

Влияние ПЭГ-1500 на связывание дипиридамола с анионным каналом эритроцитов

В.В. РАМАЗАНОВ, Я.О. НАРДИД, О.А. ОЛЕЙНИК, В.А. БОНДАРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of PEG-1500 on Dipyridamole Binding with Erythrocyte Anion Channel

RAMAZANOV V.V., NARDID YA.O., OLEJNIK O.A., BONDARENKO V.A.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследовали влияние ПЭГ-1500 на способность дипиридамола ингибировать транспорт ионов H^+ в эритроцитах. Установили, что ингибитор не связывается в анионном канале тений эритроцитов в сульфатной среде, несмотря на то, что он обладает способностью блокировать вход ионов H^+ в клетки. Использование эритроцитов, нагруженных фторидом, позволило предположить, что ингибиторная способность дипиридамола в клетках в сульфатной среде определяется выходящим потоком хлорида при работе цикла Якобса-Стиварта и что транспорт ионов H^+ отражает не полный объем входящего сульфата. Блокирование дипиридамолом указанной фракции транспорта ионов H^+ и сульфата значительно снимается в присутствии ПЭГ-1500 за счет перераспределения ингибитора между мембраной и раствором криопротектора.

Ключевые слова: эритроциты, анионный канал, ингибиторы транспорта, криопротекторы.

Досліджували вплив ПЕГ-1500 на здатність діпіридамолу інгібувати транспорт іонів H^+ в еритроцитах. Встановили, що інгібітор не зв'язується в аніонному каналі тіней еритроцитів у сульфатному середовищі, незважаючи на його здатність блокувати вхід іонів H^+ у клітини. Використання еритроцитів, навантажених фторидом, дозволило припустити, що інгібіторна здатність діпіридамолу в клітинах у сульфатному середовищі визначається вихідним потоком хлориду при роботі циклу Якобса-Стиварта і що транспорт іонів H^+ відбиває не повний обсяг вхідного сульфату. Блокування діпіридамолом зазначеної фракції транспорту іонів H^+ і сульфату значно знімається в присутності ПЕГ-1500 за рахунок перерозподілу інгібітору між мембраною і розчином криопротектора.

Ключові слова: еритроцити, аніонний канал, інгібітори транспорту, криопротектори.

The authors studied the effect of PEG-1500 on ability of dipyridamole to inhibit the H^+ ions transport in erythrocytes. It was established that the inhibitor was not bound in anion channel of erythrocytes ghosts in sulfate medium, despite its ability to block the H^+ ions entrance into cells. Using of fluoride loaded erythrocytes allowed to assume that dipyridamole's inhibitory ability in cells placed to sulfate medium is controlled by chloride output flow during Jacobs-Stewart cycle functioning, and that proton transport does not reflect the whole amount of entering sulfate. Dipyridamole blockage of stated fraction of H^+ ions transport was considerably withdrawn in PEG-1500 presense due to inhibitor's redistribution from membrane to cryoprotectant solution.

Key-words: erythrocytes, anion channel, posthypertonic lysis, cytoskeleton.

Водорастворимые полимеры ПЭГ нарушают осмотический баланс между гидратационным слоем поверхности мембраны и раствором, вызывают дегидратацию полярных групп фосфолипидов, снижая диэлектрические константы поверхности клетки и растворов и увеличивая гидрофобность мембраны [7,9,10]. При этом полимер создает стерический барьер, предотвращая взаимодействие белков с поверхностью липосом [8], а также снижая уровень включения спиновых зондов в белки и мембраны [1]. Вследствие сорбирования ПЭГ-400 и ПЭГ-1500 на поверхности белка происходит снижение подвижности нитроксильного радикала, ковалентно связанного с молекулой альбумина. Отмечается значительное вытеснение спинового зонда из гидрофобных полостей макромолекулы. При этом

Water soluble polymers PEG break the osmotic balance between membrane hydrate layer and solution, provoke the dehydration of phospholipids polar groups, decrease the dielectric constants of cell surface and solutions, increase the membrane hydrophobic properties [7, 9, 10]. Polymer creates a steric barrier, resulting in prevention of the proteins-liposomes surface interaction [8] and in a decrease in the rate of spin probes inclusion in proteins and membranes [1]. In consequence of PEG-400 and PEG-1500 sorption on protein surface a decrease in motility of nitroxy radical covalently associated with albumin molecule occurs. There is noted a significant displacement of spin probe from macromolecule hydrophobic areas. In this case the preliminarily added cryoprotectant prevents the penetration of hydrophobic probe into protein molecule. Investigations on erythrocyte

Адрес для корреспонденции: Рамазанов В.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-00-71, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Ramazanov V.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720071, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

предварительные добавки криопротекторов препятствуют проникновению гидрофобного зонда внутрь молекулы белка. Исследования на мембранах эритроцитов также показали, что молекулы ПЭГ вытесняют спиновые зонды из гидрофобных областей поверхности мембраны [1]. Дипиридамола блокирует транспорт хлорида, сульфата и фосфата в мембранах эритроцитов, связываясь в депротонированной незаряженной форме. При связывании происходит нейтрализация положительного заряда в канале доступа субстрата к транспортному сайту хлоридным анионом, который способствует встраиванию ингибитора в гидрофобный карман [6]. Молекулы дипиридамола включаются внутрь детергентных мицелл независимо от их заряда, что указывает на высокую гидрофобность ингибитора [2]. Таким образом, связывание дипиридамола в анионном канале может служить моделью для исследования влияния криопротекторов на характер взаимодействия блокатора с транспортным белком.

