

Трубачева Оксана Александровна

**РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ
Ca²⁺-АКТИВИРУЕМОЙ КАЛИЕВОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ
ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Примечание [D1]:

Томск – 2011

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации" и Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт кардиологии Сибирского отделения РАМН

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Петрова Ирина Викторовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор

Барбараш Нина Алексеевна

кандидат медицинских наук

Коноваленко Юлия Александровна

Ведущая организация: ГОУ ВПО "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития России"

Защита состоится "_____" _____ 2011 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (634050 г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России

Автореферат разослан "___" _____ 2011г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Т.С. Федорова

Актуальность проблемы

К настоящему времени накоплен огромный объем сведений о роли активных форм кислорода (АФК) в жизнедеятельности клетки, к которым наряду с супероксид-анионом, перекисью водорода относят и оксид азота. Хорошо изучено повреждающее действие АФК на клеточные мембраны. Однако в последнее время все чаще появляются работы, в которых АФК, в том числе супероксид-анион, перекись водорода (H_2O_2) и оксид азота (NO) рассматриваются в качестве регуляторов внутриклеточных процессов. Активные формы кислорода либо сами выступают в роли вторичных посредников [Das D.K., Maulik N., 1994; Bromme H.J., Holz J., 1996; Дубинина Е.Е., 2006; Быстрова М.Ф., Буданова Е.Н., 2007], либо модулируют действие известных регуляторных каскадов клетки [Dröge W., 2002]. Один из регуляторных путей связан с влиянием АФК на ионтранспортные системы клеток [Adragna N.C. et al., 2000; Gutterman D.D. et al., 2005].

Мембрана эритроцитов содержит только один тип каналов, а именно Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы ($K^+(Ca^{2+})$ -каналы) средней проводимости, или Gardos-каналы. В связи с этим красные клетки крови служат естественной моделью для изучения каналов этого типа. Кроме того, данное обстоятельство позволяет проводить исследования на суспензии интактных клеток.

Со времени своего обнаружения $K^+(Ca^{2+})$ -каналы эритроцитов достаточно интенсивно изучаются, но только недавно была установлена их физиологическая роль. $K^+(Ca^{2+})$ -каналы вносят определенный вклад в эриптоз [Lang F. et al., 2006; Foller M. et al., 2008], изменение объема клеток [Begenisich T. et al., 2004]. Не исключено их участие в деформируемости клеток: Ca^{2+} -индуцируемое снижение деформируемости эритроцитов устраняется при выравнивании градиента ионов калия [Dodson R.A. et al., 1987].

Регуляция $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов осуществляется несколькими путями. Один из них связан с вторичными посредниками, эффект которых реализуется при воздействии активаторов или ингибиторов протеинкиназ А или С [Орлов С.Н. с соавт., 1992; Петрова И.В. с соавт., 1997; Pellegrino M, Pellegrini M., 1998; Del Carlo B, et al., 2003].

Другой путь регуляции осуществляется посредством белков цитоскелета эритроцитов без участия протеинкиназ [Петрова И.В. с соавт., 2002; Ситожевский А.В. с соавт., 2004].

Наконец, мембрана эритроцитов содержит некоторые компоненты электронно-транспортной цепи, обычно присутствующие на внутренней мембране митохондрий (НАДН-дегидрогеназа, цитохром с) [Alvarez J. et al., 1984; Kennett E.C., Kuchell P.W., 2003; Matteucci E., Giampietro O., 2007], которые могут включаться в регуляцию $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов [Alvarez J. et al., 1984].

В эритроцитах, вследствие циклов окси- и дезоксигенации гемоглобина, постоянно происходит образование АФК, которые влияют на регуляторные пути этих клеток [Varvitenko N.N. et al., 2005; Matteucci F., Giampietro O., 2007]. Кроме того, в процессе своего функционирования эритроциты подвергаются действию АФК, продуцируемых другими клетками: эндотелиоцитами, иммунокомпетентными клетками во время так называемого «кислородного

взрыва» [Takahashi R. et al., 1991]. Известно, что АФК, в частности, оксид азота, оказывают влияние на эритроциты [Nicolay J. P. et al., 2008] и деформируемость эритроцитов [Bor-Kucukatay M. et al., 2003].

Эритроциты являются универсальной моделью для оценки степени и глубины повреждения мембран при патологическом процессе [Черницкий Е.А., Воробей А.В., 1987]. С другой стороны, нарушения структурно-функционального состояния мембраны эритроцитов могут рассматриваться как одно из звеньев патогенеза ряда заболеваний.

При патологических процессах, сопровождающихся окислительным повреждением эритроцитов, наблюдаются типовые изменения со стороны клеток красной крови [Новицкий В.В. с соавт., 2004]: повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция, снижение их деформируемости и сокращение продолжительности жизни [McMillan D.E. et al., 1978; Fujita J. et al., 1999; Miossec P. et al., 1999]. Нельзя исключить, что в условиях повышенной продукции АФК изменяется как функционирование самих $K^+(Ca^{2+})$ -каналов, так и внутриклеточных сигнальных систем, участвующих в их регуляции.

Однако данные об участии АФК в регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов человека немногочисленны.

В связи с вышесказанным представляется весьма актуальным изучение роли активных форм кислорода в регуляции $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов как в норме, так и при патологическом процессе, сопровождающемся окислительным повреждением эритроцитов.

Цель настоящего исследования – изучить вклад активных форм кислорода в регуляцию Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны эритроцитов здоровых доноров и больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа.

Для достижения указанной цели решались **следующие задачи:**

- 1) исследовать влияние супероксид-аниона, перекиси водорода и оксида азота на Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров;
- 2) изучить влияние перекиси водорода и агониста α_1 -адренэргических рецепторов фенилэфрина на Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров;
- 3) исследовать влияние повышенной Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости на деформируемость и изменение объема эритроцитов здоровых доноров;
- 4) изучить регуляцию активными формами кислорода Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны эритроцитов больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа.

Положения, выносимые на защиту

1. Перекись водорода снижает, а оксид азота увеличивает Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров. Супероксид-анион при внеклеточной аппликации не изменяет Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров, но снижает скорость ее развития.
2. Перекись водорода потенцирует активирующее действие агониста α_1 -адренэргических рецепторов фенилэфрина на Ca^{2+} -зависимую K^+ -

проницаемость мембраны эритроцитов как здоровых доноров, так и больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа.

3. Повышение Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости приводит к снижению деформируемости эритроцитов здоровых доноров. Одной из причин снижения деформируемости является сжатие клеток.
4. В эритроцитах больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа перекись водорода, в отличие от здоровых доноров, существенно увеличивает Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны.

Научная новизна работы

Впервые показано, что супероксид-анион, продуцируемый внеклеточным источником (система ксантин – ксантинооксидаза), не изменяет, а перекись водорода уменьшает Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров. Впервые установлено, что увеличение внутриклеточной концентрации перекиси водорода потенцирует активирующее действие фенилэфрина на Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы эритроцитов здоровых доноров.

Установлено, что стимуляция внутриклеточной продукции оксида азота с помощью L-аргинина приводит к повышению Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны эритроцитов здоровых доноров. Сходный эффект оказывает и увеличение внутриклеточной концентрации цГМФ.

Показано, что активация Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны эритроцитов здоровых доноров снижает их деформируемость, что сопровождается уменьшением объема клеток.

Впервые проведено исследование влияния активных форм кислорода на Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы эритроцитов больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа. Установлено, что у данной категории больных в отличие от здоровых доноров перекись водорода увеличивает Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов.

Научно-практическая значимость работы

Данные, полученные в настоящем исследовании, носят фундаментальный характер и расширяют существующие представления о регуляции и функциональной значимости Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов эритроцитов. Результаты работы дополняют представления о механизмах регуляции ионной проницаемости мембраны клеток активными формами кислорода. Сведения о снижении деформируемости эритроцитов вследствие увеличения Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости полезны для разработки молекулярных технологий управления деформируемостью красных клеток крови. Результаты работы, связанные с модулированием активными формами кислорода Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов эритроцитов при артериальной гипертензии в сочетании с сахарным диабетом 2 типа могут быть использованы для фармакологической коррекции нарушений структурно-метаболического статуса эритроцитов при патологиях, объединенных развитием окислительного стресса.

