

гипотермического хранения нервной ткани, что приводит к их гибели после замораживания-отогрева.

Литература

1. Сукач А.Н., Петренко А.Ю., Плачинта М.С. Криоконсервирование эмбриональных нервных клеток крысы с использованием ДМСО // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 61-62.
2. Петренко А.Ю., Грищук В.П. Влияние замораживания-отогрева под защитой диметилсульфоксида на сохранность изолированных гепатоцитов крыс // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов.– Харьков, 1990.– С. 109-114.

Поступило 16.04.2002

ENCs morphometrical study has shown, that during the process of hypothermic storage average sizes of cells reduced in such a way: in 1 hour of storage – down to 80, and in 3 hours – down to 75% of initial ones. This is explained by the effect on cells of the osmotically active sucrose solution. ENCs freeze-thawing resulted in an increase in their average sizes approximately up to 115% of initial ones, that pointed to the augmentation of a number of plasmatic membrane damages in a suspension.

The studied damages indicate the accumulation in INC of non-lethal damages during the process of nerve tissue hypothermic storage, that results in their death after freeze-thawing.

References

1. Sukach A.N., Petrenko A.Yu., Plachinta M.S. Cryopreservation of rat embryonic neuronal cells using DMSO // Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P.61-62.
2. Petrenko A.Yu., Grischuk V.P. Effect of freeze-thawing under dimethyl sulfoxide protection on viability of isolated rat hepatocytes // Physical and chemical properties and biological effects of cryoprotectants.– Kharkov, 1990.– P.109-114.

Accepted in 16.04.2002

УДК 577.352.465:612.111

UDC 577.352.465:612.111

Модификация транспорта ионов H^+ и связывания дипиридамола с мембранами эритроцитов крысы при гипертоническом воздействии

А.Н. БАЛАКИРЕВ, Ф. АБУ-АЛЬ АСАЛЬ, В.В. РАМАЗАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Modification of H^+ Ion Transport and Binding of Dipyridamol with Membranes of Rat's Erythrocytes under Hypertonic Effect

BALAKIREV A.N., ABU-AL ASAL F., RAMAZANOV V.V.

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

Обмен внутриклеточного хлорида на внеклеточный сульфат в эритроцитах человека осуществляется по двум механизмам: выход хлорида и протона по каналу и обмен внутриклеточного хлорида на сульфат и протон [3]. При этом происходит закисление среды с последующим ее защелачиванием. Фаза закисления менее чувствительна к ингибиторам, изменениям температуры и гипертоническому воздействию [1]. Цель работы – выявить характер обмена хлорида на сульфат в эритроцитах крысы.

В эксперименте использовали эритроциты крови крыс, полученные декапитацией 18-месячных животных. Отмытые эритроциты с гематокритом 70 % разводили до 20 % средой, содержащей (ммоль/л): KCl – 90, NaCl – 45, сахарозы – 44, триса – 10, pH 7,4, добавляли ДИДС в конечной концентрации 50 мкмоль/л, суспензию клеток инкубировали 60 мин при 37°C. После обработки эритроциты отмывали средой инкубации. В термостатируемую ячейку с pH электродом, содержащую сульфатные среды, вносили эритроциты и изменения pH контролировали самописцем. Белые тени получали с помощью лизиса эритроцитов на ледяной бане в среде, содержащей 1 ммоль/л ЭДТА, 5 ммоль/л триса, pH 8 в течение 10 мин. Полученный гемолизат центрифугировали при 4°C на центрифуге в течение 15 мин при 15000 об/мин. Осадок отмывали 4 раза

Exchange of intracellular chloride to extracellular sulphate in human erythrocytes is accomplished by two mechanisms: release of chloride along the channel and the exchange of intracellular chloride for sulphate and proton [3]. In this case the medium pH changes by such a way, that the phase of acidification is less sensitive than the phase of alkalisation to the inhibitors, changes of temperature and hypertonic effect [1]. The aim of the work is to reveal the character of chloride exchange to sulphate in rat's erythrocytes.

