

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА РЕГУЛЯЦИЮ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ K^+ -ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ, ОПОСРЕДОВАННУЮ АДРЕНЕРГИЧЕСКИМИ РЕЦЕПТОРАМИ

Трубачева О.А.¹, Петрова И.В.², Суслова Т.Е.¹

¹ ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН (634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а)

² ГБОУ ВПО «СибГМУ» Минздрава России, Томск, Россия (634050, г. Томск, Московский тракт, 2), e-mail: otrubacheva@inbox.ru

В настоящем исследовании изучено влияние перекиси водорода на Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов в условиях стимуляции α_1 -адренергических рецепторов. Установлено, что при повышении внутриклеточной концентрации перекиси водорода вследствие ингибирования каталазы Ca^{2+} -зависимая K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов снижается. Кроме того, в этих условиях увеличивается деформируемость красных клеток крови. Совместное действие перекиси водорода и агониста α_1 -адренергических рецепторов L-фенилэфрина либо перекиси водорода и стимулятора протеинкиназы C форболового эфира значительно увеличивает Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров. Полученные данные позволяют предположить, что увеличение внутриклеточной концентрации перекиси водорода оказывает воздействие на компоненты регуляторного каскада, опосредованного α_1 -адренергическими рецепторами, в частности, модулирует активность протеинкиназы C, что ведет к увеличению Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны.

Ключевые слова: эритроциты, Ca^{2+} -зависимая K^+ -проницаемость, адренергические рецепторы, перекись водорода, деформируемость.

EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE IN THE REGULATION OF Ca^{2+} -DEPENDENT K^+ -PERMEABILITY OF ERYTHROCYTE, MEDIATED BY ADRENERGIC RECEPTORS

Trubacheva¹ O.A., Petrova² I.V., Suslova¹ T.E.

¹ FGBU "Research Institute of Cardiology" RAMS (634012, Tomsk, st. Kiev, 111a),

² GER GBOU SSMU Health Ministry of Russia (634050, Tomsk, Moscow highway, 2), Tomsk, Russia, e-mail: otrubacheva@inbox.ru

The present study investigated the effect of hydrogen peroxide on the Ca^{2+} -dependent K^+ permeability of the membrane of red blood cells in a stimulation of α_1 -adrenergic receptors. It is established that an increase in the intracellular concentration of hydrogen peroxide by catalase inhibition of Ca^{2+} -dependent K^+ permeability of the membrane of red blood cells is reduced. In addition, in these conditions the deformability of red blood cells. The combined effect of hydrogen peroxide and an agonist of α_1 -adrenergic receptors of L-phenylephrine, or hydrogen peroxide and a stimulator of protein kinase C phorbol ester increases the Ca^{2+} -dependent K^+ permeability of the membrane of red blood cells from healthy donors. These data suggest that increasing the intracellular concentration of hydrogen peroxide affects the components of a regulatory cascade mediated by α_1 -adrenergic receptors, in particular, modulates the activity of protein kinase C, which leads to an increase in Ca^{2+} -dependent K^+ permeability of the membrane.

Key words: red blood cells, Ca^{2+} -dependent K^+ permeability, adrenergic receptors, hydrogen peroxide, the deformability.

Введение

В последнее время все чаще появляются работы, в которых активные формы кислорода (АФК) рассматриваются в качестве регуляторов внутриклеточных процессов. АФК либо сами выступают в роли вторичных посредников [1], либо модулируют действие известных регуляторных каскадов клетки [9]. Ряд регуляторных путей связан с влиянием АФК на ионтранспортные системы клеток.

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 эритроциты 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 – программируемую гибель клеток [10], изменение объема клеток [4]. Доказано их участие в деформируемости клеток: Ca^{2+} -индуцируемое снижение деформируемости эритроцитов устраняется при выравнивании градиента ионов калия или при применении блокатора каналов клотримазола [4].

Регуляция $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов осуществляется несколькими путями. Один из них связан с вторичными посредниками, эффект которых реализуется через воздействие на протеинкиназу А или С [8].

