

УДК 577.112.4:577.352.4:612.111

Н.А.ПИСАРЕНКО¹, В.А.БОНДАРЕНКО^{2*}, В.В.РАМАЗАНОВ², Л.В.КОБА¹

Вплив діпіридамолу, осмолярності та сульфгідрильних реагентів на транспорт аніонів сульфату в еритроцитах людини

UDC 577.112.4:577.352.4:612.111

N.A. PISARENKO¹, V.A. BONDARENKO^{2*}, V.V. RAMAZANOV², L.V. KOB¹

Effect of Dipyridamol, Osmolarity and Sulfhydryl Reagents on Sulphate Anion Transport in Human Erythrocytes

Досліджували особливості транспорту аніонів сульфату білком смуги 3 мембран еритроцитів людини в умовах підвищеної осмолярності середовища, модифікації SH-груп білків цитоскелета і мембрани, а також в умовах присутності у середовищі інкубації діпіридамолу. Виявлено, що вплив діпіридамолу на транспорт аніонів сульфату білком смуги 3 мембран нативних і модифікованих еритроцитів залежить від його концентрації у середовищі інкубації. При цьому найбільш значне зниження транспорту аніонів спостерігається в діапазоні концентрацій діпіридамолу від 0 до 10 мкМ. Перенос сульфат аніонів у гіпертонічному середовищі білком смуги 3 як у нативних, так і модифікованих еритроцитах значно зменшується порівняно з ізотонічними умовами. Обробка еритроцитів йодоацетамідом, парахлормеркурійбензоатом та їх комбінацією суттєво підвищує транспорт сульфату в клітину, причому найбільший ступінь впливу модифікаторів у цих умовах спостерігається при їх комбінації.

Ключові слова: еритроцити, білок смуги 3, осмолярність, діпіридамол, йодоацетамід, парахлормеркурійбензоат.

Исследовали особенности транспорта анионов сульфата белком полосы 3 мембран эритроцитов человека в условиях повышенной осмолярности среды, модификации SH-групп цитоскелета и мембраны, а также в условиях присутствия в среде инкубации дипиридамола. Установлено, что влияние дипиридамола на транспорт анионов сульфата белком полосы 3 мембраны нативных и модифицированных эритроцитов зависит от его концентрации в среде инкубации. При этом наиболее значительное снижение транспорта анионов наблюдается в диапазоне концентраций дипиридамола от 0 до 10 мкМ. Перенос сульфат анионов в гипертонической среде белком полосы 3 как в нативных, так и модифицированных эритроцитах значительно уменьшается в сравнении с изотоническими условиями. Обработка эритроцитов йодоацетамидом, парахлормеркурийбензоатом и их комбинацией существенно увеличивает транспорт сульфата в клетку, причем наибольшая степень влияния модификаторов в этих условиях наблюдается при их комбинации.

Ключевые слова: эритроциты, белок полосы 3, осмолярность, дипиридамол, йодоацетамид, парахлормеркурийбензоат.

The peculiarities of sulphate anion transport by band 3 protein of human erythrocyte membranes under conditions of increased medium osmolarity, modification of cytoskeletal and membrane SH-groups, as well as at dipyridamol presence in incubation medium have been studied. Dipyridamol effect on sulphate anion transport by band 3 protein of native and modified erythrocyte membrane was established to depend on its concentration in the incubation medium. At the same time the most significant reduction of anion transport is observed within the range of dipyridamol concentration from 0 to 10 μM. Anion sulphate transport in hypertonic medium by band 3 protein both in native and modified erythrocytes considerably decreases if to compare with isotonic conditions. Erythrocyte treatment with iodoacetamide, p-chloromercuribenzoic acid and their combination significantly augments sulphate transport into a cell, moreover under these conditions the highest effect of modifiers is observed during their combination.

Key-words: erythrocytes, band 3 protein, osmolarity, dipyridamol, iodoacetamide, p-chloromercuribenzoic acid.

Вивчення впливу модифікаторів і факторів середовища на структурно-функціональний стан системи транспорту аніонів у клітинах є актуальною проблемою. Дослідження, проведені на еритроцитах, показують, що ця система відіграє важливу роль у механізмах, які підвищують здатність клітини адаптуватися до змін умов навколишнього середовища [3, 6]. Функціональна

Studying the effect of modifiers and medium factors on structural and functional state of anion transport system in cells is of current importance. Research in erythrocytes demonstrates this system to play an important role in the mechanisms, increasing cell capability to adaptation under altered environmental conditions [3, 6]. Functional component of adaptation, manifesting in changing the transport

¹Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

²Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.:+38 (057) 373-30-84, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

¹Kharkov National University named by V.N. Karazin, Kharkov, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3084, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

компонента адаптації, яка проявляється у змінах параметрів транспорту, безпосередньо пов'язана зі структурним станом аніонного переносника – білка смуги 3 [6, 8]. Застосування інгібіторів аніонного транспорту, наприклад діпірідамолу, може стати одним із способів контролю чутливості клітини до дії факторів навколишнього середовища. Інший варіант такого контролю – модифікація структурного стану білків цитоскелета і мембрани специфічними агентами, наприклад сульфгідрильними реагентами [3]. В основі дії модифікаторів та інгібіторів аніонтранспортної системи може лежати вплив не тільки на транспортні характеристики аніонного транспорту, але й на взаємодію цитоскелетних білків з мембраною, у регулюванні яких бере участь білок смуги 3 [8].

Мета даної роботи – вивчення особливостей транспорту аніонів сульфату білком смуги 3 мембран еритроцитів людини під впливом різних концентрацій діпірідамолу в умовах підвищеної осмолярності середовища, модифікації білків цитоскелета і структурно-функціонального стану білка смуги 3 та його взаємодії з цитоскелетом.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були еритроцити людини донорської крові групи II. Консервуючим розчином був гліюглицир. Плазму і лейкоцити крові видаляли 3-разовим відмиванням в 7-10-кратному об'ємі 150 ммоль/л NaCl під час центрифугування протягом 10 хв при 3000 об/хв. Плазму, лейкоцитарну плівку і надосад видаляли методом аспірації. Ущільнений осад еритроцитів зберігали при 4°C і використовували на протязі 3-х годин.

Транспорт аніонів сульфату з обов'язковим переносом протонів досліджували методом рН-метрії в лунці об'ємом 2,5 мл з рН-електродом, в якій підтримується температура 37°C. В лунку вносили по 2 мл розчинів: ізотонічного 110 ммоль/л Na₂SO₄, або гіпертонічного 110 ммоль/л Na₂SO₄, 860 ммоль/л сахарози. У розчини також додавали по 5 мкл 200 ммоль/л NaHCO₃ та різні концентрації діпірідамолу (Sigma, США), рН середовища доводили до рівня рН суспензії еритроцитів (рН 7,0-7,3). У лунку при постійному перемішуванні вносили еритроцитарну масу об'ємом 50 мкл. Зміни рН суспензії клітин записували на самописці Endim (Німеччина).

