

УДК 576.324:612.111

РЕАКЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТНОГО СОСТАВА СРЕДЫ. IV. ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ АНИОНОВ**С.В. Руденко¹, Л. Ши², В.А. Бондаренко¹**¹*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская 23, Харьков, 61015, Украина, rsv@kharkov.ua*²*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина*

Поступила в редакцию 2 июня 2009 г.

Принята 15 июня 2009 г.

Исследовано влияние органических анионов ацетата, оксалата, цитрата, тартрата, салицилата и солей ЭДТА различной степени замещения на последовательность изменения формы эритроцитов (морфологического ответа, МО) в изотонической сахарозной среде. Установлено, что только анионы оксалата и цитрата имеют схожий характер влияния на различные фазы МО. Действие других анионов на протекание МО отличалось как от действия оксалата, так и между собой, что указывает на специфичность их влияния на форму эритроцитов в данных условиях. В отличие от неорганических моновалентных анионов, которые стабилизировали дискоидную форму эритроцитов при их добавлении на фазе 2 МО, все органические анионы вызывали резкую сферуляцию клеток. Полученные данные в совокупности позволяют исключить влияние положительного трансмембранного потенциала и ионной силы в диапазоне до 10 мМ как причинных факторов, влияющих на динамические преобразования формы эритроцитов в неэлектролитных средах, но не исключают возможного влияния конформации мембранных белков на эти процессы. Предполагается, что МО можно рассматривать как генерализованную реакцию эритроцитов на изменение ионного окружения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, форма, морфологический ответ, низкая ионная сила, сахароза, органические анионы.

RESPONSE OF ERYTHROCYTES ON CHANGES OF ELECTROLYTE CONTENT OF THE MEDIUM. IV. EFFECT OF ORGANIC ANIONS**S.V. Rudenko¹, L. Shi², V.A. Bondarenko¹**¹*Institute for Problem of Cryobiology and Cryomedicine of NASU, 23 Pereyaslavskaya St., Kharkov, 61015, Ukraine;*²*V.N.Karazin Kharkov National University, 4 Svobody Sq., Kharkov, 61077, Ukraine*

The effect of organic anions acetate, oxalate citrate, tartrate, salicylate, Na₂EDTA and Na₄EDTA on dynamics of erythrocyte shape changes in sucrose media (morphological response, MR) was studied. It was established that among anions tested only oxalate and citrate demonstrated similar mode of action relative to different phases of MR. Action of other anions was different from oxalate as well as from each other suggesting the specificity in their influence on cell shape under present conditions. In contrast to monovalent inorganic anions which caused a stabilization of discoid shape when added at phase 2 of MR, all organic anions rapidly converted the cells into the spheres. The data obtained allow to exclude the positive transmembrane potential and ionic strength at least in the range up to 10 mM as a causal factors affecting dynamics of shape changes in nonelectrolyte media, however do not exclude the possible involvement of conformation of membrane proteins. It is suggested that MR could be considered as a type of general cell reaction on changes in ionic environment.

KEY WORDS: erythrocyte, shape, low ionic strength, sucrose, anion transport, organic anions.

РЕАКЦІЯ ЕРИТРОЦИТІВ НА ЗМІНУ ЕЛЕКТРОЛІТНОГО СКЛАДУ СЕРЕДОВИЩА. IV. ВПЛИВ ОРГАНІЧНИХ АНІОНІВ**С.В. Руденко¹, Л. Ши², В.А. Бондаренко¹**¹*Институт проблем криобіології та криомедицини НАН України, вул. Переяславська 23, Харків, 61015, Україна*²*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна*

Досліджено вплив органічних аніонів ацетату, оксалату, цитрату, тартрату, салицилату та солей ЭДТА різного ступеню заміщення на послідовність зміни форми еритроцитів (морфологічної відповіді, МВ) у ізотонічному сахарозному середовищі. Встановлено, що тільки аніони оксалату і цитрату мають схожий характер впливу на різні фази МВ. Вплив останніх аніонів на характер перебігу МВ відрізняється від оксалату, а також між собою, що свідчить про специфічність їх впливу на форму клітин за даних умов. У протилежність до неорганічних моновалентних аніонів які стабілізували дискоїдну форму клітин при їх додаванні на фазі 2, усі органічні аніони викликали ризьку сферуляцію клітин. Отримані дані в сукупності дозволяють виключити вплив позитивного трансмембранного потенціалу та іонної сили в діапазоні до 10 мМ як причинних чинників, що впливають на динамічні перетворення форми еритроцитів у неелектролітних середовищах, але не виключають можливого впливу конформації мембранних білків на ці процеси. Передбачається, що МО можна розглядати як генерализовану реакцію еритроцитів на зміну іонного оточення.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: еритроцити, форма, низка іонна сила, сахароза, аніонний транспорт, органічні аніони.

