

УДК 576.324:612.111

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТНОГО СОСТАВА СРЕДЫ. II. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ АНИОННОГО ТРАНСПОРТА

С.В. Руденко¹, М.Х. Румиев², В.А. Бондаренко²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская 23, Харьков, 61015, Украина

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина

Поступила в редакцию 7 марта 2007 года

Изучено влияние ингибиторов анионного транспорта эритроцитов DIDS, SITS и DNDS на динамику изменения их формы в неэлектролитных сахарозных средах с низким содержанием ионов хлора. Установлено, что характер действия DIDS и SITS одинаков, но для SITS действующая концентрация, приводящая к тому же эффекту в несколько раз меньше чем для DIDS. Оба вещества концентрационно зависимым образом влияют на характерную трехфазную последовательность изменений формы эритроцитов последовательно элиминируя третью и вторую фазу превращений и, в конечном счете, стабилизируют первую сфероподобную фазу, характеризующуюся низким значением индекса формы (ИФ), которое клетки приобретают сразу после помещения их в неэлектролитную среду, содержащую ингибиторы. Микроскопический анализ показывает, что эта фаза представлена, в основном, сферостоматоцитами. Если то же количество ингибиторов добавляли в среду через 150 с после клеток, то это, наоборот, приводило к увеличению ИФ, что свидетельствует об уплощении эритроцитов. Действие DNDS существенно отличалось от DIDS и SITS в том отношении, что он не влиял на форму эритроцитов, если добавлялся к ним через 150 с после того как клетки были помещены в среду сахарозы. Если DNDS присутствовал в среде изначально, то все фазы морфологических изменений сохранялись, но время каждой из фаз возрастало при увеличении концентрации ингибитора. Полученные данные показывают, что морфологические превращения клеток в неэлектролитных средах, существенным образом зависят не только от состояния системы анионного транспорта эритроцитов, но и от конкретной химической природы ингибитора.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, форма, низкая ионная сила, сахароза, анионный транспорт, DIDS, SITS, DNDS, альбумин.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что эритроциты, функционирующие в русле крови в виде двояковогнутых дисков, приобретают форму стоматоцитов при их переносе в среды с низкой ионной силой, в которых электролит хлорид натрия изосмотически замещен на сахарозу. Это явление связывают с тем, что в указанных условиях происходит деполяризация мембраны [1, 2] и положительный потенциал внутри клетки согласно концепции Глазера и др. является главной причиной стоматоцитоза [3, 4, 5]. Нужно отметить, что наряду с деполяризацией клеточной мембраны в неэлектролитных условиях происходит активация транспортных механизмов, которые в нормальных физиологических условиях характеризуются низкой активностью, например резко увеличивается проницаемость мембраны для калия и натрия [6, 7], вероятно за счет активации неселективного потенциал-зависимого канала (NSVDC-potential voltage dependent channel) [2, 8, 9]. Показано, что транспорт катионов и анионов в неэлектролитных условиях взаимосвязан и ингибирование анионной проводимости приводит также и к ингибированию транспорта катионов [2, 10].

В то же время известно, что ингибиторы анионного транспорта, к которым относятся стильбеновые производные такие как DIDS, SITS, DNDS и другие вызывают эхиноцитоз эритроцитов при физиологических условиях [7, 11]. Ряд авторов рассматривают гипотезу, согласно которой форма эритроцита определяется конформационным состоянием анионного переносчика (белка полосы 3) [12, 13]. При связывании ингибитора с белком его конформация меняется и вероятность нахождения в конформации с большей поверхностной площадью увеличивается, что приводит к увеличению общей площади поверхности внешнего монослоя мембраны и, соответственно формированию выпячиваний или спикул в соответствии с теорией бислойной пары [14]. Можно предположить, что форма эритроцита кроме своей роли в обеспечении структурной стабильности клетки может играть роль и в регуляции транспортных процессов, если принять во внимание возможное влияние на конформацию интегральных белков мембраны латерального давления, которое может зависеть от текущего вида и степени морфологических изменений клеток, помещенных в нефизиологические среды. Иными словами, предполагается наличие взаимной связи как между конформацией анионного переносчика и

