

УДК: 577.3

**ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАТОРОВ НА КАТИОН-ИНДУЦИРУЕМУЮ АГРЕГАЦИЮ ЭРИТРОЦИТОВ
С.В.Руденко¹, Важди Кхалаф Жамиль Маданат², В.А.Бондаренко¹**¹*Институт проблем криобиологии и криомедицины (Харьков, Украина)*²*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*

Показано, что трехвалентные ионы галлия, подобно ионам лантана, вызывают агрегацию эритроцитов человека. Агрегация исследовалась оптическим методом на приборе ФА-01 и количественно оценивалась параметрами кинетической кривой, которые были специально разработаны для этой цели. Исследование влияния ряда модификаторов мембраны, влияющих и не влияющих на форму эритроцитов, на процесс агрегации показал, что наиболее сильным действием обладают А23187, додецилсульфат натрия и DIDS. Эти вещества достоверно изменяют дисперсность агрегатов, т.е. их распределение по размерам в сторону уменьшения. Во второй, более слабой группе, находятся SITS, DNDS и СССР, которые имеют тенденцию изменять агрегатное состояние, в третьей группе СТАВ и Lys₀, которые меняют только кинетические параметры агрегации и, наконец, замыкает этот ряд группа нейтральных веществ Crg, NEM, p-CMBS, спермидин и гуанидин, которые существенно на агрегацию не влияют.

Ключевые слова: *галлий, эритроциты, агрегация, трехвалентные катионы, мембранные модификаторы.*

Введение

Известно, что трехвалентные ионы лантана вызывают вынужденную агрегацию и слияние отмытых эритроцитов (Шереметьев и др., 2000; Шереметьев, Шереметьева, 2003а, 2003б). Хотя механизм явления и остается не вполне ясным, очевидно, что агрегация клеток связана с адгезивными свойствами клеточной поверхности. В предварительных экспериментах мы установили, что трехвалентные ионы галлия, подобно ионам лантана, также обладают свойством агрегировать эритроциты. Изменение формы эритроцитов под действием модификаторов может отразиться на их поверхностных свойствах или наоборот, изменение поверхностных свойств мембраны может привести к кренированию клетки. Можно предположить, что модификаторы за счет изменения поверхностных свойств мембраны могут влиять на агрегацию. Мы полагали, что ионы Ga³⁺ могут быть использованы в качестве индикатора, который мог бы зафиксировать изменения в поверхностных свойствах мембран после их обработки модификаторами. С другой стороны, влияние модификаторов на Ga³⁺-индуцируемую агрегацию представляет собой самостоятельный интерес с точки зрения выяснения ее механизма, поскольку сведения такого рода в литературе отсутствуют.

Материалы и методы

Работу проводили на эритроцитах человека, которые получали стандартным методом центрифугирования в изотоническом растворе HBS (150 мМ NaCl, 5 мМ HEPES, pH 7,4). Для изучения изменений формы клеток во времени и их агрегации использовали разработанный и изготовленный нами двухканальный формометр-агрегометр ФА-01, который наряду с измерением оптической плотности (ОП) или светопропускания измеряет и флуктуации интенсивности светового потока, которые несут информацию о форме клеток. В ФА-01 применено специальное устройство, состоящее из фильтра низких частот, который выделяет высокочастотную составляющую интенсивности светового потока, масштабного усилителя и последующего программного блока обработки, который вычисляет среднеквадратичное значение амплитуды флуктуаций светового потока. Индекс формы (ИФ) рассчитывался по протоколу, описанному ранее для определения формы эритроцитов (Руденко и др., 1998) и вычислялся по формуле $ИФ = k \cdot D$ где k – постоянный коэффициент, зависящий от коэффициента усиления сигнала и от калибровки прибора, а D – среднеквадратичное значение амплитуды флуктуаций светового потока. Калибровочный коэффициент k позволяет сформировать шкалу измерений ИФ, который отражает степень дискоидности эритроцитов. В цилиндрическую стеклянную или пластиковую кювету диаметром 10 мм, содержащую 2 мл HBS, добавляли 10–12 мкл сток-суспензии эритроцитов таким образом, чтобы начальное значение ОП было в пределах $0,30 \pm 0,02$, что соответствует концентрации эритроцитов порядка $6 \cdot 10^6$ в 1 мл. Клеточная суспензия перемешивалась магнитной мешалкой со скоростью 600 об/мин. Для модификации эритроцитов в кювету добавляли от 5 до 100 мкл концентрированных растворов исследуемых веществ до заданной конечной концентрации, добавляли ионы галлия и регистрировали изменения ОП и ИФ во времени. В качестве модификаторов, т.е. веществ, потенциально меняющих форму эритроцитов, использовали

