

ВЛИЯНИЕ НЕФРОПАТИИ НА МЕМБРАННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЭРИТРОЦИТАХ

А.В.Гюльханданян, С.С.Гамбаров, Р.А.Абрамян, Н.А.Абрамян,
А.П.Погосян, Г.М.Геокчакян, М.Н.Середа, Т.А.Гюльбаязян

*/Институт биохимии НАН РА,
Институт хирургии им. А.Л.Микаеляна МЗ РА/
375032 Ереван, ул. Асратяна, 9*

Ключевые слова: нефропатия, эритроциты, перекисное окисление липидов, транспорт ионов, фуросемид

Общий патофизиологический фон организма, в частности состояние клеток крови, во многом может определять состояние больного. Поскольку эритроциты участвуют во множестве регуляторных процессов, то нарушение их свойств может усугублять течение болезни.

В литературе имеются данные об изменении физико-химических свойств мембран эритроцитов [10,19] и активности некоторых ферментов [3] у больных, страдающих почечной недостаточностью. Подобные изменения могут приводить к нарушениям функциональных свойств клеток. Одним из показателей, характеризующих функциональные отклонения эритроцитов, может служить содержание K^+ в клетках.

Известно, что при токсикозах беременности, в частности при нефропатиях, часто используют диуретик фуросемид. Выявления мембранных механизмов действия препаратов, применяющихся при той или иной патологии, представляется весьма важным, поскольку позволяет дать более точные рекомендации по его использованию. Установлено, что фуросемид ингибирует Cl^- -активируемый пассивный транспорт K^+ в эритроцитах [7] и Na^+/K^+ -котранспорт [12].

Пассивный выход K^+ из эритроцитов может происходить и при активировании Ca^{2+} -зависимого и K^+ -канала [14,17,20] или при добавлении переносчика K^+ валиномицина [11,13]. Однако неизвестно, как влияет фуросемид на калиевую проницаемость, индуцированную этими способами, в условиях, когда основными внутриклеточными анионами служат Cl^- или другой проникающий анион. Между тем, подобные исследования могут дать информацию о сопряжении с потоками ионов K^+ как протонов (поскольку выход K^+ может происходить в обмен на H^+), так и

различных анионов (может идти симпорт K^+ и анионов) и тем самым помогут уточнить мембранный механизм действия фуросемида.

Нами было проведено исследование перекисного окисления липидов (ПОЛ) и количества K^+ в эритроцитах беременных, страдающих нефропатией различной степени в сравнении с этими же показателями у практически здоровых беременных. Изучено также действие фуросемида на Ca^{2+} -зависимый K^+ -канал и на сопряженный K^+/H^+ -обмен в клетках с разным составом внутриклеточных анионов.

Материал и методы

Эритроциты из гепаринизированной венозной крови беременных, страдающих нефропатией, выделяли центрифугированием и затем дважды промывали в 150 мМ NaCl. Контролем служили эритроциты из венозной крови практически здоровых беременных.

Замена внутриклеточного аниона Cl^- на NO_3^- , проводилась по Dunham [7]. Транспорт ионов K^+ и H^+ через мембраны эритроцитов изучали с помощью K^+ - и H^+ -селективных электродов потенциометрическим методом. Количество K^+ в эритроцитах определяли, вызывая гемолиз сапонином.

Эндогенный уровень ПОЛ эритроцитов (выявляли один из конечных продуктов ПОЛ — малоновый диальдегид — МДА) определяли по методу Stocks, Dogmady [18] с небольшими модификациями.

Использовали Ca^{2+} -ионофор A23187 ("Calbiochem"), ваиномицин ("Sigma"), 4-ацетиамидо-4-изотиоцианостильбен-2,2-дисульфоновую кислоту SITS ("Serva"), фуросемид (Paris Chemical).

Полученные данные подвергнуты статистической обработке методом Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования, отражающие уровень ПОЛ и количество K^+ в эритроцитах при нефропатии и в контроле, приведены в табл. 1, откуда следует, что при нефропатии I степени исследуемые структурно-функциональные параметры эритроцитов не отличаются от контроля, тогда как при нефропатиях II и III степеней происходит достоверное увеличение уровня ПОЛ соответственно на 27 и 32%; количество же K^+ в эритроцитах достоверно уменьшается на 11 и 14,5%. Сравнение же нефропатий II и III степеней показывает, что между ними отмечается небольшая разница как по количеству K^+ в эритроцитах, так и по уровню ПОЛ.

