

УДК: 577.352.4:57.043

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И МОДИФИКАТОРОВ МЕМБРАНЫ НА ТРАНСПОРТ ФЛУОРЕСЦЕИНА В ЭРИТРОЦИТАХ

О.А.Олейник, Мухамед Хани Румиех, В.В.Рамазанов, В.А.Бондаренко

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)*

В работе исследовали транспорт флуоресцеина в эритроцитах при различных температурах (25 и 37<sup>0</sup>С) и при обработке SH-реагентами и модификаторами цитоскелета. В результате экспериментов был выявлен линейный характер кривых скорости транспорта и отсутствие влияния модификаторов цитоскелета и SH-реагентов на транспорт флуоресцеина, что позволило сделать предположение о том, что данный транспортный процесс осуществляется через липидный бислой мембраны эритроцитов. Это предположение подтверждает характер температурной зависимости, имеющей излом при 21<sup>0</sup>С, что характерно для термотропных фазовых переходов липидов. Эти данные позволили заключить, что транспорт флуоресцеина осуществляется через липидный бислой мембраны эритроцитов посредством неопосредованной диффузии.

Ключевые слова: *эритроцит, мембрана, флуоресцеин, транспорт.*

### Введение

Известно, что как при гипертоническом воздействии, так и при обработке эритроцитов модификатором цитоскелета гемином происходит ингибирование транспорта хлорида и сульфата в эритроцитах через белок полосы 3 (Лупілова, 1998). Основная функция белка полосы 3 заключается в контроле  $Cl^-/HCO_3^-$  обмена. Белок полосы 3 регулирует многие клеточные параметры, такие как pH, концентрацию хлорида внутри клетки и клеточный объём. С учётом этого, а также структурной роли белка полосы 3, можно говорить о нём, как о факторе, контролирующем чувствительность клеток к изменениям температурных и осмотических параметров среды. Соответственно, модификация цитоскелета может отразиться и на транспортной функции белка полосы 3. Ингибиторы анионного транспорта являются теми инструментами, которые позволяют контролировать эти виды чувствительности (Guizouarn et al., 2001; Zavodnik et al., 2002). Было установлено, что распределение флуоресцеина в эритроцитах не блокируется ингибитором анионного транспорта ДИДС (Олейник, Бондаренко, 2000), следовательно, транспорт данного субстрата не опосредуется белком полосы 3 и не должен зависеть от состояния цитоскелета. В связи с этим исследовали транспорт флуоресцеина в эритроциты на возможность существования переносчика, а также влияние модификаторов цитоскелета на динамику транспорта флуоресцеина в эритроциты.

### Методика

В эксперименте использовались консервированные эритроциты донорской крови человека II группы. Перед экспериментом эритроциты отмывали 4 раза средой, содержащей 90 ммоль/л KCl, 45 ммоль/л NaCl, 44 ммоль/л сахарозы, 5 ммоль/л глюкозы. После этого эритроциты с гематокритом 5 % пять раз по 10 минут инкубировали в среде, содержащей вышеперечисленные компоненты и натрий-фосфатный буфер (10 ммоль/л), pH=7,4 (Haest et al., 1981). Осадок эритроцитов (50 мкл) вносили в среду инкубации объёмом 2 мл (pH=7,4) с различной концентрацией флуоресцеина (5–400 мкмоль/л) и инкубировали 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 минут при 37<sup>0</sup>С и 0, 5, 10, 20, 45 минут при 25<sup>0</sup>С. Также проводилось исследование транспорта флуоресцеина из клетки при 25<sup>0</sup>С. Для этого осуществлялась нагрузка эритроцитов (2% гематокрит) флуоресцеином вышеуказанных концентраций 1 час при 25<sup>0</sup>С, а потом исследовался выход флуоресцеина в среду из нагруженных клеток. Выход флуоресцеина для каждой концентрации измерялся при 0, 5, 10, 20, 45 минутах. В полученных надосадках измеряли интенсивность флуоресценции.