В эритроцитах постоянно происходит образование АФК, которые влияют на регуляторные пути этих клеток [5]. Кроме того, в процессе своего функционирования эритроциты подвергаются действию АФК, продуцируемых другими клетками: эндотелиоцитами, иммунокомпетентными клетками во время так называемого кислородного взрыва. Однако данные об участии перекиси водорода в регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов человека немногочисленны.

В связи с вышесказанным представляется весьма актуальным изучение роли АФК в регуляции $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов. Цель исследования – оценить влияние и механизм действия перекиси водорода на регуляцию Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов здоровых доноров в условиях стимуляции α_1 -адренергических рецепторов.

Материал и методы

В работе использовалась кровь здоровых доноров (27 человек). Кровь забиралась из локтевой вены утром натощак в пробирки с гепарином (25 ед/мл крови). После центрифугирования (1000 g, 5 мин, 4 °С) плазму и клетки белой крови удаляли, а эритроциты дважды промывали 3 частями изотонического раствора NaCl (150 мМ), содержащего 5 мМ Na-фосфатный буфер (рН 7,4) при тех же условиях центрифугирования.

Для исследования $K^+(Ca^{2+})$ -каналов был применен метод регистрации мембранного потенциала в суспензии эритроцитов по изменениям рН среды инкубации в присутствии протонофора, основанный на том, что в этих условиях распределение протонов зависит от мембранного потенциала [2]. 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 $MgCl_2$, 10 мМ глюкозы и 10 мкМ $CaCl_2$, добавляли 0,25 мл упакованных эритроцитов. Через 5 мин инкубации при 37 °С и постоянном перемешивании добавляли протонофор СИССР до конечной концентрации 20 мкМ и спустя 2 мин 0,5 мкМ Ca^{2+} -ионофора А23187. Добавление кальциевого ионофора А23187 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. Защелачивание среды инкубации соответствовало гиперполяризации мембраны, а восстановление рН – возвращению мембранного потенциала (МП) к исходному значению. Амплитуда ГО и скорость его развития (V_1) характеризуют Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы, а скорость восстановления МП (V_2) – активность Ca^{2+} -АТФазы [2].

В ряде экспериментов среда инкубации клеток содержала $5 \cdot 10^{-8}$ М, 10^{-7} М и 10^{-6} М перекиси водорода (H_2O_2) либо 0,026 М ингибитора каталазы аминотриазола в присутствии соответствующих концентраций H_2O_2 . Стимуляцию α_1 -адренергических рецепторов эритроцитов проводили добавлением L-фенилэфрина гидрохлорида (10^{-8} М). Для активации протеинкиназы С был использован фоболовый эфир (phorbol 12-myristate-13-acetate) в концентрации 10^{-7} М, который добавлялся в среду инкубации эритроцитов. В качестве ингибитора протеинкиназы С использовался стауроспорин в концентрации 10^{-6} М.

Исследование деформируемости эритроцитов проводили методом лазерной эктацитометрии, основанной на явлении дифракции световых лучей при прохождении через тонкий слой жидкости с взвешенными в ней клетками [7]. 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, предынкубированных в среде N без добавления агентов, принимали за 100%.

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. 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). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Добавление в среду инкубации эритроцитов $5 \cdot 10^{-8}$ М, 10^{-7} М и 10^{-6} М перекиси водорода не приводило к изменению параметров гиперполяризационного ответа мембраны. Обработка эритроцитов ингибитором каталазы аминотриазолом в присутствии выбранных концентраций перекиси водорода вызывала снижение амплитуды и скорости развития ГО, но при этом увеличивалась скорость восстановления мембранного потенциала.

Полученные данные свидетельствовали 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 . Показано, что в формировании

Ca²⁺-индуцированного ГО эритроцитов участвуют не только K⁺(Ca²⁺)-каналы, но и Ca²⁺-АТФаза: увеличение ее активности снижает амплитуду ГО эритроцитов [2]. Не исключено, что увеличение активности Ca²⁺-АТФазы под действием H₂O₂ приводило к описанному эффекту.