Можно предположить, что одной из причин потери K^+ эритроцитами при нефропатии является интенсификация ПОЛ. Нормальный уровень ПОЛ в эритроцитах поддерживается в основном α -токоферолом (витамин E), присутствующим в мембране [1,6], а также ферментами-антиоксидантами, такими как супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза [4,5]. Увеличение у больных нефропатией II и III степеней содержания

МДА говорит о нарушении соотношения этих антиокислительных систем или их активности.

Таблица 1

Содержание K^+ и величина ПОЛ мембран эритроцитов у беременных, страдающих нефропатией

Показатель	Контроль	Нефропатия		
		I ст.	II ст.	III ст.
K^+ , ммоль/л клеток	91,4±4,18 n=14	90,8±3,2 n=11	81,5±3,4 n=10 p<0,05	78,2±3,15 n=11 p<0,01
ПОЛ, мкмоль МДА/л клеток	6,3±0,5 n=12	6,2±0,45 n=11	7,8±0,43 n=10 p<0,01	8,05±0,4 n=11 p<0,01

Ранее нами было показано, что интенсификация ПОЛ мембран эритроцитов вследствие ингибирования каталазы приводит к усилению пассивной калиевой проницаемости клеток [2]. В работах Maridonneau et al. [15,16] также была выявлена активация выхода K^+ из клеток при добавлении к эритроцитам феназинметосульфата (ФМС), приводящего к генерации свободных радикалов кислорода и к интенсификации ПОЛ.

Таким образом, можно предположить, что повреждение липидного бислоя приводит к уменьшению количества K^+ в эритроцитах. Не исключено, что потеря внутриклеточных ионов K^+ происходит также и вследствие ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазы или Na^+ , K^+ -котранспортной системы. Однако следует отметить, что судя по данным литературы [15], низкие концентрации ФМС, не приводящие к гемолизу, но вызывающие ПОЛ и потерю K^+ , не влияют на активность этих транспортных систем.

Нами было изучено влияние состава внутриклеточных анионов на K^+/H^+ -обмен в эритроцитах, индуцированный переносчиком K^+ -валиномицином и Ca^{2+} -ионофором A23187.

На рисунке представлена картина K^+/H^+ -обмена, вызванная валиномицином в эритроцитах, в которых внутриклеточными анионами служат Cl^- (А) или NO_3^- (Б).

Подсчеты показали, что в среде со 150 мМ NaCl (рисунок) величина стехиометрии K^+/H^+ -обмена составляла в среднем 3,3 (интервал 2,5-4). Большая часть K^+ выходит, очевидно, в результате симпорта с Cl^- .

