

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В РЕГУЛЯЦИИ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ K^+ -ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП (проект № П445).

Изучено влияние оксида азота на Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов человека. Исследования проводились с помощью метода регистрации мембранного потенциала в суспензии эритроцитов по изменениям pH среды инкубации в присутствии протонофора. Активность Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов оценивалась по амплитуде гиперполяризационного ответа и скорости его развития. Обнаружено, что донор оксида азота нитропруссид натрия оказывает необычное действие на Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов, возможно, из-за развития некоторых побочных эффектов. Предукуртор NO L-аргинин увеличивает Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов. К такому же эффекту приводит и увеличение внутриклеточной концентрации цГМФ с помощью дибутирил-цГМФ или ингибиторов фосфодиэстеразы.

Ключевые слова: оксид азота; эритроциты; Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы.

Широко известна роль оксида азота как эндогенного вазодилатора, нейротрансмиттера, агента, участвующего в иммунном ответе. Кроме этого, оксид азота влияет на гипотоническую устойчивость эритроцитов, регулирует перенос ими кислорода [1, 2], воздействует на деформируемость красных клеток крови [3], а также на эриптоз – программируемую гибель эритроцитов [4].

Мембрана эритроцитов содержит Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы средней проводимости, или Gardos-каналы, которые играют определенную роль в эриптозе [5]. Не исключено их участие в деформируемости клеток: Ca^{2+} -индуцируемое снижение деформируемости эритроцитов устраняется при выравнивании градиента ионов калия [6].

Вопрос об участии оксида азота в регуляции Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов эритроцитов остается открытым. Не исключено, что эффекты оксида азота, связанные с деформируемостью эритроцитов или продолжительностью их жизни, опосредованы его влиянием на Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны красных клеток крови.

Целью настоящего исследования явилось изучение вклада оксида азота в регуляцию Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны эритроцитов здоровых доноров.

Материалы и методы исследования

В работе использовалась кровь 27 практически здоровых добровольцев в возрасте от 20 до 45 лет обоего пола.

Кровь забиралась из локтевой вены утром натощак в пробирки с гепарином (25 ед/мл крови). После центрифугирования (1000g, 5 мин, 4°C) плазму и клетки белой крови удаляли, а эритроциты дважды промывали 3 частями изотонического раствора NaCl (150 мМ), содержащего 5 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7,4), при тех же условиях центрифугирования.

Для исследования Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов был применен метод регистрации мембранного потенциала в суспензии эритроцитов по изменениям pH среды инкубации в присутствии протонофора, основанный на том, что в этих условиях распределение протонов зависит от мембранного потенциала [7]. Эксперименты проводились по следующему плану. Для получения гиперполяризационного ответа к 4,75 мл среды инкубации (среда N), содержащей 150 мМ NaCl,

1 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкозы и 10 мкМ CaCl₂, добавляли 0,25 мл упакованных эритроцитов. Через 5 мин инкубации при 37°C и постоянном перемешивании добавляли протонофор карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон (Cl-CCP Sigma) до конечной концентрации 20 мкМ и спустя 2 мин – 0,5 мкМ Ca^{2+} -ионофора A23187 (Sigma). Добавление кальциевого ионофора A23187 к суспензии клеток, содержащей хлорид кальция, приводило к выходу ионов калия и развитию гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов, что находило свое отражение в изменении pH суспензии.

Зашелачивание среды инкубации соответствовало гиперполяризации мембраны, а восстановление pH – возвращению мембранного потенциала к исходному значению. При анализе полученных данных использовались следующие параметры (рис. 1). ΔE – амплитуда гиперполяризационного ответа, значение мембранного потенциала, соответствующее максимальному уровню гиперполяризации мембраны в ответ на добавление A23187 (мВ); V_1 – скорость зашелачивания среды инкубации, отражающая скорость гиперполяризации (мэкВ OH⁻/мин·л клеток); V_2 – скорость закисления среды инкубации, отражающая скорость восстановления мембранного потенциала (мэкВ H⁺/мин·л клеток). Амплитуда гиперполяризационного ответа и скорость его развития (V_1) характеризуют Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость, а скорость восстановления мембранного потенциала (V_2) – активность Ca^{2+} -АТФазы [7].