Основные положения работы используются в курсах лекций и практических занятиях, проводимых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского

университета, на кафедре физиологии человека и животных Томского государственного университета. Методические приемы и полученные данные используются в научных исследованиях, выполняемых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета. Области применения полученных данных являются физиология, патологическая физиология, биофизика.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы доложены на всероссийских и международных научных форумах: XI и X Международном конгрессе молодых ученых и специалистов “Наука о человеке” (Томск, 2008-2009), Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов “Актуальные проблемы современной эндокринологии” (Москва, 2008), VI Сибирском физиологическом съезде (Барнаул, 2008), XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов” (Москва, 2009), XXI Съезде Физиологического общества им. И.П.Павлова (Калуга, 2010), конференции «Современная кардиология: Эра инноваций» (Томск, 2010).

Исследование выполнено в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы ГК№ П445, ГК № 02.740.11.5031 и ГК № 14.740.11.0932.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 работ, из которых 2 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы “Материалы и методы”, главы собственных результатов, их обсуждения и заключения. Библиография включает 237 ссылок, в том числе 86 – работы отечественных авторов и 151 – зарубежных. Работа иллюстрирована 37 рисунками и включает 2 таблицы.

Личное участие автора

Основные результаты исследования, вошедшие в диссертацию, получены лично автором. Анализ данных литературы по теме диссертации, статистическая обработка полученных результатов, их научный анализ, обсуждение и написание диссертации выполнены самостоятельно автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования: в ходе выполнения данной работы было обследовано 89 человек. В контрольную группу вошел 51 практически здоровый доброволец. Группу больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа составили 38 человек. Группы сопоставимы по полу и возрасту. Клинический диагноз верифицировали с помощью клинко-лабораторных методов исследования на базе отделения атеросклероза и

хронической ишемической болезни сердца НИИ кардиологии Сибирского отделения РАМН (руководитель – академик РАМН Р.С. Карпов).

Получение эритроцитов: кровь забиралась из локтевой вены утром натощак в пробирки с гепарином (25 ед/мл крови). После центрифугирования (1000g, 5 мин, 4⁰C) 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.

Использованные растворы и реактивы:

Использованные растворы: 1. *Среда отмывания эритроцитов:* 5 мМ Na-фосфатный буфер в 150 мМ NaCl. 2. *Среда инкубации эритроцитов:* 1) изотоническая среда 320 мосм: 150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкоза, 2) гипертоническая среда 420 мосм: 100 мМ сахароза, 150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкоза, 3) гиперкалиевая среда 10 мМ NaCl, 140 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкоза. 3. *Вязкая среда для определения деформируемости:* 0,2% высокомолекулярного полиэтиленоксида с молекулярной массой $M=5,8 \cdot 10^6$, 2% альбумина и 0,9% натрия хлорида.

Использованные реактивы: NaOH, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, MgCl₂, CaCl₂, глюкоза, Cl-CCP (карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон), перекись водорода, L-аргинин, нитропруссид натрия, метиленовый синий, 3-изобутил-1-метилксантин, запренаст, L-NMMA, ксантин, ксантинооксидаза, цитохром с, аминотриазол, форбол-миристинат-ацетат (PMA – phorbol 12-myristate-13-acetate), L-фенилэфрин гидрохлорид, клотримазол, каталаза, супероксиддисмутаза, альбумин, полиэтиленоксид (“Sigma”, США), тритон X100 (“Merck”, Германия), дибутирил-цГМФ (Boehringer Mannheim GmbH, Германия)

Растворы A23187, Cl-CCP, готовились на этиловом спирте. Конечная концентрация растворителя в среде инкубации эритроцитов не превышала 0,5% и не оказывала влияния на активность Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов. Раствор ксантина готовился на основе 1 мМ NaOH. Все остальные растворы готовили на основе деионизированной воды.

Метод регистрации мембранного потенциала в суспензии эритроцитов

Для исследования Ca²⁺-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 E_m как $E_m = RT/F (pH_i - pH_0)$. Здесь pH_i и pH_0 – значения pH цитоплазмы и среды инкубации, соответственно [Орлов С.Н., Петрова И.В. с соавт., 1992]. 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 37⁰C и постоянном перемешивании добавляли протонофор Cl-CCP до конечной концентрации 20 мкМ и спустя 2 мин добавляли 0,5 мкМ Ca²⁺-ионофора A23187. Добавление кальциевого ионофора A23187 к суспензии клеток, содержащей хлорид кальция, приводило к выходу

ионов калия и развитию гиперполяризационного ответа (ГО) мембраны эритроцитов, что находило свое отражение в изменении рН суспензии.

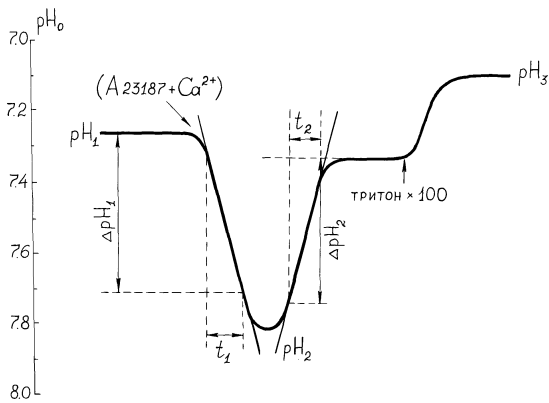


Рис. 1. Типичная кинетика изменения рН₀ в суспензии эритроцитов человека в ответ на добавление 0,5 мкМ А23187 в присутствии 10 мкМ СаСl₂ (представлена как иллюстрация метода расчета стационарных и кинетических параметров).

Защелачивание среды инкубации соответствовало гиперполяризации мембраны, а восстановление рН – возвращению мембранного потенциала (МП) к исходному значению. При анализе полученных данных использовались следующие стационарные и кинетические параметры (рис. 1.). ΔЕ – амплитуда ГО, значение мембранного потенциала, соответствующие максимальному уровню гиперполяризации мембраны в ответ на добавление А23187 (мВ); V₁ – скорость защелачивания среды инкубации, отражающая скорость гиперполяризации (мэкв ОН⁻/мин·л клеток); V₂ – скорость закисления среды инкубации, отражающая скорость восстановления мембранного потенциала (МП) (мэкв Н⁺/мин·л клеток). Амплитуда ГО и скорость его развития (V₁) характеризуют Са²⁺-зависимую К⁺-проницаемость, а скорость восстановления мембранного потенциала (V₂) – активность Са²⁺-АТФазы [Орлов С.Н., Петрова И.В. с соавт., 1992].

Спектрофотометрические методы: 1. Определение продукции супероксид-аниона. В кювету объемом 1 мл, содержащую среду N, добавляли 10⁻⁴ М ксантина, 10 мU/ мл ксантиноксидазы и 5·10⁻⁵ М цитохрома с. Измерения проводились против кюветы, содержащей среду N и цитохром с в концентрации 5·10⁻⁵ М. Продукцию супероксид-аниона оценивали по степени восстановления цитохрома с при 550 нм. Другим продуктом реакции с участием ксантиноксидазы является перекись водорода, что находит свое отражение в снижении содержания супероксид-аниона. Для подтверждения этого к среде N, содержащей ксантин, ксантиноксидазу и цитохром с в указанных концентрациях, добавляли каталазу (454 U/ мл), которая катализирует реакцию разложения перекиси водорода. 2. Регистрация изменения объема эритроцитов. Для регистрации изменений объема эритроцитов в условиях варьирования осмолярности среды инкубации и при активации К⁺(Са²⁺)-каналов использовался метод, основанный на том, что при изменении объема эритроцитов изменяется светорассеяние суспензии клеток [Орлов С.Н. с соавт., 1988].

