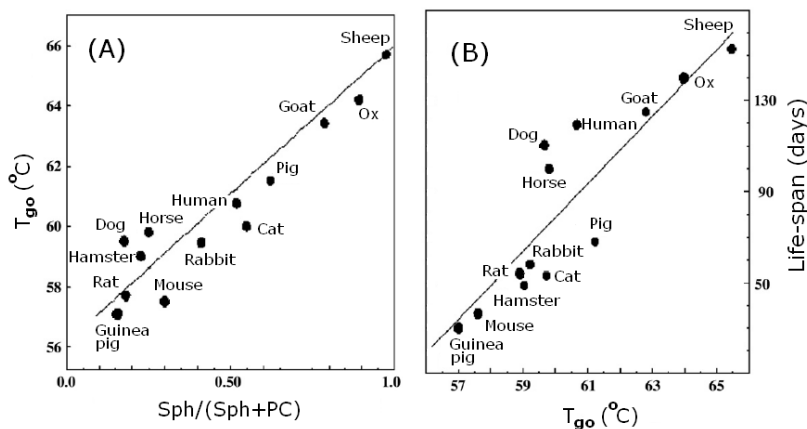
expected, the temperature profile of the N-(3-pyrene) maleimid excimerization detected threshold increase in the molecular dynamics at the denaturation temperatures of spectrin (49.5°C) and anion exchanger (67°C). Surprisingly, excimerization was greatly increased in the intermediate (58-62°C) interval around  $T_g$ . These results suggest subsidence of the molecular dynamics close to the SH-groups of some EM proteins, predominantly those of the anion exchanger.

EPR spectrum of isolated EM, spin-labeled with 3-maleimido-proxyl contains two peaks with amplitudes corresponding to the number of strongly immobilized (S amplitude) and weakly immobilized (W amplitude) spin-labels, covalently bound to the SH-groups of EM proteins, mainly spectrin and the anion exchanger (Berliner, 1983; Jozwiak and Watała, 1993; Szwarocka et al., 1996; Wang et al., 1995). The temperature dependence of the S amplitude and of the W/S ratio just coincided with the above commented temperature profile of the excimerization of fluorescent probe. This result again showed a decrease in the number of strongly immobilized binding sites about the denaturation temperatures of both spectrin and the anion exchanger and an increase in this number (i.e., protein immobilization) at  $T_g$ .

The above mentioned microcalorimetric, electrophoretic, spectrofluorometric and EPR data on the EM permeability transition at  $T_g$  all testified that despite the absence of protein denaturation, this transition involved moderate changes in the structure (clusterization) and dynamics (immobilization) of certain integral proteins, most likely the anion exchanger. Thus, inasmuch as the EM transition at  $T_g$  concerned mainly the dynamics of EM proteins it can be viewed as a dynamic, or a second order transition. This type of transition (mechanism) could explain the activation of basal ion permeability and hemolysis at high temperatures. This mechanism is consistent with the data of other authors that shifting up the temperature from 25°C results in increased oligomerization of the dimer of the EM anion exchanger (Tsuji et al., 1988). The oligomerization of the anion exchanger is a temperature-dependent reversible process up to the studied temperatures (45°C). According to the results presented it can be tentatively presumed that up to some temperature limit ( $T_g?$ ), well distanced from the denaturation temperature (67°C), the oligomerization becomes irreversible.

The above presented mechanism for thermal activation of ion permeability and hemolysis is consistent with our findings and with the data of other authors that relate this activation with the fluidity of lipid bilayer. The sphingomyelin content of mammal EMs displays strong species differences; the increase in the sphingomyelin content correlates the increase in viscosity (Borochoy et al, 1977) and the increase in the inducing temperature,  $T_g$ , of the EM permeability transition (fig. 2) (Ivanov, 1993, 2005). Conversely, the presence of n-alkanols fluidizes the EM and decreases  $T_g$  proportionally to the decrease in membrane viscosity and to the reduction of the order parameter of the lipid bilayer (Ivanov and Zlatanov, 1995). Following Shinitzky (1984) it can be assumed that the clusterization of the anion exchanger originates from the vertical displacement of proteins and the

impaired lipid to protein complementarity all consequent to increased fluidity at hyperthermia.



**Fig. 2. Species differences in the thermal resistance (panel A) and in the life-span (panel B) of mammalian erythrocytes. Thermal resistance is represented by the inducing temperature,  $T_g$ , of the permeability transitions in EM, which activates basal permeability above 37°C (Ivanov, 1993, 2005).**

The following studies were designed to clarify whether the changes in the anion exchanger are simply accompanying or directly involved in the thermal stability of EM ( $T_g$ ) and in the resistance of erythrocytes against thermal hemolysis ( $t_{1/2}$ ). The thermal stability of proteins and thermal resistance of cells is increased by a small number of factors - polyhydric alcohols and sugars (Back et al., 1979), osmolytes (Santoro et al., 1992), DNA and amino acids (Gordon, 1953), some divalent cations (Li et al., 1982), heavy water and mild static pressure (Alexandrov, 1985), some non-steroidal anti-inflammatory drugs and plant extracts (Okoli and Akah, 2004). However, they all have non-specific mode of action and can not identify specific cellular protein that significantly affects the values of  $T_g$  and  $t_{1/2}$ .

DIDS is membrane impermeable, covalent amino reagent, which at low concentrations (<50  $\mu$ M) binds specifically to the anion exchanger of EM, producing a strong inhibition and thermal stabilization of this protein (Cabantchik and Rothstein, 1974; Cabantchik and Greger, 1992; Snow et al., 1978; Ivanov et al., 2007b). The specific and covalent binding of DIDS to the anion exchanger of

human erythrocytes, conducted under optimal conditions (15  $\mu$ M, 4°C, 2 mM EDTA, 100 mM sucrose for 10 min), increased both the thermal stability of EM,  $T_g$ , by about 2.5°C and the resistance of erythrocytes against thermal hemolysis,  $t_{1/2}$ , by 65 % (Ivanov et al., 2011). These results are interpreted in favor of the direct involvement of the pre-denaturational restructuring and clusterization of the anion exchanger in thermal stability of EM and in the resistance of erythrocytes against thermal hemolysis.

The above conclusion has broader biological significance taking into account that EM anion exchanger represents a subclass of the so called AE family of membrane proteins. The AE membrane proteins carry out DIDS-inhibitable exchange diffusion of anions and maintain the intracellular pH and the concentration of  $Cl^-$  in the nucleated cells of vertebrates (Alper, 1991). This stipulates studies on the animal, including tumor, cells in view of the possible involvement of the anion exchanger protein in the thermal sensitivity of cells.

Another result of biological significance is the establishment of a strong positive correlation ( $r = 0.87$ ) between the thermal resistance ( $T_g$ ) of mammalian erythrocytes and their life-span (fig. 2). Correlation does not mean direct relationship, but important considerations could be put forwards in favor of latter in this case. A possible explanation of such relationship follows. *In vivo* outdated erythrocytes are mainly removed through opsonized phagocytosis in the spleen. Phagocytosis is triggered predominantly by the appearance of changed and clusterized anion exchanger proteins on the outside surface of the older cells. In general, disturbed biochemical and biological processes are mainly suspected as the reason for this change in the anion exchanger and its clusterization. Our results show that the high value of the physiological temperature (37°C) combined with the low  $E_a$  (250 kJ/mol) of basal ion permeability could be another reason. As the EM passive ion permeability is activated with relatively low  $E_a$  (250 kJ/mol) in the entire 37-58°C interval, the permeability transition apparently takes place as a slow temperature-activated process at temperatures significantly lower than  $T_g$ , including the physiological temperature (Ivanov, 1999; 2007). On the other hand the anion exchanger dimers change their conformation and aggregate into larger oligomers during this transition. The latter aggregates should be recognized as markers for aging, with subsequent opsonization and phagocytosis of outdated erythrocytes.

In conclusion, the results obtained with mammalian erythrocytes suggest that the permeability transition of EM at  $T_g$  (destruction of the heat target responsible for thermal hemolysis) involved initially reversible pre-denaturational change in the conformation and dynamics of the anion exchanger followed by clusterization and immobilization of its dimers, activation of basal ion permeability, accelerated aging and hemolysis. These results shed light on the mechanisms of cell and cell membrane damage in acute hyperthermia and can be used for targeted correction of the heat resistance and prevention of thermal injury of cells.

## I. СЪСТОЯНИЕ И МЕДИКОБИОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ НА ПРОБЛЕМА

В повечето случаи на клетъчна и тъканна патология, основна терапевтична задача е спасяването на все още живите клетки, което изисква да се познаят молекулните механизми на двата основни начина за клетъчна смърт – апоптоза и некроза.

Основният физичен фактор, предизвикващ топлинно изгаряне на тъканите и изгаряне при електричен удар е високата температура (Червенков и Шиндарски, 1989; Nabours et al., 2000). На клетъчно ниво изгарянията предизвикват некроза, в по-редки случаи апоптоза. От друга страна, хипертермията се използва като самостоятелен или допълнителен метод за лечение на тумори, но въпреки сериозно обоснованата си физична и биологична основа, все още не е постигнал очакваните успехи. Причината е в непознаване на първичните мишени в клетката, чието разрушаване предизвиква топлинна смърт на клетките.

Когато човешки еритроцити (от гръцки erythrós — червен и kýtos — вместилище, клетка) се инкубират при температура между 45 и 57°C те лизират толкова по-бързо, колкото по-висока е температурата. Тази т.н. термична хемолиза (от гръцки θερμός - топъл, θερμή – топлина, αίμα - кръв и λύσις - разлагане, разпадане) притежава всички белези, свойствени на термичната некроза на клетките. При други нефизиологични условия настъпва т.н. ериптоза (Lang et al., 2006), друг вид хемолиза, която демонстрира основните етапи на апоптозата. В тази връзка топлинната хемолиза на еритроцитите от човек и бозайници може да изиграе роля на клетъчен модел, осветляващ някои страни от топлинното увреждане на бактерии и съдържащите ядра клетки.

Предизвиканата от повишена температура (45-57°C) хемолиза на еритроцити от човек се дължи на един единствен температурно-активируем процес–мишена (Gershfeld and Murayama, 1987). Съгласно данните, получени с различни методи (Wilbrandt, 1941; Prinsze et al., 1991; Ivanov, 1992; Ivanov and Benov, 1992), топлиното увреждане на мишената води до повишена йонна проницаемост на плазмалемата и лизис, който в началния си етап има колоидно-осмотичен характер.

Топлинната хемолиза на несъдържащите ядра еритроцити от човек и други бозайници се изучава от дълго време, но вида на критичната мишена на топлината и молекулния механизъм на нейното разрушаване все още остават неясни. Разкриването на този механизъм би имало общобиологично и приложно-медицинско значение.

Най-напред Coakley et al., (1979) установяват, че при бързо нарастване на температурата на суспензия от човешки еритроцити до около 60°C липсва хемолиза, след което в интервала 62-65°C настъпва бърза и пълна хемолиза. Тези автори обозначават температурата 61-62°C като температурен праг на термохемолізата. Направени са опити този температурен праг да се обясни с

нарушаването на механичното равновесие на еритроцитите поради топлинната денатурация на подмембранната спектринова мрежа при 49,5°C (Coakley et al., 1980) или с това, че термохемолизата има окислителен характер (Kiel and Erwin, 1984). Lepock et al. (1989) предлагат свое обяснение на основата на трикратно (!) диференциране на микрокалориметричната термограма на цели еритроцити. При това тези автори получават нов ендотермичен връх при 60°C, който те приписват на денатурацията на минорен белтък, отговорен за термохемолизата. И трите хипотези не намират обаче експериментално потвърждение.

При втория подход за изучаване на термохемолизата еритроцитите се излагат на въздействието на различни, но постоянни температури между 45°C и 57°C (Juckett and Rosenberg, 1982; Gershfeld and Murayama, 1988; Черницкий и Ямайкина, 1989; Lepock et al., 1989). Термохемолизата се оказва подобна на топлинната денатурация на белтъците, защото нейният ход зависи от две координати на топлинното въздействие - температура и продължителност. Въвежда се (не много строго) параметъра скорост на хемолиза, това е реципрочната стойност на времето за полухемолиза. В интервала 45-57°C температурната зависимост на скоростта на хемолиза се представя като права линия в Арениусова координатна система. Този резултат показва, че **за настъпване на клетъчния лизис е необходимо топлинното разрушаване на една единствена субструктура в клетката.** Тази субструктура се разглежда като първична мишена на топлината, а нейното разрушаване - като скоростно-лимитиращ етап на хемолизата. По този начин термохемолизата се изявява като температурно активируем процес, като за големината на активационната енергия  $E_a$  (енергийният праг за разрушаване на мишената) е получена почти една и съща и твърде голяма стойност ( $300 \pm 25$  kJ/mol) от различни автори (Gershfeld and Murayama, 1988; Черницкий и Ямайкина, 1989; Lepock et al., 1989). От всички температурно активируеми процеси (биологични, химични и физични, изключвайки дехидратацията на йоните), единствено топлинната денатурация на белтъците има такава висока  $E_a$  - между 300-350 и 800 kJ/mol за отделните видове белтъци. На основа на тази (макар и гранична) стойност на  $E_a$  и съгласно посочената по-горе аналогия с денатурацията на белтъците, всички автори приемат, че **топлинното разрушаване на мишената включва необратимата топлинна денатурация (по-общо инактивация) на важен белтък или група подобни помежду си белтъци.** Хемолизата при пониски температури (39-45°C) протича обаче с по-ниска от предсказаната скорост (Wilbrandts, 1941) и  $E_a$  от 156 kJ/mol (Gershfeld and Murayama, 1988), което засега остава необяснено.

Относно вида и местоположението на отговорния за термохемолизата белтък-мишена са изказани противоречиви мнения. Ямайкина и Черницкий (1989) предположиха, че този белтък е цитозолния хемоглобин. Според тези автори увреждането на бариерната функция е вторичен процес, протичащ по окислителен механизъм.

Междувременно много автори представиха данни, получени на основата на клинични изследвания (Przybylska et al., 1993; Przybylska et al., 2000) и преки експерименти (Jozwiak and Watala, 1993; Goryunov et al., 2000), които подчертават важната роля на еритроцитната мембрана (ЕМ) в топлинната хемолиза. В тази връзка бяха публикувани резултати, които показват, че топлинната денатурация на хемоглобина не участва и не е нужна за топлинната хемолиза (Ivanov, 1992; Ivanov and Benov, 1992; Борисова и Горюнов, 1997; Goryunov et al., 2000).

ЕМ от човек има три главни белтъка – спектрин, гликофорин и анионен обменник, които заедно и поравно съставляват около 85% от нейното белтъчно съдържание. По-детайлни проучвания показаха, че периферния белтък спектрин не участва в термохемолізата (Черницкий и Ямайкина, 1988; Lerock et al., 1989; Ivanov, 1992; Ivanov and Benov, 1992). Гликофоринът никога не е приеман за участник в термохемолізата, тъй като неговите димери са изключително термостабилни и в присъствие на солубилизиращи агенти се денатурират при температури над 100°C (Marton, 1973). Участието на анионния обменник, въпреки важната му роля за ЕМ и еритроцитите, остава слабо проучено и се описва с противоречиви данни.

Анионният обменник (АЕ1) е главен интегрален белтък в ЕМ, осъществяващ транспорта на аниони (главно  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{Cl}^-$ ) от което зависи „дишането“ на еритроцитите. Това е най-разпространения белтък в ЕМ от човек и със своите около 1 милион молекули съставлява около 27% тегл. от нейния белтъчен състав и 25 % от нейната площ. Потопен е в липидна среда и неговата стабилност зависи от състоянието и състава на средата. Неговите полипептидни вериги са обединени в димери, но част от димерите са асоциирани в олигомери. Олигомеризацията нараства с възрастта на еритроцитите и образуватите кластери играят ролята на рецептор за опсонизация и фагоцитиране на старите клетки. DIDS е мембрано-непроникващ, ковалентен amino реагент, който при ниски концентрации (<50  $\mu\text{M}$ ) се свързва специфично за анионния обменник, предизвиквайки неговото пълно инхибиране, както и скокообразно повишение на температурата му на денатурация с 13°C (Cabantchik and Rothstein, 1974; Cabantchik and Greger, 1992; Snow et al., 1978; Ivanov et al., 2007b).

Особено важно е това, че анионният обменник в ЕМ съставлява подклас от по-голямото семейство от сродни белтъци в плазматичните мембрани (т.н. АЕ семейство белтъци). Основната функция на тези белтъци е да осъществяват еквимоларна обменна дифузия на аниони и да поддържат вътреклетъчното рН и концентрацията на  $\text{Cl}^-$  при повечето клетки на гръбначните животни (Alper, 1991). Тази обменна дифузия на аниони при много тъкани притежава (в различна степен) същите особености, каквито тя има при еритроцитите: чувствителност към специфични инхибитори от класа на дисулфоновите стилбени (например ДИДС), електронеутралност на транспорта, специфичност към йонния субстрат. В добавка, белтъци подобни на анионния обменник са

открити и в мембраните на бактерии и растителни клетки, където те извършват транспорт на аниони.

Prinsze et al. (1991) използват фотохимични агенти и DIDS и докладват, че тази модификация води до ускоряване и усилване (обратно на очакваното подтискане!) на йонната проницаемост и на термохемолизата и заключават, че топлинната денатурация на анионния обменник участва в мишената на топлината и свързаната с нея хемолиза. Lepock et al. (1989) сравняват хемолизата на интактни еритроцити с тази на еритроцити, чийто анионен обменник е термично стабилизиран с DIDS и не намират разлика. От тук тези автори достигат до обратния извод, че топлинната денатурация на анионния обменник не е необходима и не участва в термохемолизата. Всъщност, тези резултати се дължат на неподходящите условия за прилагане на DIDS. Неяснотата относно участието на анионния обменник в топлинната хемолиза се задълбочава и от това, че ако този белтък участва в мишената на топлината, не е ясно коя от неговите форми (мономер, димер, тетрамер, олигомер) е важна за хемолизата.

Като възможно решение за създалия се проблем би могло да се допусне, че денатурацията на някакъв минорен мембранен белтък играе ролята на първична мишена в термохемолизата. За тази цел Senisterra and Lepock (2000) избраха помпата за активен транспорт на  $Ca^{2+}$  в качеството си на задължително присъстващ в плазмалемата на всички видове клетки минорен белтък, денатуриращ се при 60°C. Тази идея обаче не може да намери експериментално потвърждение и беше изоставена.

Стриктно придържайки се към представата за първичната мишена на топлината като белтък, който се денатурира необратимо, Lepock (2003) направи друг опит за разрешаване на проблема като формулира т.н. концепция за минималната доза увреждане. Съгласно тази концепция, за топлинната смърт на клетките (и за термохемолизата в частност) не е необходимо пълното денатуриране на конкретен вид клетъчен белтък - мишена, а е достатъчна топлинната денатурация на минимално количество (между 5 и 15 %) от цялото белтъчно съдържание на клетката. По същество тази концепция не решава проблема, а го връща в неговото начало. **Така, тълкуването на различните експериментални данни и изказаните представи за вида и местоположението на отговорния за термохемолизата белтък и характера на настъпващата в него промяна остават нееднозначни и твърде неясни.**

Този труд представлява продължение на докторската дисертация "Изследване на връзката между необратимите термо-индуциранани бариерни нарушения в еритроцитните мембрани и механизма на индуцираната от хипертермия хемолиза" (Иванов, 1994). По същото това време интересът на изследователите към механизма на термохемолизата и изследванията в тази насока рязко се увеличиха.