Цель работы – исследование перераспределения дипиридамола с поверхности мембраны в раствор, содержащий ПЭГ-1500.

Материалы и методы

В работе использовали соли: NaCl, NaF, Na₂SO₄ марки чда, ЭДТА и трис производства Calbiochem, дипиридамола, ДИДС (4,4' –диизотиоцианостильбен-2,2' –дисульфат динатриевая соль) производства Sigma, ПЭГ-1500 производства Merck.

Эритроциты человека получали из донорской крови 4-кратным отмыванием растворами, содержащими: а) 0,15 моль/л NaCl, 10 ммоль/л трис (pH 7.4), б) 0,15 моль/л NaF, 10 ммоль/л трис (pH 7.4). Клетки (7%-й гематокрит) инкубировали в указанных растворах трижды по 10 мин при 37°C. Полученные хлорид- и фторидсодержащие эритроциты использовали в экспериментах на рН-метре, сопряженном с самописцем и термостатируемой ячейкой с рН-электродом. Исследовали обмен внутриклеточных анионов хлорида и фторида на внеклеточный сульфат в эритроцитах, внесенных в ячейку, содержащую 0,12 моль/л Na₂SO₄. В данном случае происходит выход хлорида и ионов водорода при работе цикла Якобса-Стеварта (закисление) и обмен внутриклеточного хлорида на внеклеточный сульфат и ион водорода (защелачивание) [11]. Константы скорости входа ионов H⁺ и процент ингибирования I дипиридамолом вычисляли соответственно по формулам:

$$K = \ln 10 * (\Delta \text{pH} / \Delta t);$$

$$I = (1 - K_{\text{дип}} / K_{\text{конт}}) * 100\%,$$

membrane showed also that PEG molecules displaced the spin probes out of hydrophobic areas of membrane surface [1]. Dipyridamole, being bound in non-proton uncharged form, blocks the chloride, sulfate and phosphate transport in erythrocytes membrane. During its binding the neutralisation of positive charge by chloride anion occurs in channel of substrate access transport site, and this promotes the inhibitor incorporation into hydrophobic “pocket” [6]. Dipyridamole molecules are incorporated into detergent micelles independently from their charge, this points to a highly expressed hydrophobic properties of inhibitor [2]. Thus, binding of dipyridamole in anion channel can serve as a model for investigation of cryoprotectant action to the character of blocker-transport protein interaction.

The aim of this work was to study the rearrangement of dipyridamole from membrane surface to PEG-1500 containing solution.

Materials and methods

The following substances were used in the study: NaCl, NaF, Na₂SO₄ (“pure for analysis” rate); EDTA, tris (Calbiochem); dipyridamol, DIDS (4, 4' – diisothiocyano stilbene – 2, 2' – disulphonate disodium salt) (Sigma); PEG-1500 (Merck).

Human erythrocytes were derived from donor blood by 4-fold washing with solutions, containing a) 0.15 M NaCl, 10 mM tris (pH 7.4); b) 0.15 M NaF, 10 mM tris (pH 7.4). The cells (7% hematocrit) were thrice incubated in the given solutions during 10 min at 37°C. Obtained chloride and fluoride containing erythrocytes were used in experiments on pH-meter with a thermostat cell and recorder. The intracellular chloride and fluoride anions exchange for extracellular sulphate in erythrocytes was studied in the cells, containing 0.12 M Na₂SO₄. In this case the efflux of chloride and protons during Jacobs-Stewart cycle functioning occurs (acidification) and intracellular chloride exchanges for extracellular sulfate and proton (alkalisation) [11]. Constants of H⁺ ions entering rate and the percentage of dipyridamole inhibiting were calculated with the following formula:

$$K = \ln 10 * (\Delta \text{pH} / \Delta t);$$

$$I = (1 - K_{\text{dip}} / K_{\text{cont}}) * 100\%,$$

where K_{dip} and K_{cont} are the constants of H⁺ ions influx rate in presence or absence of dipyridamole, correspondingly. The erythrocytes (20% hematocrit) were treated with DIDS of 50 μM concentration during 60 min at 37°C in medium, containing 0.15 M NaCl, 10 mM tris (pH 7.4), then they were 4-fold washed (at 3000 rpm). With dipyridamole of 25, 50, 100, 200 μM concentration the cells (hematocrite of 2%) were treated during 10 min in buffer-free medium, containing 0.15 M NaCl, and then sedimented without inhibitor

