БИОХИМИЯ, 1997, том 62, вып. 1, с. 121 - 127

УДК 577.152.3

ИНДУЦИРОВАННОЕ ПЧЕЛИНЫМ ЯДОМ УМЕНЬШЕНИЕ ОБЪЕМА ТЕНЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ

© 1997 г. **С.В. Руденко*, Г.А. Божок, Е.Е. Нипот**

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 310015 Харьков, ул. Переяславская, 23; факс: (0572)72-00-84, электронная почта: cbi@ilt.kharkov.ua

Поступила в редакцию 19.04.96
После доработки 04.11.96

Показано, что в результате гемолиза эритроцитов, индуцированного ядом пчелы, образуются тени, объем которых значительно меньше исходного объема клеток. То же наблюдается и при обработке ядом изолированных теней эритроцитов. Аналогичный эффект дает также смесь очищенных мелиттина и фосфолипазы А2, но не взятые в отдельности эти вещества. Изменение объема развивается во времени немонотонно. Начальная фаза сжатия сменяется продолжительной фазой спонтанного восстановления объема. Ингибиторы яд-индуцированного гемолиза (Mg^{2+}, хлорпромазин) задерживали развитие фаз сжатия и соответственно восстановления, но не влияли на амплитуду объемных изменений. Катионы Ca^{2+} в больших концентрациях (10 мМ) действовали аналогично, однако в малых концентрациях (0,1 мМ) они увеличивали степень сжатия. Степень сжатия увеличивалась в несколько раз в изотонических растворах неэлектролитов. Анализ полученных данных показывает, что яд-индуцированное уменьшение объема теней эритроцитов не является результатом осмотических эффектов, нарушения проницаемости и/или фрагментации мембраны, а обусловлено контракцией мембраны предположительно с участием мембранного цитоскелета. В этом отношении яд-индуцированная контракция эритроцитов напоминает контракцию, имеющую место в немышечных клетках.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, пчелиный яд, мелиттин, фосфолипаза А2, гемолиз, двухвалентные катионы, хлорпромазин.

Мелиттин (М) – литический пептид пчелиного яда, состоящий из 26 аминокислот, – широко используется для изучения механизмов транслокации и встраивания пептидов и белков в модельные биологические мембраны [1, 2]. Хотя детальный молекулярный механизм, посредством которого М вызывает гемолиз эритроцитов, остается неизвестным, предполагается, что первичным шагом является образование М-индуцированной поры, поскольку показано, что М формирует потенциалзависимые ионные каналы [3] и увеличивает проницаемость липидных везикул, приводя к утечке их содержимого [4]. Некоторые авторы представили доводы в пользу коллоидно-осмотической природы М-индуцированного гемолиза [5, 6]. Однако недавние исследования показали, что совместное действие М и фосфолипазы А2 (ФА2), которое моделирует действие яда, значительно отличается от действия М и ФА2, взятых в отдельности, в особенности в отношении объемных изменений и содержания мембранных белков в образовавшихся тенях [7]. Уменьшенный объем теней, формирующихся в результате яд-индуцированного гемолиза, противоречит модели коллоидно-осмотического механизма и предполагает либо причинную независимость процессов сжатия и собственно гемолиза, либо изменения в механизме, посредством которого мелиттин гемолизирует клетки в присутствии ФА2.

Цель данной работы – дать более подробную характеристику явлению уменьшения объема теней эритроцитов (сжатия), вызванному действием яда пчелы, и изучить влияние на этот процесс некоторых ингибиторов М-индуцированного гемолиза, таких как хлорпромазин и двухвалентные катионы – Zn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эритроциты человека получали, добавляя несколько капель крови донора к 10 мл физиологического раствора (150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4), перемешивали и дважды отмывали путем центрифугирования (2000 g, 3 мин). 30 мкл полученного осадка эритроцитов разводили в 0,5 мл физиологического раствора и использовали в течение нескольких часов как сток-суспензию. Мелиттин, свободный от фосфолипазы А2, был любезно предоставлен

*Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

©1997 Российская Академия Наук. Материал из электронного архива журнала "Биохимия". Статья оцифрована в Отделе Научной Информации НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Использование материала автоматически предполагает выполнение условий Пользовательского соглашения.

Постоянная ссылка на материал: http://journals.belozersky.msu.ru/biochemistry/paper/1997/01/121.

