

УДК 577.1 : 57.043

© 1991 г.

*ШПАКОВА Н. М., СЕМЕНЧЕНКО А. Ю., БОНДАРЕНКО В. А.***МОДИФИЦИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ КОНКАНАВАЛИНА А И ДИАМИДА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ К ХОЛОДОВОМУ ШОКУ**

Ключевые слова: эритроцит, холодовой шок, цитоскелет, конканавалин А, диамид.

Установлено, что температура (0 и 37°) и тоничность среды (0,15–1,20 М NaCl) оказывают влияние на агглютинацию эритроцитов конканавалином А. Обработка клеток лектином не приводит к существенному уменьшению уровня гемолиза эритроцитов при охлаждении. В отличие от конканавалина А диамид в концентрации выше 2,0 мМ вызывает снижение чувствительности клеток к холодному шоку. Изменение чувствительности эритроцитов к охлаждению в интервале 37–0° коррелирует с изменением электрофоретического спектра белков мембраны. После обработки диамидом отмечалось прогрессирующее уменьшение интенсивности спектральных полос с одновременным формированием высокомолекулярных белковых агрегатов, не входящих в гель. Эффект диамида зависит от тоничности среды, при которой производится обработка клеток, что особенно выражено в гипертонических средах с концентрацией NaCl 0,8–1,2 М. В указанных условиях агрегация спектрина была максимальной. Указывается, что в основе механизма гипертонического холодного шока эритроцитов лежит усиление ассоциации периферических белков скелета с плазматической мембраной в осмотически обезвоженных клетках, что ограничивает способность липидов адаптироваться в процессе охлаждения и приводит к стабилизации дефектов в структуре мембраны, формирующихся при низкой температуре. Диамид может устранять эти неблагоприятные изменения, вызывая диссоциацию периферических белков от цитоплазматической поверхности мембраны при агрегации последних.

Известно, что охлаждение многих клеток в области положительных температур (37–0°) вызывает их повреждение [1, 2]. Это явление, названное «холодовым шоком», характерно и для эритроцитов человека [3, 4]. Холодовой шок эритроцитов развивается как после их предварительной обработки некоторыми химическими соединениями, так и в процессе охлаждения в гипертонических растворах солей и сахаров [4, 5]. Сенсibiliзирующее действие гипертонических сред проявляется в нарушении барьерной функции мембраны и в утечке внутриклеточных электролитов на этапах, предшествующих сдвигу температуры [5]. Было высказано предположение, что процессом, приводящим к лизису клеток при сдвиге температуры от 37 до 0°, является фазовое разделение липидов, вызывающее увеличение размеров и времени жизни трансмембранных дефектов, формирующихся при экспонировании клеток в гипертонических растворах [3, 6].

Несмотря на значительный объем экспериментальных данных, полученных при изучении холодного шока [3, 4, 6], до сих пор остается неясным, какова последовательность процессов, вызывающих изменение состояния клетки и приводящих к ее лизису при охлаждении. Соответственно можно говорить и об отсутствии подходов, позволяющих огра-

ничивать или предупреждать холодовой шок. С учетом этого настоящая работа посвящена изучению особенностей развития холодового шока в условиях, когда эритроциты предварительно модифицировались химическими соединениями, изменяющими состояние основных структурных систем клетки, контролирующих их устойчивость к охлаждению,— белкового скелета и плазматической мембраны.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эритроциты получали из донорской крови II группы (срок хранения не более 2 суток). После удаления плазмы эритроциты дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4) и готовили суспензию эритроцитов с нужным гематокритом.

Для изучения влияния осмотических факторов суспензию эритроцитов (1%-ный гематокрит) помещали на 15 мин в различные среды при температуре 0 и 37°. Холодовой шок осуществляли переносом проб, проинкубированных при 37° в течение 15 мин, в ледяную баню на 15 мин (скорость охлаждения до 0° — 1–2 град/с). Контроль температуры осуществляли с помощью медь-капельного термоэлектрического преобразователя.