Для обробки модифікаторами цитоскелета готували суспензію еритроцитів з 20%-м гематокритом у середовищі, яке містить 90 ммоль/л KCl, 45 ммоль/л NaCl, 44 ммоль/л сахарози, 10 ммоль/л фосфатного буфера (рН 7,4) [14]. Йодоацетамід (ЙАА) (Serva, США) додавали в концентрації 15 ммоль/л і витримували 60 хв при температурі 37°C. Натрієву сіль парахлормеркурійбензойної

parameters is directly associated to a structural state of anion carrier: band 3 protein [6, 8]. Application of anion transport inhibitors, for example dipyrnidamol could be one of the ways to control cell sensitivity to the effect of environmental factors. Another variant of this control is to modify a structural state of cytoskeletal proteins and membrane by specific agents, for example sulfhydryl reagents [3]. Effect not only on anion transport characteristics, but on cytoskeletal proteins interaction with the membrane, where band 3 protein participates in regulation, may be the base for the action of modifiers and inhibitors of anion transport system [8].

This research was targeted to study the peculiarities of sulphate anion transport by band 3 protein of human erythrocyte membranes, affected by various dipyrnidamol concentrations under conditions of increased medium osmolarity, modification of cytoskeletal proteins and structural-functional state of band 3 protein and its interaction with cytoskeleton.

Materials and methods

Human erythrocytes of A (II) donor blood served as investigation object. Glycicir was used as preserving medium. Blood plasm and leukocytes were removed with three-fold washing-out in 7-10-fold volume of 150 mmol/l NaCl during 10 min centrifugation at 3000 rpm. Plasm, buffy coat and supernatant were removed by aspiration. Precipitated sediment of erythrocytes was stored at 4°C and used within 3 hours.

Sulphate anion transport with mandatory proton transfer was studied with pH-metry in a 2.5 ml well with pH-electrode, where temperature regimen was adjusted with maintaining 37°C. For this purpose such solutions as: isotonic one of 110 mmol/l Na₂SO₄ or hypertonic of 110 mmol/l Na₂SO₄, 860 mmol/l sucrose were introduced into a well by 2 ml. There were also added to the solution by 5 µl of 200 mmol/l NaHCO₃ and different concentrations of dipyrnidamol (Sigma, USA), medium pH was levelled to erythrocyte suspension pH (pH 7.0-7.3). Packed red cells of 50 µl was introduced into a well with a constant mixing. pH changes of cell suspension were measured with Endim recorder (Germany).

Erythrocyte suspension with 20% hematocrit in the medium, containing 90 mmol/l KCl, 45 mmol/l NaCl, 44 mmol/l sucrose, 10 mmol/l phosphate buffer (pH 7.4) was prepared for treatment with cytoskeletal modifiers [14]. Iodoacetamide (IAA) (Serva) was added under 15 mmol/l and exposed for 60 min at 37°C, p-chloromercuribenzoic acid, sodium salt (pCMB) (Reakhim) was added under 1 mmol/l with 60 min incubation at 37°C. Erythrocyte treatment by combining IAA and pCMB was as follows: the cells were primarily treated with IAA in 15 mmol/l for 20 min at 37°C, then pCMB was added in 1 mmol/l and

кислоти (ПХМБ) (Реахім, Росія) додавали в концентрації 1 ммоль/л і також проводили інкубацію протягом 60 хв при температурі 37°C. Комбінуючи ЙАА з ПХМБ, клітини обробляли ЙАА в концентрації 15 ммоль/л 20 хв при температурі 37°C, після чого ПХМБ додавали в концентрації 1 ммоль/л і витримували 60 хв при тій же температурі [11, 19]. Модифіковані еритроцити відмивали тричі 10-кратним об'ємом середовища обробки і двічі 10-кратним об'ємом 150 ммоль/л NaCl. Ущільнений осад еритроцитів зберігали при 4°C і використовували не більше 3-х годин.

На основі отриманих кривих змін рН визначали константу транспорту сульфату в клітину (K_2) [4].

Усі використані у роботі реактиви мали кваліфікацію „хч” або „чда”.

Статистичну обробку результатів проводили за методом Стьюдента-Фішера.

Результати та обговорення

Білок смуги 3 має каналоподібну структуру, яка забезпечує проходження аніонів у одному напрямку, а також їх обмінний транспорт [10], впродовж якого вони зв'язуються з транспортним сайтом білка, що розміщений на одному боці мембрани, з утворенням комплексу, який переміщується на другий бік мембрани та розпадається, звільнившись від аніонів. Цей процес супроводжується конформаційними змінами гідрофобних фрагментів білка смуги 3 [10]. Функціональна активність переносника визначається не тільки концентрацією аніонів у середовищі інкубації, але й структурно-функціональним станом комплексу цитоскелет-мембрана [8], який суттєво змінюється при гіпертонії і має велике значення у збереженні цілісності клітин в умовах заморожування-відігріву [1-3].

Таким чином, зміна стану цитоскелета та ступінь його стабілізуючого впливу на біслой можуть бути викликані не тільки впливом на певні компоненти і системи еритроцита, наприклад за допомогою хімічних модифікаторів, але й внаслідок зміни загального стану клітини, зокрема при її інкубації в гіпертонічних середовищах з різною осмолярністю, яка визначає рівень початкової дегідратації клітини.

Експериментальні дані свідчать, що однією з можливих причин пошкодження еритроцитів під час охолодження є зміни, які спостерігаються в комплексі цитоскелет-бішар [1], а розвиток чутливості еритроцитів до холодого шоку здебільшого визначається рН та іонною силою середовища [15], які, крім того, контролюють і транспорт аніонів. Перерозподіл аніонів є причиною змін осмотичного стану клітини. Реакція еритроцитів на нефізіологічні осмотичні умови середовища залежить від білків цитоскелета.

exposed for 60 min at the same temperature [10, 11, 19]. Modified erythrocytes were washed-out thrice with 10-fold volume of treatment medium and twice with 10-fold one of 150 mmol/l NaCl. Compacted sediment was stored at 4°C and used within 3 hours. The constant of sulphate transport into a cell (K_2) was determined basing on the obtained curves of pH changes [4].

All used reagents were of either “chemically pure” or “pure for analysis” grade.

The results were statistically processed with Student-Fisher method.

Results and discussion

Band 3 protein has a channel-like structure, providing anion passing in one direction as well as their exchange transport [10], during their binding with transport site of the protein, located on one side of membrane with formation of the complex, moving to another side of membrane and disintegrating, by getting free of anions. This process is associated with conformational changes in hydrophobic fragments of band 3 protein [10]. Functional activity of carrier is determined not only by anion concentration in the incubation medium, but structural and functional state of cytoskeleton-membrane complex [9], which is significantly changed under hypertonic conditions [1-3] and is of great importance in preserving cell integrity under freeze-thawing.