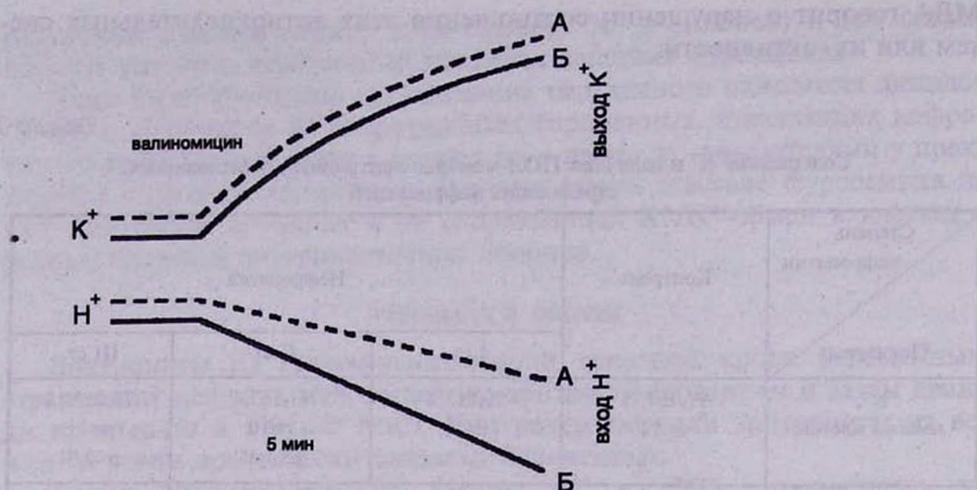


Рис. Индуцируемый валиномицином (0,6 мкм) K^+/H^+ -обмен в эритроцитах, в которых внутриклеточными анионами служат Cl^- (пунктир, А) и NO_3^- (сплошная линия, Б). А — 0,1 мл эритроцитов ингибируются в среде со 150 мМ NaCl и 0,1 мМ KCl; Б — в среде 150 мМ $NaNO_3$ и 0,1 мМ KCl

При замене внутриклеточного Cl^- на NO_3^- в среде со 150 мМ $NaNO_3$ (рисунок) K^+/H^+ -обмен через мембраны клеток имел стехиометрию, равную 1,25 (интервал 1-1,5). Из рисунка видно, что в случае Б количество вошедшего H^+ по сравнению со случаем А увеличивается.

Мы провели сравнительное изучение влияния фуросемида известного ингибитора транспорта анионов SITS [9] на индуцируемый валиномицином K^+/H^+ -обмен в эритроцитах с различным составом внутриклеточных анионов (табл. 2).

Таблица 2

Влияние фуросемида и SITS на индуцированный валиномицином K^+/H^+ -обмен в эритроцитах с различными внутриклеточными анионами

Ингибитор	Внутриклеточные анионы			
	Cl^-		NO_3^-	
	K^+	H^+	K^+	H^+
Фуросемид, 0,33%	36,5±2	35,5±0,5	9±3	11±4
SITS, 50 мкМ	65,5±1	58±6	2±1	5±1

Примечание. Ингибирование выхода K^+ и входа H^+ дано в процентах по сравнению с контролем. Приведены средние результаты 3 измерений.

Из табл. 2 видно, что SITS более чем наполовину подавляет выход K^+ и вход H^+ в эритроциты, в которых основным внутриклеточным анио-

ном является Cl^- . Фуросемид также производит ингибирование K^+/H^+ -обмена в "хлорных" эритроцитах, хотя и в меньшей степени. Очевидно, изменение рН в обработанных валиномицином "хлорных" эритроцитах происходит как из-за выхода совместно с ионами K^+ анионов (OH^- , HCO_3^-), движение которых подавляется, так и вследствие противотранспорта H^+ . Однако поскольку основной вклад в электронейтральность выходящего потока K^+ вносят анионы Cl^- , то из данных табл.2 следует, что движение Cl^- подавляется неполностью. Если же внутриклеточным анионом служит NO_3^- , то эффект ингибирования слабо выражен. Можно думать, что в "нитратных" эритроцитах выход K^+ происходит за счет антипорта H^+ .

Опыты по изучению Ca^{2+} -зависимого K^+/H^+ -обмена, индуцированного ионофором А23187, привели к результатам, аналогичным представленным на рисунке. Мы взяли в данных экспериментах концентрацию Ca^{2+} в среде, равной 0,1 мМ, т.к. при больших концентрациях Ca^{2+} существенную роль может играть эффект обмена Ca^{2+} на H^+ при увеличении потока Ca^{2+} в клетки. И в этом случае в "хлорных" эритроцитах вход H^+ был сравнительно невелик. Стехиометрия K^+/H^+ -обмена в среднем была равна 3,2 (интервал 2,8–4). При замене внутриклеточного Cl^- на NO_3^- количество вошедшего H^+ существенно увеличивается, и отношение K^+/H^+ составляет в среднем 1,5 (интервал 1–2). При этом возрастает и количество вошедшего K^+ .

В табл.3 показано влияние фуросемида и SITS на А23187-индуцированный выход K^+ и вход H^+ в эритроцитах.