Определение агглютинации эритроцитов под действием конканавалина А проводили по методу Синджера и Моррисона [7]. Клетки (10%-ный гематокрит) предварительно инкубировали в течение 20 мин в средах с концентрацией NaCl 0,15–1,20 М при температуре 0 и 37°. Затем 0,1 мл суспензии переносили в одинаковые пробирки, содержащие 1,0 мл раствора NaCl той же тоничности, при которой до этого находились эритроциты, с конканавалином А (130 мкг/мл) и без него. Поглощение определяли при длине волны 543 нм на спектрофотометре СФ-26. Процент агглютинации рассчитывали по формуле: $100\% - 100\% \left(\frac{A_{\text{пробы с лектином}}}{A_{\text{пробы без лектина}}} \right)$. При необходимости вводили поправку на гемолиз [8].

Обработку клеток диамидом проводили по методу, предложенному Хэстом с соавт. [9].

Тени эритроцитов получали по методу, разработанному Стэком [10].

Электрофоретическое разделение мембранных белков осуществляли в пластинах полиакриламидного геля, содержащего 0,1% додецилсульфата натрия, по методу, описанному Джордж с соавт. [11]. Для разделения белков использовали прибор Мультифор II фирмы «ЛКБ» (Швеция). Пробы для электрофореза готовили растворением осажденных мембран в растворе DS-Na с последующим нагреванием при 100° в течение 3 мин. Вещества, восстанавливающие дисульфидные связи, в эксперименте не применяли.

Все используемые в работе реактивы имели квалификацию х. ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа изменений состояния поверхности мембран эритроцитов в процессе инкубации в гипертонических растворах хлористого натрия при 0 и 37° мы использовали конканавалин А, который связывается с рецептором, расположенным на молекуле одного из интегральных белков мембраны — белка полосы 3 [12]. Характер модификации белков лектинами может отражать реакцию поверхностных компонентов мембраны клетки на изменение условий среды [13], т. е. по изменению характера агглютинации эритроцитов в присутствии конканавалина А можно оценивать взаимосвязь между изменением состояния клеточной поверхности и условиями, в которых находится клетка.

Как видно из данных, представленных на рис. 1, влияние тоничности среды (0,15–1,20 М NaCl) на характер агглютинации эритроцитов конканавалином А как при 0, так и при 37° является в общих чертах сходным. В обоих случаях имеет место первоначальное снижение уровня агглютинации, которое затем сменяется его возрастанием. Температура влияет на зависимую от тоничности среды агглютинацию клеток только в интервале концентраций NaCl 0,75–1,20 М, т. е. при значениях тоничности, когда структура и проницаемость мембраны модифицируются

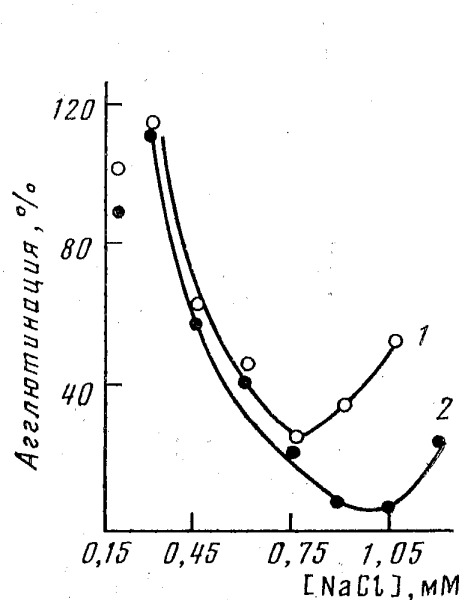


Рис. 1

Рис. 1. Действие различных концентраций NaCl на уровень агглютинации эритроцитов, подвергнутых инкубации при 37° (1) и 0° (2) (за 100% принят уровень агглютинации клеток в среде, содержащей 0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4)

