

УДК 612.1

О. А. Трубачева, Е. В. Шахристова, А. И. Галич, И. В. Петрова

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ КАЛИЕВОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ НА ДЕФОРМИРУЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ¹

Методами лазерной эктацитометрии и спектрофотометрии установлено, что увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция вызывает снижение деформируемости и уменьшение объема эритроцитов человека.

Ключевые слова: эритроциты, Ca^{2+} -зависимая калиевая проницаемость, деформируемость.

Деформируемость является важнейшим свойством эритроцитов, обуславливающим их способность выполнять физиологические функции. Проходя через капилляры, эритроциты подвергаются существенным деформациям, но при этом не изменяют свои объем и площадь поверхности, что поддерживает процессы диффузии газов на высоком уровне. Одной из причин снижения деформируемости эритроцитов служит увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция [1, 2]. Другим следствием роста внутриклеточной концентрации ионов кальция является открывание Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов, обеспечивающих выход ионов калия из эритроцитов [3]. Не исключено, что утечка ионов калия из эритроцитов оказывает определенное влияние на деформируемость эритроцитов.

Цель исследования – изучить влияние Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов на их деформируемость.

Материал и методы

В работе использовалась кровь практически здоровых добровольцев (12 человек). Кровь забиралась из локтевой вены утром натощак в пробирки с гепарином (25 ед/мл крови). После центрифугирования (1000 g, 5 мин, 4 °С) плазму и клетки белой крови удаляли, а эритроциты дважды промывали тремя частями изотонического раствора NaCl (150 мМ), содержащего 5 мМ Na-фосфатный буфер (рН 7.4) при тех же условиях центрифугирования. Для дальнейших исследований осажденные эритроциты помещали в изотоническую среду N (320 мосм) (150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкозы), в гиперкалиевую среду (10 мМ NaCl, 140 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкозы), гипоосмотическую среду (220 мосм) (100 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкозы) либо в гиперосмотическую среду (420 мосм) (100 мМ сахараза, 150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкозы) в соотношении 1:20. Для исследования деформируемости осажденные эритроциты помещали в вязкую среду, содержащую 0.2 % высокомолекулярного полиэтиленоксида с

молекулярной массой $M = 5.8 \cdot 10^6$, 2 % альбумина и 0.9 % натрия хлорида.

Исследование деформируемости эритроцитов проводили методом лазерной дифрактометрии, или эктацитометрии [4] в диапазоне скоростей сдвига от 90 до 890 с⁻¹. В основу метода положено явление дифракции световых лучей при прохождении через тонкий слой жидкости с взвешенными в ней частицами [4]. В результате на экране отображается дифрактограмма, представляющая собой ряд чередующихся концентрических окружностей: светлых – дифракционных максимумов и темных – минимумов. Изменение этой картины отражает изменения в форме взвешенных рассеивателей, в данном случае – эритроцитов при приложении напряжения сдвига [5]. Для количественной оценки деформируемости эритроцитов рассчитывался индекс деформируемости эритроцитов (ИДЭ): $ИДЭ = (L-N)/(L+N)$, где L – больший диаметр эллипса; N – меньший диаметр эллипса. Значения ИДЭ, полученные для клеток прединкубированных в среде N (контроль) принимали за 100 %.

Для регистрации изменений объема эритроцитов использовался метод, предложенный в работе [6] и основанный на том, что при изменении объема эритроцитов изменяется светорассеяние суспензии клеток.

Для активации Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов в среду инкубации клеток добавляли 0.5 мкМ Ca^{2+} -ионофора A23187 и 50 или 300 мкМ $CaCl_2$. Как было показано ранее, в этих условиях развивалась гиперполяризация мембраны эритроцитов вследствие утечки ионов калия [7].

Анализ данных проводили при помощи программы Statistica 6.0 for Windows фирмы Statsoft [8]. Фактические данные представлены в виде $X \pm m$, где X – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна–Уитни. Для проверки однородности парных или зависимых выборок был использован T-критерий Вилкоксона. Различия счи-

¹ Работа выполнена при поддержке ФЦП (госконтракт П445).