К. Демпси (Бристольский университет, Англия). Цельный пчелиный яд растворяли в дистиллированной воде и центрифугировали для удаления нерастворимых компонентов. Концентрацию яда в сток-растворе определяли по его сухому весу после выпаривания. В работе применяли хлорпромазин-HCl фирмы «Sigma» (США), остальные реактивы были квалификации х.ч. или ч.д.а.

Приготовление гипертонических теней. Мембраны теней были приготовлены из донорской крови, заготовленной на консерванте Глюгицир (Россия). Два типа теней были получены в результате постгипертонического гемолиза [8]. 0,05 мл упакованных клеток инкубировались в 0,5 мл гипертонических растворов 1,5 М NaCl или 1,4 М сахарозы в течение 30 мин при 37°. После этого 10 мл разбавленного раствора NaCl соответствующей концентрации или буфера были добавлены для восстановления изотонических условий, в которых образцы инкубировались последующие 10 мин. Негемолизировавшие в этих растворах клетки осаждались центрифугированием (2000 g, 3 мин), а тени, оставшиеся в супернатанте, концентрировались повторным центрифугированием (4000 g, 10 мин). Осадки теней разбавляли физиологическим раствором до концентрации ~ 10^9 теней в 1 мл и использовали в течение 2 ч. Тени, полученные данным методом, в изотоническом растворе имели объем, в 1,5 раза превышающий нормальный объем эритроцитов, и сферическую форму, что делало их удобным объектом для изучения методами спектроскопии импульсов сопротивления (СИС) и темнопольной микроскопии. Содержание гемоглобина в них не превышало 10% исходного содержания гемоглобина в эритроцитах.

Метод СИС, использовавшийся для измерения распределений по объему эритроцитов и теней, описан ранее [9, 10]. Сортировка клеток по размеру осуществлялась на оборудовании, изготовленном нами по типу Coulter-Counter, в котором импульсы сопротивления индуцировались частицами, проходящими через ограничивающее поток отверстие, а скорость потока, проходящего через него, поддерживалась неизменной. Показания анализатора импульсов представлены в форме 256-канальных гистограмм, модальные значения пиков которых и другие характеристики анализировались компьютером. В нашей работе было использовано калиброванное отверстие (50 мкм длиной и 50 мкм в диаметре), дающее возможность получить практически полное гидродинамическое фокусирование клеток. Для того чтобы избежать деформации клеток, скорость потока суспензии клеток, протекающей через отверстие датчика, в экспериментах была ниже 1 м/с [9]. Аликвоты клеток или теней вводились в 2 мл физиологического раствора или других растворов (pH 7,4), содержащих требуемую концентрацию яда и непрерывно перемешиваемых магнитной мешалкой. Конечная концентрация клеток в растворе ~ 10^6 клеток в 1 мл. Каждый цикл измерений методом СИС анализировал 2^{15} клеток и составлял ~ 15 с. Клетки, предварительно сферулированные лизолецитином и зафиксированные 1%-ным глутаровым альдегидом, использовались как эталонные объекты. Эксперименты проводились при комнатной температуре (22–24°). Диаметр теней измеряли с использованием микроскопии темного поля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что пчелиный яд и его основной компонент мелиттин вызывают гемолиз эритроцитов [1, 2]. Как видно из рис. 1, взаимодействие мелиттина и яда с эритроцитами приводит к разнонаправленным изменениям в объеме теней, формирующихся при гемолизе. В то время как мелиттин только увеличивает объем, яд, напротив, приводит к его уменьшению, иногда после некоторого увеличения, характерного для малых концентраций яда. В целом динамика изменений объемов такова, что после фазы относительно быстрого сжатия наблюдается медленное спонтанное восстановление объема теней. Более того, когда достигается максимальная степень сжатия, что происходит при концентрации пчелиного яда более 1,5 мкг/мл, величина последующего приращения объема уже практически не зависит от концентрации яда (рис. 1,*б*). Сам мелиттин не вызывает сжатия, однако он способен делать это в смеси с ФА2 [7]. Следовательно, М и ФА2 являются основными компонентами, ответственными за сжатие. Нельзя исключить, что комплексное влияние компонентов яда (главным образом М и ФА2) может значительно модифицировать электрические и механические свойства эритроцитарной мембраны. Для того чтобы избежать возможных артефактов при измерении объема теней методом СИС, мы рассмотрели роль изменений в проводимости и деформируемости мембраны при определении объема теней.