На основата на серия от експерименти и публикации, изграждащи ядрото на настоящия труд, се предлага друг модел за първичната мишена, отговорна

за термохемолизата на еритроцитите от човек и бозайници. Тази мишена се разрушава от температурно-индуциран процес в ЕМ, който силно активира йонната проницаемост. Кинетичните параметри на процеса, определени косвено по активацията на йонната проницаемост ( $E_a$ , индуцираща температура  $T_{go}$ ) са едни и същи за интактни еритроцити и ЕМ, изолирани от тях (Ivanov, 1992). За човешки еритроцити  $T_{go} = 60.7^\circ\text{C}$  и в присъствие на *n*-алканоли намалява пропорционално на степента на флуидизиране на ЕМ (Ivanov and Zlatanov, 1995). За еритроцити от бозайници  $T_{go}$  има по-висока или по-ниска стойност, намираща се в тясна корелация със съдържанието на сфингомиелин в ЕМ (Ivanov, 1993; 1999; 2005). Резистентността срещу топлинна хемолиза при еритроцити от бозайници, както и времето им на живот в кръвообръщението корелират със стойността на  $T_{go}$ , т.е., със съдържанието на сфингомиелин в ЕМ. Основно участие в мишената взема белтъкът за транспорт на аниони, т.н. анионен обменник, чийто мономери търпят предденатурационна промяна с индуцираща температура  $T_{go}$  (Ivanov et al., 2007; 2011), последвана от повишаване на степента на асоциация на неговите димери, отстраняване на липидите и усилване на йонната проницаемост.

## **II. ОСНОВНИ РЕЗУЛТАТИ, ДОКЛАДВАНИ В ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЯ (1994 г)**

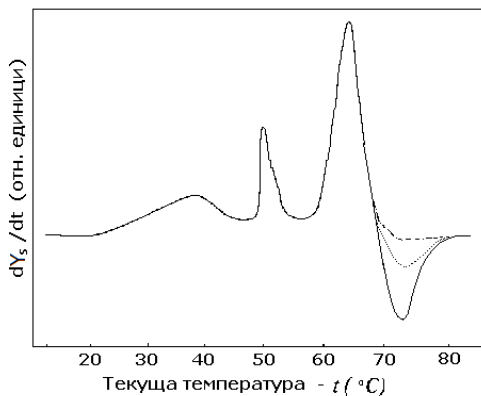
На фиг. 1 са показани предизвиканите от температурата промени в адмитанса  $Y_s$  (1-10 kHz) на суспензии, съдържащи цели еритроцити и изолирани ЕМ при наличие на външен осмотичен протектор (захароза). При равномерно загряване ( $2-8^\circ\text{C}/\text{min}$ ), първата производна по време (температура) на суспензионния адмитанс  $dY_s/dt$  търпи резки промени с пикови температури около  $40^\circ\text{C}$ ,  $52^\circ\text{C}$ ,  $66^\circ\text{C}$ . Екстраполирани към ниска ( $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ ) скорост на загряване, тези пикови температури имаха стойности  $37^\circ\text{C}$ ,  $49.5^\circ\text{C}$  ( $T_{Ao}$ ) и  $61^\circ\text{C}$  ( $T_{go}$ ). Тези промени в проводимостта отговарят на независими от цитозола температурно-индуцирани промени в структурата на ЕМ.

Върхът при  $37^\circ\text{C}$  отговаря на температурно-активирана, DIDS-инхибируема дифузия на фосфатни аниони през анионния обменник на ЕМ, дължаща се на фазов преход в ануларните липиди около анионния обменник. В тази връзка се коментираха и други известни обратими температурно-индуцирани фазови преходи в еритроцитната мембрана. Тъй като те имат обратим характер и настъпват при ниски и физиологични температури, беше заключено, че те не могат да имат връзка с механизма на топлинната хемолиза.

Пикът при  $49.5^\circ\text{C}$  детектиреше прагово нарастване на суспензионната проводимост (по-точно адмитанс), свързано с денатурацията на главния периферен белтък спектрин. Участието на спектрин в този преход беше установено с използване на цели еритроцити и изолирани ЕМ, в които

спектринът е модифициран чрез специфично омрежаване с диамид и алкилиране със Сарколизин, чрез избирателна денатурация с топлина и урея, молекулна деградация с фенолхидразин, екстрахиране и протеолиза откъм цитоплазмената страна. Всички тези модификации силно променят амплитудата и температурата на пика при 49.5°C, докато върхът при 61°C практически не се засяга.

Известно е, че едновременно с денатурацията на спектрина еритроцитите се сферизират, което би могло да промени суспензионната проводимост. В тази връзка беше показано, че извършването при 23°C на обратима сферизация на клетките не променя суспензионната проводимост (Ivanov and Porov, 1993). В добавка инкорпорирането на адамантин и фиксирането на еритроцитите с 2 mM  $O_3O_4$  елиминираше сферизацията при 49.5°C, без да променя пика при 49.5°C (Иванов, 1993). Тези резултати позволиха пика при 49.5°C да се свърже с промяна в структурата на ЕМ. Присъствието на йони на  $Ca^{2+}$  (0 – 0.15 mM) и  $Mg^{2+}$  (0-2 mM) в цитозола имаше антагонистичен ефект - първите намаляваха, вторите увеличаваха с насищане при около 1 mM амплитудата на пика.



**Фиг. 1. Производна термограма на адмитанса  $Y_s$  на суспензия от човешки еритроцити и затворени ЕМ (Ivanov, 1999a). Клетките и мембраните (вътрешно съдържание 150 mM NaCl) са суспендирани в изотонична среда, съдържаща 60 mM фосфатен буфер и осмотичен протектор (захароза).**

Най-важен за термохемолизата, както тази настъпваща при постоянна температура в интервала 45-57°C така и тази при бързо загряване, се оказва пикът с център при 61°C ( $T_{go}$ ). Този връх отчасти се припокрива с температурната област на термохемолиза (45-57°C) и точно съвпадна с температурния праг на хемолиза. Освен това, в началния си етап термохемолизата (45-57°C) има колоидно-осмотичен характер и се дължи на нарастване на йонната проникваемост на плазмалемите при запазена непроницаемост за захароза. От своя страна върхът при 61°C детектира подобен, но ускорен от бързото загряване процес -

изливане на цитозолни йони във външната среда при запазена непроницаемост за захароза (Ivanov and Benov, 1992; Иванов, 1993).

Процесите описвани с върховете при 49.5°C и 61°C отразяваха промени в мембранни белтъци, защото и двата върха имаха необратим характер, елиминираха се след фиксация на изолираните ЕМ с 0.1% (тегл.) глутар алдехид (Иванов, 1993) и техните температури се повишаваха в присъствие на глицерин и еритритол (Иванов, 1993) и тежка вода. Двата процеса обаче бяха напълно независими един от друг, т.е, в тях участваха различни белтъци на ЕМ. Ако в първия процес участваше периферен белтък (спектрин), то получените резултати сочат, че във втория процес може да участва интегрален белтък.

Мембранныят преход при 61°C демонстрира слаба чувствителност спрямо нарушаване на полярните и водородни връзки под въздействие на урея, към алкилраци и SH-омрежаващи агенти и особено висока резистентност към екстракция и протеолиза на белтъците. Трипсинизирането на вътрешната повърхност на плазмалемата унищожаваше пика при 49.5°C, но запазваше този при 61°C. Пикът при 61°C прояви силна чувствителност към модификация на външната повърхност на мембраната като трипсинизиране, алкализирание на рН на суспензионната среда и ковалентна модификация на повърхностни аминок-групи, свързани с мембранни белтъци. Внедряването в ЕМ на амфифилни вещества (детергенти, мастни киселини, лекарства, алкохоли) не засягаше температурата на първия пик, но силно понижаваше температурата на втория, толкова повече, колкото липофилността на веществото беше по-висока. При една и съща молна концентрация в ЕМ всеки n-алканол от реда метанол-октанол понижаваше в еднаква степен температурата на втория пик, микровискозността и параметъра на подреденост на липидния бислой. Всички тези резултати свидетелстват, че белтъкът участващ в мембранныя преход при 61°C има интегрална природа и неговата структурна стабилност зависи силно от хидрофобните взаимодействия с липидното обкръжение.

В присъствие на етанол температурата на втория пик се понижаваше 3.5 пъти по-силно отколкото тази на първия и при 18 % (об.) вторият пик се регистрираше при 39.5°C, с цели 6°C пред първия пик (Иванов, 1993). Еритроцити, инкубирани за 3 min при 39.5°C в присъствие на 18% етанол и захароза като осмотичен протектор се пермеабелизираха необратимо за NaCl, но запазваха дифузионната си бариера за захароза. Този ефект беше наречен **щадяща необратима пермеабелизация чрез топлина** (Ivanov and Benov, 1992) за разлика от подобната топлинна пермеабелизация при 61°C, която се предшества от денатурацията на спектрин. След отстраняване на етанола и хипертермията, индуцираната пермеабелизация е трайна, което потвърждава участието на конформационна промяна на белтък в нея. Полипептидният профил на пермеабелизираните ЕМ, получен с SDS-PAGE, не се отличаваше от този на интактните ЕМ, което говори за отсъствие на белтъчна денатурация (Ivanov and Benov, 1992). Този резултат се съгласува с представата, че в

началния си етап мембранный преход при 61°C включва обратима промяна независимо, че включва мембранен белтък.

Когато еритроцити и изолирани ЕМ се инкубираха при висока температура (45-57°C), повишената проницаемост предизвикваше раздуване и хемолиза. Обаче в присъствие на осмотичен протектор (захароза) повишената проницаемост предизвикваше изтичане на йони и свиване. По скоростта на свиване се пресмяташе йонната проницаемост, която се оказа една и съща за цели еритроцити и изолирани ЕМ (Ivanov, 1992). В Арениусова координатна система температурната зависимост на йонната проницаемост се представяше като права линия с  $E_a$  250 ± 15 kJ/mol. Индуциращата температура на мембранный процес, активиращ проницаемостта, беше определена чрез математичен модел, която се оказа равна на 61-62°C, т.е, на  $T_{90}$ .

Отрицателният пик при 69°C отговаря на спад в суспензионната проводимост, поради дифузия на захароза от средата към цитозола на клетките (Ivanov and Benov, 1992). Този връх няма отношение към началната и същинска фаза на топлинната хемолиза. Амплитудата на този пик се намалява с намаляване съдържанието на хемоглобин в ЕМ (фиг. 1 – пунктирните линии).

**В заключение, процесът който активира проницаемостта и хемолизата при висока температура (45-57°C) и при бързо загряване е локализиран в ЕМ и има характер на термо-индуциран структурен преход. Този преход вероятно включва предденатурационна промяна на интегрален белтък и се индуцира при т.н. температура на праговата хемолиза (61°C).**

### III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Въпреки, че много страни на необратимите преходи при 49,5°C и 61°C в ЕМ от човек са установени, остават нерешени важни въпроси, както следва. Ако проводимостта на суспензия от еритроцити и ЕМ силно нараства при 49,5°C и 61°C, защо топлинната хемолиза на еритроцитите над 45°C зависи само от втората промяна на ЕМ? Какъв вид промяна настъпва в ЕМ при 49,5°C, така щото тя да повишава суспензионната проводимост без да влияе на термохемолизата над 45°C? Тъй като в прехода в ЕМ при 61°C участва една единствена мишена (група от сходни мембранни белтъци), кои интегрални белтъци участват в него? По какъв начин тези белтъци участват в прехода при положение, че  $E_a$  на този мембранен преход (250 kJ/mol) е твърде ниска в сравнение с  $E_a$  на белтъчните денатурации (350-800 kJ/mol)? Какъв характер има този преход при еритроцити от други бозайници? Освен участие в термохемолизата над 45°C, има ли мембранный преход при 61°C и друга биологична роля? Какъв характер имат преходите при 49,5°C и 61°C в ЕМ от пациенти с анемия тип мембранопатия? Отговор на тези въпроси се дава в предложения дисертационен труд.

**Целта на дисертационния труд е да се проучи молекулярния механизъм на индуцираната от топлина хемолиза на еритроцити от човек и бозайници и по-точно участието на мембрания процес при  $T_g$  и на анионния обменник в този механизъм.**

За да се постигне поставената цел, бяха поставени следните задачи:

1.1. Да се изследва промяната при  $49.5^{\circ}\text{C}$  на пасивните електрични свойства, съпротивление и капацитивност, на ЕМ от човек.

1.2. Да се установят параметрите ( $E_a$ ,  $T_{go}$ ) на прехода - мишена при  $61^{\circ}\text{C}$  в ЕМ от голям брой бозайници и да се потърси връзка на тези параметри с липидния състав на ЕМ, в частност със съдържанието на сфингомиелин.

1.3. Да се проведе електрофоретично, спектрофлуориметрично, ЕПР и микрокалориметрично изследване на мембрания преход-мишена в условията на съхранена структура на спектрина.

1.4. Да се потърсят условия при които високоспецифичният термичен стабилизатор на анионния обменник DIDS подтиска йонната проницаемост и инхибира топлинната хемолиза на еритроцитите над  $45^{\circ}\text{C}$ .

1.5. Да се посочи кинетичен модел за разрушаване на мишената на топлината в ЕМ.

1.6. Да се изследва температурната зависимост на базалната йонна проницаемост при еритроцити от човек в температурния интервал  $39-57^{\circ}\text{C}$ . Да се изследва връзката на индуцираната от хипертермия йонна проницаемост с физиологичната йонна проницаемост при еритроцити от човек. Да се потърси и обоснове връзката на тази проницаемост с продължителността на живота на еритроцитите в кръвообращението на бозайниците.

1.7. Да се изследват структурните преходи при  $49.5^{\circ}\text{C}$  и  $61^{\circ}\text{C}$  в ЕМ от пациенти с анемии от вида мембранопатия.

#### **IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

IV. 1. Материали използвани при проучването.

IV. 1. 1. Химикали. FNPS, DMSO, химикалите за SDS-PAGE, хлороформ, n-алканоли от реда метанол-октанол, дитиотрейтол; бичи серумен албумин,  $\text{OsO}_4$ , глутар алдехид и диамид са закупени от Sigma (St. Louis, MO, САЩ). Убаин (Строфантин G) и сарколизин бяха набавени като лекарствени форми.

IV. 1. 2. Флуоресцентни сонди и маркери. Пирен, N-(3-Пирен) малеимид и ANS са закупени от Fluka (Швейцария) and "BDH" (Англия) съответно.

IV. 1. 3. Липиди. Сфингомиелин и фосфатидилхолин са закупени от Sigma Chemical Co, Сент Луис, Мисури.

IV. 1. 4. Буфери. Фосфатен, боратен, карбонатен и ацетатен буфери.

IV. 2. Получаване и обработка на еритроцити.

IV. 2. 1. Получаване на еритроцити от човек, бозайници и птици.

IV. 2. 2. Фиксиране на еритроцити с глутар алдехид (White, 1967) и  $\text{OsO}_4$  (Carstensen et al., 1969). Определяне на осмотична резистентност (Csordas et al., 1984) и средна деформируемост на еритроцити (Левтов и др., 1982).

- IV. 2. 3. Получаване на затворени EM (Bodemann and Passow, 1972).
- IV. 2. 4. Получаване на бели EM (Dodge et al., 1963).
- IV. 2. 5. Тест за наличие на бариерна функция на затворени EM (Yang and Kamino, 1995).
- IV. 2. 6. Получаване на липозоми от сфингомиелин и фосфатидилхолин чрез метода на етанолно инжектиране и инкорпорирането им в EM.
- IV. 3. Определяне изтичането на  $K^+$  от еритроцити (Ilani, Granoth, 1970).
- IV. 4. Определяне терморезистентност на еритроцити срещу топлинна хемолиза (Ivanov, 1993).
- IV.5. Деривационен електро-термичен анализ на импеданса на суспензия от еритроцити (Ivanov, 2008; 2010). При равномерно загряване на суспензия от изолирани EM или цели еритроцити се регистрира първата производна на суспензионния импеданс. Промените на импеданса се дължат на промяна в мембранната капацитивност (дielekтрична поляризация) и проводимост (дисипация на трансмембрания градиент на йонната концентрация).
- IV. 6. Пасивните електрични параметри, капацитивност и съпротивление, на суспензия от интактни еритроцити и изолирани EM се измерваха 1) с анализатор на импеданса Solartron 1260A Impedance /Gain-phase analyzer, Англия, в интервала от 50 kHz до 13 MHz; 2) с импедансометър VersaSTAT 3 F (Princeton, NJ, САЩ) в интервала от 50 kHz до 1 MHz; 3) с кондуктометър LM – 301 – Германия, от 50 Hz до 2 MHz и 4) със самоделен RC-мост при 250 kHz (Pauly and Schwan, 1966).
- IV. 7. Необратима термична пермеабилзация на еритроцити, при която се избягва топлинната денатурация на главните мембранни белтъци (щадяща пермеабилзация с топлина) (Ivanov and Venov, 1992). За целта, еритроцитите се поставят в контакт за 3 min с предварително загрята (39,5°C) изотонична среда, съдържаща 60 mM NaCl, 18 % (об) етанол и захароза като осмотичен протектор.
- IV. 8. Микрокалориметрични измервания на EM. Микрокалориметричните термограми са получавани с високо чувствителен диференциален сканиращ микрокалориметър от типа ДАСМ-4 (Privalov, 1980) и MSC Microcalorimeter на фирмата MicroCal, САЩ.
- IV. 9. Спектрофлуориметричните измервания на EM са извършвани със спектрофлуориметър тип Jobin Yvon JY3 D (Франция) и следните проби:
- IV. 9. 1. Пирен. Спектърът на белязаните с пирен EM е регистриран с възбуждаща светлина при 323,5 nm и при 280 nm. Установяват се два максимума при 373 nm с интензивност  $I_m$  и при 473 nm с интензивност  $I_e$ , които съответстват на флуоресценцията на мономерната и ексимерната форма на пирена. Степента на ексимеризация на пробата се дава като  $I_e/I_m$ .
- IV. 9. 2. N-3-пиренил – малеимид (PyM). Флуоресценцията е възбуждана при 344,5 nm и детектирана при 374,5 nm за мономерната и при 688,5 nm за ексимерната емисия.
- IV. 9. 3. 1-Анилинафтален-8-сулфонат (АНС). Възбуждането и флуоресцентните измервания са направени при 380 nm и 468 nm, съответно.

IV. 10. ЕПР изследване на ЕМ. Беше използван спин-белега 3-maleimidoproxy, чийто ЕПР спектър се регистрираше с EMX micro Bruker spectrometer (Germany) в X-обхвата (9.844 GHz) при 23°C.

IV. 11. SDS-PAGE електрофореза и термичен гел-анализ на белтъците на ЕМ (Fairbanks et al., 1971). Чрез термичният гел-анализ се установява настъпването на топлинна денатурация на мембранни белтъци при определена температура (Lysko et al., 1981).

IV. 12. Омрежаване на ЕМ с аминокиселинен реагент FNPS.

IV. 13. Изследване на повърхностните свойства на мембраната на еритроцити.

IV. 13. 1. Оценка на повърхностната хидрофобност на мембраните на еритроцити (Rosenberg et al., 1980).

IV. 13. 2. Електрофоретични измервания с еритроцити.

IV. 13. 3. Оценка на агрегационната способност на еритроцити в среда с ниска йонна сила.

IV. 13. 4. Оценка на адхезивността на еритроцити към хидрофилни и хидрофобни повърхности (Trommler et al., 1985).

IV. 14. Флуоресцентна микроскопия на еритроцити. Използван е флуоресцентен микроскоп Leitz Laborlux S, Германия.

IV. 15. Електронна микроскопия на еритроцити.

IV. 16. Тест за осмотична резистентност на еритроцити и ЕМ.

IV. 17. Инхибиране и стабилизиране на анионния обменник на ЕМ с DIDS (Sabantchik and Rothstein, 1974). Инхибирането се проверява съгласно Masey et al. (1978).

IV. 18. Определяне на температурната зависимост на йонната проницаемост  $P$  при еритроцити и изолирани ЕМ (Ivanov, 1992; 1999).

IV. 19. Моделни изследвания.

IV. 19.1. Моделно предсказване на  $E_a$  и ентропията  $\Delta S$  на термично-индуцираните мембранни преходи (Lerock et al., 1989).