Анионный обменник (белок полосы 3, AE1) является основным интегральным белком в мембранах эритроцитов. Он формирует комплекс, состоящий из AE1, гликофорина А, белка 4.2, анкирина, карбоангидразы и гемоглобина, который важен для организации структуры мембраны и ее прикреплению к цитоскелету [1]. Предполагается, что AE1 является элементом, ответственным за поддержание дискоидной формы эритроцитов и ее регуляцию в различных условиях. Эта регуляция может осуществляться за счет конформационных изменений в структуре белка, которые отражаются на изменении локальной площади внешнего или внутреннего монослоев мембраны, что приводит к ее изгибу в ту или иную сторону [2,3]. В другой работе [4] предполагается, что конформация AE1 влияет на форму клеток опосредованно через скручивание или раскручивания спиралей спектрина, что зависит от направленности потоков хлорида и также приводит к изменению локальной кривизны мембраны. В обоих случаях можно предполагать наличия взаимосвязи между транспортными процессами и формой эритроцитов, что частично подтверждается в экспериментах с ингибиторами анионного транспорта [2,5,6]. Основная функция AE1 состоит в осуществлении быстрого обмена внутриклеточных и внеклеточных анионов хлорида и бикарбоната (HCO_3^-), но кроме этого он может осуществлять обмен и других неорганических и органических анионов [7,8]. Как правило, скорость обмена иных анионов значительно меньше скорости обмена хлорида [7,9], в связи с чем они могут также выступать как конкурентные или неконкурентные ингибиторы хлоридного транспорта [8,10–13].

Можно предположить, что если морфология эритроцитов зависит от состояния анион транспортной системы, то замещение анионов хлорида на другие органические анионы должна отразиться на характере изменения формы клеток. В данном случае нужно учитывать и тот факт, что некоторые органические анионы, в отличие от неорганических, могут сами по себе рассматриваться как агенты, возмущающие форму клеток [4]. Поскольку известно, что в средах с низкой ионной силой наблюдаются динамические изменения формы эритроцитов [2,5], целью данной работы было изучение влияния анионов ацетата, оксалата, цитрата, тартрата и солей ЭДТА на различные фазы морфологического ответа (МО) эритроцитов в неэлектролитной сахарозной среде. Полученные данные показывают, что механизм влияния органических анионов на форму эритроцитов зависит от типа аниона и является значительно более комплексным по сравнению с неорганическими анионами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на свежих эритроцитах человека, которые дважды отмывали в незабуференном физиологическом растворе (150 мМ NaCl), а затем осадок разводили в 10 раз в изотоническом растворе HBS (150 мМ NaCl, 5 мМ HEPES, pH 7,4) и использовали как сток-суспензию. Для изучения изменений формы клеток во времени использовали двухканальный формометр-агрегометр ФА-01. Проведение измерений, калибровку прибора и обработку информации проводили аналогичным образом как описано в [5]. Динамику морфологических изменений изучали при введении аликвоты клеток в незабуференную среду 0,3 М сахарозы (Merck), pH (5,8–6,2), содержащую или не содержащую исследуемые анионы. При исследовании реакции эритроцитов в зависимости от их текущей формы, анионы в необходимый момент добавляли непосредственно в кювету с клетками из концентрированных растворов до получения заданной конечной концентрации. Использовали следующие анионы: Na-ацетат, Na-оксалат, Na₃-цитрат, тартрат ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), Na-салицилат, двухзамещенную соль ЭДТА (Na₂E) квалификации х.ч. или ч.д.а. и четырехзамещенную соль ЭДТА (Na₄E) Sigma (США). На рисунках представлены типичные данные, от 3 до 5 независимых

экспериментов, проведенных с кровью различных доноров при комнатной температуре 20–22 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1 показаны характерные примеры влияния анионов на динамику изменения формы эритроцитов в стандартной сахарозной среде. Показана реакция клеток на введение анионов в среду в трех случаях: когда анионы добавляли в конце фазы 3 (трек 1), на максимуме ИФ (трек 2) и когда такое же количество анионов присутствовало в среде до добавления туда клеток (трек 3). Высокое значение ИФ соответствует дискоидной или близкой к ней форме клеток, тогда как низкие значения этого параметра указывают на формирование менее дискоидных форм, которые, в пределе, соответствуют сферам, как, например, в случае Na_2E (ряд 6, ИФ < 0.1).

