

СРАВНЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ КИСЛОТНОГО И ЩЕЛОЧНОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2001 г. И.Т. Иванов

Медицинский факультет Фракийского университета, Стара Загора, Болгария

Поступила в редакцию 15.06.98 г.

После доработки 30.10.2000 г.

Проведено сравнительное исследование механизмов щелочного и кислотного гемолиза. Полученные результаты указывают, что на начальном этапе щелочного гемолиза происходит перенос щелочи в цитозоль. Это вызывает окислительный стресс в мембранах. Показано, что реагент Элмана не влиял на щелочной гемолиз, но полностью ингибировал гемолиз кислотный. Ингибирование кислотного гемолиза сопровождалось сшиванием мембранных белков, вероятно, в результате их аццилирования. При добавлении SH-реагентов (цистина, дитиотреитол, в меньшей степени альбумина) мембранные белки не сшивались, а барьерные функции мембран нарушались. Обнаружено, что сшивание мембранных белков реактивом Элмана не может предохранить их от окислительного стресса, но, по-видимому, предотвращает их агрегацию. На основе полученных результатов сделан вывод о том, что нарушение барьерных свойств мембран при кислотном гемолизе является следствием агрегации белков мембран, подвергшихся окислительному повреждению.

Ключевые слова: эритроциты, кислотный и щелочной гемолиз, механизм.

Основной функцией эритроцитов является транспорт кислорода и двуокиси углерода, а также связывание кислот и щелочей, образующихся при метаболизме в тканях. Для этого эритроциты снабжены мощной и быстрой системой, содержащей молекулы белка анионного обменника, который осуществляет перенос кислотных и основных эквивалентов через эритроцитарные мембраны [1]. В кислой среде внешний Cl^- обменивается на внутренний HCO_3^- или OH^- . Как следствие, в цитозоле образуются ионы H^+ . Закисление цитозоля ослабляется за счет буферной емкости гемоглобина и освобождения щелочных катионов. В щелочной среде внутренний Cl^- или HCO_3^- обмениваются на внешний OH^- . Это защелачивание цитозоля тормозится за счет освобождения H^+ гемоглобина и связывания щелочных катионов. Как следствие, эритроциты набухают в кислой среде и сжимаются в щелочной.

Многие виды клеток, включая бактериальную флору кишечника, в том числе и патоген-

ные бактерии, нормально живут в кислой среде. Лейкоциты не лизируют в кислой среде, а эритроциты лизируют быстро. Поэтому изучению влияния кислых и щелочных сред на эритроциты посвящено большое число работ. Однако о последовательности событий, приводящих к выходу гемоглобина в результате кислотного и щелочного гемолиза, пока мало что известно [2,3]. Считается, что клеточная мембрана является критической мишенью в механизме рН-индуцированного гемолиза. Принимают, что на внешней стороне мембраны происходят изменения в среде с нефизиологическими значениями рН, например, рН-индуцированные изменения конформации мембранных белков. Эти изменения вызывают нарушение барьерной функции мембран и гемолиз. Высказаны также предположения, что гемолиз связан с генерацией трансмембранной разности потенциалов при изменении рН суспензионной среды, приводящей к электрическому пробое мембран. Известно, что гемолиз, вызванный щелочами, осуществляется по типичному коллоидно-осмотическому механизму [4], тогда как кислотный гемолиз имеет другой характер [5]. Спектриновая сеть периферических белков осаждается при изоэлектрических значениях рН 4,5, образуя внутримембранные частицы из агрегатов спектрина [6]. Кислотный гемолиз ингибируется в

Сокращения: ДИДС – 4,4'-динитроциано-2,2'-стильбен-дисульфат; ДТНБ – 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота); реагент Элмана); СОД – супероксиддисмутаза; этакридин-этиловый эфир диаминно-гидроксизэтакридина (риванол), ДМСО – диметилсульфоксид.

присутствии мембранного белка гликофорина [5] и липофильного реактива Элмана [7]. Показано, что обработка эритроцитов акридиновым оранжевым, вызывающая кластеризацию мембранных белков (главным образом белков анионного канала), увеличивает их кислотную резистентность [8]. Эти результаты указывают на то, что в процесс кислотного гемолиза на некотором его этапе вовлечены модифицированные мембранные белки.

Нами получены данные о роли окислительного стресса в предшествующем лизису повреждении мембран при кислотном гемолизе. Установлено, что гемолизу, вызванному HCl , предшествует перенос кислоты в цитозоль [9,10], сопровождающийся образованием свободных радикалов, повреждающих клеточные мембраны [9]. Прохождение эквивалентного количества кислоты через анионный обменник является лимитирующей стадией в случае кислотного гемолиза эритроцитов млекопитающих, а также в случае специфического ингибирования анионного транспорта [9]. По-видимому, генерация свободных радикалов связана с изменением содержания гемоглобина, так как у реконструированных эритроцитов с меньшим содержанием этого белка необходимый для начала гемолиза уровень закисления цитозоля ($\text{pH}_{\text{цит}}$ 3,7) был намного ниже, чем у интактных эритроцитов ($\text{pH}_{\text{цит}}$ 5,7), да и повреждение барьерной функции мембран носило более мягкий характер [9].

