

Постгипертонический лизис модифицированных эритроцитов в цитратной среде

О.А. ОЛЕЙНИК, В.В. РАМАЗАНОВ, В.А. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Posthypertonic Lysis of Modified Erythrocytes in Citrate Medium

OLEJNIK O.A., RAMAZANOV V.V., BONDARENKO V.A.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследовали постгипертонический лизис эритроцитов (ПГЛ) в условиях отсутствия входящего потока анионов хлорида (в присутствии цитрата натрия), а также влияние модификаторов цитоскелета на постгипертоническую чувствительность эритроцитов. Было показано, что чувствительность эритроцитов к ПГЛ зависит от взаимодействия белка полосы 3 с цитоскелетом, а устойчивость – от взаимодействия белка полосы 4.1 с мембраной.

Ключевые слова: эритроциты, постгипертонический лизис, цитоскелет.

Досліджували постгіпертонічний лізис (ПГЛ) еритроцитів в умовах відсутності потоку аніонів хлориду, що спрямований до клітини (у присутності цитрату натрію), а також вплив модифікаторів цитоскелета на постгіпертонічну чутливість еритроцитів. Було показано, що чутливість еритроцитів до ПГЛ залежить від взаємодії білка смуги 3 із цитоскелетом, а стійкість – від взаємодії білка смуги 4.1 із мембраною.

Ключові слова: еритроцити, постгіпертонічний лізис, цитоскелет.

Posthypertonic lysis (PHL) of erythrocytes under conditions of the absence of chloride anion entering flux at sodium citrate presence), as well as the effect of cytoskeletal modifiers on the erythrocyte posthypertonic sensitivity were investigated. It was demonstrated, that the erythrocyte sensitivity to PHL depended on the band 3 protein interaction with cytoskeleton, and the resistance did on the band 4.1 protein interaction with the membrane.

Key-words: erythrocytes, posthypertonic lysis, cytoskeleton.

Одной из причин повреждения эритроцитов при замораживании является нарушение структуры цитоскелет-мембранного комплекса вследствие нарастания осмотического градиента на мембране [1]. Изменение осмотического состояния клетки при смене осмотических условий среды контролируется, прежде всего, потоками воды и соответствующим перераспределением ионов хлора. Эти процессы имеют общую структурную основу, представленную белком полосы 3, который обеспечивает контроль движения воды и хлора через мембрану эритроцитов. Установлено, что развитие чувствительности эритроцитов к холодному и гипертоническому шоку определяется основными специфическими контактами белков цитоскелета с мембраной [3, 5]. Однако неясно, принимает ли участие цитоскелет эритроцитов в регуляции чувствительности клеток к такому повреждающему фактору, как ПГЛ – явление гемолиза, индуцированное инкубацией эритроцитов в дегидратирующей, а затем в регидратирующей средах. В момент изменения осмолярности внеклеточной среды инкубации происходит резкое увеличение потока воды в клетку, что вызывает объёмные сдвиги, которые могут индуцировать нарушение целостности цитоплазматической

Адрес для корреспонденции: Олейник О.А. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720135, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

One of the causes of erythrocyte damage during freezing is the structure disorder in cytoskeleton-membrane complex due to an increase in osmotic gradient on the membrane [1]. The change in cell osmotic state under the change in the medium osmotic conditions is, first of all, controlled by the water flow and corresponding redistribution of chloride ions. These processes have the common structural base, representing by the band 3 protein, which provides the control of water and chlorine movement through the erythrocyte membrane. It was established, that the development of erythrocyte sensitivity to cold and hypertonic stress was determined by the main specific contacts of cytoskeletal proteins with membrane [3, 5]. But it is not clear whether erythrocyte cytoskeleton takes part in regulating cell sensitivity to such a damaging effect as PHL, phenomenon of hemolysis, induced by erythrocyte incubation in dehydrating and then in rehydrating media. In the moment of the osmolarity change in the extracellular medium of incubation a sharp increase in water flow into a cell occurs, resulting in the volumetric shifts, which can induce the impairment of cytoplasmic membrane integrity. That is why to investigate the effect of non-penetrating citrate anion, as well as some other modifiers on cell sensitivity to PHL, is of our interest.

Address for correspondence: Olejnik O.A., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720135 fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

мембраны. В этой связи представляет интерес выявить влияние непроникающего аниона цитрата, а также различных модификаторов на чувствительность клеток к ПГЛ.

Материалы и методы

В экспериментах использовали эритроциты донорской крови II группы. ПГЛ эритроцитов осуществляли перенесением аликвот клеточной суспензии из 3 М NaCl (экспозиция 10 с) и из 1,5 М NaCl (экспозиция 45 мин) в изотоническую регидратирующую среду, содержащую цитрат натрия (106 ммоль/л, pH 7,4). Для обработки цитоскелета модификаторами эритроциты с 20%-м гематокритом суспендировали в среде, содержащей (ммоль/л): KCl – 90, NaCl – 45, сахарозы – 4, трис – 10 (pH 7,4, 37°C) [13]. В работе использовали следующие модификаторы цитоскелета: йодацетамид (ИАА) [6] в концентрации 15 ммоль (1ч), парахлормеркурийбензоат (ПХМБ) в концентрации 1 ммоль/л (1ч), N-этилмалеимид (N-ЭМ) в концентрации 12 ммоль/л, (1ч) [20], гемин в концентрации 300 мкМ (10 мин) [16]. При комбинированной обработке ИАА/ПХМБ модификация ИАА производилась 15 мин с последующим добавлением ПХМБ до конечной концентрации 1 ммоль на 1 ч [7,20]. В экспериментах использовали ингибиторы анионного транспорта ДИДС в концентрации 5 мкМ [4] и дипиридамола в концентрации 20 мкМ [2]. Уровень гемолиза и осмотическое поведение эритроцитов регистрировали методом светорассеяния, т. е. уровень гемолиза определяли путём изменения оптической плотности (ОП) суспензии эритроцитов при длине волны 720 нм. Концентрация клеток в кювете соответствовала 0,3 ед. ОП. Уменьшение интенсивности света, прошедшего через кювету с образцом, обусловлено рассеянием суспензией на малые углы, определяющемся количеством гемоглобин-содержащих клеток, сохраняющих заметную разность показателей преломления среды внутри и снаружи эритроцита (Δn). Выброс гемоглобина из одиночной клетки обычно завершается за 5-10 с и в масштабах минутного эксперимента Δn для одиночной клетки изменяется скачком. Об изменении формы эритроцитов судили по размаху флуктуаций ОП (ширине “шумовой” дорожки). Чем больше клеток принимают форму, близкую к сферической, тем меньше ширина “шумовой” дорожки.