где $K_{\text{дип}}$ и $K_{\text{конт}}$ – константы скорости входа ионов H^+ соответственно при наличии и отсутствии дипиридамола. Эритроциты (20%-й гематокрит) обрабатывали с ДИДС в концентрации 50 мкмоль/л, 60 мин при 37°C в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl, 10 ммоль/л трис (pH 7.4), и отмывали 4 раза (3000 об/мин). С дипиридамолом в концентрациях 25, 50, 100, 200 мкмоль/л клетки (2%-й гематокрит) обрабатывали 10 мин в безбуферной среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl и осаждали без отмывания ингибитора. Белые тени эритроцитов получали лизисом клеток на ледяной бане в среде, содержащей 1 ммоль/л ЭДТА, 5 ммоль/л трис (pH 8) в течение 10 мин. Тени отмывали лизирующей средой при 15000 об/мин 15 мин при 4°C до полного удаления гемоглобина. Связывание дипиридамола оценивали по степени его флуоресцентной поляризации, которую тестировали при титровании 1 мкмоль/л реагента тенями эритроцитов в спектрометрической кювете спектрофлуориметра Hitachi 2MPF. Величину поляризации флуоресценции вычисляли по формуле [3]:

$$P=(V_v -L_v*(V_H/L_H))/(V_v+L_v*(V_H/L_H)),$$

где V_v, L_v, L_H, V_H – интенсивности флуоресценции, измеренные с поляризаторами при 0-0°; 0-90°; 90-90°; 90-0° соответственно.

Результаты и обсуждение

Эксперименты показали, что рост концентрации дипиридамола вызывает ингибирование входа протонов в эритроциты. Если экспериментальная среда содержала дополнительно 15% ПЭГ-1500, это приводило к снятию блокирующей способности ингибитора (рис. 1). Учитывая такой результат, эритроциты были обработаны различными концентрациями дипиридамола, чтобы молекулы ингибитора изначально связались с мембраной. В этом случае также отмечается блокирование входа протонов в клетку, которое подавляется в присутствии ПЭГ-1500, хотя и в меньшей степени (рис. 2, а). Когда в ячейку дополнительно были добавлены такие же концентрации дипиридамола, как и при обработке эритроцитов, ингибирование транспорта протонов усиливалось, однако влияние ПЭГ-1500 на снижение блокирующей способности дипиридамола сохранялось (рис. 2, б). В последнем случае подавляющая способность ПЭГ-1500 на ингибиторную силу дипиридамола была наименее выраженной. Это понятно, так как блокатор был предварительно связан с мембраной клетки и, кроме того, находился в среде инкубации. Полученные результаты указывают на то, что ПЭГ-1500, во-первых, может препятствовать контакту дипиридамола с мембраной и соответ-

washing-out. Erythrocyte ghosts were obtained by cell lysis on ice bath in the medium, containing 1mM EDTA, 5 mM tris (pH 8) during 10 min. The ghosts were washed by lysing medium at 15000 rpm during 15 min at 4°C upto a total hemoglobin removal. Dipyridamole binding was evaluated by its fluorescent polarisation, tested by titring of 1mCM of reagent by erythrocytes ghosts in spectrometrical well of Hitachi 2MPF spectrofluorimeter. The fluorescence polarisation rate was calculated by the following formula [3]:

$$P=(V_v -L_v*(V_H/L_H))/(V_v+L_v*(V_H/L_H)),$$

where V_v, L_v, L_H, V_H are fluorescence intensities, measured with polarisators at 0-0°; 0-90°; 90-90°; 90-0°, correspondingly.

Results and discussion

It was shown in the experiments that a rise in dipyridamole concentration results in inhibition of proton influx into erythrocytes. The blocking ability of inhibitor was withdrawn, if the medium additionally contained 15% PEG-1500 (Fig. 1). Taking this result into account, the erythrocytes were treated by various concentrations of dipyridamol, to provide a preliminary binding of inhibitor and membrane. In this case we also observed the blockage of proton influx to the cells, being suppressed in PEG-1500 presence, but in lesser extent (Fig. 2a). At extra adding into the well the same dipyridamole concentrations, as those for erythrocytes

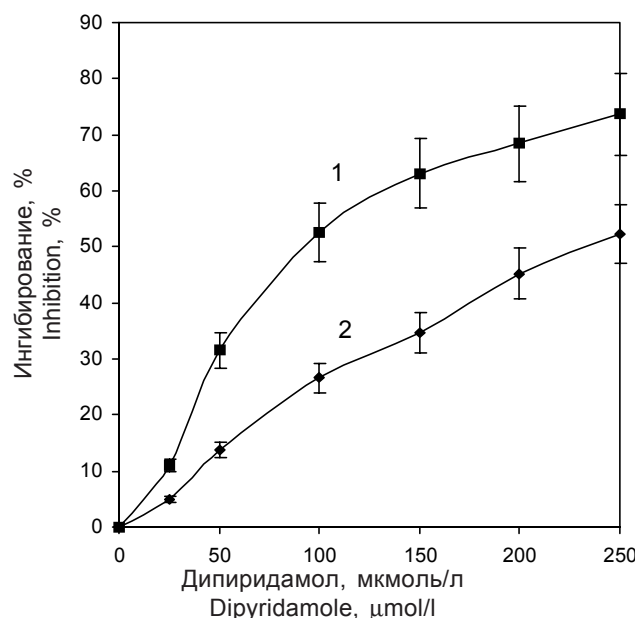


Рис.1. Степень ингибирования дипиридамолом транспорта ионов H^+ в эритроциты в средах, содержащих: 1– 0,12 моль/л Na_2SO_4 ; 2– 0,12 моль/л Na_2SO_4 + ПЭГ-1500 (15%).