Статистическая обработка. Анализ данных проводили при помощи программы STATISTICA 6.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде «среднее арифметическое ± ошибка среднего» ($\bar{X} \pm m$). Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий нормальности Колмогорова–Смирнова. Сформированные выборки не подчинялись закону нормального распределения, поэтому для проверки статистических гипотез были использованы непараметрические критерии [8]. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна–Уитни. Для проверки однородности парных или зависимых выборок был использован T-критерий Вилкоксона [9]. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

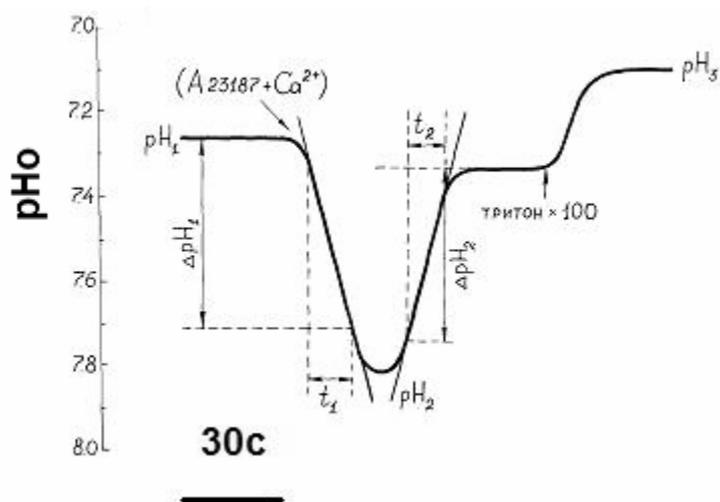


Рис. 1. Типичная кинетика изменения pH в суспензии эритроцитов человека в ответ на добавление 0,5 мкМ А23187 в присутствии 10 мкМ СаСl₂ и 20 мкМ Сl-ССР (представлена как иллюстрация метода расчета параметров гиперполяризационного ответа эритроцитов)

Результаты исследования и обсуждение

Для изучения влияния оксида азота в экспериментальной практике широко используются нитросоединения – доноры NO. В проведенных экспериментах был применен нитропруссид натрия (НП, Sigma).

Добавление в среду инкубации эритроцитов НП в концентрациях от 10⁻⁸ до 10⁻⁶ М не вызывало изменений амплитуды гиперполяризационного ответа эритроцитов (рис. 2).

Увеличение концентрации НП в среде инкубации эритроцитов до 10⁻⁵ М приводило к достоверному снижению амплитуды гиперполяризационного ответа (рис. 2). Кроме того, снижались и скорость развития гиперполяризации, и скорость восстановления мембранного потенциала. Увеличение концентрации нитропруссид натрия в среде инкубации до 10⁻⁴–10⁻³ М полностью подавляло развитие гиперполяризационного ответа эритроцитов (на рис. 2 не указано).

