

ПОВЪРХНОСТЕН ЕЛЕКТРИЧЕН ЗАРЯД НА ЕРИТРОЦИТИ В НОРМА И ПАТОЛОГИЯ. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЛЕКТИНИ И НЕВРОТОКСИЧНА ФОСФОЛИПАЗА A₂

В. Долчинкова¹, Н. Христова - Авакумова², Бл. Рукова³, Св. Петрова⁴

Key words: erythrocyte membranes; electrophoretic mobility; surface charge density; lectins; phospholipase A₂

Увод

Повърхностният електричен заряд е физиологична характеристика, която има постоянна стойност за различните видове клетки и отделните етапи от развитието им. Нейната стойност се определя от заряда на функционалните групи на повърхността на мембраната. Той е важен фактор определящ транспорта на йони и макромолекули, проникваемостта на стените на кръвоносните съдове и взаимодействията при процесите на между-молекулно разпознаване. Плътността на повърхностния електричен заряд на мембраните и на субклетъчните органи е определяща при взаимодействието им с извънклетъчната среда и процесите на адхезия и агрегация. Електрокинетичният потенциал и плътността на повърхностния електричен заряд са директно свързани с електрофоретичната подвижност на клетките (1). Изследването и анализът на електрокинетичните харак-

¹Катедра Биофизика и Радиобиология, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

²Катедра медицинска физика и биофизика, Медицински факултет - София, Медицински Университет

³Катедра по медицинска генетика, Медицински факултет - София, Медицински Университет

⁴Лаборатория по ензимология, Катедра Биохимия, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

Surface charge density of erythrocytes in norm and pathology: Interaction of lectins and neurotoxin phospholipase A₂

V. Doltchinkova,
N. Hristova - Avakumova,
Bl. Rukova, Sv. Petrova

The erythrocytes bear a stable electric charge determined by their surface structure and by the chemical composition of their environment. Surface charge density may alter essentially under pathological conditions as well as under the effect of various chemical agents, provoking physico-chemical alterations in the cells and on their surface. This paper presents data about the influence of some lectins (concanavalin A, Con A, phytohemagglutinin M, PHA M) and phospholipase A₂ on the electrophoretic mobility, zeta potential as well as surface charge density of the human erythrocytes in norm and pathology.

There are changes in the electrokinetic properties of erythrocytes from patients with iron deficiency as well as β -thalassemia which are accompanied by a decrease or enhancement of their electrophoretic mobility, respectively. Under 20 μ g/ml Con A treatment on erythrocytes in norm more negatively charged surface exposed groups was observed as well as more intensive fluorescence upon FITC Con A binding is occurred. Beta thalassemia erythrocytes possess the lower fluorescence after FITC Con A binding than control ones. Zeta potential of β -thalassemia erythrocytes significantly increased upon

200 pg/ml PHA M dose of treatment. The enhancement of net negative surface charge density of the membranes after lectin treatment is observed. The electrokinetic potential of erythrocyte membranes is increased under PLA_2 treatment due to an enhancement of negative surface charge density which preserve of aggregation of erythrocytes; the intermembrane repulsion exceeds electrostatic attraction.

теристики на мембраните и на възможността за влиянието върху тях са важни при оптимизиране на условията на взаимодействие на мембраните с други молекули и на агрегацията при някои клетки.

Мембраната на еритроцитите е отрицателно заредена. Това се определя от сиаловата киселина, карбоксилните групи на протеините и фосфатните групи на фосфолипидите (6). Изследвания на рН зависимостта на подвижността показват, че еритроцитите имат ниска изоелектрична точка от 1.7 до 2.3 (4). Еритроцитите имат поведението на гликопротеинова повърхност.

Цялото количество въглехидрати е разположено по външната повърхност на еритроцитната мембрана, като те са организирани във високомолекулни гликанови структури. Някои от тези гликани са свързвани с липиди и образуват гликолипидната фракция, която е 5-10% от общата маса на липидите в мембраната или $0.25 - 0.5 \times 10^{-13}$. По-голямата част от гликаните са свързани с протеини - гликофорин А, В и С, белтък на ивица 3.

Изследвано е влиянието на лектини или $sPLA_2$ върху електрокинетичните свойства на еритроцитни мембрани. Човешките еритроцити при норма и патология са третирани с лектини, имащи способността да се свързват специфично към мембранната повърхност. Взаимодействието на еритроцитната мембрана с невротоксичната фосфолипаза A_2 дава възможност да се изясни структурното ниво на субстратната ѝ специфичност.

Лектините се използват като биологична сонда за мембранна стабилност, както и за анализиране на повърхностните компоненти на биологичните мембрани. Те притежават специфични рецепторни сайтове за въглехидратите и могат да взаимодействат с гликопротеините както в разтвор, така и когато те са на повърхността на мембраната (7). Свързването на лектините може да даде информация за измененията в гликопротеиновите комплекси в мембраната.

Змийската отрова е смес от протеини, притежаващи невротоксични, кардиотоксични, хемолитични и агрегационни свойства. *Vipera ammodytes meridionalis* е балкански ендемит. Основният компонент, на който се дължи токсичността на отровата е невротоксинът випоксин (3). Той е хетеродимерен йонен комплекс съставен от две субединици - основен и силно токсичен His 48 $sPLA_2$ ензим и киселинен, ензимно неактивен и нетоксичен инхибитор. $sPLA_2$ ензимите катализират специфичната хидролиза на 2 - ацилестерната връзка на 1,2 диацил 3 - sn-фосфолипидите. Реакцията изисква наличието на калциеви йони, като се образуват мастни киселини и лизофосфолипиди (8). Опитно е установено, че PLA_2 субкомпонентата на невротоксина притежава хемолитични и антикоагулационни свойства (2).