Fig. 1. Dipyridamole inhibiting rate for H^+ ion transport into erythrocytes in media, containing 1– 0,12 mol/l Na_2SO_4 ; 2– 0,12 mol/l Na_2SO_4 + PEG-1500 (15%).

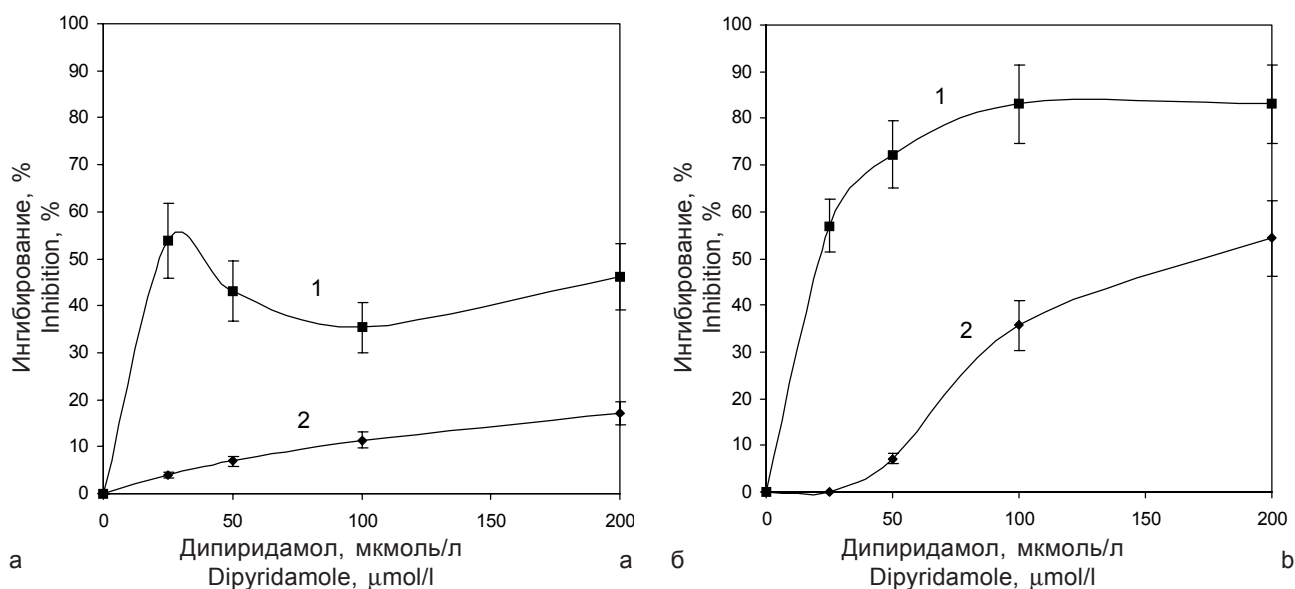


Рис. 2. Влияние ПЭГ-1500 на способность дипиридамола ингибировать транспорт ионов H⁺ в эритроциты: а – предварительно обработанные дипиридамолом; б – предварительно обработанные дипиридамолом, ингибитор дополнительно добавлялся в экспериментальную среду. 1 – 0,12 моль/л Na₂SO₄; 2 – 0,12 моль/л Na₂SO₄ + ПЭГ-1500 (15%).

Fig. 2. PEG-1500 effect to dipyridamole inhibiting activity for H⁺ ions transport into erythrocytes a – preliminarily treated with dipyridamole; b – preliminarily treated with dipyridamole, and additionally with presense of inhibitor in experimental medium. 1 – 0,12 mol/l of Na₂SO₄; 2 – 0,12 mol/l of Na₂SO₄ + PEG-1500 (15%).

венно входу ингибитора в анионный канал; во-вторых, может происходить перераспределение связанного ингибитора в раствор криопротектора. Для того чтобы уточнить такие предположения, для оценки связывания дипиридамола исследовали поляризацию его флуоресценции [3] в присутствии белых теней, полученных из контрольных эритроцитов, и эритроцитов, обработанных ДИДС, который в отличие от дипиридамола является необратимым ингибитором транспортной системы и ковалентно связывается в анионном канале, снижая сродство хлорида к транспортному сайту [4,5]. Исследование показало, что степень поляризации ингибитора выше в среде с NaCl, чем в среде с Na₂SO₄ (рис.3). При этом ингибитор анионного канала ДИДС и ПЭГ-1500 блокируют рост поляризации флуоресценции в 0,15 моль/л NaCl, но не в 0,12 моль/л Na₂SO₄. Это свидетельствует о том, что рост поляризации флуоресценции в хлориде натрия определяется связыванием дипиридамола в анионном канале, тогда как меньшая степень поляризации в сульфате натрия характеризуется, видимо, эффектом рассеивания мембран (солубилизация мембран додецилсульфатом натрия на 50% снижает поляризацию флуоресценции, данные не представлены). Таким образом, эксперименты по изучению влияния ДИДС и ПЭГ-1500 на поляризацию флуоресценции дипиридамола показывают, что в сульфатной среде в сравнении с хлоридной связывание дипиридамола в анионном канале мембран эритроцитов не