Исследование деформируемости эритроцитов. Исследование проводили методом лазерной эктацитометрии, основанной на явлении дифракции световых лучей при прохождении через тонкий слой жидкости с взвешенными в ней клетками [Белкин А.В. с соавт., 1991; Фирсов Н.И. с соавт., 1983; Evans E. et al., 1986; Bessis M. et al., 1975]. Для количественной оценки рассчитывался индекс деформируемости эритроцитов (ИДЭ): $ИДЭ = (L - H) / (L + H)$, где L – больший диаметр эллипса; H – меньший диаметр эллипса. Значения ИДЭ, полученные для клеток прединкубированных в среде N без добавления агентов, принимали за 100%.

Статистическая обработка. Анализ данных проводили при помощи программы Statistica 6.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде “среднее \pm ошибка среднего” ($X \pm m$). 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 [Гланц С., 1999]. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Для проверки однородности парных или зависимых выборок был использован T-критерий Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test) [Боровиков В. П., 1998]. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние супероксид-аниона и перекиси водорода на Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов

Одним из наиболее значимых АФК является супероксид-анион (O_2^-), продукция которого существенно увеличена при ряде патологических состояний: ишемии, гипоксиях, стрессовых ситуациях, эндокринопатиях, опухолевом процессе, различных бактериальных инфекциях и интоксикациях [Владимиров Ю.А., 2000; Карли Ф. с соавт., 1997; Логинов А. С, Матюшин Б. Н., 1996; Шепелев А.П. с соавт., 2000; Чеснокова Н.П. с соавт., 2001].

Для получения супероксид-аниона был применен подход, описанный в работах [Larsson R. et al., 1987; Tsai K. et al., 1997; Kuciel R., Mazurkiewicz A., 2004], где в качестве источника O_2^- использовалась ксантиноксидазная реакция.

Как показали предварительные спектрофотометрические исследования в бесклеточной среде, максимальная продукция супероксид-аниона наблюдалась через 10 минут инкубации с 10^{-4} М ксантином, 10 мU/ мл ксантиноксидазой и составила 9 мкМ.

Амплитуда ГО эритроцитов, прединкубированных в присутствии 10^{-4} М ксантина и 10 мU/ мл ксантиноксидазы в течение 10 минут, не отличалась от контрольных значений и составила $97,57 \pm 0,96$ % ($n=7$, $p > 0,05$) (рис. 2). В то же время, наблюдалось снижение скорости развития ГО, которая составила $54,38 \pm 1,39$ % ($n=7$, $p < 0,02$) от контрольных значений. Скорость восстановления МП не отличалась от контрольных значений.

Таким образом, оказалось, что при действии супероксид-аниона снаружи клетки Ca^{2+} -зависимая K^+ -проницаемость эритроцитов в целом не изменяется, но значительно снижается скорость ее нарастания.

Другим продуктом ксантиноксидазной реакции является H_2O_2 [Kuciel R., Mazurkiewicz A., 2004], образование которой растет при увеличении времени инкубации.

Увеличение времени прединкубации клеток с ксантином и ксантиноксидазой до 20 и 30 минут вызвало достоверное снижение амплитуды и скорости развития ГО эритроцитов (рис. 2).

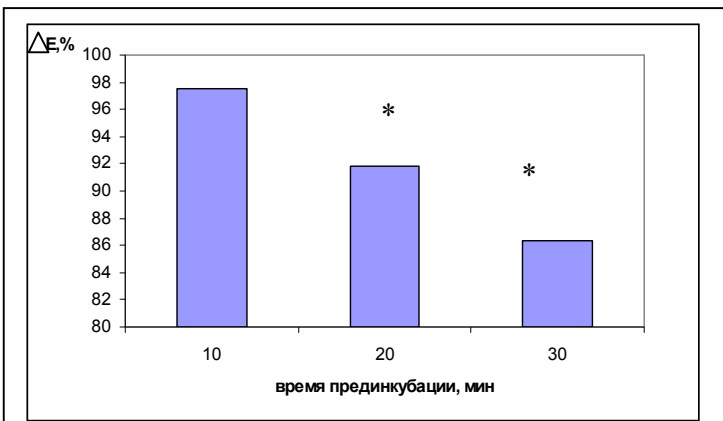


Рис. 2. Зависимость амплитуды гиперполяризационного ответа эритроцитов здоровых доноров от времени инкубации с 10^{-4} М ксантином и 10 мU/мл ксантиноксидазой.

За 100% приняты значения параметра в отсутствие ксантина и ксантиноксидазы.

Эти параметры составили $91,8 \pm 0,84\%$ ($n=7$, $p<0,05$), $65,52 \pm 1,39\%$ ($n=7$, $p<0,02$) и $86,36 \pm 0,76\%$ ($n=7$, $p<0,05$), $56,39 \pm 1,95\%$ ($n=7$, $p<0,02$), соответственно при 20 и 30 минутах инкубации. Скорость восстановления МП эритроцитов, отражающая активность Ca^{2+} -насоса мембраны этих клеток, достоверно снижалась до $75,74 \pm 2,01\%$ ($n=7$, $p<0,05$) только при 30 минутах прединкубации.

Возможно, что снижение параметров ГО при увеличении времени инкубации эритроцитов с ксантином и ксантиноксидазой обусловлено действием H_2O_2 .

В следующей серии экспериментов было изучено влияние перекиси водорода на параметры ГО эритроцитов.

Инкубация эритроцитов с $5 \cdot 10^{-8}$, 10^{-7} и 10^{-6} М перекиси водорода не привела к достоверному изменению параметров ГО. Ранее было показано [Ситожевский А.В. с соавт., 1997; Sitozhevsky A.V. et al., 1997] при низких концентрациях гидропероксидов плазматическая мембрана эритроцитов становится первым барьером, где происходит расщепление экзогенной перекиси. Ключевую роль в декомпозиции экзогенной перекиси играют так называемые Fe-связывающие центры мембраны, представленные гемовым и негемовым железом. Кроме того, для эритроцитов характерна высокая активность каталазы и глутатионпероксидазы - ферментов, разрушающих перекись водорода, образующуюся в самих эритроцитах или проникающую извне.

Использование более высоких концентраций перекиси водорода оказалось невозможным из-за развивающегося в этих условиях повреждения эритроцитов.

Для увеличения внутриклеточной концентрации H_2O_2 был использован проникающий в клетку ингибитор каталазы аминотриазол. Обработка

эритроцитов аминотриазолом привела к достоверному снижению амплитуды и скорости развития ГО эритроцитов при всех использованных концентрациях перекиси водорода.

Так, параметр ΔE составил $86,82 \pm 5,69\%$ ($n=5$, $p<0,05$), $85,05 \pm 0,85\%$ ($n=5$, $p<0,05$) и $79,02 \pm 0,91\%$ ($n=5$, $p<0,05$), а скорость развития ГО – $77,08 \pm 1,09\%$ ($n=5$, $p<0,05$), $74,73 \pm 4,24\%$ ($n=5$, $p<0,05$) и $78,51 \pm 1,55\%$ ($n=5$, $p<0,05$) соответственно при $5 \cdot 10^{-8}$, 10^{-7} и 10^{-6} М H_2O_2 .

В то же время оказалось, что скорость восстановления ГО эритроцитов, обработанных аминотриазолом, достоверно увеличивалась и составила при $5 \cdot 10^{-8}$, 10^{-7} и 10^{-6} М H_2O_2 соответственно $146,35 \pm 5,59\%$ ($n=5$, $p<0,05$), $151,06 \pm 3,52\%$ ($n=5$, $p<0,05$) и $146,85 \pm 3,57\%$ ($n=5$, $p<0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о снижении Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости и, напротив, об увеличении активности Ca^{2+} -насоса мембраны эритроцитов в условиях повышения внутриклеточной концентрации H_2O_2 .

Поскольку мишенью для перекиси водорода являются SH-группы различных белков [Быстрова М.Ф и Буданова Е.Н., 2007], наиболее вероятно, что эффект H_2O_2 связан с модификацией сульфгидрильных групп белков канала или его регуляторных белков. Подтверждением этому являются ранее полученные в нашей лаборатории данные о снижении амплитуды ГО под действием блокатора SH-групп N-этилмалеимида [Кремено С.В., 2004].