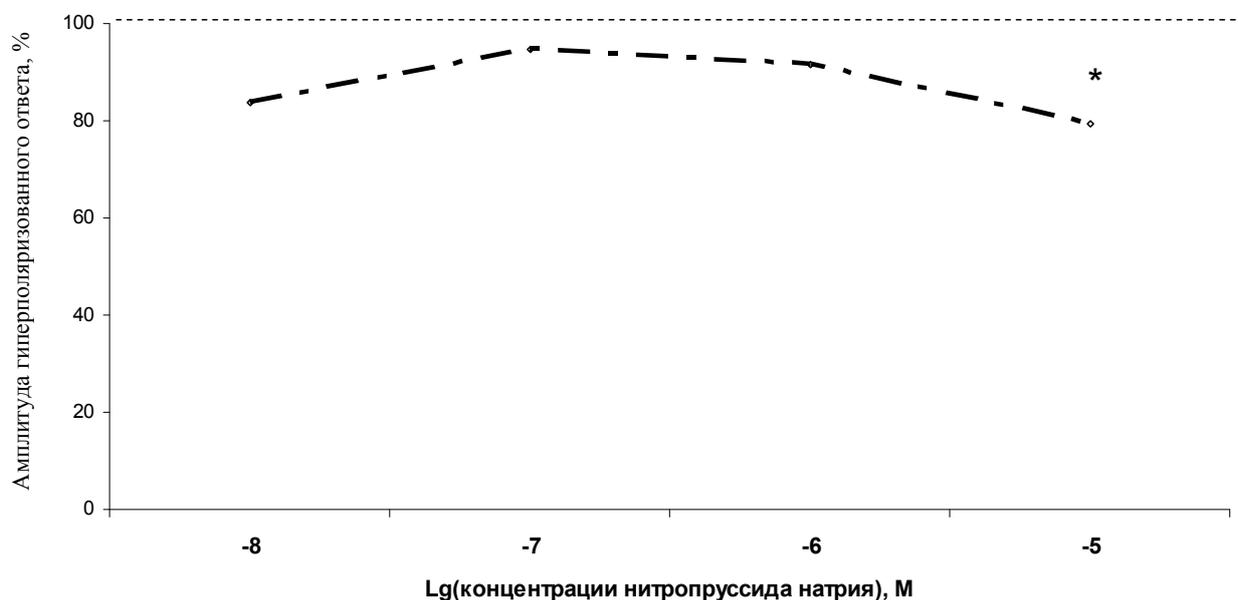


Рис. 2. Изменение амплитуды гиперполяризационного ответа эритроцитов человека в присутствии различных концентраций нитропруссид натрия. За 100% приняты значения ответа в отсутствии нитропруссид натрия (контроль).
* Статистически значимые отличия от контрольных значений (p<0,05)

Имеются данные о стимуляции нитропруссидом натрия калиевой проводимости мембраны ряда клеток, в первую очередь гладкомышечных, что связывают с действием оксида азота, донором которого нитропруссид натрия является. В проведенных нами экспериментах был получен противоположный результат. Каковы

же причины неожиданного влияния нитропруссид натрия на Са²⁺-активируемые калиевые каналы мембраны эритроцитов?

Следует отметить, что относительно донорной способности нитропруссид натрия не существует единой точки зрения. Некоторые авторы считают, что

НП спонтанно освобождает оксид азота [10], который легко проникает внутрь клеток и оказывает свое регуляторное действие. Согласно другой точке зрения, НП подвергается изменениям, в которых участвует мембранносвязанная НАДН-дегидрогеназа [11]. Кроме того, нитропруссид натрия освобождает не только NO, но и ионы цианида CN^- , причем концентрация последних пропорциональна концентрации НП [12]. Мембрана эритроцитов содержит некоторые фрагменты электронно-транспортной цепи, в частности НАДН-дегидрогеназу, цитохром с [13–15], которые могут включаться в регуляцию Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов [13]. Установлено, что ионы CN^- могут выступать в роли ингибитора цитохрома с [16].

Возможно, полученные эффекты НП обусловлены его декомпозицией с участием фрагментов электронно-транспортной цепи, имеющихся в мембране эритроцитов и ингибирующим влиянием ионов цианида.