обусловленным этим изменением формы эритроцитов, что подтверждено в ряде работ [7, 11, 13], так и, наоборот, обратным влиянием формы клеток на конформацию переносчика [7] и, следовательно, опосредовано на процессы транспорта. Для проверки этого предположения мы изучали динамику морфологических изменений эритроцитов в средах с низкой ионной силой, в которых транспортные процессы значительно активированы [6, 15, 16, 17] как в нормальных условиях, так и в условиях ингибирования анионной проводимости с помощью ряда ингибиторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на свежих эритроцитах человека, которые дважды отмывали в незабуференном физиологическом растворе (150 мМ NaCl), а затем осадок разводили в 10 раз в изотоническом растворе HBS (150 мМ NaCl, 5 мМ HEPES, pH 7,4) и использовали как сток-суспензию. Для изучения изменений формы клеток во времени использовали разработанный и изготовленный нами двухканальный формометр-агрегометр ФА-01, который наряду с измерением оптической плотности (ОП) или светопропускания измеряет и флуктуации интенсивности светового потока, которые несут информацию о форме клеток. Индекс формы (ИФ) рассчитывался по протоколу, описанному ранее для определения формы эритроцитов [18, 19] и вычислялся по формуле $ИФ = k \cdot D$ где k - постоянный коэффициент, зависящий от коэффициента усиления сигнала и от калибровки прибора, а D - среднее квадратичное значение амплитуды флуктуаций светового потока. Калибровочный коэффициент k позволяет сформировать шкалу измерений ИФ который отражает степень дискоидности (или сферичности) эритроцитов (1 – для дисков и нуль – для сфер). В цилиндрическую стеклянную кювету диаметром 10 мм, содержащую 2 мл HBS, добавляли 9-11 мкл сток-суспензии эритроцитов таким образом, чтобы начальное значение ОП было в пределах $0,30 \pm 0,02$, что соответствует концентрации эритроцитов порядка $6 \cdot 10^6$ в 1 мл. Клеточная суспензия перемешивалась магнитной мешалкой со скоростью 600 об/мин. Динамика морфологических изменений изучалась при введении клеток в незабуференную среду 0,3 М сахарозы (Merck), pH 5,8, содержащую или не содержащую ингибиторы. При необходимости ингибиторы (от 2 до 40 мкл) добавляли непосредственно в кювету из концентрированных растворов до получения заданной конечной концентрации. Использовали следующие ингибиторы анионного транспорта: DIDS 4,4'-Диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота, SITS 4-Ацетамидо-4'-изотиоцианатостильбен - 2,2'-дисульфоновая кислота (Sigma), DNDS - 4,4'-динитростильбен - 2,2'-дисульфоновая кислота (Pfaltz and Bauer).

Стационарная морфология клеток в кювете контролировалась оптической микроскопией в тонком жидком слое без применения фиксирующих агентов, чтобы исключить эффект стекла (20 Eriksson, 1990). На рисунках представлены типичные данные, от 3 до 5 независимых экспериментов, проведенных с кровью различных доноров при температуре 20–22 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показаны типичные кривые изменения ОП и ИФ эритроцитов, помещенных в изотонический раствор сахарозы в присутствии различного количества SITS. Видно, что в среде без SITS морфологическая реакция эритроцитов состоит, по крайней мере, из трех фаз, которые определяют то, что кривая зависимости ИФ от времени выглядит в виде пика. Такая форма этой зависимости указывает на то, что клетки быстро сферулируются сразу после помещения их в раствор сахарозы, что фиксируется по значительному уменьшению ИФ (фаза 1). Затем значение ИФ восстанавливается до величин, характерных для дискоидных клеток в физиологическом растворе 1.0 – 1.2 (фаза 2), после чего ИФ снова уменьшается (фаза 3). В данной работе мы исследовали только те образцы крови, которые в контроле демонстрировали характерную трехфазную зависимость, показанную на рис. 1, для которой время достижения максимума ИФ было около 20 с.

Как следует из рис. 1, присутствие в среде SITS существенным образом меняет динамику морфологических изменений. При увеличении концентрации SITS пик ИФ сначала смещается вправо по оси времени (рис. 1, г) после чего наблюдается стабилизация фазы 2 (дискообразная фаза с высоким значением ИФ) за счет элиминации фазы 3 (рис. 1, в). Далее скорость увеличения ИФ на фазе 2 постепенно уменьшается и, в конечном счете, происходит стабилизация фазы 1, которая характеризуется низким значением ИФ, который в дальнейшем не изменяется (рис. 1, г). Практически аналогичный результат был получен для DIDS с той лишь разницей, что концентрация DIDS, которая приводит к тому же результату была примерно в 2-3 раза больше по сравнению с SITS. В отличие от DIDS и SITS, третий ингибитор DNDS при увеличении его концентрации в среде монотонно сдвигал положение пика зависимости ИФ от времени вправо, одновременно расширяя его. Из рис. 2 (в, г) хорошо видно, что в этом случае длительность фазы 1 значительно возрастает, чего не наблюдается для и DIDS и SITS. Такое действие ингибитора DNDS предполагает, что он оказывает свое действие на все фазы морфологических изменений эритроцитов примерно в одинаковой степени, тогда как DIDS и SITS сначала в большей

Морфологическая реакция эритроцитов на изменение электролитного состава среды...