В настоящей работе изучали механизм щелочного гемолиза на основе развитого в работе [9] экспериментального подхода. Для этой цели применяли специфические реактивы – 4,4'-дизотиоциано-2,2'-стильбендисульфат (ДИДС), ферменты: супероксиддисмутазу (СОД) и каталазу, реактив Элмана. ДИДС является мембранонепроницающим ингибитором, ковалентно связывающимся с анионным обменником эритроцитарных мембран [11]. Реактив Элмана 5,5'-дितिобис(2-нитробензойная кислота) (ДТНБ) известен как бифункциональный реагент, способный сшивать мембранные белки [12]. СОД и каталаза понижают концентрацию супероксидного аниона и перекиси водорода соответственно. Тем самым, они ингибируют окислительный стресс и уменьшают окислительное повреждение клеток [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали реактивы: ДИДС; ДТНБ; диэтиотреитол; β -меркаптоэтанол; диметилсульфоксид (ДМСО); супероксиддисмутазу; каталазу

и бычий сывороточный альбумин (Sigma, USA). L-цистеин фирмы Reanal, Венгрия.

Эритроциты выделяли из свежей крови человека и отмывали трехкратным центрифугированием в физиологическом растворе (150 мМ NaCl). Перед использованием эритроциты суспендировали (гематокрит 0,05) в том же растворе, содержащем 5 мМ глюкозы. Раствор ДТНБ (40 мМ) в ДМСО добавляли к суспензионной среде в объемном соотношении, соответствующем искомой концентрации. Во всех образцах, включая контрольный образец, концентрация ДМСО была 1% об.

Анионный обменник мембран эритроцитов ингибировали, инкубируя клетки (гематокрит 0,15) 15 мин при 25°C в физиологическом растворе, содержащем 10 мМ буфер (фосфатный или боратный), 10 мкМ ДИДС [11]. Для получения разной степени ингибирования величину pH буфера варьировали в интервале pH 7,0–8,0. Перед использованием обработанные клетки трижды отмывали в физиологическом растворе. Ингибирование анионного транспорта определяли методом [14], отслеживая изменения pH изотонического сахарозного раствора, содержавшего 20 мМ NaCl после суспендирования (гематокрит 0,05) в нем интактных или обработанных ДИДС клеток.

К 1,8 мл незабуференного физиологического раствора при постоянном перемешивании добавляли 20 мкл суспензии интактных или обработанных ДИДС эритроцитов. Гемолиз регистрировали по оптической плотности светорассеяния при 700 нм (Spekol 20, ФРГ) после смешивания 20 мкл разбавленной HCl или NaOH с суспензией эритроцитов [2] при температуре 25°C. Конечное значение pH измеряли pH -метром (Radelkis, Венгрия) в отдельном эксперименте после завершения гемолиза.

Осмотические свойства и деформируемость мембран клеток, фиксированных ДТНБ в кислой среде, сравнивали с теми же свойствами мембран интактных клеток по зависимости равновесного клеточного объема от осмотического давления среды суспендирования. Равновесный объем эритроцитов обратно пропорционален осмотическому давлению среды. 20 мкл суспензии интактных или фиксированных клеток добавляли к 1,8 мл раствора NaCl указанной концентрации. Объем клеток оценивали после 3 мин уравнивания по оптической плотности светорассеяния при 700 нм (D_{700}) [15]. В этих условиях значение D_{700} обратно пропорционально объему клеток [15].

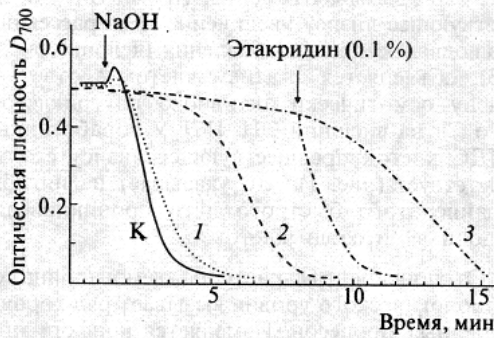


Рис. 1. Кинетические кривые щелочного гемолиза эритроцитов человека при разных степенях ингибирования анионного обменника. Для регистрации кривых использовали intactные клетки (К) и клетки, обработанные ДИДС при pH 7,0 (1), pH 7,6 (2) и pH 8,0 (3). Гемолиз регистрировали по оптической плотности светорассеяния (D_{700}) суспензии. Стрелкой указан момент введения NaOH (конечный pH 12) и этакридина (конечная концентрация 0,1%).

Фракционирование мембран эритроцитов проводили согласно [16]. Клетки, фиксированные ДТНБ в кислой среде, лизировали детергентом (4 % пентанол и 0,4% тритон X-100). Мембраны осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 10000 g и отмывали 5 мМ фосфатным буфером, pH 7,9, для удаления гемоглобина. Осажденные мембраны растворяли в смеси метанол-хлороформ (1:2). Через 5 мин добавляли дистиллированную воду в соотношении 1:1 при интенсивном перемешивании. Раствор центрифугировали 5 мин при 10000 g, после чего формировались три слоя. Верхний, водно-метанольный слой, содержал гликофорин и другие гидрофильные мембранные компоненты, тогда как нижний слой содержал хлороформ и липиды. Большая часть мембранных белков, включая спектрин и SH-содержащие интегральные белки, располагалась на граничной поверхности между обоими слоями.