IV. 19.2. Моделно предсказване на индуциращата температура  $T_{90}$  на мембранния преход-мишена в ЕМ от бозайници (Lerock et al., 1989; Ivanov, 1993).

### **Методични особености на изследването**

Понеже в началния си етап хемолизата в интервала 45-57°C има колоидно-осмотичен характер, в изследването основно бяха измервани промени в бариерната функция на еритроцитите, индуцирани от температурата. В тази връзка основните методи на изследване бяха измерване на изтичане на цитозолни йони и промени в суспензионния импеданс. От друга страна, промените в бариерната функция се изследваха както при постоянна температура, така и в условията на равномерно загряване.

Втора особеност на изследването, което го отличава от другите подобни изследвания, е съпоставяне на получените с цели еритроцити резултати с

тези, получени с изолирани ЕМ. Това дава възможност да се регистрират термо-индуцирани промени и нарушения в бариерната функция и в структурата на плазматичната мембрана и, чрез привличане на допълнителни методи, тези нарушения да се свържат с механизма на термохемолиза.

Трета особеност на изследването е съпоставяне на резултатите, получени с еритроцити от човек с тези, получени с еритроцити от широк кръг бозайници, които имат ясно дефинирани разлики в липидния и белтъчния състав на мембраните.

## **V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

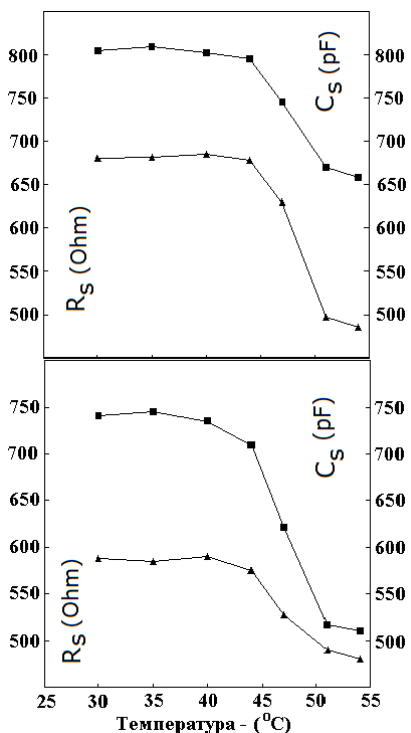
### **V.1. Промяна на пасивните електрични параметри на ЕМ при 49.5 °C (Ivanov, 1999a, 2010; Ivanov et al., 2010).**

Измерването на съпротивлението и капацитета на ЕМ се извършваше по т.н. суспензионен метод. Този метод предлага големи методически улеснения, но внася все още неразрешения проблем за влиянието на клетъчната форма. В настоящето изследване този проблем се решава, като се използват 1) човешки еритроцити с дискоцитна форма, 2) изолирани от тях ЕМ със сферична форма и 3) еритроцити, фиксирани като дискоцити с 1 mM  $O_3O_4$ . Под микроскоп беше установено, че при загряване фиксираните еритроцити запазват дискоцитната си форма до 60°C, а интактните се сферизират при 49.5°C. При същите условия изолираните ЕМ запазват сферичната си форма.

При непрекъснато загряване съпротивлението и капацитетът на суспензия от максимално пакетирани еритроцити и ЕМ бяха измервани по два начина - с RC-мост при 250 kHz (фиг. 2) и с анализатор на импеданса тип Solartron 1260A в интервала от 50 kHz до 1.8 MHz (Фиг. 3). Резултатът е, че независимо от това, каква е била началната и крайна форма на клетките и мембраните, капацитетът и съпротивлението на суспензията намаляват по сходен начин в температурния интервал, където спектрина денатурира (Фиг. 2 и 3). От тук се прави изводът, че намалението на капацитета и на съпротивлението на суспензията при 49.5°C е независимо от началната форма на клетките и нейната промяна при посочената температура. В такъв случай, намалението на суспензионното съпротивление и капацитет при 49.5°C ще се дължи на намаление на съпротивлението и/или намаление на капацитета на ЕМ. Коя от тези три възможности е настъпвала?

В нискофреkwентна среда, с нарастване на честотата до около 300 kHz капацитивният реактанс ( $1/\omega C$ ) на ЕМ дава на късо съпротивлението на ЕМ и премахва възможността да се регистрират каквито и да било промени на това съпротивление. Това се обяснява с т.н.  $\beta$ -дисперсия на диелектричната поляризация на ЕМ. По тази причина, ако съпротивлението на ЕМ е намалявало при 49.5°C, то ефекта от това намаление върху суспензионното съпротивление ще бъде най-силен при ниски честоти, умерен при средни и много слаб при високи честоти. Опитът обаче показва, че при ниски (1 kHz),

средни (50 kHz) и високи честоти (250 – 500 kHz) се регистрираше почти едно и също намаление на съпротивлението на суспензията при 49.5°C. От тук следва, че посоченото намаление на съпротивлението на суспензията не може да се дължи на намаление на съпротивлението на ЕМ, което фактически се е запазвало на постоянно ниво.



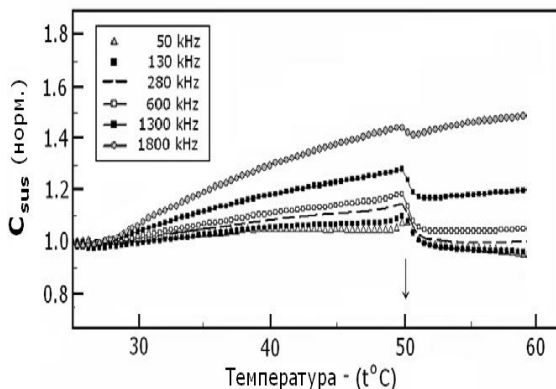
**Фиг. 2.** Температурна зависимост на капацитета  $C_s$  ( $\square$ ) и съпротивлението  $R_s$  ( $\Delta$ ) на фиксирани еритроцити (горен панел) и изолирани ЕМ (долен панел), суспендирани в изотонична среда от 30 mM NaCl и захароза. Клетките са максимално пакетирани, инкубирани при посочената температура за 4 min и бързо охладени до 20°C за да се измери съпротивлението и капацитета при 250 kHz.

Този извод се подкрепя от данните на фиг. 4. При загряване на суспензии от еритроцити и изолирани ЕМ промяната на суспензионния импеданс при  $T_g$  зависеше по знак и големина от наложения трансмембранен градиент на концентрацията на йоните. Това показва нарастване на мембранната проницаемост за йони и пропорционално на това нарастване на нискочестотната мембранна проводимост при  $T_g$ . Отсъствието на такава зависимост в спада на суспензионния импеданс при  $T_A$  отново показва, че проницаемостта на ЕМ за йони (мембранната проводимост и съпротивление) са оставали практически постоянни.

Резултатите показват, че при 49.5°C капацитетът на ЕМ търпи силен спад, но съпротивлението на ЕМ остава практически постоянно. Регистрираното при 49.5°C намаление както на суспензионния капацитет, така и на суспензионното съпротивление се обяснява с т.н. еквивалентна схема от успоредно свързани съпротивление и кондензатор. Капацитетът на ЕМ при

посочените честоти зависи от микроструктурната поляризация на ЕМ (ефект на Максвел-Вагнер). Съгласно този механизъм на диелектрична поляризация, намалението на капацитета на ЕМ при 49.5°C има за следствие усилване на електричното поле и от тук намаление на съпротивлението на суспензията, което в значителната си част има дисперсен характер. До същия извод води и установената силна честотна зависимост на промяната в суспензионното съпротивление при 49.5°C в надлежащия честотен интервал (0.5–10 MHz) (Ivanov, 2010).

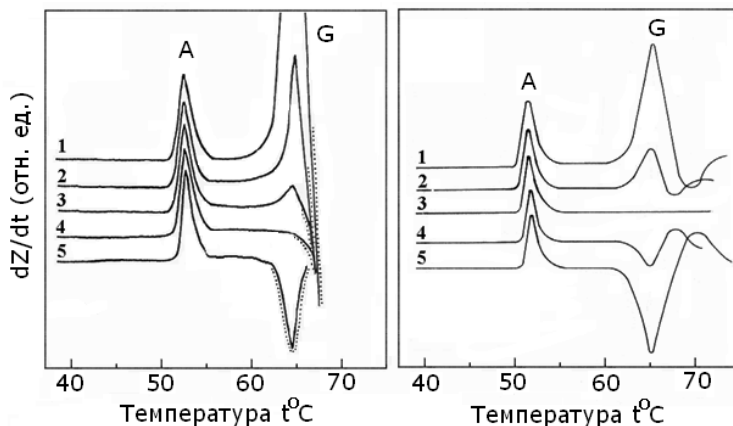
Тъй като в литературата има данни за слабо нарушение на дифузионната бариера при разрушаване на подмембранната спектринова мрежа (Klonk and Deuticke, 1992), не е изключено да настъпва и слабо, под границата на чувствителността на измерването, намаление на съпротивлението на мембраните при 49.5°C. Пред вид на високата чувствителност (0.1%), характерна за Solartron 1260A, трябва да се заключи, че тази промяна е много слаба в сравнение с предизвиканото от промяната на капацитета намаление на дисперсното съпротивление и може да се пренебрегне.



**Фиг. 3. Намаление на капацитета  $C_{sus}$  на суспензия от пакетирани еритроцити и изолирани ЕМ, измерван с импедансометр Solartron 1260A, при температурата на денатурация на спектрина (посочена със стрелка). Честотата на измерване е посочена върху панела. Скорост на загряване – 3°C/min.**

Като заключение, представените данни показват, че известната денатурация на спектрина при 49.5°C се съпровожда с намаление на диелектричната поляризация, капацитета и  $\beta$ -дисперсията на еритроцитната мембрана (Ivanov, 1999a). Спадът на капацитета на мембраните се съпровожда от стъпкообразно нарастване на суспензионната проводимост, което обаче има дисперсен характер. Съпротивлението, съответно проводимостта, йонната проницаемост, дифузионната бариера за йони на ЕМ

се запазват постоянни, в границите на чувствителността на уреда (0.1%). Този резултат още веднаж подкрепя извода, че спектриновата денатурация не играе основна роля в механизма на термохемолизата.

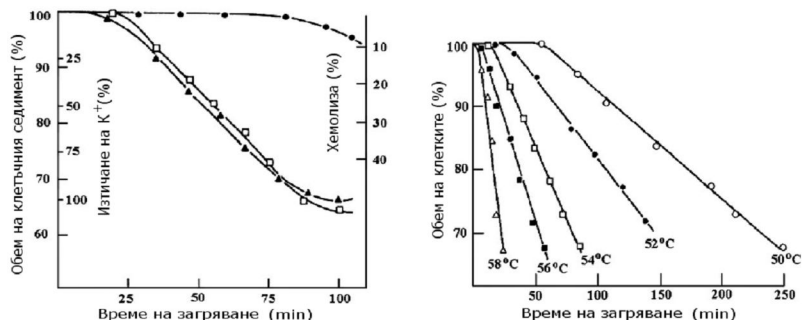


**Фиг. 4. Ефект на трансмембрания градиент на йонната концентрация върху деривативната термограма на суспензионния импеданс. Суспензиите съдържаха цели еритроцити (ляв панел) и изолирани затворени ЕМ, чието съдържание беше 150 mosM NaCl и 150 mosM захароза (десен панел). Изотоничната суспензионна среда съдържаше различни концентрации от NaCl и захароза, в mosM, както следва. Ляв панел: 100 и 200 (1), 150 и 150 (2), 200 и 100 (3), 270 и 30 (4), 300 и 0 (5). Десен панел: 80 и 220 (1), 120 и 180 (2), 150 и 150 (3), 180 и 120 (4), 220 и 80 (5). Точкуваните участъци от линиите върху левия панел показват температурните интервали, в които еритроцитите се разширяваха и лизираха. Хематокрит и скорост на загряване, 0.07 и 2.0 °C/min, съответно (Ivanov et al., 2007a).**

Според Foster and Schwan (1989), плазматичната мембрана екранира вътрешността на клетките, включително клетъчното ядро, от външни електрични полета с честоти по-ниски от тази на  $\beta$ -дисперсията (1 MHz). Представените резултати показват, че спектринът и спектрин-подобните периферни белтъци при съдържащите ядра животински клетки могат да имат значителен принос към това екраниране.

## В. 2. Топлинна хемолита на еритроцити от бозайници (Ivanov, 1993; 2005; Иванов, 1997).

Ценна информация за природата на мембрания преход и мишената, отговорна за активиранието на йонната проницаемост и топлинната хемолита, може да се получи като се използват еритроцити от различни бозайници, чийто мембрани са най-добре изучените клетъчни мембрани.

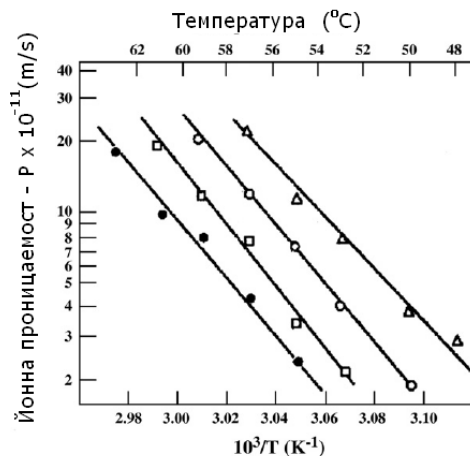


**Фиг. 5. Ефект на високата температура върху хемолита, изтичането на електролити и обема на еритроцити от човек, суспендирани в изотонична среда от 60 мМ NaCl и захароза. Ляв панел: изтичане на K<sup>+</sup> (Δ), обем на клетъчния седимент (□) и излизане на хемоглобин (●) по време на загряване при 54°C. Десен панел: промяна в обема на клетките по време на загряване при посочените температури.**

Високата температура усилва проницаемостта на EM за йони. Инкубирането на еритроцити от човек във физиологичен разтвор на NaCl при висока, но постоянна температура води до раздуване и хемолита. Наличието на осмотичен протектор (захароза) в суспензионната среда сменя посоката на обемната промяна от раздуване и хемолита в свиване без хемолита (фиг. 5, ляв панел). Ходът на обемната промяна във времето може да се раздели на две части - начален етап, в който обемът на клетките беше постоянен (лаг период  $D_0$ ) и продължителен следващ етап, в който клетките равномерно губят електролити и се свиват с постоянна скорост  $K(s^{-1}) = 1/H_0 \cdot (dH/dt)$ , където  $H$  е хематокрита, а  $H_0$  е началния хематокрит,  $t$  - времето (s). Съгласно изведена по-рано формула (Ivanov, 1992), скоростта на свиване  $K$  е

пропорционална на индуцираната в този етап пасивна йонна проникваемост  $P$ . Фиг. 5 (десен панел) показва, че с нарастване на температурата на инкубация скоростта на свиване  $K$  (наконът на правата линия) и проникваемостта  $P$  нарастват, а лаг-периодът намалява.

Интервалът от време в който човешките еритроцити се свиваха с постоянна скорост имаше такава продължителност, че повечето (до 90%) от  $K^+$  йони излизаха извън ЕМ (фиг. 5, ляв панел). Съществуването на такъв продължителен интервал от време, в който пасивната йонна проникваемост на ЕМ зависи само от един параметър - температурата, но е постоянна с времето е посочено в наши и чужди доклади (Prinzse et al., 1991; Ivanov, 1992, 2007a). Този резултат показва, че след най-ранната фаза на температурна модификация на ЕМ, индуцираната висока проникваемост спрямо малки йони ( $Na^+$ ,  $K^+$  и  $Cl^-$ ) остава постоянна за продължителен интервал от време. Йонната проникваемост, индуцирана при висока, но постоянна температура [Prinzse et al., 1991] и при загряване [Ivanov, 1992, 2007] има обратим характер. Всичко това поставя под съмнение участието на топлинна денатурация на белтък в нейното индуциране и, като следствие, в термохемолизата. И наистина, топлинната денатурация на белтъците е процес, зависещ от температурата и времето. Подобни кинетични съображения отхвърлят и възможността тази проникваемост да се предизвиква от окислителен стрес върху ЕМ, който при дадена температура също се ускорява с времето.



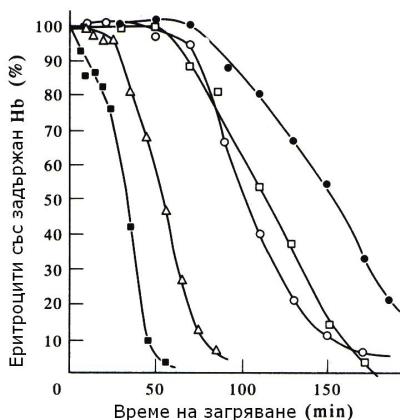
**Фиг. 6. Температурна зависимост на индуцираната йонна проникваемост в еритроцити от различни видове: (●) овца, (□) крава, (○) коза, (Δ) кон. Еритроцитите са суспендирани в изотонична среда от 60 mM NaCl и захароза.**

Резултат, противоположен на горния е докладван от други автори (Bischof et al., 1995) за други клетки. Те са измервали излизането

на флуоресцентната сонда калцеин от ядросъдържащи клетки от човек при температури между 37 и 70°C и са получили, че при постоянна температура

проницаемостта на плазмалемата за калцеин зависи както от температурата, така и от времето. От тук тези автори заключават, че при фиксирана висока температура клетъчните мембрани се променят (увреждат) непрекъснато с времето. Обяснението на този резултат е, че калцеинът (мол. маса 995 Da) може да напусне клетката, само ако в плазмалемата има значителни бариерни дефекти. Това обаче става на по-късен етап спрямо наблюдаваната в нашия случай модификация (температурна активация) на пасивната проницаемост за малки йони (фиг. 1).

Когато еритроцити от различни бозайници се суспендират в изотонична среда от 60 mM NaCl и захароза при висока, но постоянна температура, пасивното изтичане на йони от тях също протича на два етапа (Ivanov, 1993). След един интервал от време на задръжка се установяваше постоянна скорост на свиване  $K$ , от чиято стойност се пресмяташе големината на индуцираната йонна проницаемост  $P$ . При еритроцити от всеки един вид (на фиг. 5 – десен панел за еритроцити от човек), с увеличаване на температурата на експозиция, времето на задръжка намаляваше, а скоростта на свиване  $K$ , респективно индуцираната йонна проницаемост нарастваше.



**Фиг. 7. Ход на хемолизата при 55°C на еритроцити от бозайници. Терморезистентността (времето за полухемолиза  $t_{1/2}$ ) корелира с индуциращата температура  $T_g$  на мембрания преход, която за отделните видове е: плъх (■) 59°C, кон (Δ) 60°C, коза (○) 63°C, крава (□) 64°C и овца (●) 65,5°C.**

Температурната зависимост на индуцираната йонна проницаемост  $P$  при четири вида бозайници е показана на фиг. 6. За удобство е използвана Арениусова координатна система ( $y = \lg P$ ;  $x = 10^3/T$ ), където  $T$  е термодинамичната температура. За всеки един от посочените видове, всички измерени стойности на  $P$  лежат на една права линия, което показва, че за съответния температурен интервал  $P$  се явява температурно активируем параметър:  $P = P_0 \cdot \exp(-E_a/RT)$ . Изчислените от наклона на правите линии стойности на активационната енергия  $E_a$  за посочените видове практически съвпадат помежду си ( $250 \pm 25$  kJ/mol). Същата стойност се получава и за  $EM$  от човек. Тези резултати показва, че

увреждането само на една единствена мишена в ЕМ от посочените видове е била достатъчна за да се активира йонната проницаемост.