Thus, a change in cytoskeletal state and a degree of its stabilising effect on bilayer can be caused not only by affecting certain components and systems of erythrocyte, for example by using chemical modifiers, but due to a change in general state of cell, namely at its incubation in hypertonic media with different osmolarities, which determines the level of initial cell dehydration.

Experimental data testify to the fact that one of the possible causes of erythrocyte damage during cooling are the changes, observed in cytoskeleton-bilayer complex [1], and the development of erythrocyte sensitivity to cold shock is mainly determined by pH and ion strength of medium [5], which, in addition, control the anion transport as well. Redistribution of anions is the cause of the variations in cell osmotic state. Response of erythrocytes, the one of dipyridamol on non-physiological medium osmotic conditions depends on cytoskeletal proteins.

Dipyridamol effect on sulphate anion transport by band 3 protein of native erythrocytes depends on its concentration (Fig. 1). Dipyridamol is known to be originally a blocker of anion access channels to the band 3 protein transport site. Therefore this inhibitor reduces the anion sulphate transport.

The Fig. 1 shows that the most significant decrease of anion transport in our protocol is observed during dipyridamol concentration increase from 0 up to

Вплив діпіридамолу на транспорт аніонів сульфату білком смуги 3 нативних еритроцитів залежить від його концентрації (рис. 1). Відомо, що діпіридамол за своєю природою є блокатором каналів доступу аніонів до транспортного сайту білка смуги 3. Тому цей інгібітор зменшує транспорт аніонів сульфату.

Як видно з рис. 1, найбільш значне зниження транспорту аніонів у нашій постановці спостерігається при підвищенні концентрації діпіридамолу від 0 до 10 мкМ як в ізотонічному, так і в гіпертонічному середовищах. Подальше підвищення концентрації блокатора в середовищах інкубації не має значного впливу на транспорт. При збільшенні концентрації діпіридамолу до 10 мкМ в ізотонічних умовах відсоток інгібування транспорту становить майже 50%, а в умовах гіпертонії – близько 60%. При максимальній концентрації інгібітора 50 мкМ в ізотонічному середовищі досягається більше 60% інгібування, а в гіпертонічному – більш 70% (рис. 2). Таким чином, дегідратація клітин в гіпертонічних умовах має незначний вплив на пригнічення аніонного транспорту діпіридамолом.

Транспорт аніонів сульфату білком смуги 3 залежить від осмотичного тиску середовища інкубації. Інкубація еритроцитів в гіпертонічному середовищі, яке містить сахарозу і сульфат натрію,

10 μM both in isotonic and hypertonic media. Further increase in blocker concentration in incubation media does not significantly affect the transport. When augmenting dipyridamol concentration up to 10 μM under isotonic conditions the percentage of transport inhibition makes more than 50% and 60% for hypertonic ones. Under maximum inhibitor concentration of 50 μM more than 60% inhibition is achieved in isotonic medium, and more than 70% for hypertonic one (Fig. 2). Thus, cell dehydration under hypertonic conditions slightly affects the anion transport inhibition by dipyridamol.

Anion sulphate transport by band 3 protein depends on osmotic pressure of incubation medium. Erythrocyte incubation in hypertonic medium, comprising sucrose and sodium sulphate, stipulates a decrease in sulphate anion transport almost by 50% if to compare with isotonic conditions (0.1 mol/l Na_2SO_4). This testifies to the fact that either rearrangement of cytoskeletal state or its interaction with membrane elements under these conditions affect an anion transport function of band 3 protein. Decrease in anion transport in hypertonic medium can be probably related to a deforming effect on hypertonic conditions, resulting in a loss of significant part of water by erythrocytes and their getting a flattened shape [1, 5]. This can cause a shift in conformational orientation of hydrophobic segments of band 3 protein. Since the

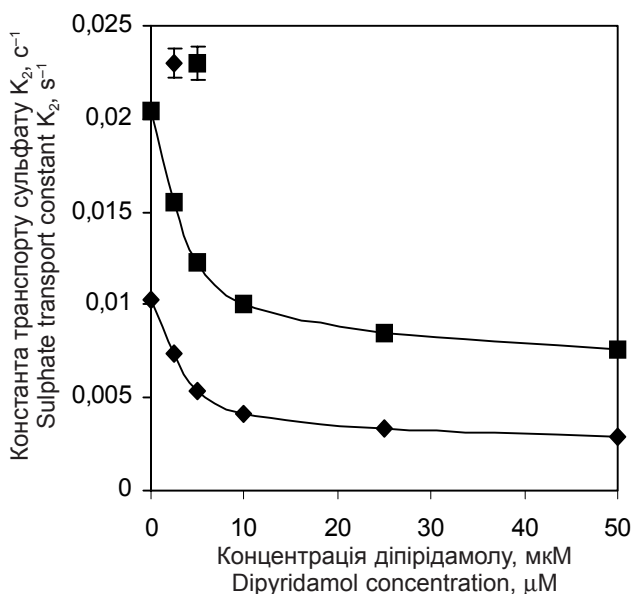


Рис. 1. Вплив діпіридамолу на транспорт аніонів сульфату білком смуги 3 мембрани еритроцитів в ізотонічному та гіпертонічному середовищах: \blacklozenge – гіпертонічний розчин, що містить 0,11 моль/л Na_2SO_4 , 0,86 моль/л сахарози; \blacksquare – ізотонічний розчин, що містить 0,11 моль/л Na_2SO_4 .

Fig. 1. Dipyridamol effect on sulphate anion transport by band 3 protein of erythrocyte membrane in isotonic and hypertonic media: \blacklozenge – hypertonic solution, comprising 0.11 mol/l Na_2SO_4 , 0.86 mol/l sucrose; \blacksquare – isotonic solution with 0.11 mol/l Na_2SO_4 .

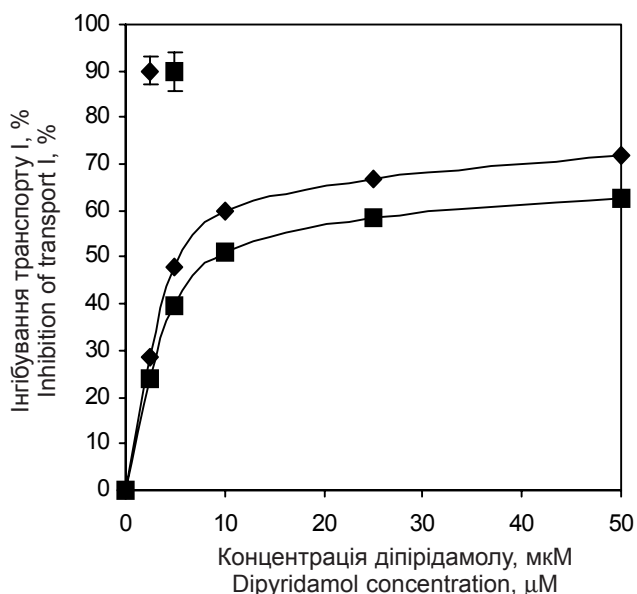


Рис. 2. Інгібування транспорту аніонів сульфату білком смуги 3 мембрани еритроцитів в ізотонічному та гіпертонічному середовищах: \blacklozenge – гіпертонічний розчин, що містить 0,11 моль/л Na_2SO_4 , 0,86 моль/л сахарози; \blacksquare – ізотонічний розчин, що містить 0,11 моль/л Na_2SO_4 .

