

БИОФИЗИКА

УДК 577.37

А. С. Оганесян, член-корреспондент ПАН Армении С. С. Оганесян

Изменение кинетических параметров гемолиза эритроцитов
в присутствии кальций антагонистов

(Представлено 7/IX 1993)

Присутствие медленных кальциевых каналов в мембране эритроцитов (¹), кардиомиоцитов и мышц, вариабельность чувствительности этих каналов к верапамилу могут быть отражены в степени изменчивости кинетических параметров разного типа гемолиза эритроцитов.

Целью настоящей работы было выявление механизмов взаимодействия верапамила с эритроцитами с помощью анализа кинетики осмотического, сапонинового и кислотного гемолиза.

Автоматическую регистрацию хода гемолиза проводили модифицированным методом на лазерном агрегометре. Анализ кривых гемолиза проводили по методу А. Г. Агамаяна, С. С. Оганесяна (²). Разработанный метод требовал всего 20 мкл крови, 20 мкл исследуемого вещества и 500 мкл гемолитической среды на каждую пробу. Гемолиз проводили при $t=37^{\circ}\text{C}$ с быстрым перемешиванием, что позволяло сократить время диффузии исследуемого вещества к мембранам эритроцитов. Очищенные эритроциты получали по общепризнанному методу (³). Обработку результатов проводили статистическим пакетом SWP4 на компьютере. Использованы: верапамил (изоптин) гидрохлорида фирмы «ЛЕК» и сапонин фирмы «Merk».

Верапамил в микромолярных концентрациях не вызывал лизиса клеток, после инкубации в течение часа с эритроцитами в изотонической среде. Однако его влияние обнаруживалось на кинетике процесса гемолиза при пороговых значениях гемолизирующих факторов. В табл. 1 приведены значения константы скорости гипоосмотического и сапонинового гемолиза на прямолинейном участке гемолиза, а в табл. 2—длительность начальной фазы сапонинового гемолиза, при разных концентрациях верапамила.

Бифазный профиль взаимодействия верапамила с эритроцитами для гипоосмотического гемолиза, относительно контрольного значения, указывает на схожесть характера взаимодействия с анестетиками, которые в анестезирующих дозах оказывают антигемолитическое действие (⁴). С другой стороны, высокие концентрации верапамила могут действовать на биомембрану как катионы, аналогично ионам кальция. Проникая через липидный слой в цитоплазму клетки, верапамил может замещать ионы кальция на кальцийсвязывающих участках (⁵).

Таблица 1

Влияние верапамила на константу скорости гемолиза эритроцитов человека
(среднее из 4-х измерений)

Верапамил в среде	Осмотический гемолиз (0,35% NaCl Трис/HCl буфер, pH 7,4)				Сапожиновский гемолиз (0,025 мг сап + 0,9% NaCl Трис/HCl буфер, pH 7,4)			
	Испытуемые				Испытуемые			
	1-ый	2-ой	3-ий	4-ый	1-ый	2-ой	3-ий	4-ый
$5 \cdot 10^{-3}$ М	$0,2 \pm 0,05$	$0,1 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,00$	$0,1 \pm 0,00$	$3,9 \pm 0,17$	$2,1 \pm 0,11$	$1,9 \pm 0,03$	$1,6 \pm 0,08$
$5 \cdot 10^{-4}$ М	$1,7 \pm 0,09$	$0,2 \pm 0,00$	$0,2 \pm 0,00$	$0,6 \pm 0,00$	$1,9 \pm 0,10$	$1,0 \pm 0,05$	$0,8 \pm 0,05$	$0,7 \pm 0,05$
$5 \cdot 10^{-5}$ М	$2,0 \pm 0,05$	$0,4 \pm 0,01$	$2,7 \pm 0,03$	$1,0 \pm 0,14$	$2,1 \pm 0,26$	$0,8 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,03$
$5 \cdot 10^{-6}$ М	$2,0 \pm 0,14$	$0,4 \pm 0,01$	$3,0 \pm 0,03$	$0,9 \pm 0,03$	$1,5 \pm 0,08$	$0,7 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,05$	$0,4 \pm 0,10$
$5 \cdot 10^{-7}$ М	$2,3 \pm 0,21$	$0,3 \pm 0,05$	$2,8 \pm 0,15$	$0,8 \pm 0,03$	$1,6 \pm 0,30$	$0,8 \pm 0,03$	$0,7 \pm 0,06$	$0,3 \pm 0,03$
$5 \cdot 10^{-8}$ М	$1,7 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,26$	$2,9 \pm 0,06$	$0,9 \pm 0,07$	$1,8 \pm 0,00$	$0,8 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,06$	$0,3 \pm 0,00$
Без вера- памила	$0,9 \pm 0,03$	$0,2 \pm 0,03$	$1,6 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,02$	$2,8 \pm 0,43$	$0,8 \pm 0,05$	$0,8 \pm 0,06$	$0,6 \pm 0,06$

Концентрация 2,2 мкмоль/л эквивалентна количеству верапамила, рекомендуемого для терапевтического использования в клинике (1).

Таблица 2.