Що се отнася до индуциращата температура  $T_{g0}$  на процеса-мишена, който активира йонната проницаемост в ЕМ, за еритроцитите от всеки вид тя се определяше по три начина. Първите два начина включват равномерно загряване на цели еритроцити и на изолирани ЕМ, суспендирани в изотонична среда от 60 mM NaCl и захароза. При такива условия температурната активация на йонната проницаемост се регистрираше чрез нискочестотна (10 kHz) кондуктометрия като изтичане на цитозолни йони в тесен температурен интервал около температурата на полуизтичане  $T_g$ . Ако се използва производна кондуктометрия, кривата описваща изливането на йоните се превръща в тесен пик, центриран около същата температура  $T_g$ . Измерените стойности за  $T_g$ , екстраполирани към ниска ( $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ ) скорост на загряване (т.е.,  $T_{g0}$ ) при ЕМ от 13 вида бозайници са посочени на фиг. 19 (А). Третият начин се основава на модел, в който представената на фиг. 6 температурна зависимост на йонната проницаемост се екстраполира към по-високите температури ( $57\text{-}65^\circ\text{C}$ ), където измерванията са затруднени. Температурата, при която половината от йоните ще изтекат в рамките на стандартно време (2-3 min) се приемаше за проектна индуцираща температура на процеса (Ivanov, 1993). За всеки от посочените видове, проектната индуцираща температура съвпада със задоволителна точност ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) с  $T_{g0}$ .

На фиг. 7 е показан ходът на хемолизата на еритроцити от различни видове при  $55^\circ\text{C}$ . От тези данни за всеки вид може да се определи времето за 50% хемолиза,  $t_{1/2}$ , т.н. резистентност срещу термохемолиза (терморезистентност). Терморезистентността на еритроцитите от изследваните видове силно корелира с  $T_{g0}$  на техния мембранен преход (Фиг. 7). Еритроцити от видове, които имат по-висока терморезистентност, имат по-висока  $T_{g0}$  и обратно. Този резултат показва, че за еритроцитите от различни бозайници мембранната термостабилност  $T_{g0}$  представлява в същото време и мярка за тяхната терморезистентност. Този резултат посочва йонната проницаемост на ЕМ и нейното активиране при  $T_{g0}$  като основен фактор, от който зависи термохемолизата. Ако има и други фактори (например денатурацията на спектрина), които влияят на термохемолизата, те сигурно имат второстепенно значение, тъй като не нарушават съществено посочената на фиг. 7 корелация.

Регистрирането на хипертермичния преход-мишена в ЕМ от различни бозайници дава частичен отговор на въпроса, кой е участващия белтък или белтъци в този преход. Вече беше посочено, че два от мажорните мембранни белтъци (спектрин и гликофорин) не участват в този преход. ЕМ от свиня, коза, крава и повечето овце не съдържат белтъчни преносители за нуклеозиди (Young and Jarvis, 1983), тези от преживни бозайници не съдържат  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствителни  $\text{K}^+$  канали, а тези от куче нямат белтъчни помпи за активен транспорт на  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  (Schatzman, 1982). Посоченият преход е регистриран и в ЕМ от птици (кокошка, пуйка, патица) в които липсват белтъчни преносители за вода, амиди, урея и тиоурея (Deuticke, 1977). Тези

данни показват, че ако в прехода (мишената) участва един единствен белтък, общ за всички ЕМ, този белтък не може да бъде нито един от горе изброените видове.

**V. 3. Влияние на сфингомиелина върху топлинната мишена, отговорна за термохемолизата при еритроцити от бозайници (Ivanov, 1993; 2002; 2005; Иванов, 1997).**

Съдържанието на сфингомиелин (Sph) и фосфатидилхолин (PC) в мембраната на еритроцитите от бозайници се мени в широки граници, като тяхната сума (Sph+PC) е относително постоянна величина (Deuticke, 1977). Съдържанието на останалите липиди е относително постоянно в ЕМ от тези видове. Съгласно представените по-горе данни, стойността на  $E_a$  не е засегната от вариациите в съдържанието на сфингомиелин при еритроцитите от различни бозайници, но стойността на индуциращата температура  $T_{90}$  е силно повлияна (Фиг. 19 (А)). Колкото съдържанието на сфингомиелин е по-голямо, съответно това на фосфатидилхолин е по-малко, толкова  $T_{90}$  има по-висока стойност. Установената корелация между  $T_{90}$  и отношението  $Sph/(Sph+PC)$  може да се изрази чрез формулата  $T_{90} (^{\circ}C) = 56.96 + 8.004 \cdot Sph/(Sph+PC)$ . Коефициентът на линейна корелация  $r = 0.944$ , а коефициентът за определяне на най-добре съгласуващата се с данните праволинейна зависимост е  $R^2 = 0.89$ .

Установеният ефект на сфингомиелина върху стойността на  $T_{90}$  (и терморезистентността) свидетелства за физичен контакт между този фосфолипид и мембранный белтък – мишена на топлината, т.е., липид-белтъчно взаимодействие. Това е силен резултат в полза на интегралната природа на белтъка. Сфингомиелинът и фосфатидилхолинът са полярни, холин-съдържащи фосфолипиди, които предоставят еднакви възможности за взаимодействие с мембранните белтъци на основата на полярни и водородни връзки. Поради това, наблюдавания ефект върху  $T_{90}$  не може да се обясни с този тип взаимодействия. Ацилните вериги на сфингомиелина обаче са по-дълги и по-наситени от тези на фосфатидилхолина (Deuticke, 1977) и осъществяват по-силно хидрофобно взаимодействие и, съответно, осигуряват по-висока стабилност на отговорния за термохемолизата белтък. Благодарение на същото си качество, сфингомиелинът разположен в домена от свободни липиди понижава флуидността на липидния бислой, което води до същия ефект. Засега не може да се каже дали групирането на част от сфингомиелина и холестерола в липидни рафтове (салове, острови) в ЕМ играе роля в стабилизирането на белтъка-мишена на топлината.

За да се проучи ефекта на съдържащия се в ЕМ сфингомиелин върху термичната резистентност на еритроцитите беше направен активен експеримент при който съдържанието на сфингомиелин в ЕМ от човек се увеличаваше чрез вливане в тях на липозоми от сфингомиелин (Ivanov, 2002). Липозоми, съдържащи сфингомиелин или фосфатидилхолин, се

получаваха по метода на етанолно инжектиране, модифициран с добавяне на хлороформ. За целта 0.5 ml липиден разтвор (5 mg липид в 1 ml етанол:хлороформ, 5:1) се инжектираше в 10 ml топла (45°C), разбърквана изотонична среда от 120 mM NaCl, 30 mM фосфатен буфер, pH 7.4, 5 mM глюкоза, 1 mM EGTA и 3 mM MgCl<sub>2</sub>. След избистряне на суспензията, тя се продухваше за да се намали съдържанието на хлороформ и охлаждаше, след което към нея се добавяха 1 ml еритроцити. Натоварването на еритроцитите с липиди се провеждаше при стайна температура (27°C) в присъствие на етанол (4 об %) и хлороформ (под 1% об) за 70 min, хематокрит 9 %. Присъствието на етанол и хлороформ флуидизираше липозомите и ЕМ поради което тяхното сливане протичаше много по-бързо в сравнение със сливането на соникирани липозоми и ЕМ в среда без хлороформ и етанол. Контролните еритроцити се обработваха по същия начин, но без липиди в средата. Обработените еритроцити се отделяха и измиваха трикратно. По този начин бяха приготвени еритроцити с внедрен в ЕМ сфингомиелин, еритроцити с внедрен фосфатидилхолин и контролни еритроцити. Данните от измерената терморезистентност ( $t_{1/2}$ ) и мембранна термостабилност ( $T_g$ ) на тези еритроцити са представени в табл. 1.

**Табл. 1. Ефект от натоварването със сфингомиелин върху времето  $t_{1/2}$  за полухемолиза на еритроцитите при 55°C и температурата  $T_g$  за полуизтичане на цитозолните йони при бързо (2°C/min) загряване на еритроцитите.**

Еритроцити	$t_{1/2}$ (min)	$T_g$ (°C)
Контролни	25 ± 2	64.2 ± 0.2
С увеличено съдържание на фосфатидилхолин	24 ± 2	64.0 ± 0.2
С увеличено съдържание на сфингомиелин	39 ± 2	65.2 ± 0.2

В сравнение с контролните еритроцити, скоростта на хемолиза на еритроцитите инкорпорирани със сфингомиелин се намали с около 56 % (!), а лаг-периодът значително се разшири (не е показано). Тези параметри практически не се промениха обаче при клетки, инкорпорирани със фосфатидилхолин.

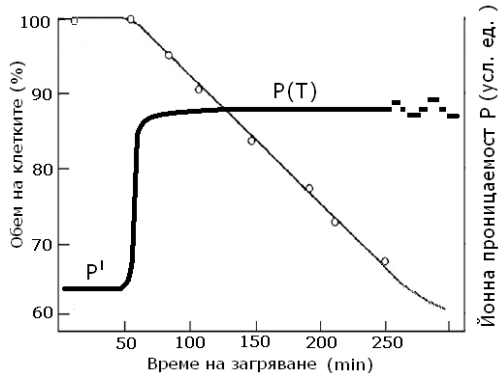
Температурата за полуизтичане на електролитите  $T_g$  при загряване на различни видове клетки се използва като мярка за стабилността на техните мембрани (Hardin et al., 1999). Обикновено, това е параметър, който се мени слабо - в рамките на няколко °C. В случая  $T_g$  се увеличи с около 1.0±0.2°C при клетки натоварени със сфингомиелин и практически не се промени при клетки натоварени със фосфатидилхолин (Табл. 1).

Получените резултати подкрепят изказаното по-рано твърдение (Ivanov, 1993), че видовете различия в термичната резистентност и мембранната

термостабилност при еритроцити от бозайници могат да се дължат на различното съдържание на сфингомиелин в техните мембрани.

#### **V. 4. Кинетичен модел, описващ разрушаването на мишената на топлината (Ivanov, 1993; 2005; Иванов, 1997).**

При физиологична температура ЕМ има много слаба остатъчна пасивна проницаемост за  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$  от около  $1.2 \times 10^{-12}$  m/s и е напълно непроницаема за по-големи частици (манитол, захароза). При високи температури (45-57°C) в ЕМ и по-точно в нейната първична мишена на топлината настъпват промени, които водят до нарастване на йонната проницаемост и хемолиза. Тези промени могат да се моделират на основата на промените в проницаемостта на ЕМ. Съществуват два алтернативни модела, които описват промяната на ЕМ (мишената), водеща до хемолиза. Според единия модел промяната на ЕМ (разрушаването на мишената) представлява продължителен и непрекъснат процес, поради което проницаемостта зависи както от температурата, така и от времето. В настоящия труд е представен алтернативен модел, основан на промените в йонната проницаемост, които отговарят на най-ранните промени в мишената.



**Фиг. 8. Етапи в модифицирането на йонната проницаемост на еритроцити при висока температура (50°C).**

Пасивната йонна проницаемост на ЕМ от човек беше изучена в условията на висока, но постоянна температура и при наличие на осмотичен протектор във външната среда (фиг. 5 и 8). Съобразно големината и вида на температурно-индуцираната проницаемост, структурните промени в мишената могат условно да се разделят на четири етапа:

- етап на натрупване на малки, подкритични промени в мишената през което време йонната проницаемост запазва началната си ниска стойност  $P'$ ;
- етап на модификация (активиране) на йонната проницаемост. През този етап йонната проницаемост бързо нараства по сигмоиден начин от началната си ниска стойност  $P'$  до една крайна висока стойност  $P$ . Експериментално беше определено, че зависимостта на  $P$  от температурата  $T$  има експоненциална

форма,  $P(T) = P(T_0) \exp(-E_a/RT)$ , където  $E_a = 250 \pm 15$  kJ/mol. Според теорията на активираното състояние  $E_a$  има смисъл на активационна енергия - енергетична бариера, която трябва да се преодолее за да може мишената да премине от начално в крайно състояние и да се активира проницаемостта от  $P'$  в  $P$ . Тези резултати подкрепят модела за обратим (за продължителен интервал от време), температурно-индуциран преход между две състояния в мишената като основен механизъм за нейната температурна промяна (при други автори - разрушаване).

- етап на постоянна йонна проницаемост. През този етап индуцираната йонна проницаемост  $P(T)$  има постоянна стойност (фиг. 8). Големината на  $P(T)$  е такава, че по-голямата част от йоните напускат цитозола през този етап и клетките се свиват. Фактът, че в този етап  $P$  зависи от температурата, но остава постоянна с времето също подкрепя модела, описващ промяната на мишената като еднократен и обратим преход от между две стабилни състояния. При отсъствие на осмотичен протектор еритроцитите се раздуват и търпят масивна хемолiza, която в началната си фаза има колоидно-осмотичен вид. Това показва, че присъствието на захароза не влияе на начина, по който мишената се променя и се индуцира йонната проницаемост. В края на този етап пермеабилзацията става необратима. Това състояние се получава при т.н. щадящо, но необратимо пермеализирани мембрани.

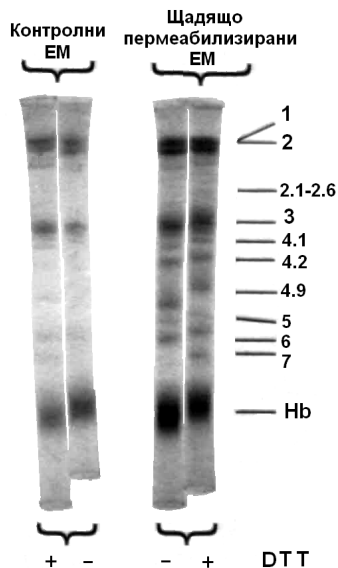
-етап, в който се появяват бариерни дефекти, пропускащи частици с все по-големи размери - манитол (мол. маса 182), захароза (342), рафиноза (594), калцеин (995) и т.н. Този етап на късни и необратими промени на мишената е слабо проучен, тъй като при избраните условия той настъпва след като хемолизата в по-голямата си част е завършила. Предварителни и непубликувани резултати насочват към едно възможно участие на цитозолния хемоглобин в него. В тази връзка използването на изолирани ЕМ лишени от хемоглобин, както и на захароза като осмотичен протектор, която в същото време е и уловител на свободни радикали, има съществено значение за отлагането на този етап и за по-ясната изява на предишните важни за хемолизата етапи.

#### **V. 5. Електрофоретично изследване на топлинната мишена (термичния преход в ЕМ) отговорна за термохемолизата (Ivanov, 1996)**

В това изследване е използвана възможността мембрания преход, свързан с механизма на термохемолiza, да бъде индуциран отделно и изследван самостоятелно. Топлинната денатурация на спектрина няма отношение към мембрания преход, но предхождайки го по температура и време, затруднява това изследване. Това затруднение е избягнато, като са използвани еритроцити и изолирани ЕМ, в които този преход е индуциран в присъствието на 18% етанол чрез инкубация при 39,5°C за 3 min (Ivanov and Benov, 1992). Тъй като спектринът на тези ЕМ остава интактен, тези еритроцити (ЕМ) са обозначавани като "претърпели необратима, но щадяща

топлинна пермеабилзация”, за разлика от EM претърпели „топлинно пермеабилзиране” чрез загряване за 3 min при 61°C.

Съгласно данните от т.н. термичен гел-анализ (Lysko et al., 1981) след като определен полипептид (белтък) в еритроцитната мембрана бъде денатуриран с топлина, той агрегира и неговата ивица в SDS-PAGE електрофоретичния профил на EM изчезва, а агрегатите му остават на старта. Например, подобна агрегация настъпва след 3 минутно загряване на EM при 50°C (агрегация на спектрина) и при 68°C (агрегация на анионния обменник). Ако обаче солубилизацията на мембранните белтъци се извърши в присъствие на SH-редуциращ агент, например дитиотреitol, агрегатите се разпадат и ивицата на белтъка се появява отново на мястото си.



**Фиг. 9. SDS-PAGE профил на полипептидите на интактни EM (контролни EM) и на EM, претърпели необратима щадяща топлинна пермеабилзация (щадящо пермеабилзирани EM). Солубилизацията на мембранните полипептиди е проведена със (+DTT) и без (-DTT) 40 mM дитиотреitol. Белтъчните ивици са отбелязани според Fairbanks et al. (1971).**

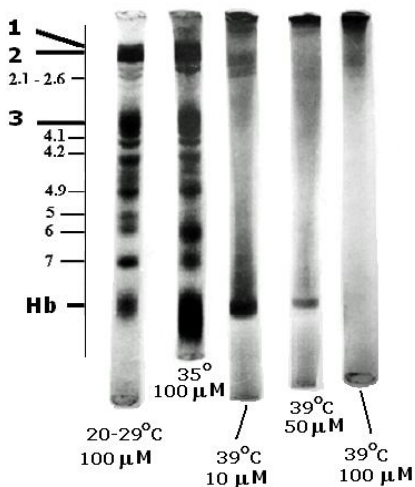
Фиг. 9 показва, че SDS-PAGE електрофоретичният профил на EM, претърпели щадяща, но необратима пермеабилзация с топлина, не се променя, ако солубилизацията на полипептидите е правена със или без дитиотреitol. Това означава, че никой от белтъците, които се регистрират в електрофореграмата, не е бил денатуриран, а това са над 98% от всички

мембранни белтъци. В добавка, този профил напълно съвпада с профила на интактните EM, което още веднаж доказва, че в пермеабилзираните EM не е настъпвала белтъчна денатурация.

Този резултат показва, че „разрушаването” на топлинната мишена, даже в началото на етапа на необратимост, не е резултат, нито се придружава от такава топлинна промяна на мембранните белтъци, която да позволи тяхната спонтанна агрегация чрез формиране на междумолекулни дисулфидни

връзки. Тогава как се променят мембранните белтъци и променят ли се те изобщо след щадящата пермеабилзация?

Отчасти отговор на този въпрос дават резултатите по омрежаване на белтъците на EM с бифункционалния, силно липофилен аминореагент FNPS. Всяка молекула FNPS е способна да свърже две депротонирани amino групи, ако са отдалечени една от друга на не повече от 9 nm (малко повече от дебелината на мембраната). След обработката на EM с FNPS, техните белтъци се разделяха чрез SDS-PAGE (фиг. 10). Ако полученият електрофоретичен профил съвпада с този на интактните EM, това означава, че липсва омрежаване.

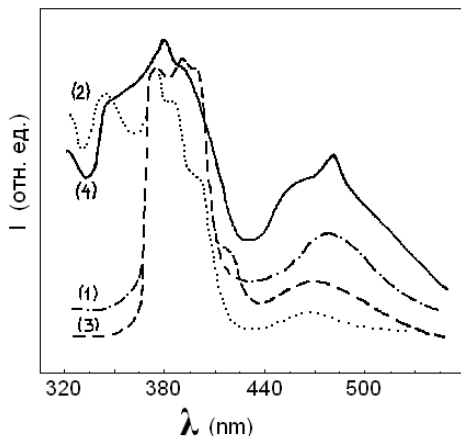


**Фиг. 10.** SDS-PAGE профил на полипептидите на EM, омрежени с FNPS. Клетките (изолираните мембрани) се загряват в присъствие на 18% етанол за 3 min при посочените температури, приближавайки се стъпка по стъпка към температурата (39°C) индуцираща необратима пермеабилзация. След загряването, клетките (EM) са измити и инкубирани при 22°C за 2 часа в среда съдържаща 140 mM NaCl, 10 mM боратен буфер, pH 8,5 и FNPS в посочената концентрация. След модификацията с FNPS EM са измити и подложени на електрофореза.

Резултатите показват, че FNPS не е в състояние да омрежи мембранните белтъци на интактните еритроцити и белтъците на интактни изолирани EM. Даже след обработка на мембраните с пермеабилзация агент сапонин и в присъствие на 10% (об) DMSO, за който е известно, че пермеабилзира и флуидизира клетъчните мембрани и засяга конформацията на мембранните белтъци (Barnett, 1978), amino групите оставаха недостъпни за омрежаване с FNPS. Нещо повече, FNPS не можеше да омрежи и мембранните белтъци на еритроцити и на изолирани EM след тяхното загряване в присъствие на 18 % (об) етанол за 3 min при температури (35°C) само с 5°C по-ниски от тази, при която се разрушава топлинната мишена (фиг. 10).