Fig. 2. Inhibition of sulphate anion transport by band 3 protein of erythrocyte membrane in isotonic and hypertonic media: \blacklozenge – hypertonic solution, comprising 0.11 mol/l Na_2SO_4 , 0.86 mol/l sucrose; \blacksquare – isotonic solution with 0.11 mol/l Na_2SO_4 .

зумовлює зниження транспорту аніонів сульфату майже на 50% порівняно з умовами ізотонії (0,11 моль/л Na_2SO_4). Це свідчить про те, що перебудова стану цитоскелета, і його взаємодії з елементами мембрани в даних умовах впливають на аніонтранспортну функцію білка смуги 3. Зниження транспорту аніонів в гіпертонічному середовищі, вірогідно, може бути пов'язано з деформуючим впливом умов гіпертонії, в результаті якого еритроцити втрачають значну частину води і набувають сплющеної форми [1, 5]. Це може викликати зміщення конформаційної орієнтації гідрофобних сегментів білка смуги 3. Оскільки перенесення аніонів супроводжується не локальними змінами конформації транспортного сайту, а узгодженою переорієнтацією у просторі гідрофобних сегментів білка у мембрані, деформуючий вплив гіпертонічного середовища може викликати зміни в енергії утворення та переміщення комплексу в мембрані внаслідок порушення упаковки спіральних сегментів, які утворюють канал.

Дія гіпертонічного середовища на транспорт аніонів сульфату може бути викликана і іншими факторами. В умовах підвищення осмолярності середовища підсилюється взаємодія заряджених ділянок мембранних білків і знижується плинність мембрани еритроцитів [12], яка суттєво змінює транспорт аніонів [9]. Вплив його може здійснюватись внаслідок послаблення конформаційної рухливості гідрофобних сегментів аніонного переносника.

Відомо, що механізм аніонного транспорту потребує узгодженої роботи та взаємодії ділянок, досить віддалених від транспортного сайту. Зміни як у ліпідному оточенні [16], так і білковому (модифікація білків цитоскелета) можуть впливати на транспортну функцію аніонного переносника. Враховуючи те, що білок смуги 3 мембран еритроцитів є основним трансмембранним білком, який об'єднує цитоскелет і біслою у єдиний функціональний комплекс, і те, що його сегменти проходять через еритроцитарну мембрану до 14 разів [17], виконуючи разом з цитоскелетом функцію підтримки ліпідного бішару, можна припустити, що ряд факторів будуть впливати на структурно-функціональний стан цього білка, а тому і на транспорт аніонів через плазматичну мембрану.

Для вивчення стану аніонтранспортної системи в умовах модифікації використовували обробку еритроцитів сульфгідрильними реагентами, ЙАА та ПХМБ. Одержані результати показали, що обробка еритроцитів цими модифікаторами сприяє полегшенню транспорту аніонів сульфату білком смуги 3. Причому кожна з використаних модифікацій полегшувала аніонний транспорт по-різному.

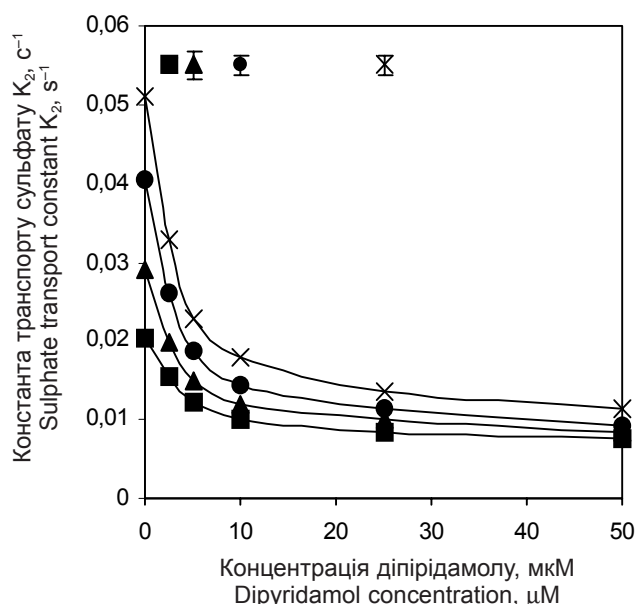


Рис. 3. Вплив діпіридамола на транспорт аніонів сульфату білком смуги 3 мембрани нативних і модифікованих еритроцитів в ізотонічному середовищі, яке містить 0,11 моль/л Na_2SO_4 : ■ – нативні еритроцити; ▲ – еритроцити, модифіковані ЙАА; ● – еритроцити, модифіковані ПХМБ; × – еритроцити, модифіковані ЙАА і ПХМБ.

Fig. 3. Dipyridamol effect on sulphate anion transport by band 3 protein of native and modified erythrocytes membrane in isotonic medium with 0.11 mol/l Na_2SO_4 : ■ – native erythrocytes; ▲ – IAA modified erythrocytes; ● – pCMB modified erythrocytes; × – IAA and pCMB modified erythrocytes.

anion transfer is accompanied not by local changes in transport site conformation, but a correlated reorientation in space of protein hydrophobic segments in a membrane, a deforming effect of hypertonic medium can cause the changes in formation energy and complex translocation through a membrane, due to a disorder in channel-forming spiral segments.

Effect of hypertonic medium on sulphate anion transport can be affected by other factors as well. Under conditions of increased medium osmolarity the interaction of charged sites of membrane proteins strengthens with reduction of erythrocyte membrane fluidity [12], which significantly changes anion transport [9]. Its effect can be realised due to the weakening in conformation mobility of anion carrier hydrophobic segments.

Mechanism of anion transport is known to need a correlated functioning and interaction of components, being at a quite distance from a transport site. Changes both in lipid [16] and protein environments (cytoskeletal protein modification) can affect transport function of anion carrier. Taking into account the fact that band 3 protein of erythrocyte membranes is the main transmembrane protein, joining cytoskeleton and bilayer into a common functional entire, and that its segments pass through an erythrocyte membrane up

Як видно з рис. 3, обробка еритроцитів ЙАА сприяє збільшенню транспорту сульфату на 40% порівняно з нативними клітинами. При модифікації еритроцитів блокуються цитоплазматичні SH-групи і SH-групи у мембрані. Йодоацетамід здатний заблокувати 5 SH-груп цитоплазматичного фрагмента білка смуги 3, але не взаємодіє з 6-ю ПХМБ-специфічною SH-групою [7].