Концентрацию ДТНБ в средах определяли по оптической плотности поглощения при 400 нм после защелачивания раствором NaOH до pH 12,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как и при кислотном гемолизе [9], специфическое ингибирование анионного обменника эритроцитов сильно повлияло на ход щелочного гемолиза (рис. 1). Гемолиз intactных и обработанных ДИДС клеток, вызванный

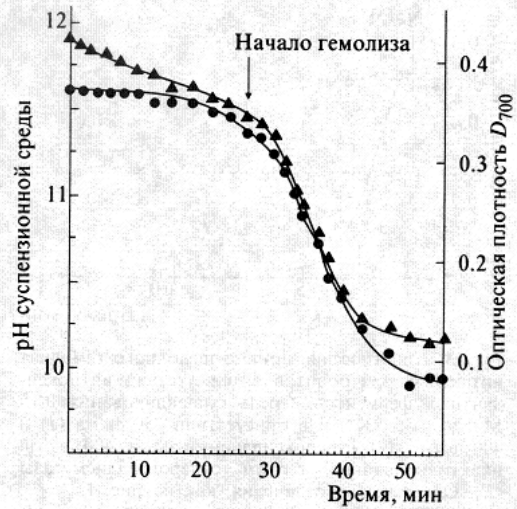


Рис. 2. Синхронно измеренные кривые изменения pH гемолитической среды (треугольник) и щелочного гемолиза (кружок) обработанных ДИДС эритроцитов. Клетки, обработанные ДИДС (10 мкМ, pH 8), суспендировали (гематокрит 3%) в физиологическом растворе. NaOH добавляли в начальный момент времени. Величину pH суспензионной среды (pH_{cp}) измеряли pH-метром и регистрировали на самописце. Гемолиз определяли по оптической плотности светорассеяния (D_{700}) аликвот, которые периодически отбирали и разводили физиологическим раствором. Начало гемолиза обозначено стрелкой.

NaOH, начинался после предшествующего лизису интервала времени, но у последних это время было намного больше. Чем выше была степень ингибирования анионного канала (кривые 1, 2 и 3 на рис. 1), тем продолжительнее был предшествующий лизису этап гемолиза и время полугемолиза $t_{1/2}$.

В отдельном эксперименте к суспензии обработанных ДИДС клеток (гематокрит 0,03) добавляли NaOH и изменение pH суспензионной среды (pH_{cp}) контролировали погруженным pH-электродом (рис. 2). Гемолиз определяли по изменению оптической плотности светорассеяния (D_{700}) аликвот, которые отбирали периодически и разводили равным объемом физиологического раствора, содержавшего 20 мМ фосфатного буфера, pH 7,4. Конец предшествующего лизису этапа и начало лизиса определяли микроскопически по появлению отдельных гемолизирующих клеток. В предшествующем лизису интервале значения pH_{cp} линейно уменьшались, что указывало на вход щелочи в цитозоль и связывание ее за счет буферной

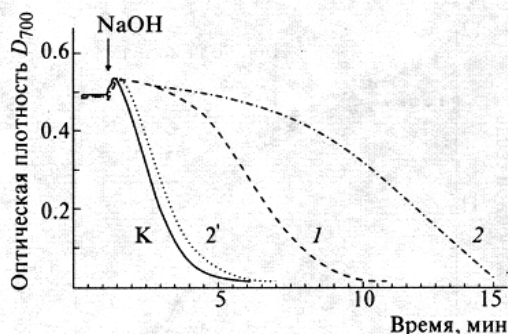


Рис. 3. Кинетические кривые щелочного гемолиза интактных эритроцитов в присутствии антиоксидантных ферментов. Среда суспендирования 0,15 М NaCl без (K^+) и в присутствии 250 ед/мл (1) и 400 ед/мл (2) супероксиддисмутазы и 400 ед/мл инактивированной теплом супероксиддисмутазы (2'). Остальные обозначения, как на рис. 1.

емкости гемоглобина. Молярную концентрацию гидроксильных анионов OH^- в гемолитической среде, т.е. $10^{-(14 - pH_{cp})}$, определяли в начале ($c_{нач}$) и в конце ($c_{кон}$) предшествующего лизису интервала. Согласно данным, приведенным на рис. 2, около 60% исходного количества щелочи вошло в цитозоль клеток до начала гемолиза. Это свидетельствует о том, что нарушению барьерной функции клеточных мембран и выходу гемоглобина предшествовало вхождение значительного количества щелочи в цитозоль клеток и связанное с этим отклонение pH цитозоля от физиологического значения. Ясно, что наряду с изменениями внешней поверхности клеток, в механизме щелочного гемолиза должны учитываться и изменения, происходящие в цитозоле после защелачивания суспензионной среды.

Этот вывод согласуется с результатами, представленными на рис. 1. Ингибирование анионного обменника и связанное с этим уменьшение скорости проникновения щелочи в цитозоль приводит к тем большему замедлению начала гемолиза, чем сильнее ингибирован анионный обменник. К тому же добавление этакридина (концентрация 0,1%) к суспензии обработанных ДИДС клеток в любой момент предшествующего лизису этапа вызывало быстрый гемолиз (рис. 1). Во внешней среде (при pH ~ 11,5), молекулы этакридина ($pK_a \sim 10,2$) электрически нейтральны и, вследствие липофильности, легко проходят через клеточную мембрану. На другой стороне мембраны этакридин диссоциирует, и вследствие этого защелачивает

цитозоль, вызывая гемолиз. Кроме того, предшествующее лизису увеличение светорассеяния, наблюдаемое после добавления щелочи (рис. 1 и 3), объясняется сжатием клеток в ответ на замену осмотически активного внутриклеточного Cl⁻ на внешний OH⁻ [17]. У обработанных ДИДС клеток предшествующее лизису сжатие отсутствует (рис. 1), что указывает на ингибирование этого быстрого пути проникновения щелочи в цитозоль клеток.

