

## МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАЗОМЕДИАТОРАМИ ИОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Петрова И.В.<sup>1</sup>, Бирулина Ю.Г.<sup>1</sup>, Трубачева О.А.<sup>2</sup>, Шефер Е.А.<sup>1</sup>, Розенбаум Ю.А.<sup>1</sup>,  
Тесля Е.С.<sup>1</sup>, Овчинникова А.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет  
Московский тракт, 2, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: ivpetrova57@yandex.ru

<sup>2</sup>НИИ кардиологии Томского НИМЦ  
ул. Киевская, 111А, г. Томск, 634012, РФ  
Поступила в редакцию: 27.06.2018

**Аннотация.** Мы установили, что монооксид азота (NO) и сероводород (H<sub>2</sub>S) оказывают модулирующее действие на Ca<sup>2+</sup>-зависимые калиевые каналы мембраны эритроцитов. Это приводит к изменению амплитуды гиперполяризации мембраны, вызванной кальциевым ионофором или редокс-агентами. Эффекты NO и H<sub>2</sub>S зависят от способа активации исследуемых каналов. Влияние NO и H<sub>2</sub>S на исследуемые каналы может быть опосредовано модификацией SH-групп белков ионного канала или белков, регулирующих его проводимость, в частности, входящих в состав электронно-транспортной цепи мембраны эритроцитов.

**Ключевые слова:** эритроциты, кальций-зависимые калиевые каналы, газовые посредники.

NO, H<sub>2</sub>S и CO образуют новую группу внутри- и межклеточных посредников, выполняющих разнообразные регуляторные функции. Некоторые исследователи относят их к особой группе газомедиаторов [1]. Все газы имеют собственные ферменты синтеза, экспрессирующиеся тканеспецифично; синтез газов регулируется как кратковременно в ответ на увеличение концентрации кальция в клетке, так и на уровне экспрессии ферментов. Несмотря на сходство их свойств, газы имеют специфические физиологические эффекты и собственные мишени действия в различных тканях. Влияние газов может опосредоваться как непосредственным взаимодействием и модификацией белковых субъединиц ионтранспортных систем, так и изменением активности систем внутриклеточных мессенджеров. Преимуществом газов перед другими посредниками является малое время жизни и высокая скорость диффузии, что позволяет им инициировать быстрые и кратковременные эффекты. Кроме того, липофильность позволяет молекулам газам проникать в мембраны, где они могут, воздействуя на структуру мембранно-связанных белков, в частности, ионных каналов или обменников, изменять их функции.

Эритроциты не являются исключением среди клеток, функции которых контролируются газовыми посредниками. Так, показано, что оксид азота оказывает воздействие на деформируемость эритроцитов [2], а также препятствует программированной гибели красных клеток крови [3].

Установлено, что ион-транспортной системой, участвующей в регуляции деформируемости эритроцитов [4], а также обеспечивающей эритроцитоз [5], являются кальций-зависимые калиевые каналы (K(Ca)каналы) промежуточной проводимости, обнаруженные в мембране красных клеток крови несколько десятилетий назад. Открывание K(Ca)каналов обеспечивает выходящий поток ионов калия и приводит к гиперполяризации мембраны эритроцитов, что рассматривается как начальный этап программируемой гибели красных клеток крови [5]. Стимуляция K(Ca)каналов может осуществляться двояким образом: либо при увеличении входящего потока ионов кальция, либо при активизации электронно-транспортной цепи, некоторые фрагменты которой находятся в мембране эритроцитов [6].

Несмотря на интенсивные исследования физиологических эффектов газообразных посредников, молекулярные механизмы действия газов в клетках изучены недостаточно, это, в частности, касается роли газомедиаторов в регуляции ион-транспортной функции мембраны эритроцитов.

**Целью** настоящей работы является изучение влияния доноров оксида азота и сероводорода на Ca<sup>2+</sup>-зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовалась венозная кровь 25 здоровых добровольцев в возрасте 20-27 лет. Кровь забиралась из локтевой вены утром натощак в пробирки с гепарином (25 ед/мл крови).

Процедура получения упакованных эритроцитов: после центрифугирования (1000 g, 5 мин, 4 °C) плазму и клетки белой крови удаляли, а осадок эритроцитов дважды промывали тремя частями изотонического раствора NaCl (150 mM), содержащего 5 mM Na-фосфатного буфера (pH 7,4), при тех же условиях центрифугирования. Последний раз осадок эритроцитов промывали средой, содержащей 150 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM глюкозы, при тех же условиях центрифугирования. После этого упакованные эритроциты переносили на лед и хранили не более 12 ч.