Таблица 3

Влияние фуросемида и SITS на индуцированный А23187 K^+/H^+ -обмен в эритроцитах с различными внутриклеточными анионами

Ингибитор	Внутриклеточные анионы			
	Cl^-		NO_3^-	
	K^+	H^+	K^+	H^+
Фуросемид, 0,33%	41±1,3	91±3	18,5±1	39,5±0,5
SITS, 50 мкМ	60,5±0,5	94±3	4±2	2±1

Примечание. Ингибирование выхода K^+ и входа H^+ дано в процентах по сравнению с контролем. Приведены средние результаты 3 измерений.

Из табл. 3 видно, что и фуросемид и SITS ингибирует выход K^+ из "хлорных" эритроцитов почти в той же степени, что и в случае с валиномицином. Однако вход H^+ почти полностью подавляется. Можно предположить, что изменение рН, сопутствующее выходу K^+ при обработке эритроцитов А23187 связано в "хлорных" эритроцитах в основ-

ном с движением анионов (OH^- , HCO_3^-). Транспорт этих анионов, вносящих вклад в изменение рН, ингибируется SITS и фуросемидом. Ионы K^+ выходят, очевидно, совместно с анионами Cl^- , движение которых подавляется частично. Таким образом, можно прийти к выводу, что индуцированный A23187 выход K^+ в "хлорных" эритроцитах человека происходит в симпорте с анионами Cl^- , а также HCO_3^- или (и) OH^- . Антипорт K^+/H^+ играет незначительную роль. В эритроцитах же, в которых Cl^- заменен на NO_3^- , происходит в основном антипорт K^+ и H^+ .

Отметим, что в работе Fuhrmann et al. [8] было показано увеличение индуцированного валиномицином выхода K^+ из эритроцитов при замене внутриклеточного Cl^- на NO_3^- . Авторы пришли к выводу, что NO_3^- является более проникающим через мембрану клеток анионом, чем Cl^- . Однако они не учитывали, что в этих условиях в эритроцитах может происходить интенсивный обмен K^+ на H^+ . Поэтому увеличение скорости выхода K^+ происходит, по всей вероятности, именно вследствие усиления этого обмена, а не по причине большей проницаемости мембран эритроцитов к NO_3^- .

Совсем недавно было показано, что фуросемид может повышать концентрацию K^+ внутри эритроцитов [21]. Отметим, что при применении фуросемида количество K^+ в плазме крови обычно уменьшается. Однако механизм увеличения K^+ в клетках все еще недостаточно ясен. Исходя из наших данных мы можем предположить, что механизм K^+ -сберегающего эффекта фуросемида заключается в его действии на анион-транспортные системы. Ингибируя пути выхода анионов, фуросемид тем самым подавляет и выход K^+ из эритроцитов, поскольку K^+ может выходить совместно с анионами, и калиевая проницаемость мембраны в большей степени лимитируется анионной проницаемостью.

Подобное заключение о механизме действия фуросемида нам кажется важным, поскольку, как показано в данной работе, при нефропатиях II и III степени количество K^+ внутри эритроцитов уменьшается.

Поступила 15.10.96

ՆԵՅՐՈՊԱԹԻԱՅԻ ԱԶԳԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ՊՐՈՑԵՍՆԵՐԻ ՎՐԱ ԷՐԻԹՐՈՑԻՏՆԵՐՈՒՄ

Ա.Վ. Գյուլխանյան, Ս.Ս. Գամբարով, Ռ.Ա. Արրահամյան,
Ն.Ա. Արրահամյան, Ա.Պ. Պողոսյան, Գ.Մ. Գեղիչակյան,
Մ.Ն. Սերեդա, Թ.Ա. Գյուլբայազյան

Ցույց է տրված, որ 2-րդ եւ 3-րդ աստիճանի մեֆրոպաթիայով տառապող հղի կանանց մոտ էրիթրոցիտներում նվազում է K^+ -ի քանակը եւ միեւնոյն ժամանակ բարձրանում է լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման մակարդակը: Հայտնաբերված է, որ էրիթրոցիտներում, որտեղ հիմնական մեթրոքային անիոնը Cl^- է, երիկամային հիվանդությունների ժամանակ օգտագործվող դիուրետիկ ֆուրոսեմիդն արգելակում է իոնոֆոր A23187-ով առաջացված Ca^{2+} -ից կախված K^+ -ի ելքը եւ H^+ -ի մուտքը, ինչպես նաեւ վալինոմիցինով ինդուկցված K^+/H^+ փոխանակումը:

Իսկ երբ հիմնական ներթոցային անիոն է ծառայում NO_3^- -ը, ֆուրոսեմիդը թույլ է ազդում K^+ -ի թափանցելիության վրա: Ենթադրվում է, որ ֆուրոսեմիդի էֆեկտի մեխանիզմը պայմանավորված է թաղանթների անիոնաընթացային ուղիների վրա նրա ազդեցությամբ:

THE INFLUENCE OF NEPHROPATHY ON MEMBRANE PROCESSES IN ERYTHROCYTES

A.V.Gyulkhandanyan, S.S.Gambarov, R.A.Abramyan,
N.A.Abramyan, A.P.Pogossyan, G.M.Geokchakyan,
M.N.Sereda, T.A.Gyulbayazyan

It is shown that in pregnant women with nephropathy of 2 and 3 degrees the amount of K^+ in erythrocytes is decreased, and the level of lipid peroxidation is increased. It is revealed that in erythrocytes in which the basic intracellular anion is Cl , diuretic furosemid, which is used at kidney pathologies, inhibits Ca_2^+ -dependent K^+ efflux induced by ionophore A23187, as well as K^+/H^+ exchange induced by valinomycin. Under conditions when the basic intracellular anion is NO_3^- furosemid slightly influences potassium permeability. It was suggested that mechanism of furosemid influence is due to its action on anion-transporting pathway of membranes.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абрамова Ж.И., Оксенгендлер Г.И.* Человек и противокислительные вещества. М., 1985.
2. *Гюльханданян А.В.* Биол. ж. Армении. 1987, т. 40, с. 205.
3. *Куликова А.И., Романчук Л.А., Тугушева Ф.А., Чупрасов В.Б.* Вопр. мед. химии, 1979, 3, с. 268.
4. *Мецлер Д.* Биохимия, М., 1980.
5. *Фридович И.В.* В кн.: Свободные радикалы в биологии (ред. Прайор У.) М., 1979, I, с. 272.
6. *Carrel R., Winterbourn C., Rachmilewitz E.* Brit. G. Haematol., 1975, 30, p. 259.
7. *Dunham P.B., Stewart G.W., Ellory J.C.* Proc. Nat. Acad. Sci., USA. Biol. Sci., 1980, 77, p. 1711.
8. *Fuhrmann G.F., Hutterman J., Knauf P.A.* Biochim. Biophys. Acta, 1984, 769, p. 130.
9. *Funder J.* Acta Physiol. Scand., 1980, 108, p. 31.
10. *Giardini O., Taccone-Galucci M., Lubrano R. et al.* Nephron, 1984, 30, p. 235-237.
11. *Harris E.J., Pressman B.C.* Nature, 1967, 216, p. 918-920.
12. *Heilmann L., von Tempelhoff G.F., Ulrich S.* Arch. Gynecol. Obstet., 1993, 253 (4), p. 167.
13. *Henderson P.G.F., McGivan J.D., Chappel J.B.* Biochem. J., 1969, 111, p. 521.
14. *Lake W., Rasmussen H., Goodman D.B.P.* J. Membrane Biol., 1977, 32, p. 93.
15. *Maridonneau I., Braquet P., Garay R.P.* J. Biol. Chem., 1983, 258, p. 3107.
16. *Maridonneau I., Garay R.P., Braguet P.* Biomed. Biochim. Acta, 1983, 11/12, p. 58.
17. *Schwartz W., Passow H.* Ann. Rev. Physiol., 1983, 45, p. 359.
18. *Stocks J., Dormandy T.L.* Brit. J. Haematol., 1971, 20, p. 95.
19. *Taccone-Galucci M., Giardini O., Lubrano R. et al.* Amer. J. Nephrol., 1986, p. 92.
20. *Szazs I., Sarkadi B., Gardos G.* J. Membrane Biol., 1977, 35, p. 75.
21. *Weiss D.I., Evanson O.A., Geor R.I.* Vet. Res. Commun., 1994, 18(5), p. 373.