Отклонение pH раствора гемоглобина от физиологического уровня вызывает ряд изученных процессов. Изменяется конформация глобина и начинается диссоциация тетрамеров. Ускоряется автоокисление гемоглобина в метгемоглобин с выделением супероксидного анион-радикала $O_2^{\cdot-}$ [13]. В повышенной концентрации эти радикалы дисмутируют с образованием перекиси водорода H_2O_2 , способной вступать в реакцию Фентона. Сама перекись

водорода реагирует с $O_2^{\cdot-}$ и в результате образуется гидроксильный радикал OH^{\cdot} (реакция Хабера-Вайса). Образовавшиеся радикалы и оксиданты, если их продукция превосходит антиокислительную мощность клеток, окисляют SH-группы гемоглобина и метгемоглобина, что приводит к денатурации, отделению глобина от гема и освобождению ионов железа [18]. В цитозоле эти процессы инициируют окислительный стресс мембран, а часть денатурированного глобина адсорбируется на внутренней стороне мембраны [19], изменяя конформацию мембранных компонентов [20].

На рис. 3 представлены кинетические кривые, отражающие эффект антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы на гемолиз интактных клеток, вызванный NaOH. Фермент в концентрациях до 100 ед/мл не влиял на ход гемолиза. Как и в случае кислотного гемолиза [9] выше этой концентрации наблюдалось ингибирование щелочного гемолиза, усилившееся при увеличении концентрации фермента. Так, в присутствии 400 ед/мл СОД, щелочная резистентность эритроцитов возрастала примерно в четыре раза. Подобный результат получали в присутствии каталазы в концентрациях 300–1500 ед/мл (данные не приведены). В присутствии обоих ферментов, когда они находились в состоянии максимальной активности, щелочной гемолиз практически не имел места (данные не приведены). Ферменты добавляли в водном растворе хлорида натрия, но это не изменяло pH среды. Предварительная тепловая инактивация ферментов (100°C, 10 мин) практически

полностью элиминировала их защитную роль при щелочном гемолизе (рис. 3).

Согласно существующим представлениям, выявление защитной роли антиокислительных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы при повреждении клеток считают прямым доказательством участия свободных радикалов в этом повреждении [13]. После защелачивания суспензии эритроцитов так же, как и при кислотном гемолизе, развивается окислительный стресс, который, по-видимому, играет решающую роль в механизме щелочного гемолиза, о чем свидетельствует ингибирование гемолиза в присутствии антиоксидантных ферментов. Очевидно, что продуцируемые радикалы в состоянии нарушить барьерную функцию мембран и вызвать гемолиз, если скорость их образования превышает антиокислительную мощность находящихся в среде суспендирования ферментов (примерно 400 ед/мл СОД и 1500 ед/мл каталазы).

Самым вероятным источником этого окислительного стресса является отклонение цитозольного рН от физиологического значения. В то же время ингибирование белка анионного канала никак не может отменить вклад других факторов, связанных с изменением внешней поверхности клеток, в частности, рН-индуцированные конформационные изменения мембранных белков или генерацию трансмембранного потенциала, которые наступают после добавления щелочи к клеточной суспензии. Так что в условиях защелачивания эти два литические фактора несомненно действуют на мембраны интактных и обработанных ДИДС клеток. Однако тот факт, что у обработанных ДИДС клеток предшествующий лизису интервал времени был увеличен в три раза, показывает, что действие этих факторов было не очень существенно в механизме щелочного гемолиза. В дополнение гемолиз обработанных ДИДС клеток начинался не в момент добавления щелочи, когда генерируется трансмембранный потенциал, а тогда, когда градиент гидроксильных анионов и соответственно трансмембранный потенциал в большей степени уже выровнялись. Основная функция белков анионного канала заключается в переносе кислот и щелочей с внешней стороны клеток в цитозоль. Ингибирование этого канала приводит к уменьшению скорости поступления кислоты или щелочи в цитозоль, соответственно отдалается момент, когда рН цитозоля критически отклонится от физиологического уровня и начнется генерация окислительного стресса. Наоборот, добавление этакридина, который в этих условиях выпол-

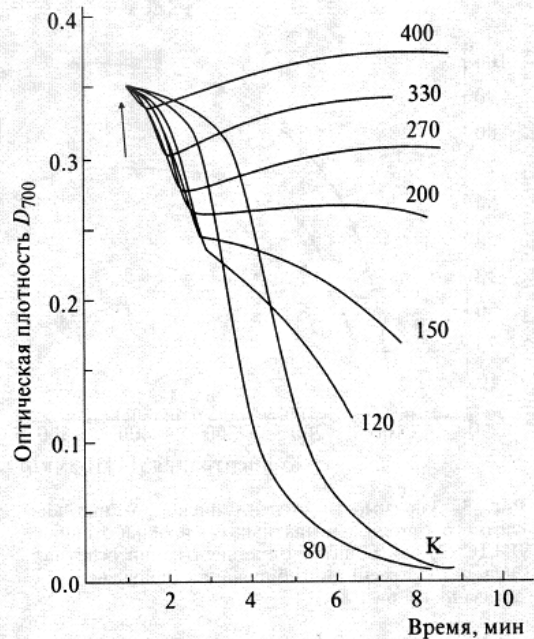


Рис. 4. Кинетические кривые кислотного гемолиза интактных эритроцитов в присутствии реактива Эллмана (ДТНБ). Стрелкой указан момент добавления клеток к среде гемолизования, содержащей 150 мМ NaCl, HCl (рН 3,2), 1% об. ДМСО и указанную концентрацию ДТНБ в мкМ. Степень ингибирования гемолиза при концентрации ДТНБ (с) вычисляли как отношение соответствующих величин оптической плотности светорассеяния (D_{700}) суспензии $(D_{\text{начальное}} - D_{\text{конечное}}) / (D_{\text{начальное}} - D_{\text{конечное}})_0$.