Ранее в работах [Орлов С.Н. с соавт., 1992; Петрова И.В. с соавт., 1999] было показано, что в формировании Ca^{2+} -индуцированного ГО эритроцитов участвуют не только $K^+(Ca^{2+})$ -каналы, но и Ca^{2+} -АТФаза: увеличение ее активности снижает амплитуду ГО эритроцитов. Не исключено, что увеличение активности Ca^{2+} -АТФазы под действием H_2O_2 приводило к описанному эффекту.

Еще одной причиной снижения амплитуды ГО может быть ингибирование АФК Na^+/K^+ -АТФазы [Болдырев А.А. с соавт., 1996], что приводит к снижению градиента ионов калия, имеющегося на мембране эритроцита. Последнее, в свою очередь, приводит к уменьшению Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны. Действительно, ранее в нашей лаборатории было обнаружено, что диссипация калиевого градиента эритроцитов вследствие ингибирования Na^+/K^+ -АТФазы оубаином приводила к снижению амплитуды ГО эритроцитов [Ситожевский А.В. с соавт. 2006].

Таким образом, в настоящем исследовании обнаружено снижение Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости и стимуляция Ca^{2+} -АТФазы перекисью водорода. Наиболее вероятной причиной обнаруженного эффекта H_2O_2 является окисление сульфгидрильных групп белков канала или его регуляторных белков.

Роль перекиси водорода в адренергической регуляции Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны эритроцитов

В ряде работ показано участие внутриклеточных сигнальных систем в регуляции $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов [Орлов С.Н. с соавт., 1992; Петрова И.В. с соавт., 1997; Pellegrino M, Pellegrini M., 1998; Del Carlo V. et al., 2003]. Известно, что активность ряда ферментов, являющихся участниками внутриклеточных регуляторных каскадов, таких как протеинкиназа С, NO-синтаза,

гуанилатциклаза и др. модулируются АФК [Sheehan D.W. et al., 1993; Rodriguez-Martinez M.A. et al., 1998; Thakali K. et al., 2005].

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние агониста α_1 -адренэргических рецепторов L-фенилэфрина на $K^+(Ca^{2+})$ -каналы в условиях повышенной концентрации H_2O_2 . L-фенилэфрин (10^{-8} М) в отсутствие перекиси водорода приводил к увеличению амплитуды ГО на $9,45 \pm 1,69\%$ ($n=7$, $p<0,05$), но не изменял параметры V_1 и V_2 . Совместное действие H_2O_2 и L-фенилэфрина вызывало существенный рост параметров ГО: амплитуда увеличивалась почти в 2 раза, скорость развития ГО – более чем, в 3 раза, а скорость восстановления – в 5 раз (рис. 3).

Одним из ключевых ферментов сигнального пути, опосредованного α_1 -адренэргическими рецепторами, является протеинкиназа С (ПКС). Известно, что в эритроцитах ПКС вызывает увеличение входа ионов кальция, что ведет к активации Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости [Andrews D.A. et al., 2002; Klarl B.A. et al., 2006]. Возможно, в условиях повышения концентрации H_2O_2 , увеличивается активность ПКС, что ведет к возрастанию входа ионов Ca^{2+} и, соответственно, к увеличению Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны эритроцитов.

Подобные результаты получены при обработке эритроцитов активатором ПКС форбол-миристат-ацетатом (ФМА) (10^{-7} М). ФМА приводил к достоверному увеличению амплитуды и скорости развития ГО до $114,70 \pm 12,32\%$ ($n=8$, $p<0,05$) и $132,14 \pm 0,39\%$ ($n=8$, $p<0,05$) соответственно. На фоне повышенной концентрации H_2O_2 стимулирующее влияние ФМА на $K^+(Ca^{2+})$ -каналы сохранялось: амплитуда и скорость развития ГО оставались увеличенными.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что в эритроцитах АФК, в частности, H_2O_2 , регулируют сигнальный каскад, опосредованный α_1 -адренэргическими рецепторами, реализуя свое действие, скорее всего, через модуляцию активности протеинкиназы С. Результатом является увеличение Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости.

Влияние оксида азота на Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов

Для изучения влияния оксида азота в экспериментальной практике широко используются нитросоединения – доноры NO. В проведенных экспериментах был применен нитропруссид натрия (НП) [Ignarro L., 1987].

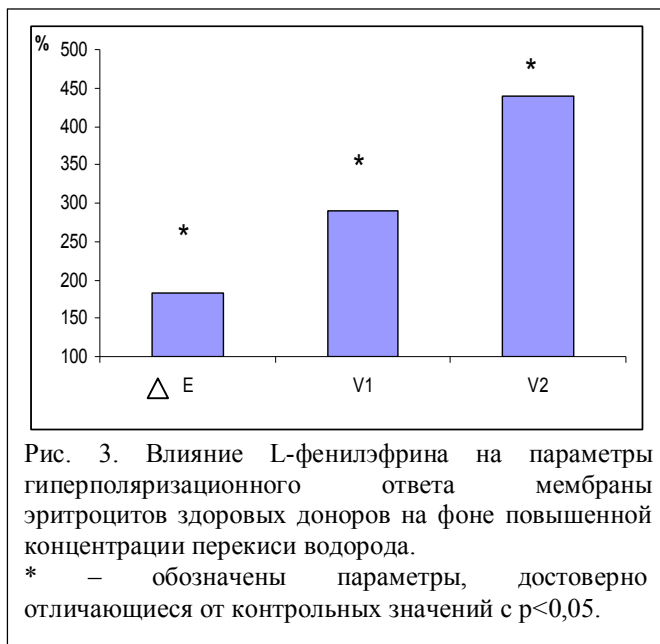


Рис. 3. Влияние L-фенилэфрина на параметры гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов здоровых доноров на фоне повышенной концентрации перекиси водорода.
* – обозначены параметры, достоверно отличающиеся от контрольных значений с $p<0,05$.

Добавление в среду инкубации эритроцитов НП в концентрациях от 10^{-8} до 10^{-6} М не вызывало изменений амплитуды гиперполяризационного ответа (ГО) эритроцитов (рис. 4).

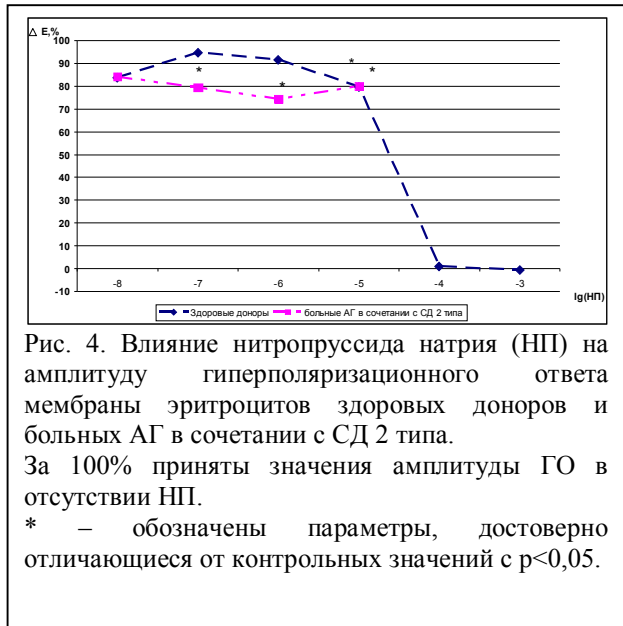


Рис. 4. Влияние нитропруссид натрия (НП) на амплитуду гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов здоровых доноров и больных АГ в сочетании с СД 2 типа. За 100% приняты значения амплитуды ГО в отсутствии НП.
* — обозначены параметры, достоверно отличающиеся от контрольных значений с $p < 0,05$.

Добавление 10^{-5} М НП к среде инкубации эритроцитов приводило к снижению амплитуды ГО на $20,5 \pm 0,84\%$ ($n=6$, $p < 0,05$) (рис. 4). Кроме того, уменьшались и скорость развития ГО (V_1), и скорость восстановления МП (V_2). Эти параметры составили $42,0 \pm 0,49\%$ ($n=6$, $p < 0,05$) и $87,0 \pm 0,04\%$ ($n=6$, $p < 0,05$), соответственно. При увеличении концентрации НП в среде инкубации до 10^{-4} - 10^{-3} М ГО эритроцитов получить не удалось.