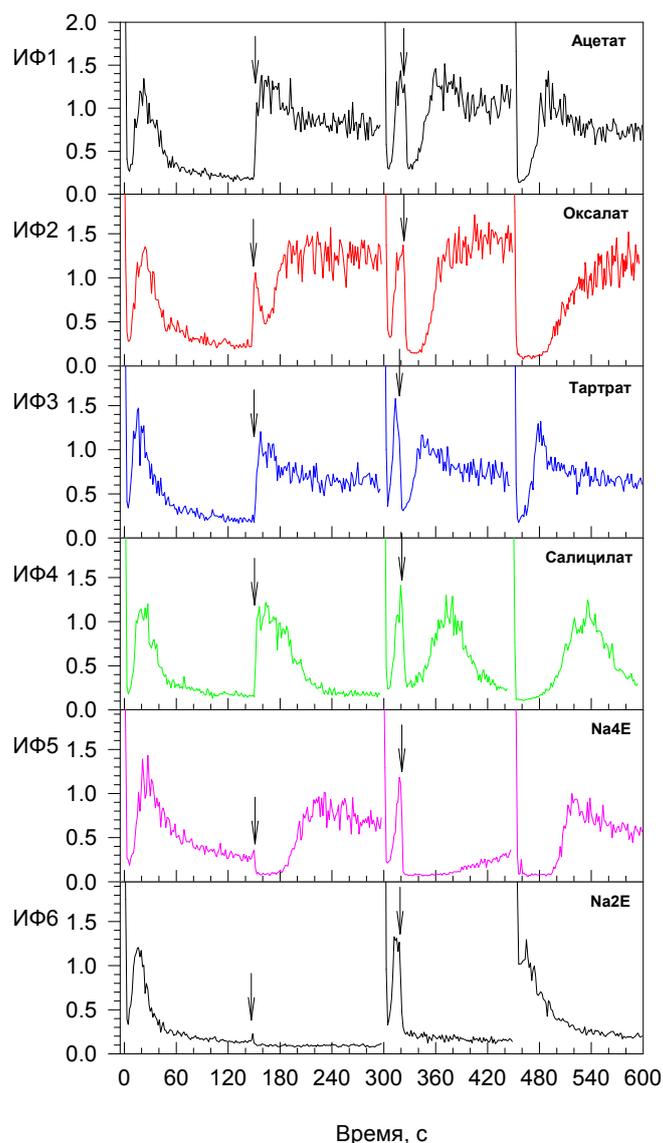


Рис. 1. Примеры характерных кривых изменения индекса формы (ИФ) эритроцитов во времени (морфологического ответа) после их введения в сахарозную среду (0,3 М), содержащую (трек 3) и не содержащую анионы ацетата (5 мМ), оксалата (1 мМ), тартрата (5 мМ), салицилата (5 мМ), Na_4E и Na_2E (0,05 мМ) (треки 1 и 2). Стрелки на треках 1 и 2 в каждой серии показывают момент добавления анионов. Вертикальная линия в начале каждого трека соответствует моменту введения клеток в среду и соответствует нулевому времени для этого трека независимо от оси времени для всего графика.

Эти данные показывают, что как изначальное присутствие анионов в среде, так и их добавление на различных фазах МО значительно модифицируют морфологические преобразования эритроцитов. Эффект анионов как по степени, так и направленности их влияния зависит от типа аниона и его концентрации. Так, при добавлении всех исследуемых анионов на максимуме ИФ происходит резкое его уменьшение, свидетельствующее о сферуляции клеток. При добавлении анионов через 150 с после начала МО, как правило, происходит быстрое восстановление ИФ, чего, однако, не наблюдается для Na₂E и Na₄E. Для сравнения влияния анионов на МО мы исследовали их действие на различные фазы МО в зависимости от концентрации.

На рис. 2 показаны зависимости изменения ИФ на фазе 1 от концентрации анионов в сахарозной среде. Видно, что увеличение концентрации цитрата, оксалата, салицилата и Na₄E приводит к монотонному уменьшению ИФ до минимального значения (<0.1). Для ацетата и тартрата это уменьшение сменяется последующим увеличением, а Na₂E характеризуется только увеличением ИФ при увеличении ее концентрации. Эти данные показывают, что анионы цитрата, оксалата, салицилата и Na₄E стимулируют фазу 1 и ингибируют фазу 2 формотрансформации, т.е. стимулируют начальную сферуляцию клеток, а Na₂E, наоборот ингибирует начальную сферуляцию клеток на фазе 1. Влияние ацетата и тартрата на эту фазу является более сложным по сравнению с другими анионами, поскольку оно имеет бимодальный характер. Следует обратить внимание, что различные анионы также значительно отличаются концентрационным диапазоном, в котором они проявляют схожий эффект.

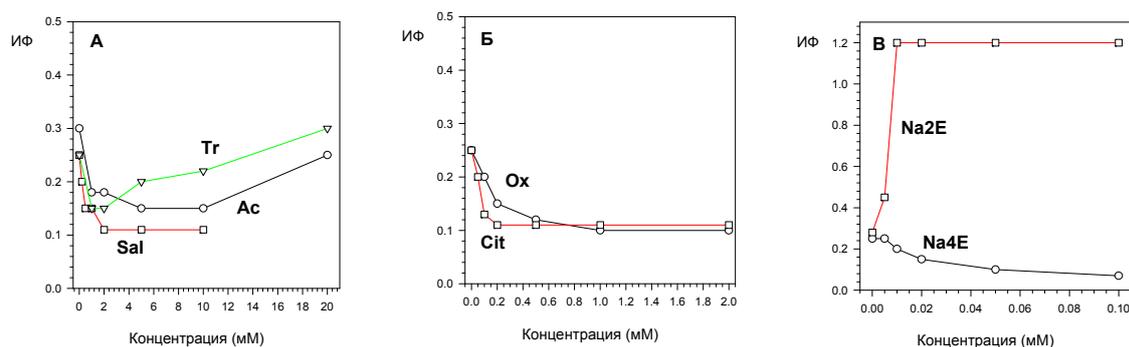


Рис. 2. Зависимость ИФ на фазе 1 МО от исходной концентрации анионов ацетата, тартрата и салицилата (А), анионов оксалата и цитрата (Б), анионов Na₄E и Na₂E (В) в сахарозной среде.

Наиболее сильными являются Na₂E и Na₄E, а наименее сильными – ацетат и тартрат, при этом их эффективная концентрация различается на 2 порядка.