няет роль гидроксифора, увеличивает скорость поступления щелочных эквивалентов в цитозоль и инициирует гемолиз. Принимая во внимание эти соображения, на основе представленных результатов можно утверждать, что, как и при кислотном гемолизе, в процессе щелочного гемолиза также происходит перенос щелочи через анионный обменник и генерация окислительного стресса на мембранах.

Присутствие реактива Эллмана (ДТНБ) в гемолитической среде не отразилось на ходе гемолиза, вызванного NaOH, но сильно повлияло на конечную степень гемолиза, вызванного HCl (рис. 4). В этих экспериментах клетки добавляли в среду, уже содержащую ДТНБ и кислоту. Гемолиз был полным и ускоренным при концентрациях ДТНБ ниже 100 мкМ, однако, при концентрациях выше 100 мкМ ДТНБ проявлял себя как ингибитор гемолиза (рис. 4

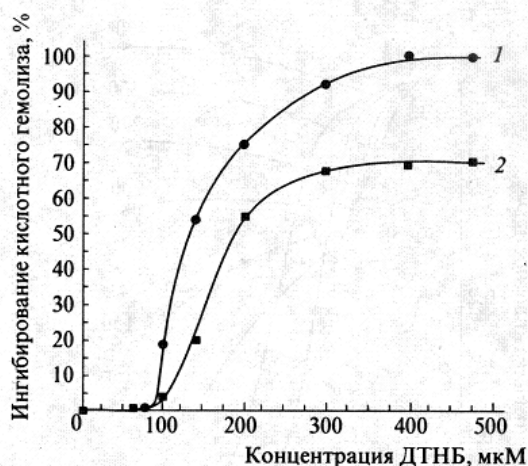


Рис. 5. Зависимости степени ингибирования кислотного гемолиза интактных (1) и обработанных ДИДС (2) эритроцитов от концентрации реактива Элмана. Степень ингибирования получена, как показано на рис. 3.

и 5). В концентрациях выше 400 мкМ реактив Элмана полностью ингибировал гемолиз интактных клеток и в меньшей степени гемолиз клеток, обработанных ДИДС (рис. 5). Однако решающее значение для проявления ингибирующего эффекта ДТНБ имела последовательность смешивания ДТНБ, кислоты и клеток. Когда кислота была добавлена через 1 мин после смешивания клеток и раствора ДТНБ, начинался быстрый и полный выход гемоглобина, происходивший быстрее, чем гемолиз в среде без ДТНБ (данные не приведены). Даже в случае добавления клеток в среду, содержащую ДТНБ и кислоту (рис. 4), сразу начинался гемолиз части клеток, которая была тем меньше, чем выше была концентрация ДТНБ. Вероятно, воздействие ДТНБ на клетки было двояким. С одной стороны, он sensibilizировал клетки к гемолитическому действию кислоты, а с другой стороны, он защищал клетки от гемолиза, но происходило это только в кислой среде.

После отделения клеток от кислотной (НСl) гемолитической среды, содержащей 0,5 мМ ДТНБ, в среде суспендирования оказывалось примерно на 30% меньше реагента Элмана по сравнению с начальным количеством. Очевидно, значительная часть реагента связывалась с клетками. После отделения, эти же клетки отмывали и исследовали в физиологическом растворе, рН 7,4. В дальнейшем, они обозначены

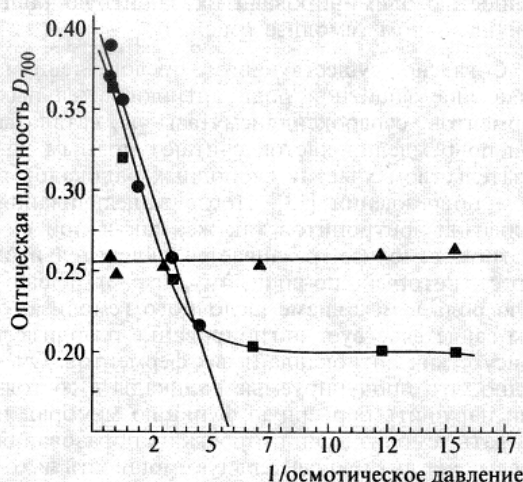


Рис. 6. Влияние осмотического давления среды NaCl на объем интактных эритроцитов (кружок) и эритроцитов, фиксированных глутаровым альдегидом (треугольник) и ДТНБ в кислой среде (квадрат). Фиксирование клеток ДТНБ (0,5 мМ) проводили в закисленном физиологическом растворе, рН 3,2. Фиксирование клеток с глутаровым альдегидом (1% об.) проводили при рН 7,4. Через 5 мин клетки отделяли, промывали в физиологическом растворе и добавляли равными порциями в раствор NaCl указанной тоничности. Изменения объема регистрировали по оптической плотности светорассеяния D_{700} , согласно [13].

как клетки, фиксированные ДТНБ в кислой среде.