Имеется множество данных о стимуляции НП калиевой проводимости мембраны ряда клеток, в первую очередь,

гладкомышечных. Каковы же причины неожиданного влияния НП на $K^+(Ca^{2+})$ -каналы мембраны эритроцитов?

Следует отметить, что относительно донорной способности НП не существует единой точки зрения. Некоторые авторы считают, что НП спонтанно освобождает оксид азота [Ignarro L.J. et al., 2002], который легко проникает внутрь клеток и оказывает свое регуляторное действие. Согласно другой точке зрения, НП подвергается изменениям, в которых участвует мембраносвязанная НАДН-дегидрогеназа [Mohazzab-N. K. M., et al., 1999]. Кроме того, НП освобождает не только NO, но и ионы ферроцианида и феррицианида [Pasch T. et al., 1983; Солнцева Е.И. с соавт, 2009; Lockwood A. et al., 2010], которые вмешиваются в процессы переноса электронов посредством фрагментов электронно-транспортной цепи (НАДН-дегидрогеназа, цитохром с), имеющих на мембране эритроцитов [Kennet E., Philip W., 2003]. В ряде работ продемонстрировано, что звенья этой цепи вмешиваются в регуляцию Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости [Alvarez J. et al., 1984; 1992].

Возможно, полученные эффекты НП обусловлены не только NO, но и другими продуктами его диссоциации.

Чтобы избежать NO-независимых эффектов НП, 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 [Kleinbongard P. et al., 2005; Suhr F. et al., 2009]. В ряде работ показано, что увеличение концентрации L-аргинина приводит к увеличенной продукции NO [Chen L.Y., Mehta J.L., 1998; Nameda Y. et al., 1996; Дмитриенко Н.П., 2008].

Инкубация эритроцитов с L-аргинином (10^{-6} М) вызывала достоверное повышение как амплитуды, так и скорости развития ГО эритроцитов. ΔE увеличился до $124 \pm 1,26$ % ($n=9$, $p<0,05$), а V_1 – до $113 \pm 0,2$ % ($n=5$, $p<0,05$) (рис.5). Скорость восстановления МП эритроцитов не изменилась и составила $100,67 \pm 0,05$ % ($n=6$).

Ингибирование NO-синтазы с помощью L-NMMA ($24 \cdot 10^{-5}$ М) снижало амплитуду ГО до $85,1 \pm 2,26$ % ($n=9$, $p<0,05$) (рис. 5).

Таким образом, в проведенных экспериментах установлено, что внутриклеточная продукция NO увеличивает 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 [Caramelo C. et al., 1994].

В работах по изучению участия NO в регуляции Na^+/H^+ -обмена и K^+ -Cl⁻-котранспорта эритроцитов показан цГМФ-зависимый эффект оксида азота [Petrov V, Lijnen P., 1996; Adragna N.C., Lauf P.K., 1998; Adragna N.C. et al., 2000].

Для выяснения цГМФ-зависимого действия оксида азота обычно применяют ингибитор растворимой гуанилатциклазы – метиленовый синий [Реутов В.П., 1994; Drewett J., 1994]. Однако, предварительные эксперименты показали, что метиленовый синий сам изменяет параметры ГО: в концентрации 10^{-6} М он

увеличивает амплитуду и скорость развития ГО, что свидетельствует о его влиянии на Ca^{2+} -активируемую калиевую проницаемость эритроцитов. Имеются данные о прямом влиянии метиленового синего на Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы высокой проводимости [Stockand J.D., Sansom S.C., 1996].

В связи с этим были проведены эксперименты с агентами, увеличивающими внутриклеточную концентрацию цГМФ: дибутирил-цГМФ (10^{-4} М) – проникающим в клетки аналогом цГМФ и ингибиторами фосфодиэстераз: изобутилметилксантином (10^{-4} М) и

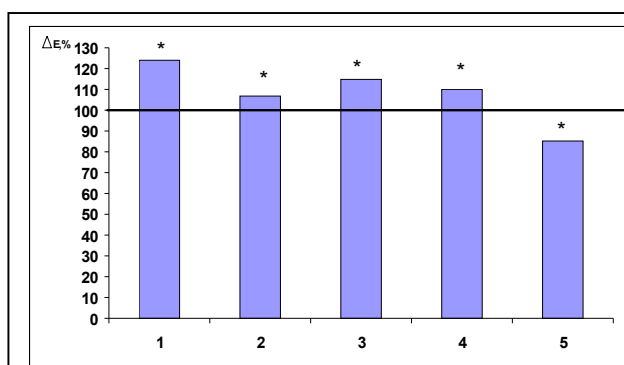


Рис. 5. Влияние L-аргинина (1), дибутирил-цГМФ (2), изобутилметилксантина (3), запринаста(4) и L-NMMA(5) на амплитуду гиперполяризационного ответа (ГО) мембраны эритроцитов здоровых доноров.

За 100% принимались контрольные значения амплитуды ГО без добавления агентов.

* – обозначены параметры, достоверно отличающиеся от контрольных значений с $p<0,05$.

запринастом (10^{-4} М). Инкубация эритроцитов со всеми перечисленными веществами приводила к повышению амплитуды ГО на $7,14 \pm 0,76$ % ($n=6$, $p<0,05$), $15,03 \pm 2,17$ % ($n=6$, $p<0,05$) и $10,14 \pm 2,51$ % ($n=6$, $p<0,05$), соответственно (рис. 5).

Скорость развития ГО достоверно увеличивалась при действии изобутилметилксантина, запринаста и составляла $132 \pm 0,39$ % ($n=6$, $p<0,05$) и $114,52 \pm 0,25$ % ($n=6$, $p<0,05$), соответственно. Оказалось, что L-аргинин,

дибутирил-цГМФ и ингибиторы ФДЭ действуют однонаправлено, увеличивая активность Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов, что позволяет предположить наличие цГМФ-опосредованного действия оксида азота на каналы.

Таким образом, в настоящем исследовании обнаружено, что донор оксида азота НП в концентрациях выше 10^{-5} М снижает Ca^{2+} -зависимую K^{+} -проницаемость эритроцитов, возможно, из-за развития некоторых побочных эффектов. Предукурор NO L-аргинин увеличивает Ca^{2+} -зависимую K^{+} -проницаемость мембраны эритроцитов. К такому же эффекту приводит и увеличение внутриклеточной концентрации цГМФ.

Вклад Ca^{2+} -зависимой K^{+} -проницаемости и модулирующих ее агентов в деформируемость эритроцитов здоровых доноров

Эритроциты вносят существенный вклад в реологические свойства крови, что во многом определяется их способностью обратимо изменять форму. Известно, что увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, кроме активации $\text{K}^{+}(\text{Ca}^{2+})$ -каналов ведет к снижению деформируемости красных клеток крови. Не исключено, что этот эффект обусловлен повышением Ca^{2+} -зависимой K^{+} -проницаемости мембраны. Для проверки этого предположения изучено влияние Ca^{2+} -зависимой K^{+} -проницаемости и АФК на деформируемость эритроцитов.

Деформируемость эритроцитов исследовалась методом лазерной эктацитометрии при скоростях сдвига 90, 180, 360 и 890 c^{-1} .

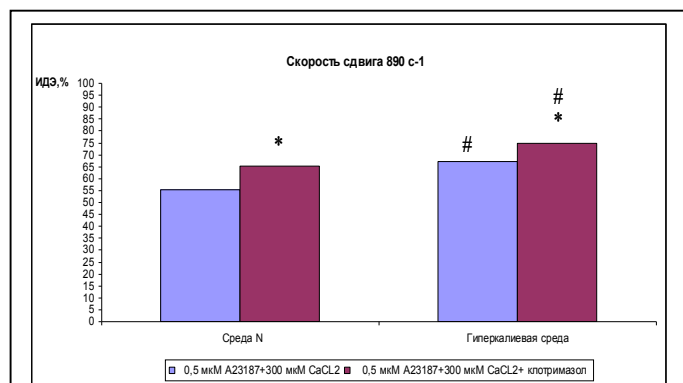


Рис. 6. Изменения деформируемости эритроцитов в различных средах при скорости сдвига 890 c^{-1} .