Таким чином, виявлене полегшення переносу сульфату в еритроцитах, що оброблені ЙАА, може бути пов'язане з модифікацією білків цитоскелета і мембрани, а також з безпосередньою взаємодією ЙАА з 5 сульфгідрильними групами цитоплазматичного фрагмента білка смуги 3, що може спричинити зміни конформації молекули аніонного переносника.

Обробка еритроцитів ПХМБ сприяла більш значному полегшенню транспорту сульфату. При даній модифікації клітин перенесення сульфат аніону збільшувалося майже у 2 рази (рис. 3). Згідно з [11, 18] обробка еритроцитів ПХМБ у певних умовах порушує зв'язок мембрана-цитоскелет в зоні білок смуги 3-анкірин-спектрин. Дія даного реагенту виявляє себе при зв'язуванні його ковалентно з SH-групою, що локалізована на 17 кДа гідрофобному фрагменті білка смуги 3. Оскільки ПХМБ за своєю природою є зарядженою молекулою, то його вплив на еритроцити буде викликати зміни структурних взаємодій білків у мембрані [18]. Таким чином, більш значне полегшення переносу сульфату при попередній обробці еритроцитів ПХМБ можна пояснити тим, що в цих умовах модифікація веде не тільки до зміни стану окремих білків мембрани і цитоскелета в цілому, але й до порушення зв'язку мембрана-цитоскелет в зоні білок смуги 3-анкірин-спектрин внаслідок взаємодії цього модифікатора з ПХМБ-специфічною SH-групою.

Для підвищення специфічності впливу ПХМБ на еритроцити їх обробляли ЙАА. Така комбінована модифікація викликала збільшення транспорту аніонів сульфату білком смуги 3 у 2,5 рази відносно контролю (рис. 3). Можливо, це пов'язано з тим, що початкова обробка еритроцитів ЙАА зумовлює насичення цитоплазматичного пулу сульфгідрильних груп і частини SH-груп мембрани. Внаслідок цього ПХМБ не блокує дані групи, а має можливість взаємодіяти з більшим відсотком ПХМБ-специфічних сульфгідрильних груп білків смуги 3, що викликає зміни великої кількості зв'язків білок смуги 3-анкірин-спектрин. Можна припустити, що зміна зв'язку білка смуги 3 з цитоскелетом може бути однією з причин полегшення аніонного транспорту в умовах *in vitro*.

Введення діпірідамолу в середовище інкубації (рис. 3) гальмує транспортну функцію білка смуги 3

to 14 times [17], realising together with cytoskeleton a reinforcing function of lipid bilayer, we can assume that some factors will affect the structural and functional state of this protein and consequently the anion transport through plasmatic membrane.

Erythrocyte treatment with such sulfhydryl reagents as IAA and pCMB was used to investigate the state of anion transport system under modification. The results obtained demonstrated that the erythrocyte treatment with these modifiers contributed to facilitation of sulphate anion transport by band 3 protein. Moreover each of applied modifications facilitated anion transport.

As presented in Fig. 3 IAA erythrocyte treatment contributes to augmentation of sulphate transport by 40% in comparison with native cells. Cytoplasmic pool of SH-group and one in a membrane are blocked during erythrocyte modification. Iodoacetamide is capable to block 5 SH-groups of band 3 protein cytoplasmic fragment, but it does not interact with 6th pCMB-specific SH-group [7].

Thus, the revealed facilitation of sulphate transport in IAA-treated erythrocytes can be associated with modification of cytoskeletal proteins and membrane, as well as with direct IAA interaction with 5 sulfhydryl groups of band 3 protein cytoplasmic fragments, that can change the molecule conformation of anion carrier.

Treatment of erythrocytes with pCMB contributed to more significant facilitation of sulphate transport. Under this modification in cells the sulphate anion transport increased almost twice (Fig. 3). As reported in details in the papers [11, 18], the pCMB erythrocyte treatment under certain conditions impairs the membrane-cytoskeleton bond within the band 3 protein-ankyrin-spectrin area. This reagent action is manifested during its covalent binding with SH-group, located at 17 kDa hydrophobic fragment of band 3 protein. pCMB, being originally a charged molecule, will cause the changes in protein structural rearrangements in a membrane by its effect on erythrocytes [18]. Thus, more significant facilitation of sulphate transport at initial erythrocyte treatment with pCMB can be explained by the fact, that under these conditions the modification results not only in state change of certain proteins of membrane and cytoskeleton in the whole, but in a disorder in the membrane-cytoskeleton bond within the area of band 3 protein-ankyrin-spectrin due to this modifier interaction with pCMB-specific SH group.

Erythrocytes were IAA treated for augmenting a specific pCMB effect on them. Such combined modification resulted in an increase in sulphate anion transport by band 3 protein in 2.5 times in respect of the control (Fig. 3). This may be associated to the fact that an initial erythrocyte treatment with IAA stipulates the saturation of cytoplasmic pool of sulfhydryl groups

на тлі всіх початкових модифікацій, причому ступінь гальмування переносу цих аніонів також залежить від концентрації діпіридамола, як і у випадку з нативними клітинами. При підвищенні концентрації діпіридамола у середовищі від 1 до 10 мкМ спостерігається найбільш значний інгібуючий ефект цієї сполуки. При цьому відсоток гальмування транспорту аніонів сульфату діпіридамолом тим вищий, чим ефективніша була початкова модифікація (рис. 4). Так, при концентрації діпіридамола 10 мкМ транспорт сульфату в нативних еритроцитах зменшується на 50%, в еритроцитах, модифікованих ЙАА, – на 60%, а після модифікації ПХМБ і комбінацією ЙАА та ПХМБ – приблизно на 65%. Подальше підвищення концентрації діпіридамола в середовищі інкубації суттєво не впливає на транспорт сульфату.

Вплив початкової модифікації SH-груп білків мембрани і цитоскелета у гіпертонічних умовах зберігає таку ж тенденцію, що і в ізотонічних (рис. 5). Модифікація еритроцитів окремо ЙАА і ПХМБ значно не відрізняється при дослідженні переносу сульфат аніонів. Ступінь впливу кожної модифікації в умовах гіпертонії значно нижча порівняно з ізотонією. Так, при початкових модифікаціях еритроцитів ЙАА і ПХМБ транспорт сульфату у гіпертонічних умовах полегшується

and a part of membrane SH-group. As a result pCMB does not block these groups, but has the possibility to interact with greater percentage of pCMB-specific sulfhydryl groups of band 3 proteins, that change a big number of bonds of band 3 protein-ankyrin-spectrin. Thus, we can assume that a change in the bond of band 3 protein with cytoskeleton can be one of the causes in facilitating anion transport *in vitro*.