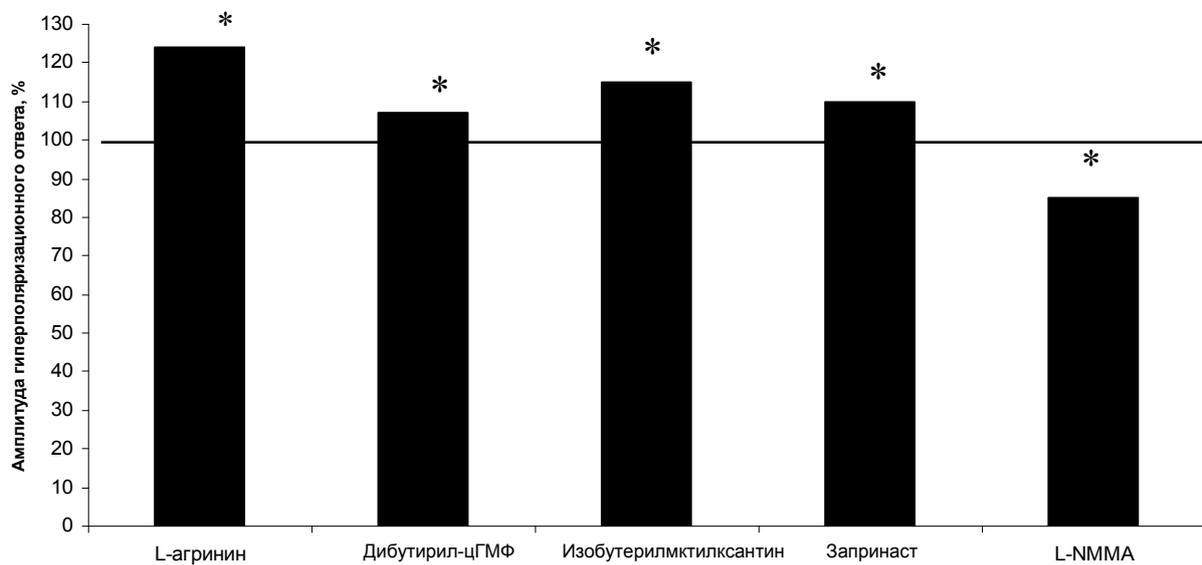


Рис. 3. Амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов человека в присутствии L-аргинина, дибутирил-цГМФ, изобутилметилксантина, запринаста и L-NMMA. За 100% приняты значения гиперполяризационного ответа в отсутствии перечисленных агентов (контроль). * Статистически значимые отличия от контрольных значений ($p < 0,05$)

В работах по изучению участия NO в регуляции Na^+/H^+ -обмена и K^+ -Cl⁻-котранспорта показан цГМФ-зависимый эффект оксида азота [20–22].

Для выяснения цГМФ-зависимого действия оксида азота обычно применяют ингибитор растворимой гуанилатциклазы – метиленовый синий. Однако проведенные эксперименты показали, что метиленовый синий сам изменяет параметры гиперполяризационного ответа: в концентрации 1 мкМ он увеличивал амплитуду и скорость развития гиперполяризации, что свидетельствует о его влиянии на Ca^{2+} -активируемую калиевую проницаемость эритроцитов.

В связи с этим были проведены эксперименты с агентами, увеличивающими внутриклеточную концентрацию цГМФ: дибутирил-цГМФ (10^{-4} М) (Sigma) – проникающим в клетки аналогом цГМФ и ингибитором фосфодиэстеразы – изобутилметилксантином (10^{-4} М) и запринастом (10^{-4} М) (100 мкМ) (Sigma) [20]. Инкубация эритроцитов со всеми перечисленными веществами

Чтобы избежать NO-независимых эффектов нитропруссид натрия, мы использовали другой подход для увеличения концентрации оксида азота, связанный с естественным преддуктором NO L-аргинином.

Известно, что эритроциты содержат NO-синтазу – фермент, образующий оксид азота из L-аргинина [17, 18].

Инкубация эритроцитов с L-аргинином (10^{-6} М) вызывала достоверное повышение амплитуды и скорости развития ГО эритроцитов (рис. 3).

Ингибирование NO-синтазы с помощью L-NMMA (Sigma) ($24 \cdot 10^{-5}$ М) достоверно снижало амплитуду гиперполяризационного ответа (рис. 3).

Таким образом, в проведенных экспериментах установлено, что внутриклеточная продукция NO с помощью L-аргинина увеличивала Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов. Подтверждением этому являются сведения, что L-аргинин снижает гипотонический гемолиз красных клеток крови вследствие активации выхода ионов калия [19].

приводила к достоверному повышению амплитуды гиперполяризационного ответа (рис. 3). Скорость развития ГО достоверно увеличивалась при действии изобутилметилксантина и запринаста. Результаты исследования показали, что L-аргинин, дибутирил-цГМФ и ингибиторы фосфодиэстеразы действуют однонаправленно, увеличивая активность Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов. Это позволяет предположить наличие цГМФ-опосредованного действия оксида азота на каналы.