*- обозначены ИДЭ, достоверно отличающиеся от значений, полученных в отсутствие клотримазола с $p < 0,05$.

#- обозначены ИДЭ, достоверно отличающиеся от значений, полученных в отсутствие клотримазола в различных средах с $p < 0,05$.

Для необратимого увеличения Ca^{2+} -зависимой K^{+} -проницаемости эритроциты прединкубировали в среде N, содержащей $0,5 \text{ мкМ Са}^{2+}$ -ионофора А23187 и 300 мкМ СаСl_2 .

В этих условиях индекс деформируемости эритроцитов (ИДЭ) снижался до $70,27 \pm 0,2\%$ ($n=7$, $p < 0,05$), $57,54 \pm 1,26\%$ ($n=7$, $p < 0,05$), $50,59 \pm 0,40\%$ ($n=7$, $p < 0,05$) и $55,46 \pm 0,46\%$ ($n=7$, $p < 0,05$) при скоростях сдвига 90, 180, 360 и 890 c^{-1} , соответственно.

Одной из причин снижения деформируемости эритроцитов в этих условиях может быть активация Ca^{2+} -зависимой K^{+} -проницаемости.

Для проверки этого предположения был использован подход, связанный с прекращением выхода ионов калия из клеток: обработка эритроцитов блокатором $\text{K}^{+}(\text{Ca}^{2+})$ -каналов клотримазолом и/или прединкубация эритроцитов в гиперкалиевой среде. Внесение 2 мкМ клотримазола в среду инкубации

эритроцитов совместно с A23187 и 300 мкМ CaCl₂ приводило к достоверному увеличению ИДЭ на 17,18±0,7% (n=7, p<0,05), 16,52 ± 1,72% (n=7, p<0,05), 13,4 ± 0,8% (n=7, p<0,05) и 9,87 ± 0,89% (n=7, p<0,05), соответственно, при скоростях сдвига 90, 180, 360 и 890 с⁻¹ по сравнению со значениями, полученными в отсутствие блокатора (рис. 6). Инкубация эритроцитов в гиперкалиевой среде, содержащей 0,5 мкМ Ca²⁺-ионофора A23187 и 300 мкМ CaCl₂, также вызывала рост ИДЭ по сравнению со значениями, полученными в среде N. Его значения составили 74,08±0,84% (n=7, p<0,05), 63,05±0,11% (n=7, p<0,05), 69,48±0,23% (n=7, p<0,05) и 67,13±0,76% (n=7, p<0,05), соответственно, от контрольных значений. Совместное действие клотримазола и гиперкалиевой среды приводило к еще более выраженному увеличению ИДЭ. Однако полного восстановления деформируемости эритроцитов в этих условиях не происходило и при скоростях сдвига 90, 180, 360 и 890 с⁻¹ ИДЭ составил 90,61±0,06% (n=7, p<0,05), 78,0±2,16% (n=7, p<0,05), 71,58±1,83% (n=7, p<0,05) и 74,98±0,37% (n=7, p<0,05), соответственно, от контрольных значений (рис. 6).

Причина этого связана с тем, что увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, помимо открывания K⁺(Ca²⁺)-каналов, приводит к нарушению состояния белков мембранного каркаса, изменениям в липидном матриксе мембраны [Lang F. et al., 2004], что играет важную роль в деформируемости эритроцитов [Freedman J.C. et al., 1988; Weed R.I. et al., 1969].

Известно, что изменение транспорта ионов через эритроцитарную мембрану может приводить к изменению объема этих клеток [Орлов С.Н. с соавт., 1988]. Утечка ионов калия из клеток через K⁺(Ca²⁺)-каналы влечет за собой их дегидратацию и, следовательно, сжатие [Lang F. et al., 2003, 2004].

В настоящей работе спектрофотометрическим методом было показано сжатие эритроцитов в условиях активации Ca²⁺-зависимой K⁺-проницаемости, которое устранялось при добавлении блокатора каналов клотримазола.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об определенном вкладе Ca²⁺-зависимой K⁺-проницаемости в деформируемость эритроцитов. Одной из причин снижения деформируемости эритроцитов в этих условиях может являться сжатие клеток.

Добавление аминотриазола к среде инкубации эритроцитов повышало ИДЭ относительно контрольных значений на 8,11±0,77% (n=8), 30,69±2,97% (n=8, p<0,05), 18,9±7,33% (n=8, p<0,05) и 5,40±2,85% (n=8) при всех выбранных скоростях сдвига. Возможно, эффект связан со снижением Ca²⁺-зависимой K⁺-проницаемости в условиях повышения внутриклеточной продукции перекиси водорода, что было обнаружено в настоящем исследовании.

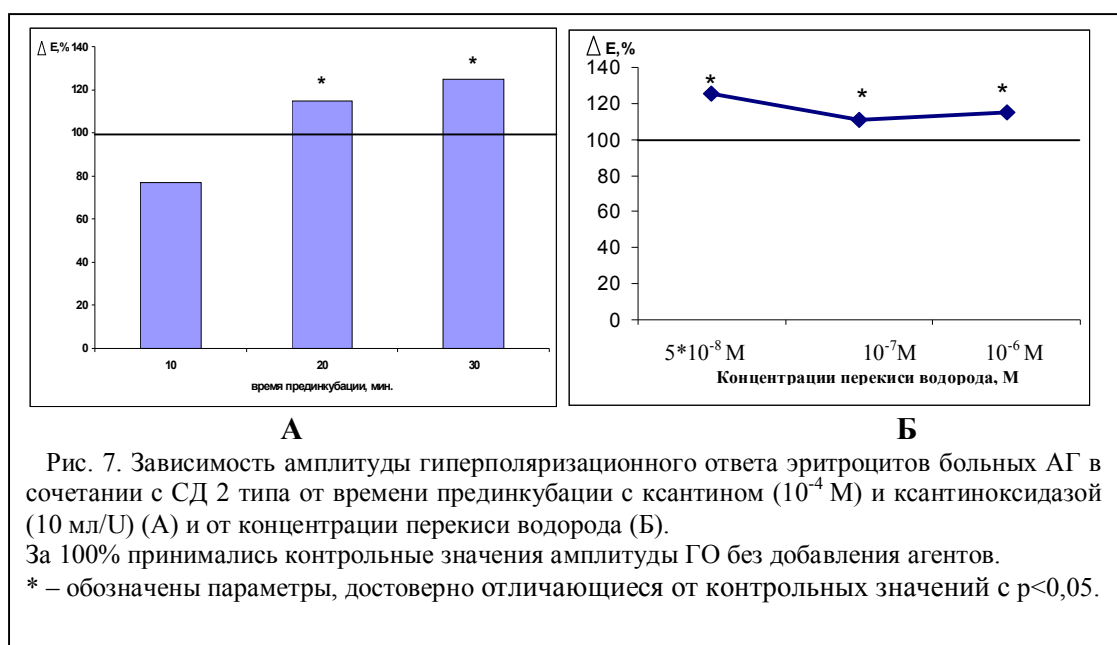
Влияние активных форм кислорода на Ca²⁺-зависимую K⁺-проницаемость мембраны эритроцитов больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа

Многие патологические состояния, в том числе артериальная гипертензия и сахарный диабет 2 типа, сопровождаются развитием окислительного стресса, нарушениями метаболизма оксида азота [Baynes J.W., 1991; De Mattia G. et al., 1998] и снижением деформируемости эритроцитов [McMillan D.E. et al., 1978; Fujita J. et al., 1996; Miossec P. et al., 1999].

В одинаковых условиях стимуляции Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости амплитуда ГО эритроцитов больных АГ в сочетании с СД 2 типа достоверно снижена по сравнению со здоровыми донорами и составляет $84,35 \pm 4,33\%$ ($n=8$, $p < 0,05$). Возможная причина этого эффекта - повышенная концентрация ионов кальция в цитоплазме эритроцитов у исследованной категории больных [Fujita J. et al., 1996]. Одинаковая добавка Ca^{2+} приводит к меньшему ответу в условиях повышенной внутриклеточной концентрации ионов кальция. Это может быть связано со снижением чувствительности каналов к Ca^{2+} у больных АГ в сочетании с СД 2 типа.