Результаты и обсуждение

На рис.1 представлены данные об изменении ОП контрольных и модифицированных эритроцитов в ответ на внесение в среду инкубации (0,15 моль/л NaCl) ингибиторов анионного транспорта ДИДС и

Materials and methods

Erythrocytes of the II group donor blood were used in the experiments. The erythrocyte PHL was performed by transferring the cell suspension aliquots out of 3M NaCl (10 sec exposure) and out of 1.5 M of NaCl (45 min exposure) into the isotonic rehydrating medium, containing sodium citrate (106 mmol/l, pH 7.4). For the treatment with cytoskeletal modifier the erythrocytes with 20% hematocrit were suspended in the medium, containing (mmol/l) 90 KCl, 45 NaCl, 44 for sucrose, 10 for tris (pH 7.4, 37°C) [13]. The following cytoskeletal modifiers were used in the work: iodacetamide (IAA) [6] in 15 mM concentration (1 hr), p-chloromercuribenzoate (PCMB) in 1 mmol/l concentration (1hr), N-ethylmaleimide (N-EM) in 12 mmol/l concentration (1 hr) [20], hemin in 300 μ M concentration (10 min) [16]. At a combined treatment with IAA/PCMB the IAA modification was performed during 15 min with the following adding PCMB up to the final concentration of 1mM/l for 1 hr [7, 20]. The inhibitors of anion transport DIDS in 5 μ M concentration [4] and dipyrindamol in 20 μ M concentration [2] were used at the experiments. The level of hemolysis and osmotic behaviour of erythrocytes were recorded using the method of light scattering, i.e. the level of hemolysis was determined using the change in optical density (OD) of erythrocyte suspension at the wave length of 720 nm. Cell concentration in a dish corresponded to 0.3 units of OD. A decrease in the intensity of light, passed through the dish with the sample, was stipulated by the suspension scattering into small angles, being determined with the number of hemoglobin-containing cells, preserving a visible difference of indices of the medium refraction inside and outside of erythrocyte (Δn). Usually hemoglobin release from a single cell finishes for 5-10 sec and Δn for single cell changes by a jump within the scale of one-minute experiment. The change of erythrocyte shape was judged on the range of OD fluctuations (width of “noise” track). The more cells gain the shape, being close to a spherical one, the less is the width of “noise” track.

Results and discussion

The Fig.1 demonstrates the data about OD change in the control and modified erythrocytes as a response to the introduction into the incubation medium (0.15 mol/l NaCl) of anion transport inhibitors DIDS and dipyrindamol. It is seen, that the control erythrocytes preserve the capability to respond to DIDS and dipyrindamol effect. Certain OD increase is observed when introducing DIDS into the flask with suspension, at the same time the “noise” track width reduces (Fig.1,a, curve 1). When introducing dipyrindamol a certain OD increase in cell suspension is noted as well, and the range of its fluctuations is more manifested,

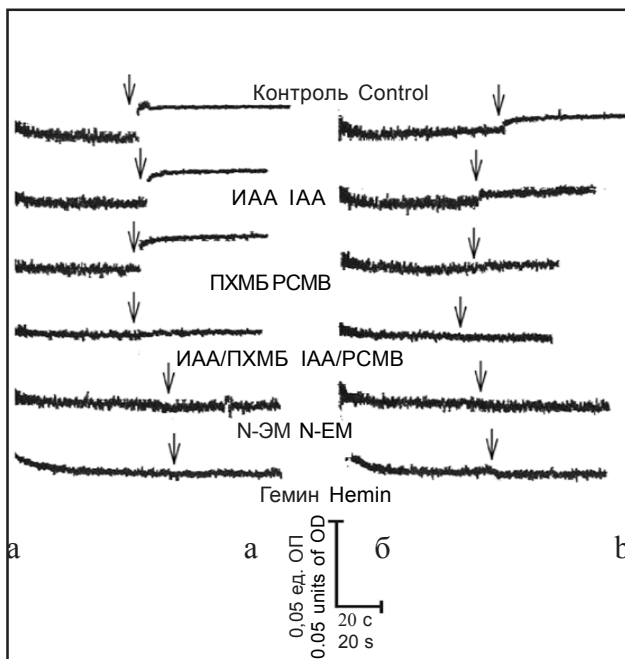


Рис. 1. Изменение ОП суспензии эритроцитов в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl, при внесении ингибиторов анионного транспорта ДИДС (а) и дипиридамола (б).

Fig. 1. OD change in erythrocyte suspension in the medium with 0.15 M/l NaCl when introducing anion transport inhibitors DIDS (a) and dipyridamol (b).