Влияние верапамила на длительность начальной фазы (в сек) сапонинового гемолиза эритроцитов человека (средние данные из 4-х измерений у отдельных лиц)

Верапамил в среде	Испытуемые			
	1-ый	2-ой	3-ий	4-ый
$5 \cdot 10^{-3}$ М	$37 \pm 1,15$	$61 \pm 2,94$	$55 \pm 2,32$	$62 \pm 1,68$
$5 \cdot 10^{-4}$ М	$68 \pm 6,00$	$100 \pm 3,11$	$109 \pm 6,91$	$113 \pm 4,80$
$5 \cdot 10^{-5}$ М	$62 \pm 9,16$	$153 \pm 14,57$	$128 \pm 6,49$	$115 \pm 3,80$
$5 \cdot 10^{-6}$ М	$61 \pm 0,88$	$118 \pm 1,89$	$121 \pm 6,61$	$128 \pm 8,10$
$5 \cdot 10^{-7}$ М	$66 \pm 9,50$	$105 \pm 5,50$	$120 \pm 7,88$	$120 \pm 5,21$
$5 \cdot 10^{-8}$ М	$63 \pm 3,00$	$115 \pm 2,38$	$130 \pm 6,83$	$134 \pm 4,04$
Без вера- памила	$47 \pm 3,67$	$110 \pm 5,31$	$112 \pm 10,32$	$110 \pm 5,79$

тем самым увеличивая концентрацию свободного кальция в цитозоле. Повышение внутриклеточного кальция вызывает потерю ионов калия, гидролиз АТФ, трансформацию в эхиноциты, делая эритроциты более осмотически резистентными и менее деформируемыми (⁶). Верапамил специфически угнетает связывание кальция с низкоаффинными участками в концентрации $1,4$ мкмоль, снижая кальцийсвязывающую емкость клетки и уменьшая таким образом количество потока кальция внутрь через медленные каналы (⁷).

Известно, что гипоосмотический гемолиз эритроцитов имеет три фазы: увеличение объема при сохранении постоянной величины площади поверхности, увеличение поверхности за счет растяжения мембраны и переход в пульсирующую фазу, заканчивающиеся появлением пор и лизисом клетки (⁸). Установление действия верапамила на каждую из этих фаз способствует выяснению механизма его взаимодействия с компонентами мембраны. Так при сфероцитозе, вызванном термическим взаимодействием ($+47^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$) или действием хлорпромазина (400 мкмоль/л) имеет место частичное блокирование медленных кальциевых каналов терапевтическими дозами верапамила ($5 \cdot 10^{-6}\text{M}$) (¹).

Молекулы сапонины способны формировать комплексы с мембранным холестерином и, удаляя их, вызывать гемолиз эритроцитов (⁹). Верапамил в высоких концентрациях вызывает перераспределение отдельных липидов, тем самым увеличивая доступ молекул детергента к холестериновым участкам, приводя в конечном итоге к укорочению начальной фазы и увеличению константы скорости сапонинового гемолиза на прямолинейном участке гемолиза.

Достаточно заметных изменений константы скорости и длительности начальной фазы кислотного гемолиза, вызванного верапамилем, не выявлено.

Аналогичное действие верапамила обнаружено при гемолизе отмытых эритроцитов для каждого исследуемого типа гемолиза.

Полученные результаты указывают на возможность четкого обнаружения эффекта биологически активных соединений на фоне малейших изменений состояния биомембран в условиях оценки кинетики их разрушения.

Ա. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Հայաստանի ԳԱՆ քղթակից անդամ Ա. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

Էրիթրոցիտների հեմոլիզի կինետիկական չափանիշների փոփոխությունը
 Ca^{2+} -անտագոնիստների ազդեցության ներքո

Մշակվել է հատուկ եղանակ արյան կարմիր բջիջների կենսաթաղանթի քայքայման կինետիկական չափանիշների արձանագրության օգնությամբ թաղանթների վրա ազդող դեղանյութերի ուսումնասիրման համար: Ցույց է տրվել, որ կենսաթաղանթները քայքայող գործոնների շեմքային քանակների ներկայությունը միջավայրում զգալի չափով բարձրացնում է զգայնությունը թաղանթային Ca^{2+} -ի անցուղիների արգելակիչների հանդեպ և հնարավորություն է տալիս ստանալու ավելի ծավալուն ինֆորմացիա:

ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ R. Johnsson, N. E. Saris, Clinica Chemica Acta, v. 174, p. 141—148 (1988). ² А. Г. Агамаян, С. С. Оганесян. Космическая биология и авиакосмическая медицина, т. 6, с. 60—62). ³ Биополимеры, ред. Ю. Изаняси, Мир, М., (1988). ⁴ Е. А. Черницкий, А. В. Воробей. Структура и функции эритроцитарных мембран, Минск, Наука и техника, (1981). ⁵ М. А. Кайфаджян, Биол. журн. Армении, т. 40, № 7, с. 554—559 (1987). ⁶ J. W. Eaton, R. F. Bronda, Amer. J. Hemotol., v. 9, p. 391—399 (1980). ⁷ А. Флекенштейн, Г. Флекенштейн-Грюн, В кн.: Физиология и патофизиология сердца, ред. Н. Сперелакис, т. 1, с. 476—503. М., Медицина, (1990). ⁸ Ю. М. Петренко, Ю. А. Владимиров, Биофизика, т. 32, 3, с. 448—453 (1987). ⁹ E. Peuchant, Ch. Salles, Clinica Chemica Acta, v. 178, p. 271—282 (1988).