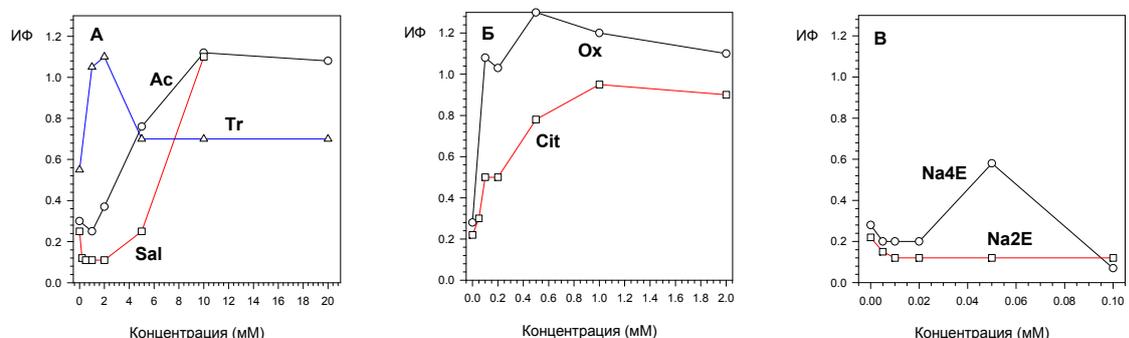


Рис. 3. Зависимость ИФ на фазе 3 МО, измеренного через 150 с после введения клеток в сахарозную среду, от исходной концентрации в ней анионов ацетата, тартрата и салицилата (А), анионов оксалата и цитрата (Б), анионов Na₄E и Na₂E (В).

На рис. 3 и 4 приведены аналогичные данные в отношении влияния анионов на фазу 3 МО при условиях когда анионы изначально присутствовали в среде (рис.3) и когда их добавляли на максимуме МО (рис. 4).

В обоих этих случаях зависимости для ацетата, оксалата и цитрата имеют схожий характер, что свидетельствует в пользу того, что момент добавления анионов не имеет существенного значения для проявления ими конечного блокирующего эффекта на эту фазу МО. Последнее справедливо также и для других анионов, хотя характер концентрационной зависимости для них имеет другой вид. Так тартрат и Na_4E характеризуются концентрационным максимумом, при котором их эффект максимален в отношении увеличения ИФ и снижается как при уменьшении, так и при увеличении концентрации. В отличие от этого салицилат характеризуется концентрационным минимумом, т.е. действует, фактически, противоположно тартрату и Na_4E уменьшая ИФ. Это связано с особым влиянием салицилата на динамику МО (рис. 1).

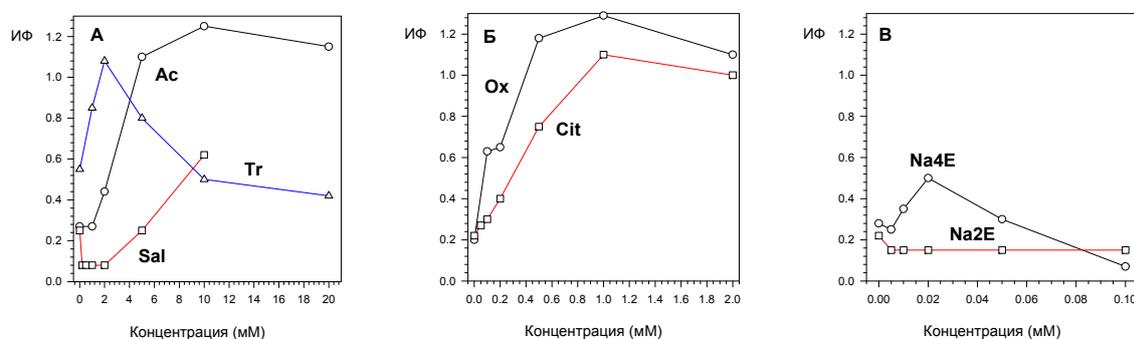


Рис. 4. Зависимость ИФ на фазе 3 МО, измеренного через 150 с после введения клеток в сахарозную среду, от концентрации анионов ацетата, тартрата и салицилата (А), анионов оксалата и цитрата (Б), анионов Na_4E и Na_2E (В) в условиях, когда анионы добавляли к эритроцитам на максимуме МО (~через 20с).

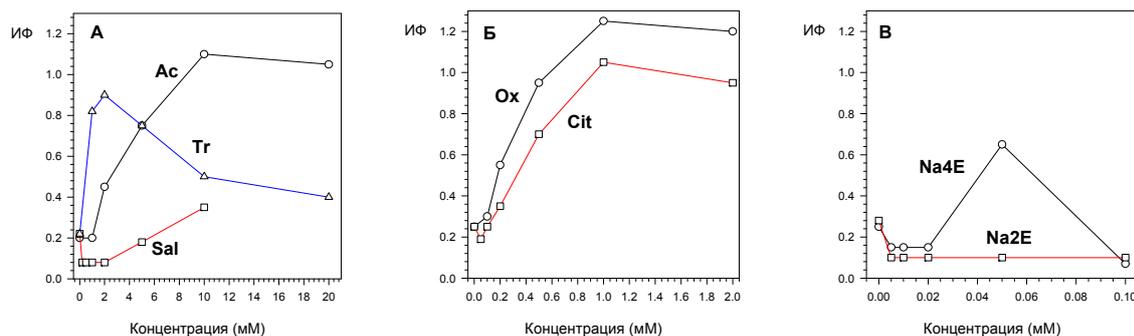


Рис. 5. Зависимость степени восстановления ИФ, измеренного через 150 с после добавления анионов от их концентрации. Анионы ацетата, тартрата и салицилата (А), анионы оксалата и цитрата (Б) и анионы Na_4E и Na_2E (В) добавляли к клеткам, через 150 с после введения их в сахарозную среду.