следующие соединения: 4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-Disulfonic Acid (DIDS), 4-Acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic Acid (SITS), 4,4'-dinitrostilbene-2,2'-disulfonic acid (DNDS), sodium dodecyl sulfate (SDS), cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone (CCCP), A23187, 4-Chloromercuribenzenesulfonate (p-CMBS), хлорпромазин (Cpr), лизолецитин (Lyso), n-этилмалеймид (NEM), гуанидин-HCl, спермидин. На рисунках представлены типичные данные, от 3 до 5 независимых экспериментов, проведенных с кровью различных доноров.

Результаты и обсуждение

Существует несколько подходов к исследованию агрегации эритроцитов. Для ее исследования могут быть использованы различные методы, в частности метод СОЭ, селектометрия (Dobbe et al., 2003), в которой одновременно может оцениваться агрегация и восстановление формы клеток после снятия сдвигового напряжения, метод ультразвукового обратного рассеивания, который может учитывать полидисперсность в размере, форме и ориентации агрегатов в потоке (Fontaine et al., 2002), оптический метод (slide test) для определения адгезивности/агрегативности эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов (Fusman et al., 2001). Агрегация может определяться с помощью оптического ротационного клеточного анализатора (LORCA), который определяет статические и динамические параметры процесса агрегации, т.е. общую степень агрегации, полу-время агрегации и их комбинацию, определяемую как агрегационный индекс (Hardeman et al., 2004). Эритроцитарный агрегометр, основанный на анализе обратно рассеянного света, описан в работе (Wang et al., 1997). Он позволяет подойти к феномену агрегации с точки зрения кинетики, структурных и реологических параметров. В работе (Zhao et al., 1999) сравнивались три оптических метода для определения агрегации эритроцитов, и было установлено, что различные методы не дают полностью идентичных результатов. Таким образом, на сегодняшний день не предложено общепринятого метода для определения агрегации эритроцитов. Следовательно, при использовании индивидуального метода необходимо предварительно охарактеризовать его в отношении способности определять те или иные параметры агрегации. Исходя из этого, для исследования агрегации был использован оптический формомер-агрегометр ФА-01. На первом этапе работы мы старались охарактеризовать процесс агрегации применительно к нашим условиям и определить количественные или качественные параметры, которые могли служить той или иной количественной мерой процесса. Простое перенесение известных параметров, характеризующих процесс агрегации клеток, в частности тромбоцитов, таких как степень, время или скорость агрегации, или параметров, определяемых другими приборами, оказалось невозможным из-за большой неопределенности и, соответственно, большой погрешности, возникающей при измерении и интерпретации этих величин, которые детально проанализированы в работе (Руденко, 2005). Для оценки слабых влияний модификаторов на агрегацию, если таковые имеют место, мы использовали разработанные нами параметры. На рис. 1 показаны три типичных примера агрегации эритроцитов, индуцированной Ga^{3+} , в присутствии и отсутствии модификаторов DNDS и SDS, которые иллюстрируют, какие изменения могут наблюдаться на кинетических кривых. Из контрольной кривой 1 видно, что процесс агрегации сопровождается плавным уменьшением ОП и волнообразным изменением ИФ, который сначала уменьшается, достигает минимума, а затем снова увеличивается и выходит на плато. В работе (Руденко, 2006) показано, что агрегация, индуцированная лантаном, также как и в случае ионов галлия, является 100%, и поэтому конечное значение ОП A_{600} не является мерой агрегации, как это принято в классической агрегометрии, но, тем не менее, может являться параметром, который характеризует агрегатное состояние системы. Меньшее значение A_{600} характеризует крупные агрегаты, большее значение A_{600} соответствует более мелким агрегатам. С размерами агрегатов, но противоположным образом, также связан и ИФ. Как видно из кривой 3, обработка клеток приводит к увеличению A_{600} и уменьшению $ИФ_{600}$ по сравнению с контролем, что показывает, что в этом случае формируются более мелкие агрегаты. Характерной особенностью агрегации дискоидных клеток является то, что ИФ в ходе агрегации достигает минимума, который соответствует начальному мелкодисперсному агрегатному состоянию (MAC) системы (дублеты и триплеты), которые, будучи более сферопобными, чем исходные дискоциты, и вызывают уменьшение ИФ, причем, как правило, до фиксированной величины $0,25 \pm 0,02$. Из кривой 2 рис. 1 видно, что кренирование клеток под действием DNDS, что сопровождается уменьшением ИФ, приводит к сдвигу положения минимума ИФ при агрегации влево относительно контроля. Этот сдвиг, в принципе, можно интерпретировать как то, что модификатор ускоряет формирование MAC, и использовать величину сдвига для количественной характеристики действия модификатора, но если действие его достаточно сильно, то, как следует из кривой 3, положение этого минимума и значение ИФ в нем определить не представляется возможным. По этой причине величину ИФ в минимуме и его положение нельзя использовать для количественной характеристики действия модификаторов во всех случаях. Нам представляется более разумным использовать для этого параметр, определяемый как максимальный временной

