ОЦЕНКА ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА В МЕМБРАНАХ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛОГА

Белевич Е.И., Костин Д.Г., Слобожанина Е.И.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, Catherina_Bel_@tut.by

Перераспределение фосфатидилсерина (ФС) из внутреннего во внешний липидный слой мембран эритроцитов является одним из основных признаков эриптоза [1]. Этот процесс, который впервые так определен Лангом в 2005 году [1], характеризует апоптоз, протекающий в безъядерных клетках крови – эритроцитах. Одним из механизмов, запускающих эриптоз, является увеличение концентрации внутриклеточного кальция. Известно, что повышение концентрации внутриклеточного кальция при эриптозе активирует эндопептидазу калпаин, скрамблазу, кальций-чувствительные калиевые-каналы, что приводит к сморщиванию клетки, везикуляции и экспонированию ФС на ее поверхности [1].

Цель данной работы – на модели процесса эриптоза, созданной путем повышения концентрации внутриклеточного кальция в эритроцитах, разработать способ оценки содержания фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны эритроцитов.

Эксперименты выполнены на эритроцитах доноров. Для увеличения концентрации внутриклеточного кальция в интактных эритроцитах нами использован кальциевый ионофор A23187-Br, который, по ряду исследований, сам может приводить к высвобождению кальция из внутриклеточных органелл [2]. В работе использован флуоресцентный аналог ФС – 1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-*sn*-glycero-3-phosphoserine (16:0/C_6-NBD-PS, «Avanti polar lipids», США). Встраивание флуоресцентного зонда в мембраны эритроцитов проводили при 37ºС. 16:0/C_6-NBD-PS встраивали в эритроциты в среде, содержащей 0,5 мМ $CaCl_2$ и/или 1мкМ ионофора A23187-Br. Для определения содержания 16:0/C_6-NBD-PS во внутреннем липидном слое мембраны эритроцитов использовали процедуру «обратного обмена с БСА» [3]. Флуоресцентные измерения выполняли на спектрофлуориметре FP-6300 (Jasco, Япония).

На рисунке 1А представлены данные содержания 16:0/C_6-NBD-PS во внутреннем липидном слое эритроцитов, подвергшихся воздействию кальция и/или кальциевого ионофора через 20 мин инкубации с зондом.

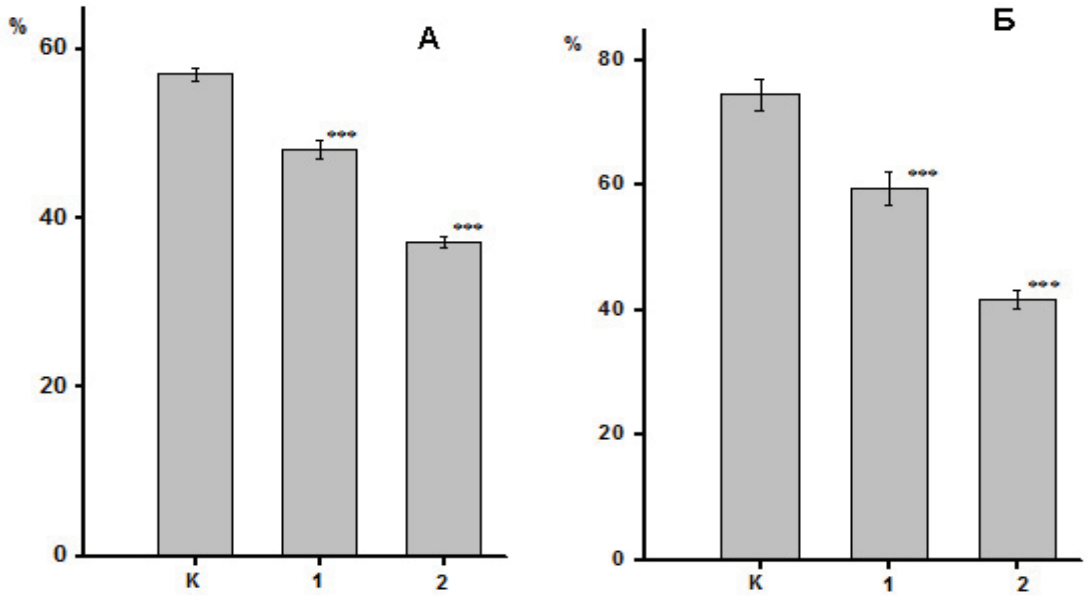

Рисунок 1 – Содержание 16:0/C_6-NBD-PS (в %, от общего количества встроенного зонда) во внутреннем липидном слое мембран контрольных эритроцитов (К) и эритроцитов, проинкубированных с ионофором A23187-Br (1), с ионофором A23187-Br и ионами кальция (2) через 20 мин (А) и 60 мин (Б) инкубации с зондом