Для регистрации изменений мембранного потенциала эритроцитов в присутствии Ca<sup>2+</sup> ионофора (A23187) или искусственной электронно-донорной системы аскорбат – феназинметосульфат (ФМС) использовался метод [7], основанный на том, что при наличии протонофора (карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон) (Cl-CCP) в

среде инкубации распределение протонов зависит от мембранного потенциала  $E_m$ , как  $E_m = RT/F \cdot (pH_i - pH_0)$ , где  $pH_i$  и  $pH_0$  – значения pH цитоплазмы и среды инкубации, соответственно. При низкой буферной емкости среды инкубации (в наших условиях она примерно в 100 раз меньше буферной емкости цитоплазмы) изменениями pH; можно было пренебречь, а его квазистационарный уровень определялся при гемолизе клеток в присутствии детергента.

Эксперименты проводились по следующему плану. Для получения A23187-зависимого гиперполяризационного ответа (ГО) к 4,75 мл среды инкубации (150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ глюкозы), добавляли 0,25 мл упакованных эритроцитов. Через 5 мин инкубации при 37 °С и перемешивании добавляли 20 мкМ протонофора Cl-CCP, еще через 2 мин добавляли 0,5 мкМ Ca<sup>2+</sup>-ионофора A23187.

Для получения редокс-зависимого ГО к 4,75 мл среды инкубации того же состава, но содержащей 10 мМ аскорбата натрия добавляли 0,25 мл упакованных эритроцитов. Через 5 мин инкубации при 37 °С и перемешивании добавляли 20 мкМ протонофора Cl-CCP, через 2 мин добавляли 0,1 мМ ФМС.

Для исследования влияния монооксида азота, сероводорода на амплитуду A23187- или редокс-зависимого гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов в среду инкубации добавляли донор NO – нитропруссид натрия (НН) или донор сероводорода гидросульфид натрия (NaHS) в различных концентрациях (указаны в соответствующих сериях экспериментов).

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы SPSS Statistics 17.0.1 for Windows. Достоверность различий определяли непараметрическими критериями: U-критерий Манна-Уитни (U test Mann-Whitney) для независимых и Т-критерий Вилкоксона (Wilcoxon Signed Ranks Test) для зависимых выборок.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стимуляция K(Ca)-каналов эритроцитов в условиях эксперимента может осуществляться в присутствии либо Ca<sup>2+</sup>-ионофора A23187, либо экзогенных доноров электронов (например, системы аскорбат – феназинметосульфат) [7,6]. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> благодаря кальциевому ионофору A23187, как и добавление электронно-донорной системы аскорбат – ФМС приводит к сходным изменениям мембранного потенциала эритроцитов, что находит свое отражение в формировании так называемого гиперполяризационного ответа (ГО). Амплитуда ГО является интегральной характеристикой, отражающей активность K(Ca)-каналов эритроцитов.

Для изучения влияния оксида азота в экспериментальной практике широко используются нитросоединения – доноры NO. В первой серии экспериментов изучалось влияние донора NO нитропруссида натрия на амплитуду A23187- и редокс-стимулированного ГО эритроцитов. Для этого к среде инкубации эритроцитов добавляли 5, 10, 50, 100, 500 или 1000 нМ нитропруссида натрия.

Добавление нитропруссида натрия в избранных концентрациях приводило к значительному снижению амплитуды A23187-стимулированного ГО. При этом максимальное снижение амплитуды ГО мембраны эритроцитов наблюдалось уже при низких концентрациях нитропруссида натрия в среде инкубации, и дальнейший рост концентрации этого агента не приводил к изменению исследуемого параметра (табл. 1).

Характер изменения амплитуды редокс-стимулированного ГО при использованных концентрациях носил другой характер. Так, присутствие 5 нМ и 10 нМ нитропруссида натрия в среде инкубации эритроцитов вызывало достоверное увеличение амплитуды редокс-стимулированного ГО эритроцитов (табл. 1). При дальнейшем увеличении концентрации НН (50 - 500 нМ) амплитуда ГО приближалась к контрольным значениям, и лишь при максимальной среди использованных нами концентраций нитропруссида натрия амплитуда ГО снижалась (табл. 1).

Таким образом, эффекты нитропруссида натрия оказались неодинаковыми при разных способах стимуляции K(Ca)каналов.