Dipyridamol introduction into the incubation medium (Fig. 3) inhibits band 3 protein transport function at the background of all initial modifications, moreover the inhibition degree of these anions transfer depends also on dipyridamol concentration the same as for the case with native cells. If increasing dipyridamol concentration in the medium from 1 to 10 μM the most significant inhibiting effect of this compound is noted. At the same time the percentage of inhibition of sulphate anion transport by dipyridamol is higher with more efficient initial modification (Fig. 4). Thus, under 10 μM dipyridamol concentration the sulphate transport in native erythrocytes reduces by 50%, in IAA modified erythrocytes it does by 60% and approximately by 65% after pCMB modification and IAA with pCMB combination. Further augmentation of dipyridamol concentration in incubation medium does not significantly affect the sulphate transport.

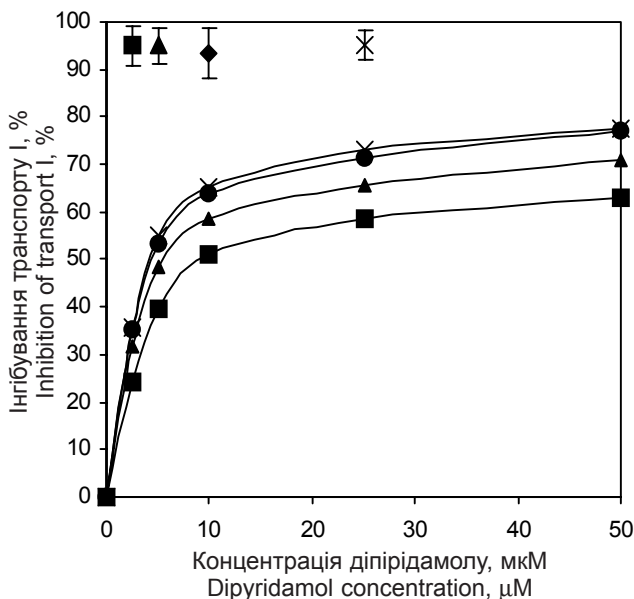


Рис. 4. Інгибування транспорту аніонів сульфату білком смуги 3 мембрани нативних і модифікованих еритроцитів в ізотонічному середовищі, яке містить 0,11 моль/л Na_2SO_4 : ■ – нативні еритроцити; ▲ – еритроцити, модифіковані ЙАА; ● – еритроцити, модифіковані ПХМБ; × – еритроцити, модифіковані ЙАА і ПХМБ.

Fig. 4. Inhibition of sulphate anion transport by band 3 protein of native and modified erythrocytes membrane in isotonic medium, comprising 0.11 mol/l Na_2SO_4 : ■ – native erythrocytes; ▲ – IAA modified erythrocytes; ● – pCMB modified erythrocytes; × – IAA and pCMB modified erythrocytes.

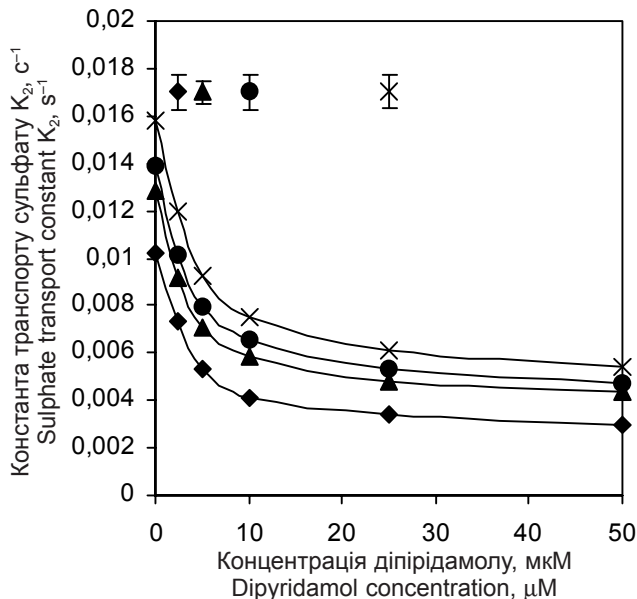


Рис. 5. Вплив діпіридамола на транспорт аніонів сульфату білком смуги 3 мембрани нативних і модифікованих еритроцитів у гіпертонічному середовищі, яке містить 0,11 моль/л Na_2SO_4 , 0,86 моль/л сахарози: ■ – нативні еритроцити; ▲ – еритроцити, модифіковані ЙАА; ● – еритроцити, модифіковані ПХМБ; × – еритроцити, модифіковані ЙАА і ПХМБ.

Fig. 5. Dipyridamol effect on sulphate anion transport by band 3 protein of native and modified erythrocytes membrane in hypertonic medium with 0.11 mol/l Na_2SO_4 , 0.86 mol/l sucrose: ■ – native erythrocytes; ▲ – IAA modified erythrocytes; ● – pCMB modified erythrocytes; × – IAA and pCMB modified erythrocytes.

лише на 30% (в ізотонії при модифікації ЙАА – на 40%, а при модифікації ПХМБ – на 100%). При комбінованій обробці клітин обома модифікаторами SH-груп полегшення транспорту через білок смуги 3 становить 55% в умовах гіпертонії (в ізотонії 150%).

Крім того, інкубація еритроцитів у гіпертонічному середовищі, що містить сахарозу і сульфат натрію, знижує транспорт аніонів сульфату білком смуги 3 тим більше, чим ефективніша була початкова модифікація. Так, якщо в умовах гіпертонії транспорт сульфату в нативних еритроцитах інгібується на 50%, то в еритроцитах, які спочатку були модифіковані ЙАА, – на 56%, в еритроцитах, що зазнали модифікацію ПХМБ, – на 66%, а при початковій комбінованій модифікації клітин ЙАА і ПХМБ – на 70%.

Таким чином, під впливом гіпертонічних умов модифікація еритроцитів використаними сульфгідрильними реагентами суттєво згладжується. Це свідчить про те, що комбінована дія на клітини гіпертонії та модифікаторів має різний вплив на перенос аніонів. Гіпертонія, як фактор загальної модифікації клітин, відіграє більш вирішальну роль у зміні аніонного транспорту через мембрану еритроцитів.

Згідно з одержаними результатами (рис. 5), введення діпірідамолу в гіпертонічне середовище інкубації гальмує транспортну функцію білка смуги 3 на тлі всіх початкових модифікацій. Максимальний ефект гальмування цього блокатора спостерігається у тому ж інтервалі концентрацій, що і в ізотонічних умовах, а саме від 0 до 10 мкМ. В умовах гіпертонії гальмування транспорту сульфату діпірідамолом у модифікованих еритроцитах має дещо інший характер: відсоток інгібування для модифікованих клітин нижчий (біля 50% при концентрації діпірідамолу в середовищі 10 мкМ) порівняно з нативними еритроцитами (60% при тих же концентраціях інгібітора). При цьому характер інгібуючої дії цього блокатора однаковий для всіх трьох варіантів початкової модифікації (рис. 6). Подальше підвищення концентрації діпірідамолу в гіпертонічних умовах інкубації, як і в умовах ізотонії, суттєво не впливає на транспорт сульфату.