тали достоверными при уровне значимости $p < 0.01$ или $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Индексы деформируемости эритроцитов, инкубированных в среде N и гиперкалиевой среде в отсутствие Ca^{2+} -ионофора и хлорида кальция, не отличались. Преинкубация эритроцитов в среде N, содержащей 0.5 мкМ Ca^{2+} -ионофора A23187 и 300 мкМ CaCl_2 приводила к снижению ИДЭ на всех скоростях сдвига в среднем на 30–45 % ($n = 7$, $p < 0.05$) (таблица). По нашему предположению, одной из причин снижения деформируемости эритроцитов в этих условиях может быть активация Ca^{2+} -

зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов, которая обусловлена открыванием Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов. Для проверки этого предположения был использован подход, связанный с прекращением выхода ионов калия из клеток: обработка эритроцитов блокатором Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов клотримазолом и преинкубация эритроцитов в гиперкалиевой среде. Внесение 2 мкМ клотримазола в среду инкубации эритроцитов (среду N) в присутствии A23187 и 300 мкМ CaCl_2 приводило к достоверному увеличению ИДЭ в среднем на 15–20 % по сравнению со значениями, полученными в отсутствие блокатора.

Индекс деформируемости эритроцитов (%), измеренный в различных условиях

| Скорость сдвига c^{-1} | Факторы, влияющие на деформируемость эритроцитов | | | |
|------------------------------------|--|--------------------|---------------------|--------------------|
| | Среда N | | Гиперкалиевая среда | |
| | 0.5 мкМ A23187, 300 мкМ CaCl_2 | | | |
| | | 2 мкМ клотримазола | | 2 мкМ клотримазола |
| 90 | 70.266±0.2 %* | 87.45±0.5 %# | 74.08±0.84 % | 90.61±0.06 %# |
| 180 | 57.54±1.26 %* | 74.061±0.46 %# | 63.67±0.11 % # | 78.0±2.16 %# |
| 360 | 50.59±0.40 %* | 63.99±0.4 %# | 69.48±0.23 %# | 71.58±1.83 %# |
| 890 | 55.46±20.46 %* | 65.33±0.05 %# | 67.125±0.76 %# | 74.98±0.37 %# |

Примечание: за 100 % приняты значения ИДЭ в контрольных экспериментах. * – $p < 0.05$ ($n = 7$) по сравнению с контролем (среда N в отсутствие A23187 и CaCl_2); # – $p < 0.05$ ($n = 7$) по сравнению со значениями ИДЭ, полученными в присутствии 0.5 мкМ A23187 и 300 мкМ CaCl_2 .

Другим приемом для прекращения выхода ионов калия из эритроцитов является устранение калиевого градиента, к чему приводит инкубация клеток в гиперкалиевой среде. Действительно, инкубация эритроцитов в гиперкалиевой среде, содержащей 0.5 мкМ Ca^{2+} -ионофора A23187 и 300 мкМ CaCl_2 также вызывала рост ИДЭ по сравнению со значениями, полученными в среде N в присутствии A23187 и 300 мкМ CaCl_2 (таблица). Внесение клотримазола в гиперкалиевую среду приводило к еще более выраженному увеличению исследуемого параметра. Однако полного восстановления индекса деформируемости эритроцитов в этих условиях не происходило, поскольку увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция помимо открывания Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов приводит к нарушению состояния белков мембранного каркаса, изменениям в липидном матриксе мембраны, что играет важную роль в деформируемости эритроцитов [3, 9].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости в изменении деформируемости эритроцитов.

Известно, что изменение транспорта ионов через эритроцитарную мембрану может приводить к изменению объема этих клеток [6]. Выход ионов калия из эритроцитов влечет за собой их дегидратацию и, следовательно, сжатие [3]. Имеются сведения, что при инкубации эритроцитов с кальцие-

вым ионофором иономицином клетки из дискоцитов переходят в эхиноциты и сфероциты [10]. Возможно, именно уменьшение объема и изменение формы эритроцитов является причиной снижения их деформируемости.