treatment, the inhibition of proton transport was increased, but the PEG-1500 effect on dipyridamole inhibition action was kept (Fig. 2b). In latter case the suppressing effect of PEG-1500 to dipyridamole inhibition was the least expressed. It is obvious, since the blocker was preliminarily bound with cell membrane and additionally present in incubation medium. Obtained results show that, firstly, PEG-1500 can prevent the dipyridamole contact with membrane, and, correspondingly, the inhibitor entrance to anion channel; secondly, there is a possibility of rearrangement of bound inhibitor into cryoprotectant solution. To check such supposition, we have evaluated the dipyridamole binding by studying its polarisation fluorescence [3] in presence of ghosts, derived from control erythrocytes and from the cells, treated with DIDS. In contrast to dipyridamole DIDS is an irreversible inhibitor of transport system and binds covalently in anion channel, decreasing the chloride affinity to a transport site [4, 5]. It is shown in our investigation that inhibitor polarisation rate is higher in NaCl containing medium, comparing to that with Na₂SO₄ (Fig. 3). In this case the anion channel inhibitor DIDS and PEG-1500 block the rise in fluorescence polarisation in 0.15 M NaCl, but not in 0.12 M Na₂SO₄. This testifies to the fact, that rise in fluorescence polarisation in sodium chloride is determined by dipyridamole binding in anion channel, whereas lesser polarisation rate in sodium sulfate is determined apparently by membrane scattering effect (membrane solubilisation by sodium dodecyl sulfate decreases the fluorescence polarisation for 50%, data

происходит. Тем не менее эксперименты по исследованию блокирования входа протонов в клетки указывают на обратное. С одной стороны, транспорт ионов H^+ в сульфатной среде, который сопровождается входом сульфата [11], блокируется дипиридамолом (см. рис. 1), с другой – замена во внеклеточной среде хлорида на сульфат снимает как связывание дипиридамола в анионном канале (рис. 3, 4), так и блокирование данным ингибитором транспорта сульфата [6]. Спектрофлуориметрические результаты можно объяснить с учетом данных [6], что дипиридамолом не связывается в анионном канале в сульфатной среде и что для его связывания необходимы анионы хлорида. Однако блокирование дипиридамолом входа ионов H^+ в сульфатной среде свидетельствует об обратном (см. рис. 1). Таким данным есть объяснение, если предположить, что вход ионов H^+ , тестируемый рН-электродом, выявляет некоторую долю общего транспорта, чувствительную к дипиридамолу в сульфатной среде, но не выявляемую в экспериментах с радиоактивным сульфатом [6]. В предполагаемом случае связывание дипиридамола в канале может катализироваться хлоридом, который выходит при работе цикла Якобса-Стеварта в эритроцитах, внесенных в сульфатную среду. Этот выброс хлорида сопровождается быстрым закислением суспензии клеток, а последующее защелачивание отражает обмен хлорида на внеклеточный сульфат и протон [11]. Взаимодействие дипиридамола с анионным каналом эритроцитов в сульфатной среде, опосредованное выходящим хлоридом, будет происходить по тому же механизму, что и в хлоридной среде [6] – нейтрализация хлоридным анионом положительного заряда в субстратном канале приводит к открыванию гидрофобного кармана и встраиванию в него блокатора. Учитывая такое предположение, клетки насыщали фторидом, который слабее, чем хлорид, инициирует связывание дипиридамола в анионном канале эритроцитов [6]. На рис. 5 представлены результаты по ингибированию дипиридамолом входа ионов H^+ в эритроциты, содержащие различные анионы. Как и предполагалось, замена внутриклеточного хлорида на фторид приводит к снижению ингибиторной способности дипиридамола, что согласуется с данными [6]. Дипиридамолом в отличие от ДИДС классифицируют как ингибитор анионного канала, который блокирует каналы доступа анионов к транспортному сайту [5]. Как было отмечено выше, его связывание опосредуется взаимодействием с гидрофобным участком канала [6]. Исследование локализации молекул дипиридамола в мицеллах детергента показало, что поляризованная часть молекулы находится в полярной зоне, а неполярные

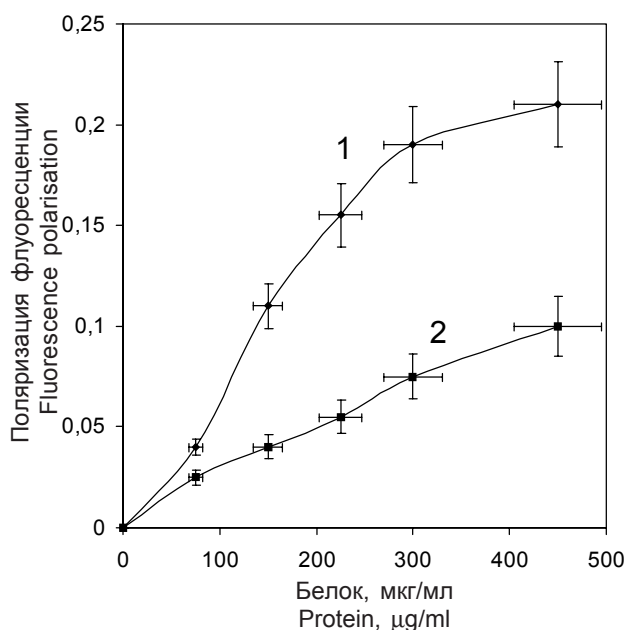


Рис. 3. Рост уровня поляризации флуоресценции дипиридамола при титровании белыми теньями эритроцитов в средах, содержащих: 1 – 0,15 моль/л NaCl, 10 ммоль/л трис (pH 7,4); 2 – 0,12 моль/л Na₂SO₄, 10 ммоль/л трис (pH 7,4).