Висновки

Аналізуючи вплив на еритроцити підвищеної осмолярності середовища та сульфгідрильних реагентів, можна припустити, що зміна зв'язку білка смуги 3 з цитоскелетом може полегшувати транспорт аніонів сульфату через їх білок-транспортер, тоді як зміна стану як цитоскелета, так і його взаємодії з елементами мембрани може бути

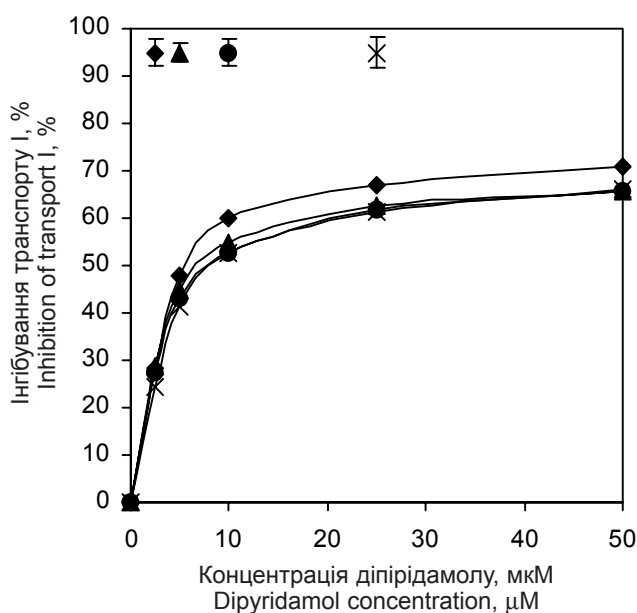


Рис. 6. Інгібування транспорту аніонів сульфату білком смуги 3 мембрани нативних і модифікованих еритроцитів у гіпертонічному середовищі, яке містить 0,11 моль/л Na_2SO_4 , 0,86 моль/л сахарози: ■ – нативні еритроцити; ▲ – еритроцити, модифіковані ЙАА; ● – еритроцити, модифіковані ПХМБ; × – еритроцити, модифіковані ЙАА і ПХМБ.

Fig. 6. Inhibition of sulphate anion transport by band 3 protein of native and modified erythrocytes membrane in hypertonic medium, comprising 0.11 mol/l Na_2SO_4 , 0.86 mol/l sucrose: ■ – native erythrocytes; ▲ – IAA modified erythrocytes; ● – pCMB modified erythrocytes; × – IAA and pCMB modified erythrocyte

The influence of initial modification of membrane and cytoskeletal protein SH-groups under hypertonic conditions preserves the similar tendency as for isotonic conditions (Fig. 5), moreover a separate erythrocyte modification by IAA and pCMB does not significantly differ when studying anion sulphate transfer. The effect degree of each modification under hypertonic conditions is significantly lower in comparison with isotonic ones. Thus, under initial erythrocyte modifications with IAA and pCMB the sulphate transport under hypertonic conditions is facilitated only by 30% (by 40% under isotony at IAA modification and by 100% under pCMB modification). At a combined cell treatment with both modifiers of SH-groups the facilitation of transport through the band 3 protein makes 55% under hypertonic conditions (150% under isotony).

In addition, erythrocyte incubation in hypertonic medium, comprising sucrose and sodium sulphate reduces the sulphate anion transport by band 3 protein the more, the more was the efficiency of initial modification. Thus, if under hypertonic conditions the sulphate transport in native erythrocytes is inhibited by 50%, in those, being pre-modified with IAA it was done by 56%, by 66% in those pCMB-modified and

однією з причин його гальмування. Координація змін взаємодій між білками цитоскелета та цитоскелетом і мембраною матиме значення для регуляції функціональної активності аніонного каналу.

Отже, характеристики переносу сульфат аніонів їх білком-транспортером в еритроцитах людини залежать від загального стану клітин, стану цитоскелета, плазматичної мембрани, їх взаємодій між собою, а також особливостей стану та конформації самого білка смуги 3.

Література

1. *Бондаренко В.А.* Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Дис. ... д-ра биол. наук.— Харьков, 1988.— 446 с.
2. *Бондаренко Т.П.* Осмолярность и температура среды как факторы, регулирующие чувствительность эритроцитов к охлаждению и осмотическому стрессу: Дис. ... д-ра биол. наук.— Харьков, 1994.— 351 с.
3. *Рамазанов В.В.* Вплив осмотичного стресу та модифікаторів цитоскелета на розвиток холодового та гіпертонічного шоку еритроцитів: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харків, 1994.— 14 с.
4. *Рамазанов В.В., Лупилова Н.А., Тодрин А.Ф., Бондаренко Т.П.* Осмотическая модификация транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде // Пробл. криобиологии.— 1999.— №4.— С. 34-41.
5. *Сторожок С.А., Соловьев С.В.* Структурные и функциональные особенности цитоскелета мембраны эритроцита // Вопросы мед. химии.— 1992.— Т. 38, №2.— С. 14-17.
6. *Черницкий Е.А., Воробей А.Б.* Структура и функция эритроцитарной мембраны.— Минск, 1981.— 330 с.
7. *Allen D.W., Cadman S.* Comparison of the effects of N-ethylmaleimide and iodoacetamide on red blood cell membranes // Proc. Soc. Exp. Biol. Med.— 1976.— Vol. 152, N3.— P. 318-321.
8. *Bennett V.* The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells // Annu. Rev. Biochem.— 1985.— Vol. 54.— P. 273-304.
9. *Cabantchik Z.I., Baruch D., Keren-Zur Y. et al.* The modulatory effect of membrane viscosity on structural and functional properties of the anion exchange protein of human erythrocytes // Memb. Biochem.— 1986.— Vol. 6, N3.— P. 197-216.
10. *Cabantchik Z.I., Knauf P.A., Rothstein A.* The anion transport system of the red blood cell // Biochem. Biophys. Acta.— 1978.— Vol. 515, N3.— P. 239-302.
11. *Clark S.J., Ralston G.B.* The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membranes brought about by p-mercuribenzenesulfonate // Biochim. Biophys. Acta.— 1990.— Vol. 1021, N2.— P. 141-147.
12. *D'Avilla Nunes M.* A spin label study of erythrocyte membranes during simulation of freezing // J. Membr. Biol.— 1981.— Vol. 60, N2.— P. 155-163.
13. *Falke J.J., Chan S.I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 3. Translocation inhibitors // Biochemistry.— 1986.— Vol. 25, N24.— P. 7899-7906.
14. *Haest C.W.M., Kamp D., Deuticke B.* Topology of membrane sulfhydryl groups in the human erythrocyte. Demonstration of a non-reactive population in intrinsic proteins // Biochim. Biophys. Acta.— 1981.— Vol. 643, N2.— P. 219-326.
15. *Jung C.Y., Green F.A.* Hypertonic cryohemolysis: ionophore and pH effects // J. Membrane Biol.— 1978.— Vol. 39, N2.— P. 273-284.
16. *Kohne W., Deuticke B., Haest C.W.* Phospholipid dependence of the anion transport system of the human erythrocyte

by 70% at the initial combined cell modification with IAA and pCMB.