степени действуют на фазы 2 и 3 и только затем стабилизируют фазу 1 (рис. 1 в, г). Данные, представленные на рис. 3, дополнительно подтверждают вывод о том, что действие DNDS отличается от соответствующего влияния DIDS и SITS. Как видно, DNDS практически не оказывает влияния на величину ОП и ИФ если его добавляли через 150 с после введения клеток в сахарозную среду (рис. 3 в), что свидетельствует в пользу того, что он не вызывает дополнительных морфологических изменений клеток, тогда как DIDS и SITS (рис. 3, а, б) сильно изменяют эти параметры в направлении, которое может быть интерпретировано как уплощение эритроцитов и приближение их формы к дискоидной. Для сравнения аналогичный эксперимент был проведен с альбумином (рис. 3, г), который показал, что его действие отличается от действия всех ингибиторов наличием переходной фазы морфологических изменений, которая заключается во временном увеличении ИФ после добавления альбумина к эритроцитам. С другой стороны, мы также установили ранее (в печати), что концентрационная зависимость действия альбумина если он содержится в неэлектролитной среде, напоминает таковую для DIDS и SITS.

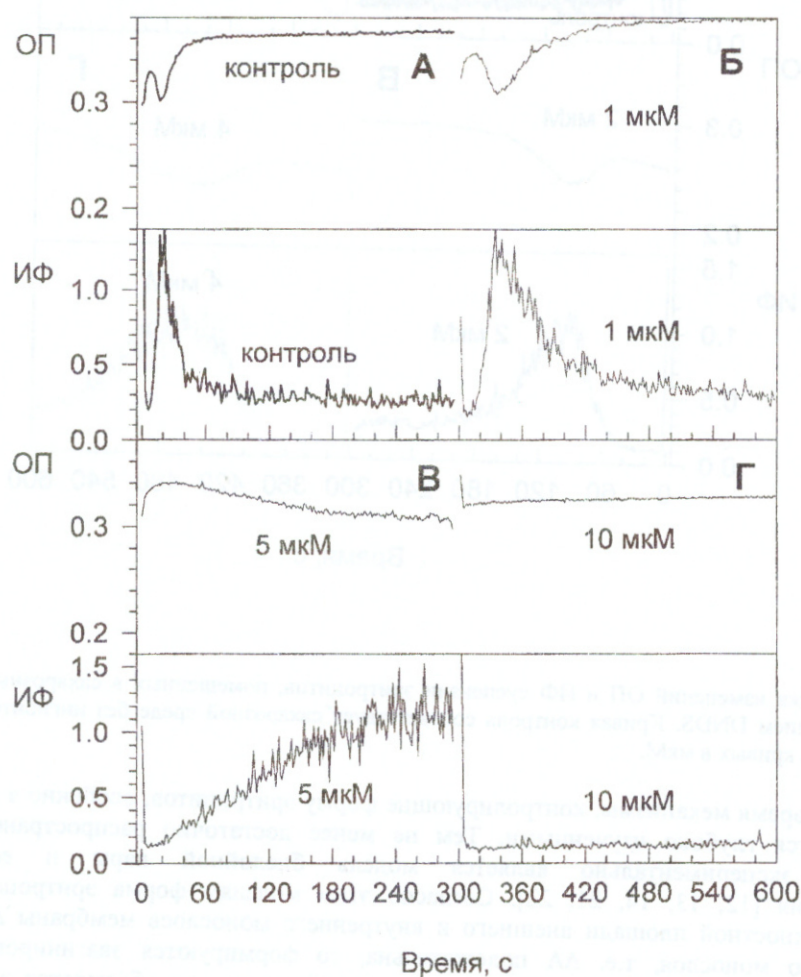


Рис.1 Динамика изменений ОП и ИФ суспензии эритроцитов, помещенных в сахарозные среды (0,3 М) с различным содержанием SITS. Кривая контроль соответствует сахарозной среде без ингибитора. Концентрации SITS указаны возле кривых в мкМ.