Fig. 3. Rise in the dipyridamole fluorescence polarisation rate when titrating the erythrocyte ghost in media, containing 0.15 mol/l NaCl, 10 mmol/l tris (pH 7.4) (1); 0.12 mol/l Na₂SO₄, 10 mmol/l tris (pH 7.4).

are not presented). Thus, the experiments on investigation of DIDS and PEG-1500 effect on dipyridamole's fluorescence polarisation show that no binding of dipyridamole in erythrocytes membrane anion channel occurs in sulfate medium comparing with the chloride one. Nevertheless, the experiments on the studying of blocking the proton influx into cells point to the contrary one. On one hand, the H^+ ions transport in sulfate medium, accompanying the sulfate influx [11], is blocked by dipyridamole (see Fig. 1). On other hand the change of chloride for sulfate in extracellular medium eliminate both the dipyridamole binding in anion channel (Fig. 3, 4) and the blocking of sulfate transport by this inhibitor [6]. Spectro-fluorometrical data (Fig. 3, 4) could be interpreted taking into account the fact, that dipyridamole does not bind in anion channel in sulfate medium, and this phenomenon is possible in presence of chloride anions [6].

When supposing the dipyridamole binding in the channel could be chloride catalysed, resulted from the Jacobs-Stewart cycle functioning in the erythrocytes, placed into sulphate medium. This outcome of chloride is accompanied by a fast acidification of cell suspension, and the following alkalisation reflects the chloride exchange for extracellular sulfate and proton [11]. Dipyridamole and erythrocytes anion channel interaction in sulfate medium, mediated by chloride outcome, will proceed by the same mechanism, as for

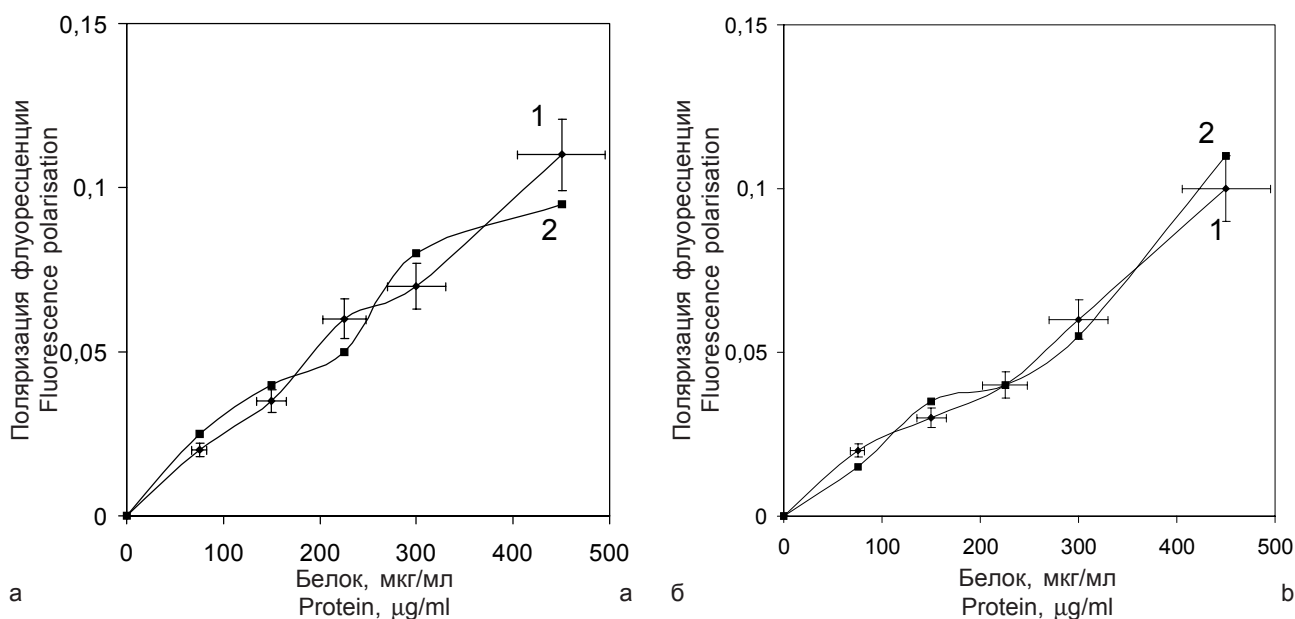


Рис. 4. Влияние ДИДС и ПЭГ-1500 на рост уровня поляризации флуоресценции дипиридамола при титровании белыми теньями эритроцитов; эритроциты обработаны ДИДС перед выделением белых теней: **а** – 1 – 0.15 моль/л NaCl, 10 ммоль/л трис (pH 7.4); 2 – 0,12 моль/л Na₂SO₄, 10 ммоль/л трис (pH 7.4); **б** – 1 – 0.15 моль/л NaCl, 10 ммоль/л трис (pH 7.4) + ПЭГ-1500 (15%), 2 – 0,12 моль/л Na₂SO₄, 10 ммоль/л трис (pH 7.4) + ПЭГ-1500 (15%).

