

мазков О. А. Вопросы медицинской химии, 1984, 3, 79—86. 5. Иванов В. Т. Вопросы медицинской химии, 1984, 3, 23—31. 6. Коплик Е. В., Ведяев Д. Ф., Михалева И. И. и др. Докл. АН СССР, 1983, 267, 1, 230—233. 7. Медведев О. С., Титов М. И. В кн.: «Фармакология нейропептидов», М., 1982, 88—101. 8. Медеяновский А. Н., Мартынов Л. Н., Бугаев Б. А. и др. В кн.: «Проблемы сравнительной электрокардиологии», Сыктывкар, 1979, 91. 9. Судаков К. В. Вопросы медицинской химии, 1984, 3, 15—23. 10. Чазов Е. И., Титов М. И., Виноградов В. А. и др. Вопросы медицинской химии, 1984, 3, 47—51. 11. Шерстнев В. В., Полетаев А. Б., Долгов О. Н. Успехи физиологических наук, 1979, X, 66—86. 12. Brain peptides—new synaptic messengers. *Lancet*, 1980, 8200, 895—896. 13. Monnier M., Dubler J. A. et al. *Pflügers Arch.*, 1973, 345, 23—35. 14. Monnier M., Dubler J., Gächter R. et al. *Neurosci. Lett.*, 1977, 6, 9—13. 15. Price D. A., Greenberg M. J. *Science*, 1977, 197, 4304, 670—671. 16. Tobler J., Borbely A. Waking a Sleeping, 1980, 4, 139—153.

УДК (612.111:577.1+577.352.36):616.1

А. В. ГЮЛЬХАНДЯН, Г. М. ГЕОКЧАҚЯН, А. З. КАРАПЕТЯН

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ СОСУДИСТЫХ ПАТОЛОГИЯХ

При многих патологических состояниях меняются как функциональные, так и структурные характеристики мембран клеток. Знание механизмов нарушений может способствовать более глубокому пониманию условий развития патологического состояния и помочь в коррекции мембранных нарушений.

Одной из характеристик функционального состояния мембран является концентрация ионов в клетке и проницаемость по отношению к ним. Известно, что увеличение концентрации Ca^{2+} в эритроцитах как с помощью кальциевых ионофоров, так и при ингибировании метаболизма (при этом происходит истощение клетки по АТФ) ведет к выходу K^{+} из эритроцитов [8—12, 14].

Перспективным методом исследования структурного состояния мембран является метод флуоресцентных зондов, позволяющий судить о таких физико-химических параметрах мембран, как поверхностный заряд, мембранный потенциал, микровязкость мембран и т. д. [1, 2]. Одним из наиболее распространенных зондов является отрицательно заряженный краситель 1-анилино-8-нафталисульфонат (АНС), флуоресценция которого резко повышается при переходе из водной среды в неводную фазу [1, 2, 6, 7].

В настоящей работе исследовано изменение количества K^{+} в эритроцитах, калиевой проницаемости мембран, связанной с транспортом Ca^{2+} внутрь и структурного состояния мембран по данным флуоресценции АНС при некоторых сосудистых патологиях по сравнению с нормой.

Методика. Эритроциты выделяли из свежей человеческой крови, взятой под гепарином. Была использована кровь больных с облитерирующим атеросклерозом и эндартеритом. Контролем служили эритроциты доноров.

Для исследования концентрации K^+ и калиевой проницаемости эритроцитов кровь осаждалась, затем дважды промывалась в 150 мМ NaCl. Изменения концентрации K^+ и H^+ определяли с помощью пленочного K^+ - и стеклянного H^+ -селективных электродов, соединенных в одной ячейке и подключенных через рН-метры к самописцам. Для определения количества K^+ в клетке в ячейку добавляли сапонин в конечной концентрации 0,02%, что приводило к гемолизу эритроцитов и быстрому выходу K^+ . Калиевую проницаемость эритроцитов смотрели, добавляя в ячейку ингибитор гликолиза — фторид натрия. Истинный объем эритроцитов вычисляли центрифугированием суспензии эритроцитов на микроцентрифуге. Расчеты велись на 1 литр плотно отцентрифугированных эритроцитов.