дипиридамола. Видно, что контрольные эритроциты сохраняют способность отвечать на действие ДИДС и дипиридамола. При внесении ДИДС в кювету с суспензией отмечается некоторое повышение ОП, при этом ширина “шумовой” дорожки уменьшается (рис. 1, а, кривая 1). При внесении ДИДС также наблюдается увеличение ОП суспензии клеток, а размах ее флуктуаций более выражен, но величина наблюдаемого эффекта меньше, чем в случае применения ДИДС (рис. 1, б, кривая 1). Эритроциты, обработанные ИАА, реагируют на внесение ДИДС как и контрольные клетки, только ширина “шумовой” дорожки несколько больше по сравнению с контрольными клетками (рис. 1, а, кривая 2). При использовании дипиридамола изменение как ОП, так и ширины “шумовой” дорожки менее выраженное по сравнению с ответной реакцией контрольных клеток (рис. 1, б, кривая 2). Эритроциты, предварительно обработанные ПХМБ, также отвечают на внесение ДИДС повышением ОП, однако при этом ширина “шумовой” дорожки увеличивается по сравнению с контролем (рис. 1, а, кривая 3). Следует отметить, что эритроциты, модифицированные ПХМБ, практически не реагируют на внесение дипиридамола (рис. 1, б, кривая 3). Клетки, модифицированные последовательно ИАА и ПХМБ, не реагируют на внесение ДИДС (рис. 1, а, кривая 4) и дипиридамола (рис. 1, б, кривая 4) изменением как ОП, так и

but the effect value is less, than at DIDS usage (Fig. 1, b, curve 1). IAA-treated erythrocytes respond to the DIDS introduction in the same way as the control cells, only the “noise” track width is slightly bigger in comparison with the control cells (Fig. 1, a, curve 2). When using dipyridamol the change in both OD and “noise” track width is less manifested in comparison with the control cell response (Fig. 1, b, curve 2). PCMB-pretreated erythrocytes also respond to DIDS introduction by the OD increase, but at the same time the “noise” track width augments comparing to the control (Fig. 1, a, curve 3). It should be noted, that the PCMB-modified erythrocytes do not practically respond to dipyridamol introduction (Fig. 1, b, curve 3). The cells, successively modified with IAA and PHMB do not respond to DIDS (Fig. 1, a, curve 4) and dipyridamol (Fig. 1, b, curve 4) introduction by the change in both OD and “noise” track width. The similar response of erythrocytes to both DIDS and dipyridamol is observed in the erythrocytes, modified with N-EM (Fig. 1, a and 1, b, curves 5) and hemin (Fig. 1, a and 1, b, curves 6).

The Fig. 2 shows, that the OD level of rehydrated erythrocytes after exposure in the solution, containing 1.5 mol/l of NaCl under conditions when cells were pretreated with cytoskeletal modifiers, differed from the OD level of the control erythrocytes. Post-hypertonic hemolysis of the control cells, transferred after hypertonic incubation into isotonic rehydrating medium, containing sodium citrate is practically absent, no visible changes of OD level of cells are observed under these conditions (Fig. 2, curve 1). In this case the width of “noise” track is the same that as for the control erythrocytes, incubated in the solution, containing 0.15 mol/l of NaCl. There is observed some decrease in OD of erythrocyte suspension, preliminarily treated with IAA, at the rehydration after hypertonic effect (Fig. 2, curve 2). The behaviour of PCMB-modified cells (Fig. 2, curve 3) is similar, i.e. there is a decrease in the suspension OD during rehydration. Considerable differences in cell reaction on rehydration are noted in the erythrocytes, successively modified with IAA and PCMB (Fig. 2, curve 4). In all three cases mentioned above the width of “noise” track is similar to the same in the control erythrocytes in the solution, containing 0.15 mol/l NaCl. In contrast to the IAA or PCMB-treated erythrocytes there are observed a complete absence of OD change in erythrocytes in a citrate rehydrating medium and a decrease in the “noise” track width. At the rehydration of N-EM-modified erythrocytes (Fig. 2, curve 5), there is noted a decrease in the suspension OD, similar to that in the erythrocytes, treated separately with IAA and PCMB. In this case the “noise” track width is at the control level. The most manifested (almost down to zero) decrease OD of rehydrated erythrocytes in a

ширины “шумовой” дорожки. Подобная реакция эритроцитов как на ДИДС, так и на дипиридазол наблюдается у эритроцитов, модифицированных N-ЭМ (рис. 1, а, б, кривые 5) и геминном (рис. 1, а, б, кривые 6).

Как видно на рис. 2, уровень ОП регидратированных эритроцитов после экспозиции в растворе, содержащем 1,5 моль/л NaCl, в условиях, когда клетки были предварительно обработаны модификаторами цитоскелета, отличается от уровня ОП контрольных эритроцитов. Постгипертонический гемолиз контрольных клеток, перенесенных после гипертонической инкубации в изотоническую регидратирующую среду, содержащую цитрат натрия, практически отсутствует, в данных условиях не наблюдается заметного изменения уровня ОП клеток (рис. 2, кривая 1). При этом ширина “шумовой” дорожки такая же, как и у контрольных эритроцитов, инкубируемых в растворе, содержащем 0,15 моль/л NaCl. Наблюдается некоторое снижение ОП суспензии эритроцитов, предварительно обработанных ИАА, при регидратации после гипертонического воздействия (рис. 2, кривая 2). Клетки, модифицированные ПХМБ (рис. 2, кривая 3), ведут себя подобным образом, т.е. снижается ОП суспензии при регидратации. Значительные отличия в реакции клеток на регидратацию наблюдаются в случае эритроцитов, последовательно модифицированных ИАА и ПХМБ (рис.2, кривая 4). Во всех трёх указанных выше случаях ширина “шумовой” дорожки аналогична таковой у контрольных эритроцитов в растворе, содержащем 0,15 моль/л NaCl. В отличие от эритроцитов, обработанных ИАА или ПХМБ, наблюдаются полное отсутствие изменения ОП эритроцитов в цитратной регидратирующей среде и уменьшение ширины “шумовой” дорожки. При регидратации эритроцитов, модифицированных N-ЭМ (рис. 2, кривая 5), имеется тенденция к снижению ОП суспензии, аналогично таковой у эритроцитов, обработанных отдельно ИАА и ПХМБ. Ширина “шумовой” дорожки при этом находится на уровне контроля. Наиболее выраженное снижение (практически до нуля) ОП регидратированных эритроцитов в цитратной регидратирующей среде наблюдается у клеток, предварительно обработанных геминном (рис. 2, кривая 6), ширина “шумовой” дорожки по сравнению с контролем сильно уменьшается.