Существуют два основных источника погрешностей в измерении объема клеток и теней методом СИС, которые могут приводить к тому, что измеряемый объем («кажущийся объем») может отличаться от истинного. К ним относятся электропроводящие свойства мембран клеток и их деформируемость [9, 10]. Рис. 2

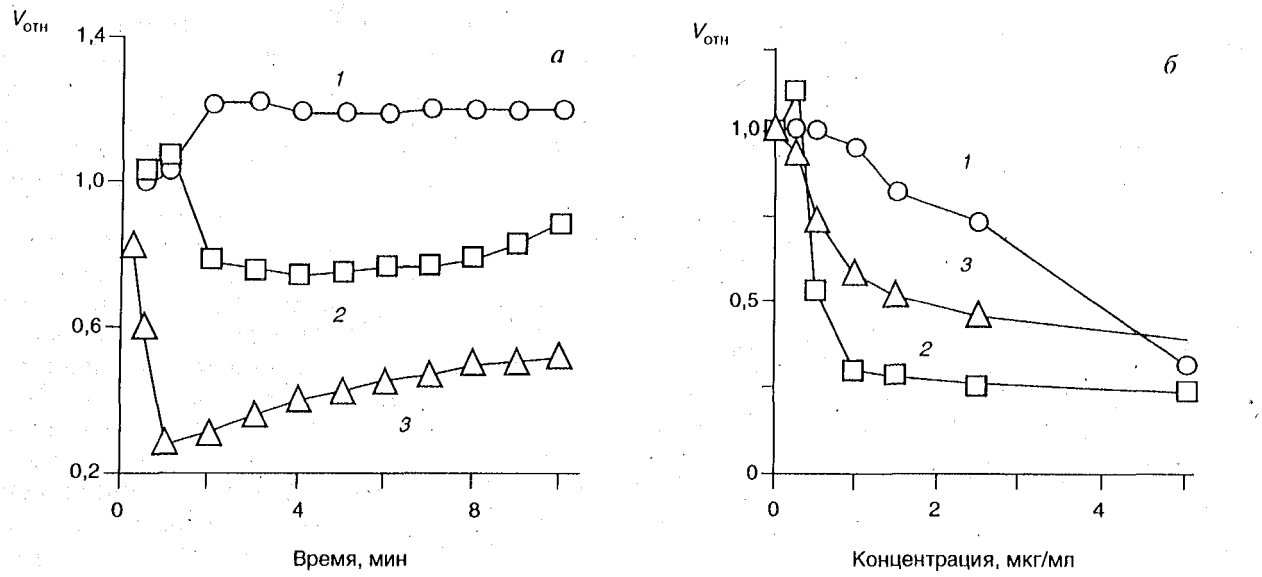


Рис. 1. Зависимость изменений объема эритроцитов, индуцированных мелиттином и пчелиным ядом, от времени (*а*) и концентрации яда (*б*). *а* – Эритроциты в конечной концентрации ~ 10^6 клеток в 1 мл добавляли в физиологический раствор, содержащий мелиттин (1 мкг/мл, *1*) и пчелиный яд (0,4 (*2*) или 1,5 мкг/мл (*3*)), и определяли объем методом СИС. *б* – Средний относительный объем измеряли через 15 с (*1*), 40 с (*2*) и 10 мин (*3*) после введения клеток в среду, содержащую пчелиный яд в указанных концентрациях

сравнивает зависимости амплитуды импульсов тока, возникающих при прохождении клетки через измерительное отверстие, от электрического тока через него для нативных и фиксированных глутаровым альдегидом клеток с соответствующими зависимостями для яд-индуцированных теней в условиях максимального сжатия и после спонтанного восстановления объема. Во всех случаях в этих зависимостях не наблюдались типичные изломы, указывающие на электрический пробой мембраны, по крайней мере до 0,4 мА [10]. Поскольку во всех других экспериментах величина тока через отверстие не превышал 0,3 мА, электрический пробой может быть исключен как возможное объяснение уменьшения объемов клеток, обработанных пчелиным ядом.