Известно, что активность ряда ферментов, являющихся участниками внутриклеточных регуляторных каскадов, таких как протеинкиназа С (ПК С), NO-синтаза, гуанилатциклаза и др., модулируются АФК [9]. Установлено, что внутриклеточные сигнальные системы участвуют в регуляции K⁺(Ca²⁺)-каналов эритроцитов [3; 8].

В связи с вышесказанным исследовалось влияние повышенной внутриклеточной концентрации перекиси водорода в условиях стимуляции α₁-адренергических рецепторов, которые присутствуют в мембране эритроцитов, на параметры ГО.

Ингибирование каталазы аминотриазолом в присутствии H₂O₂ и обработка эритроцитов L-фенилэфрином значительно увеличивало амплитуду ГО эритроцитов, которая составила 181,85±7,04% (n=7, p<0,05) (рис. 1). В этих условиях существенно увеличивалась и скорость гиперполяризации, и скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов. Эти параметры составили, соответственно, 290,45±20,46 % (n=7, p<0,05) и 440,28±0,56 % (n=7, p<0,05) по сравнению с контролем (рис. 1).

Стимуляция L-ФЭ α₁-адренергических рецепторов приводит к активации фосфолипазы С через G-белок. В результате этого образуются инозитол-1,4,5-трифосфат и диацилглицерол, который в присутствии фосфатидилсерина и Ca²⁺ активирует протеинкиназу С. Значительное увеличение параметров ГО в условиях ингибирования каталазы может быть связано с влиянием перекиси водорода на ключевой фермент регуляторного каскада, опосредованного α₁-адренергическими рецепторами, протеинкиназу С.

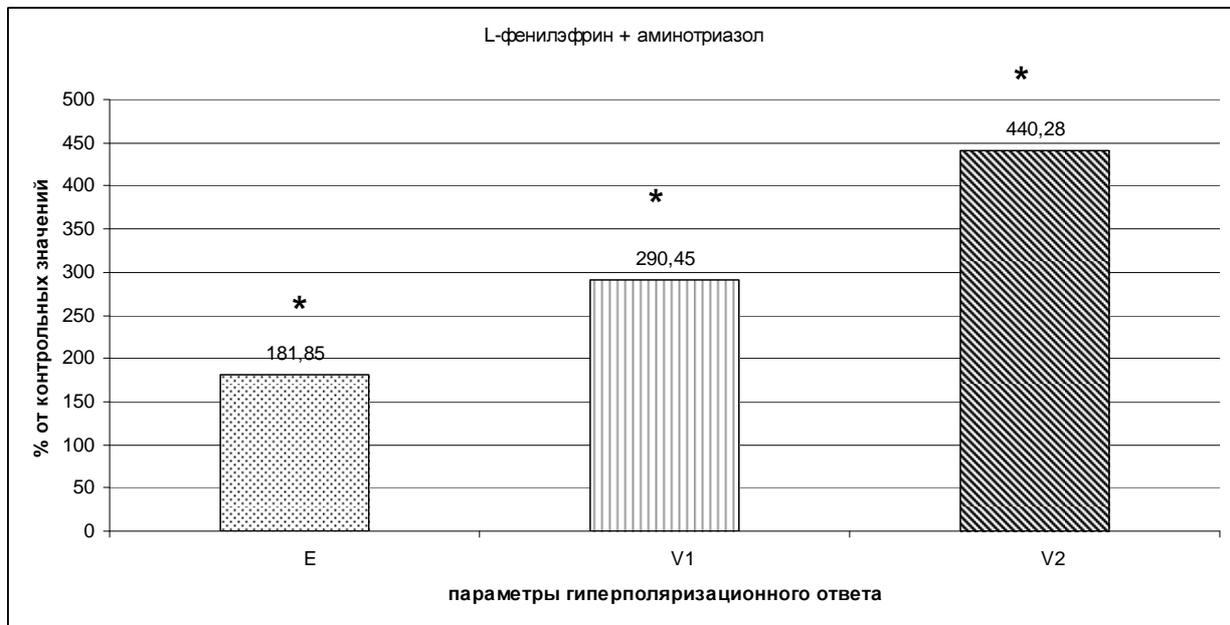


Рис. 1. Влияние L-фенилэфрина (10^{-8} М) в присутствии перекиси водорода (10^{-6} М) и аминотриазола (0,026 М) на параметры гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов.