сдвиг между контрольными и экспериментальными кривыми ОП и ИФ – $\Delta T_{\max} = T_{\text{конт}} - T_{\text{эксп}}$. Необходимость использования одновременно обеих зависимостей определяется тем, что процесс агрегации в определенной степени независимо характеризуется каждой из них (Руденко, 2006). Например, временной сдвиг зависимости ОП между контролем и кривой SDS (кривая 3) невелик, но значителен для зависимости ИФ. Это определенно свидетельствует о том, что SDS вмешивается в процесс агрегации и ускоряет его на определенной фазе роста агрегатов. Для DNDS эта разница больше видна на кривых ОП, чем ИФ. Знак этого параметра также является существенным – если экспериментальная кривая сдвигается влево, то он отрицательный (для стимулирующих веществ), если вправо, то положительный (для ингибирующих веществ).

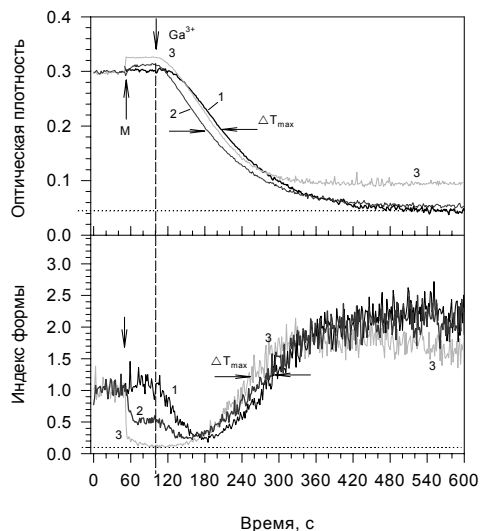


Рис. 1. Влияние модификаторов формы эритроцитов на их Ga^{3+} -индуцируемую агрегацию. Стрелками с надписью М и Ga^{3+} показано добавление агентов и ионов галлия до конечной концентрации 1 мМ, соответственно. Конечные концентрации агентов: 1 – контроль, 2 – DNDS – 10 мкМ, 3 – SDS – 20 мкМ

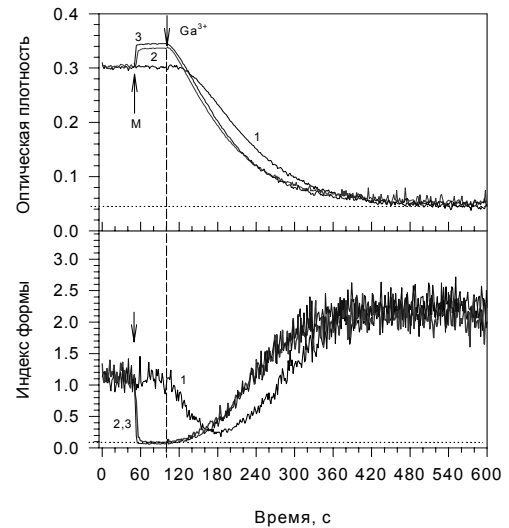


Рис. 2. Влияние модификаторов формы эритроцитов на их Ga^{3+} -индуцируемую агрегацию. Стрелками с надписью М и Ga^{3+} показано добавление агентов и ионов галлия до конечной концентрации 1 мМ, соответственно. Конечные концентрации агентов: 1 – контроль, 2 – СТАВ – 0,3 мкМ, 3 – Lyso – 20 мкМ