Обработку эритроцитов модификаторами цитоскелета и SH-реагентами производили следующим образом: осадок эритроцитов (гематокрит 20%) обрабатывали следующими веществами:

– SH-реагентами (канальными модификаторами) – йодацетамидом (ИАА) (15 ммоль/л) (Рамазанов и др., 1996), парахлормеркурийбензоатом (ПХМБ) (1 ммоль/л), дитиобиснитробензоатом (ДТНБ) (2 ммоль/л), N-этилмалеимидом (N-ЭМ) (10 ммоль/л) (Sato et al., 1993) 1 час при 37<sup>0</sup>С;

– мембранными модификаторами – комбинированная обработка йодацетамидом (15 ммоль/л – 1 час при 37<sup>0</sup>С) и после этого парахлормеркурийбензоатом (1 ммоль/л – 1 час при 37<sup>0</sup>С) (Clark, Ralston, 1990; Sato et al., 1993), диизотиоцианостильбендисульффонатом (ДИДС) (0,05 ммоль/л),

гемином (0,3 ммоль/л) (Рамазанов, 1993), фенилгидразином (ФГ) (1 ммоль/л, гематокрит 5%) 10 минут при 37°C (Arduini et al., 1989).

Эритроциты после соответствующих обработок отмывали 4 раза средой для инкубации.

Следующим этапом была инкубация обработанных эритроцитов (гематокрит 2%) в пробах объемом 2 мл с флуоресцеином (20 мкмоль/л) в интервале времени (0, 1, 2, 5, 10, 15 минут). После инкубации эритроциты отмывали один раз холодной средой. Полученный осадок лизировали на льду дистиллированной водой 5 минут, осаждали гемоглобин 10% трихлоруксусной кислотой на льду 5 минут, пробы центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин, рН надосадка доводили до 12 и измеряли интенсивность флуоресценции на спектрофлуориметре HITACHI MPF-2A. Значения интенсивности флуоресценции (%) переводили в концентрацию с помощью калибровки.

Для вычисления констант скорости транспорта флуоресцеина строили график в координатах

$$\ln\left(\frac{F_{100\%} - F_t}{F_{100\%}}\right) \text{ от времени,}$$

где  $F_{100\%}$  – интенсивность флуоресценции после полного распределения субстрата между клеткой и средой,

$F_t$  – интенсивность флуоресценции в определенный момент времени.

Термодинамические параметры транспорта флуоресцеина вычисляли на основе уравнения Эйринга при построении графика в координатах  $\lg \frac{Kh}{TK_b}$  от  $1/T$  и на основе данного уравнения

вычисляли энергию и энтальпию активации:

$$\lg \frac{Kh}{TK_b} = \frac{\Delta S^*}{2,303R} - \frac{\Delta H^*}{2,303R T}$$

где  $K$  – константа скорости,

$h$  – постоянная Планка ( $6,62 \times 10^{-34}$  Дж×с),

$T$  – температура (К),

$K_b$  – постоянная Больцмана ( $1,38 \times 10^{-23}$  Дж/К),

$\Delta S^*$  – энтропия активации (Дж/(моль×К)),

$R$  – универсальная газовая постоянная (8,31 Дж/(моль×К)),

$\Delta H^*$  – энтальпия активации.

## Результаты

Исследование входа флуоресцеина в эритроциты показало, что скорость транспорта данного субстрата возрастает линейно в интервале концентраций 5–300 мкмоль/л, причём подобный характер зависимости выявляется как при 37°C, так и при 25°C (рис. 1а). Помимо этого, выход данного субстрата в интервале концентраций 5–400 мкмоль/л также не указывает на насыщаемый характер зависимости скорости транспорта от концентрации субстрата (рис. 1б).

ДИДС является ингибитором анионного транспорта (Kubota et al., 2003), однако обработка им эритроцитов не вызывает значительных изменений динамики входа флуоресцеина в клетки по сравнению с контролем (рис. 2а). Эти данные подтверждаются ранее полученными результатами (Олейник, Бондаренко, 2000). Известно, что подобная обработка уже через 5–10 минут приводит к тому, что 10–15 % спектрина не экстрагируются из мембранных везикул эритроцитов и остаются связанными с белком полосы 3 (Hsu, Morrison, 1983). Кроме того, ДИДС способен вызывать эхиноцитоз эритроцитов (Blank et al., 1994). Следовательно, наблюдаемый эффект ДИДС характеризует его влияние на взаимодействие белка полосы 3 с цитоскелетом.

Обработка эритроцитов SH-реагентами, модифицирующими транспортные системы эритроцитов (ИАА, ПХМБ, ДТНБ, N-ЭМ), также не выявила значительных изменений в кинетике транспорта исследуемого субстрата в клетки (рис. 2б).