Аналогичные изменения ОП отмечаются и у контрольных и модифицированных эритроцитов, дегидратированных в растворе, содержащем 3 моль/л NaCl (рис.3).

Все использованные выше модификаторы являются специфическими реагентами, которые способны взаимодействовать с SH-группами белка

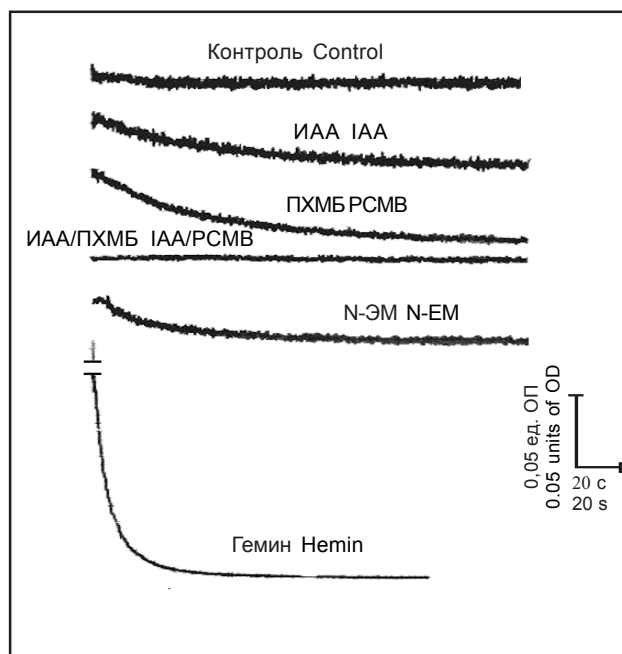


Рис. 2. Влияние модификаторов цитоскелета на изменение ОП суспензии эритроцитов, перенесённых из раствора, содержащего 1,5 моль/л NaCl, в раствор с 0,106 моль/л цитрата натрия.

Fig. 2. Effect of cytoskeletal modifiers on OD change in erythrocyte suspension, transferred from the solution with 1.5 M/l NaCl into the solution with 0.106 M/l sodium citrate.

citrate rehydrating medium is observed in hemin – pretreated cells (Fig. 2, curve 6), the “noise” track width considerably reduces in comparison with the control.

The similar OD changes are observed in the control and modified erythrocytes, dehydrated in the solution, containing 3 mol/l NaCl (Fig. 3).

The all used above modifiers are specific reagents, capable to interact with SH-groups of band 3 protein. IAA is a sulfydryl acetylating agent, which blocks the SH-group cytoplasmic pool and up to 50% of the membrane SH-groups [8], but does not interact with PCMB-specific SH-group, localised on the 17 kDa chemotriptych fragment of band 3 protein, which localises in lipid membrane bilayer [19]. As it was demonstrated in the paper [3], the results of electrophoretic analysis testify to the fact, that the protein spectrum of the IAA-treated erythrocyte membranes does not qualitatively change, there is a slight change in quantitative composition. The mechanism of N-EM action is similar to IAA, as well as it is a sulfydryl reagent, blocking 80% of the membrane SH-groups [8, 25]. Studying the electrophoresis data of membrane proteins after N-EM treatment demonstrated the absence of quantitative and qualitative changes in protein spectrum, that as with IAA testified to the absence of N-EM effect on protein spectrum of membranes [3]. At the same time the N-EM blocking of specific SH-groups on spectrin

полосы 3. ИАА - сульфгидрильный ацетилирующий агент, блокирующий цитоплазматический пул SH-групп и до 50 % мембранных SH-групп [8], но не взаимодействующий с ПХМБ-специфической SH-группой, локализованной на 17 кДа химотриптическом фрагменте белка полосы 3, который локализуется в липидном бислое мембраны [19]. Как было показано в [3], результаты электрофоретического анализа свидетельствуют, что белковый спектр мембран эритроцитов, обработанных ИАА, качественно не меняется. Количественный состав изменяется незначительно. Механизм действия N-ЭМ сходен с действием ИАА, а также является сульфгидрильным реагентом, который блокирует 80 % SH-групп мембраны [8, 25]. Исследование данных электрофореза мембранных белков после обработки N-ЭМ показало отсутствие количественных и качественных изменений спектра белков, что, как и у ИАА, также свидетельствует об отсутствии влияния N-ЭМ на белковый спектр мембран [3]. В то же время блокада N-ЭМ специфических SH-групп на спектрине тормозит реакцию достижения равновесия между димерным и тетрамерным состоянием спектрина [16, 23]. ПХМБ, являясь по своей природе гидрофобной и заряженной молекулой, при действии на мембраны эритроцитов нарушает структурные взаимодействия белков в мембране этих клеток, играя важную роль в диссоциации и солюбилизации цитоскелета [14, 18]. ПХМБ вызывает изменение связи мембрана-цитоскелет в области белок полосы 3-анкирин-спектрин [11]. Однако без предобработки ИАА, который блокирует цитоплазматический пул и 50 % мембранных белков, ПХМБ не достигает ПХМБ-специфической SH-группы, связываясь с другими мембранными SH-группами (в том числе с SH-группами белка полосы 3) [8, 11, 27]. Поэтому в данном случае полный эффект действия меркуриата на белок не прослеживается, что также подтверждают данные электрофореза [3].