Здесь и на рис. 2: E – амплитуда гиперполяризационного ответа; V1 – скорость развития гиперполяризационного ответа; V2 – скорость восстановления гиперполяризационного ответа. За 100% принимались значения гиперполяризационного ответа без добавления агентов.

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

В следующей серии экспериментов изучено влияние фобол-миристат-ацетата (ФМА) – активатора протеинкиназы С на параметры ГО эритроцитов в условиях ингибирования каталазы в присутствии H_2O_2 . В этих условиях достоверно повышались амплитуда ГО и скорость развития гиперполяризации мембраны эритроцитов до $141,01 \pm 12,37\%$ ($n=8$, $p < 0,05$) и до $125,31 \pm 0,41\%$ ($n=8$, $p < 0,05$) соответственно, по сравнению с контролем (рис. 2). Скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов достоверно не изменялась в присутствии использованных агентов. Обработка эритроцитов ингибитором протеинкиназы С стауроспорином устраняла полученные эффекты.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что увеличение внутриклеточной концентрации перекиси водорода оказывает воздействие на компоненты регуляторного каскада, опосредованного α_1 -адренергическими рецепторами. Известно, что в эритроцитах стимуляция ПК С вызывает увеличение входа ионов кальция, что ведет к активации $K^+(Ca^{2+})$ -каналов [6]. Возможно, в условиях повышения внутриклеточной концентрации H_2O_2 , увеличивается активность ПК С, стимулированной через α_1 -адренергические рецепторы либо ФМА, что ведет к повышенному входу ионов Ca^{2+} и, соответственно, к увеличению Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны эритроцитов, а также возрастанию активности Ca^{2+} -насоса.