Прединкубация эритроцитов больных с ксантином (10^{-4} М) и ксантинооксидазой (10 мU/мл) в течение 10 минут не изменяла амплитуду и скорость развития ГО, но достоверно увеличивала скорость восстановления МП: этот параметр составил $124,84 \pm 0,19\%$ ($n=9$, $p < 0,05$), что свидетельствует о возрастании активности Ca^{2+} -АТФазы.

Увеличение продолжительности инкубации эритроцитов с ксантином и ксантинооксидазой до 20 и 30 минут привело к росту амплитуды ГО до $114,8 \pm 6,14\%$ ($n=9$, $p < 0,05$) и $124,58 \pm 4,38\%$ ($n=9$, $p < 0,05$), соответственно (рис. 7.А), в то время как у здоровых доноров в этих условиях наблюдалось снижение исследуемого параметра.



Влияние перекиси водорода на параметры ГО эритроцитов больных также отличалось от результатов, полученных для здоровых доноров. Так, параметр ΔE достоверно увеличивался до $125,78 \pm 2,73\%$ ($n=7$, $p < 0,05$), $111,15 \pm 3,42\%$ ($n=7$, $p < 0,05$) и $114,94 \pm 2,05\%$ ($n=7$, $p < 0,05$), соответственно при добавлении $5 \cdot 10^{-8}$, 10^{-7} и 10^{-6} М H_2O_2 (рис. 7.Б), тогда как у здоровых доноров наблюдалось снижение

амплитуды ГО при этих же концентрациях перекиси водорода, но только в условиях предобработки эритроцитов ингибитором каталазы.

Стимуляция α_1 -адренэргических рецепторов эритроцитов больных L-фенилэфрином не приводила к изменению параметров ГО. Активатор протеинкиназы С ФМА также не изменял параметры ГО эритроцитов больных АГ в сочетании с СД 2 типа. Отсутствие влияния L-фенилэфрина и ФМА на $K^+(Ca^{2+})$ -каналы эритроцитов больных АГ в сочетании с СД 2 типа может быть связано с тем, что у этой категории больных активность протеинкиназы С изначально повышена [Александровский Я.А., 1998].

Совместное действие H_2O_2 и L-фенилэфрина вызывало повышение амплитуды и скорости развития ГО эритроцитов до $187,72 \pm 22,39\%$ ($n=6$, $p<0,05$) и $245,78 \pm 25,27\%$ ($n=6$, $p<0,05$), соответственно. Скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов в описанных условиях также возрастала до $388,89 \pm 63,19\%$ ($n=6$, $p<0,05$).

Аналогичный эффект наблюдался и при действии ФМА на фоне повышенной концентрации H_2O_2 . Так, амплитуда ГО возрастала до $128,56 \pm 13,61\%$ ($n=7$, $p<0,05$), а скорость развития ГО – до $113,64 \pm 6,35\%$ ($n=7$, $p<0,05$). Скорость восстановления МП эритроцитов в этих условиях достоверно не изменялась.

Инкубация эритроцитов больных в присутствии 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} М НП достоверно снижала амплитуду ГО ответа эритроцитов. Этот параметр составил $79,47 \pm 11,01\%$ ($n=6$, $p<0,05$), $74,39 \pm 8,47\%$ ($n=6$, $p<0,05$) и $80,09 \pm 4,26\%$ ($n=6$, $p<0,05$), соответственно (рис. 4). Скорость развития ГО и скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов больных АГ в сочетании с СД 2 типа в присутствии НП достоверно не изменялись. Таким образом, эффекты НП оказались однонаправленными и у больных, и у здоровых доноров. Однако у больных снижение амплитуды ГО эритроцитов под воздействием НП происходило уже при концентрации 10^{-7} М и последующее увеличение концентрации донора NO не приводило к дальнейшим изменениям этого параметра.

В условиях дисбаланса про- и антиоксидантных систем эритроцитов [Ефимов А.С., Науменко В.Г., 1985; Waynes J.W., 1991; De Mattia G. et al., 1998], усиления перекисного окисления липидов [Максимов О.В., Солун М.Н., 1989], увеличения степени гликозилирования не только гемоглобина, но и белков мембранного каркаса [Schwartz R.S. et al., 1991; Mahindrakar Y. S, et al., 2007], отмечаемых у больных АГ в сочетании с СД 2 типа, изменение Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны клеток будет являться дополнительным весьма неблагоприятным фактором, ведущим к дальнейшему снижению деформируемости эритроцитов.

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что регуляция активными формами кислорода $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов больных АГ в сочетании с СД 2 типа существенно изменена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

$K^+(Ca^{2+})$ -каналы играют важную роль в функционировании эритроцита, в частности, участвуя в изменении объема клеток, а также в процессе эриптоза. В настоящем исследовании установлено, что, кроме этого, Ca^{2+} -зависимая K^+ -проницаемость мембраны вносит существенный вклад в регуляцию деформируемости красных клеток крови: увеличение в среде инкубации ионов кальция снижает индекс деформируемости эритроцитов, что частично устраняется блокатором каналов клотримазолом или прединкубацией в гиперкалиевой среде. Одной из причин снижения деформируемости эритроцитов при активации $K^+(Ca^{2+})$ -каналов может быть дегидратация клеток вследствие утечки ионов калия и их сжатие, что подтверждено спектрофотометрическими исследованиями.

Известно, что на деформируемость эритроцитов, эриптоз оказывают воздействие активные формы кислорода, в частности, оксид азота. В связи с этим важным представляется исследование функционирования $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов в условиях повышенной концентрации АФК, тем более, что они могут выступать в роли либо регуляторов, либо повреждающих факторов.

В настоящем исследовании установлено, что АФК, в том числе перекись водорода и NO вмешиваются в регуляцию $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов.

Увеличение внутриклеточной концентрации перекиси водорода с помощью ингибирования каталазы приводит к снижению Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости, но к повышению активности Ca^{2+} -насоса мембраны эритроцитов здоровых доноров. Ранее было установлено, что Ca^{2+} -АТФаза вносит существенный вклад в формирование ГО эритроцитов [Орлов С.Н. с соавт., 1992] и увеличение ее активности приводит к снижению амплитуды ГО. С другой стороны, мишенями для перекиси водорода, являются сульфгидрильные группы белковых молекул, в том числе и белков каналов [Быстрова М.Ф и Буданова Е.Н., 2007]. Возможно, обнаруженное снижение Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости эритроцитов здоровых доноров под действием перекиси водорода можно рассматривать как защитную реакцию, препятствующую преждевременной гибели клеток и снижению их деформируемости в условиях повышенной продукции АФК.

В эритроцитах больных, напротив, при увеличении содержания перекиси водорода отмечается повышение Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны клеток. Это должно способствовать дальнейшему снижению деформируемости эритроцитов и сокращению времени их жизни, что отмечается при патологиях, объединенных развитием окислительного стресса.

В проведенном исследовании выяснилось, что применение нитропрусида натрия для изучения NO-зависимой регуляции $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов вызывает ряд затруднений. Это связано с тем, что при увеличении его концентрации развиваются побочные NO-независимые эффекты, по-видимому,

маскирующие действие самого оксида азота. В связи с этим в качестве источника оксида азота был использован L-аргинин – субстрат для NO-синтазы. Выяснилось, что NO увеличивал активность $K^+(Ca^{2+})$ -каналов здоровых доноров. Свое действие на Ca^{2+} -активируемую калиевую проницаемость эритроцитов NO, как и в других клетках, по-видимому, реализует цГМФ-зависимым способом. Это подтверждается полученными данными об однонаправленном действии на $K^+(Ca^{2+})$ -каналы L-аргинина, дибутирил-цГМФ и ингибиторов ФДЭ.