В экспериментах для повышения эффективности действия ПХМБ эритроциты были предобработаны сульфгидрильным реагентом ИАА [11, 17]. Данная обработка оказывает повреждающее действие на мембрану, поскольку происходит потеря белков полос 4.1, 4.3, 4.9, 2.1 (анкирин, который связывает спектрин с белком полосы 3) [3]. В нашей работе был использован специфический модификатор гемин, который нарушает взаимодействие белков цитоскелета между собой. Гемин, свободно проникая через липидный бислой мембраны эритроцитов, связывается с белком полосы 4.1, актином, спектрином [11, 22, 24, 26]. Учитывая то, что первичным сайтом взаимодействия гемина с цитоскелетом

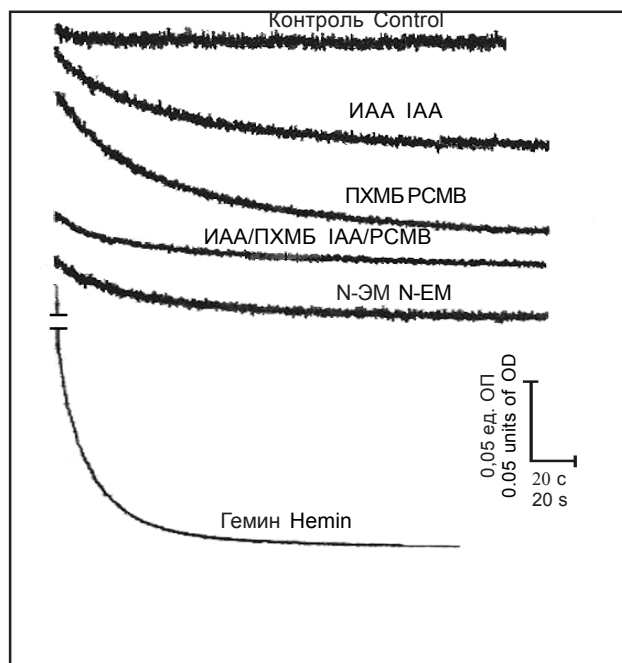


Рис. 3. Влияние модификаторов цитоскелета на изменение ОП суспензии эритроцитов, перенесённых из раствора, содержащего 3 моль/л NaCl, в раствор с 0,106 моль/л цитрата натрия.

Fig. 3. Effect of cytoskeletal modifiers on OD change in erythrocyte suspension, transferred from the solution with 3 M/l NaCl into the solution with 0.106 M/l sodium citrate.

inhibits the reaction of balance achievement between the dimer and tetramer state of spectrin [16, 23]. PCMB, being on its nature hydrophobic and charged molecule, when affecting erythrocyte membranes, impairs structural interactions of proteins in membrane of these cells, playing an important role in cytoskeletal dissociation and solubilisation [14, 18]. PCMB causes the change in the membrane-cytoskeleton bond in the area of band 3 protein-ankyrin-spectrin [11]. However without IAA treatment, which blocks cytoplasmic pool and 50% of membrane proteins, PCMB does not achieve the PCMB-specific SH-group, being connected with other membrane SH-groups (including SH-groups of band 3 protein) [8, 11, 27]. Therefore in this case a complete effect of mercuriate action on protein does not traced, that is confirmed by electrophoresis data as well [3].

In the experiments in order to increase the efficiency of PCMB action the erythrocytes were pretreated with IAA sulfhydryl reagent [11, 17]. This treatment causes a damaging effect on a membrane, since the loss of bands 4.1, 4.3, 4.9, 2.1 proteins (ankyrin, connecting spectrin with band 3 protein) occurs [3]. Specific modifier hemin, impairing the interaction of cytoskeletal proteins between themselves was used in our work. Hemin, easily penetrating through lipid bilayer of erythrocyte membranes, is bound with band 4.1 protein, actin, spectrin [11, 22, 24, 26]. Taking into account the fact, that the first site of hemin

является белок полосы 4.1, обработка клеток данным реагентом позволяет модифицировать участки, в которых цитоскелет прикрепляется к бислою [21], что подтверждается данными электрофореза: происходит потеря белков полос 2.1 (анкирина), 4.3, 4.9, 6.

Как известно, ПГЛ, гипертонический и холодный шок имеют разную природу. В отличие от ПГЛ, при холодном и гипертоническом шоке обработка эритроцитов геминном вызывает значительную потерю чувствительности клеток к стрессовому воздействию [5]. Это свидетельствует об участии цитоскелета в контроле холодной и осмотической чувствительности клеток.

ДИДС необратимо ингибирует анионный канал [12], а дипиридамола обратимо [15], при этом они обладают способностью блокировать перераспределение анионов хлорида. Применение ДИДС и дипиридамола позволяет выяснить роль перераспределения анионов хлорида в контроле осмотической чувствительности клеток. Использование разного класса ингибиторов анионного транспорта показало, что перераспределение анионов хлорида через анионный переносчик влияет на осмотическую чувствительность как контрольных, так и модифицированных эритроцитов в условиях, когда в среде присутствуют анионы хлорида. Более выраженное действие ДИДС на осмотическую чувствительность клеток к ПГЛ объясняется, по-видимому, тем, что данный ингибитор ковалентно связывается с участком белка полосы 3 вблизи от транспортного сайта данного белка [9], а дипиридамола стерически перекрывает транспортный сайт, замедляя движение анионов хлорида [10].