За разлика от тези случаи, FNPS омрежаваше част от мембранните белтъци на еритроцити и EM, претърпели щадяща пермеабилзация (Фиг. 10). В този

случай, всички омрежени мембранни белтъци (полипептидни вериги) оставаха на старта като една обща ивица, която имаше ярко жълт цвят (цвета на FNPS) преди обгарянето. Оптималната концентрация на FNPS беше около 10  $\mu\text{M}$  и по-малко, при което от главните белтъци най-силно се омрежаваше ивицата 3 (анионния обменник) и най-слабо – спектрина и прилежащите му белтъци от ивицата 2.1 - 2.6 (фиг. 10). Това показва, че при разрушаване на топлинната мишена, част от интегралните белтъци и най-вече анионния обменник претърпяват достатъчно силна конформационна промяна (но не и денатурация), при която те се сближават на разстояние по-малко от 9 нм и експонират свободни amino групи. Големият брой на димерите на анионния обменник - около половин милион на клетка, улеснява това сближаване и съответно омрежаване с FNPS.



**Фиг. 11. Флуоресцентен спектър на пирен внедрен в контролни и щадящо пермеабилizирани EM. Възбуждането при 323.5 нм позволява емисия на пирена, локализиран в домена от свободни липиди на контролните (1) и пермеабилizираните (3) EM, докато възбуждане при 280 нм индуцира емисия на пирена локализиран в близкото липидно обкръжение на белтъците на контролните (2) и пермеабилizираните EM (4).**

Въпреки, че разрушаването на мишената в EM не включва белтъчни денатурации, този процес се съпровождаше от силна промяна на повърхностните свойства на еритроцитите (Ivanov, 1999 c). При необратимо пермеабилizираните в щадящи условия еритроцити беше установено нарастване на повърхностната хидрофобност, намаление на повърхностния заряд, поява на повърхностна грануляция, нарастване на способността им за взаимна агрегация и адхезия към хидрофобни повърхности. Това подкрепя извода за промяна на интегралните белтъци, включително анионния обменник.

**V. 6. Спектрофлуорометрично и ЕПР - изследване на топлинната мишена (термичния преход в ЕМ) отговорна за термохемолизата (Ivanov et al. , 1999; Ivanov et ., 2011)**

Мембранният процес и мишената на топлината в ЕМ бяха изследвани при два вида условия: 1) при равномерно загряване и 2) в условията на съхранена структура на спектрина. Спектринът е термолабилен белтък, който няма отношение към топлинната хемолиза. Във втория случай бяха използвани т.н. еритроцити и изолирани ЕМ, претърпели щадяща топлинна пермеабилзация.

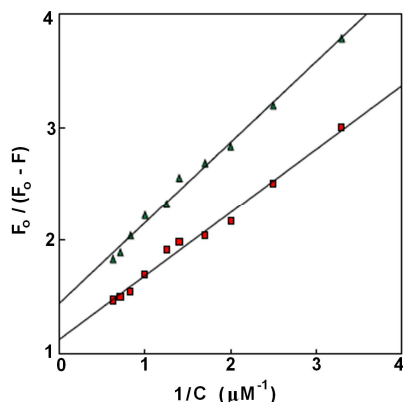
При това изследване бяха използвани три вида флуоресцентни сонди и белези, които се разполагат на различни места в мембраната. Флуоресцентната сонда пирен се разполага в хидрофобното ядро на липидния бислой и докладва за подвижността и подредеността на липидните опашки. Молекулите на пирена съществуват в две форми – мономерна и димерна, наречена ексимер. Отношението между броя на ексимерните и броя на мономерните форми се нарича ексимеризация на пирена и се измерва с отношението на интензивността на флуоресценцията на ексимера към тази на мономера. Ексимеризацията съответства на микровискозността, колкото последната е по-голяма, толкова равновесието е изтеглено в посока към мономерната форма.

**Табл. 2. Ексимеризация и анизотропия на флуоресценцията на сонди и маркери, свързани към ЕМ преди и след топлинна пермеабилзация на ЕМ при щадящи условия. Показани са средни стойности  $\pm$  средно квадратично отклонение. N = 4.**

ЕМ	Анизотропия на флуоресценцията на N-(3-пирен) малеимид	Ексимеризация на N-(3-пирен) малеимид	Ексимеризация на пирен в домена на ануларните липиди	Ексимеризация на пирен в домена на свободните липиди
Контролни	0.25 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.02	0,13 $\pm$ 0.02	0,38 $\pm$ 0.02
Пермеабиллизирани	0.28 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.03	0,21 $\pm$ 0.02	0,31 $\pm$ 0.02

На Фиг. 11 е показан флуоресцентният спектър на пирен, внедрен в липидния бислой на контролни и пермеабиллизирани ЕМ. При контролните ЕМ, ексимеризацията на пирена, внедрен в домена от свободни липиди (крива 1), е 3 пъти по-висока от ексимеризацията на пирена, прикрепен към т.н. ануларни липиди, разположени в близък контакт с интегралните белтъци (крива 2) – табл. 2. Такова състояние е нормално и характерно за интактните ЕМ, чийто ануларни липиди са силно имобилизирани в сравнение със

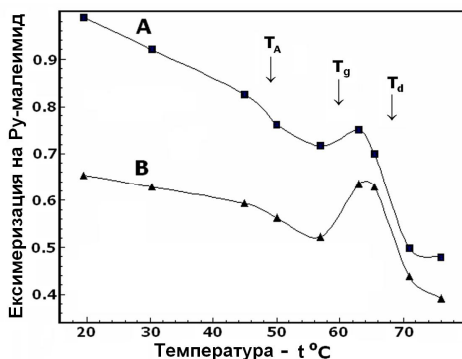
свободните липиди. При пермеабилзираните ЕМ отново свободните липиди са по-подвижни от ануларните, но вече в много по-слаба степен (табл. 2). В сравнение с контролните ЕМ, при пермеабилзираните ЕМ ексимеризацията на пирена е слабо понижена в домена от свободни липиди (крива 3) и силно повишена в домена от ануларни липиди (крива 4) – табл. 2. Това означава, че след като топлинната мишена е разрушена, ануларните липиди са станали малко по-подвижни, докато свободните липиди като цяло са отслабили движенията си (табл. 2). Тъй като свободните липиди са около 3-4 пъти повече от ануларните, този резултат означава, че като цяло липидният бислой при пермеабилзираните ЕМ е понижил динамиката си спрямо тази на контролните ЕМ. Това може да бъде индиректен резултат от едно значително групиране и имобилизиране на интегралните белтъци в пермеабилзираните ЕМ.



**Фиг. 12. Ефективност за радиационния пренос на енергия между триптофановите остатъци на интегралните белтъци и пирен, разположен в ануларния слой при контролни (□) и пермеабилзираните (Δ) мембрани. Двойно реципрочна графика на интензивността на флуоресценцията на триптофан като функция на концентрацията на пирен.  $F_0$  and  $F$  означават флуоресценцията на триптофан при 338 nm в отсъствие и присъствие на пирен, съответно.**

За да се провери тази възможност, беше използван N-(3-Пирен)малеимид, който е силно липофилен белег, способен да флуоресцира след свързване към -SH групи на белтъците. Спектърът на този флуоресцентен белег съдържа един пик при 373 nm (емисия на мономерната форма на пробата) и друг при 688 nm (емисия на ексимерната форма). Белегът формира ексимери, когато две пиренови групи се сближат и насложат една срещу друга на разстояние от 4 до 10 Å. Появата на такива ексимери означава образуване на белтъчни асоциати и агрегати [Chiti, 2010]. В табл. 2 е показано, че ексимеризацията на N-(3-Пирен)малеимид и анизотропията на неговото излъчване са значително по-големи, когато той е свързан към белтъците на щадящо пермеабилзираните ЕМ, отколкото когато е свързан с белтъци на контролни ЕМ. Ексимеризацията на белега нараства с 67 % след пермеабилзирането на ЕМ, което показва значително по-голяма степен на асоциация на мембранните

белтъци. До същия извод води и нарастналата анизотропия на флуоресценцията на пирен малеимида, която може да се дължи на намалена ротационна подвижност и поява на белтъчни асоциати след пермеабилзацията.



**Фиг. 13.** Температурна зависимост на ексимеризацията на N-(3-Pyren)maleimide, свързан към контролни EM (A) и DIDS-третиранни EM (B), изолирани от човешки еритроцити. Измерванията върху EM са провеждани при посочените температури след 4.5 min инкубация. Със стрелки са отбелязани: температурата на денатурация на

спектрин ( $T_A$ ), температурата на денатурация на анионния обменник ( $T_d$ ) и температурата на полуизтичане на цитозолните електролити ( $T_{g0}$ ).

Степента на асоциация на интегралните белтъци може да се оцени и по ефективността, с която се пренася енергия от възбудени с фотони триптофанови остатъци на тези белтъци към пирен, локализиран в околните слой от ануларни липиди. Ефективността на енергийния пренос зависи от обема на контактната зона между триптофановите остатъци и ануларните липиди, намиращи се не по-далеч от 3,6 nm (Dobretsov, 1989). На фиг. 12 е представена връзката между интензивността на флуоресценция на триптофана и концентрацията на пирена (т.е., гасенето на триптофана) за контролни и пермеабилizирани EM. Ако тази връзка се представи в двойно-реципрочна координатна система ще се получи права линия. При екстраполация на концентрацията на пирена към безкрайност ( $1/C \rightarrow 0$ ) правата линия пресича ординатата ос в точка, чията стойност е равна на реципрочната стойност на максимално възможната ефективност за енергиен пренос, съответстваща на пълно гасене на всички възбудени места в мембраната (Borochov et al, 1977). От тази графика се определя, че максималната ефективност за енергиен пренос в контролните EM е 0.92, което е много близо до стойността 0.95 за интактните EM (Kowalska and Cierniewski, 1983). За пермеабилizирани EM обаче, тази величина е само 0,70, което показва значително намаление на контактната зона между мембранните

белтъци и околните липиди. Това е ново свидетелство за нарастване на степента на асоциация на интегралните белтъци и отстраняване на част от липидите, контактуващи с тях, след разрушаване на мишената на топлината.

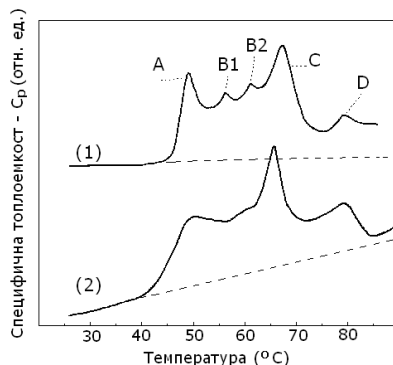
Промените в интегралните белтъци, настъпващи по време на разрушаването на топлинната мишена в ЕМ беше изследвано и при последователно нарастване на температурата (Ivanov et al., 2011). На фиг. 13 е показано, че при ниски температури ексимеризацията на РuM, свързан към белтъците на ЕМ, монотонно намалява с температурата, което може да се обясни с температурния ефект върху флуидността на ЕМ. Прагов спад на ексимеризацията, съответно разпадане на част от белтъчните асоциати, се наблюдава в температурните области, където денатурира спектрина ( $T_d$  – освобождаване на движението на интегралните белтъци) и анионния обменник ( $T_d$  – разпадане на димерите на анионния обменник). Както вече може да се очаква, около температурата на разрушаване на топлинната мишена ( $T_{90}$ ) ексимеризацията нараства, което показва нарастване на степента на асоциация (групиране, агрегация) на мембранните белтъци. Най-вероятно в този прагов процес на асоцииране участва предимно белтъкът на анионния обменник, тъй като спектринът вече е денатуриран, а гликофоринът е лишен от SH-групи и не залавя белега. Този извод се подкрепя и от голямото (почти 100%) намаление на ексимеризацията на РuM при ЕМ, обработени с DIDS (фиг. 13), за който е известно, че стабилизира димерната за сметка на полимерната форма на анионния обменник. Същите изводи бяха направени и въз основа на температурната зависимост на подвижността на спин-белега 3-maleimido-proxyl, ковалентно свързан към белтъците на ЕМ, най-вече към анионния обменник (Ivanov et al., 2011).

#### **V. 7. Микрокалориметрично изследване на топлинната мишена (термичния преход) в ЕМ, отговорна за термохемолизата (Ivanov et al., 1999; Ivanov et al., 2007)**

Мембранният процес – мишена на топлината при топлинната хемолиза беше изследван и с метода на DSC в условията на съхранена структура на спектрина. За целта бяха използвани т.н. еритроцити и изолирани ЕМ, претърпели необратима, но щадяща топлинна пермеабилзация.

Температурната денатурация на всеки белтък (полипептид) е ендотермичен процес, който се регистрира с метода на диференциалната сканираща микрокалориметрия (DSC). С този метод се измерва скоростта на поглъщане на топлина от белтъка като функция на температурата. Ако пробата е смес от няколко белтъка, или белтъкът съдържа няколко различни полипептида, техните денатурации се разделят като различни ендотермични пикове върху температурната ос.

DSC-термограмата на EM, изолирани от интактни еритроцити, беше регистрирана с два микрокалориметъра - ДАСМ-4, Русия (фиг. 14, крива 1) и MSC Microcalorimeter на фирмата MicroCal, САЩ (фиг. 15, крива 1). Термограмата на фиг. 14 представя известните пет еднотермични пика: А (49.5°C) – денатурация на фибриларните молекули на спектрина (Brandts et al, 1977), В1 (56°C) – денатурация на минорни периферни белтъци, вероятно анкирин и белтъка от ивиците 4.1 и 4.2 (Lysko et al, 1981), В2 (62°C) – денатурация на цитоплазматичния домен на мономера на анионния обменник (Davio and Low, 1982), С (68°C) – денатурация на трансмембрания домен на мономера на анионния обменник (Davio and Low, 1982) и D (78°C – денатурация на неизвестен белтък, вероятно на периферния белтък тропомиозин). При съдържание на йони под 50 mM пиковите В1 и В2 се сливат в един общ пик, обозначаван като пик В (фиг. 15, крива 1).



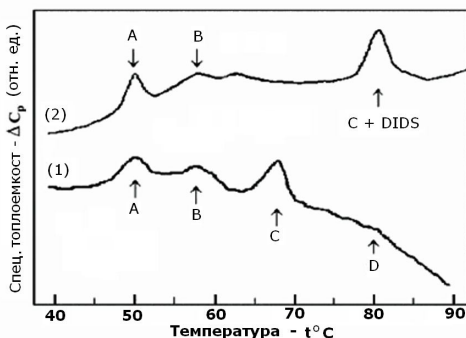
**Фиг. 14. DSC-термограми на контролни (1) и термично пермеабилizирани (2) EM. Всеки връх отговаря на топлинната денатурация на определен вид мембранен белтък. Концентрация на белтъците 3 mg/ml, скорост на сканиране 1.0 K/min. Суспензионната среда съдържа 100 mM фосфатен буфер, pH 7.4. С пунктир е отбелязана базовата линия.**

На същата фиг. 14 (крива 2) е представена и DSC-термограмата на EM, изолирани от щадящо пермеабилizирани еритроцити. Микрокалориметричният профил на тези EM демонстрира същите денатурации, показани с пиковите А, С, D и вероятно В2. Енталпията на денатурация на спектрина (площта на А пика) е почти еднаква за двата вида EM. Площта на пика С е почти една и съща при двете термограми, което показва, че практически целия брой мономери на анионния обменник не са претърпели денатурация по време на термопермеабилizацията на EM. Тези резултати потвърждават данните на SDS-PAGE изследването, че топлинната денатурация на двата главни мембранни белтъка, спектрина и анионния обменник, не е нужна и не участва в термичната пермеабилizация, а от тук и в механизма на термохемолизата.

От фиг. 14 и 15 се вижда, че температурата на денатурация на спектрина (49.5°C) е една и съща при контролните и пермеабилizираните EM, което отново показва съхранена структура на спектрина. Обаче, двата

микрокалориметъра показаха, че температурата на денатурация на трансмембрания домен на мономерите на анионния обменник е понижена при пермеабилзираните ЕМ с 2°C (фиг. 14, крива 2) и 2.5°C (фиг. 16, крива 3) спрямо контролата (67°C) (фиг. 14, крива 1; фиг. 15, крива 1). Тези находки показват, че за разлика от спектрина, този домен е претърпял предденатурационна структурна промяна при пермеабилзицията.

Тази промяна беше по-подробно изследвана с използване на бифункционалния реагент DIDS при ниски концентрации (<50 µM), когато той се свързва едновременно и специфично за вътрешните хидрофилни пори на двата мономера на анионния обменник. След това свързване структурната стабилност на всеки трансмембранен домен силно се повишава и температурата на неговата денатурация скокообразно нараства с 13°C, т.е., от 67 на 80°C. За интактни еритроцити тази структурна стабилизация е показана на Фиг. 15 (крива 2).

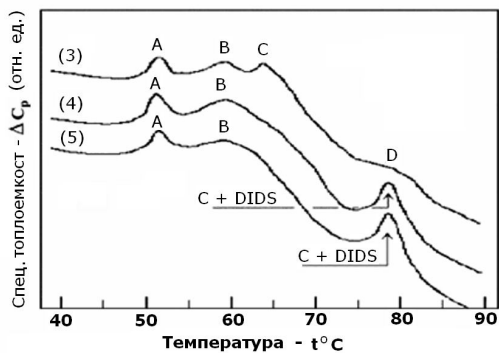


**Фиг. 15. Термограми на ЕМ, изолирани от интактни еритроцити (1) и на ЕМ, изолирани от обработени с DIDS интактни еритроцити (2). Обозначението на пиковите е обяснено в текста.**

Денатурационната температура на трансмембрания домен на анионния обменник беше определена с метода на DSC при еритроцити, обработени с DIDS и в последствие пермеабилзирани, както и при пермеабилзирани еритроцити, в последствие обработени с DIDS (фиг. 16, криви 4 и 5). И в двата случая трансмембрания домен на анионния обменник повиши денатурационната си температура скокообразно на 76.5°C. Получената стойност е с 3.5°C по-ниска от тази при стабилизирания с DIDS интактен анионен обменник – 80°C (фиг. 15, крива 2). Този и предишните резултати вероятно показват, че когато термопермеабилзицията преминава от обратима към необратима фаза, в трансмембрания домен на анионния обменник се индуцира някакъв ограничен по мащаб структурен преход, водещ до понижаване на денатурационната му температура с около 2.5°C и до слабо понижаване на способността на DIDS да стабилизира този домен. По принцип по-голяма склонност към взаимна асоциация имат белтъците с по-голямо

съдържание на хидрофобни аминокиселинни остатъци. В случая посочения предденатурационен преход може да увеличи хидрофобността на трансмембрания домен, което да има връзка с необратимата кластеризация на белтъка и отстраняването на част от ануларните му липиди.

Горните резултати показват, че способността на DIDS да стабилизира термично мономерите на анионния обменник не се премахва след пермеабилзацията или от пермеабилзацията на EM. Този извод подкрепя заключението, получено с други методи, че практически всички мономерни на анионния обменник съхраняват своята вторична и в значителна степен своята третична структура след пермеабилзацията на EM. В същото време пермеабилзацията на EM се съпътства от значителна промяна в третичната структура на целия брой (1 млн.) мономерни на анионния обменник, която промяна обаче е далеч от състоянието на крайна денатурация.



**Фиг. 16.** DSC-термограми на EM, изолирани от пермеабилizирани еритроцити (3) и на EM, изолирани от пермеабилizирани еритроцити, които са обработени с DIDS преди (4) и след (5) пермеабилзацията.

