

УДК 612.111.15

## ВЛИЯНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА $Ca^{2+}$ -ЗАВИСИМУЮ КАЛИЕВУЮ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ СЖАТИЯ КЛЕТОК

<sup>1</sup>Трубачева О.А., <sup>2</sup>Петрова И.В.

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН, Томск;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, e-mail: otrubacheva@inbox.ru

В настоящем исследовании изучено влияние перекиси водорода на  $Ca^{2+}$ -зависимую  $K^+$ -проницаемость мембраны эритроцитов в условиях сжатия клеток. Установлено, что сжатие эритроцитов вследствие помещения их в среды с повышенной осмолярностью вызывает достоверное увеличение  $Ca^{2+}$ -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов. Кроме того, в условиях сжатия эритроцитов внесение перекиси водорода в среду инкубации вызывает снижению амплитуды гиперполяризационного ответа по сравнению с результатами, полученными при сжатии клеток в отсутствие перекиси водорода. Оптическая плотность суспензии эритроцитов увеличивается при внесении в инкубационную среду 200 мМ сахарозы и не изменяется при добавлении  $H_2O_2$ . Полученные данные позволяют предположить, что регулирующее влияние перекиси водорода на  $Ca^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов в условиях сжатия клеток, вероятно, обусловленную координирующим воздействием белков цитоскелета.

**Ключевые слова:** эритроциты,  $Ca^{2+}$ -зависимая  $K^+$ -проницаемость, перекись водорода, объем клеток

## EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE ON $Ca^{2+}$ -DEPENDENT POTASSIUM PERMEABILITY OF THE MEMBRANE OF HUMAN ERYTHROCYTES UNDER COMPRESSION CELLS

<sup>1</sup>Trubacheva O.A., <sup>2</sup>Petrova I.V.

<sup>1</sup>FGBU «Research Institute of Cardiology» RAMS, Tomsk;

<sup>2</sup>GER GBOU SSMU Health Ministry of Russia, Tomsk, e-mail: otrubacheva@inbox.ru

The present study investigated the effect of hydrogen peroxide on  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$ -permeability of the membrane of red blood cells under compression cells. Found that the red blood cells as a result of compression of placing them in a medium with high osmolarity causes a significant increase in  $Ca^{2+}$ -dependent potassium permeability of the membrane of red blood cells. In addition, the introduction of red blood cells under compression of hydrogen peroxide in the incubation medium causes a decrease in the amplitude of hyperpolarizing response compared with the results in compression of cells in the absence of hydrogen peroxide. The optical density of the suspension of erythrocytes increased when incorporated in the incubation medium of 200 mM sucrose and is not changed by adding  $H_2O_2$ . These data suggest that on the regulatory effect of hydrogen peroxide on  $Ca^{2+}$ -dependent potassium permeability of the membrane of red blood cells under compression cells, probably due to the coordinating effect of cytoskeletal proteins.

**Keywords:** red blood cells,  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$ -permeability, hydrogen peroxide, cell volume

Долгое время активные формы кислорода (АФК) рассматривались исключительно в качестве агентов, отрицательно влияющих на жизнедеятельность клетки. В частности, это обусловлено их ведущей ролью в патогенезе многих заболеваний: избыточная и неконтролируемая продукция АФК приводила к активации процессов перекисного окисления липидов, что, в конечном итоге, вызывало изменение физико-химических свойств мембраны и связанного с этим транспорта ионов через клеточную мембрану.

В последнее время все чаще появляются работы, в которых АФК рассматриваются в качестве регуляторов внутриклеточных процессов. Активные формы кислорода либо сами выступают в роли вторичных посредников [1;2], либо модулируют действие известных регуляторных каскадов клетки [10]. Один из регуляторных путей связан с влиянием АФК на ионтранспортные системы клеток.