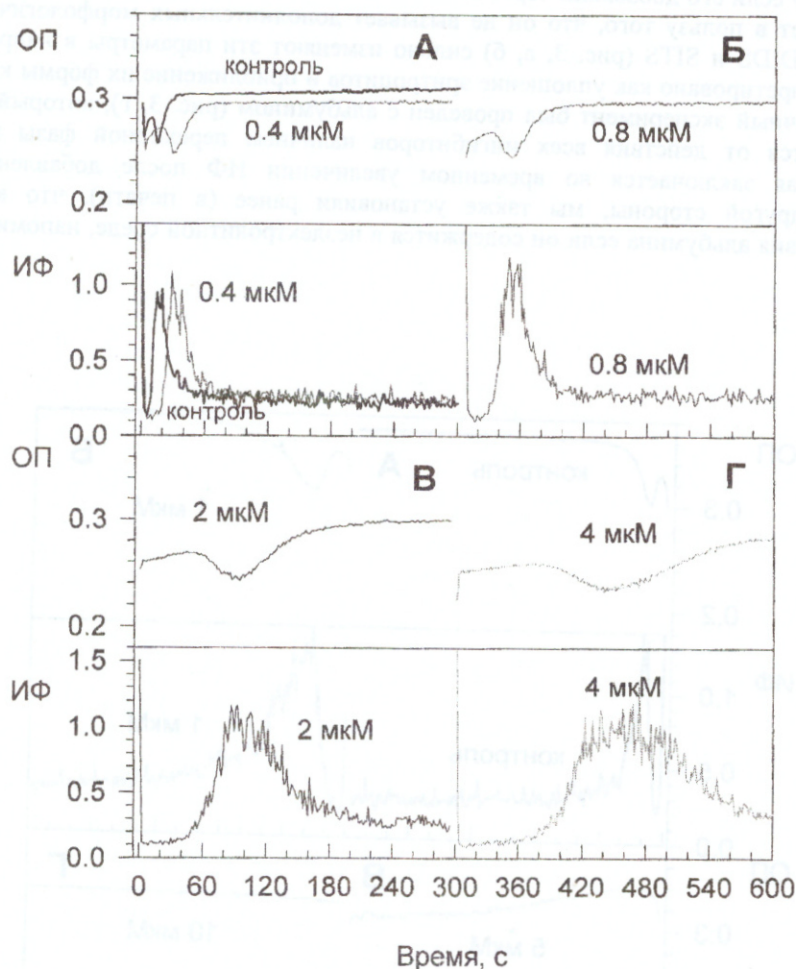


Рис. 2. Динамика изменений ОП и ИФ суспензии эритроцитов, помещенных в сахарозные среды (0,3 М) с различным содержанием DNDS. Кривая контроль соответствует сахарозной среде без ингибитора. Концентрации DNDS указаны возле кривых в мкМ.

В настоящее время механизмы, контролирующие форму эритроцитов, особенно в неэлектролитных средах не являются глубоко изученными. Тем не менее достаточно распространенной и хорошо подтвержденной экспериментально является модель бислоистой пары и ее последующие усовершенствования [12, 13, 14, 21, 22]. Согласно этим моделям форма эритроцита определяется разницей в поверхностной площади внешнего и внутреннего монослоев мембраны ΔA . Если больше площадь внешнего монослоя, т.е. ΔA положительна, то формируются эвагинированные формы с выпячиваниями или спикулами (эхиноциты), а если отрицательна – то образуются инвагинированные формы (стоматоциты). Исходя из этого можно полагать, что между действием различных агентов с одной и той же направленностью морфологических изменений (эхиноцитарных или стоматоцитарных) должна существовать аддитивность или синергизм. Это означает, что два агента, действуя совместно, по крайней мере не должны ослаблять действие друг друга, при условии, что они непосредственно химически не взаимодействуют друг с другом с образованием промежуточных интермедиатов, которые могут иметь свое самостоятельное влияние на форму клеток. В нашем случае неэлектролитной среды, которая может рассматриваться как один агент, и ингибитора анионного транспорта – как второй агент, видимых оснований к такому взаимодействию нет, а указанная аддитивность, которая подтверждает гипотезу бислоистой пары, продемонстрирована рядом исследователей [23].