In the experiment we used erythrocytes of rat's blood, obtained after decapitation of 18 months' animals. Washed-out with 70% hematocrit erythrocytes were diluted down to 20% with the medium, containing: KCl – 90 mM/l, NaCl – 45, sucrose – 44, tris - 10, pH 7.4, DIDS was added under final concentration of 50 mcM/l, cell suspension was incubated for 60 min at 37°C. After the treatment the erythrocytes were washed-out with incubation medium. The erythrocytes were placed into a thermostated well with pH electrode, containing sulphate media and the changes in pH were controlled with a recorder. White ghosts were obtained by lysis of erythrocytes on ice bath in the medium, containing 1 mM/l EDTA, 5 mM tris, pH 8 during 10 min. Obtained hemolysate was centrifuged at 4°C by the centrifuge during 15 min at 1500 rot/min. The sediment

гемолизирующей средой. Полученные белые тени хранили на льду не более 30 мин до эксперимента. Интенсивность роста поляризации флуоресценции дипиридамола измеряли при титровании его белыми тенями эритроцитов во флуориметрической кювете. Содержание белка в белых тенях эритроцитов определяли методом Лоури.

ДИДС и дипиридамола в использованных концентрациях в изотонической сульфатной среде не блокируют выхода протонов из клетки, тогда как вход блокируется на 57 и 63% соответственно (таблица). Гипертонические среды вызывают блокирование как выхода, так и входа протонов и индуцируют ингибиторное действие дипиридамола при выходе протонов из клетки. При транспорте протонов в клетку рост степени ингибирования отражает аддитивное действие блокаторов и гипертонических сред. Титрование дипиридамола тенями эритроцитов вызывает рост поляризации флуоресценции как в изотонической, так и в гипертонической сульфатной средах. Однако в гипертонической среде степень поляризации флуоресценции выше, чем в изотонической (рисунок). Титрование тенями, полученными из ДИДС обработанных эритроцитов, приводит к редукции нарастания поляризации флуоресценции дипиридамола в гипертонической сульфатной среде. Если среда инкубации, наряду с изотоническим сульфатом, содержала гипертоническую сахарозу, то это значительно подавляло рост поляризации дипиридамола при титровании его тенями контрольных эритроцитов.

Полученные результаты показывают, что выход H^+ не чувствителен к ингибиторам по сравнению с его входом. В [1] отмечалось, что обмен внутриклеточного хлорида на внеклеточный сульфат для эритроцитов человека осуществляется по двум механизмам: каналному и обменному, что, вероятно, характерно и для эритроцитов крысы. Использование гипертонических сред индуцирует ингибиторное действие дипиридамола на выход протонов из клетки (таблица), однако только гипертоническая сульфатная среда вызывает рост степени поляризации флуоресценции дипиридамола с тенями, а гипертоническая сахарозная среда редуцирует этот показатель (рисунок). Такой результат указывает на то, что рост ионной силы приводит к увеличению связывания дипиридамола с анионным каналом, однако рост осмотического градиента на мембране также является весомым фактором в изменении ингибиторной силы данного блокатора.

Полученные результаты после обработки эритроцитов ДИДС указывают, что остаточная поляризация флуоресценции дипиридамола в изотонической сульфатной среде обусловлена связыванием его не с анионным каналом, а с поверхностью мембраны. Незначительное влияние гипертонической сульфатной

Степень блокирования (%) транспорта ионов H^+ в эритроцитах, находящихся в различных средах