Таким образом, в настоящем исследовании обнаружено, что донор оксида азота нитропруссид натрия оказывает необычное действие на $K^+(Ca^{2+})$ -каналы эритроцитов, возможно, из-за развития некоторых побочных эффектов. Стимуляция внутриклеточной продукции оксида азота с помощью L-аргинина вызывает повышение Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны эритроцитов человека. К такому же эффекту приводит и увеличение внутриклеточной концентрации цГМФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клещев А.Л., Демидов М.Л., Седов К.Р. Биохимические аспекты действия нитропруссид натрия // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1994. Т. 133, № 1. С. 39–43.
2. Kon K., Maeda N., Shiga T. Effect of nitric oxide on the oxygen transport of human erythrocytes // Toxicol. Environ Health. 1977. Vol. 5, № 2. P. 1109–1113.
3. Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability // Amer. J. Physiol. 2005. Vol. 284. P. 1577–1584.
4. Nicolay J.P., Liebig G., Niemoeller O.M. et al. Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide // Pflügers Archiv European Journal of Physiology. 2008. Vol. 456, № 2. P. 293–305.
5. Lang K.S., Lang P.A., Huber S.M., Wieder T. Mechanisms and significance of eryptosis // Antioxid Redox Signal. 2006. Vol. 8, № 8. P. 1183–1192.
6. Dodson R.A., Hinds T.R., Vincenzi F.F. Effects of calcium and A23187 on deformability and volume of human red blood cells // Blood cells. 1987. Vol. 12. P. 555–561.
7. Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И. и др. Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca^{2+} -индуцированных изменений мембранного потенциала // Биологические мембраны. 1992. Т. 9, № 9. С. 885–903.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
9. Боровиков В.П., Боровиков И.П. Статистика. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. М., 1998. 591 с.
10. Ignarro L.J., Napoli C., Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide // Ibid.-2002. Vol. 90, № 1. P. 21–28.
11. Mohazzab H.K.M., Kaminski P.M., Agarwal R., Wolin M.S. Potential role of a membrane-bound NADH oxidoreductase in nitric oxide release and arterial relaxation to nitroprusside // Circ Res. 1999. № 5. P. 220–228.
12. Lockwood A., Patka J., Rabinovich M. et al. Sodium nitroprusside-associated cyanide toxicity in adult patients fact or fiction? A critical review of the evidence and clinical relevance // Open Access Journal of Clinical Trials. 2010. № 2. P. 133–148.
13. Alvarez J., Garcia-Sancho J., Herreros B. Effect of electron donors on Ca^{2+} -dependent K^{+} -transport in one – step inside – out vesicles from human erythrocyte membrane // Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol. 771. P. 23–27.
14. Kennett E.C., Kuchell P.W. Redox reactions and electron transfer across the red cell membrane // IUBMB Life. 2003. Vol. 55, № 7. P. 375–385.
15. Matteucci E., Giampietro O. Electron pathways through erythrocyte plasma membrane in human physiology and pathology: potential redox biomarker? // Biomark Insights. 2007. Vol. 17, № 2. P. 321–329.
16. Leavesley B.H., Heather B., Prabhakaran K. et al. Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: implications for acute cyanide toxicity // 2008. Toxicol. Sci. Vol. 101, № 1. P. 101–111.
17. Kleinbongard P., Schulz R., Rassaf T. et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase // Blood. 2006. Vol. 107, № 7. P. 2943–2951.
18. Suhr F., Porten S., Hertrich T., Brixius K. Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes // Exp. Biol. Med. 2009. Vol. 20, № 2. P. 95–103.
19. Caramelo C., Riesco A., Outeiriño J. et al. Effects of nitric oxide on red blood cells: changes in erythrocyte resistance to hypotonic hemolysis and potassium efflux by experimental maneuvers that decrease nitric oxide // Biochem Biophys Res Commun. 1994. Vol. 199, № 2. P. 447–454.
20. Petrov V., Lijnen P. Regulation of human erythrocyte Na^{+}/H^{+} -exchange by soluble and particulate guanylate cyclase // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1996. Vol. 271. P. 1556–1564.
21. Adragna N.C., Lauf P.K. Role of nitrite, a nitric oxide derivative, in K-Cl-cotransport activation of low-potassium sheep red blood cells // J. Membr. Boil. 1998. Vol. 166. P. 157–167.
22. Adragna N.C., White R.E., Orlov S.N., Lauf P.K. K-CL cotransport vascular smooth muscle and erythrocytes: possible implication in vasodilatation // Am. J. Physiol Cell. Physiol. 2000. Vol. 278 (2). P. 381–390.

Статья представлена научной редакцией «Биология» 22 февраля 2011 г.