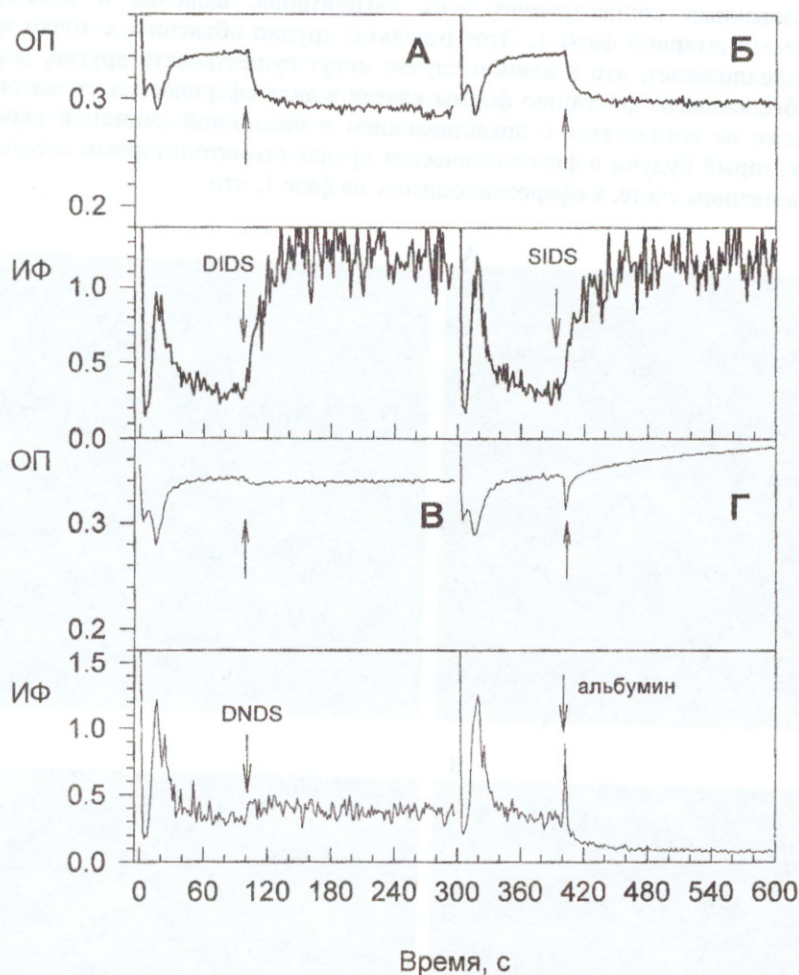


Рис. 3. Влияние ингибиторов анионного транспорта и альбумина на динамику изменения ОП и ИФ суспензии эритроцитов после их введения в изотоническую среду сахарозы (0,3 М) и последующего добавления реагентов. Стрелками показаны моменты введения агентов в среду в следующей конечной концентрации в мкМ: DIDS – 20; SITS – 10; DNDS – 20. Концентрация альбумина равна 125 мкг/мл.

Поскольку индекс формы определяет среднюю по популяции степень дискоидности клеток, но не может определить какой именно тип морфологических изменений происходит в каждом конкретном случае, мы проводили также микроскопические наблюдения за клетками в процессе их трансформации. Было установлено, что в фазе 3 контрольные клетки представляют собой гладкие, близкие к сферическим объекты – сферостоматоциты, а в фазе 2 – формы, не являющиеся дискоцитами и классическими стоматоцитами, но тем не менее, относящиеся к инвагинированным, стоматоцитарным формам. Наблюдения показывают, что и в фазе 1, как и следовало ожидать исходя из результатов других авторов, [4], происходят преобразования по типу стоматоцитоза и сферостоматоцитоза. В средах, содержащих ингибиторы анионного транспорта обнаруживаются только различные стоматоцитарные формы, степень дискоидности которых коррелирует с величиной ИФ. При малых значениях ИФ эти формы приближены к сферическим, а при больших – больше напоминают начальные стадии стоматоцитоза, т.е. клетки имеют большую степень дискоидности. Исходя из этого можно сказать, что DIDS и SITS, добавленные через 150 с, увеличивают степень дискоидности стоматоцитов (рис. 3 а,б). Это же происходит на фазе 2 при введении клеток в контрольную среду и в среду с ингибитором когда ИФ возрастает (рис. 1 и 2).