На рис. 5 показана зависимость ИФ, измеренного через 150 с после того как анионы в заданной концентрации были добавлены к клеткам в конце фазы 3, т.е. через 150 после начала МО. Видно, что характер этих зависимостей аналогичен зависимостям, показанным на рис. 3 и 4, с той разницей, что эффект салицилата в этом случае в несколько раз меньше при его максимальной концентрации. Из этих данных можно заключить, что конечная (равновесная) форма эритроцитов в конце МО будет соответствовать составу внеклеточной среды и будет, практически, одинаковой

независимо от того в какой момент состав среды был изменен, несмотря на существенно разную динамику формотрансформации, которая зависит от момента добавления аниона.

Как видно из рис.1, влияние анионов сопровождается смещением максимума ИФ по оси времени по отношению к контролю и в некоторых случаях к появлению лага между первичной сферуляцией клеток и началом восстановления дискоидной формы на фазе 2. На рис. 6 показано влияние анионов на время достижения максимума T_{\max} , а на рис. 7 их влияние на лаг-период.

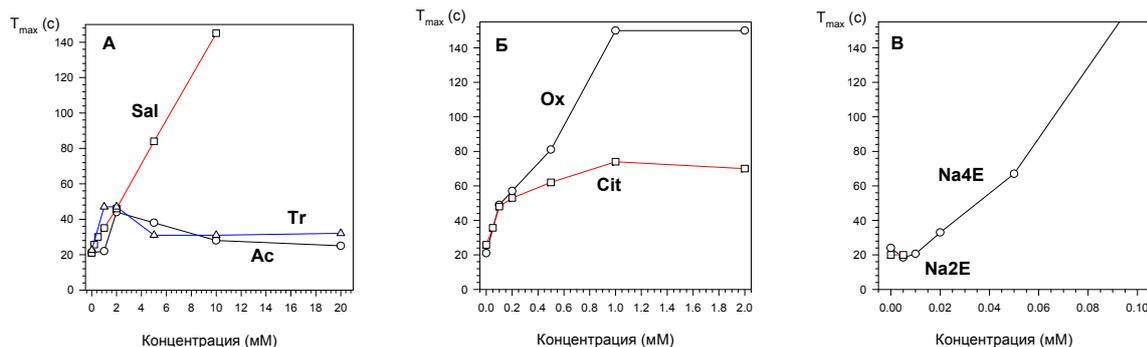


Рис. 6. Зависимость времени достижения максимального значения ИФ от концентрации анионов ацетата, тартрата и салицилата (А), анионов оксалата и цитрата (Б), анионов Na4E и Na2E (В) когда они присутствовали в сахарозной среде до добавления клеток.

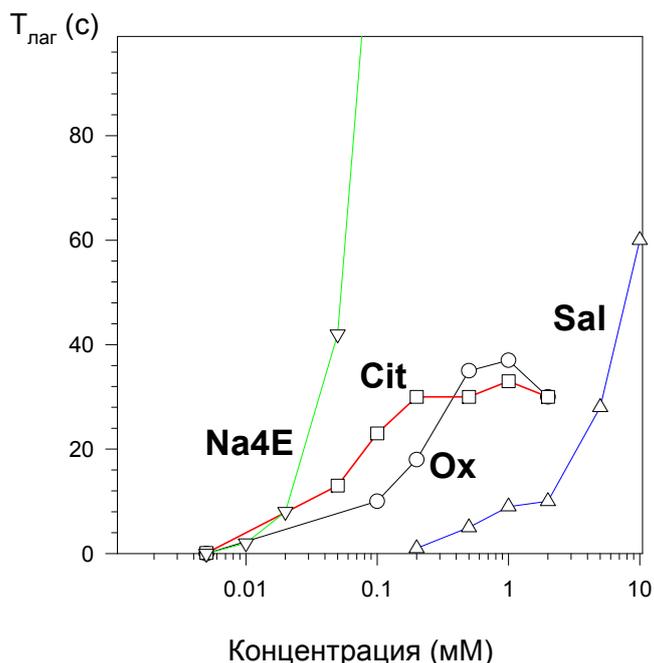


Рис. 7. Зависимость времени лаг периода между моментом введения клеток в среду и началом восстановления ИФ на фазе 2 от концентрации анионов салицилата, оксалата, цитрата и Na4E когда они присутствовали в сахарозной среде до добавления клеток.