Известно, что в методе СИС показания анализатора импульсов могут уменьшаться, когда увеличивается деформируемость клеток [9]. Рис. 3 показывает, что зависимость положения максимума гистограммы импульсов (кажущегося объема) от перепада гидростатического давления и, следовательно, от скорости потока через отверстие одинакова для нативных клеток и сжатых теней и близка к таковой для недеформирующихся фиксированных клеток. Хотя с ростом гидростатического давления наблюдалось некоторое смещение максимума гистограммы фиксированных клеток, указывающее на инерционность измерительной системы, оно не превышало 10% исходного объема и было одинаковым для контрольных и опытных объектов. Поскольку величина этих изменений значитель-

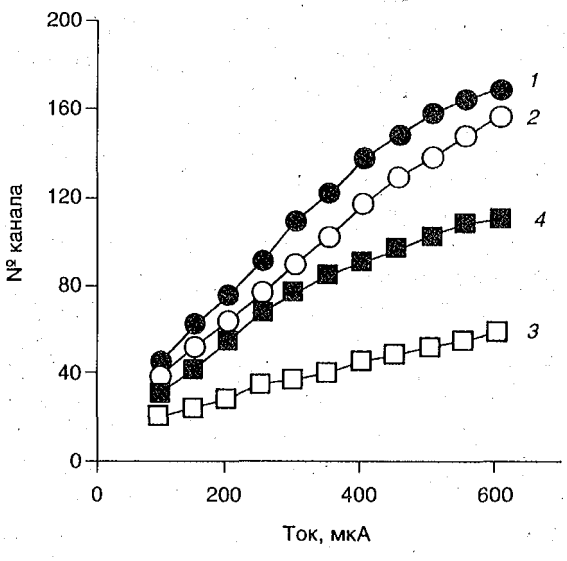


Рис. 2. Зависимость среднего значения амплитуды импульсов тока, генерируемых частицами при прохождении измерительного отверстия, определенного как номер канала распределения, от электрического тока через отверстие: *1* – контрольные клетки, *2* – эталонные фиксированные клетки, *3* – клетки, обработанные пчелиным ядом в концентрации 0,75 мкг/мл, измеренные через 1,5 мин после обработки, *4* – они же, измеренные через 10 мин после обработки

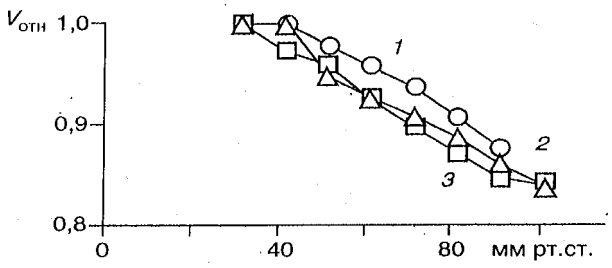


Рис. 3. Влияние перепада гидростатического давления, приложенного к измерительному отверстию, на среднее относительное значение показаний анализатора импульсов для эталонных фиксированных клеток (*1*), контрольных клеток (*2*) и клеток, обработанных пчелиным ядом в концентрации 1,5 мкг/мл (*3*)

но меньше изменений при действии яда, то ясно, что изменение деформируемости не вносит заметной ошибки в измерение объема теней. Кроме того, это означает, что деформируемость эритроцитов, обработанных ядом, не изменяется значительно по сравнению с нативными клетками [9].

Прямые доказательства того, что индуцированные пчелиным ядом изменения кажущегося объема связаны с уменьшением истинного объема теней, были получены при использовании микроскопии темного поля, которые представлены в табл. 1. Как видно, обработка ядом приводит к уменьшению диаметра и объема теней, полученных как в результате индуцированного пчелиным ядом гемолиза нативных клеток, так и более крупных гипертонических теней, что согласуется с данными, полученными СИС-методом. Нужно отметить, что изолированные гипертонические тени и тени, образующиеся при действии пчелиного яда, имели правильную сферическую форму. Эти данные показывают, что сжатие не является результатом эффектов, связанных с изменениями электрических и механических свойств мембраны, а также осмотических эффектов, поскольку аналогичный эффект наблюдается и при использовании изолированных теней, практически не содержащих гемоглобина и по внутриклеточному составу одинаковых с составом внешней среды [7] (табл. 1). Эти данные скорее свидетельствуют в пользу существования мембранной контрактильной системы, которая может активироваться цельным пчелиным ядом или смесью М и ФА2.