Thus, under the effect of hypertonic conditions the erythrocyte modification by used sulfhydryl reagents is considerably smoothed. This testifies to the fact that the combined action on cells of hypertony and modifiers have different effect on anion transfer. Hypertony as the factor of general cell modification, plays more important role in a change of anion transport through erythrocyte membrane.

According to the results obtained (Fig. 5) dipyridamol introduction into hypertonic incubation medium inhibits transport function of band 3 protein at the background of all initial modifications. The maximum effect of this blocker inhibition is noted within the same concentration interval as for isotonic conditions, namely from 0 to 10 μM . Under hypertony the sulphate transport inhibition by dipyridamol in modified erythrocytes has other character, that is the percentage of inhibition for modified cells is slightly lower (about 50% at 10 μM dipyridamol concentration in the medium) if to compare with native erythrocytes (60% under the same concentrations of inhibitor). At the same time the character of inhibiting action of this blocker is similar for all three variants of initial modification (Fig. 6). Further augmentation of dipyridamol either under hypertonic conditions of incubation or isotonic ones does not significantly affect the sulphate transport.

Conclusions

Thus, during the analysis of the influence of an increased medium osmolarity and sulfhydryl reagents on erythrocytes we can suppose that a change in band 3 protein bond with cytoskeleton can facilitate the sulphate anion transport through their protein-transporter, meanwhile a change of state in both cytoskeleton and its interactions with membrane elements can be one of the causes for its inhibition. Coordination of changes in interactions between cytoskeletal proteins, cytoskeleton and membrane will be of importance for regulating functional activity of anion channel.

Thus, the characteristics of anion sulphate transfer by their protein-transporter in human erythrocytes depend on cell general state, one of cytoskeleton, plasma membrane, their interactions between themselves, as well as on state peculiarities and confirmation of band 3 protein itself.

References

1. *Bondarenko V.A.* Development and prevention of temperature shock in erythrocytes: Doctor thesis (biological sciences).— Kharkov, 1988.— 446 p.
2. *Bondarenko T.P.* Osmolarity and temperature of medium as factors, regulating erythrocyte sensitivity to cooling and

- membrane. Studies on reconstituted band 3 lipid vesicles // Biochim. Biophys. Acta.– 1983.– Vol 730, N1.– P. 139-150.
17. *Popov M., Tam L.Y., Li J., Reithmeier R.A.* Mapping the ends of transmembrane segment in a polytopic membrane protein. Scanning N- glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3 // J. Biol. Chem.– 1997.– Vol. 272, N29.– P. 18325-18332.
 18. *Ralston G.B., Crisp E.A.* The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1981.– Vol. 649, N1.– P. 98-104.
 19. *Toon M.R., Solomon A.K.* Control of red cell urea and water permeability by sulfhydryl reagents // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– Vol. 860, N2.– P. 361-375.

Надійшла 26.04.2005

- osmotic stress: Doctor thesis (biological sciences).– Kharkov, 1994.– 351 p.
3. *Ramazanov V.V.* Effect of osmotic stress and cytoskeletal modifiers on cold and hypertonic shock development in erythrocytes: Author's abstract of thesis of candidate of biological sciences, Kharkov, 1994.– 14 p.
 4. *Ramazanov V.V., Lupilova N.A., Todrin A.F., Bondarenko V.A.* Proton transport osmotic modification in erythrocytes in a sulphatic medium // Problems of Cryobiology.– 1999.– N4.– P. 34-41.
 5. *Storozhok S.A., Soloviev S.V.* Structural and functional peculiarities of cytoskeleton of erythrocyte membrane // Voprosy med. khimii.– 1992.– Vol. 38, N2.– P. 14-17.
 6. *Chernitsky E.A., Vorobey A.B.* Structure and function of erythrocyte membrane.– Minsk, 1981.– 330 p.
 7. *Allen D.W., Cadman S.* Comparison of the effects of N-ethylmaleimide and iodoacetamide on red blood cell membranes // Proc. Soc. Exp. Biol. Med.– 1976.– Vol. 152, N3.– P. 318-321.
 8. *Bennett V.* The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells // Annu. Rev. Biochem.– 1985.– Vol. 54, N??.– P. 273-304.
 9. *Cabantchik Z.I., Baruch D., Keren-Zur Y. et al.* The modulatory effect of membrane viscosity on structural and functional properties of the anion exchange protein of human erythrocytes // Memb. Biochem.– 1986.– Vol. 6, N3.– P. 197-216.
 10. *Cabantchik Z.I., Knauf P.A., Rothstein A.* The anion transport system of the red blood cell // Biochem. Biophys. Acta.– 1978.– Vol.515, N3.– P. 239-302.
 11. *Clark S.J., Ralston G.B.* The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membranes brought about by p-mercuribenzenesulfonate // Biochim. Biophys. Acta.– 1990.– Vol.1021, N2.– P. 141-147.
 12. *D'Avilla Nunes M.* A spin label study of erythrocyte membranes during simulation of freezing // J. Membr. Biol.– 1981.– Vol. 60, N2.– P. 155-163.
 13. *Falke J.J., Chan S.I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 3. Translocation inhibitors // Biochemistry.– 1986.– Vol. 25, N24.– P. 7899-7906.
 14. *Haest C.W.M., Kamp D., Deuticke B.* Topology of membrane sulfhydryl groups in the human erythrocyte. Demonstration of a non-reactive population in intrinsic proteins // Biochim. Biophys. Acta.– 1981.– Vol. 643, N2.– P. 219-326.
 15. *Jung C.Y., Green F.A.* Hypertonic cryohemolysis: ionophore and pH effects // J. Membrane Biol.– 1978.– Vol. 39, N2.– P. 273-284.
 16. *Kohne W., Deuticke B., Haest C.W.* Phospholipid dependence of the anion transport system of the human erythrocyte membrane. Studies on reconstituted band 3 lipid vesicles // Biochim. Biophys. Acta.– 1983.– Vol 730, N1.– P. 139-150.
 17. *Popov M., Tam L.Y., Li J., Reithmeier R.A.* Mapping the ends of transmembrane segment in a polytopic membrane protein. Scanning N- glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3 // J. Biol. Chem.– 1997.– Vol. 272, N29.– P. 18325-18332.
 18. *Ralston G.B., Crisp E.A.* The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1981.– Vol. 649, N1.– P. 98-104.
 19. *Toon M.R., Solomon A.K.* Control of red cell urea and water permeability by sulfhydryl reagents // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– Vol. 860, N2.– P. 361-375.

Accepted in 26.04.2005