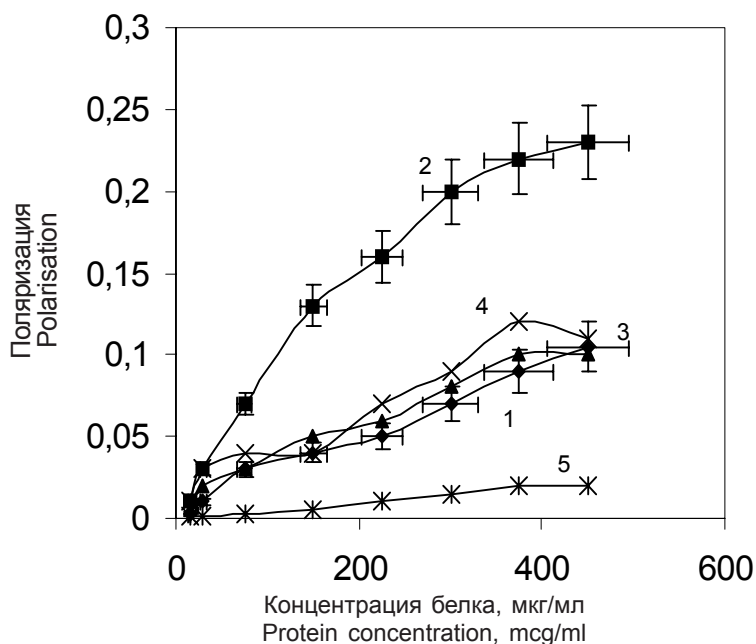
Blockage rate (%) of H^+ ion transport in erythrocytes being in various media

Транспорт ионов H^+ H^+ ions transport	Ингибиторы Inhibitors	0,12 M Na_2SO_4	1 M Na_2SO_4	0,12 M Na_2SO_4 + 0,86 M сахарозы/ sucrose
Из клетки Out of a cell	Контроль Control	-	39±6	33±5
	Дипиридамола (300 мкмоль/л) Dipyridamol (300 mcmol/l)	0	76±9	62±7
	ДИДС (0,5 мкмоль/л) DIDS (0.5 mcmol/l)	0	52±8	31±4
В клетку Into a cell	Контроль Control	-	44±6	51±6
	Дипиридамола (300 мкмоль/л) Dipyridamol (300 mcmol/l)	63±7	88±6	86±7
	ДИДС (0,5 мкмоль/л) DIDS (0.5 mcmol/l)	57±8	82±6	82±8

was washed-out 4 times with hemolysing medium. Resulted white ghosts were stored on ice not more than 30 min before the experiment. The intensity of the growth of dipyridamol fluorescence polarisation was measured during its titration by white ghosts of erythrocytes in fluorimetric cuvette. Protein content in white ghosts of erythrocytes was determined with Loury method.

DIDS and dipyridamol of the used concentrations in isotonic sulphate medium do not block the release of protons out of a cell, meanwhile the entering is blocked by 57 and 63%, correspondingly (Table). Hypertonic media cause the blocking of both release and entering of protons and induced inhibitory effect of dipyridamol at the proton release out of a cell. During the transport of protons into a cell the growth of inhibition degree reflects an additive effect of blockers and hypertonic media. Titration of dipyridamol with the ghosts of erythrocytes causes the growth of fluorescence polarisation both in isotonic and hypertonic sulphate media. However in hypertonic medium the degree of fluorescence polarisation is higher than in isotonic one (Figure). Titration by the ghosts, obtained from DIDS-treated erythrocytes, results in the reduction of accumulation of dipyridamol fluorescence polarisation in hypertonic sulphate medium. If incubation medium along with isotonic sulphate contained hypertonic sucrose, then this considerably suppressed the growth of dipyridamol polarisation during its titration by the ghosts of the control erythrocytes.

The obtained results demonstrate that the H^+ releasing phase is not sensitive to the inhibitors in comparison with the one of H^+ entering. The paper [1] showed that the exchange of intracellular chloride to extracellular sulphate for human erythrocytes is accomplished by two mechanisms: channel and exchange, that is characteristic for rat's erythrocytes. Usage of hypertonic media induces an inhibitory effect



Рост поляризации флуоресценции дипиридамола в различных средах (моль/л) при титровании белыми телями эритроцитов:

1 – 0,12 сульфата натрия; 2 – 1,0 сульфата натрия; 3 – 0,12 сульфата натрия (обработка ДИДС); 4 – 1,0 сульфата натрия (обработка ДИДС); 5 – 0,12 сульфата натрия и 0,86 М сахарозы.