Мембрана эритроцитов содержит  $Ca^{2+}$ -активируемые калиевые каналы ( $K^+(Ca^{2+})$ -каналы) средней проводимости или Gardos-каналы. Их открывание приводит к утечке ионов  $K^+$  и, вследствие этого, к гиперполяризации мембраны эритроцитов. Относительно недавно была установлена физиологическая роль  $K^+(Ca^{2+})$ -каналов: они вносят определенный вклад в программируемую гибель эритроцитов – эриптоз [11;12], изменение объема клеток [8]. Кроме того, показано их участие в деформируемости клеток:  $Ca^{2+}$ -индуцируемое снижение деформируемости эритроцитов устраняется при их блокировании или выравнивании градиента ионов калия [7].

Один из путей регуляции  $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов связан с белками цитоскелета клеток без участия протеинкиназ [5; 6].

В процессе своего функционирования эритроциты подвергаются действию активных форм кислорода, продуцируемых как внутри них, так и другими клетками (эндо-

телиоцитами, иммунокомпетентными клетками). Таким образом, АФК могут влиять на регуляторные пути красных клеток крови [9].

**Целью настоящего исследования** явилось изучение влияния перекиси водорода на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов в условиях сжатия клеток.

### Материал и методы исследования

Исследования проводили на венозной крови практически здоровых доноров-добровольцев в возрасте 20–25 лет. Для исследования  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой калиевой проницаемости 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. [3]. В качестве параметров, характеризующих  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость, использовали  $\Delta E$  – амплитуду гиперполяризационного ответа (ГО), значение мембранного потенциала, соответствующее максимальному уровню гиперполяризации мембраны в ответ на добавление А23187 (мВ).

Для выяснения влияния АФК на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов в суспензию клеток добавляли перекись водорода в конечных концентрациях 1, 2, 3, 4, 5, 8 мкМ.

Для сжатия клеток упакованные эритроциты помещали в среду N (150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ глюкозы, 10 мкМ CaCl<sub>2</sub>), содержащую 100 или 200 мМ сахарозы. Для регистрации изменений объёма эритроцитов в условиях варьирования осмолярности среды использовался метод оценки светорассеяния суспензий клеток, основанный на способности эритроцитов рассеивать световой поток при длинах волн больше 600 нм, исходя из того, что оптическая плотность взвеси обратно пропорциональна объёму исследуемых частиц [4]. Математическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ SPSS for Windows 11.5. Для каждого параметра определяли значения медианы (M) и квартилей (Q2-Q3). Достоверность различия между группами определяли по непараметрическому критерию Вилкоксона.

### Результаты исследования и их обсуждение

Добавление перекиси водорода в использованных концентрациях к суспензии эритроцитов не изменяло амплитуду ГО по сравнению с контролем. Использование более высоких концентраций перекиси водорода вызывало повреждение эритроцитов. Сжатие эритроцитов вследствие помещения их в среды с повышенной осмолярностью (в присутствии 100 или 200 мМ сахарозы) вызывало достоверное увеличение амплитуды ГО, что указывает на повышение  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов (рис. 1).

Ранее было показано, что обнаруженный эффект связан с возможным влиянием белков цитоскелета на проводимость  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых калиевых каналов [6].

Внесение перекиси водорода (1 мкМ) в среды инкубации с повышенной осмолярностью вызывало статистически значимое снижение амплитуды ГО по сравнению с результатами, полученными при сжатии клеток в отсутствие перекиси водорода (рис. 2).

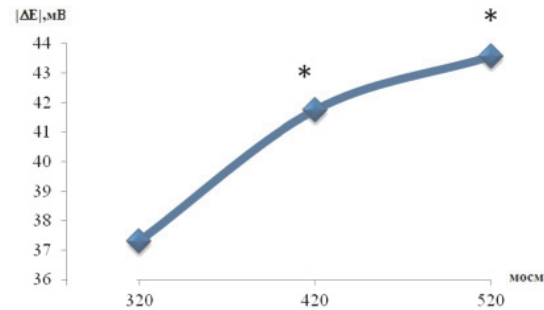


Рис. 1. Амплитуда ГО в условиях варьирования осмолярности среды инкубации.

