

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/246450016>

Microcalorimetric study of erythrocyte membrane suspension from normal subjects and patients with essential hypertension

ARTICLE *in* BULLETIN OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE · MARCH 1983

Impact Factor: 0.36 · DOI: 10.1007/BF00834806

CITATIONS

4

READS

8

7 AUTHORS, INCLUDING:



Valery L Shnyrov

Universidad de Salamanca

180 PUBLICATIONS 1,731 CITATIONS

SEE PROFILE

mem isolated from the rat brain cortex by the method of Hajos retain their transmembrane potential (TMP) close to the K^+ -diffusional one. In the Krebs-Ringer medium containing 5 mM KCl the TMP of the synaptosomes was equal to 70–80 mV. The cyostatics cytochalazine B and colchicine and the peptides leu- and met-enkephalins and tuitin in concentrations up to 10^{-3} and 10^{-4} M did not affect the TMP of the synaptosomes. Cytochalazine B in a concentration of $4 \cdot 10^{-4}$ M and over caused synaptosomal aggregation. The neuroleptics aminazine, trifluoroperazine, haloperidol, the antidepressant imipramine in concentrations about 10^{-4} M as well as the tranquilizers diazepam and piazepam in concentrations about 10^{-3} M completely depolarized synaptosomal membranes.

УДК 616.12-008.331.1

Ключевые слова: гипертоническая болезнь, эритроциты; мембрана; калориметрия.

С. Н. Орлов, В. Л. Шныров, Г. Г. Жадан,
И. С. Литвинов, П. В. Гулак, Н. И. Покудин,
А. З. Постнов

МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СУСПЕНЗИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В НОРМЕ И ПРИ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ

Четвертое Главное управление при Минздраве СССР, Москва и Институт биологической физики АН СССР, Пущино
Представлена акад. АМН СССР Д. С. Саркисовым

В последние годы установлено, что как при гипертонической болезни человека [7], так и при экспериментальной модели этого заболевания — спонтанной генетической гипертензии у крыс [1, 6] в основе нарушения функций мембраны эритроцитов (ее проницаемости для одновалентных катионов, связывания и АТФ-зависимого транспорта кальция) лежит существенное нарушение ее структуры. Одно из направлений дальнейших исследований по этой проблеме — выявление компонентов мембраны, отвечающих опсанному мембранному дефекту.

В связи с этим мы предприняли исследование мембраны эритроцитов больных гипертонической болезнью с помощью дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. В работе использовали кровь больных с клинически установленным диагнозом гипертонической болезни III-II степени по классификации ВОЗ (6 мужчин и 5 женщин, возраст 50–56 лет, артериальное давление 160–190/100–120 мм рт. ст.) и кровь нормотензивных пациентов (6 мужчин и 7 женщин, возраст 30–50 лет, артериальное давление 110–130/70–90 мм рт. ст.).

Метод получения теней эритроцитов описан нами ранее [2]. Концентрацию общего белка определяли по методу Лоури [3]. В качестве растворителя везде использовали 5 mM Na-фосфатный буфер pH 7,4. Концентрация белка в суспензии

тений эритроцитов была в пределах 3–5 мг/мл. Микрокалориметрические исследования проводили на высокочувствительном дифференциальном сканирующем приборе ДАСМ-1М (СКБ БЦ АН СССР), конструкция и принцип работы которого подробно описаны ранее [8]. Рабочий объем измерительной ячейки 1 мл. Скорость прогрева $1^\circ\text{C}/\text{мин}$. Чувствительность калориметра по теплоемкости при этой скорости прогрева $5 \cdot 10^{-3}$ Дж/°C. Для получения базовой линии обе калориметрические ячейки заполняли раствором. Высокая воспроизводимость базовой линии позволяла регистрировать удельную теплоемкость мембран с погрешностью не более 5%. Точность регистрации температуры $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

На рис. 1 приведена микрокалориметрическая запись изменения избыточной теплоемкости прогреваемой суспензии мембран эритроцитов человека (норма) в концентрации 4,55 мг белка в 1 мл. Контур теплопоглощения суспензии теней эритроцитов имеет сложный (многостадийный) вид. Рядом исследователей проведено подробное изучение 5 наиболее явно выраженных термодуцированных переходов: мембранах эритроцитов [3, 4, 9, 10]. В соответствии с предложенной в этих работах терминологией и обозначены элементарные составляющие контуры, которые мы выделили в чистом виде, учитывая факт тепловой необратимости каждого перехода.

Процедура получения элементарных контуров заключается в следующем. Сначала суспензию прогреваем до температуры 45°C , находящейся вблизи температурного максимума первого предполагаемого элементарного перехода (А-переход). Затем суспензию охлаждаем до 10°C (температура начала прогрева), после чего прогреваем мембраны с той же скоростью до 51°C — до температуры, близкой к максимуму второго перехода (В₁-переход). Затем вновь охлаждаем суспензию до начальной температуры прогрева и потом прогреваем до 56°C и т. д. Используя вы-

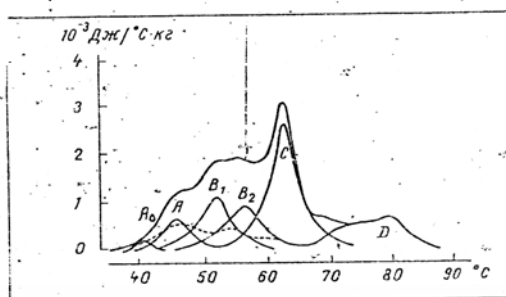


Рис. 1. Зависимость от температуры теплоемкости суспензии мембран эритроцитов. Буквами обозначены элементарные составляющие сложного контура необратимых переходов (сплошная линия). Пунктирная линия — базовые превращения.