Действие ДИДС на осмотическое поведение эритроцитов, модифицированных N-ЭМ, геминном и комбинацией ИАА/ПХМБ, согласуется с действием этих же модификаторов на изменение ОП эритроцитов при ПГЛ, однако, если все указанные модификаторы снимают эффект ДИДС на повышение ОП, то их действие на ПГЛ неоднозначно: комбинированная обработка ИАА/ПХМБ и N-ЭМ снижает чувствительность клеток к ПГЛ по сравнению с эритроцитами, обработанными ИАА и ПХМБ отдельно, а гемин, наоборот, вызывает практически полный лизис. В случае с N-ЭМ наблюдаемые эффекты можно объяснить тем, что блокада N-ЭМ специфических SH-групп на спектрине тормозит реакцию достижения равновесия между димерами и тетрамерами спектрина [16, 23]. Такая обработка снимает эффект ДИДС, при этом изменения ОП не наблюдаются в отличие от условий, при которых клетки обрабатывались ИАА и ПХМБ отдельно, когда эффект ДИДС не

interaction with cytoskeleton is the band 4.1 protein, the cell treatment with this reagent allows modifying the sites, where cytoskeleton is attached to bilayer [21], that is confirmed by the data of electrophoresis: the loss of bands 2.1 (ankyrin), 4.3, 4.9, 6 proteins occurs [3].

As it is known, the PHL, hypertonic and cold stress have a different nature. In contrast to PHL, during cold and hypertonic stress the erythrocyte treatment by hemin causes a considerable loss of cell sensitivity to stress effect [5]. This fact testifies to the cytoskeleton participation in the control for the cold and osmotic cell sensitivity.

DIDS inhibits irreversibly the anion channel [12], but dipyrindamol does this reversibly [15], at the same time they have the capability for blocking the anion chloride redistribution. DIDS and dipyrindamol application allows to find out the role of chloride anion redistribution in the control of cell osmotic sensitivity. The usage of different class inhibitors of anion transport demonstrated, that the redistribution of chloride anions through the anion carrier affected the osmotic sensitivity of both control and modified erythrocytes under conditions, when the chloride anions are present in the medium. Most manifested DIDS effect on cell osmotic sensitivity to PHL is, apparently, explained by the fact, that this inhibitor is covalently bound with the site of band 3 protein close to this protein transport site [9], but dipyrindamol blocks sterically the transport site, by inhibiting the chloride anion movement [10].

The DIDS effect on the osmotic behaviour of the erythrocytes, modified by N-EM, hemin and IAA/PCMB combination correlates with effect of the same modifiers on the change in erythrocyte OD at PHL, however if all modifiers remove the DIDS effect on OD augmentation, their action on PHL is not simple: a combined treatment with IAA/PCMB and N-EM reduces the cell sensitivity to PHL in comparison with the erythrocytes, treated with IAA and PCMB separately, but hemin, in contrast, causes practically complete lysis. In case with N-EM the observed effects can be explained with the fact, that the N-EM blockage of specific SH-groups on spectrin inhibits the reaction of balance achievement between the spectrine dimers and tetramers [16, 23]. Such treatment removes the DIDS effect, at the same time no changes in OD were observed, in contrast to the conditions, when cells were treated with IAA and PCMB separately, when DIDS effect is not removed.

The results obtained allow to speak about the fact, that the balance of dimer-tetramer in cytoskeletal spectrin can be responsible in the certain extent for the development of cell sensitivity to osmotic effect. Hemin treatment reduces the mechanical stability of erythrocytes [24, 26], therefore a practically complete erythrocyte lysis in citrate medium during PHL occurs

снимается.

Полученные результаты позволяют говорить о том, что равновесие димер-тетрамер в спектрине цитоскелета в определённой степени может быть ответственно за развитие чувствительности клеток к осмотическому воздействию. Обработка геминном уменьшает механическую стабильность эритроцитов [24, 26], поэтому происходит практически полный лизис эритроцитов в цитратной среде в процессе ПГЛ (рис. 2, 3) и одновременно наблюдается отсутствие осмотического ответа на внесение ДИДС (см. рис. 1).

Комбинированная обработка ИАА/ПХМБ приводит к изменению конформации цитоплазматического фрагмента белка полосы 3, при этом нарушается нативное взаимодействие его с анкирином и спектрином. Во-первых, это может блокировать прохождение сигнала об осмотическом воздействии в последовательности липидный бислой – белок полосы 3 – анкирин – спектрин, что приведёт к замедлению реакции распада тетрамеров спектрина на димеры и соответственно торможению развития гемолиза. Во-вторых, образование гемолитической поры включает перераспределение белка полосы 3 в мембране эритроцитов [20], динамика которого будет заторможена вследствие изменения структуры данного белка при взаимодействии ПХМБ в его гидрофобной области. При связывании ПХМБ со специфической SH-группой белка полосы 3 латеральное перераспределение данного белка, вероятно, отсутствует.

Выводы

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что развитие чувствительности к ПГЛ в условиях, когда градиент хлорида направлен из клетки, а в среде присутствует непроникающий анион (цитрат), зависит от взаимодействия белка полосы 3 с белками цитоскелета. В то же время на устойчивость клеток к ПГЛ влияет взаимодействие белка полосы 4.1 с мембраной.