Известно, что двухвалентные катионы, в частности Ca^{2+}, модулируют взаимодействие между М и липидной мембраной [4, 11–13] и активируют ФА2. Двухвалентные катионы главным образом ингибируют М-индуцированный гемолиз [4, 11–13]. Влияние катионов Zn^{2+}, Mg^{2+} и Ca^{2+}, а также другого ингибитора – хлорпромазина [7] на яд-индуцированное сжатие показано на рис. 4. Все ингибиторы уменьшали степень сжатия, в особенности на ранних стадиях взаимодействия. Сжатие отсутствовало при относительно высоких концентрациях Zn^{2+} (более 20 мкМ) – вместо этого наблюдалось набухание клеток. Хлорпромазин предотвращал сжатие только в течение первых 40 с взаимодействия пчелиного яда с клетками. Его влияние было очень слабым, если клетки взаимодействовали с ядом в течение 1,5 мин или более. Схожие закономерности были получены и для Mg^{2+}, хотя он оказывал более сильный протектирующий эффект по сравнению с хлорпромазином. Ca^{2+} обладал разнонаправленным влиянием, активируя сжатие при концентрации 0,1 мМ и ингибируя его при увеличении концентрации до 10 мМ. Данные рис. 4 показывают, что общий эффект ингибиторов в основном заключается в значительном задерживании фаз сжатия и набухания, а не в уменьшении собственно амплитуды объемных изменений. При низких концентрациях ингибиторов степень сжатия, определяемая на 1,5 мин, превышает таковую на 10 мин, что указывает на фазу набухания. Дальнейшее же увеличение концентрации ингибиторов (Zn^{2+} и Ca^{2+}) приводит к ограничению сжатия. Кроме этого, фаза набухания отсутствует при высоких концентрациях Zn^{2+} и Ca^{2+}. В этом отношении Mg^{2+} и хлорпромазин значительно отличаются от Zn^{2+} и Ca^{2+}, поскольку и Mg^{2+} и хлорпромазин обладают относительно

Таблица 1. Параметры клеток и теней, обработанных пчелиным ядом

Параметр	Клетки		Тени из сахарозы		Тени из NaCl	
	контрольные	обработанные	контрольные	обработанные	контрольные	обработанные
Диаметр, мкм	–	4,5 ± 0,6	6,11 ± 0,14	4,7 ± 0,2	6,6 ± 0,7	4,4 ± 0,3
Объем, мкм^3	90 ± 5	50 ± 17	119 ± 8	52 ± 8	150 ± 42	45 ± 11

Примечание. Эритроциты или тени в конечной концентрации $3 \cdot 10^7$ клеток в 1 мл были добавлены к физиологическому раствору, содержащему пчелиный яд (7,5 мкг/мл). Диаметр теней определяли, используя микроскопию темного поля, через 2–3 мин после смешивания.

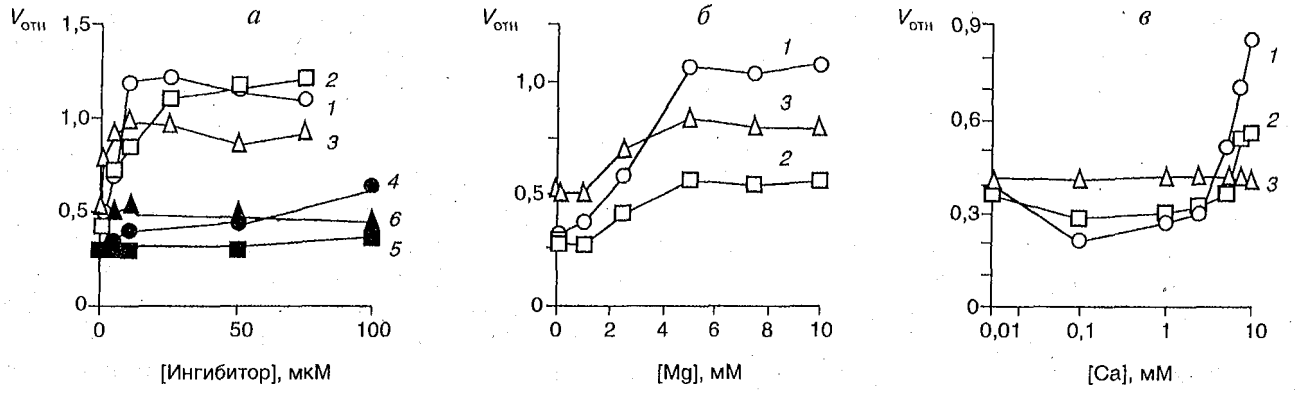


Рис. 4. Влияние Zn^{2+} (*1–3*) и хлорпромазина (*4–6*) (*а*), Mg^{2+} (*б*) и Ca^{2+} (*в*) на изменения в объеме эритроцитов, индуцированных пчелиным ядом (1,5 мкг/мл). Относительный объем клеток измерялся через 40 с (*1, 4*), 1,5 мин (*2, 5*) и 10 мин (*3, 6*) после начала взаимодействия клеток с ядом