Предложенный способ количественной оценки влияния модификаторов на агрегацию, разумеется, не универсален, поскольку агрегация представляет собой сложный многостадийный процесс, и вещества могут оказывать свое влияние на разных фазах процесса, что может и не отразиться на указанных параметрах. Поэтому большое, если не определяющее, значение имеет сам характер процесса, который мы разделили на три типа – контроль (тип 1), типа DNDS (тип 2) и типа SDS (тип 3). Как видно, в основном, они различаются степенью сферуляции клеток перед добавлением индуктора Ga^{3+} . На рис. 2 показано влияние на агрегацию СТАВ и лизолецитина, из которого видно, что оба агента (3 тип агрегации) действуют идентично, не изменяя конечных количественных параметров кривой A_{600} и ИФ_{600} , но увеличивают скорость изменения ОП на начальном этапе и сдвигают кривую влево на 50 ± 3 с. Другие агенты Срг (тип 2) и гуанидин (тип 1), несмотря на очевидную разницу между ними в преобразовании формы клеток, не влияют на дальнейший ход агрегации, что проявляется в том, что соответствующие кривые накладываются одна на другую. Это также является демонстрацией чувствительности и воспроизводимости метода, который показывает, что различия в кривых действительно обусловлены различиями в процессе агрегации, протекающем в тех или иных условиях, а не иными побочными причинами. Данные о влиянии всех веществ на агрегацию суммированы в таблице. Их анализ позволяет сделать несколько заключений. Во-первых, среди исследованных модификаторов выделяется группа, состоящая из NEM, спермидина, гуанидина и p-CMBS, которые практически не влияют на агрегацию, за исключением того, что могут вызывать минимальный временной сдвиг между контрольной и экспериментальной кривыми. Все они относятся к 1 типу агрегации, очень слабо влияя на форму эритроцитов. К этой группе примыкает хлорпромазин, который хотя и изменяет форму клеток выраженным образом, тем не менее, не оказывает влияние на кинетику агрегации (рис. 3). Во-вторых, среди остальных агентов, которые оказывают влияние на параметры агрегации, можно выделить

групу, которая достоверно изменяет одновременно все три параметра A_{600} , $ИФ_{600}$ и ΔT_{max} (DIDS, SDS, A23187), группу, которая изменяет только один параметр ΔT_{max} (STAB и Lyso) и группу, в которой изменения параметров носят характер тенденции (SITS, DNDS, СССР).

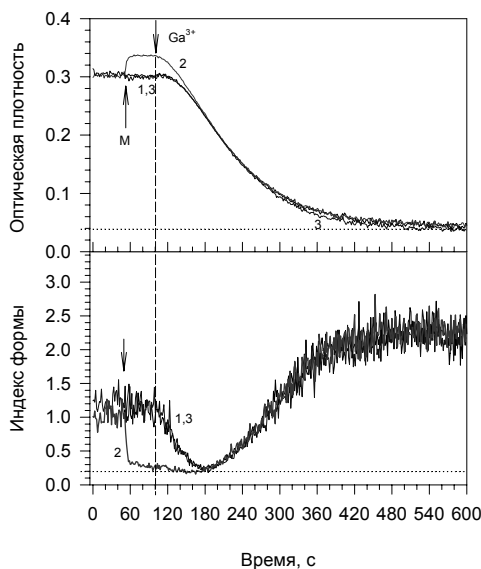


Рис. 3. Влияние модификаторов формы эритроцитов на их Ga^{3+} -индуцируемую агрегацию. Стрелками с надписью M и Ga^{3+} показано добавление агентов и ионов галлия до конечной концентрации 1 мМ, соответственно
Конечные концентрации агентов:
1 – контроль,
2 – $Sr-g$ – 6 мкМ,
3 – гуанидин – 5 мМ