Литература

1. Белоус А.М. Роль белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток // Криобиология.– 1990.– № 3.– С. 3-12.
2. Лупилова Н.О. Вплив інгібіторів аніонного транспорту і модифікаторів цитоскелета на бар'єрні характеристики еритроцитів в умовах осмотичного стресу: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.– Харків, 1999.– 16 с.
3. Кудокоцева Е.В., Рамазанов В.В., Тимченко Л.Н. и др. Влияние модификаторов цитоскелета на структурный спектр белков цитоскелета эритроцитов человека // Пробл. криобиологии.– 1998.– № 4.– С. 22-25.

(Fig. 2, 3) and simultaneously there is observed the absence of osmotic response on DIDS introduction (see Fig. 1).

Combined IAA/PCMB treatment results in a change of conformation of cytoplasmic fragment of band 3 protein, at the same time there is the impairment of its native interaction with ankyrin and spectrin. Firstly, this can block the passage of signal about osmotic interaction in the sequence of lipid bilayer – band 3 protein – ankyrin – spectrin, that will result in the deceleration of the decay reaction of spectrin tetrameres in dimeres and the hemolysis development inhibition, correspondingly. Secondly, the formation of hemolytic pore includes the redistribution of band 3 protein in the erythrocyte membrane [20], which dynamics will be inhibited due to the change in this protein structure when interacting with PCMB in its hydrophobic area. During the PCMB binding with the specific SH-group of band 3 protein the lateral redistribution of this protein is probably absent.

Conclusions

Thus, the data obtained allow to suppose, that the development of sensitivity to PHL under conditions, when the chloride gradient is directed from a cell, and a non-penetrating anion (citrate) is present in the medium, depends on the interaction of band 3 protein with cytoskeletal proteins. At the same time the interaction of band 4.1 protein with the membrane affects the cell resistance to PHL.

References

1. Belous A.M. Role of cytoskeletal proteins in cold cell stability // Cryobiology.– 1990.– N3.– P. 3-12.
2. Lupilova N.O. Effect anion transport inhibitors and cytoskeletal modifiers on erythrocyte barrier characteristics under osmotic stress conditions: Authors' abstract of the candidate of biological sciences.– Kharkiv, 1999.– 16 p.
3. Kudokotseva E.V., Ramazanov V.V., Timchenko L.N. et al. Action of modifiers on the structural spectrum of the cytoskeletal proteins of human red cells // Problems of Cryobiology.– 1998.– N4.– P. 22-25.
4. Ramazanov V.V. Effect of osmotic stress and cytoskeletal modifiers on the development of cold stress and hypertonic shock of erythrocytes: Thesis of the candidate of biological sciences.– Kharkov, 1993.– 138 p.
5. Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. The action of ionic strength on the development of the RBC susceptibility to hypertonic stress // Problems of Cryobiology.– 1996.– N2.– P. 13-17.
6. Ramazanov V.V., Semenchenko A.Yu., Volovelskaya E.L. et al. The effect of the strength of binding of peripheral proteins with membranes on the hypertonic stress of RBC // Problems of Cryobiology.– 1996.– N3.– P. 8-11.
7. Clark S.J., Ralston G.B. The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membranes brought about by p-mercuribenzenesulfonate // Biochim. Biophys. Acta.– 1990.– 1021.– P. 141-147.
8. Deuticke B. The role of membrane sulfhydryls in passive, mediated transport processes and for the barrier function of the erythrocyte membrane // Membrane biochemistry.– 1986.–