Fig. 4. Rise in the dipyrindamole fluorescence polarisation rate when titrating the erythrocyte ghost; erythrocytes were preliminarily treated with DIDS before ghosts obtaining in the media, containing **a** – 1 – 0.15 mol/l NaCl, 10 mmol/l tris (pH 7.4); 2 – 0.12 mol/l Na₂SO₄, 10 mmol/l tris (pH 7.4); **b** – 1 – 0.15 mol/l NaCl, 10 mmol/l tris (pH 7.4) + PEG-1500 (15%), 2 – 0.12 mol/l Na₂SO₄, 10 mmol/l tris (pH 7.4) + PEG-1500 (15%).

заместители пронизывают гидрофобное ядро мицеллы. Даже в системе с положительно заряженными мицеллами при низком pH, когда отталкивание между протонированными молекулами дипиридамола и положительно заряженными

the chloride medium [6], i.e. neutralisation of a positive charge by chloride anion in substrate channel leads to the opening of hydrophobic “pocket” and incorporation of blocking agent into it. Taking this fact into account, the cells were loaded with fluoride, which initiates the dipyrindamole binding in erythrocyte anion channel in lesser extent comparing to chloride. Fig. 5 shows the results on inhibitor action of dipyrindamole on H⁺ ions influx into erythrocytes, containing various anions. As supposed, the change of intracellular chloride for fluoride leads to decrease in inhibitor action of dipyrindamole, that is in concordance with the data of paper [6]. In contrast to DIDS dipyrindamole is classified as an anion channel inhibitor, which blocks the channels of anion access to transport site [5]. As it was stated above, its binding is mediated by interaction with channel hydrophobic site [6]. Investigation of dipyrindamole molecule localisation in detergent micelles showed that molecule’s polarised part was in polar zone, and non-polar substitutes transpierce the micelle hydrophobic nucleus. Even in the system with positively charged micelles at low pH, where the repulsion between protonated dipyrindamole molecules and positively charged micelles surfaces decreases the dissociation constant in 100 times, it localises inside the micelles [2]. This points to a highly expressed hydrophobic properties of dipyrindamole molecule. PEGs are known to be in concurrence with phospholipid polar heads in membranes for water binding, as well as to have a structuring effect to water layer around

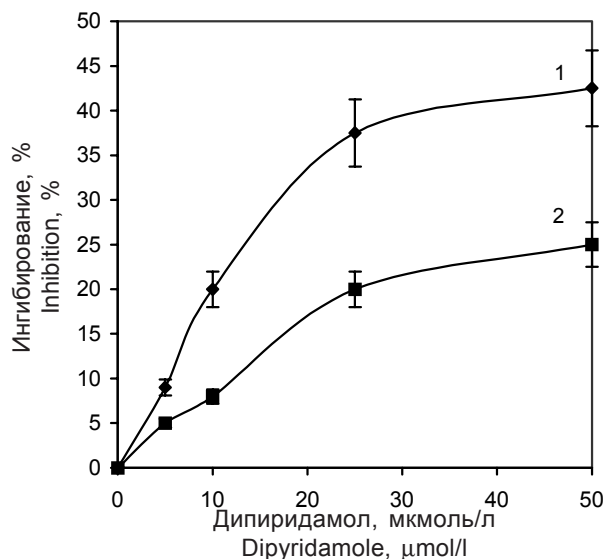


Рис.5. Ингибирование дипиридамолом транспорта ионов H⁺ при замене внутриклеточного хлорида на фторид: 1 – нормальные хлоридсодержащие эритроциты; 2 – эритроциты, нагруженные фторидом.

Fig. 5. Dipyrindamole inhibition of H⁺ ion transport at the exchange of intracellular chloride for fluoride: 1 – normal chloride containing erythrocytes; 2 – fluoride loaded erythrocytes.

поверхностями мицелл снижает константу диссоциации в 100 раз, все равно он локализуется внутри мицелл [2]. Это указывает на высокую гидрофобность молекулы дипиридамола. Известно, что ПЭГ конкурируют с полярными головками фосфолипидов в мембранах за связывание воды, оказывают структурирующее действие на слой воды, прилегающий к полимеру [7]. Изменение сольватационных свойств воды приводит к изменению диэлектрических констант растворов ПЭГ и мембранной поверхности [10]. Все это может способствовать вытеснению гидрофобных зондов из поверхностей белка и мембраны [1], а изменение диэлектрических свойств среды инкубации – перераспределению дипиридамола между мембраной и раствором и препятствовать поступлению его в мембрану.

Выводы

Полученные результаты позволяют предположить, что транспорт ионов H^+ в эритроциты, внесенные в сульфатную среду, отражает только часть объема обмена внутриклеточного хлорида на внеклеточный сульфат. Ингибирование этой доли обмена дипиридамолом определяется присутствием анионов хлорида во внутриклеточной среде. ПЭГ-1500 подавляет связывание дипиридамола в анионном канале мембран и снижает блокирующую способность данного ингибитора на транспорт ионов H^+ в эритроциты. Это действие полимера связано с перераспределением дипиридамола между мембраной и раствором.