Примечание: \* – достоверность изменений параметра  $\Delta E$  по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

Возможно, снижение  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов в условиях повышенной осмолярности среды в присутствии перекиси водорода обусловлено непосредственным влиянием перекиси водорода на белки  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых калиевых каналов, либо на системы, регулирующие их активность. Однако, как было показано выше, в изотонической среде перекись водорода не оказывала влияния на исследуемый параметр. Другой причиной обнаруженного эффекта могло быть набухание эритроцитов в присутствии перекиси водорода. Так, в работе [13] показано, что третбутиловая перекись приводила к увеличению объёма эритроцитов на 15%.

Исследование светорассеяния суспензии эритроцитов показало, что внесение эритроцитов в гиперосмолярную среду повышает оптическую плотность раствора до 1,81 (1,78–1,88) по сравнению с изотонической средой (1,60 (1,58–1,61)), что свидетельствует о сжатии эритроцитов. Добавление перекиси водорода (1 мкМ) в гиперосмотический раствор, содержащий 200 мМ сахарозы, не изменяло исследуемый показатель (таблица). Следовательно, перекись водорода не влияет на изменение объёма эритроцитов, а действует, видимо, на более тонкие механизмы регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых калиевых каналов.

Таким образом, в настоящем исследовании обнаружено, что добавление микромолярных концентраций перекиси водорода в изотоническую среду инкубации эритроцитов не приводит к изменению амплитуды гиперполяризационного ответа. Сжа-

тие эритроцитов вследствие помещения их в среды с повышенной осмолярностью (420 и 520 мосм) вызывает достоверное увеличение  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов. Внесение перекиси водорода в среды инкубации с повышенной осмолярностью вызывает статистически значимое снижение амплитуды гиперполяризационного ответа по сравнению с результатами, полученными при сжа-

тии клеток в отсутствие перекиси водорода, и этот эффект не связан с изменением объема эритроцитов. На основании проведенных исследований выдвинуто предположение, что регулирующее влияние перекиси водорода на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов в условиях сжатия клеток, вероятно, обусловлено ее воздействием на белки цитоскелета эритроцитов.

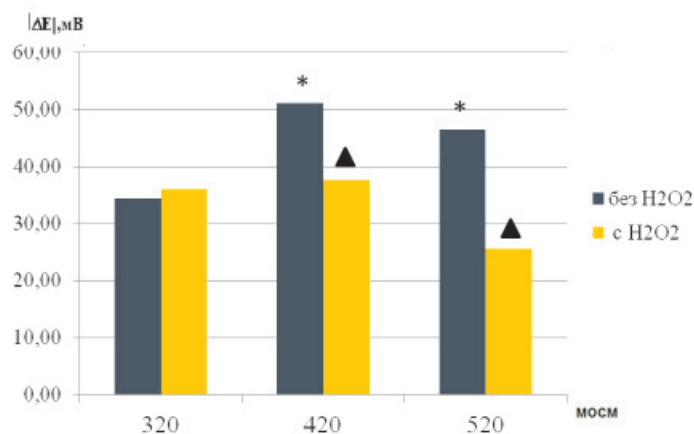


Рис. 2. Амплитуда ГО в условиях варьирования осмолярности среды инкубации в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Примечание: \* – достоверность изменений параметра  $\Delta E$  по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

Оптическая плотность среды инкубации ( $D$ ) в условиях варьирования осмолярности и присутствия перекиси водорода ( $\text{Me} (Q_1-Q_3)$ )

№ п/п	Условия инкубирования клеток	$n$	$D$
1	320 мосм (контроль)	8	1,6037 (1,5853–1,6077)
2	320 мосм + $\text{H}_2\text{O}_2$ (1 мкМ)	16	1,5628 (1,5569–1,5912)
4	520 мосм	6	1,8180 (1,7835–1,8792) $P^{1,2} < 0,05$
5	520 мосм + $\text{H}_2\text{O}_2$ (1 мкМ)	6	1,771 (1,657–1,7922) $P^{1,2} < 0,05$

Примечание:  $p^{1,2}$  – показатель достоверности различий по сравнению с условиями 1 и 2.

