

ем линейного натяжения кромки поры. Более того, диапазон изменения  $\gamma$  в этом случае точнее отражает степень изменения  $\bar{\Gamma}$  БЛМ.

Таким образом, полученные результаты показывают, что в основе изменения электрохимической устойчивости БЛМ при действии бензокаина лежит изменение линейного натяжения кромки поры.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дерягин Б. В., Гуткоп Н. В. Коллоидный ж. СССР, 21, 431, 1962.
2. Микаелян Л. Г., Аджян С. А., Карапетян А. К. Биолог. ж. Армении, 18, 1, 29, 1985.
3. Микаелян Л. Г., Аджян С. А. Биофизика, в печати.
4. Чиммеджев Ю. А. и др. В кн.: Биофизика мембран, 2, сер. Итоги науки и техники, 161, М., 1982.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР

Получено 20.VIII 1985 г.

УДК 612.118.221:546.41

### ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА КИНЕТИКУ ОСМОТИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

А. Г. АГАМАЛЯН

*Ключевые слова:* эритроциты,  $\text{Ca}^{2+}$ , гемолиз.

Эритроциты являются простой и удобной моделью для изучения структуры и функций биомембран, трансмембранного транспорта и резистентности мембран к различным физико-химическим воздействиям. В эритроцитарных мембранах отсутствует  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  обмен [9], что делает их выгодным объектом для исследования механизма активного  $\text{Ca}^{2+}$ -транспорта, осуществляемого действием  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса, выводящего  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки против концентрационного градиента (содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в эритроцитах  $1 - 2 \times 10^{-5}$  М, из которых  $10^{-7} - 10^{-6}$  М в цитоплазме, а во внеклеточной среде  $10^{-4}$  М). Функцию вывода ионов кальция из клетки осуществляет  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимая  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ аза, работающая за счет расщепления АТФ в присутствии магния и кальмодулина [7]. Незначительное увеличение внутриэритроцитарной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к значительному изменению формы клеток (городчивание эритроцитов) и увеличению жесткости мембраны. [3, 12], что вероятнее всего связано с воздействием на сократительные белки спектрин-актинового цитоскелета, прилегающего к внутренней стороне мембраны [4], хотя есть данные о кальций-зависимых изменениях в липидном составе мембран эритроцитов. Проникновение ионов кальция в эритроциты стимулируется ионофором А23187, пропранололом, увеличением рН среды и АТФ истощением [5, 6, 11].

Нами была поставлена задача изучить действие ионов кальция на процесс осмотического лизиса эритроцитов донорской крови при различных условиях среды, что может дать дополнительную информацию о некоторых аспектах трансмембранного кальций-переноса.

**Материал и методика.** Методика автоматической записи кинетики гемолиза подробно изложена в предыдущих публикациях [1, 2]. Метод основан на изменении светопропускания суспензии эритроцитов в гемолизирующем буфере в процессе гемолиза. В качестве анализируемых параметров были использованы общее время процесса ( $t$ ) и скорость на начальном кооперативном участке кривой осмотического гемолиза ( $v$ ). Использовали отмытые эритроциты в 0,9%-ном NaCl/15 мМ Трис-HCl буфера, а в качестве гемолизирующего раствора—0,225%-ный NaCl с pH 7,4 при 25°C. CaCl<sub>2</sub> в исследуемой концентрации добавляли *in vitro* в гемолизирующий раствор до начала эксперимента. При работе с высокими концентрациями Ca<sup>2+</sup> (выше 10<sup>-3</sup> М) рассчитывали и вводили поправку на изменение осмотического давления.

**Результаты и обсуждение.** Как видно из рис. 1 а, ионы кальция в изученных концентрациях увеличивают общее время гемолиза и снижают скорость в кооперативной фазе, т. е. резистентность мембран эритроцитов к повреждающему воздействию повышается. Интересно, что в