слабым ингибирующим эффектом. Как видно из рис. 4, Zn^{2+} является наиболее эффективным ингибитором сжатия среди использованных веществ, что согласуется с его известной высокой способностью протектировать эритроциты и другие типы клеток от повреждающего воздействия различных токсинов, в частности М [4, 11–13]. Степень яд-индуцированного сжатия значительно зависит от состава и ионной силы раствора. Одинаковые концентрации пчелиного яда вызывали большее сжатие в изотонических растворах KCl и хлорида холина (ChCl) по сравнению с NaCl (табл. 2), а сахароза, маннитол и глюкоза еще в большей степени облегчали сжатие. Большая степень сжатия в ChCl и неэлектролитах коррелировала с большей скоростью гемолиза в этих средах. Если ионное окружение играет значительную роль в рассматриваемом явлении, это может частично объяснить активирующие свойства ионов кальция при низких концентрациях (рис. 4,*в*) как специфическое взаимодействие с липидными и/или белковыми компонентами мембраны, поскольку другие катионы не обладают подобным эффектом. Маловероятно также, что эффект сжатия обусловлен активацией ФА2 в присутствии кальция, поскольку концентрации катионов малы. В этом случае эффект должен возрастать при увеличении концентрации кальция, чего не происходит в действительности (рис. 4,*в*). Дополнительные данные, исключающие участие лизолипидов в сжатии и соответственно ФА2 как их источник, были получены ранее [7]. Скорее для возникновения эффекта сжатия необходимо кооперативное действие М и ФА2, поскольку ФА2 и М по отдельности не обладают способностью вызывать сжатие, что, однако, происходит при использовании смеси, которая моделирует пчелиный яд [7].

Складывается впечатление, что сжатие и гемолиз причинно не связаны между собой, поскольку изолированные тени также демонстрируют подобный феномен сжатия. Тем не менее наблюдается корреляция, состоящая в том, что, чем больше скорость гемолиза, тем больше скорость и степень сжатия. Эта корреляция подтверждается в экспериментах с различными

Таблица 2. Влияние состава инкубационной среды на относительную скорость гемолиза ($v_{отн}$) и относительный объем теней ($V_{отн}$)

Среда	$v_{отн}$	$V_{отн}$
NaCl	1	0,68 ± 0,11
KCl	1,1 ± 0,1	0,53 ± 0,03
ChCl	2,6 ± 0,4	0,57 ± 0,01
Сахароза	17 ± 4	0,053 ± 0,016
Маннитол	19 ± 1	0,042 ± 0,015
Глюкоза	19 ± 1	0,067 ± 0,019

Примечание. Эритроциты в конечной концентрации $5 \cdot 10^7$ клеток в 1 мл были добавлены к изоосмотичным электролитным или неэлектролитным средам (pH 7,4), содержащим пчелиный яд в концентрации 1,5 мкг/мл. После завершения гемолиза по 0,2 мл этих клеточных суспензий переносили в 2 мл изотонического раствора NaCl и определяли объем теней методом СИС. Скорость гемолиза, определенную из кинетических кривых как описано ранее [7], для различных сред нормировали на скорость гемолиза в среде NaCl. Относительный средний объем клеток, обработанных ядом, рассчитывали относительно изотонического объема нативных клеток в среде NaCl.

концентрациями пчелиного яда, двухвалентных катионов и составами инкубационных сред. Понятно, что более интенсивный гемолиз является результатом более интенсивного порообразования в мембране. Последний процесс может облегчить трансмембранное перераспределение пептида и/или ФА2 и, таким образом, агент сможет достичь участка связывания, ответственного за контракцию. Известно, что Ca^{2+} вызывает нарушение нативного трансмембранного распределения липидов [14] – эффект, который может вносить вклад в активирующую способность этих катионов вызывать сжатие (рис. 4,*в*). Эффект сжатия также вряд ли может быть объяснен взаимодействием между компонентами яда и мембранными липидами, поскольку внедрение дополнительных молекул М в липидный бислой должно увеличивать его площадь. Однако площадь поверхности и, следовательно, равновесный объем сферической тени могут быть уменьшены, если М вызывает фазовый переход и/или диск-мицеллизацию липидов [15, 16]. Предполагая, что сжатие обусловлено фазовым переходом липидов из жидкого в упорядоченное состояние, при котором происходит уменьшение поверхностной площади, приходящейся на 1 молекулу липида, на 20% [17–19], мы получили оценку, согласно которой конечный объем тени должен равняться 0,7 относительно ее начального объема. Эта величина больше найденной экспериментально, следовательно, сжатие клетки не может быть объяснено изменением фазового состояния липидов.