Литература

1. *Моисеев В.А., Зинченко В.Д., Нардид О.А.* О некоторых молекулярных механизмах криозащиты биологических объектов // Физико-химические процессы в криобиологических системах.– Харьков, 1991.– С.78-92.
2. *Borissevitch I.E., Borges C.P.F., Yushmanov V.E., Tabak M.* Localization of dipyrindamole molecules in ionic micelles: effect of micelle and drug charges // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1995.– Vol.1238.– P. 57-62.
3. *Davio S.R., Low F.S.* Characterization of the calorimetric C transition of the human erythrocyte membrane // *Biochemistry.*– 1982.– Vol.21.– P. 3585-3593.
4. *Falke J.J., Chan S.I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors.1.Transport site inhibitors // *Biochemistry.*– 1986.– Vol.25.– P. 7888-7894.
5. *Falke J.J., Chan S.I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 2. Channel blockers // *Biochemistry.*– 1986.– Vol.25.– P. 7895-7898.
6. *Legrum B., Passow H.* Inhibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride-dependent association of dipyrindamole with a stilbene disulfonate binding site on the band 3 protein // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1989.– Vol.979, N2.– P. 193-207.
7. *Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K.* Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes // *Biophys. J.*– 1995.– Vol.68.–P. 525-535.

polymers [7]. Changes in solvating properties of water affect the dielectric constants of PEG solutions and membrane surface [10]. All this can lead to the exclusion of hydrophobic probes from proteins microenvironment and membrane [1]. In addition, the changes in dielectric properties of incubation medium will result in dipyrindamole's rearrangement between membrane and solution, as well as in prevention of its entering to membrane.

Conclusions

The obtained results allow to assume that H^+ ions transport into erythrocytes, placed into sulphate medium, reflects only the part of intracellular chloride and extracellular sulphate exchange. Inhibition of this exchange share by dipyrindamole is determined by presence of chloride anions in intracellular medium. PEG-1500 suppresses the dipyrindamole binding in membrane anion channel and decreases the blocking ability of this inhibitor to H^+ ions transport into erythrocytes. This polymer action is associated with the rearrangement of dipyrindamole between membrane and solution.

References

1. *Moyiseev V.A., Zinchenko V.D., Nardid O.A.* Some molecular mechanisms in cryoprotection of biological objects // *Physicochemical processes in cryobiological systems.*– Kharkov, 1991.– P. 78-92.
2. *Borissevitch I.E., Borges C.P.F., Yushmanov V.E., Tabak M.* Localization of dipyrindamole molecules in ionic micelles: effect of micelle and drug charges // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1995.– Vol.1238.– P. 57-62.
3. *Davio S.R., Low F.S.* Characterization of the calorimetric C transition of the human erythrocyte membrane // *Biochemistry.*– 1982.– Vol.21.– P. 3585-3593.
4. *Falke J.J., Chan S.I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors.1.Transport site inhibitors // *Biochemistry.*– 1986.– Vol.25.– P. 7888-7894.
5. *Falke J.J., Chan S.I.* Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 2. Channel blockers // *Biochemistry.*– 1986.– Vol.25.– P. 7895-7898.
6. *Legrum B., Passow H.* Inhibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride-dependent association of dipyrindamole with a stilbene disulfonate binding site on the band 3 protein // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1989.– Vol.979, N2.– P. 193-207.
7. *Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K.* Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes // *Biophys. J.*– 1995.– Vol.68.–P. 525-535.
8. *Moribe K., Maruyama K., Iwatsuru M.* Estimation of surface state of poly(ethylene glycol)-coated liposomes using an aqueous two-phase partitioning technique // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).*– 1997.– Vol.45.– P. 1683-1687.
9. *Neu B., Armstrong J.K., Fisher T.C., Meiselman H.J.* Surface characterization of poly(ethylene glycol) coated human red blood cells by particle electrophoresis // *Biorheology.*– 2003.– Vol.40.– P. 477-487.
10. *Ohki S., Arnold K.* Surface dielectric constant, surface hydrophobicity and membrane fusion // *J. Membr. Biol.*– 1990.– Vol.114.– P. 195-203.

8. Moribe K., Maruyama K., Iwatsuru M. Estimation of surface state of poly(ethylene glycol)-coated liposomes using an aqueous two-phase partitioning technique // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).– 1997.– Vol.45.– P. 1683-1687.
9. Neu B., Armstrong J.K., Fisher T.C., Meiselman H.J. Surface characterization of poly(ethylene glycol) coated human red blood cells by particle electrophoresis // Biorheology.– 2003.– Vol.40.– P. 477-487.
10. Ohki S., Arnold K. Surface dielectric constant, surface hydrophobicity and membrane fusion // J. Membr. Biol.– 1990.– Vol.114.– P. 195-203.
11. Romano L., Passow H. Characterization of anion transport system in trout red blood cell // Am. J. Physiol.– 1984.– Vol.246.– P. 330-338.

Accepted in 04.11.2003

Поступила 04.11.2003