#### **V. 8. Пряко доказателство, че анионният обменник участва в топлинната мишена (термичния преход в EM) отговорна за термохемолизата (Ivanov et ., 2011)**

Всички представени дотук резултати се отнасят до промяната в EM, настъпваща по време на «разрушаването» на нейната топлинна мишена, отговорна за термохемолизата. Използваните методи (DSC, SDS-PAGE, спектрофлуориметрия, ЕПР, omрежаване на белтъците с FNPS) показват, че анионният обменник търпи значителна предденатурационна промяна при разрушаването на мишената, докато другите главни белтъци (спектрин, гликофорин) не участват в мишената. Изследването с DSC позволи тази промяна да се регистрира на ниво третична структура на анионния обменник, т.е, беше установена структурна промяна в самия мономер на обменника, без

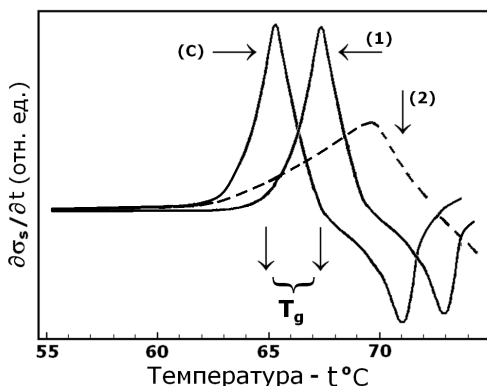
да настъпва денатурация. В добавка, данните получени чрез омрежаване на белтъците с FNPS, спектрофлуориметрия и ЕПР показаха, че промяната в мономерите на анионния обменник води до промяна на неговите димери, която от своя страна води до повишаване на степента на асоциация и групиране на димерите на обменника в по-високомолекулни агрегати.

Посочената промяна на анионния обменник е в състояние да обясни както зависимостта на термохемолизата от съдържанието на сфингомиелин в ЕМ (V.3), така и посочените по-горе (V.4) кинетични особености на йонната проницаемост, предизвикваща термохемолизата. Въпреки това, трябва да се отговори директно на въпроса – дали тази промяна на анионния обменник съпътства разрушаването на мишената, като има бегло значение за нея, или тази промяна представлява самото разрушаване на мишената? За тази цел трябва да се представят преки доказателства, че анионният обменник участва в мишената, например – специфичното стабилизиране на структурата на анионния обменник трябва да подтиска йонната проницаемост и да забавя термохемолизата. По-долу се представя такова доказателство на основата на ефекта на DIDS върху йонната проницаемост и термохемолизата.

DIDS е мембранонепроницаващ, високоспецифичен, ковалентен инхибитор и мощен термичен стабилизатор на анионния обменник. Ако анионният обменник участва по някакъв начин в хемолизата при високи температури (45-57°C) то свързването на DIDS към него трябва да има силен подтискащ ефект върху хемолизата. Много изследователи (Черницкий и Ямайкина, 1988; Lerock et al., 1989) обаче съобщават, че свързването на DIDS към анионния обменник няма никакъв ефект върху топлинната хемолиза и заключават, че анионният обменник няма отношение към нея. Prinsze et al., (1991) докладват, че свързването на DIDS към анионния обменник увеличава (вместо да подтиска!) йонната проницаемост и термохемолизата. Причината за тези резултати е в неподходящите условия (pH 7.4 и отсъствие на щадящи фактори), при които тези автори са свързвали DIDS към анионния обменник.

В настоящия труд бяха намерени условия, при които свързването на DIDS към анионния обменник увеличава значително мембранната термостабилност ( $T_{50}$ ) на еритроцитите и тяхната резистентност  $t_{1/2}$  срещу топлинна хемолиза (Ivanov et al., 2011). Тези условия, условно обозначени като „оптимални“ и „щадящи“, включват инкубация на еритроцитите в изотонична среда, съдържаща 100 mM NaCl, 100 mM захароза, 2 mM EDTA, 20 mM Трис буфер, pH 8.2, 15  $\mu$ M DIDS, температура 4°C в продължение на 10 min, хематокрит 0.10. От решаващо значение за резултата е стойността на pH (при pH 7.4 и pH 9.0 наистина няма ефект!), както и присъствието на захароза и EDTA, които играят ролята на протектори за ЕМ. В последствие бяха намерени и други такива „оптимални“ условия (1 - умерено хипотонична среда от 90 mM NaCl; 2 – изотонична, но силно нискоийонна среда от 30 mM NaCl и захароза), общото в които е привеждане на еритроцитите в гладка, сфероподобна форма. При всички тези случаи обаче, максималното повишение от 2.5°C на  $T_0$  не може да бъде надвишено.

Суспензии, съдържащи контролни и третирани с DIDS (15  $\mu\text{M}$ , pH 8.2) еритроцити се загряваха от 20 до 70°C с различни, но постоянни скорости на загряване (2-8°C/min). Промените в суспензионната проводимост  $\sigma_s$  в течение на загряването показаха, че температурната зависимост на изтичане на електролити от клетките се описва със сигмоидна крива. След диференциране на  $\sigma_s$  по време (температура) тази крива се превръща в симетричен пик, центриран около критичната средна температура на изтичане на йоните,  $T_q$  (фиг. 17), съответстваща на максимална скорост на изтичане и на момента за полуизтичане на йоните. След този пик в ЕМ се формираха бариерни дефекти с нарастващ размер, проницаеми за манитол, захароза и накрая рафиноза.



**Фиг. 17. Ефект на DIDS върху изтичането на цитозолните йони и термичната стабилност на ЕМ,  $T_g$ . Еритроцитите са обработвани при оптимални условия (виж текста) с 15  $\mu\text{M}$  DIDS (крива 1) и без DIDS (крива С - контрол). Крива 2 показва изтичането на йони от ЕМ, обработени с DIDS при неоптимални условия.**

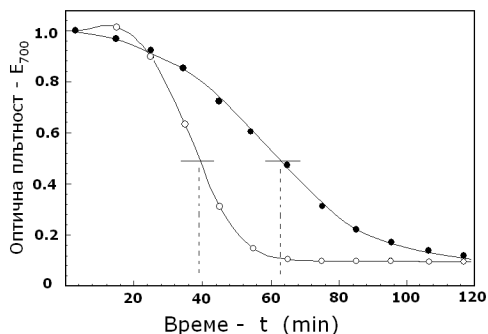
Екстраполирана към ниска скорост на загряване (0.5°C/min),  $T_q$  беше използвана като мярка за термостабилността на ЕМ и обозначавана с  $T_{g0}$ .  $T_{g0}$  имаше по-висока стойност при DIDS-обработените еритроцити,  $63.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$ , спрямо тази при интактните еритроцити,  $60.7 \pm 0.2^\circ\text{C}$  (табл. 3). Същият резултат беше получен и с ЕМ, изолирани от DIDS-обработени еритроцити, както и с интактни ЕМ, впоследствие обработени с DIDS (не е показано).

Контролни и обработени с DIDS еритроцити бяха инкубирани при 53°C за да се сравни хода на тяхната топлинна хемолиза (фиг. 18). Времето,  $t_{1/2}$ , за хемолиза на 50% от еритроцитите беше използвано като мярка за тяхната резистентност спрямо топлинна хемолиза. При DIDS-обработените еритроцити  $t_{1/2}$  беше средно с около 65 % по-голямо спрямо това при интактните еритроцити (табл. 3).

DIDS-обработените еритроцити показаха както увеличена резистентност спрямо хемолиза (табл. 3), така и забавено изтичане на йоните (фиг. 17, крива 1) единствено в случай, когато обработката с DIDS се провеждаше при посочените по-горе щадящи и оптимални условия. Ако обработването на

еритроцитите с DIDS се провеждаше при други условия, изтичането на йони при високи температури имаше по-неблагоприятен ход (фиг. 17, крива 2) и като следствие – резистентността срещу топлинна хемолиза се влошаваше (резултат публикуван от Prinsze et al., 1991). Нещо повече, даже и след обработка на еритроцити с DIDS при оптимални условия, на фона на общото стабилизиране на клетките (фиг. 18) част от тях (вероятно най-старите) се сенсibiliзираха срещу действието на топлина. Съгласно фиг. 18, термичната хемолиза на контролните клетки започва след един период на задръжка, по време на който всички клетки съхраняват своя хемоглобин. При обработените с DIDS клетки този период на задръжка обаче липсва и сенсibiliзираните клетки започваха да лизират непосредствено с излагането им на въздействието на хемолитичната температура.

В заключение, в настоящия труд беше установено участие на молекулите на анионния обменник в мембранната мишена на топлината, чието разрушаване стои в основата на активацията на йонната проводимост и топлинната хемолиза. На второ място, разрушаването на мишената се съпътства от сближаване (асоцииране) и обездвижване на молекулите на анионния обменник, което може да бъде причина за самата активация на йонната проводимост.



**Фиг. 18. Ефект на DIDS върху хемолизата на еритроцити при  $53^{\circ}\text{C}$ . Клетките са обработвани с DIDS (●) и без DIDS (○) при оптимални условия. Степента на хемолиза се определя по оптичната плътност на суспензията при  $700\text{ nm}$  ( $E_{700}$ ), нормализирана спрямо началната ѝ стойност.  $N = 4$ .**

Степента на взаимна асоциация на молекулите на анионния обменник в ЕМ и подвижността на образуваните молекулни комплекси са добре изучени при температури близки до физиологичната температура. В зависимост от своята ротационна и трансляционна подвижност, тези молекули условно се разделят на две групи: 1) свободни димери и 2) асоциати от димери и други интегрални белтъци, обездвижени чрез свързване към спектриновия цитоскелет (Kodippili et al., 2009). Съгласно (Tsuji et al., 1988) равновесието между свободните и обездвижени молекули на анионния обменник силно се мени с температурата: при  $20^{\circ}\text{C}$  около 70% от тези молекули са свободни димери (30% обездвижени

тетрамери), докато при 45°C свободните са около 15%, а обездвижените 85%. От своя страна обездвижените молекули се подразделят на няколко вида асоциати (полимери) в зависимост от това, по колко димера се съдържат във всеки полимер. Ако тази температурна зависимост се екстраполира към високи температури ще се получи, че малко преди 61°C ( $T_g$ ) всички димери ще са агрегирани. Кинетичните данни на този процес (лаг период, начална обратимост, зависимост от температурата, отсъствие на денатурация) също подкрепят възможността той да стои в основата на «разрушаване» на мишената, отговорно за активацията на йонната проницаемост. Засега не е ясно как този естествен за ниските температури и обратим термо-индуциран процес на асоцииране на анионния обменник преминава в необратим около  $T_g$ . Вероятно причината е посочения ограничен по мащаб пред-денатурационен преход в трансмембрания домен на белтъка, при което неговата денатурационна температура се понижава с около 2.5°C.

**Табл. 3. Мембранна термостабилност,  $T_{90}$ , и резистентност,  $t_{1/2}$ , срещу термична хемолита на контролни и DIDS-обработени еритроцити. За условията на обработка и смисъла на  $T_{90}$ , и  $t_{1/2}$  виж текста.**

Изследвани еритроцити	$t_{1/2}$ (min)	$T_{90}$ (°C)
Контролни еритроцити	38 ± 2	60.7 ± 0.2
DIDS-обработени еритроцити	63 ± 3	63.2 ± 0.3

#### **V. 9. Биологично значение на свързания с термохемолитата мембранен преход – мишена на топлината (Ivanov, 1993, 1997, 1999b, 2005)**

При нормални условия анионният обменник на еритроцитите (т.н. AE1 белтък) играе ключова роля в поддържането на здравината и целостта на тези клетки, както и на тяхната функция. Главният извод от настоящия труд е, че този белтък играе ключова роля, без да се денатурира, и при хемолитата на еритроцитите при високи (45-57°C) температури. Това предопределя и връзката на топлинната хемолита с някои други биологични явления, които протичат както при физиологични, така и при нефизиологични условия.

##### **V. 9. 1. Биофизични основи на връзката «терморезистентност – продължителност на живот» при еритроцити от бозайници.**

Еритроцитите от бозайници нямат способността да синтезират de novo белтъци и тяхното време на живот може да се разглежда като функция на няколко фактора, едни от които повишават, други намаляват техния жизнен потенциал. Като такъв фактор е посочен окислителният стрес и

противодействащата му антиокислителна система на еритроцитите, който обаче не може да обясни някои експериментални факти. Други такива фактори могат да бъдат терморезистентността на клетките и йонната проницаемост при 37°C. Например, намалената продължителност на живот на еритроцити от анемични пациенти се обяснява с увеличената катионна проницаемост на техните ЕМ (Komeno et al., 1996).

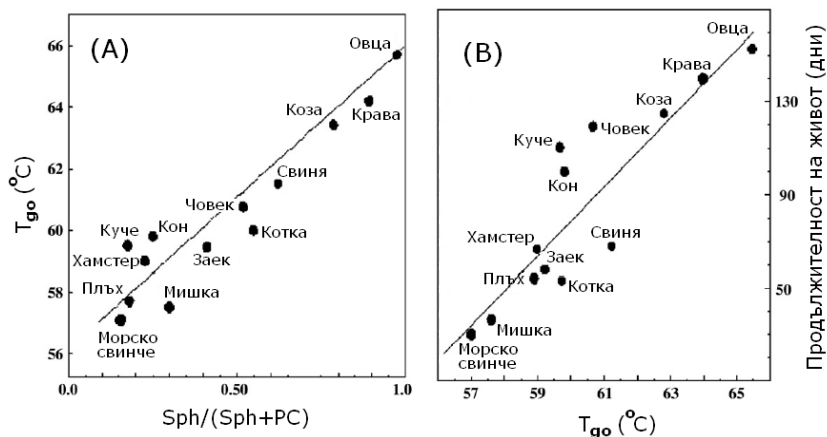
Действително, известни са резултати, които показват положителна корелация между терморезистентността на микроорганизми и тяхната продължителност на живот. Подобна корелация беше получена и за еритроцити от 13 случайно подбрани вида бозайници – фиг. 19 (Ivanov, 1993, 2005). Между терморезистентността на еритроцитите, изразена чрез температурата  $T_{90}$  на прехода в мишената на техните ЕМ и продължителността на живот на еритроцитите в кръвообръщението се установява силна положителна линейна корелация ( $r = 0.87$ ). Тази корелация показва, че еритроцитите с по-голяма способност да устояват на увреждане от топлина и други вредни условия са способни на по-дълъг живот в кръвообръщението, без обаче това да означава по необходимост причинно-следствена връзка.

Една възможна причина за тази корелация може да бъде в качествата на основният участник в мишената на топлината – анионния обменник. Това е главен интегрален белтък, чиято стабилност зависи от състоянието и състава на липидния бислой. От друга страна от този белтък в голяма степен зависи здравината и целостта на еритроцитите.

Втора причина за посочената корелация може да се търси във влиянието на топлинната мишена върху йонната проницаемост на ЕМ при физиологична температура. За да се оцени това влияние температурната зависимост на йонната проницаемост  $P$  на ЕМ от човек е представена в един по-широк интервал около физиологичната температура (фиг. 20). За удобство е използвана Арениусова координатна система ( $y = \lg P$ ;  $x = 10^3/T$ ), където  $T$  е термодинамичната температура. Данните за интервала 5-37°C са получени чрез измерване скоростта на изтичане на  $K^+$  от еритроцитите (Гордиенко и Гордиенко, 1986; Hall and Willis, 1986). За интервала 38 - 57°C са ползвани собствени данни, получени чрез измерване скоростта на свиване на еритроцити, суспендирани в изотонична среда от 60 mM NaCl и захароза (Ivanov, 1999b, 2005). За интервала 45-57°C са използвани интактни еритроцити (Ivanov, 1993), докато в интервала 38-45°C са ползвани еритроцити, инхибирани с уабаин (инхибитор на помпите за активен транспорт на  $K^+$  и  $Na^+$ ), защото йонната проницаемост  $P$  е ниска и сравнима с активния транспорт за  $K^+$  и  $Na^+$  (Ivanov, 2005).

Както се вижда от Фиг. 20, всички стойности на йонната проницаемост  $P$  за интервала от 38-57°C лежат на една права линия, което показва, че за целия този интервал  $P$  се явява температурно активируем параметър:  $P = P_0 \cdot \exp(-E_a/RT)$ . Определената от наклона на правата линия активационна енергия е  $E_a = 250 \pm 15$  kJ/mol. Този резултат показва, че за целия интервал от 38 до 57°C съществува една единствена мишена, чието разрушаване активира

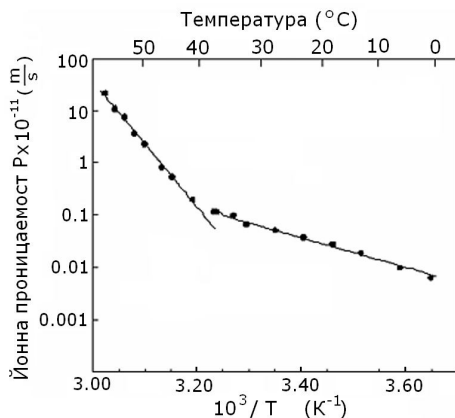
температурно йонната проницаемост в ЕМ. За високотемпературната част (50-57°C) на този интервал, тази мишена беше идентифицирана като мембранна мишена на топлината, чието разрушаване (мембранен преход при 61°C) е отговорно за усилването на йонната проницаемост и хемолизата при хипертермия.



**Фиг. 19.** Видови различия при бозайници в мембранната термостабилност  $T_{go}$  (Ivanov, 1993, 1997, 2007) - (A) и продължителността на живот на еритроцитите в кръвообръщението (по литературни данни) - (B). Броят на измерванията на  $T_{go}$  са: овца (5), коза (2), свиня (2), човек (100), кон (2), заек (5), плъх (6), мишка (2), морско свинче (3) и куче (1). Разликите в  $T_{go}$  при даден вид са по-малки от 0.2°C. (A): Количеството на фосфатидилхолин (PC) и сфингомелин (Sph) са в % спрямо общите фосфолипиди на ЕМ (Deuticke, 1977).

Съгласно данните на фиг. 20, йонната проницаемост на ЕМ в интервала 5-37°C е температурно активируем параметър с  $E_a = 56$  kJ/mol. Последната стойност е много близка до активационната енергия на йонната проницаемост на бислоини липозоми с голям радиус. От тук авторите заключават, че механизмът за температурна активация на P в този интервал включва ефект на температурата върху липидния бислои на ЕМ (флуидизиране). В действителност P сменя незначително активационната си енергия в интервала 5-17°C (не е показано).

Фиг. 20 показва, че нормалната телесна (физиологична) температура от 36.7°C се явява гранична точка (контактна зона) за двата механизма на активация на Р. Непосредствено под телесната температура преобладава активацията посредством флуидизиране на бислоя, докато непосредствено над тази температура превес взема механизмът, променящ интегралните белтъци и главно анионния обменник. Този резултат не е случаен и, ако допуснем неговата валидност и за ядросъдържащите животински клетки, има потенциал да обясни еволюционния избор на стойността на телесната температура при човек и бозайници.



**Фиг. 20. Температурна зависимост на йонната проницаемост Р на еритроцити от човек.**

Възниква въпросът – какъв е приносът на всеки един от посочените два механизма при формиране на стойността на йонната проницаемост на ЕМ при 37°C? Данните представени

в табл. 4, макар да имат предварителен характер, могат да хвърлят светлина върху този проблем. Най-подробни и точни са данните за ЕМ от човек. Екстраполирайки праволинейната зависимост за Р, получена експериментално за интервала 38-57°C към 37°C, получаваме стойността  $0.60 \times 10^{-12}$  m/s. Подобна близка стойност ( $0.81 \times 10^{-12}$  m/s) се изчислява и от измерената скорост за свиване на еритроцитите при 37°C. Тези стойности съставляват около 60 % от измерената стойност (средно  $1.18 \times 10^{-12}$  m/s) за катионната проницаемост на ЕМ от човек при 37°C (Brumen and Heinrich, 1984). До подобен извод водят и сравнителните данни за ЕМ от други два вида (табл. 4). В заключение, данните от фиг. 20 и табл. 4 показват, че хипертермичния механизъм за активация на йонната проницаемост може да е отговорен за значителна част (50 – 70%) от физиологичната стойност на тази проницаемост при телесната температура на човек и други бозайници.