Известно, что интактные эритроциты имеют высокую проницаемость для воды и очень низкую проницаемость для неорганических катионов, вследствие чего они проявляют себя как линейные осмометры в растворах NaCl при концентрациях соли в диапазоне 100 – 500 мМ [21]. На рис. 6 показано, что в подобных условиях клетки, фиксированные реактивом Элмана в кислой среде, тоже проявляют себя как линейные осмометры. Это свидетельствует о сохранении полупроницаемости их мембран и, в частности, сохранении их барьерных свойств для неорганических катионов. Такое изменение объема не имело места у клеток, обработанных глутаровым альдегидом (1%) (рис. 6). Этот мембранопроницающий бифункциональный аминокислотный реагент, как известно, сшивает как цитозольный гемоглобин, так и мембранные белки, препятствуя изменению объема клеток. В этой связи, данные рис. 6 указывают еще и на то, что у клеток, фиксированных реактивом Элмана в

кислой среде, гемоглобин остался преимущественно в свободном состоянии, что позволяет этим клеткам изменять свой объем в тех же пределах, что и интактным клеткам.

В гипотонических средах с концентрациями NaCl от 100 до 20 мМ интактные клетки набухали до объема выше критического и лизировали, тогда как клетки, фиксированные ДТНБ в кислой среде, достигали одого и того же максимального объема, который не изменялся в течение нескольких часов (рис. 6 и 7). Этот результат подтверждает, что мембраны фиксированных клеток сохраняли свойства барьера проницаемости для неорганических катионов. Этот результат свидетельствует также о том, что механические свойства мембран фиксированных клеток и, в частности, их модуль изотропного расширения [22] претерпели изменения. В процессе гипертонического сжатия мембраны этих клеток деформировались подобно мембранам интактных клеток, но в гипотонических средах они были не в состоянии подвергаться надкритическому изотропному растяжению, которое у интактных мембран приводит к появлению пор. Подобное изменение механических свойств клеточных мембран может быть результатом избирательного сшивания мембранных белков в присутствии реактива Элмана на предшествующем лизису этапе кислотного гемолиза.

Влияние SH-реагентов на мембраны клеток, фиксированных ДТНБ в кислой среде, изучали в условиях значительного градиента концентрации ионов по обе стороны клеточных мембран (рис. 7, кривые 1 и 1'). В контрольных экспериментах изотоничность внешней среды по отношению к клеточному цитозолю восстанавливали добавлением сахарозы (рис. 7, кривые 2 и 2'). Добавление мембранопроникающих SH-реагентов (цистеина, дитиотреитола или β-меркаптоэтанола) к суспензии этих клеток приводило к быстрому гемолизу (рис. 7, кривые 1' и 2'). По-видимому, восстановление SH-групп поверхностных и внутримембранных белков фиксированных клеток при применении этих мембранопроникающих SH-реагентов полностью снимало фиксацию мембран и нарушало барьерные свойства. В отличие от этого, добавление мембранонепроникающего SH-реактива альбумина [23] во внешнюю среду приводило к значительному сжатию клеток до нового равновесного объема (примерно на 20% согласно изменению светорассеяния) (рис. 7, кривые 1 и 2). Это значительное изменение объема фиксированных клеток не может быть вызвано ос-

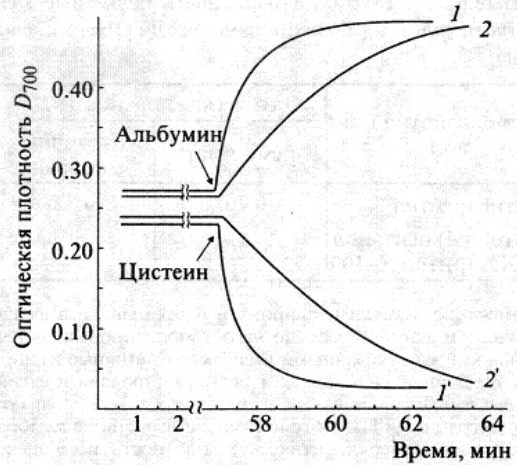


Рис. 7. Увеличение проницаемости клеток, фиксированных ДТНБ в кислой среде, в присутствии непроникающих и проникающих SH-реагентов. Клетки суспендировали в 1,8 мл гипотонической среды, содержащей 20 мМ NaCl (кривые 1 и 1'), или в том же объеме изотонической среды, содержащей 20 мМ NaCl и сахарозу (кривые 2 и 2'). При непрерывном перемешивании в момент, обозначенный стрелкой, добавляли 20 мкл раствора непроникающего SH-реактива (альбумин в конечной концентрации 30 мкг/мл) или проникающего SH-реактива (цистеин, дитиотреитол или β-меркаптоэтанола в конечной концентрации 1%). Последующие изменения объема клеток регистрировали по оптической плотности светорассеяния (D_{700}) суспензии. Начальная концентрация клеток различна у разных образцов.

мотическим давлением, создаваемым альбумином, так как альбумин в конечной концентрации (30 мкг/мл) обладает незначительным осмотическим давлением. Это подтверждается опытами с добавлением такого же количества альбумина к суспензии интактных эритроцитов в изотонических условиях, что не приводило к изменению объема клеток (данные не показаны). К тому же равновесные значения объема фиксированных клеток были тем больше, чем меньше была концентрация NaCl в суспензионной среде (данные не показаны), но не зависели от присутствия сахарозы вплоть до достижения изотоничности (рис. 7, кривые 1 и 2). Эти результаты указывают на то, что взаимодействие альбумина с внешней поверхностью клеток инициировало выход цитозольных ионов и осмотически связанной с ионами воды в соответствии с ионным концентрационным градиентом. Это указывает на повышение проницаемости мембран для ионов при одновременном сохранении их фиксации и барьерных

Связывание ДТНБ с цитозольными белками и мембранами клеток, фиксированных ДТНБ в кислой среде

Гемолизирующий агент	Оптическая плотность, D_{400}	
	Гемоллизат	Клеточные мембраны
Дитиотреитол	0,707	0,327
4% (об/об) пентанол и 0,4% тритон X-100	0,200	1,07

Примечание. Клетки изолировали и промывали в физиологическом растворе, после чего гемолизировали в нейтральной среде указанными агентами. Клеточные мембраны отделяли от гемолизата и ресуспендировали в физиологическом растворе в объеме, равном объему гемолизата. Концентрацию ДТНБ в гемоллизате и в растворе мембран определяли, измеряя оптическую плотность поглощения при 400 нм (D_{400}) после защелачивания до pH 12 и разведения полученных растворов дистиллированной водой (pH 12) в 10 раз. Приведены усредненные данные трех экспериментов.