Взаимодействие АНС с эритроцитами определяли согласно методике [7]. 4 раза промытые эритроциты инкубировали 30 мин в среде, содержащей 150 мМ NaCl и 10 мМ трис-HCl, pH 7,4 и 20 мкМ АНС при 37°C. При этом отношение объема эритроцитов к объему среды равнялось 1:7. Затем суспензию быстро отцентрифугировывали и 0,03 мл супернатанта добавляли в 3 мл диоксана, в котором флуоресценция АНС увеличивается на несколько порядков по сравнению с водной фазой. Таким образом можно узнать долю АНС, не связанного с эритроцитами. Интенсивность флуоресценции смотрели на спектрофлуориметре Marki фирмы «Farrand» (США) при длине волны возбуждения 370 нм и флуоресценции 470 нм. Сравнивались относительные интенсивности флуоресценции АНС супернатанта в диоксане (J) с контролем (J_0). Для контроля соответствующее количество среды без эритроцитов инкубировали с 20 мкМ АНС 30 мин при 37°C, затем 0,03 мл раствора добавляли в 3 мл диоксана.

Результаты и обсуждение. В таблице представлены результаты расчета концентрации K^+ в эритроцитах (функциональные свойства) и отношение интенсивностей флуоресценции, отражающей структурные аспекты, в норме и при сосудистых патологиях. Как видно из табл., количество K^+ в норме и при атеросклерозе отличается незначительно (достоверного отличия нет). В случае же эндартериита концентрация K^+ уменьшается по сравнению с нормой почти на 17% ($P < 0,05$).

Таблица

Количество K^+ и отношение интенсивностей флуоресценции в норме и при сосудистых патологиях

	[K^+], ммоль/л эритроцитов	J/J_0
	$M \pm m$	
норма	$89,7 \pm 4,2$ $n=11$	$0,807 \pm 0,008$ $n=5$
облитерирующий атеросклероз	$81,7 \pm 2,9$ $n=17$	$0,754 \pm 0,012$ $n=8$
эндартериит	$74 \pm 4,4$ $n=12$	$0,746 \pm 0,006$ $n=11$

Механизм «выбирания» АНС эритроцитами включает 2 процесса: адсорбцию АНС на поверхности мембран и перенос красителя внутрь клеток [4, 7]. Поскольку меньшая величина J/J_0 означает уменьшение количества АНС в супернатанте, то, судя по нашим данным, и при артеросклерозе и при эндартериите увеличивается связывание и проникновение АНС в эритроциты. В обоих случаях по сравнению с нормой есть

достоверное различие: $P < 0,01$ при атеросклерозе и $P < 0,001$ при эндартериите. Это может быть связано как с уменьшением фиксированного отрицательного заряда на мембране, так и с ухудшением состояния мембраны, что приводит к увеличению проницаемости и к большему вхождению АНС внутрь эритроцитов.

Нами был исследован выход K^+ из эритроцитов при ингибировании гликолиза метаболитическим ингибитором, фторидом натрия. При подавлении гликолиза прекращается производство АТФ и Ca^{2+} -АТФаза, существующая на мембране эритроцитов [13, 15] и работающая с использованием энергии гидролиза АТФ, теряет способность к активной «откачке» Ca^{2+} против градиента концентрации. Если при этом в среде присутствуют ионы кальция, то их проникновение внутрь приводит к активированию Ca^{2+} -зависимого «калиевого канала» и ионы калия могут выходить из эритроцитов [8, 9, 12].

На рис. 1 и 2 представлены типичные кривые выхода K^+ из эритроцитов в условиях ингибирования гликолиза фторидом в присутствии Ca^{2+} в среде в норме и при эндартериите, поскольку наибольшее отличие от нормы было получено именно в этом случае. Как видно из рис. 1, в норме после добавления фторида происходит незначительный выход K^+ , первая добавка Ca^{2+} практически не влияет на калиевую проницаемость, последующее же внесение Ca^{2+} приводит к быстрому выходу K^+ , при этом наблюдается резкий «всплеск» концентрации H^+ . При эндартериите (рис. 2 А) быстрый выход K^+ получается уже после первой порции Ca^{2+} , «всплеск» иногда бывает менее выраженный. В некоторых случаях уже после фторида калиевая проницаемость существенно увеличивается и последующие добавки Ca^{2+} не влияют на скорость выделения K^+ (рис. 2 Б). «Всплеска» H^+ не замечается.