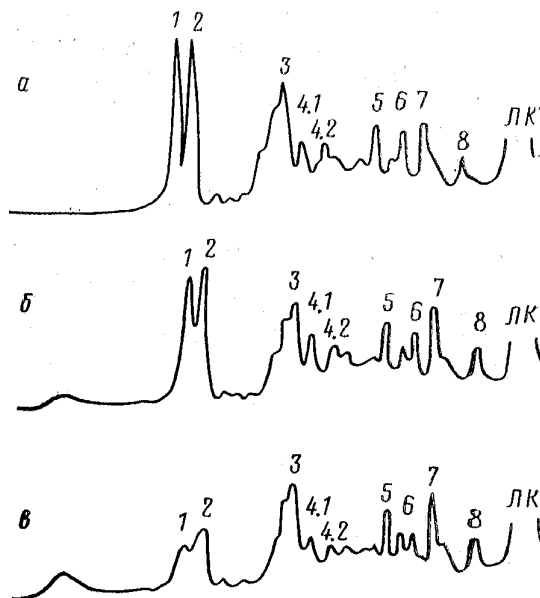


Рис. 2

Рис. 2. Денситограммы мембранных белков эритроцитов, обработанных диамидом в концентрации 2,0 (б) и 5,0 мМ (в), а — контроль

[5]. Поэтому различия в характере агглютинации эритроцитов при 0 и 37° в присутствии конканавалина А могут отражать неодинаковый структурный ответ клеток на действие гипертонических концентраций солей при указанных температурах.

Анализ действия конканавалина А на холодовой шок эритроцитов показывает, что предварительная обработка лектином незначительно снижает уровень гемолиза клеток при охлаждении от 37 до 0° (не более чем на 5—7%). С учетом этого можно сделать вывод, что локализованные изменения структуры мембран эритроцитов, охватывающие белок полосы 3, не оказывают значительного влияния на чувствительность клеток к холодовому шоку. В свою очередь зависимое от температуры изменение характера агглютинации эритроцитов в средах, содержащих 0,75—1,20 М NaCl (рис. 1), может отражать модификацию состояния мембранных липидов. Помимо этого, согласно данным Робинсона с соавт. [14], основной сиалопротеид PAS-1 также связывает конканавалин А. С учетом этого не исключена возможность селективного связывания конканавалина А с различными белковыми рецепторами при 37 и 0°.

Из полученных данных можно сделать вывод, что локализованные изменения интегральных белковых компонентов мембраны, которые индуцируются на фоне модификации цитоскелета под влиянием осмотического стресса, не оказывают существенного влияния на состояние эритроцитов, подвергшихся охлаждению. В связи с этим существенное значение представляет вопрос о механизме, посредством которого осмотический стресс модифицирует структуру цитоскелета и влияет на устойчивость клеток к последующему охлаждению.

Для этого проводились эксперименты, в которых использовался сульфгидрильный реагент — диамид, способный сшивать спектрин ди-

Рис. 3. Уровень гемолиза эритроцитов, обработанных диамидом в среде, содержащей 1,20 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4, при охлаждении от 37 до 0°

Рис. 4. Денситограммы мембранных белков эритроцитов, обработанных диамидом (1,0 мМ) в гипертонических условиях (концентрация NaCl: 0,15 (а), 0,80 (б, в), 1,20 М (г, д)): а, б, г — контроль, в, д — диамид