свойств для сахарозы. Такое специфическое повышение ионной проницаемости фиксированных мембран в присутствии альбумина может быть следствием избирательного восстановления только мембранных SH-групп, экспонированных наружу.

Практически полный и быстрый гемолиз клеток, фиксированных ДТНБ в кислой среде, происходил также при защелачивании суспензионной среды до pH 12. Такой же результат можно было получить совместным воздействием детергентов (4 % пентанол и 0,4% тритон X-100) при нейтральном pH (данные не показаны). Имея в виду, что эти детергенты не в состоянии нарушить ковалентное сшивание белков, можно предположить, что у фиксированных ДТНБ клеток гемоглобин находился в свободном состоянии, что позволяло ему выходить за пределы клеток в случае нарушения барьерных функций мембран.

Применение указанных выше способов гемолиза клеток, фиксированных ДТНБ в кислой среде, позволило изучить распределение ДТНБ между цитозольными белками и клеточными мембранами. В таблице показано, что после гемолиза, вызванного детергентами, захваченный клетками реагент Элмана находился прежде всего во фракции мембран. По-видимому, перед гемолизом клеточные мембраны содержали в пять раз больше ДТНБ, чем цитозоль, что согласуется с выводом о преимущественном сшивании мембранных белков по сравнению с

возможным сшиванием гемоглобина. Данные таблицы указывают еще на то, что дитиотреитол, восстановитель SH-групп, переводил большую часть захваченного мембранами ДТНБ в гемоллизат. Эти результаты подтверждают, что у клеток, фиксированных ДТНБ в кислой среде, реагент связывался главным образом с мембранами и преимущественно с их белками, содержащими SH-группы. Подобный вывод согласуется с результатом фракционирования сшитых мембран, проведенного по методике [16]. Нижний и верхний слои, содержащие липиды и гликофорин, лишенные SH-групп, практически не содержали ДТНБ. В то же время срединный слой, в котором находились интегральные белки и спектрин, содержащие много SH-групп, был интенсивно желтым.

Известно, что в нейтральных и щелочных средах реагент Элмана осуществляет дисульфидный обмен с SH-группами белков, оставаясь в конце реакции в свободном состоянии [12]. По-видимому, этот обмен сенсибилизирует клеточные мембраны к последующему гемолитическому воздействию кислоты. Одновременное же воздействие ДТНБ и кислоты на клетки, однако, выявило дополнительный ингибирующий эффект и, при определенных условиях, гемолиз всех клеток не наблюдался (рис. 4 и 5). Ингибирование кислотного гемолиза в этих условиях было связано с образованием ковалентных сшивок между мембранными белками, в которых, по-видимому, участвовал сам реагент (таблица). В изолированных клетках сшивания можно было частично избежать, применяя мембранонепроницающий SH-реагент (альбумин) или полностью мембранопроницающие SH-реагенты или защелачивание среды. Это сшивание мембранных белков можно объяснить, имея в виду, что ДТНБ представляет собой дикарбоновую ароматическую кислоту. Ввиду очень большой гидрофобности, ДТНБ концентрировался преимущественно в клеточных мембранах. В кислой среде ДТНБ, вероятно, осуществлял ацилирование преимущественно SH-групп мембранных белков в условиях кислотного катализа [24], вызывая тем самым сшивание белков. Перевод фиксированных мембран в щелочную среду снимал сшивание из-за гидролиза образовавшихся тиоэфиров [24].

Чтобы объяснить сигмоидный вид кривых, характеризующих ингибиторный эффект ДТНБ (рис.4), будем исходить из представления, что гемолиз индивидуальной клетки можно предотвратить, когда вся площадь ее мембраны будет охвачена сетью сшитых белков. При концентрациях ниже 100 мкМ и приблизительно

равномерном распределении имеющегося агента между мембранами суспендированных клеток количества ДТНБ очевидно недостаточно для того, чтобы полностью фиксировать мембраны заметного числа клеток. Здесь проявились только сенсibiliзирующие свойства агента. При концентрациях ДТНБ выше 100 мкМ уже значительная доля клеток и затем все клетки подвергались полному сшиванию своих мембран и не лизировали. По-видимому, предварительная обработка клеток ДИДС уменьшала эффективность этой фиксации и понижала максимальную степень ингибирования гемолиза (рис. 4). Весьма вероятно, что ингибированный ДИДС анионный канал претерпел изменения, помешавшие его включению в сеть сшитых реактивом Элмана белков.