Оксалат, цитрат, салицилат и Na4E увеличивают время максимума при возрастании их концентрации, причем только оксалат и цитрат проявляют свойство насыщения. Цитрат и тартрат имеют зависимость с максимумом и время максимума T_{\max} не сильно различается при больших и малых концентрациях этих анионов, тогда как Na2E не имеет четко выраженного максимума ИФ (рис. 1), поэтому ее зависимость от концентрации анионов определить не представляется возможным. Среди

исследованных анионов только оксалат, цитрат, салицилат и Na_4E формировали лаг-период (рис. 7), длительность которого увеличивалась с увеличением концентрации этих анионов. Как и в случае времени максимума (рис. 6) оксалат и цитрат имели схожие концентрационные зависимости с насыщением, а салицилат и особенно Na_4E нелинейно увеличивали время лага при возрастании их концентрации. Влияние анионов на время максимума и время лага проявлялось в том же концентрационном диапазоне, что и их влияние на различные фазы МО.

Из представленных данных видно, что в действии анионов на МО эритроцитов наблюдаются как общие, так и отличительные черты. К общим особенностям можно отнести тот факт, что все анионы вызывают резкую сферуляцию клеток при их добавлении на максимуме МО (рис. 1). Некоторые анионы (оксалат, цитрат, салицилат, Na_4E) вызывают появление лаг-периода перед фазой 2, и они же, за исключением Na_4E , вызывают быстрое восстановление дискоидной формы клеток (увеличение ИФ) после их добавления в конце фазы 3, что также можно рассматривать как общее свойство в их действии. К выраженным отличительным свойствам нужно отнести уменьшение, а не увеличение ИФ при добавлении анионов Na_2E и Na_4E через 150 с после начала МО и блокирующее, а не активирующее влияние Na_2E на фазу 1 (рис. 1, ряд 6). Обнаруженный нами факт, что две соли ЭДТА различной степени замещения обладают чуть ли не противоположным действием представляется достаточно неожиданным. Возможно это связано с основностью этих солей (кислая и щелочная), но в любом случае этот факт показывает, что близкие по структуре вещества могут иметь значительно различающийся эффект на форму эритроцитов и ее динамику. Исходя из результатов, полученных при исследовании влияния неорганических моновалентных анионов [14], которые обладают схожим действием, можно было предположить, что и органические анионы могли бы отличаться диапазоном действующих концентраций при сохранении общей закономерности влияния. В этом случае, по аналогии с неорганическими анионами, концентрационные зависимости их влияния на различные фазы МО должны иметь похожий вид. Это предположение подтверждается только для анионов оксалата и цитрата (рис. 2–7), которые имеют очень схожий характер влияния и одинаковый концентрационный диапазон. Анионы ацетата в некоторых аспектах также идентичны анионам оксалата и цитрата, однако тот факт, что зависимость времени максимума от концентрации анионов (рис. 6) имеет другой вид и ацетат не вызывает появления лага, показывают, что механизм действия ацетата не эквивалентен таковому для структурно близких анионов оксалата и цитрата. Аналогичные соображения можно привести для анионов тартрата и особенно для салицилата, Na_2E и Na_4E , которые еще более существенно отличаются от оксалата и цитрата. Таким образом, несмотря на кажущуюся похожесть кинетических кривых, приведенных на рис. 1, можно заключить, что механизм действия анионов, кроме оксалата и цитрата, принципиально отличаются как от этих анионов, так и между собой, поскольку имеют различные по характеру концентрационные зависимости эффектов в отношении различных фаз МО. Еще более сильно действие органических анионов отличается от действия неорганических моновалентных анионов [14].

Как было показано ранее, моновалентные неорганические анионы блокируют МО на любой фазе процесса и вызывают медленное восстановление дискоидной формы клеток при их добавлении в конце фазы 3 [14]. Можно было предположить, что эффект блокировки связан с увеличением ионной силы сахарозной среды, поскольку он является общим для всех этих анионов. Ионная сила среды рассматривается как один из факторов, ответственных за аномальное увеличение проницаемости мембраны для катионов в средах с низкой ионной силой [15]. Полученные нами данные, однако, позволяют полностью исключить ионную силу как причинный фактор, ответственный

за начальную сферуляцию клеток в сахарозной среде, поскольку для органических анионов увеличение ионной силы до 10 мМ (ацетат), наоборот, стимулирует не только начальную сферуляцию, но и сферуляцию на фазе 2 (рис. 1), а не подавляет ее, как в случае неорганических анионов [14]. Увеличение ионной силы, следовательно, является лишь сопутствующим процессом, сопровождающим увеличение концентрации анионов.