### Список литературы

1. Быстрова М.Ф., Буданова Е.Н. Перекись водорода и пероксиредоксин в редокс-регуляции внутриклеточной сигнализации // Биол. мембраны. – 2007. – Т. 24, № 2. – С. 115–125.

2. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). // Физиологические и клинико-биохимические аспекты. – СПб.: Изд-во Медицинская пресса, 2006. – 400 с.

3.  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированных изменений мембранного потенциала / С.Н. Орлов, И.В. Петрова, Н.И. Покудин и др. // Биол. мембраны. – 1992. – Т. 9, № 9. – С. 885–903.

4. Орлов С.Н. Транспорт одновалентных катионов в эритроцитах человека и крысы: регуляция активаторами протеникиназ и сжатием / С.Н. Орлов, Н.И. Покудин, Ю.В. Постнов // Кардиология. – 1988. – Т. 28, № 3. – С. 91–96.

5. Исследование роли липидного матрикса и белков мембранного каркаса в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^{+}$ -каналов эритроцитов у больных алкоголизмом и сахарным диабетом II типа / И.В. Петрова, В.Д. Прокопьева, А.В. Ситожевский, С.В. Кремено, В.И. Корюкин, М.Б. Баскаков, Н.А. Бохан, В.В. Новицкий // Бюлл. Эксперим. Биологии и медицины. – 2002. – № 10. – С. 401–404.

6. Изучение объем – зависимой регуляции  $\text{Ca}^{2+}$  – активируемых калиевых каналов эритроцитов в норме и у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией / А.В. Ситожевский, И.В. Петрова, В.Д. Про-

копьева, С.В. Кремено, В.В. Новицкий // *Бюлл. Эксперим. Биологии и медицины*. – 2004. – Т. 137, № 1. – С. 34–31.

7. Влияние повышенной  $Ca^{2+}$ -зависимой калиевой проницаемости на деформируемость эритроцитов / О.А. Трубачева, Е.В. Шахристова, А.И. Галич, И.В. Петрова // *Вестник ТГПУ*. – 2011. – Вып. 5(107). – С. 69–71.

8. Physiological roles of the intermediate conductance,  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel Kcnn4 / T. Begenesich, T. Nakamoto, C.T. Ovitt, K. Nehrke, C. Brugnara, S.L. Alper, J.E. Melvin // *J Biol Chem*. – 2004. – № 12. – P. 681–6887.

9. Barvitenko N.N. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance / N.N. Barvitenko, N.C. Adragna, R.E. Weber // *Cell Physiol Biochem*. – 2005. – № 15. – С. 1–18

10. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiol. Rev*. – 2002. – Vol. 82, № 1. – P. 47–95.

11. Foller M. Erythrocyte programmed cell death / M. Foller, S.M. Yuber, F. Lang // Department of Physiology, University of Tübingen. – 2008. – № 60. – P. 661–668.

12. Lang F. Mechanisms and significance of eryptosis / K.S. Lang, P.A. Lang, S.M. Huber, T. Wieder // *Antioxid Redox Signal*. – 2006. – № 8(8). – С. 1183–92.

13. Lisovskaya I.L. Modulation of RBC volume distributions by oxidants (phenazine methosulfate and tert-butyl hydroperoxide): role of Gardos channel activation / I.L. Lisovskaya, I.M. Shcherbachenko, R.I. Volkova, V.P. Tikhonov // *Bioelectrochemistry*. – 2008. – № 73(1) – С. 49–54.

### References

1. Bystrova M.F., Budanova E.N. Perekis' vodoroda i peroksidredoksiny v redoks-regulyacii vnutrikletочноj signalizacii // *Biol. membrany*. 2007. Т. 24, no. 2. pp. 115–125.

2. Dubinina E.E. Produkty metabolizma kisloroda v funkcional'noj aktivnosti kletok (zhizn' i smert', sozidanie i razrushenie). // *Fiziologicheskie i kliniko-bioximicheskie aspekty*. SPb.: Izdatel'stvo Medicinskaya pressa. 2006. 400 p.