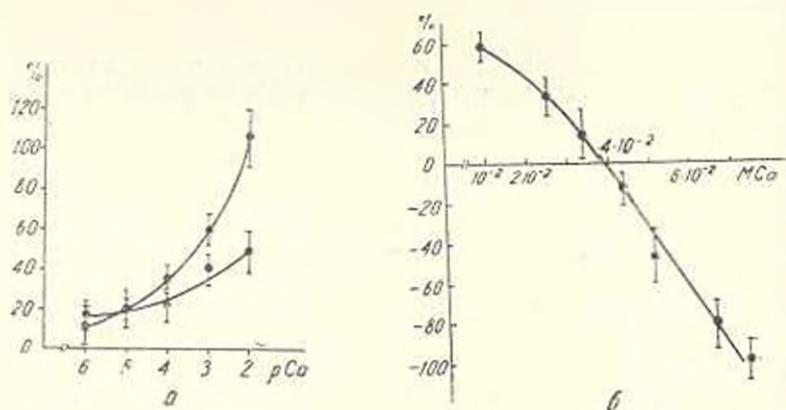
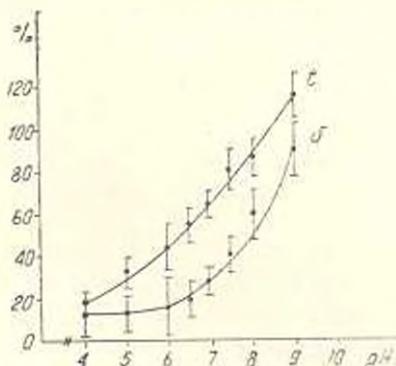


Рис. 1. Эффект различных концентраций ионов кальция на параметры кинетики осмотического гемолиза эритроцитов. По оси ординат — увеличение времени и уменьшение скорости гемолиза в процентах по отношению к контролю без кальция. pH среды 7,4, температура 25°C.

условиях длительной инкубации суспензии крови с высокими концентрациями Ca<sup>2+</sup> достоверное действие на процесс гемолиза не выявлялось. Замедление гемолиза происходит лишь при добавлении кальция в кювету с гемолизирующим раствором. По всей видимости, осмотическому разрыву предшествует увеличение входа Ca<sup>2+</sup> внутрь эритроцитарных клеток, что увеличивает их жесткость и прочность к разрыву. При концентрациях Ca<sup>2+</sup> выше 10<sup>-2</sup> М стабилизирующий эффект ионов кальция начинает понижаться и меняется на обратный, т. е. ускоряющий гемолиз (рис. 1 б). Это объясняется тем, что Ca<sup>2+</sup>-насос успешно справляется со своей функцией лишь при концентрации ионов во внеклеточной среде, превышающей внутриклеточную не более чем в 10000 раз [10]. Таким образом, при высоких концентрациях Ca<sup>2+</sup> в значительной степени проникает в эритроциты, вызывая кальциевую деструкцию мембраны, что, естественно, ускоряет гемолиз.

Изучена также зависимость эффекта  $\text{Ca}^{2+}$  на гемолиз от pH среды в диапазоне 4—9 (рис. 2). Повышение эффекта с ростом pH связано с увеличением входа катиона в эритроциты [6]. При повышении температуры среды от 5 до 40°C при постоянном pH действие кальция на ге-

Рис. 2. Зависимость эффекта ионов кальция на гемолиз от pH среды  $t=25^\circ\text{C}$ , содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в среде  $5 \cdot 10^{-3}$  М.



молиз усиливается (от 20 до 68% по скорости), а при более высокой температуре резко уменьшается, что согласуется с данными об инактивации  $\text{Ca}^{2+}$ -помпы при температуре выше 42°C [8]. Полученные данные подтверждают предположение об увеличении проницаемости мембран эритроцитов к ионам кальция в процессе осмотического гемолиза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агамян А. Г., Оганесян С. С. Космич. биол., 6, 60—62, 1983.
2. Авамян К. Г., Оганесян С. С., Агамян А. Г., Саркисян М. А. Методические рекомендации «Определение кинетических параметров гемолиза крови и эритроцитов у больных методом непрерывной автоматической регистрации». Ереван, 1981.
3. Dunn M. J. Biochim. Biophys. Acta, 352, 97—116, 1974.
4. Palek I., Stewart G., Lionetti F. J. Blood, 44, 583—597, 1974.
5. Reed P. W. Fed. Proc., 32, 615, 1973.
6. Romero P. J., Whittam R. J. Physiol., 211, 481—507, 1971.
7. Sarkadi B. Biochim. Biophys. Acta, 604, 159—190, 1980.
8. Sarkadi B., Szász I., Gerlóczy A., Gardos G. Biochim. Biophys. Acta, 461, 93—107, 1977.
9. Schatzmann H. J. In Current Topics in Membranes and Transport (Bronner F. and Kleinzeller A., eds), 6, 125—163, Academic Press, New York, 1975.
10. Schatzmann H. J., Vincenzi F. F. J. Physiol., 201, 369—395, 1969.
11. Szász I., Sarkadi B., Gardos G. J. Membrane Biol., 35, 75—95, 1977.
12. Weed R. L., LaCelle P. L., Merrill E. W. J. Clin. Invest., 48, 795—811, 1969.

Институт кардиологии МЗ Армянской ССР.  
лаборатория молекулярной кардиологии

Поступило 15.XI 1985 г.