В-третьих, на основании изменения параметра ΔT_{max} можно заключить, что влияющие вещества относятся к стимуляторам агрегации. Понятие стимуляции, тем не менее, требует некоторого уточнения и конкретизации. Под действием стимулятора процесс агрегации может ускориться, качественно оставаясь тем же самым. Это означает, что система осуществит тот же самый переход из мономерного агрегатного состояния (суспензия одиночных клеток) в конечное состояние, которое характеризуется неким распределением агрегатов по размерам, по той же траектории, но за меньшее время. Этой ситуации будет соответствовать временной сдвиг между контрольной и экспериментальными кривыми агрегации и постоянство A_{600} и $ИФ_{600}$, которые характеризуют агрегатное состояние системы. Мы полагаем, что STAB и Lyso действуют по такому механизму. С другой стороны, модификатор может вызвать такого рода изменения клеточной поверхности, что приведет не только к изменению кинетических параметров процесса агрегации, но и к изменению структурных параметров, таких как форма формирующихся агрегатов и их распределение по размерам. Как указывается в работе (Руденко, 2006), одновременное увеличение параметра A_{600} и уменьшение $ИФ_{600}$ свидетельствует о переходе системы агрегатов в более мелкодисперсное состояние. С этой точки зрения агенты, которые ведут себя подобным образом, могут рассматриваться и как ингибиторы, поскольку они способны ограничивать рост крупных агрегатов. Сложность ситуации заключается в том, что агрегация может, в принципе, обладать свойствами аутоингибируемого процесса – скорость которого велика на начальных фазах процесса, но резко падает по мере выработки ингибирующего продукта. Ясно, что для характеристики такого процесса нужно вводить дополнительные параметры или искать иные способы его описания. Поскольку задачей нашего исследования на данном этапе было установить, в какой мере модификаторы способны влиять на процесс индуцированной агрегации эритроцитов, мы полагаем, что ответ на него может быть дан в виде интегральной оценки силы влияния, которая основывается на следующей градации. Мы считаем, что наибольшее влияние на процесс агрегации оказывают те вещества, которые способны изменить дисперсность системы, и меньшее те вещества, которые влияют только на временные характеристики процесса, не затрагивая его фазовую структуру. Исходя из таких представлений, мы можем заключить, что наиболее сильным влиянием на агрегацию обладают $A23187 > SDS > DIDS$, которые приводят к достоверному изменению дисперсности агрегатов (т.е. распределению по размерам и форме). Во второй, более слабой группе, находятся SITS, DNDS и СССР, которые имеют тенденцию изменять агрегатное состояние, в третьей группе STAB и Lyso, которые меняют только кинетические параметры агрегации и, наконец, замыкает этот ряд группа нейтральных веществ $Sr-g$, NEM, p -CMBS, спермидин и гуанидин, которые существенно на агрегацию не влияют.

Таблица.

Влияние модификаторов формы на параметры Ga^{3+} -индуцируемой агрегации

Соединение	параметр			
	A_{600}	$ИФ_{600}$	$\Delta T_{max}, c$	тип
Контроль	0,045±0,004	2,25±0,008	–	1
DIDS 2 мкМ	0,065±0,004*	1,85±0,07*	–30±5	2
SITS 0,2 мкМ	0,05±0,006	2,05±0,08	–24±4	2
DNDS 20 мкМ	0,044±0,005	2,0±0,08	–33±4	3
СТАВ 0,3 мкМ	0,054±0,005	2,08±0,08	–50±7	3
SDS 20 мкМ	0,094±0,009*	1,65±0,08*	–35±5	3
Срг 6 мкМ	0,046±0,006	2,25±0,11	0	2
СССР 50 мкМ	0,053±0,005	1,95±0,09	–30±5	2
A23187 30 мкМ	0,1±0,01*	1,6±0,08*	–55±8	2
Лизолецитин 0,2 мМ	0,050±0,005	2,25±0,11	–50±7	3
NEM 10 мМ	0,054±0,007	2,2±0,11	–20±10	1
Спермидин 1 мМ	0,046±0,006	2,25±0,10	–10±3	1
Гуанидин 10 мМ	0,046±0,006	2,25±0,09	–7±3	1
p-CMBS 0,1 мМ	0,043±0,006	2,15±0,08	–20±4	1

Параметры определялись из кинетических кривых агрегации, подобных приведенным на рис. 1. (среднее±ст.откл.) (* – различия значимы относительно контроля $p < 0,05$).