Следует отметить, что в литературе не существует единой точки зрения относительно донорной способности НН. Согласно [8], НН спонтанно освобождает оксид азота, который, легко проникая внутрь клеток, оказывает свое регуляторное действие. Но существует и другая точка зрения, согласно которой НН подвергается изменениям благодаря мембранносвязанной НАДН-дегидрогеназе [9], присутствующей в мембране эритроцитов [10]. Кроме того, нельзя исключить, что НН освобождает не только NO, но и ионы ферроцианида и феррицианида, которые могут модулировать процесс переноса электронов посредством фрагментов электронно-транспортной цепи (НАДН-дегидрогеназа, цитохром с), присутствующие в мембране эритроцитов [10]. В работе [11] показано, что компоненты этой цепи вмешиваются в регуляцию Ca<sup>2+</sup>-зависимой калиевой проницаемости эритроцитов.

**Таблица 1.** Влияние нитропруссида натрия (НН) на амплитуду A23187- и редокс-стимулированного гиперполяризационного ответа эритроцитов

Концентрация НН, нМ	5	10	50	100	500	1000
Способ получения ГО						
A23187	93,15 ± 2,67*	92,26 ± 4,06*	92,11 ± 3,32*	88,18 ± 2,89*	89,39 ± 4,02*	86,95 ± 149*
Редокс-система	107,8 ± 8,5*	104,22 ± 7,23*	97,43 ± 4,54	97,92 ± 4,29	96,83 ± 5,87	91,42 ± 3,69*

Примечание: За 100 % приняты значения параметров в отсутствие нитропруссида натрия.

\* – амплитуда ГО достоверно отличается от полученного в отсутствие нитропруссида натрия (n = 8, p < 0,05).

Возможно, обнаруженные эффекты НН на К(Са)каналы эритроцитов обусловлены не только влиянием NO, но и другими продуктами его диссоциации. Кроме того, важно отметить, что полученные нами результаты снижения активности К(Са)каналов эритроцитов в присутствии НН согласуются с данными о предотвращении NO программируемой гибели эритроцитов (эритрозо), поскольку начальным этапом этого процесса является увеличение  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов [3].

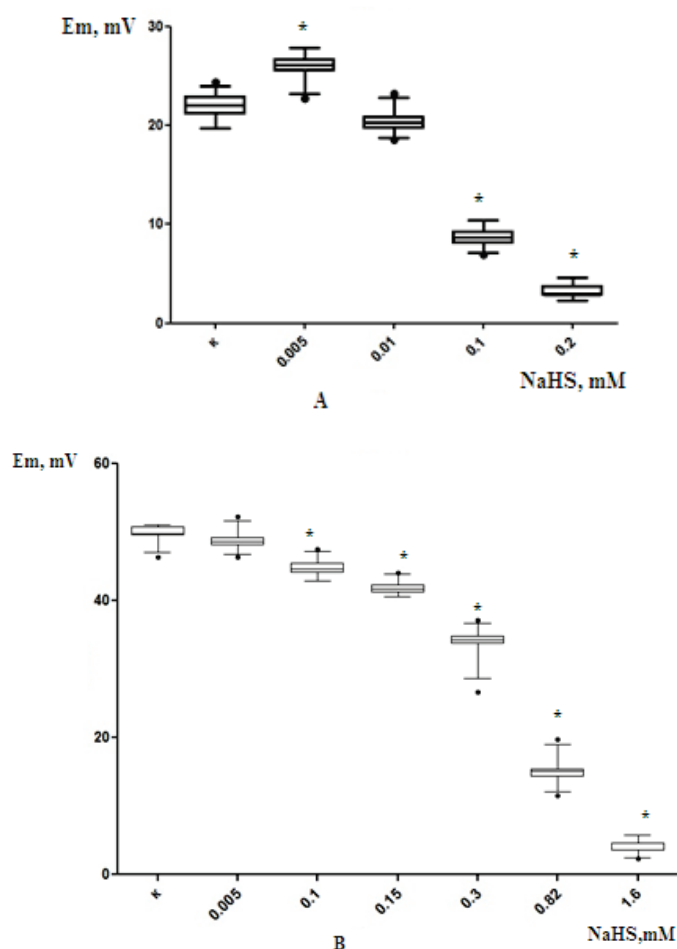
Во второй серии экспериментов исследовали влияние донора сероводорода NaHS на амплитуду ГО мембраны эритроцитов. Известно, что гидросульфид натрия (NaHS) в водном растворе подвергается гидролизу, образуя ионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{HS}^-$ , которые, в свою очередь, взаимодействуют с  $\text{H}^+$  с формированием  $\text{H}_2\text{S}$  [12].