В настоящей работе спектрофотометрическим методом также изучено изменение объема эритроцитов в условиях активации Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости клеток. Предварительно было проведено исследование изменений объема эритроцитов при их инкубации в гипо- и гиперосмотической средах. Перенос эритроцитов в гипоосмотическую среду приводил к достоверному снижению показателя светорассеяния суспензии клеток, а инкубация эритроцитов в гиперосмотической среде вызывала увеличение этого показателя (рис. 1), что свидетельствовало о набухании и сжатии клеток крови соответственно.

Внесение 0.5 мкМ A23187 в суспензию клеток, инкубированных в среде N в присутствии 50 мкМ CaCl_2 , приводило к увеличению показателя светорассеяния, что свидетельствовало о сжатии клеток (рис. 2).

Подтверждением участия Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов в уменьшении объема эритроцитов служат данные о возвращении показателя светорассеяния к контрольным значениям при инкубации клеток в присутствии блокатора каналов клотримазола (2 мкМ) на фоне 0.5 мкМ A23187 и 50 мкМ CaCl_2 .

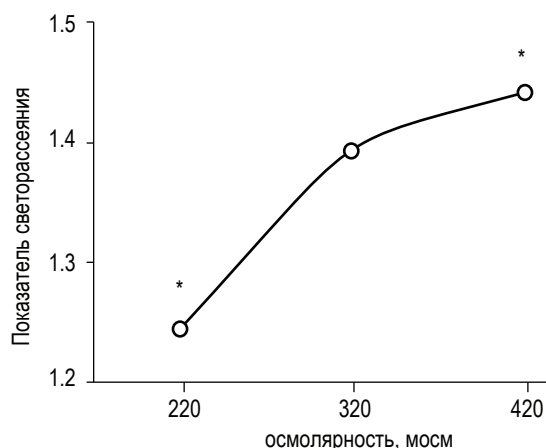


Рис. 1. Зависимость показателя светорассеяния суспензии эритроцитов от осмолярности среды инкубации. * Отмечены показатели светорассеяния эритроцитов, достоверно ($p < 0.01$, $n = 45$) отличающиеся от параметра, измеренного в изотонической среде (320 мосм)

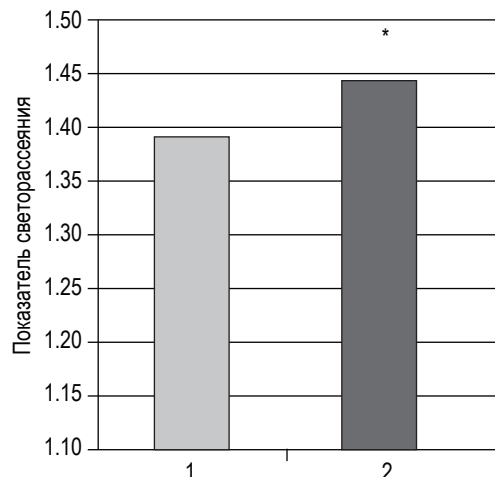


Рис. 2. Изменения показателя светорассеяния суспензии эритроцитов в средах разного состава. 1 – изотоническая среда; 2 – изотоническая среда содержит 0.5 мкМ А23187 и 50 мкМ $CaCl_2$. * Обозначены показатели, достоверно ($p < 0.01$, $n = 45$) отличающиеся от измеренных в отсутствие А23187

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что одной из причин снижения деформируемости эритроцитов в условиях повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция является

увеличение Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов, обусловленное открыванием Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов, что приводит к дегидратации клеток и уменьшению их объема.