Поскольку ингибиторы анионного транспорта являются агентами эхиноцитарного ряда [7, 11, 24], увеличение степени дискоидности вполне объяснимо с точки зрения модели бислойной пары. Эхиноцитарный агент препятствует стоматоцитозу, вызванному деполяризацией мембраны. При дальнейшем увеличении концентрации агента следовало бы ожидать появление дискоидных форм или даже перехода части клеток в эхиноциты. На самом деле из данных микроскопии следует, что при максимальных использованных концентрациях всех ингибиторов, включая и DNDS, происходит стабилизация сферостоматоцитарной фазы 1. Этот результат трудно объяснить с точки зрения модели бислойной пары, что предполагает, что в данном случае могут существовать другие, дополнительные механизмы, которые обеспечивают фиксацию формы клеток в виде сферических стоматоцитов. Другой результат, который также не согласуется с представлением о бислойной липидной паре относится к действию альбумина, который будучи в физиологических средах стоматоцитарным агентом [20, 25, 26] (рис. 4, б) приводит, в конечном счете, к сферозхиноцитозу на фазе 1, что

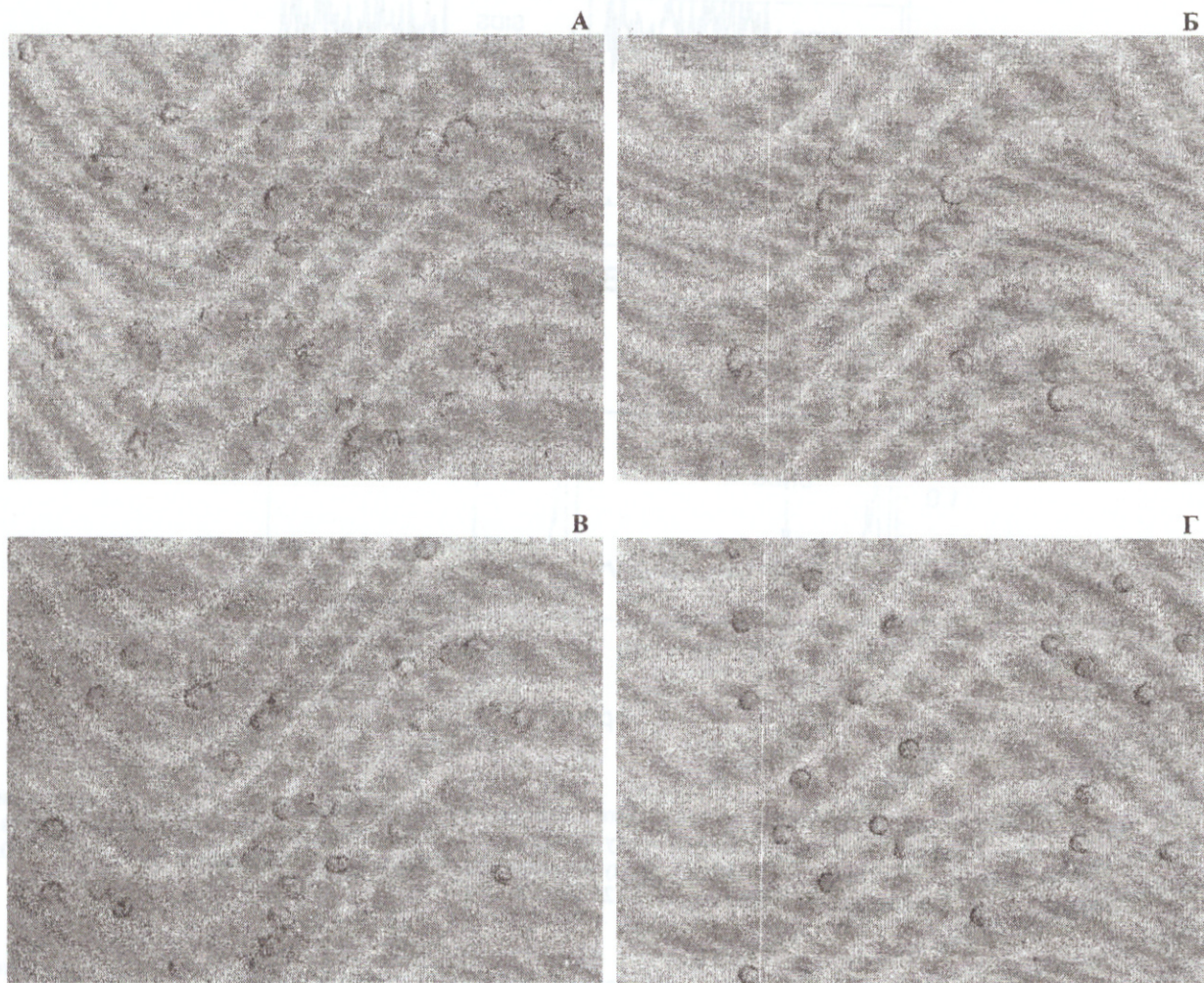


Рис. 4. Эритроциты в физиологическом растворе (А, Б) и в растворе 0,3М сахарозы (В, Г) через 5 мин после помещения их в среды в отсутствии и в присутствии 125 мкг/мл альбумина (Б, Г).

подтверждается микроскопически (рис. 4, г). Можно сказать, что в неэлектролитных средах альбумин меняет знак своего действия и приобретает свойства эхиноцитарного агента. В настоящее время все эти эффекты, включая и саму трехфазную последовательность изменений формы в неэлектролитной среде остаются малопонятными. Другие данные [26, 27] указывают, что некоторые эхиноцитарные и стоматоцитарные агенты могут изменять направленность своего действия на форму эритроцитов в зависимости от ионной силы среды, при этом эти эффекты не зависят от гликокаликса и