Този извод обуславя връзката на (част от) пасивната йонна проницаемост на ЕМ при 37°C с прехода-мишена, който активира тази проницаемост в условията на хипертермия и оттам с резистентността на еритроцитите срещу

топлинна хемолiza. Колкото съдържанието на сфингомиелин в ЕМ е по-голямо, толкова преходът в мишената ще бъде повече затруднен и съответно йонната проницаемост при 37°C ще бъде по-ниска. От тук загубата на енергия за поддържане на йонната хомеостаза на еритроцитите ще бъде по-малка, което благоприятства тяхното по-продължително пребиваване в кръвообращението.

**Табл. 4. Екстраполация към 37°C на данните за високотемпературната йонна проницаемост,  $P \times 10^{+12}$  (m/s), при еритроцити от различни бозайници, сравнена със стойността за пасивната, убаин-нечувствителна проницаемост за катиони при 37°C. N=2.**

Вид	Стойност, получена чрез екстраполация на данните за $P$ към 37°C	Убаин-нечувствителна проницаемост за $K^+$ и $Na^+$ , измерена при 37°C
Човек	0.60 (0.81*)	1.10 за $P_K$ (a) 1.28 за $P_{Na}$ (a)
Овца	0.25	0.22 (b)
Бивол	0.40	0.46 (b)
Коза	0.65	0.37 (b)

(\*) -стойност пресметната от измерената скорост на свиване; (a) – по Brumen and Heinrich (1984); (b) – стойност според данните на Kirk (1977)

Макар това обяснение да е по принцип обосновано, остава проблемът с онази част от пасивната проницаемост при 37°C, която се дължи на нискотемпературния механизъм (фиг. 20). Веднага трябва да се посочи, че както високотемпературния, така и нискотемпературния механизъм за активация на йонната проницаемост при 37°C зависят по сходен начин от липидния състав на ЕМ. Липидният състав и по-точно съотношението сфингомиелин / фосфатидилхолин влияе силно върху биофизичните параметри на моделни мембрани и ЕМ от бозайници (Deuticke, 1977). Това се обяснява главно с различният индекс на ненаситеност при фосфатидилхолина (0.33) и сфингомиелина (0.96) поради което вторият липид повишава подредеността и намалява флуидността на липидния бислой. При 37°C проницаемостта за неелектролити в изкуствени липозоми с големи размери (Lande et al., 1995) и ЕМ от бозайници (Scott, 1993) се влияе по сходен начин от липидния състав и по-точно от флуидността. И при двата вида мембрани по-високото съдържание на сфингомиелин съответства на по-ниска флуидност и по-малка проницаемост. Подобна зависимост е установена и за йонната ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $PO_4^{2-}$ ) проницаемост на ЕМ от бозайници при 37°C (Kirk, 1977). Дискутирайки влиянието на липидния състав на ЕМ върху йонната проницаемост на еритроцити от бозайници при 37°C, Erdmann et al. (1990) обаче стигат до заключението, че освен липидната фаза, трябва да има

някакъв допълнителен и важен фактор, който влияе на тази проницаемост. Представените по-горе данни на фиг. 20 и табл. 4 показват, че този допълнителен фактор може да бъде свързаната с термохемолизата активация на пасивната проницаемост, която проектирана към 37°C съставлява повече от половината от физиологичната йонна проницаемост на ЕМ при 37°C.

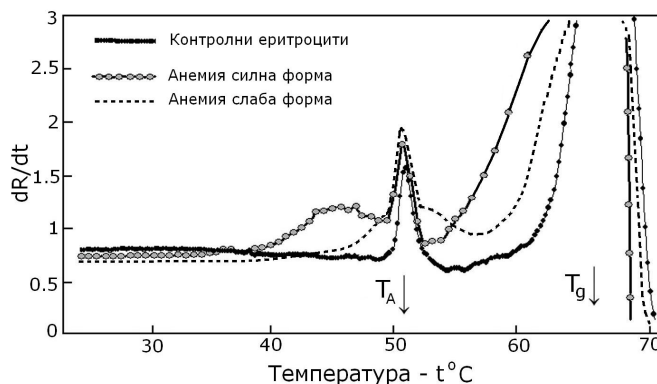
При физиологична температура йонната дифузия, която съответства на свързаната с термохемолизата компонента на йонната проницаемост е слаба и се компенсирана от активния транспорт на  $K^+$  и  $Na^+$ . В сравнение с активния транспорт на катиони обаче, тази дифузия е много по-силно активируема от температурата. Като следствие, при по-високи температури (38-45°C), тази дифузия при еритроцитите ще бъде само частично компенсирана от активния транспорт и то толкова по-слабо, колкото по-висока е температурата. Това може да обясни факта, че хемолизата при по-ниски температури (40-45°C) протича с по-ниска от предсказаната скорост (Wilbrandts, 1941) и по-малка  $E_a$  (156 вместо 300 kJ/mol) (Gershfeld and Murayama, 1988). По тази причина в настоящия труд йонната проницаемост в този интервал беше определяна с еритроцити, чийто помпи за активен транспорт са инхибирани.

#### **V. 9. 2. Използване на метода на термичния анализ на импеданса на еритроцитна суспензия за установяване на хемолитична анемия тип мембранопатия (Ivanov et al., 2007, Иванов и др., 2010)**

При контролни еритроцити, суспендирани в изотонична, нискосолева среда от NaCl и захароза, този метод регистрира два прехода в ЕМ при 49.5°C (денатурация на спектрина) и 60.7°C (активация на йонната проницаемост). Посочените преходи в ЕМ се детектират върху деривативната термограма (фиг. 1 и 21) като два пика, центрирани при температурите  $T_d$  и  $T_g$ .

Вродените анемични състояния при човек и бозайници се дължат на променени гени, кодиращи нетрайни или нефункциониращи белтъци в еритроцитите. В зависимост от локализацията на променения белтък се различават ензимопатии (например хемоглобинопатии) и мембранопатии. Мембранопатиите са по-редки (1:10 000), в скандинавските страни значително по-чести (1:2000) случаи с различна степен на проявление. Една от най-важните мембранопатии е т.н. микросфероцитна анемия или синдром на Минковски-Шофар, при която една от няколко връзки между интегралните белтъци и подмембрания скелет е нарушена, поради което интегралните белтъци са по-подвижни. Това се обяснява с промяна на анионния обменник, спектрина или някои от минорните белтъци на подмембрания скелет. Молекулите на анионния обменник при контролните еритроцити са разделени в две групи според техния коефициент на латерална дифузия – група на бързо движещи се (23%) и група на бавно движещи се (77%) молекули. Обратно, при анемичните еритроцити групата на бързо

дифундиращите е по-многобройна (80%) за сметка на тази на бавно дифундиращите - 20 % (Kodippili et al., 2009).



**Фиг. 21. Деривативна кондуктометрична термограма на еритроцити от анемичен пациент с мембранопатия тип Minkowski-Shauffard. Еритроцитите (хематокрит 0.40) са суспендирани в изотонична среда от 60 mM NaCl и захароза. Честота и скорост на загряване – 100 kHz и 3.5°C/min, съответно.**

Фиг. 21 показва силно променена термограма при еритроцити от пациент с остра форма на микросфероцитна анемия (N = 4). Промяната засяга най-вече бариерната функция на ЕМ, при което активацията на йонната проникваемост преди  $T_g$  започва при значително по-ниска температура. Това може да е следствие от посочената по-горе увеличена подвижност на молекулите на анионния обменник при еритроцитите с мембранопатия. След премахване на съдържащото действие на спектрина при 50°C настъпва бърза агрегация на анионния обменник, водеща до активиране на йонната проникваемост и изливане на цитозолните йони. Обратно, при контролните еритроцити ефекта от отпадането на спектриновата бариера след 50°C не се отразява толкова съществено на дифузията на тези молекули и съответно на тяхната асоциация.

Появява се и нов пик, центриран при 45°C, дължащ се на локален температурно-индуциран процес в ЕМ, който се регистрира само при ниски и средни честоти ( $f < 200$  kHz). Началото на този пик се припокрива с телесната температура (37°C), което се съгласува с данните за повишена йонна проникваемост на този вид анемични еритроцити (Bruce, 2009). Тези отклонения са по-слабо проявени при пациенти с умерена форма на

заболяването (N=3). И в двата случая денатурацията на спектрина протича нормално. Интересно е, че и двете отклонения в термограмата на анемичните еритроцити се премахват, ако еритроцитите се обработят с DIDS (20  $\mu$ M) или дипиридамол (лекарство против стенокардия, което действа подобно на DIDS). Това е указание, че тези отклонения имат връзка с анионния обменник на еритроцитите, който е наследствено променен.

С този метод бяха установени отклонения в термограмата и в други случаи на мембранопатии – наследствена хидроцитоза (ксероцитоза) (N=3) и пиропойкилоцитоза (N=1) (Ivanov et al., 2007).

### **V. 9. 3. Използване на метода на термичния анализ на импеданса на еритроцитна суспензия за сравняване на действието на органични разтворители върху мембранните белтъци (Ivanov, 2001)**

Голям брой органични разтворители намират приложение във фармацевтичната, козметичната и хранително-вкусовата промишленост, а така също и в много биологични и медицински методики за обработка на клетки и тъкани. Много често освен полезен ефект тези разтворители проявяват и цитотоксично действие. В тази връзка се изследва влиянието на органичните разтворители върху разтежа на микроорганизми и хемолизата на еритроцити. В допълнение към този тест за цитотоксичност, деривативният анализ на импеданса на еритроцитна суспензия (фиг. 1) предоставя допълнителна информация поради това, че с негова помощ се регистрират два термо-индуцирани прехода в различни по вид и местоположение мембранни белтъци – единия периферен при 49.5 $^{\circ}$ C и втория интегрален при 60.7 $^{\circ}$ C. Това дава възможност да се сравни действието на органичните разтворители върху структурната стабилност (денатурационната температура  $T_m$ ) на двата главни мембранни белтъка – спектрина и анионния обменник.

В присъствие на органичен разтворител всяка една от двете  $T_m$  се промени линейно с  $\Delta T_m$ , показвайки лабилизация ( $\Delta T_m < 0$ ) или стабилизация ( $\Delta T_m > 0$ ) на структурата на съответния белтък. Ако  $C_{ex}$  е молната концентрация на разтворителя в суспензионната среда, то силата F на разтворителя да променя конформационната стабилност на мембрания белтък може да се изрази като  $F = \Delta T_m / C_{ex}$ . Получените резултати показват, че колкото полярността на разтворителя и неговата способност да формира водородни връзки са по-високи, толкова F е по-слаба. При някои разтворители (диметил сулфоксид и диметил формамид) силата за дестабилизация на периферния белтък е равна на силата за дестабилизация на интегралния белтък. Формамидът дестабилизира избирателно периферния белтък. Някои разтворители (глицерол, особено еритритол) стабилизират термично двата белтъка. С нарастване на хидрофобността на разтворителите (етилен гликол < метанол < етанол < ацетон < пиридин < етил ацетат < диетил малеат) силата за дестабилизация на интегралния белтък расте. От тук е направен изводът, че ако трябва да се постигне ниска цитотоксичност, трябва да се

използват по-полярни разтворители с по-голяма способност да формират водородни връзки.

#### **V. 9. 4. Други приложения с потенциално биологично значение**

Анионният обменник на еритроцитите съставлява подклас от по-голямото семейство от сродни белтъци на плазматичните мембрани (т.н. АЕ семейство белтъци). Основната функция на тези белтъци е да осъществяват еквимоларна обменна дифузия на аниони и да поддържат вътреклетъчното рН и концентрацията на  $\text{Cl}^-$  при повечето клетки на гръбначните животни (Alper, 1991). Тази обменна дифузия на аниони при много тъкани притежава (в различна степен) същите особености, каквито тя има при еритроцитите: чувствителност към инхибитори от класа на дисулфононите стилбени (например ДИДС), електронеутралност на транспорта, специфичност към йонния субстрат. В добавка, белтъци подобни на анионния обменник са открити и в мембраните на бактерии и растителни клетки, където те извършват транспорт на аниони.

От казаното по-горе може да се очаква, че в условията на остра хипертермия ( $45-57^\circ\text{C}$ ) всички тези мембранни белтъци ще се променят по сходен начин както при еритроцитите от бозайници, така и при други видове клетки и ще повишават йонната проницаемост до степен, несъвместима с живота на клетките. В тази връзка трябва да се посочи, че както при еритроцитите от бозайници, подобно изливане на цитозолните йони беше регистрирано и при голям брой други видове клетки в условията на бързо загряване (Ivanov, 2002a). При бактерии (*Streptococcus faecalis*) то беше пряко свързано с резистентността им срещу клетъчна смърт, индуцирана от високи температури (Ivanov and Boytcheva, 1993).

Представените по-горе резултати обосновават използването на топлинната хемолiza като модел за ускорено стареене на еритроцитите. Причината е, че както при стареенето на еритроцитите, така и при топлинната хемолiza настъпват сходни промени в ЕМ (увеличена асоциация на анионния обменник, повишена йонна пропускливост).

Лекарствените противовъзпалителни вещества от определен вид имат способността да увеличават резистентността на еритроцитите срещу топлинна хемолiza. В тази връзка топлинната хемолiza е почти задължителен метод за изследване на механизма на противовъзпалително действие на лекарствата. Описаните по-горе промени в ЕМ при хипертермия могат да добавят нови данни към този механизъм.

### **VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ИЗВОДИ**

Настоящият труд е насочен към изясняване на механизма на индуцираната от топлинна хемолiza (некроза, онкоза) на определен вид моделни клетки - безядрени еритроцити от бозайници. Резултатите и представеният модел на

този механизъм са съвместими с концепциите за критична температура ( $T_g$ ) и критичен преход (първична мишена на топлината). Първичната мишена представлява пред-денатурационен (първоначално обратим) термо-индуциран (с индуцираща температура  $T_g$ ) преход в някои интегрални белтъци на ЕМ, най-вече анионния обменник. Преходът води към взаимна асоциация на тези белтъци, което силно активира ( $E_a = 250 \text{ kJ/mol}$ ) базалната проницаемост за йони, а тя от своя страна предизвиква хемолиза от колоидно-осмотичен тип над  $45^\circ\text{C}$ . Съдържанието на сфингомиелин в ЕМ на еритроцитите от бозайници оказва силно модулиращо влияние върху големината на  $T_g$  и оттам върху резистентността на тези клетки срещу топлинна хемолиза.

Съгласно този модел промените в проницаемостта на ЕМ, отговорни за топлинната хемолиза преминават през същите три етапа, характерни и за промените в проницаемостта на плазмалемата при клетъчната некроза: начална обратима фаза (предлетална фаза) при температура  $T \ll T_g$ , ранен етап на необратимата фаза (точка на необратимост) при  $T \approx T_g$ , и краен етап на необратимата фаза при  $T > T_g$ .

Трябва да се подчертае и значението на още един преход в ЕМ, този при  $49.5^\circ\text{C}$ , при който денатурира периферния белтък спектрин. Този преход променя необратимо формата, механичните и диелектричните качества на ЕМ, но няма първостепенен ефект върху бариерната функция и топлинната хемолиза.

Представения модел на топлинна хемолиза (като се вземе пред вид и ефекта на спектриновата денатурация) може да се приложи в условията на остра хипертермия при ядросъдържащи клетки, тъй като в тяхната плазмалема присъстват белтъци, подобни на еритроцитния анионен обменник. Този модел в значително по-чист вид е подходящ за бактерии, защото те не притежават спектринова мрежа.

## VII. СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

1. Денатурацията на спектрина при  $49.5^\circ\text{C}$  предизвиква спад в диелектричната поляризация (капацитет) на ЕМ но запазва постоянна проводимостта и йонната проницаемост, което подкрепи съществуващата представа, че тази денатурация не играе важна роля в механизма на термохемолиза.

2. За еритроцити от човек в интервала от  $38^\circ\text{C}$  до  $57^\circ\text{C}$  беше установен един единствен механизъм за температурна активация ( $E_a = 250 \pm 15 \text{ kJ/mol}$ ) на йонната проницаемост на ЕМ, който включва конформационен преход в интегрален белтък с индуцираща температура  $61^\circ\text{C}$  ( $T_{g0}$ ). Това показва смяна на механизма на активация при  $37^\circ\text{C}$ , който по литературни данни има  $E_a = 56 \text{ kJ/mol}$  за интервала  $10\text{-}37^\circ\text{C}$ .

3. За еритроцити от 5 бозайника (овца, крава, коза, кон, плъх)  $E_a$  за активация на йонната проницаемост има същата стойност както при човек, но

различни стойности на  $T_{90}$ , които корелират с резистентността  $t_{1/2}$  на тези клетки срещу топлинна хемолиза.

4. За еритроцити от 13 бозайника (овца, крава, коза, кон, човек, куче, свиня, заек, котка, морско свинче, хамстер, плъх, мишка) стойностите на  $T_{90}$  показват големи видови различия, менейки се между  $57.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$  при морско свинче и  $65.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$  при овца, но силно корелират ( $r = 0.944$ ) със съдържанието на сфингомиелин в ЕМ. На по-високо съдържание на сфингомиелин отговаря по-висока  $T_{90}$ .

5. Електрофоретичният (SDS-PAGE) и микрокалориметричният (DSC) анализ на белтъците на ЕМ необратимо, но щадящо пермеабилizирани при  $T_{90}$  показва, че разрушаването на първичната мишена на топлината, отговорна за топлинната хемолиза не се съпровожда и не се нуждае от крайната денатурация на мембранни белтъци. От тук се прави извода, че белтъкът – участник в първичната мишена търпи предденатурационен преход в своята конформация.

6. Спектрофлуориметричното и ЕПР изследване на ЕМ при стъпково нарастване на температурата показва нарастване в асоциацията на мембранните белтъци (главно анионния обменник) при  $T_{90}$  ( $61^\circ\text{C}$ ) и потвърди спада в тази асоциация при температурите на денатурация на спектрина ( $49.5^\circ\text{C}$ ) и на анионния обменник ( $67^\circ\text{C}$ ). До същия извод водят и данните от спектрофлуориметричното изследване на ЕМ, необратимо но щадящо пермеабилizирани при  $T_{90}$ . Тези резултати обосновават хипотезата, че разрушаването на мишената включва предденатурационен преход в белтък, при което нараства асоциацията на неговите молекули.

7. Бяха намерени подходящи условия за обработка на ЕМ с DIDS – мембранонепроницащ, бифункционален аминореагент, който се свързва специфично към анионния обменник на ЕМ и го стабилизира термично. Тази обработка на ЕМ с DIDS имаше положителен ефект – повишение на термостабилността ( $T_{90}$ ) на ЕМ с  $2.6 \pm 0.3^\circ\text{C}$  и на резистентността  $t_{1/2}$  на еритроцитите срещу топлинна хемолиза средно с 65%. Това е пряко доказателство за участието на анионния обменник в мишената на топлината.

8. Намерена е добра корелация ( $r=0.87$ ) между стойностите на  $T_{90}$  в ЕМ от посочените 13 вида бозайници и продължителността на живот на еритроцитите в кръвообращението. На по-висока  $T_{90}$ , т.е., на по-висока термична стабилност на ЕМ и по-голяма резистентност на еритроцитите срещу топлинна хемолиза, съответства по-продължителен живот на еритроцитите в кръвоносната система на бозайниците.

9. Двата пика върху производната термограма на суспензионния импеданс са променени при еритроцити от пациенти с някои форми на анемия от тип мембранопатия. Температурата на спектриновия пик е повишена при хидроцитоза, но при пиропойкилоцитоза е понижена. При микросфероцитоза се появява трети пик, който е центриран при по-ниска температура ( $45^\circ\text{C}$ ) в случаите на по-остра форма на анемия. Отклоненията в пика при  $T_g$  се премахват, ако еритроцитите се обработят с DIDS ( $20 \mu\text{M}$ ) или

антистенокардин (лекарствен аналог на DIDS), което е указание, че анионният обменник на тези еритроцити е наследствено променен.