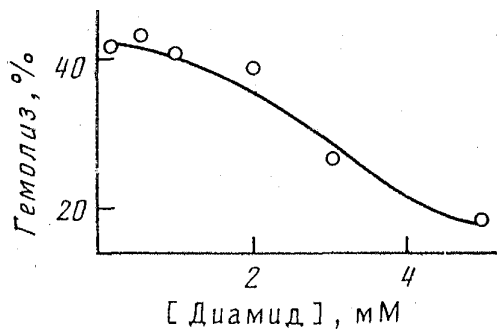


Рис. 3

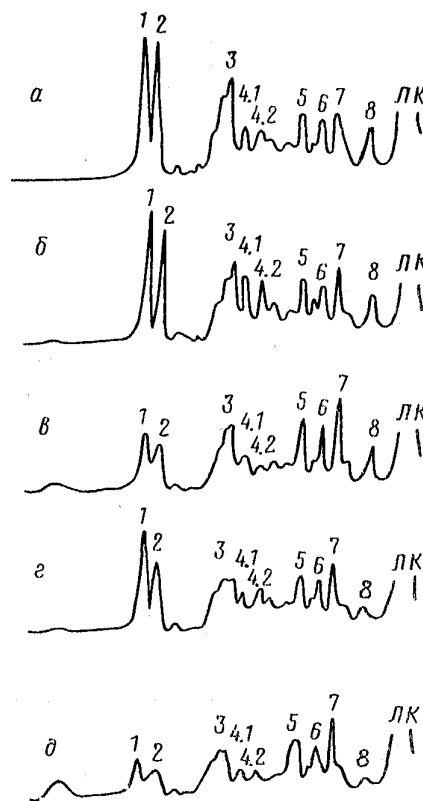


Рис. 4

сульфидными связями [9]. Как видно из данных, представленных на рис. 2, диамид в концентрациях 2,0 и 5,0 мМ резко изменяет электрофоретический спектр белков мембраны эритроцита, что проявляется в прогрессирующем уменьшении интенсивности спектриновых полос с одновременным формированием белковых агрегатов, не входящих в гель. Наблюдаемая картина совпадает с данными, полученными Хёстом с соавт. [9].

Для того чтобы выявить взаимосвязь между характером химической модификации скелета эритроцитов и их чувствительностью к холодовому шоку, параллельно были проведены эксперименты, в которых эритроциты, обработанные диамидом (0,5—5,0 мМ), охлаждались от 37 до 0° в присутствии 1,20 М NaCl (рис. 3). Видно, что при повышении концентрации диамида выше 2,0 мМ чувствительность эритроцитов к охлаждению в гипертонических средах резко снижается, что коррелирует с образованием межмолекулярных сшивок в белковом скелете эритроцитов (рис. 2 и 3). Уровень холодового гемолиза в этом случае зависит от концентрации SH-реактанта, используемой на предварительном этапе обработки клеток перед гипертонической инкубацией, и минимален после обработки эритроцитов диамидом в максимально используемой концентрации (5,0 мМ).

Каков конкретный механизм влияния диамида на устойчивость эритроцитов к гипертоническому холодовому шоку, остается неясным. В соответствии с концепцией, высказанной в работах Грина с соавт. [3, 6], холодовой шок эритроцитов может быть обусловлен потерей способности мембранных липидов адаптироваться к сдвигу температуры в условиях, когда стабилизируются взаимодействия периферических белков с липидами внутреннего монослоя мембраны. Поэтому наблюдаемые эффекты диамида могут объясняться диссоциацией белкового скелета от

мембраны под влиянием этого реагента, что в конечном итоге ограничивает роль указанного фактора.

Действительно, данные, полученные Хёстом с соавт. [9], показывают, что сшивки белков под влиянием SH-реагентов устраняют ограничения, налагаемые белками цитоскелета на пространственное распределение липидов в мембране. Морфологически это проявляется в том, что после обработки мембран эритроцитов диамидом наблюдается кластеризация внутримембранных частиц [15]. Можно предположить, что ослабление взаимосвязи между компонентами цитоскелета и липидами, которое вызывает снижение чувствительности эритроцитов к холодовому шоку, обусловлено по крайней мере двумя механизмами. В первом случае диссоциация цитоскелета может привести к ограничению неблагоприятного влияния белков на адаптацию липидов в процессе охлаждения в гипертонических условиях [6]. Во втором случае устраняется способность периферических белков резко замедлять процесс «замыкания» дефектов, формирующихся в мембране в процессе охлаждения [16—18]. Основную роль в механизме, контролирующем процесс замыкания, играет белок полосы 4.1 [16, 17]. На денситограммах, представленных на рис. 2, видно, что диамид модифицирует состояние белка 4.1, т. е. действие диамида в определенной степени может быть связано с влиянием на процесс замыкания дефектов мембраны.