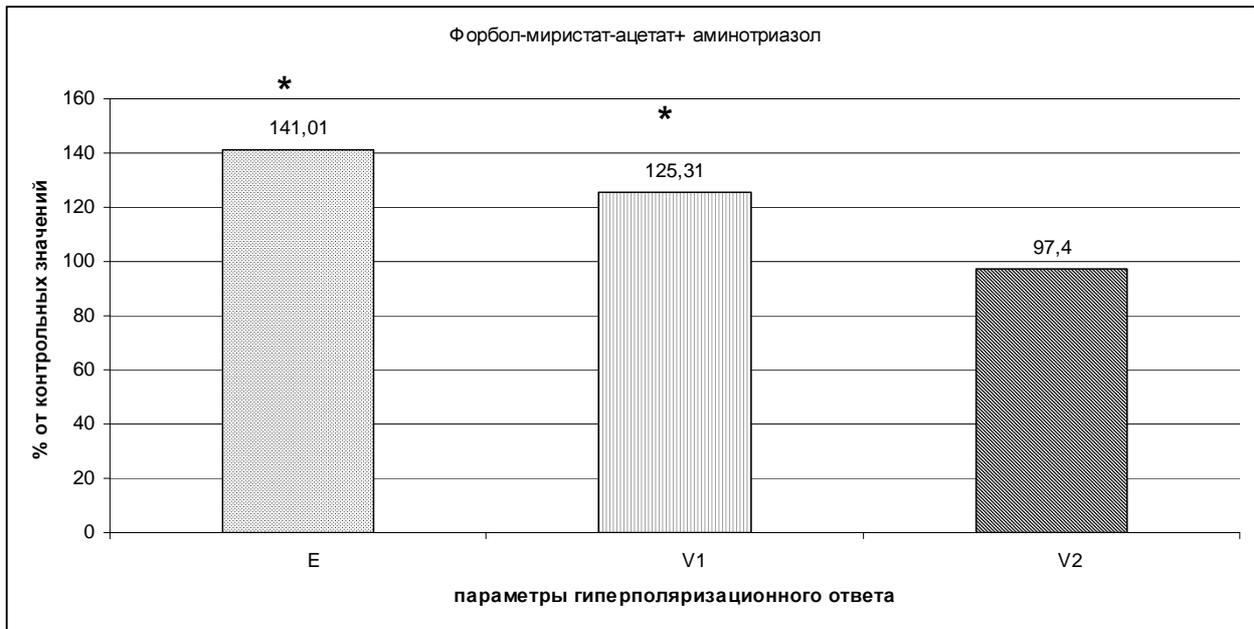


Рис. 2. Влияние формол-миристат-ацетата (10^{-7} М) в присутствии перекиси водорода (10^{-6} М) и аминотриазола (0,026 М) на параметры гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов.

За 100% принимались значения гиперполяризационного ответа без добавления агентов.

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

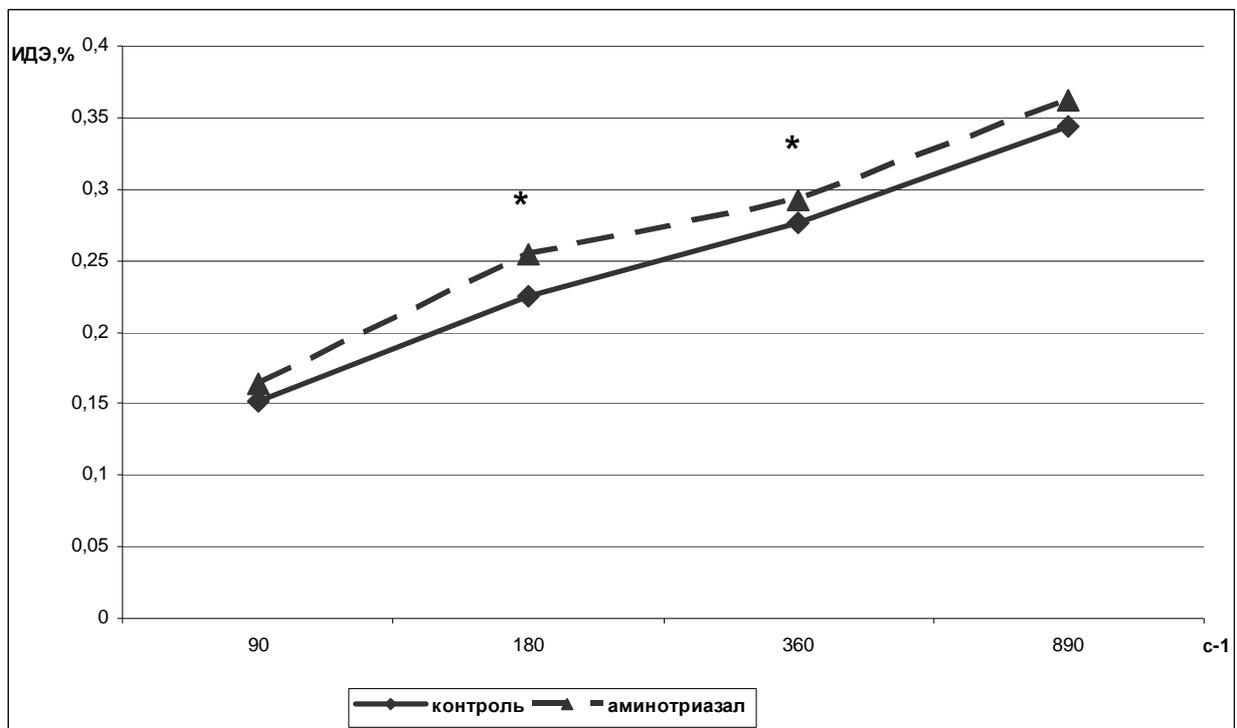


Рис. 3. Влияние аминотриазола (0,026 М) на индекс деформируемости эритроцитов. За 100% принимались значения без добавления агента.