Обработка эритроцитов реагентами, модифицирующими цитоскелет, такими как гемин, фенилгидразин, ПХМБ, также не оказывает влияния на транспорт флуоресцеина (рис. 2а).

При рассмотрении температурной зависимости было показано, что зависимость транспорта флуоресцеина в клетки от температуры можно представить двумя линейными участками в интервале температур от 1 до 21°C и от 21 до 40°C (рис. 3) с энергией активации 36,7 ккал/моль и энтропией активации 52,3 ккал/(моль×К) в низкотемпературном участке и с энергией активации 15 ккал/моль и энтропией активации –21,7 ккал/(моль×К) в верхнем участке.

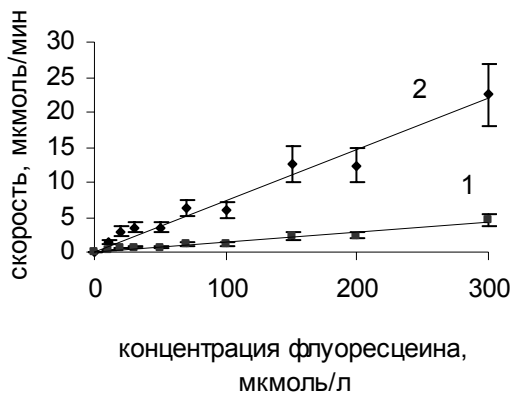


Рис. 1а. Концентраційна залежність транспорту флуоресцеїна в еритроцити: 1 – 25°C, 2 – 37°C

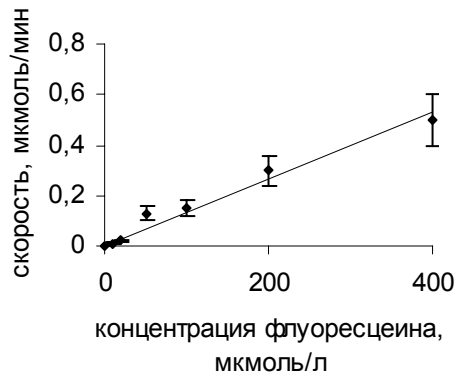


Рис. 1б. Концентраційна залежність транспорту флуоресцеїна з еритроцитів при 25°C

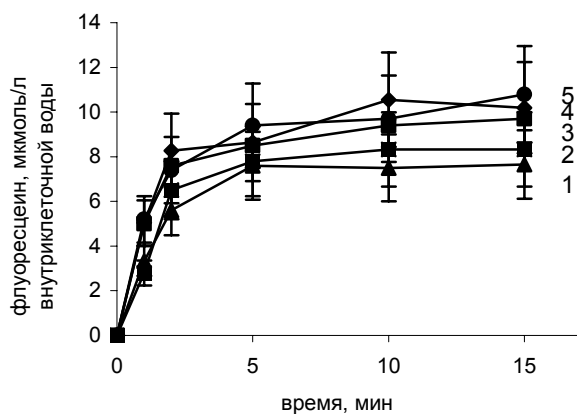


Рис. 2а. Вплив мембранних модифікаторів на транспорт флуоресцеїна в еритроцити: 1 – гемин, 2 – контроль, 3 – ДИДС, 4 – ИАА/ПХМБ, 5 – ФГ

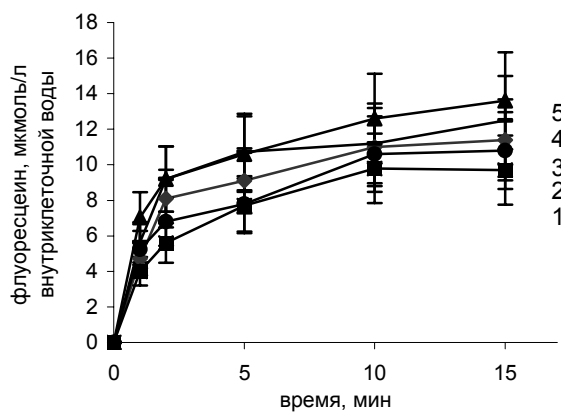


Рис. 2б. Вплив каналних модифікаторів на транспорт флуоресцеїна в еритроцити: 1 – контроль, 2 – ПХМБ, 3 – ИАА, 4 – N-ЭМ, 5 – ДТНБ