В литературе накоплено множество данных о том, что повреждение нативной структуры мембранных белков влечет за собой их латеральную агрегацию [25]. Неизвестно, однако, когда нарушается барьерная функция мембран — на этапе денатурации белков или на последующей стадии их агрегации. В условиях кислотного гемолиза сшивание мембран ДТНБ может предотвратить агрегацию мембранных белков, но не может отменить их повреждения, наступившего после закисления суспензионной среды. Результаты этой работы показывают, что нарушение структуры мембранных белков само по себе не вызывает такие барьерные дефекты, которые обычно связываются с гемолизом, если последующая агрегация этих белков невозможна. Таким образом, приходится допустить, что барьерные дефекты, ответственные за кислотный и, вероятно, щелочной гемолиз, связаны, главным образом, с самой агрегацией измененных белков. На основе этого заключения ингибирующий эффект гликофорина, проявляющийся при кислотном гемолизе [5], можно объяснить тем, что гликофорин, будучи чрезвычайно стабильным мембранным гликопротеидом, несущим большой поверхностный заряд, вероятно, мешает агрегации измененных мембранных белков. Размеры барьерных дефектов при щелочном гемолизе малы, так что молекулы сахарозы (0,45 нм) через них не проходят [4], тогда как при кислотном гемолизе размеры дефектов составляют около 15 нм [5]. Одним из факторов, влияющим на размер дефектов, может быть периферическая сеть спектрина, которая ограничивает латеральную диффузию мембранных белков и мешает их агрегации. Ввиду того, что изоэлектрическое зна-

чение рН спектрина лежит в кислой области, возможности этой сети ограничить агрегацию измененных белков и образование барьерных дефектов, вероятно, проявляются главным образом при щелочном гемолизе. В дополнение отметим, что окисление гемоглобина в кислой среде идет более интенсивно, по сравнению с этим процессом в щелочной среде, что, вероятно, приводит к значительно более тяжелому окислительному стрессу и изменению мембранных белков при кислотном гемолизе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wood S.C., Lenfant C. // Handbook of Physiology, Sect. 3: The respiratory System, V. IV /By eds. L.E. Fahri, S.M. Tenney. Bethesda, MD: American Physiological Society, 1987.
2. Ilani A., Granoth R. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1027. P. 199–1027.
3. Заводник И.Б., Пулецкая Т.П. // Биофизика. 1997. Т. 42, вып. 5. С. 1106–1112.
4. Ponder E. Haemolysis and Related Phenomena. N.Y.: Grune and Stratton, 1971.
5. Arvinte T., Cudd A., Schulz B., Nicolau C. // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 981. P. 61–68.
6. Elgsaeter A., Shoton D.M., Branton D. // Biochim. Biophys. Acta. 1976. V. 426. P. 101–122.
7. Иванов И.Т., Бенов Л.Ц. // Биофизика. 1991. Т. 36. С. 839–844.
8. Трикуленко А.В., Пилишко У.В., Панкевич Г.Л. // Биофизика. 1996. Т. 41. С. 1275–1277.
9. Ivanov I.T. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1415. P. 349–360.
10. Иванов И.Т., Данаилова Ю.Д. // Биофизика. 1991. Т. 36, вып. 5. С. 845–849.
11. Cabantchik J.Z., Rothstein A. // J. Membr. Biol. 1974. V. 15. P. 207–226.
12. Heuschen A. // Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis / By eds. B. Wittmann-Liebold, J. Salnikow, V.A. Erdmann. Springer-Verlag, 1986. P. 244–255.
13. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. // Harper's Biochemistry. Prentice Hall International Inc., 1993. P. 692.
14. Macey R., Adorante J.S., Orme F.W. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 512. P. 284–295.
15. Yang X.S., Kamino K. // Jpn. J. Physiol. 1995. V. 45 (5). P. 723–741.
16. Hamaguchi H., Cleve H. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. V. 278. P. 271–280.
17. Baker G.F., Baker P. // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1285. P. 192–202.
18. Prasad M.R., Engelman R.M., Jones R.M., Das D.K. // Biochem. J. 1989. V. 263. P. 731–736.
19. Gordon-Smith E., White J. // Brit. J. Haematol. 1974. V. 26. P. 513–517.

20. *Waugh S., Low Ph.* // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 34-39.
21. *Savitz D., Siedel V., Solomon A.* // *J. Gen. Physiol.* 1964. V. 48. P. 48-79.
22. *Evans E.A., Parsegian V.A.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1983. V. 416. P. 13-33.
23. *Tan Boen Hie.* // *The Reactivity of Sulfhydryl and Disulfide Groups in Native and Denatured Bovine Serum Albumine*. Leiden: Druco Drukkerijbedijven, 1962. P. 121-282.
24. *Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И.* // *Биоорганическая химия*. М.: Медицина, 1985. С. 204.
25. *Deuticke B., Lutkemeier P., Poser B.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. V. 1067. P. 111-122.

A Comparison of the Mechanisms of Acid- and Base-induced Hemolysis of Human Erythrocytes

I.T. Ivanov

Medical Faculty, University of Fraki, Stara Zagora, Bulgaria

A comparative analysis of the mechanisms of base- and acid-induced hemolysis was performed. The results obtained indicate the transport of base equivalents through the anion exchanger during the initial phase of base-induced hemolysis, followed by oxidative stress on cellular membranes and hemolysis. It was shown that the Ellman's reagent (0.4 mM) did not prevent NaOH-induced hemolysis but fully inhibited HCL-induced hemolysis. The inhibition of acid-induced hemolysis was accompanied by the crosslinking membrane proteins, presumably through their acylation. The addition of SH-reducing reagents (cystein, dithiotreitol and, to a lesser extent, albumin eliminated the crosslinkage of membrane proteins and impaired the permeability barrier. It was found that crosslinkage could not prevent the oxidative damage of membrane proteins but was able to preserve the permeability barrier. Based on these results, it was concluded that the barrier impairments associated with acid-induced hemolysis were due to the aggregation of membrane proteins that underwent oxidative damage.

Key words: erythrocytes, base- and acid-induced hemolysis, mechanism