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

Ранее в наших исследованиях было показано влияние повышенной Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны на деформируемость эритроцитов [4]. Поскольку в настоящем исследовании установлена регуляторная роль перекиси водорода на $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы, было изучено влияние этого агента на деформируемость эритроцитов.

С этой целью исследовано изменение деформируемости эритроцитов в присутствии аминотриазола при скоростях сдвига 90, 180, 360 и 890 c^{-1} . Добавление аминотриазола в среду инкубации эритроцитов повышало индекс деформируемости эритроцитов относительно контрольных значений при всех выбранных скоростях сдвига до $0,164 \pm 0,077\%$ ($n=8$), $0,2545 \pm 0,097\%$ ($n=8$, $p < 0,05$), $0,2929 \pm 0,033\%$ ($n=8$, $p < 0,05$) и $5,40 \pm 2,85\%$ ($n=8$) соответственно. Достоверно параметр увеличился при скорости сдвига 180 и 360 c^{-1} (рис. 3).

Не исключено, что полученные данные можно объяснить снижением Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости мембраны в условиях ингибирования каталазы.

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что ингибирование каталазы в присутствии перекиси водорода снижает Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов здоровых доноров. Это может быть одной из причин повышения способности эритроцитов деформироваться при ингибировании каталазы. В то же время стимуляция α_1 -адренергических рецепторов L-фенилэфрином либо активация протеинкиназы C посредством форболового эфира в присутствии ингибитора каталазы и перекиси водорода значительно увеличивают Ca^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость мембраны эритроцитов. Обнаруженный эффект, возможно, обусловлен влиянием перекиси водорода на протеинкиназу C либо другие звенья регуляторного каскада, опосредованного α_1 -адренергическими рецепторами.

Список литературы

1. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение) // Физиологические и клинико-биохимические аспекты. – СПб. : Медицинская пресса. – 2006. – 400 с.
2. 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 // Биол. мембраны. – 1992. – Т. 9. – № 9. – С. 885–903.
3. Петрова И.В. [и др.] Роль внутриклеточных сигнальных систем в регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1997. – Т. 124. – № 6. – С. 653-655.
4. Трубочева О.А. [и др.] Влияние повышенной Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости на деформируемость эритроцитов // Вестник ТГПУ. – 2011. – № 5. – Вып. 5 (107). – С. 69-71.

5. Трубачева О.А., Кремено С.В., Петрова И.В., Ситожевский А.В., Груздева О.В., Иванов В.В., Сулова Т.Е. Участие активных форм кислорода в регуляции Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов эритроцитов // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – № 2. – С. 56-60.
6. Andrews D.A., Yang L., Low P. S. Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells // Blood. – 2002. – Vol. 100. – № 9. – С. 392-399.
7. Bessis M., Mohandas N. A diffractometric method for the measurement of cellular deformability // Blood Cells. – 1975. – Vol. 100. – P. 307-313.
8. Del Carlo B. Modulation of Ca^{2+} -activated K^+ - channels of human erythrocytes by endogenous protein kinase C / B. Del Carlo, M. Pellegrini, M. Pellegrino // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – V. 1612. – С. 107-116.
9. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. – 2002. – Vol. 82. – № 1. – P. 47-95.
10. Foller M. Erythrocyte programmed cell death / M. Foller, S.M. Yuber, F. Lang // Department of Physiology, University of Tübingen. – 2008. – № 60. – P. 661-668.

Рецензенты

Степовая Е.А., д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО «СибГМУ» Минздравсоцразвития России, г. Томск.

Ласукова Т.В., д-р биол. наук, профессор кафедры медико-биологических дисциплин ГБОУ ВПО «Томский государственный педагогический университет», г. Томск.