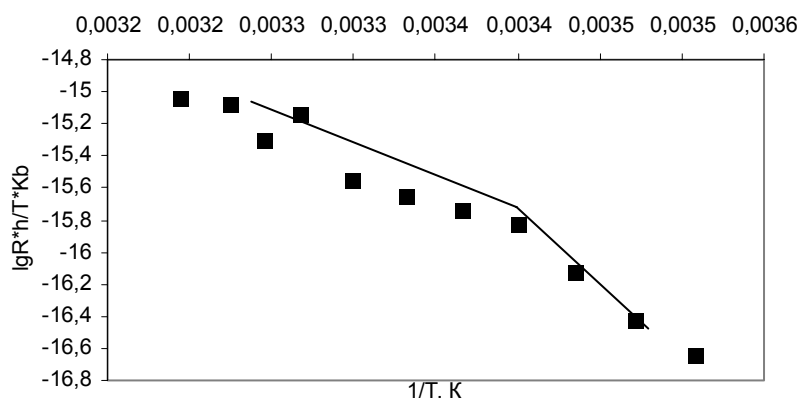


Рис. 3. Вплив температури на транспорт флуоресцеїна в еритроцити

### Обсуждение

Лінійний характер кривих швидкості транспорту вказує на просту дифузію через ліпідний бислої, оскільки в разі опосередкованої дифузії або транспорту через переносчик дані криві мали б вигляд гіперболи, що свідчить про насичуваність транспорту. Даний експеримент показав ненасичувані характер залежності швидкості транспорту флуоресцеїна від його концентрації (рис. 1а і 1б), що дозволяє говорити про те, що даний шлях транспорту не

опосредуется переносчиком и происходит через липидный бислой. В пользу транспорта флуоресцеина через липидный бислой также указывает тот факт, что обработка клеток модификаторами каналов (рис. 2б) также не модифицирует транспорт данного субстрата. Кроме того, обработка клеток SH-реагентами также не приводит к модификации динамики транспорта флуоресцеина (рис. 2б). В случае гемина известно, что обработка им эритроцитов приводит к блокированию котранспорта протона и сульфата в эритроциты 3 (Лупілова, 1998). Таким образом, результаты исследований показывают, что транспорт флуоресцеина происходит посредством непосредственной диффузии через липидный бислой мембраны. Такое предположение подтверждается тем, что температурная зависимость транспорта данного субстрата в эритроциты имеет излом при 21<sup>0</sup>С, температуре термотропного фазового перехода липидов (Pappayee, Mishra, 2000).

Обсуждая транспорт флуоресцеина в клетку, прежде всего, нужно обратить внимание на размер проникающей молекулы. Как известно из литературы (Garric et al., 1982), коэффициент проницаемости вещества тем меньше, чем больше его молекула ( $M_{\text{флуоресцеин}}=332$ ). На проницаемость влияет также и растворимость вещества в липидном бислое, чем меньше растворимость, тем меньше коэффициент проницаемости (Garric et al., 1982). От этих параметров зависит энергия активации, которая увеличивается с размером молекулы, что видно в ряду спиртов с увеличением молекулярной массы (Garric et al., 1982). При этом проницаемость возрастает с температурой, что наблюдается и для флуоресцеина: в низкотемпературном участке энергия активации выше, чем в высокотемпературном. Кроме этого, в пользу транспорта через липидный бислой свидетельствует точка излома при 21<sup>0</sup>С, что указывает на связь между фазовым состоянием липидов и транспортом флуоресцеина.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что транспорт флуоресцеина представляет собой диффузию через липидный бислой.