Кажется вероятным, что «всплеск» вызван каким-то структурным изменением формы эритроцитов (деформацией), связанным с транспортом Ca^{2+} внутрь. Если это справедливо, то, очевидно, при эндартериите мембраны эритроцитов в значительной мере нарушены. Не исключено и «ослабление» метаболитических процессов, в частности гликолиза, из-за чего в эритроцитах может быть меньше АТФ. Вышесказанное может объяснить иницирование калиевого канала при меньшем числе добавок Ca^{2+} по сравнению с нормой.

Таким образом, можно прийти к выводу, что при указанных сосудистых патологиях функциональные изменения эритроцитов сопряжены со структурными нарушениями мембран. В свою очередь эти нарушения могут быть связаны с ухудшением процессов гликолиза. Известно, например, что в мембране эритроцитов есть ферментная система, зависящая от АТФ, Mg^{2+} и коэнзима А, которая может превращать лизофосфатидилхолин в фосфатидилхолин [5]. Это так называемая ацилазная реакция важна для сохранения фосфолипидов эритроцитов. Можно предположить также, что повышенная агрегируемость эритроцитов при сосудистых патологиях [4] объясняется именно такими структурными изменениями как нарушение фосфолипидного состава, заряда

мембран или деформация эритроцитов. Поэтому наряду с хирургическим лечением этих заболеваний можно рекомендовать терапию, направленную на коррекцию состояния эритроцитов.

Ереванский филиал ВНИЦ АМН СССР

Поступила 30/X 1986 г.

Ա. Վ. ԳՅՈՒԽԱՆԴԱՆՅԱՆ, Գ. Մ. ԳԵՈՎԿԿՅԱՆ, Ա. Զ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ԷՐԻԹՐՈՑԻՏՆԵՐԻ ՈՐՈՇ ՀՈՒՆԿՑԻՈՆԱԿ ԵՎ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԱՅԻՆ
ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՆՈՔԱՅԻՆ
ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրված են մարդկային էրիթրոցիտների թաղանթների որոշ ֆունկցիոնալ և կառուցվածքային հատկությունների փոփոխությունները անոթային հիվանդությունների ժամանակ և համեմատություն նորմայի հետ:

A. V. Gyulkhandanyan, G. M. Geokchakyan, A. Z. Karapetyan

The Investigation of Some Functional and Structural Properties of Erythrocytes in Vascular Pathologies.

Summary

The changes of some functional and structural characteristics of human red blood cell membranes in vascular pathologies in comparison with healthy donors have been studied.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., Наука, 1980.
2. Добрецов Г. Е. Итоги науки и техн. ВИНТИ. Биофизика, 11, 101—188, 1979.
3. Саркисян Б. Г., Шердукалова Л. Ф., Феоктистов В. Е., Аюнц М. Б. Кровообращение, 15, 22—26, 1982.
4. Черницкий Е. А., Воробей А. В., Конев С. В. Биофизика, 23, 80—84, 1978.
5. Шохет С. (S. B. Shohet) В кн.: «Мембраны и болезнь». М., Медицина, 76—89, 1980.
6. Fortes P. A. G., Hoffman J. F. J. Membrane Biol., 1971, 5, 154—168.
7. Fortes P. A. G., Hoffman J. F. J. Membrane Biol., 1974, 16, 79—90.
8. Lew V. S. Biochem. Biophys. Acta, 1971, 233, 827—830.
9. Lew V. S. J. Physiol. Lond., 1970, 206, 35—36.
10. Lew V. S., Ferreira H. G. Nature, 1976, 263, 336—338.
11. Reed P. W. J. J. Biol. Chem., 1976, 251, 3489—3493.
12. Romero P. J., Whittam R. J. Physiol. Lond., 1971, 214, 481—507.
13. Sarcadi B. Biochem. Biophys. Acta, 1980, 604, 154—190.
14. Sarcadi B., Szasz J., Gardos G. J. Membrane Biol., 1976, 26, 357—370.
15. Sarcadi B., Szasz J., Gerloczy A., Gardos G. Biochem. Biophys. Acta, 1977, 464, 93—107.