объясняются вероятным влиянием мембранного потенциала на перераспределение заряженных агентов через мембрану. Так классический стоматоцитарный агент хлорпромазин при определенных условиях может вызывать эхиноцитоз эритроцитов – процесс, который зависит от времени [5], и может объясняться тем, что в условиях деполяризации положительно заряженному хлорпромазину труднее взаимодействовать с

внутренним монослоем мембраны. Интересно, что похожий эффект трехфазных морфологических превращений, индуцированных хлорпромазином, наблюдается в физиологических условиях на эритроцитах, обработанных ванадатом [28], который ингибирует аминоксфолипидтранслоказу, однако эти превращения занимают значительно больший период времени (порядка нескольких часов).

Полученные нами данные указывают на значительную роль начальных условий, в которых происходит резкое изменение состава среды, окружающей эритроциты, либо формируются максимальные градиенты ионов или незлектролитов. Эти градиенты заставляют транспортные переносчики и, в частности, белок полосы 3, который ответственен за транспорт анионов, находиться в конформации, обеспечивающей максимальную пропускную способность мембраны для анионов. Эта конформация, по-видимому, способствует стоматоцитозу, поэтому ингибирование анионной проводимости специфическими ковалентными и нековалентными ингибиторами с внешней стороны мембраны может сопровождаться иными конформационными превращениями, чем те, которые происходят в физиологических условиях, когда активность переносчика не столь высока, что может объяснить факт фиксации клеток в фазе I в виде сферостоматоцитов. В отличие от ингибиторов анионного транспорта, альбумин проявляет один и тот же эффект, независимо от того добавлен он к клеткам в нулевой момент времени или позже. Это указывает на то, что механизм его действия значительно отличается от такового для DIDS, SITS и DNDS.