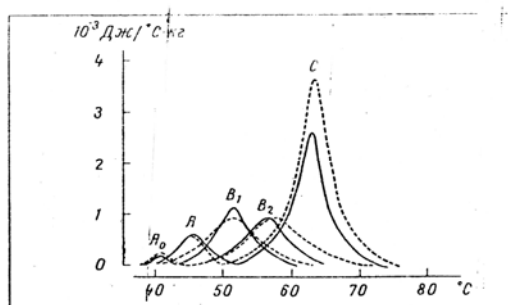


Рис. 2. Элементарные необратимые составляющие контура теплопоглощения суспензии мембран эритроцитов (норме (сплошная линия) и при гипертоической болезни (пунктирная линия).

числительную технику, проводим последовательное вычитание контуров: из первой кривой теплопоглощения, записанной до температуры максимума первого перехода, вычитаем контур, полученный в результате второго сканирования, из этого, второго, контура вычитаем контур, полученный при третьем прогреве и т. д., после чего, предположив симметрию элементарных контуров, строим их полный профиль.

Как видно на рис. 1, предложенный метод позволяет выделить в температурном интервале от 35 до 70°C по крайней мере 4 элементарных необратимых термоперехода, связанных с теплопоглощением белковых компонентов мембраны (А-, В₁-, В₂- и С-переходы). Ввиду недостаточности сведений о природе температурных переходов в области более высоких температур (D-переход) остальные элементарные переходы мы не выявляли, хотя очевидно, что D-переход состоит по меньшей мере из 3 элементарных переходов. На рис. 1 показано, кроме того, полностью обратимое изменение теплопоглощения (пунктирная линия), связанное, по всей видимости, с фазовыми переходами в липидах мембраны эритроцитов, и необратимый переход вблизи 41°C, названный А₀-переходом.

При сопоставлении температурной зависимости теплоемкости мембраны эритроцитов нормотензивных пациентов и больных гипертоической болезнью были выявлены следующие особенности (рис. 2).

В мембранах эритроцитов больных гипертоической болезнью максимумы В₂- и С-переходов сдвинуты в область более высоких температур, а В₁-переход существенно уширен. Эти результаты свидетельствуют о нарушении упаковки белковых молекул в мембране при патологии вследствие нарушения белок-липидных взаимодействий, что согласуется с данными, полученными ранее при исследовании (зондировании) области анулярных липидов с помощью шпена [7].

Для С-перехода в мембранах эритроцитов больных гипертоической болезнью наблюдается почти 30% увеличение энтальпии термопревращения, что, по-видимому, указывает на обогащенность этих мембран белком, соответствующим С-переходу. В связи с этим следует отметить, что, по данным ряда авторов [9, 10], С-переход определяется термопревращением трансмембранного белка полосы 3, т. е. белка, ответственного за анионный транспорт через мембрану. Дальнейшие исследования должны конкретизировать молекулярную природу этой полосы, а также компонентов, ответственных за В₁- и В₂-переходы, для которых выявлены менее существенные изменения энтальпии термопревращения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Орлов С. Н., Гулак П. В., Карагодина З. В. и др. — Кардиология, 1981, № 11, с. 108—112.
2. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Гулак П. В. — Докл. АН СССР, 1982, т. 262, с. 482—485.
3. Brandts J. F., Erickson L., Lysko K. et al. — Biochemistry (Wash.), 1977, v. 16, p. 3450—3452.
4. Brandts J. F., Taverna R. D., Sadasivan E. et al. — Biochim. biophys. Acta, 1978, v. 512, p. 566—579.
5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
6. Montenay-Garestier T., Aragon I., Dezanck M. A. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1981, v. 100, p. 660—665.
7. Орлов С. Н., Постнов Ю. В. — Clin. Sci., 1982, v. 63, p. 281—284.
8. Privalov P. L., Plotnikov V. V., Filimonov V. V. — J. Chem. Thermodyn., 1975, v. 7, p. 41—50.
9. Snow J. W., Brandts J. F., Low P. S. — Biochim. biophys. Acta, 1978, v. 512, p. 579—591.
10. Snow J. W., Vincentelli J., Brandts J. F. — Ibid., 1981, v. 642, p. 418—428.

Поступила 17.12.82

MICROCALORIMETRIC STUDY OF RED CELL MEMBRANE SUSPENSION IN HEALTH AND ESSENTIAL HYPERTENSION

S. N. Orlov, V. I. Shnyrov, G. G. Zhadan, I. S. Litvinov, P. V. Gulak, N. I. Pokudin, Yu. V. Postnov

The Fourth Main Administration, Ministry of Health of the USSR, Moscow, Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino

Microcalorimetric method was used to study the temperature dependence of thermal absorption of human red cell membrane suspension in health and essential hypertension. In disease, the temperature dependence of individual irreversible thermoinduced transitions characteristic for human red cell membranes was appreciably changed, which was comparable with disorders of protein-lipid interactions discovered before by fluorescent examination, while elevated enthalpy of one of the transitions pointed to the possibility of enriching these membranes with band 3 protein. Unlike normal, red cell membranes in essential hypertension exhibited a special thermoinduced irreversible transition with the thermoabsorption maximum about 41°C.