Список литературы

- Руденко С.В. Артефакты традиционной агрегометрии // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – №7. – С. 41–46.
- Руденко С.В. Агрегация эритроцитов как модель агрегации тромбоцитов // Биологические мембраны. – 2006. – Т.23, №1. – С. 60–68.
- Руденко С.В., Кроуф Дж.Х., Таблин Ф. Изменение формы эритроцитов в зависимости от времени // Биохимия. – 1998. – Т.63, №12. – С. 46–55.
- Шереметьев Ю.А., Суслов Ф.Ю., Дерюгина А.В., Шереметьева А.В. Влияние нейроменидазы и протеолитических энзимов на электрофоретическую мобильность эритроцитов и их агрегацию, индуцированную La^{3+} // Биофизика. – 2000. – Т.45, №1. – С. 79–82.
- Шереметьев Ю.А., Шереметьева А.В. Влияние La^{3+} на электрофоретическую подвижность и агрегацию интактных и обработанных низкими концентрациями глутарового альдегида эритроцитов человека // Биофизика. – 2003. – Т.48, №1. – С. 63–67 (а).
- Шереметьев Ю.А., Шереметьева А.В. Влияние диамида на деформируемость и La^{3+} -индуцируемые агрегацию и слияние эритроцитов человека // Биофизика. – 2003. – Т.48, №2. – С. 256–258 (б).
- Dobbe J.G., Streekstra G.J., Strackee J. et al. Sylllectometry: the effect of aggregometer geometry in the assessment of red blood cell shape recovery and aggregation // IEEE Trans. Biomed. Eng. – 2003. – Vol.50, №1. – P. 97–106.
- Fontaine I., Savery D., Cloutier G. Simulation of ultrasound backscattering by red cell aggregates: effect of shear rate and anisotropy // Biophys. J. – 2002. – Vol.82, №4. – P. 1696–1710.

- Fusman R., Rotstein R., Elishkewich K. et al. Image analysis for the detection of increased erythrocyte, leukocyte and platelet adhesiveness/aggregation in the peripheral blood of patients with diabetes mellitus // Acta Diabetol. – 2001. – Vol.38, №3. – P. 129–134.
- Hardeman M.R., Dobbe J.G., Ince C. The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer // Clin. Hemorheol. Microcirc. – 2004. – Vol.25, №1. – P. 1–11.
- Wang H., Yang J., Fan J. et al. The development of a laser back-scattering erythrocyte-aggregometer // Zhongguo. Yi. Liao. Qi. Xie. Za. Zhi. – 1997. – Vol.21, №2. – P. 71–74.
- Zhao H., Wang X., Stoltz J.F. Comparison of three optical methods to study erythrocyte aggregation // Clin. Hemorheol. Microcirc. – 1999. – Vol.21, № 3–4. – P. 297–302.

ВПЛИВ МОДИФІКАТОРІВ НА КАТІОН-ІНДУКОВАНУ АГРЕГАЦІЮ ЕРИТРОЦИТІВ

С.В.Руденко, Важді Кхалаф Жаміль Маданат, В.А.Бондаренко

Показано, що тривалентні іони галію, подібно до іонів лантану, викликають агрегацію еритроцитів людини. Агрегацію досліджували оптичним методом на приладі ФА-01 і кількісно оцінювали параметрами кінетичної кривої, які були спеціально розроблені для цієї мети. Дослідження впливу ряду модифікаторів мембрани, що впливають і не впливають на форму еритроцитів, на процес агрегації, показало, що найбільший вплив мають А23187, додецилсульфат натрію та DIDS. Ці речовини достовірно змінюють дисперсність агрегатів, тобто їх розподіл за розмірами у бік зменшення. У другій, більш слабкій групі, знаходяться SITS, DNDS и СССР, які мають тенденцію змінювати агрегатний стан, у третій групі CTAB і Lyso, які змінюють тільки кінетичні параметри агрегації, і завершує цей ряд група нейтральних речовин Cpr, NEM, p-CMBS, спермідин та гуанідин, які суттєво на агрегацію не впливають.

Ключові слова: *галій, еритроцити, агрегація, трьохвалентні катіони, мембранні модифікатори.*

EFFECT OF MODIFIATORS ON CATION-INDUCED AGGREGATION OF ERYTHROCYTES

S.V.Rudenko, Wajdi Khalaf Jamil Madanat, V.A.Bondarenko

It is shown that multivalent gallium ions similar to lanthanum cause aggregation of human erythrocytes. Aggregation was studied using optical principle on shapemeter-aggregometer SA-01 by means of special designed parameters obtained from kinetic curve of aggregation. Studying of effect of modifiers either having or not an influence on shape of cells showed that A23187, SDS and DIDS had a maximal effect. These substances changed substantially dispersity of aggregates i.e. their size distribution reducing the size of aggregates. In the second little bit weaker group was SITS, DNDS and СССР which had a tendency to change an aggregation state of the system. CTAB and Lyso belong to third group which changed only kinetic parameters of aggregation. Finally, Cpr, NEM, p-CMBS, spermidine and guanidine did not influence the aggregation.

Key words: *gallium, erythrocytes, aggregation, trivalent cations, modifiers of membrane.*

Представлено Т.П.Бондаренко
Рекомендовано до друку В.В.Клименком