3. Orlov S.N.  $Sa^{2+}$ -aktiviruemye kalievye kanaly e'ritrocytov, issledovannye metodom registracii  $Sa^{2+}$ -inducirovannyx izmenenij membrannogo potentsiala / S.N. Orlov, I.V. Petrova, N.I. Pokudin i dr. // *Biol. membrany*. 1992. Т. 9, no. 9. pp. 885–903.

4. Orlov S.N. Transport odnovalentnyx kationov v e'ritrocytax cheloveka i krysy: regulyaciya aktivatorami proteinkinaz i szhatiem / S.N. Orlov, N.I. Pokudin, Yu.V. Postnov // *Kardiologiya*. 1988. Т. 28, no.3. pp. 91–96.

5. Petrova I.V. Issledovanie roli lipidnogo matriksa i belkov membrannogo karkasa v regulyacii  $Sa^{2+}$ -aktiviruemyx  $K^{+}$ -kanalov e'ritrocytov u bol'nyx alkogolizmom i saxarnym diabetom II tipa. / I.V. Petrova, V.D. Prokop'eva, A.V. Sitozhevskij,

S.V. Kremenno, V.I. Koryukin, M.B. Baskakov, N.A. Boxan, V.V. Novickij // *Byull. E'ksperim. Biologii i mediciny*. 2002. no. 10. pp. 401–404.

6. Sitozhevskij A.V., Izuchenie obm – zavisimoy regulyacii  $Sa^{2+}$  – aktiviruemyx kalievых kanalov e'ritrocytov v norme i u bol'nyx saxarnym diabetom 2 tipa v sochetanii s arterial'noj gipertenziej / A.V. Sitozhevskij, I.V. Petrova, V.D. Prokop'eva, S.V. Kremenno, V.V. Novickij // *Byull. E'ksperim. Biologii i mediciny*. 2004. Т. 137, no.1. pp. 34–31.

7. Trubacheva O.A., Shaxristova E.V., Galich A.I., Petrova I.V. Vliyanie povyshennoj  $Ca^{2+}$ -zavisimoy kalievoy pronicaemosti na deformiruemosť e'ritrocytov // *Vestnik TGPU*. 2011. Vyp.5(107). pp. 69–71.

8. Begenesich T. Physiological roles of the intermediate conductance,  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel Kcnn4 / T. Begenesich, T. Nakamoto, C.T. Ovitt, K. Nehrke, C. Brugnara, S.L. Alper, J.E. Melvin // *J Biol Chem*. 2004. no. 12. pp. 681–6887.

9. Barvitenko N.N. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance / N.N. Barvitenko, N.C. Adragna, R. E. Weber // *Cell Physiol Biochem*. 2005. no. 15. pp. 1–18.

10. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiol. Rev*. 2002. Vol. 82, no. 1. pp. 47–95.

11. Foller, M. Erythrocyte programmed cell death / M. Foller, S.M. Yuber, F. Lang // Department of Physiology, University of Tübingen. 2008. no. 60. pp. 661–668.

12. Lang, F. Mechanisms and significance of eryptosis / K.S. Lang, P.A. Lang, S.M. Huber, T. Wieder // *Antioxid Redox Signal*. 2006. no. 8(8). pp. 1183–92.

13. Lisovskaya I.L.. Modulation of RBC volume distributions by oxidants (phenazine methosulfate and tert-butyl hydroperoxide): role of Gardos channel activation / Lisovskaya I.L., Shcherbachenko I.M., Volkova R.I., Tikhonov V.P. // *Bioelectrochemistry*. 2008. no. 73(1) pp. 49–54.

### Рецензенты:

Степовая Е.А., д.м.н., профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии, ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России, г. Томск;

Ласукова Т.В., д.б.н., профессор кафедры медико-биологических дисциплин, ГБОУ ВПО «Томский государственный педагогический университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 19.02.2013.