Интересно рассмотреть вопрос о том, в какой мере полученные данные соответствуют положениям теории бислойной пары (ТБП), которая лежит в основе наших представлений о механизмах регуляции формы эритроцитов [6]. Согласно этой теории вещества с противоположным типом действия в отношении формы эритроцитов должны компенсировать действие друг друга. Согласно нашим данным и данным работы [2] МО представляет собой последовательность морфологических преобразований в направлении эхиноцит – дискоцит – стоматоцит. Т.е. фаза 1 является эхиноцитарной, а последняя фаза 3 – стоматоцитарной. Причины, которые вызывают изменения формы именно в такой последовательности, в настоящее время неясны, однако можно проанализировать действие на него различных веществ с известным типом влияния на форму эритроцитов. Считается, что ацетат, оксалат и салицилат являются эхиноцитарными агентами, а цитрат и сама сахароза – стоматоцитарными [4]. ЭДТА считается нейтральным веществом [17], специфическое действие тартрата на форму клеток неизвестно. Исходя из ТБП следует ожидать, что эхиноцитарные агенты будут активировать фазу 1, ингибировать фазу 2 и способствовать восстановлению дискоидной формы эритроцитов будучи добавлены в конце фазы 3 (через 150 с). Напротив, стоматоцитарные агенты должны ингибировать фазу 1, активировать фазу 2 и не влиять или даже активировать фазу 3. Представленные данные показывают, что действие эхиноцитарных агентов ацетата, оксалата и салицилата удовлетворяет этим предсказаниям. Действие Na_2E также соответствует им если предположить, что этот анион обладает стоматоцитарным типом действия, что можно проверить экспериментально. Аналогично, действие тартрата в целом согласуется с предположением об эхиноцитарном типе действия этого агента. Таким образом, действие обозначенных выше веществ, в целом, находится в соответствии с положениями ТБП. С другой стороны, влияние цитрата максимально близко к действию оксалата, но он в отличие от него рассматривается как стоматоцитарный агент, т.е. действует противоположно тому, как предсказывает ТБП. Действие Na_4E является комплексным: на фазе 3 она сначала ведет себя как стоматоцитарный агент, а на фазе 1 как эхиноцитарный (рис. 1). Другие факты, не согласующиеся с представлениями ТБП в ходе МО получены в [24]. На наш взгляд эти несоответствия экспериментальных результатов теории бислойной пары еще не означают, что она не применима для описания МО, поскольку взятый из литературы тип действия веществ определялся, в основном, в физиологических условиях. Однако нельзя исключить, что он может измениться в неэлектролитных средах за счет действия дополнительных факторов, например, изменения мембранного потенциала [17–19]. В наших исследованиях органические анионы применялись в относительно небольших концентрациях, которые в физиологическом растворе не вызывали больших изменений формы клеток. В сахарозной среде их эффект был значительно сильнее, особенно при добавлении на максимуме МО, что приводило к мгновенной сферуляции эритроцитов (рис. 1). Следовательно, сахарозная среда увеличивает чувствительность эритроцитов к действию микроокружения. Подобное было продемонстрировано ранее в отношении литического пептида мелиттина [20]. Исходя из этого, а также учитывая то, что, практически, все органические анионы обладают собственной спецификой в отношении динамики изменения формы эритроцитов, исследование механизмов

регуляции формы этих клеток в многокомпонентных средах представляется сложной проблемой, поскольку кроме индивидуального действия компонентов нужно также учитывать эффекты их возможного взаимодействия. Вероятно из-за этого данные, полученные разными авторами, и их выводы значительно отличаются. Это относится, например, к дискуссии о влиянии мембранного потенциала на форму эритроцитов [17,21,22,23]. На наш взгляд, более надежные данные в этом отношении можно получить на простых экспериментальных системах, подобных нашей. По нашим данным мембранный потенциал, также как и ионная сила, по крайней мере в диапазоне до 10 мМ, не является фактором, регулирующим форму эритроцитов, поскольку наблюдаемая динамика МО и влияние на нее анионов показывает, что при одном и том же положительном трансмембранном потенциале клетки могут иметь форму как эхиноцитов, так и дискоцитов и стоматоцитов. Механизм этой трансформации остается неясным. Возможно, что в данном случае возрастает роль субстратной специфичности, когда конформационные изменения в транспортном белке в процессе связывания и транслокации определяются химической природой субстрата [25,26]. Поскольку органические анионы в той или иной степени являются субстратами для АЕ1, то их влияние на конформацию и, опосредованно, на форму эритроцитов, может определяться не ионной силой, а тем, в какой мере они стерически ему соответствуют. Например, предполагается, что скорость транспорта оксианионов определяется соответствием структуры аниона и его транспортного сайта на АЕ1 [27]. О роли субстратной специфичности говорят также факты, что модификация АЕ1 зависит от того какой субстрат хлорид или сульфат связан с АЕ1 в момент модификации [28]. В работе [29] показано, что изменение такого параметра как рН среды вызывает время зависимые изменения формы эритроцитов, где сферы образовывались как промежуточные формы между различными стационарными состояниями. Влияние градиента рН очень напоминает реакцию клеток на введение органических анионов на максимуме МО, где сферы также образовывались как промежуточные формы. Мы полагаем, что МО эритроцитов в сахарозной среде и изменения в динамике формы, индуцируемые анионами, можно рассматривать как генерализованную реакцию клеток на изменение ионного окружения.

ВЫВОДЫ

Установлено, что среди исследованных органических анионов только оксалат и цитрат обладали схожим действием в отношении динамики изменения формы эритроцитов в сахарозной среде и ее различных фаз. Другие анионы отличались по своему действию как от оксалата так и между собой, что указывает на специфичность их влияния на форму клеток в этих условиях. Полученные данные позволяют исключить влияние положительного трансмембранного потенциала и ионную силу среды как причинных факторов, обуславливающих изменения формы клеток в неэлектролитной среде, но не исключают участие в этих процессах конформационных перестроек мембранных белков. Предполагается, что морфологический ответ может быть одним из типов общей реакции клеток на изменение их ионного окружения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, Peters LL, Chasis JA, Delaunay J, Mohandas N, Anstee DJ, Tanner MJ. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 2003;101(10):4180-8.
2. Gimsa J, Ried C. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? . *Mol.Membr.Biol.* 1995;12(3):247-54.
3. Betz T, Bakowsky U, Muller MR, Lehr CM, Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2007;70:122-6.