Как видно из рисунка, процент 16:0/C_6-NBD-PS во внутреннем липидном слое мембраны через 20 мин инкубации для контрольных эритроцитов составлял 57,1±0,8%, для эритроцитов, обработанных кальциевым ионофором A23187-Br – 48,2±1,0% и для клеток, подвергшихся воздействию ионов кальция и кальциевого ионофора A23187-Br – 37,2±0,8%.

Подобная тенденция в распределении 16:0/C_6-NBD-PS в мембранах эритроцитов под воздействием ионофора A23187-Br и/или ионов кальция сохранилась и через 60 мин инкубации с зондом. Однако, в этом случае содержание 16:0/C_6-NBD-PS во внутреннем слое увеличивалось как в контрольных эритроцитах, так и в обработанных ионами кальция и/или ионофором A23187-Br. Так, содержание 16:0/C_6-NBD-PS во внутреннем липидом слое мембран эритроцитов спустя 60 мин инкубации с зондом составляло 74,4±2,5% для контрольных эритроцитов, 59,4±2,7% для клеток, обработанных кальциевым ионофором A23187-Br и 41,7±1,5% для клеток подвергшихся воздействию ионов кальция и кальциевого ионофора A23187-Br (рис. 1Б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в эритроцитах, подвергшихся воздействию ионов кальция в присутствии

ионофора A23187-Br, происходит перераспределение 16:0/C_6-NBD-PS из внутреннего липидного слоя во внешний по сравнению с контрольными клетками. Распределение 16:0/C_6-NBD-PS между внешним и внутренним липидными слоями в мембранах контрольных эритроцитов и клеток, обработанных ионами кальция и/или A23187-Br, зависит от времени инкубации с зондом. Нами обнаружено, что после обработки эритроцитов только кальциевым ионофором также происходит перераспределение 16:0/C_6-NBD-PS из внутреннего липидного слоя во внешний. Перераспределение 16:0/C_6-NBD-PS из внутреннего липидного слоя во внешний по действием ионофора A23187-Br можно объяснить рядом причин. С одной стороны, формирование пор в мембране эритроцитов с помощью A23187-Br меняет плотность упаковки липидов, что приводит к дополнительному свободному перемещению 16:0/C_6-NBD-PS между внешним и внутренним липидными монослоями. С другой стороны, при встраивании A23187-Br в мембраны эритроцитов происходит высвобождение ионов кальция, связанных с полярными головками фосфолипидов и белками [4], что вызывает перераспределение части ФС во внешний липидный слой.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что перераспределение ФС из внутреннего во внешний липидный слой мембран эритроцитов можно оценивать с помощью флуоресцентного аналога 16:0/C_6-NBD-PS – 1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-*sn*-glycero-3-phosphoserine. Способ можно применять в научном процессе для выявления путей запуска эриптоза при воздействии физико-химических факторов в норме и при патологии.

Литература

1. Lang, F., Qadri S.M. Mechanisms and signification of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes // Blood purif. – 2012. - Vol. 33, № 1-3. - P. 125–130.
2. Suzuki J., Umeda M., Sims P.J., Nagata S. Calcium – dependent phospholipid scambling by TMEM16F // Nature – 2010. – Vol. 468, № 9. – P. 834-837.
3. Puri V., Gupta C.M. Out-to-in translocation of butanetriol-containing phospholipid analogs in human erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. - Vol. 1373, № 1. – P. 59-66.
4. Kucherenko, Y.V., Weiss E., Bernhardt I. Effect of the ionic strength and prostaglandin E2 on the free Ca2+ concentration and the Ca2+ influx in human red blood cells // Bioelectrochemistry. – 2004. – Vol. 62, № 2. – P. 127-133.