4. *Рамазанов В.В.* Влияние осмотического стресса и модификаторов цитоскелета на развитие холодового и гипертонического шока эритроцитов: Дис. ...канд. биол. наук.– Харьков, 1993.– 138 с.
5. *Рамазанов В.В., Бондаренко В.А.* Действие гемина и ДИДС на холодовой и гипертонический шок эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 1996.– № 2.– С. 13-17.
6. *Рамазанов В.В., Семенченко А.Ю., Воловельская Е.Л.* Влияние прочности связи периферических белков с мембранами на гипертонический шок // Пробл. криобиологии.– 1996.– № 3.– С. 8-11.
7. *Clark S.J., Ralston G.B.* The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membranes brought about by p-mercu-ribenzenesulfonate// Biochim. Biophys. Acta.–1990.– 1021.– P. 141-147.
8. *Deuticke B.* The role of membrane sulfhydryls in passive, mediated transport processes and for the barrier function of the erythrocyte membrane // Membrane biochemistry.– 1986.– Vol. 6.– № 4.– P. 309-326.
9. *Falke J.J., Chan S.I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 1. Transport site inhibitors // Biochemistry.– 1986.– Vol. 25.– P. 7888-7894.
10. *Falke J.J., Chan S.I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 2. Channel blockers // Biochemistry.– 1986.– Vol. 25.– P. 7995-7998.
11. *Jarolim P., Lahav M., Liu S.C., Palek J.* Effect hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin // Blood.– 1990.– Vol. 76, N10.– P. 2125-2131.
12. *Jennings M.* Oligomeric structure and the anion transport function of human erythrocyte band 3 protein // J. Membrane Biol.– 1984.– Vol. 80.– P. 103-117.
13. *Haest C.W.M., Kamp D., Deuticke.* Topology of membrane sulfhydryl groups in the human erythrocyte. Demonstration of a non-reactive population in intrinsic proteins // Biochim. Biophys. Acta.– 1981.– Vol. 643.– P.219-326.
14. *Kunimoto M., Shibata K., Miura T.* p-Chlormercuribenzoate-induced dissociation of cytoskeletal proteins in red blood cell of rats // BBA.– 1987.– 905(2).– P. 257-267.
15. *Legrum B, Passow H.* Ingibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride-dependent association of dipyrindamole with a stibene disulfonate binding site on the band 3 protein // BBA, Biomembranes.–1989.– № 2.– P. 193-207.
16. *Liu S.C., Palek J.* Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons // Nature.–1980.– Vol. 285.– P. 586-588.
17. *Plishker G.A.* Iodoacetic acid inhibition of calcium-dependent potassium efflux in red blood cells// Am. J. Physiol.– 1985.– Vol. 248.– P. C419-C424.
18. *Ralston G.B., Crisp E.A.* The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1981.– Vol. 649.– P. 98-104.
19. *Ramjeesingh M., Gaarn A., Rothstein A.* The locations of the three cysteine residues in the primary structure of the intrinsic segments of band 3 proteins, and implications concerning the arrangement of band 3 protein in the bilayer// Biochim. Biophys. Acta.– 1983.– Vol. 729.– P. 150-160.
20. *Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y.* Participation of band 3 in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // Biol. Phar. Bull.– 1993.– 16(2).– P. 188-194.
21. *Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M.* Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin// Biochem. Internat.–1986.–13,N3.– P.467-477.
22. *Solar I., Shaklai N.* Association of hemin with protein 4.1 as compared to spectrin and actin // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– Vol. 983.– P. 199-204.
- Vol. 6.– № 4.– P. 309-326.
9. *Falke J.J., Chan S.I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 1. Transport site inhibitors // Biochemistry.– 1986.– Vol. 25.– P. 7888-7894.
10. *Falke J.J., Chan S.I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 2. Channel blockers // Biochemistry.– 1986.– Vol. 25.– P. 7995-7998.
11. *Jarolim P., Lahav M., Liu S.C., Palek J.* Effect hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin // Blood.– 1990.– Vol. 76, N10.– P. 2125-2131.
12. *Jennings M.* Oligomeric structure and the anion transport function of human erythrocyte band 3 protein // J. Membrane Biol.– 1984.– Vol. 80.– P. 103-117.
13. *Haest C.W.M., Kamp D., Deuticke.* Topology of membrane sulfhydryl groups in the human erythrocyte. Demonstration of a non-reactive population in intrinsic proteins // Biochim. Biophys. Acta.– 1981.– Vol. 643.– P.219-326.
14. *Kunimoto M., Shibata K., Miura T.* p-Chlormercuribenzoate-induced dissociation of cytoskeletal proteins in red blood cell of rats // BBA.– 1987.– 905(2).– P. 257-267.
15. *Legrum B, Passow H.* Ingibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride-dependent association of dipyrindamole with a stibene disulfonate binding site on the band 3 protein // BBA, Biomembranes.–1989.– № 2.– P. 193-207.
16. *Liu S.C., Palek J.* Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons // Nature.–1980.– Vol. 285.– P. 586-588.
17. *Plishker G.A.* Iodoacetic acid inhibition of calcium-dependent potassium efflux in red blood cells// Am. J. Physiol.– 1985.– Vol. 248.– P. C419-C424.
18. *Ralston G.B., Crisp E.A.* The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1981.– Vol. 649.– P. 98-104.
19. *Ramjeesingh M., Gaarn A., Rothstein A.* The locations of the three cysteine residues in the primary structure of the intrinsic segments of band 3 proteins, and implications concerning the arrangement of band 3 protein in the bilayer// Biochim. Biophys. Acta.– 1983.– Vol. 729.– P. 150-160.
20. *Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y.* Participation of band 3 in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // Biol. Phar. Bull.– 1993.– 16(2).– P. 188-194.
21. *Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M.* Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin// Biochem. Internat.–1986.–13,N3.– P.467-477.
22. *Solar I., Shaklai N.* Association of hemin with protein 4.1 as compared to spectrin and actin // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– Vol. 983.– P. 199-204.
23. *Streichman S., Hertz E., Tatarsky I.* Direct involvement of spectrin thiols in maintaining erythrocyte membrane thermal stability and spectrin dimer self-association // BBA.–1988.– Vol. 942.– P. 333-340.
24. *Takakuwa Y., Tchernia G., Rossi M. et al.* Restoration of normal membrane stability to unstable protein 4.1-deficient erythrocyte membranes by incorporayon of purified protein 4.1 // J. Clin. Invest.– 1986.– Vol. 78.– P. 80-85.
25. *Toon M.R., Solomon A.K.* Control of red cell urea and water permeability by sulfhydryl reagents // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.–Vol. 860.– P. 361-375.
26. *Wyse J.W., Butterfield D.A.* Interaction of hemin erythrocyte membranes alterations in the physical state of the major sialoglycoprotein // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– Vol. 979.– P. 121-126.

23. *Streichman S., Hertz E., Tatarsky I.* Direct involvement of spectrin thiols in maintaining erythrocyte membrane thermal stability and spectrin dimer self-association // *BBA.*– 1988.– Vol. 942.– P. 333-340.
24. *Takakuwa Y., Tchernia G., Rossi M. et al.* Restoration of normal membrane stability to unstable protein 4.1-deficient erythrocyte membranes by incorporation of purified protein 4.1 // *J. Clin. Invest.*– 1986.– Vol. 78.– P. 80-85.
25. *Toon M.R., Solomon A.K.* Control of red cell urea and water permeability by sulfhydryl reagents // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1986.–Vol. 860.– P. 361-375.
26. *Wyse J.W., Butterfield D.A.* Interaction of hemin erythrocyte membranes alterations in the physical state of the major sialoglycoprotein // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1989.– Vol. 979.– P. 121-126.
27. *Zhang Z.H., Solomon A.K.* Effect of PCMBs on anion transport in human red cell membranes // *BBA.*– 1992.– 1106(1).– P. 31-39.

Accepted in 22.04.2003

Поступила 22.04.2003