4. Wong P. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte . *J.Theor.Biol.* 1999;196(3):343-61.
5. Руденко С.В., Мухамед Хани Румиех, Бондаренко В.А. Морфологическая реакция эритроцитов на изменение электролитного состава среды. II. Влияние ингибиторов анионного транспорта // *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Біофізичний вісник* – 2007. - Вип. 1(18). – С. 53-60.
6. Blank ME, Hoefner DM, Diedrich DF. Morphology and volume alterations of human erythrocytes caused by the anion transporter inhibitors, DIDS and p-azidobenzylphlorizin. *Biochim.Biophys.Acta* 1994;1192(2):223-33.
7. Jennings ML, Adame MF. Characterization of oxalate transport by the human erythrocyte band 3 protein. *J.Gen.Physiol.* 1996;107(1):145-59.
8. Gunn RB, Wieth JO, Tosteson DC. Some effects of low pH on chloride exchange in human red blood cells. *J.Gen.Physiol* 1975;65(6):731-49.
9. Dalmark M, Wieth JO. Temperature dependence of chloride, bromide, iodide, thiocyanate and salicylate transport in human red cells . *J.Physiol* 1972;224(3):583-610.
10. Gunn RB, Dalmark M, Tosteson DC, Wieth JO. Characteristics of chloride transport in human red blood cells. *J.Gen.Physiol* 1973;61(2):185-206.
11. Jennings ML, Schulz RK, Allen M. Effects of membrane potential on electrically silent transport. Potential-independent translocation and asymmetric potential-dependent substrate binding to the red blood cell anion exchange protein. *J.Gen.Physiol.* 1990;96(5):991-1012.
12. Liu SQ, Law FY, Knauf PA. Effects of external pH on substrate binding and on the inward chloride translocation rate constant of band 3 (PDF)(Reprint). *J.Gen.Physiol* 1996;107(2):271-91.
13. Salhany JM, Gaines ED. Steady state kinetics of erythrocyte anion exchange. Evidence for site-site interactions. *J.Biol.Chem.* 1981;256(21):11080-5.
14. Руденко С.В., Ши Л., Бондаренко В.А. Морфологическая реакция эритроцитов на изменение электролитного состава среды. III. Влияние моновалентных анионов // *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Біофізичний вісник* – 2008. - Вип. 1(18). -????
15. Bernhardt I, Erdmann A, Vogel R, Glaser R. Factors involved in the increase of K⁺ efflux of erythrocytes in low chloride media. *Biomed.Biochim.Acta* 1987;46(2-3):S36-S40
16. Sheetz MP, Singer SJ. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1974;71(11):4457-61.
17. Glaser R., Heinrich R., Gaestel M. Potential-induced shape transformation in human red blood cells (1982) *Studia biophysica.* V. 90, 155-156
18. Nwafor A., Coakley W.T. Drug-induced shape change in erythrocytes correlates with membrane potential change and is independent of glycocalyx charge // *Biochem. Pharmacol.* – 1985. – Vol.34, №18. – P. 3329–3336.
19. Nwafor A., Coakley W.T. Charge-independent effects of drugs on erythrocyte morphology // *Biochem. Pharmacol.* – 1986. – Vol.35, №6. – P. 953–957.
20. Rudenko, S.V., and Nipot, E.E. (1996) Protection by chlorpromazine, albumin and divalent cations of hemolysis induced by melittin, [ala-14]melittin and whole bee venom. *Biochem. J.* 317, N3, 747-754.
21. Glaser R. Does the transmembrane potential (Deltapsi) or the intracellular pH (pHi) control the shape of human erythrocytes? *Biophys.J.* 1998;75(1):569-70.
22. M.M. Gedde, D.K. Davis, W.H. Huestis, Cytoplasmic pH and human erythrocyte shape. *Biophys.J.* 72 (1997) 1234-1246.
23. M.M. Gedde, W.H. Huestis, Membrane potential and human erythrocyte shape. *Biophys.J.* 72 (1997) 1220-1233.
24. Руденко С.В., Мухамед Хани Румиех, Бондаренко В.А. Морфологическая реакция эритроцитов на изменение электролитного состава среды. I. Влияние альбумина // *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія* – 2007. №768, Вип. 5. – С. 150-156.
25. Krupka RM. Role of substrate binding forces in exchange-only transport systems: II. Implications for the mechanism of the anion exchanger of red cells. *J.Membr.Biol.* 1989;109(2):159-71.
26. Deves R, Krupka RM. The binding and translocation steps in transport as related to substrate structure. A study of the choline carrier of erythrocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1979;557(2):469-85.
27. Galanter WL, Hakimian M, Labotka RJ. Structural determinants of substrate specificity of the erythrocyte anion transporter. *Am.J.Physiol.* 1993;265(4 Pt 1):C918-C926
28. Ruffing W, Gartner EM, Lepke S, Legrum B, Passow H. Transport-related conformational states of the band 3 protein: probing with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le.-grand.)* 1996;42(7):1097-118.
29. Hoffman,J.F. On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells *Blood Cells.* 1987, 12, 565-588.