#### Список литературы

- Лупілова Н.О. Вплив інгібіторів аніонного транспорту і модифікаторів цитоскелету на бар'єрні характеристики мембран еритроцитів в умовах осмотичного стресу. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харьков, 1998. – 16с.
- Олейник О.А., Бондаренко В.А. Влияние ионной силы на распределение флуоресцеина между эритроцитами и средой инкубации // Проблемы криобиологии. – 2000. – №2. – С. 115–116.
- Рамазанов В.В. Влияние осмотического стресса и модификаторов цитоскелета на развитие холодового и гипертонического шока эритроцитов. Дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1993. – 138с.
- Рамазанов В.В., Семенченко А.Ю., Воловельская Е.Л. и др. Влияние прочности связи периферических белков с мембранами на гипертонический шок // Проблемы криобиологии. – 1996. – №3. – С. 8–11.
- Arduini A., Belfiglio M., Scurti R. et al. Mechanism of spectrin degradation induced by phenylhydrazine in intact human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – Vol.979, №1. – P. 1–6.
- Blank M.E., Hoefner D.M., Diedrich D.F. Morphology and volume alterations of human erythrocytes caused by the anion transporter inhibitors, DIDS and p-azidobenzylphlorizin // Biochim. Biophys. Acta. – 1994. – Vol.1192, №2. – P. 223–233.
- Clark S.J., Ralston G.B. The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membranes brought about by p-mercuribenzenesulfonate // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – Vol.1021, №2. – P. 141–147.
- Garric R.A., Patel B.C., Chinard F.P. Erythrocyte permeability to lipophilic solutes changes with temperature // Am. J. Cell Physiol. – 1982. – Vol.242, №1. – P. 74–80.
- Guizouarn H., Gabillat N., Motais R., Borgese F. Multiple transport functions of a red blood cell anion exchanger, tAE1: its role in cell volume regulation // J. Physiol. – 2001. – Vol.535, Pt 2. – P. 497–506.
- Haest C.W.M., Kamp D., Deuticke B. 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.
- Hsu L., Morrison M. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components // Arc. Biochem. Biophys. – 1983. – Vol.227, №1. – P. 31–38.
- Kubota K., Ishibashi T., Matsubara T. et al. Effects of 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) and chlorpromazine on NO<sub>3</sub>-transport via anion exchanger in erythrocytes: inertness of DIDS in whole blood // J. Pharmacol. Sci. – 2003. – Vol.93, №4. – P. 505–508.
- Pappayee N., Mishra A.K. 1-Naphthol as an excited state proton transfer fluorescent probe for erythrocyte membranes // Spectrochimica Acta. Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. – 2000. – Vol.56, №11. – P. 2249–2253.
- Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y. Participation of band 3 in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // Biol. Phar. Bull. – 1993. – Vol.16, №2. – P. 188–194.
- Zavodnik I.B., Zavodnik L.B., Bryszewska M.J. The mechanism of Zn-phthalocyanine photosensitized lysis of human erythrocytes // J. Photochem. Photobiol. B. – 2002. – Vol.67, №1. – P. 1–10.

**ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ І МОДИФІКАТОРІВ МЕМБРАНИ НА ТРАНСПОРТ ФЛУОРЕСЦЕЇНУ В ЕРИТРОЦИТАХ****О.О.Олійник, Мухамед Хані Румієх, В.В.Рамазанов, В.А.Бондаренко**

В роботі досліджували транспорт флуоресцеїну в еритроцитах при різних температурах (25 і 37<sup>0</sup>С) і при обробці SH-реагентами і модифікаторами цитоскелету. В результаті експериментів був виявлений лінійний характер кривих швидкості транспорту і відсутність впливу модифікаторів цитоскелету і SH-реагентів на транспорт флуоресцеїну, що дозволило зробити припущення про те, що даний транспортний процес здійснюється через ліпідний бішар мембрани еритроцитів. Це припущення підтверджує характер температурної залежності, що має злам при 21<sup>0</sup>С, що є характерним для термотропних фазових переходів ліпідів. Ці дані дозволили зробити висновок, що транспорт флуоресцеїну здійснюється через ліпідний бішар мембрани еритроцитів за допомогою неопосередкованої дифузії.

Ключові слова: *еритроцит, мембрана, флуоресцеїн, транспорт.*

**INFLUENCE OF TEMPERATURE AND MODIFIERS OF MEMBRANE ON THE FLUORESCEIN TRANSPORT IN ERYTHROCYTES****O.A.Oleynik, Muhamed Hani Rumieh, V.V.Ramazanov, V.A.Bondarenko**

In this work the transport of fluorescein was explored in red blood cells at different temperatures (25 and 37<sup>0</sup>C) and at treatment by SH-reagents and modifiers of cytoskeleton. As a result of experiments linear character of speed curves of transport and absence of influencing of cytoskeletal modifiers and SH-reagents on the transport of fluorescein were exposed, that allowed to do supposition that this process is carried out through lipid bilayer membranes of erythrocytes. This supposition was confirmed by temperature dependence the curve which has a fracture at 21<sup>0</sup>C, what is for termotropic phases transitions of lipids. These allowed concluding that the transport of fluorescein is carried out through lipid bilayer of erythrocyte membrane by unmediated diffusion.

Key words: *erythrocyte, membrane, fluorescein, transport.*

---

Представлено В.І.Грищенком  
Рекомендовано до друку Н.О.Бабенко