Таким образом, АФК модулируют активность $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов как здоровых доноров, так и больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа. Эффекты исследованных АФК оказались во многом противоположными для $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов больных по сравнению со здоровыми донорами. Окислительный стресс, развивающийся при данной патологии, приводит к существенным изменениям регуляции $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов.

ВЫВОДЫ

1. Повышение внутриклеточной концентрации перекиси водорода снижает, а оксида азота увеличивает Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров. Супероксид-анион при его действии с наружной стороны мембраны, не изменяет активность Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов эритроцитов здоровых доноров и больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа.

2. Совместное действие перекиси водорода и агониста α_1 -адренэргических рецепторов L-фенилэфрина значительно увеличивает Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров.

3. Стимуляция Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости снижает деформируемость эритроцитов здоровых доноров, что сопровождается уменьшением объема клеток.

4. Под действием перекиси водорода Ca^{2+} -зависимая K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа возрастает.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Роль активных форм кислорода в регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов / О.А. Трубачева // Всероссийская 66-ая юбилейная студенческая научная конференция им. Н.И. Пирогова: сборник статей. – Томск: СибГМУ, 2007. – С.363–364.

2. Исследование влияния фенилэфрина гидрохлорида на Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов здоровых доноров и больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2-го типа / О.А. Трубачева, А.В. Ситожевский, С.В. Кремено, О.В. Груздева, И.В. Петрова // 2 съезд кар-

Отформатировано: Шрифт:
8 пт

диологов сибирского федерального округа: материалы научной конференции. – Томск, 2007. – С. 121-122.

3. Исследование влияния метаболитов системы ксантин-ксантинооксидаза на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров / О.А. Трубачева, С.В. Кремено, А.В. Ситожевский, И.В. Петрова, О.В. Груздева, В.В. Иванов // III Всероссийская научно-практическая конференции с международным участием “Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов”. – Новосибирск, 2007. – №7 (62). – С. 50.

4. Внутриклеточные механизмы реализации эффектов оксида азота на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией / О.А. Трубачева, С.В. Кремено, О.В. Груздева, И.В. Рогачевская // Наука о человеке: материалы IX конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск: СибГМУ, 2008. – С. 94.

5. Вклад активных форм кислорода в регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов человека / О.А. Трубачева, А.В. Ситожевский, С.В. Кремено, О.В. Груздева, И.В. Петрова, В.В. Иванов // VI Сибирский физиологический съезд. Тезисы докладов. – Барнаул: Принтэкспресс, 2008. – С. 16-17.

6. Влияние нитропруссид натрия на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость эритроцитов больных с сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией / О.А. Трубачева, С.В. Кремено, О.В. Груздева, И.В. Рогачевская // Актуальные проблемы современной эндокринологии: материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. – Москва, 2008. – С. 35.

7. Регуляция Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны: роль протеинкиназы C / О.А. Трубачева, О.Н. Насанова, С.В. Кремено, О.В. Груздева // XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов”: материалы докладов. – Москва, 2009. – С.40.

8. Участие мембранных редокс-процессов и активированных кислородных метаболитов в регуляции Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов здоровых доноров и больных с сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией / О.А. Трубачева, С.В. Кремено, О.В. Груздева // Наука о человеке: материалы X конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск: СибГМУ, 2009. – С. 87-88.

9. Влияние перекиси водорода и форболового эфира на $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы эритроцитов больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа / О.А. Трубачева, С.В. Кремено, О.В. Груздева, И.В. Рогачевская // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: материалы 64-й всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Екатеринбург, 2009. – С. 577-578.

10. Участие активных форм кислорода в регуляции Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов эритроцитов / О.А. Трубачева, С.В. Кремено, И.В. Петрова,

А.В. Ситожевский, О.В. Груздева, В.В. Иванов, Т.Е. Сулова // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2009. – №2. – С. 56-60.

11. Оксид азота – регулятор Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов человека / О.А. Трубачева, И.В. Рогачевская, С.В. Кремено, О.В. Груздева // Бюллетень северного государственного медицинского университета № 1 (XXII). – Архангельск, 2009. – С. 236.

12. Вклад протеинкиназы С в регуляцию Ca^{2+} -зависимой K^+ проницаемости мембраны эритроцитов у больных АГ в сочетании с СД 2 типа/ О.А. Трубачева, О.Н. Насанова, С.В. Кремено, О.В. Груздева // Западские чтения: материалы IV научно-практической конференции молодых учёных с международным участием. – Ростов-на-Дону, 2009. – С. 123-124.

13. Оксид азота как регулятор Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов здоровых доноров/ О.А. Трубачева, С.В. Кремено, А.В. Ситожевский, Т.Е. Сулова // Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии: материалы научной конференции. – Томск, 2009. – С. 98-100.

14. Изучение влияния донаторов на Ca^{2+} -зависимую калиевую проводимость мембраны и способность к деформируемости эритроцитов человека / О.А. Трубачева, А.С. Васильев // IV Международная научная конференция молодых ученых-медиков: материалы научной конференции.– Курск, 2010. – Т.2. – С. 269-271.

15. Влияние донатора оксида азота – нитропруссид натрия и пероксида водорода на Ca^{2+} -зависимую K^+ - проницаемость мембраны эритроцитов у больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа / О.А. Трубачева, О.Н. Насанова, И.В. Петрова, Т.Е. Сулова, А.В. Ситожевский, С.В. Кремено // Сибирский медицинский журнал: материалы научной конференции. – Томск. – 2010. – Т.25, №2. – С. 146.

16. Регуляция Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов: роль оксида азота и пероксида водорода / И.В. Петрова, О.А. Трубачева, А.В. Ситожевский, Т.Е. Сулова, С.В. Кремено // XXI Съезд Физиологического общества им. И.П.Павлова. – Калуга, 2010. –С. 477.

17. Влияние активных форм кислорода на Ca^{2+} -активируемую K^+ -проницаемость эритроцитов больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2 типа / О.А. Трубачева // **Сибирский медицинский журнал**. – Томск. – 2011. – Т.26, №1. – С. 118-122.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия	O_2^- – супероксид-анион
АФК – активные формы кислорода	СД 2 типа – сахарный диабет 2 типа
ГО – гиперполяризационный ответ	ПК С – протеинкиназа С
ГЦ – гуанилатциклаза	ФЭ – фенилэфрин
ИДЭ – индекс деформируемости эритроцитов	ФДЭ – фосфодиэстераза
$K^+(Ca^{2+})$ -канал – кальций	ФМА – форбол-меристат-ацетат
активируемый калиевый канал	- цГМФ – циклический 3:5-гуанозин-монофосфат
МН – мембранный потенциал	NO – оксид азота
НП – нитропруссид натрия	L-NMMA – N-monomethyl-l-arginine
H_2O_2 – перекись водорода	

Отформатировано:
английский (США)

Удалено: ¶

¶
¶
¶
¶

Отформатировано:
английский (США)

Удалено: ¶

¶
¶

Отформатировано: Шрифт:
14 пт, английский (США)

Отформатировано: Шрифт:
14 пт

Удалено:

Отформатировано: Шрифт:
14 пт

Удалено:

Отформатировано: Шрифт:
14 пт

Автор выражает благодарность директору ГУ НИИ кардиологии Сибирского отделения РАМН, академику РАМН Р.С. Карпову; руководителю клинко-диагностической лаборатории в.н.с., к.м.н. Т.Е. Суловой; н.с., к.м.н. А.В. Ситожевскому; лаборатории фармакологии кровообращения НИИ Фармакологии СО РАМН профессору, д.б.н. М.Б. Плотникову; н.с., д.м.н. О.И. Алиеву; н.с. А.С. Васильеву; к.б.н., доценту кафедры биохимии и молекулярной биологии В.В. Иванову; н.с. лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Учреждения РАМН НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний Сибирского отделения РАМН, к.м.н. С.В. Кремено за оказанное содействие в проведении настоящего исследования.

Подписано в печать 17.05.2011 г.
Усл. печ. листов 0.65 Печать на ризографе.
Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии ГОУ ВПО Сиб ГМУ
634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел. 53-04-08
Заказ № 199. Тираж 100 экземпляров