### **VIII. СПИСЪК НА СОБСТВЕНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, ЦИТИРАНИ В ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЯ (1994 г.)**

#### **Общ импакт фактор – 4.7**

1. **Иванов И. Т.** "Метод за определяне на термо-индуцирани бариерни нарушения в клетъчни мембрани". Патент за изобретение-51841 /13.04.1995
2. **Иванов И. Т.** (1993) Исследование нарушений барьерных функции мембран эритроцитов при непрерывном нагреве. Биологические мембраны, том 10, 160-169; **Иванов И. Т.** (1994) Investigation of the Erythrocyte Membrane Barrier Disturbances during Transient Heating. Biol. Membr., v.7, pp. 145 - 154. (анг. текст на статията от т. 2). Импакт фактор 0.8
3. **Ivanov I.T.** and Popov B. K. (1993) Do changes in cell shape affect suspension conductivity? Gen. Physiol. Biophys. 12, 311-315. Импакт фактор 0.8
4. **Ivanov I. T.** and Benov L. C. (1992) Thermohaemolysis of human erythrocytes in isotonic NaCl/sucrose media during transient heating. J. Therm. Biol., v.17, pp. 381-389. Импакт фактор 0.8
5. **Ivanov I. T.** (1992a) Thermohaemolysis of human erythrocytes in sucrose containing isotonic media. J. Therm. Biol., v.17, pp. 375-379. Импакт фактор 0.8
6. **Ivanov I. T.** and Lyutskanov V. G. (1987) Thermotropic behavior of intact human erythrocyte membrane revealed by differential scanning conductometry. Mol. Cryst. Liq. Cryst., v.152, 327-332. Импакт фактор 1.5

### **IX. СПИСЪК НА СОБСТВЕНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, ВКЛЮЧЕНИ В НАСТОЯЩИЯ ТРУД**

#### **Общ импакт фактор - 22.3**

1. **Ivanov I. T.**, A. Zheleva and I. Zlatanov. Anion exchanger and the resistance against thermal hemolysis. International Journal of Hyperthermia. 2011. 27 (3), 286 – 296. Импакт фактор 2.7
2. **Ivanov I. T.** and A. Zheleva. Band 3 protein involvement in the 61°C transition of human erythrocyte membrane relevant to the hemolytic anemias of the type membranopathy. Trakia journal of sciences. Volume 8, Supplement 2, 2010, pp. 6-11.
3. **Ivanov, I.T.** Impedance spectroscopy of human erythrocyte membrane: Effect of frequency at the spectrin denaturation transition temperature, Bioelectrochemistry 78 (2010) 181–185. Импакт фактор 3.5

4. **Ivanov Ivan Tanev**, Miroslav Karabaliev, Plamen Zagorchev. Temperature and frequency dependences of the resistance and capacitance of erythrocyte membranes as a tool for detecting anemia of the type membranopathy. *Trakia journal of sciences*. Volume 8, Supplement 2, 2010, pp. 43-48.
5. **Ivanov I.T.**, A. Tolekova, P. Chakaarova. Erythrocyte membrane defects in hemolytic anemias found through derivative thermal analysis of electric impedance. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 641-648. Импакт фактор 1.5
6. **Ivanov Ivan T.**, Myriam Brähler, Radostina Georgieva, Hans Bäumler. Role of membrane proteins in thermal damage and necrosis of red blood cells. *Thermochemica Acta* 456 (2007) 7-12. Импакт фактор 1.4
7. **Ivanov, I.T.** (2005) Allometric dependence of the life span of mammal erythrocytes on thermal stability and sphingomyelin content of plasma membranes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147 (2007) 876-884. Импакт фактор 1.35.
8. **Ivanov I. T.** (2002a) Incorporation of sphingomyelin increases thermostability of human erythrocyte membrane and resistance of erythrocytes against thermal hemolysis. *J Thermal Biology*. 27, 285-289. Импакт фактор 0.9
9. **Ivanov I. T.** (2002b) Derivative conductometry profile of thermal alterations in cellular membranes – a possible relationship between membrane alterations, cellular proliferation capacity and maximum temperature of growth. *J Thermal Biology*. Volume 27/2 pp. 137 - 149. Импакт фактор 0.9
10. **Ivanov I. T.** (2001) Rapid method for comparing the cytotoxicity of organic solvents and ability to destabilize proteins of erythrocyte membrane. *Pharmazie*, 56, №10, pp. 808-809. Импакт фактор 0.9
11. **Ivanov, I. T.** (1999a) Changes in Passive Electric Parameters of Human Erythrocyte Membrane During Hyperthermia: Role of Spectrin Phosphorylation. *Gen. Phys. Biophys.* 18, 165-180. Импакт фактор 0.7
12. **Ivanov I. T.** (1999b) Impact of thermohaemolysis-related membrane alteration on passive ion permeability and life-span of erythrocytes. *J. Therm. Biol.*, v. 24, 143-150. Импакт фактор 0.9
13. **Ivanov, I. T.** (1999c) Investigation of surface and shape changes accompanying the membrane alteration responsible for the heat-induced lysis of human erythrocytes. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 13, 311 –323. Импакт фактор 1.0
14. **Ivanov I. T.**, Todorova R. and Zlatanov I. (1999) Spectrofluorometric and microcalorimetric study of the thermal poration relevant to the mechanism of thermohaemolysis. *Int. J. Hyperthermia*, v. 15, pp. 29-43. Импакт фактор 1.7
15. **Иванов И. Т.** (1997) Исследование роли белков эритроцитарной мембраны в термоиндуцированных нарушениях барьера проницаемости. *Биол. мембраны*. Том 14, (1), стр. 41-49. **Ivanov I. T.** (1997) Involvement of Erythrocyte Membrane Proteins in Temperature-Induced Disturbances of the Permeability Barrier. *Membr. Cell Biol.* 11, 45-56 (анг. текст на статията). Импакт фактор 0.5

16. **Ivanov I. T.** (1996) Investigation into the membrane alteration relevant to the mechanism of thermohaemolysis. *J. Therm. Biol.*, 21, 205-212. Импакт фактор 0.9
17. **Ivanov I. T.** and Zlatanov I. (1995) Correlation between the n-alkanols-induced sensitization of erythrocytes to hyperthermia and the fluidization of their membranes. *Int. J. Hyperthermia*, v. 11, 673-683. Импакт фактор 1.7
18. **Ivanov I. T.** and S. I. Boytcheva (1994) Relationship between the hyperthermia induced killing of *Streptococcus faecalis* bacteria cells and their permeability barrier disturbance event at high temperatures. *J. Therm.Biol.*, v. 19, N 3, 199-206. Импакт фактор 0.8
19. **Ivanov I. T.** (1993) Thermohaemolysis of mammalian erythrocytes. *J. Therm. Biol.*, v.18, pp. 177-183. Импакт фактор 0.9
20. **Ivanov I. T.** (1992b) Relationship between thermohemolysis and the thermoinduced disturbance of the barrier properties of human erythrocyte membrane. *Rep. Bulg.Acad. Sci.*, v. 45, N 9, pp.129-132. Импакт фактор 0.05

#### **IX. СПРАВКА ЗА ЦИТИРАНИЯТА НА ТРУДОВЕТЕ:**

**Общо 58 цитирания, от които 1 в български източник и 57 в чуждестранни източници.**

##### **Ivanov, I.T. (2001) *Pharmazie*, 56 (10) pp. 808-809:**

1. John E. Hallsworth, Bernard A. Prior, Yoshiyuki Nomura, Masayoshi Iwahara, and Kenneth N. Timmis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, p. 7032-7034 Vol. 69, No. 12.
2. A. B. Caruso, M. G. Dunn. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2005. V.73, Issue 4, Pages 388 – 397.
3. Armutcu, F., Coskun, O., Gürel, A., Sahin, S., Kanter, M., Cihan, A., Varim Numanoglu, K., Altinyazar, C. *Cell Biology and Toxicology* 21 (1), 53-60. 2005
4. M. R. Mozafari (2005) *Cellular & Molecular Biology Letters*, vol. 10, pp. 711-719.
5. Mozafari, M. R., Reed, C. J., Rostron, C., 2007. *Pharmazie*, 62 (3) pp. 205-209.
6. Mortazavi, S. M., Mohammadabadi, M. R., Khosravi-Darani, K., Mozafari, M. R. (2007) *Journal of Biotechnology*, 129 (4) pp. 604-613.
7. F. Armutcu, A Gürel, S. Söğüt. *Tip Araştırmaları Dergisi* 2004: 2(2): 17 -20
8. S. Kumar, P. K. Sharma, M. Bansal, R. Malviya. *JChrDD*, Vol 2, Issue 1, 2011: 7-13
9. Mo Guan. Studies on cryopreservation of zebrafish (*danio rerio*) oocytes using controlled slow cooling and vitrification. **Dissertation**. University of Bedfordshire. Luton LU2 8DL. March 2009.

**Ivanov IT, Tolekova A, Chakaarova P. J Biochem Biophys Methods (2007) 70(4):641-648:**

1. Chaves-Moreira, Daniele. Estudo da atividade hemolítica do veneno de *Loxosceles intermedia* (Aranha Marrom) e seus mecanismos moleculares. **Dissertação de mestrado** – Ministério da Educação, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular e Molecular. Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, 2008. 107p.

2. Humberto Gabriel Rodrigues; Maria Thereza Alves Batista; Lúbia Cristina Fonseca; Tales Alexandre Aversi-Ferreira. *Biotemas*, 22 (1): 7-16, 2009

3. Kim Hickman, Josef T Prchal, Neeraj Agarwal. A Novel Mutation of the Spectrin Gene. A project. University of Utah and University of Witwatersrand, South Africa - Sponsors and Collaborators. Clinical Trials. gov – A service of the U. S. National Institutes of Health - 2008

4. Humberto Gabriel Rodrigues. Effect of glyphosate on the stability of erythrocytes from human and *rattus norvegicus* in physiologic saline solution. Orientador: professor Dr. Nilson Penha-Silva. Universidade federal de Uberlândia. Instituto de genética e bioquímica. Pós-graduação em genética e bioquímica. Uberlândia, MG. 2008. pp. 1- 63

5. Rita de Cássia Mascarenhas Netto. Estabilidade de membrana de eritrócitos em portadores de depressão. Universidade federal de Uberlândia. Instituto de Genética e Bioquímica Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica). UBERLÂNDIA, MG, 2009.

**Ivanov I.T. Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol. 147 (2007) 876-884:**

1. P. J. Quinn, C. Wolf. The liquid-ordered phase in membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1788 (2009), 33-46

2. *Health & Medicine Week*. Atlanta: Oct 8, 2007. pg. 4216; ISSN: 15316459; ProQuest document ID: 1354226281

3. Chaves-Moreira, Daniele. Estudo da atividade hemolítica do veneno de *Loxosceles intermedia* (Aranha Marrom) e seus mecanismos moleculares. **Dissertação de mestrado** – Ministério da Educação, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular e Molecular. Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, 2008. 107p.

4. A Koshkaryev, G Barshtein and S Yedgar. *Cell Biochem Biophys*. Vol. 56, Nº 2-3, 2010, Pp. 109-114

5. Шевченко О. Вестник института биологии Коми НЦ УрО РАН. 2009 (№ 5). С. 34 -35

6-A. Shevchenko O. G. and L. N. Shishkina. 2011. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. Comparative and Ontogenic Biochemistry* Volume 47, Number 2, 179-186

6-B. Shevchenko O. G., L. N. Shishkina, 2011, published in Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii, 2011, Vol. 47, No. 2, pp. 151–156.

**Ivanov I. T., Boytcheva S. (1994) J. Therm. Biol., v.19 (3), 199-206:**

1. Logue J., Tiqu P., Cossins A. R. (1995) J. Therm. Biol. 20(1-2),191-197

**Ivanov I. T. (1993) J. Therm. Biol., 18, -3, 177 -183:**

1. K. Bowler and R. Manning (1994) In: Temperature Adaptation of Biological Membranes. (Edited by A.R. Cossins) Portland Press. London. pp. 185-203

2. Jozwiak Z., Laski J., Gwozdziński K. (1996) J. Therm. Biol., 21, 129-137

3. Przybylska M, Bryszewska M, Kedziora J Bioelectrochemistry 52 (2): 239-249 (2000)

4. Борисова А. Г. Сравнительное изучение функциональных свойств гемоглобина и реакции термогемолита эритроцитов у экто- и эндотермных позвоночных. **Диссертация.** 1996 г.

**Ivanov I. T. Zlatanov I. Int. J. Hyperthermia. 1995. 11 (5), 673-683:**

1. Зинчук, В. В. Успехи физиологических наук. - 2001 - Том 32, № 3, Стр. 74 – 78 .

2. Зинчук, В. В. Гродненский медицинский университет Беларуси, Гродно. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты. ЗАО Центр "Анализ веществ". Библиотека. 2001 год.

3. Савостьянов, В. В. Диагностика критических волевических нарушений у раненых и больных (клинико-экспериментальное исследование). **Диссертация** доктора медицинских наук. Москва. 2005.

4. Коваль, Г.С. Распределение эритроцитов на разных уровнях артериального русла на основе их метаболических и структурных различий. **Диссертация.** Томск. 2008.

5. Меркушкина, И.В. Коррекция метаболических нарушений головного мозга при эндотоксикозе. **Диссертация** доктора медицинских наук. Саранск. 2009.

**Ivanov I. T., Todorova R., Zlatanov I. (1999) Int. J. Hyperthermia, 15, 29-43:**

1. Goryunov A. S., Sukhanova G. A., Borisova A. G. and S. P. Rozhkov (2000) J. Ther. Analysis and Calorimetry, vol. 62, 29-37

2. Yao Cheng-can, Yao Ping, LI Xuang – kun, Huang Yao-xiong. (2005) Chinese Journal of Pathophysiology 2005 Vol.21 No.6 P.1101-1105.

3. Hans-Dietrich Polaschegg and Nathan W. Levin. In: Replacement of Renal Function by Dialysis. 5<sup>th</sup> edition. Edited by Walter H. Horl, Karl M. Koch, Robert M. Lindsay, Claudio Ronco, James F. Winchester (editor-in-chief). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht / Boston / London. 2004.

**Ivanov I. T. J. Membr Cell Biol, 1997, 11(1): 45-56:**

1. Yao Chen-can, Yao Ping, Huang Yao-Xiong. Instant effect of environmental temperature on membrane shape and surface electric charge of living intact human red blood cells. Journal of Jinan university (Natural science & medicine edition), 2005, vol. 26, № 5, pp. 689 – 693.

2. Yao Cheng-can, Yao Even, Tang Guohan, Zheng Blue, Li Xiaokun, Huang Yaoxiong. (2005) Effect of radio-frequency electromagnetic wave and environmental temperature on membrane mechanical properties of single living intact human red blood cells. China occupational medicine, Vol.32 No.3 P.11-13.

**Иванов И. Т. (1993) Биол. мембраны, т. 10, 160-169:**

1. Борисова А. Г., Горюнов А. С. (1997) Журнал эволюционной биохимии и физиологии. т.33, 142-147

2. Anatoliy V. Goncharenko and Yia-Chung Chang. J. Phys. Chem. B, 2009, 113 (29), pp 9924–9931

3. Тарасова, Ю.В. Белки плазмы крови как регуляторы гемолитического процесса. **Диссертация** кандидата биологических наук. Санкт-Петербург . 2000.

**Ivanov I. T. (1999b) J. Therm. Biol., v. 24, 143-150:**

1. Yao CC, Li XK, Huang YX Spectroscopy and Spectral Analysis 25 (4): 613-616 (2005)

**Ivanov I. T. J Therm Biol. V 27 (2) 2002, 137-149:**

1. Wex H., D. M. Rawson, and T. Zhang. Electrochimica Acta, 51(24), 2006, 5157-5162

2. Gordiyenko O. I., T. P. Linnik, E. O. Gordiyenko. Bioelectrochemistry. 2004, vol.62 (no.2), 115-118

3. Гордієнко О.І. Механізми пасивної проникності до неелектролітів та індекс сферичності еритроцитів людини. **Диссертация** д-ра фіз.-мат. наук. 2005 год Харк. нац. ун-т ім. В.Н.Карамзіна. — Х., 2005.

4. Belon, PElia, VElia, LMontanino, MNapoli, ENiccoli, M. J therm anal calor. 2008, 93 (2), 459-469

5. Jiannan Ding; Ruiyong Zhang; Yizun Yu; Decai Jin; Changli Liang; Yang Yi; Wei Zhu; Jinlan Xia. Braz. J. Microbiol. vol.42 no.2, 514-525, São Paulo, 2011

**Ivanov I. T. (1992) Rep. Bulg.Acad. Sci., v. 45, N 9, pp. 129-132:**

1. Przybylska M, Bryszewska M, Kedziora J. Bioelectrochemistry 52 (2): 239-249, 2000

**Ivanov I.T. (1996) J. Therm. Biol., v.21, 205-212:**

1. Przybylska M, Bryszewska M, Kedziora J. *Bioelectrochemistry* 52 (2): 239-249 DEC 2000

**Ivanov I. T. (1999) Gen. Physiol. Biophys. 18, 165-180 (1999):**

1. Waczulíková, L. Šikurová, J. Čársky, L. Štrbová, B. Krahulec. *Gen Physiol Biophys* 19(4):381-392, 2000

2. Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова. Проблемы криобиологии. Т. 20, 2010, №4. 388 – 395

**Ivanov I. T. (1999) Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces. 13, 311-323:**

1. Malgorzata A. Witek, Mateusz L. Hupert, and Steven A. Soper. Pp. 391-442. In: *Bio-MEMS. Technologies and Applications*. Eds. Wanjun Wang and Steven A. Soper. CRC Press. Taylor & Francis Group. 2006.

2. C.B. Firmino. Influência da idade de doadoras humanas sobre estabilidade de seus eritrócitos. Universidade federal de uberlândia. Instituto de genética e bioquímica. Pós-graduação em genética e bioquímica. Uberlândia, MG. 2007. CDU 576.36. Data de defesa 28/02/2007. pp. 1-79

3. J. Song, R. P. Joshi, K. H. Schoenbach. *Med Biol Eng Comput.* 2011. V.49 (6), 713-718

**Ivanov I. T. (2002) J Therm Biol, 27, 285-289:**

1. F.G. de Freitas Reis. Dependência termica dos efeitos de glicérol e sorbitol a 1M sobre a estabilização e destabilização in vitro de eritrócitos humanos por etanol. Universidade federal de uberlândia. Instituto de genética e bioquímica. Pós-graduação em genética e bioquímica. Uberlândia, MG. 2007. CDU 576.314. Data de defesa 28/02/2007. pp. 1-67

**Ivanov I.T., M. Brähler, R. Georgieva, H. Bäumlner. Thermochim Acta 456 (2007), 7-12:**

1. L.D. Hansen, D.J. Russell, C.T. Choma. *Cell Biochemistry and Biophysics*. V.49 (2), 2007, 125-140

2. Zhang, SF; Yan, D; Tang, HY; Feng, X; Han, YM; Yang, M; Wang, YS; Xiao, XH. *Acta Chimica Sinica* 68 (20): 2119-2124 (2010)

**Ivanov I T. J. therm. Biol. V.17 (6), 375-379, 1992:**

1. G.Pompeo, M.Girasole, A.Cricenti, G. Boumis, A.Bellelli, S. Amiconi. *Biochim Biophys Acta – Biomembranes*. V.1798 (6), 2010, 1047-1055

**Иванов И.Т. Биол. мембраны. 1997. Т. 14. №1. С.41-49:**

1. Тарасова, Ю.В. Белки плазмы крови как регуляторы гемолитического процесса. **Диссертация.** Санкт-Петербург. 2000.

2. Иващенко, М.Н. Гомеостатические функции крови в условиях воздействия пчелиного маточного молочка и прополиса на организм. **Диссертация**. Нижний Новгород. 2002.

**Ivanov I. T. and L. Benov (1992) J. Therm. Biol., 17, 381 -389:**

1. Попов В. Erythrocyte membrane stabilization effect and antioxidant activity of methyl methacrylate. Bulgarian Medicine 12 (5), 3-6. 2004