О том, что гипертоническая инкубация эритроцитов влияет на состояние белкового скелета, свидетельствуют результаты, представленные на рис. 4. В данной группе экспериментов эритроциты предварительно не обрабатывались диамидом в изотоническом растворе NaCl, т. е. отсутствовала ситуация, когда последующее действие гипертонического стресса было направлено на уже модифицированные клетки. В экспериментах, представленных на рис. 4, обработка клеток производилась на этапе гипертонической инкубации при 37° в растворах NaCl (0,8 и 1,2 М). В указанных условиях появление сшивок между белками фактически должно было «фиксировать» белковый скелет при том или ином значении тоничности наружной среды. Анализируя контрольные образцы (денситограммы белков мембран клеток, которые не подвергались обработке диамидом) (рис. 4), можно сделать вывод, что гипертоническая инкубация оказывает существенное влияние на белки цитоскелета и прежде всего на спектрин. Видно, что при повышении тоничности среды до 0,8 и 1,2 М NaCl в клетках, обработанных диамидом, происходит прогрессирующая элиминация спектрина в агрегаты с большой молекулярной массой, не включающиеся в гель. Помимо этого наблюдается уменьшение интенсивности полос в области 4.1 и 4.2. Одновременно выявляются изменения в области низкомолекулярных пептидов, включающих белок полосы 7 и другие белки с более низкой молекулярной массой. В последнем случае наиболее значительные изменения характерны для клеток, проинкубированных в среде с максимальной тоничностью (1,2 М NaCl).

Более интенсивная агрегация спектрина, наблюдаемая при повышении тоничности среды (рис. 4, в, д), может отражать как увеличение локальной концентрации спектрина у поверхности мембраны в процессе осмотического обезвоживания клеток, так и нарушение структуры бислоя, облегчающее взаимодействие SH-реагента с белковыми молекулами, локализованными на ее внутренней поверхности. Агрегация спектрина под влиянием диамида может модифицировать характер ас-

социации различных белковых компонентов внутри мембранного скелета, а также связывание скелета с точками прикрепления на мембране [20—22]. Образование сшивок между белками, приводящее к уменьшению количества фосфолипидов, ассоциированных с белковыми молекулами [23], может лежать в основе повышения устойчивости клеток к охлаждению в присутствии диамида [3]. Косвенно на это указывают данные [24] о способности диамида модифицировать осмотическое поведение эритроцитов.

Таким образом, действие диамида, модифицирующего состояние белкового скелета эритроцитов, в условиях холодового шока может заключаться в изменении прочности связей спектриновой сети с интегральными компонентами мембраны. Помимо этого изменение состояния молекул спектрина при его взаимодействии внутри самой сети может модифицировать ассоциацию основных компонентов скелета — спектрина, актина и белка 4.1 между собой. В последнем случае действие температуры на различные компоненты скелета и в первую очередь на белок 4.1 может существенно ослабляться. Экспериментально показано [19], что в отличие от ассоциированной с мембраной формы белка 4.1, когда наблюдается температурный переход в мембранах в районе 8° [16, 17], в случае растворимой формы белка 4.1 термоиндуцированные изменения в области положительных температур не отмечаются.

Таким образом, в отличие от факторов, способных модифицировать состояние интегральных компонентов мембраны (конканавалин А) и существенно не изменяющих чувствительность эритроцитов к холодовому шоку, модификация состояния периферических белков мембранного скелета под влиянием диамида приводит к снижению чувствительности клеток к охлаждению в гипертонических средах. Так как результирующее действие этого реагента на клетки проявляется в ослаблении ассоциации белкового скелета с мембраной [25, 26], последнее может указывать на то, что в отсутствие диамида высокая чувствительность эритроцитов к холодовому шоку может быть связана с концентрированием цитоплазматических белков у внутренней поверхности мембраны при осмотическом обезвоживании, что приводит к усилению их ассоциации с мембраной и стабилизации структурных дефектов мембраны при низких температурах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hammerstedt R. H., Amann R. P., Rucinsky T. et al. // Biol. Reproduct. 1976. V. 14. № 4. P. 381—397.
2. Macleod R. A., Caleott P. H. // Surv. Vegetative Microbes. XXVI Symp. Soc. Microbiol. Univ. Cambridge, 1976. P. 81—109.
3. Green F. A., Jung C. Y. // J. Membrane Biol. 1977. V. 33. № 3—4. P. 249—262.
4. Takahashi T., Williams R. J. // Cryobiology. 1983. V. 20. № 5. P. 507—520.
5. Бондаренко Т. П. Дис. ... канд. биол. наук. Харьков: Ин-тут проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, 1981. 151 с.
6. Green F. A., Jung C. Y., Cuppoletti J., Owens N. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 648, № 2. P. 225—230.
7. Singer J. A., Morrison M. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 426. № 1. P. 123—131.
8. Singer J. A., Morrison M. // Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 406. № 4. P. 553—563.
9. Haest C. W. M., Plasa G., Kamp D., Deuticke B. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 509. № 1. P. 21—32.
10. Steck T. L. // J. Supramol. Struct. 1978. V. 8. № 3. P. 311—325.
11. Görg A., Postel W., Weser J. et al. // Science Tools. 1985. V. 32. № 1. P. 5—9.
12. Луцук М. Д., Панасюк Е. Н., Луцук А. Д. Лектины. Львов: Вища школа, 1981. 156 с.