Стимуляцию К(Са)каналов также, как и в первой серии экспериментов, проводили двумя способами.

Инкубация эритроцитов с различными концентрациями NaHS (0,005-0,2 мМ) приводила к неодинаковым изменениям амплитуды A23187-стимулированного ГО. Так, в присутствии 0,005 мМ NaHS амплитуда ГО достоверно возрастала. Внесение более высоких концентраций NaHS (от 0,01 мМ до 0,2 мМ) приводило к постепенному снижению амплитуды ГО. При повышении концентрации NaHS в среде инкубации до 0,2 мМ наблюдалось снижение изучаемой величины в 7,6 раз (рис. 1А). При концентрациях NaHS, превышающих 0,2 мМ, получить ГО эритроцитов не удалось.

Другим способом активации К(Са)-каналов, как отмечалось выше, является внесение в среду инкубации эритроцитов искусственной электронно-донорной системы аскорбат – ФМС. Добавление в среду инкубации клеток возрастающих концентраций NaHS приводило к достоверному снижению амплитуды редокс-зависимого ГО (рис. 1В).

Оказалось, что, как и в серии с НН, динамика A23187- и редокс-стимулированного ГО была неодинаковой. Так, в присутствии 0,005 мМ NaHS амплитуда A23187-стимулированного ГО увеличивалась, а редокс-стимулированного ответа снижалась. Кроме того, было выявлено, что снижение амплитуды редокс-зависимого ГО в присутствии NaHS менее выражено по сравнению с A23187-зависимым ГО. Так, в присутствии 0,1 мМ NaHS амплитуда редокс-зависимого ГО снижалась в среднем на 10 %, а A23187-зависимого – на 60 %. Практически полного подавления редокс-зависимого ГО удалось достичь при инкубации эритроцитов в присутствии 1,6 мМ NaHS, тогда как A23187-зависимый ГО практически не развивался при добавлении 0,2 мМ NaHS.



**Рисунок 1.** Влияние NaHS на амплитуду (А) A23187- и (В) редокс-стимулированного гиперполяризационного ответа эритроцитов человека.

\*- Отмечены параметры, достоверно отличающиеся от контрольных ( $n = 25$ ,  $p < 0,05$ )

Таким образом, оказалось, что в присутствии доноров NO и H<sub>2</sub>S изменение амплитуды A23187-зависимого и редокс-стимулированного ГО имеет разнонаправленный характер. Это свидетельствует о том, что проводимость K(Ca)каналов эритроцитов, активированные различным способом, меняется неодинаковым способом.

Регуляция K(Ca)-каналов эритроцитов осуществляется несколькими путями. Один из них связан с компонентами электронно-транспортной цепи, некоторые компоненты которой присутствуют на мембране эритроцитов (НАДН-дегидрогеназа, цитохром c) [10, 11] и могут включаться в регуляцию K(Ca)-каналов эритроцитов [11].

Система аскорбат – ФМС приводит к образованию редокс-агентов, которые, возможно оказывают свое влияние на Ca<sup>2+</sup>-зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов опосредованно через SH-группы белков канала или его регуляторных белков. Окисление и восстановление SH-групп играет определенную роль в редокс-зависимой калиевой проводимости мембраны эритроцитов человека. Возможно, что сульфгидрильные группы белка калиевого канала являются конечным или промежуточным акцептором в электронном транспорте на мембране эритроцитов. Тогда модуляция SH-групп может оказаться пусковым конформационным сигналом для запуска работы K(Ca)-канала.

В проведенном исследовании установлено, что доноры NO и H<sub>2</sub>S регулируют K(Ca)каналы эритроцитов, что находит свое отражение в изменении амплитуды ГО, вызванного кальциевым ионофором или редокс-агентами. Оказалось, что зависимость амплитуды ГО от концентрации NH или NaHS определяется способом стимуляции Ca<sup>2+</sup>-зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов. Влияние монооксида азота и сероводорода на исследуемые каналы может быть опосредовано модификацией SH-групп белков ионного канала или белков, регулирующих его проводимость, в частности, входящих в состав электронно-транспортной цепи мембраны эритроцитов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в проведенном исследовании установлено, что монооксид азота и сероводород оказывает модулирующее действие на K(Ca)-каналы мембраны эритроцитов. Эффекты NO и H<sub>2</sub>S зависели от способа активации исследуемых каналов. A23187-зависимый ГО оказался более чувствителен к NO и H<sub>2</sub>S по сравнению с редокс-индуцированной гиперполяризацией мембраны эритроцитов.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-015-00395/18.*