Список литературы

1. Катюхин Л. Н. Реологические свойства эритроцитов. Современные методы исследования // Рос. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. 1995. № 6 (81). С. 122–129.
2. Яхонтов С. В. и др. Механизмы и факторы взаимодействия звеньев сердечно-сосудистой системы при переходных процессах // Вестн. Томского гос. пед. ун-та. 2010. Вып. 3(93). С. 149–155.
3. Freedman J. C., Bifano E. M., Crespo L. M. et al. Membrane potential and cytotoxic Ca cascade of human red blood cell // Physiol. Blood: 41st Annu. Symp. Soc. Gen. Physiol. Woods Hole, Mass. 9–12 Sept. 1987. N.-Y. 1988. P. 217–231.
4. Bessis M., Mohandas N. A diffractometric method for the measurement of cellular deformability // Blood cells. 1975. № 2 (1). P. 307–313.
5. Bessis M. et al. Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices // Blood Cells. 1980. № 3(6). P. 315–327.
6. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Рязский Г. Г. и др. О механизме регуляции транспорта ионов через плазматическую мембрану при изменении объема клетки // Биол. мембраны. 1988. № 8(5). С. 1030–1041.
7. Орлов С. Н., Петрова И. В., Покудин Н. И. и др. Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca^{2+} -индуцированных изменений мембранного потенциала // Биол. мембраны. 1992. № 8(9). С. 885–903.
8. Боровиков В. П., Боровиков И. П. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. М.: Филинь, 1997. 608 с.
9. Weed R. I. et al. Metabolic dependence of red cell deformability // J. Clin. Invest. 1969. V. 48. P. 795–809.
10. Миндукшев И. В., Кривошлык В. В., Добрылко И. А. и др. Нарушение деформационных и транспортных характеристик эритроцитов при развитии у них апоптоза // Биол. мембраны. 2010. № 1(27). С. 28–38.

Трубачева О. А., младший научный сотрудник.

Научно-исследовательский институт кардиологии Сибирского отделения РАМН.

Ул. Киевская, 111 а, г. Томск, Томская область, Россия, 634012.

E-mail: otrubacheva@inbox.ru

Шахристова Е. В., зав. лабораторией.

Сибирский государственный медицинский университет.

Московский тракт, 2, г. Томск, Томская область, Россия, 634050.

E-mail: shaxristova@yandex.ru

Галич А. И., студент.

Сибирский государственный медицинский университет.

Московский тракт, 2, г. Томск, Томская область, Россия, 634050.

E-mail: galalyona@mail.ru

Петрова И. В., доктор биологических наук, профессор кафедры.

Сибирский государственный медицинский университет.

Московский тракт, 2, г. Томск, Томская область, Россия, 634050.

E-mail: ivpetrova57@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 24.02.2011.

O. A. Trubacheva, E. V. Shakhristova, A. I. Galich, I. V. Petrova

THE EFFECT OF ELEVATED Ca^{2+} -DEPENDENT POTASSIUM PERMEABILITY OF ERYTHROCYTE DEFORMABILITY

Methods of laser ektacytometry and spectrophotometry revealed that the increase in intracellular calcium ion concentration causes a decrease in deformability and a reduction in human erythrocytes.

Key words: *erythrocytes, Ca^{2+} -dependent potassium permeability, deformability.*

Trubacheva O. A.

Research Institute of Cardiology, Siberian Branch of RAMS.

Ul. Kiyevskaya, 111 a, Tomsk, Tomsk region, Russia, 634012.

E-mail: otrubacheva@inbox.ru

Shakhristova E. V.

Siberian State Medical University.

Moskovskiy trakt, 2, Tomsk, Tomsk region, Russia, 634050.

E-mail: shaxristova@yandex.ru

Galich A. I.

Siberian State Medical University.

Moskovskiy trakt, 2, Tomsk, Tomsk region, Russia, 634050.

E-mail: galalyona@mail.ru

Petrova I. V.

Siberian State Medical University.

Moskovskiy trakt, 2, Tomsk, Tomsk region, Russia, 634050.

E-mail: ivpetrova57@yandex.ru