13. Marikovsky Y., Brown C. S., Weinstein R. S., Wortis H. H. // Exp. Cell Res. 1976. V. 98. № 2. P. 313-324.
14. Robinson P. J., Bull F. G., Andeeton B. H., Roitt I. M. // FEBS Letters. 1975. V. 58. № 1. P. 330-333.
15. Kurantsin-Mills J., Lessin L. S. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 641. № 1. P. 129-137.
16. Minetti M., Ceccarini M. // J. Cell. Biochem. 1982. V. 19. № 1. P. 59-77.
17. Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A. M. M. // J. Cell. Biochem. 1984. V. 25. № 2. P. 61-72.
18. Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A. M. M. // J. Cell. Biochem. 1984. V. 25. № 2. P. 73-86.
19. Forte T., Leto T. L., Minetti M., Marchesi V. T. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 27. P. 7876-7880.
20. Becker P. S., Cohen C. M., Lux S. E. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 10. P. 4620-4628.
21. Carraway K. L., Carraway C. A. C. // Biochim. et biophys. acta. 1989. V. 988. № 2. P. 147-173.
22. Liu S. C., Derick L. H., Duquette M. A., Palek J. // Europ. J. Cell Biol. 1989. V. 49. № 2. P. 358-366.
23. Haest C. W. M., Kamp D., Plasa G., Deuticke B. // Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. 1978. V. 359. № 3. P. 272.
24. Heunbush P. H., Jung C. Y., Green F. A. // J. Cell. Physiol. 1985. V. 122. № 2. P. 266-273.
25. Haest C. W. M. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 694. № 4. P. 331-352.
26. Haest C. W. M., Heller K., Schwister K. et al. // Biomed et biochim. acta. 1983. V. 42. № 11-12. P. 127-130.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
Харьков

Поступила в редакцию
28.08.90
После доработки
25.10.90

N. M. SHPAKOVA, A. Yu. SEMENCHENKO, V. A. BONDARENKO

THE MODIFYING EFFECT OF CONCAVALIN AND DIAMIDE ON ERYTHROCYTE SENSITIVITY TO THE COLD SHOCK

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine,
Ukrainian SSR Academy of Sciences, Kiev*

Key words: erythrocyte, cold shock, cytoskeleton, concanavalin A, diamide.

The temperature (0°C and 37°C) and the medium tonicity (0.15-1.20 M NaCl) were shown to affect erythrocyte agglutination by concanavalin A. Treatment of cells with lectin caused no significant decrease in the erythrocyte hemolysis upon cooling. Diamide, unlike concanavalin A used at concentrations above 2.0 M decreases the cell sensitivity to the cold shock. The changes in the erythrocyte susceptibility to cooling within the temperature range of 37-0°C correlate with changes in the electrophoretic spectrum of membrane proteins. The progressive decrease in the spectrin bands intensity with a simultaneous formation of high molecular weight protein aggregates not included in the gel composition was observed after diamide treatment. The diamide effect depends on the medium tonicity, at which the treatment was performed, being especially wellpronounced in hypertonic media with 0.8-1.2 M NaCl concentrations, the maximal spectrin aggregation being observed under these conditions. It is suggested that the main factor of the mechanism underlying the erythrocyte hypertonic cold shock is the increase in the association of peripheral cytoskeleton proteins with plasma membrane in osmotically dehydrated cells which limits the ability of lipids to adapt during cooling and results in the stabilization of defects in the membrane structure at low temperatures. Diamide eliminates these unfavourable changes eventually resulting in the dissociation of peripheral proteins from the cytoplasmic surface of the membrane on the protein aggregation.