Polarisation growth of dipyrindamol fluorescence in various media (M/l) during titration with white ghosts of erythrocytes:

1 – 0.12 sodium sulphate; 2 – 1.0 sodium sulphate; 3 – 0.12 sodium sulphate (DIDS treatment); 4 – 1.0 sodium sulphate (DIDS treatment); 5 – 0.12 sodium sulphate and 0.86 M sucrose

среды на действие ДИДС, видимо, обусловлено тем, что он связывается только с анионным каналом и с более высоким сродством, чем дипиридамола [2].

Таким образом, комбинирование эритроцитов крысы с незабуференной сульфатной средой вызывает её закисление с последующей фазой защелачивания. При этом фаза закисления менее чувствительна к ингибиторам анион-транспортной системы, чем фаза защелачивания. Гипертоническое воздействие стимулирует ингибиторную силу дипиридамола на фазу закисления. Гипертоническая сульфатная среда вызывает больший рост поляризации флуоресценции дипиридамола в присутствии телей эритроцитов, тогда как гипертоническая сахарозная среда подавляет рост данного показателя.

Литература

1. Рамазанов В.В., Лупилова Н.А., Тодрин А.Ф., Бондаренко Т.П. Осмотическая модификация транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде // Пробл. криобиологии. – 1999. – №4. – С. 34-41.
2. Cabantchik Z.J., Knauf P.A., Rostein A. The anion transport system of the red blood cell // Biochem. Biophys. Acta. – 1978. – V.515. – P. 239-302.
3. Red cell membranes - a methodological approach / Eds. Ellory J.C., Young J.D. – Academic press, 1982. – 369 p.

Поступило 26.03.2002

of dipyrindamol on the release of protons out of a cell (Table), but only hypertonic sulphate medium causes the growth of the degree of dipyrindamol fluorescence polarisation with the ghosts and hypertonic sucrose medium reduces this index (Figure). Such a result points to the fact that the growth of ionic strength results in an increase in dipyrindamol binding with anion channel, however the growth of osmotic gradient on membrane is also powerful factor in the change of inhibitory strength of this blocker.

The obtained results after the treatment of erythrocytes with DIDS show that residual polarisation of dipyrindamol fluorescence in isotonic sulphate medium is stipulated by its binding not with anion channel but the surface of membrane. A slight effect of hypertonic sulphate medium on DIDS effect is likely stipulated by the fact, that it binds only with anion channel and with higher affinity than dipyrindamol [2].

Thus the combination of rat's erythrocytes with non-buffered sulphate medium causes its acidification with the following alkalisation phase. In this case the phase of acidification is less sensitive to the inhibitors of anion-transport system that the phase of alkalisation. Hypertonic effect stimulates an inhibitory strength of dipyrindamol on the phase of acidification. Hypertonic sulphate medium causes a larger growth of dipyrindamol fluorescence polarisation in the presence of erythrocyte ghosts, meanwhile hypertonic sucrose medium suppresses the rise in this index.

References

1. Ramazanov V.V., Lupilova N.A., Todrin A.F., Bondarenko T.P. Proton transport osmotic modification in erythrocytes in a sulphatic medium // Problems of Cryobiology. – 1999. – N4. – P. 34-41.
2. Cabantchik Z.J., Knauf P.A., Rostein A. The anion transport system of the red blood cell // Biochem. Biophys. Acta. – 1978. – V.515. – P. 239-302.
3. Red cell membranes - a methodological approach / Eds. Ellory J.C., Young J.D. – Academic press, 1982. – 369 p.

Accepted in 26.03.2002