В заключение можно сказать, что некоторые из полученных нами данных показывают, что в условиях сильной деполаризации мембраны могут наблюдаться явления, которые не объясняются с позиции теории бислоистой пары [14] и требуют более подробного изучения с точки зрения влияния трансмембранного перераспределения липидных или белковых компонентов, а также цитоплазматических структур, в первую очередь цитоскелета, на регуляцию формы эритроцитов в средах с низкой ионной силой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Glaser R, Fujii T, Muller P, Tamura E, Herrmann A. Erythrocyte shape dynamics: influence of electrolyte conditions and membrane potential. *Biomed.Biochim.Acta* 1987;46(2-3):S327-S333
2. Bennekou P, Barksman TL, Kristensen BI, Jensen LR, Christophersen P. Pharmacology of the human red cell voltage-dependent cation channel. Part II: inactivation and blocking. *Blood Cells Mol.Dis.* 2004;33(3):356-61.
3. Glaser R. Does the transmembrane potential ($\Delta\psi$) or the intracellular pH (pHi) control the shape of human erythrocytes? *Biophys.J.* 1998;75(1):569-70.
4. Muller P, Herrmann A, Glaser R. Further evidence for a membrane potential-dependent shape transformation of the human erythrocyte membrane. *Biosci.Rep.* 1986;6(11):999-1006.
5. Hartmann J, Glaser R. The influence of chlorpromazine on the potential-induced shape change of human erythrocyte. *Biosci.Rep.* 1991;11(4):213-21.
6. Sambasivarao D., Rao N.M., Sitaramam V. Anomalous permeability and stability characteristics of erythrocytes in non-electrolyte media // *Biochim.Biophys.Acta* – 1986 V.857 –N1. – P. 48 – 60.
7. Betz T, Bakowsky U, Muller MR, Lehr CM, Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2007;70:122-126.
8. Kaestner L, Christophersen P, Bernhardt I, Bennekou P. The non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane: reconciliation between two conflicting reports and further characterisation. *Bioelectrochemistry.* 2000;52(2):117-25.
9. Barksman TL, Kristensen BI, Christophersen P, Bennekou P. Pharmacology of the human red cell voltage-dependent cation channel; Part I. Activation by clotrimazole and analogues. *Blood Cells Mol.Dis.* 2004;32(3):384-8.
10. Bennekou P, Kristensen BI, Christophersen P. The human red cell voltage-regulated cation channel. The interplay with the chloride conductance, the Ca^{2+} -activated K^{+} channel and the Ca^{2+} pump. *J.Membr.Biol.* 2003;195(1):1-8.
11. Blank ME, Hoefner DM, Diedrich DF. Morphology and volume alterations of human erythrocytes caused by the anion transporter inhibitors, DIDS and p-azidobenzylphlorizin. *Biochim.Biophys.Acta* 1994;1192(2):223-33.
12. Wong P. Mechanism of control of erythrocyte shape: a possible relationship to band 3. *J.Theor.Biol.* 1994;171(2):197-205.
13. Gimsa J. A possible molecular mechanism governing human erythrocyte shape. *Biophys.J.* 1998;75(1):568-9.
14. Sheetz MP, Alhanaty E. Bilayer sensor model of erythrocyte shape control. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1983;416:58-65.

15. Jones GS, Knauf PA. Mechanism of the increase in cation permeability of human erythrocytes in low-chloride media. Involvement of the anion transport protein capnophorin. *J.Gen.Physiol* 1985;86(5):721-38.
16. Zeidler RB, Kim HD. Effects of low electrolyte media on salt loss and hemolysis of mammalian red blood cells. *J.Cell Physiol* 1979;100(3):551-61.
17. Kummerow D, Hamann J, Browning JA, Wilkins R, Ellory JC, Bernhardt I. Variations of intracellular pH in human erythrocytes via $K^{+}(Na^{+})/H^{+}$ exchange under low ionic strength conditions. *J.Membr.Biol.* 2000;176(3):207-16.
18. Руденко С.В., Кроуф Дж.Х., Таблин Ф. Изменение формы эритроцитов в зависимости от времени //Биохимия.-1998.-Т.63, № 12.- С. 46-55
19. Руденко С.В. Агрегация эритроцитов как модель агрегации тромбоцитов //Биологические мембраны. - 2006. - Т.23, № 1. - С. 61-68 .
20. Eriksson LE. On the shape of human red blood cells interacting with flat artificial surfaces--the 'glass effect'. *Biochim.Biophys.Acta* 1990;1036(3):193-201.
21. Tachev KD, Danov KD, Kralchevsky PA. On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model. *Colloids.Surf.B.Biointerfaces.* 2004;34(2):123-40.
22. Svetina S, Kuzman D, Waugh RE, Zihel P, Zeks B. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2004;62(2):107-13.
23. Deuticke B. Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment. *Biochim.Biophys.Acta* 1968;163 :494-500
24. Schwarz S, Haest CW, Deuticke B. Extensive electroporation abolishes experimentally induced shape transformations of erythrocytes: a consequence of phospholipid symmetrization? *Biochim.Biophys.Acta* 1999;1421(2):361-79.
25. Reinhart WH, Chien S. Echinocyte-stomatocyte transformation and shape control of human red blood cells: morphological aspects. *Am.J.Hematol.* 1987;24(1):1-14.
26. Nwafor A, Coakley WT. Charge-independent effects of drugs on erythrocyte morphology. *Biochem.Pharmacol.* 1985;35(6):953-7.
27. Nwafor A, Coakley WT. Drug-induced shape change in erythrocytes correlates with membrane potential change and is independent of glycocalyx charge. *Biochem.Pharmacol.* 1985;34(18):3329-36.
28. Chen JY, Huestis WH. Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1997;1323(2):299-309.