Спонтанное восстановление объема теней также делает маловероятным и то, что сжатие является результатом везикуляции мембраны, которое наблюдалось ранее [20]. В этом случае необходимо было бы допустить обратное слияние микровезикул с мембранами сжатых теней. Интенсивность микровезикуляции увеличивается при увеличении концентрации пептида [20]. Тем не менее на рис. 1 показаны насыщение и независимость величины восстановления объема от концентрации пчелиного яда. Дополнительным свидетельством в пользу этого, является то, что добавление новой порции яда, которое увеличивает его концентрацию в среде на 1,5 мкг/мл (концентрация, вызывающая максимальное сжатие), после фазы восстановления объема уже не способно привести к повторному сжатию (данные не представлены). Таким образом, мембранная система, ответственная за сжатие, способна ответить на действие пчелиного яда один раз, после чего инактивируется. В этом отношении процесс сжатия отличается от М-индуцированного гемолиза, скорость которого пропорциональна концентрации М в среде независимо от последовательности его добавления [21]. Настоящие данные делают также маловероятным и то, что процесс сжатия с пчелиным ядом является кальмодулинзависимым, поскольку ингибитор кальмодулина – хлорпромазин – слабо влиял на степень сжатия и набухания подобно Mg^{2+} (рис. 4). Более того, не было обнаружено разницы в ответе на воздействие пчелиным ядом и теней, которые образовались в результате действия гемолитических концентраций хлорпромазина, по сравнению с нативными клетками или другими типами теней (данные не представлены). При этом предполагается, что все связывающие участки кальмодулина должны быть полностью насыщены хлорпромазином.

Полученных данных недостаточно для детального описания этой контрактильной системы. Уменьшение объема может происходить как за счет уменьшения площади поверхности мембраны при одновременном увеличении ее толщины, так и за счет образования складок (выступов и впадин) при неизменной площади поверхности. Хотя микроскопические наблюдения показывают, что сжатые тени имеют правильную сферическую форму, величина выступов может быть слишком мала для регистрации этим методом. Мы предполагаем, что главным элементом, ответственным за контракцию, является мембранный цитоскелет, который, будучи ионным гелем [22, 23], может претерпевать значительные объемные превращения в ответ на изменение ионного окружения [24, 25] и присутствие заряженных частиц [26, 27]. Известно, что цитоскелет эритроцита способен значительно сжиматься при определенных условиях [28, 29], что делает его вероятным кандидатом, принимающим непосредственное участие в этом явлении. С этой точки зрения наиболее вероятно, что при сжатии реализуется второй вариант, когда на мембране образуются многочисленные выступы и впадины, а сокращается собственно сеть цитоскелета, которая точечно прикреплена к мембране. Внутреннее содержимое клеток и теней при этом удаляется через мембранные поры, образованные мелиттином. Известно, что размер этих пор увеличивается при увеличении концентрации мелиттина [5, 20]. Этим можно объяснить тот факт, что при малых концентрациях яда наблюдается набухание, а не сжатие клеток (рис. 1,*б*). Концентрация яда в этом случае мала, чтобы инициировать контракцию, но достаточна для того, чтобы нарушить проницаемость мембраны и вызвать коллоидно-осмотический гемолиз.