#### **Список литературы / References:**

1. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.*, 2002, vol. 16, no. 13. pp. 1792-1798.
2. Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H. J., Baskurt O.K. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003, vol. 284, pp. H1577-H1584.
3. Nicolay J.P., Liebig G., Niemoeller O.M., Koka S., Ghashghaieina M, Wieder T., Haendeler J, Busse R., Lang F. Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 2008, vol. 456, no. 2, pp. 293-305.
4. Трубачева О.А., Шахристова Е.В., Галич А.И., Петрова И.В. Влияние повышенной Ca<sup>2+</sup>-зависимой калиевой проницаемости на деформируемость эритроцитов. *Вестник ТГПУ*, 2011, вып. 5, № 107, с. 69-72. [Trubacheva O.A., SHahristova E.V., Galich A.I., Petrova I.V. The effect of increased Ca<sup>2+</sup>-dependent potassium permeability on erythrocyte deformability. *Digest TGPU*, 2011, iss. 5, no. 107, pp. 69-72. (In Russ.)]
5. Lang F., Lang K.S., Lang P.A., Huber S.M, Wieder T. Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal.*, 2006, vol. 8, no. 8, pp. 1183-1192.
6. Гюльханданян А.В., Геокчакян Г.М. Ca<sup>2+</sup>-зависимый выход K<sup>+</sup> из эритроцитов, индуцированный окислительными процессами. *Биофизика*, 1991, т. 36, № 1, с. 169-171. [Gyulhandanyan A.V., Geokchakyan G.M. Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> output of the red blood cells induced by oxidative processes. *Biofizika*, 1991, vol. 36, no. 1, pp. 169-171 (In Russ.)]
7. Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И., Баскаков М.Б., Медведев М.А. Ca<sup>2+</sup>-активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca<sup>2+</sup>-индуцированных изменений мембранного потенциала. *Биологические мембраны*, 1992, т. 9, № 9, с. 885-903. [Orlov S.N., Petrova I.V., Pokudin N.I., Baskakov M.B., Medvedev M.A. Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels of erythrocytes, studied by the method of recording the Ca<sup>2+</sup>-induced changes in the membrane potential. *Biologicheskie membrany*, 1992, vol. 9, no. 9, pp. 885-903. (In Russ.)]
8. Ignarro L., Cirino G., Casini A., Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2002, vol. 34, no. 6, pp. 879-886.
9. Mohazzab 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, no. 84, iss. 2, pp. 220-228.

10. Kennett E.C., Kuchell P.W. Redox reactions and electron transfer across the red cell membrane. *IUBMB Life*, 2003, vol. 55, no. 7, pp. 375-385.
11. Alvarez J., Montero M., Garcia-Sancho J. High affinity inhibition of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-channels by cytochrome P-450 inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, no. 17, pp. 11789-11793.
12. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.*, 1996, vol. 16, no. 3, pp. 1066-1071.

#### REGULATION MECHANISMS OF ERITROCYTE MEMBRANE IONIC PENETRATION BY GASOMEDIATORS

Petrova I.V.<sup>1</sup>, Birulina Y.G.<sup>1</sup>, Trubachova O.A.<sup>2</sup>, Shefer E.A.<sup>1</sup>, Rozenbaum Y.A.<sup>1</sup>,  
Teslya E.S.<sup>1</sup>, Ovchinnikova A.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian state medical university

Moscow road, 2, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: ivpetrova57@yandex.ru

<sup>2</sup>SRI of cardiology of Tomsk SRMC

Kievskaya str., 111A, Tomsk, 634012, Russia

**Abstract.** We have established that nitrogen monoxide (NO) and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) have a modulating effect on the Ca<sup>2+</sup>-dependent potassium channels of the erythrocyte membrane. This leads to a change in the hyperpolarization amplitude of the membrane caused by the calcium ionophore or redox agents. The effects of NO and H<sub>2</sub>S depend on the way the channels are activated. The effect of NO and H<sub>2</sub>S on the channels under investigation can be mediated by the modification of SH-groups of ion channel proteins or proteins regulating its conductivity, in particular, which are part of the electron transport chain of the erythrocyte membrane.

**Key words:** erythrocytes, calcium-dependent potassium channels, gas intermediaries.