Мы благодарим К. Демпси за предоставленные мелиттин и ФА2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dempsey, C.E. (1990) *Biochim. Biophys. Acta,* **1031**, 143–161.
2. Habermann, E. (1972) *Science*, **177**, 314–322.
3. Pawlak, M., Stankowski, S., and Schwarz, G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta,* **1062**, 94–102.
4. Portlock, S.H., Clague, M.J., and Cherry, R.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta,* **1030**, 1–10.
5. Katsu, T., Kuroko, M., Morikawa, T., Sanchika, K., Fujita, Y., Yamamura H., and Oda, M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta,* **983**, 135–141.
6. Tosteson, M.T., Holmes S.J., Rasin M., and Tosteson D.C. (1985) *J. Membr. Biol.*, **87**, 35–44.
7. Руденко С.В., Семенченко А.Ю. (1995) *Биохимия*, **60**, 734–745.
8. Rudenko, S.V., and Patelaros, S.V. (1995) *Biochim. Biophys. Acta,* **1235**, 1–9.
9. Akeson, S.P., and Mel, H.C. (1986) *Biorheology*, **23**, 1–15.
10. Richiery, G.V., and Mel, H.C. (1986) *Cell Biophysics,* **8**, 243–259.
11. Alder, G.M., Arnold, W.M., Bashford, C.L., Drake, A.F., Pasternak, C.A., and Zimmermann, U. (1991) *Biochim. Biophys. Acta,* **1061**, 111–120.
12. Bashford, C.L., Alder, G.M., Menestrina, G., Micklem, K.J., Murphy, J.J., and Pasternak, C.A. (1986) *J. Biol. Chem.,* **261**, 9300–9308.
13. Bashford, C.L., Rodriguez, L., and Pasternak, C.A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta,* **983**, 56–64.
14. Henseleit, U., Plasa, G., and Haest, C.W.W. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1029**, 127–135.
15. Galla, H.-G., Hartmann, W., and Sackmann, E. (1978) *Ber. Bunsengen. Phys. Chem.*, **82**, 918–922.
16. Dempsey, C., and Sternberg, B. (1991) *Biochim. Biophys. Acta,* **1061**, 175–184.
17. Izaguirre, E., Lange, Y., and Shipley, G.G. (1975) *Biophys. J.,* **15**, 101–107.
18. Janiak, M.J., Small, D.M., and Shipley, G.G. (1976) *Biochemistry,* **15**, 4574–4580.
19. Tardieu, A., Luzzati, Y., and Reman, F.C. (1973) *J. Mol. Biol.*, **75**, 711–734.
20. Katsu, T., Ninomiya, C., Kuroko, M., Kobayashi, H., Hirota, T., and Fujita, Y. (1988) *Biochim. Biophys. Acta,* **939**, 57–63.
21. De Grado, W.F., Musso, G.F., Lieber, M., Kaiser, E.T., and Kezdy, F.J. (1982) *Biophys. J.*, **37**, 329–338.
22. Stokke, B.T., Mikkelsen, A., and Elgsaeter, A. (1986) *Eur. Biophys. J.*, **13**, 203–218.
23. Stokke, B.T., Mikkelsen, A., and Elgsaeter, A. (1986) *Eur. Biophys. J.*, **13**, 219–233.
24. Yoshio, N., Hirohito, N., and Matsuhiko, M. (1986) *J. Chem. Eng. Japan,* **19**, 274–280.
25. Ricka, J., and Tanaka, T. (1985) *Macromolecules*, **18**, 83–85.
26. Hirotsu, S., Hirokawa, Y., and Tanaka, T. (1987) *J. Chem. Phys.*, **87**, 1392–1395.
27. Amiya, T., and Tanaka, T. (1987) *Macromolecules,* **20**, 1162–1164.
28. Svoboda, K., Schmidt, C.F., Branton, D., and Block, S.M. (1992) *Biophys. J.*, **63**, 784–793.
29. Vertessy, B.G., and Steck, T.L. (1989) *Biophys. J.*, **55**, 255–262.

BEE VENOM-INDUCED SHRINKAGE OF ERYTHROCYTE GHOSTS

S.V. Rudenko, G.A. Bojok, E.E. Nipot

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of the Ukraine, 310015 Kharkov, Pereyaslavskaya Str. 23, the Ukraine; fax: (0572)72-00-84, E-mail: cbi@ilt.kharkov.ua

Submitted April 19, 1996
Revision submitted November 4, 1996

It is shown that during hemolysis induced by bee venom the ghosts with the volume significantly less than the initial volume of cells are produced. Treatment by bee venom of isolated ghost membranes leads to the same effect. Analogous phenomenon is caused by the mixture of purified melittin and phospholipase A2, but not by separate action of these substances. Changes of volume develop in time non-monotonically. Prolonged phase of spontaneous volume restoration follows by initial phase of shrinkage. Inhibitors of hemolysis (Mg2+, chlorpromazine) retarded the development of both shrinkage and restoration phases, but did not influence the extent of volume changes. Cations of Ca2+ at large concentration (10 mM) acted in a similar manner, but increased the extent of shrinkage acting at low concentration (0,1 mM). Extent of shrinkage has been increased several times in isotonic non-electrolyte solutions. Analysis of the data shows that bee venom-induced reduction in ghosts volume is not due to osmotic effects or permeabilization and/or fragmentation of membrane but rather attributed to membrane contraction, which is presumably relates to membrane cytoskeleton. In this respect venom-induced shrinkage resemble that of contractile events in non-muscle cells.

KEY WORDS: erythrocytes, bee venom, melittin, phospholipase A2, hemolysis, divalent cations, chlorpromazine.