Материал и методи

При изследването на електрофоретичната подвижност са използвани еритроцити от донорна кръв от здрави хора и пациенти на Секция „Таласемия”, взета от Националния Център по Хематология и Трансфузиология в гр. София. Хематокритът на кръвта е 0.20. Провеждането на опита се извършва до четири часа след трикратното промиването на еритроцитите във фосфатен буфер след центрофугиране в микроцентрофуга MiniSpin (Eppendorf, Hamburg) при 12000 rpm за 15 sec.

При промиването на еритроцитите и измерването на електрофоретичната им

подвижност се използва PBS буфер, рН 7.4 (10.1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 136.9 mM NaCl).

Електрофоретичната подвижност на еритроцитите след въздействие с фосфолипаза А₂ е определяна в Н buffer (130 mM NaCl, 3.7 mM KCl, 0.25 mM CaCl₂, 1mM EGTA, 25 mM Hepes, рН 7.5)

Concanavalin A (Con A, Sigma) е лектин, изолиран от *Canavalia eusiformis*. Той има ММ 104 kDa и е съставен от четири идентични субединици. Con A се свързва с α-D-глюкозни и α-D-манозни остатъци.

Phytohemagglutinin M (PHA M, Sigma) е лектин, изолиран от *Phaseolus vulgaris*. Той има ММ 126 kDa. Лектинът се свързва с олигозахаридните остатъци, съдържащи N-ацетил D-галактозамин, като за това е необходимо наличието на Mg²⁺ и Ca²⁺ йони. Молекулата е тетрамер и притежава четири въглехидратсвързващи домена.

PLA₂ бе пречистена от невротоксина випоксин, изолиран от змийската отрова на *Vipera ammodytes meridionalis*, чрез йонообменна хроматография. Използвана е колона Mono S (HR5/5) за FPLC.

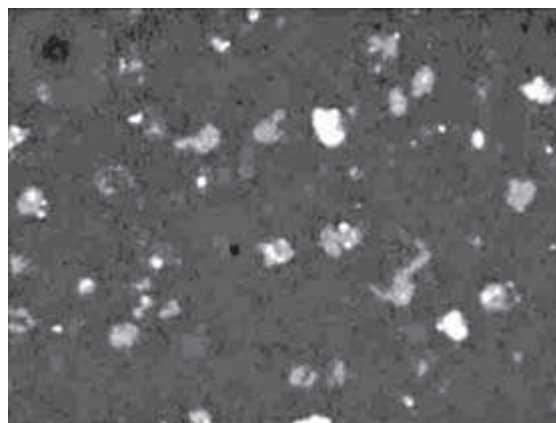
Микроелектрофорезата е осъществена с помощта на апаратура - цитоферометър Opton - Austria. Микроелектрофоретичната му камера е с правоъгълно напречно сечение. Оптичният микроскопски образ се прехвърля с помощта на видеокамера "Sony" на екрана на монитор, което позволява точен контрол на стационарната равнина и стандартно отчитане на миграцията на еритроцитите в електричното поле.

Електрофоретичните измервания се извършват при фазов контраст в предната стационарна равнина на камерата. Измерването се извършва при температура 23°C и големина на тока 10 mA, като се засича времето, за което всяка една от клетките изминава 16 μm. При изчисляването на електрофоретичната подвижност се измерват между 20 и 30 клетки. Дзета потенциалът (електрокинетичен потенци-

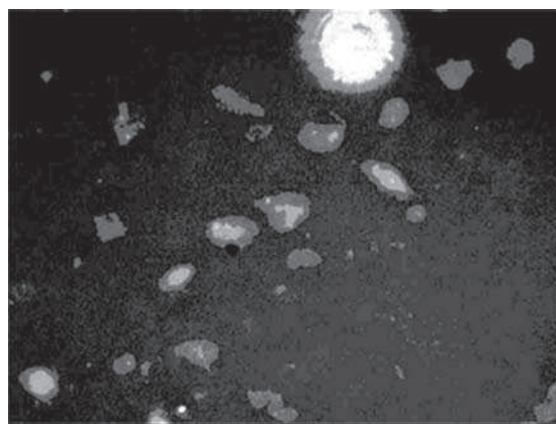
ал) е изчисляван от електрофоретичната подвижност, като е използвано уравнението на Helmholtz-Smoluchowski. Повърхностният електричен заряд се определя съгласно McLaughlin (5).

Резултати

Установено е, че конканавалин А не води до промяна в електрофоретичната подвижност на еритроцитите при норма. Железните йони (1 mM) не предизвикват статистически значими изменения в електрокинетичните свойства на еритроцитни мембрани при норма след третиране с лектина Con A. При случаите с желязодефицитна анемия се наблюдава нарастване на ЕФП само при доза от 20 μg/ml Con A (p = 0,011) в еритроцитната суспензия.



Снимка 1. Еритроцитни мембрани от здрав донор, третирани с FITC Con A.

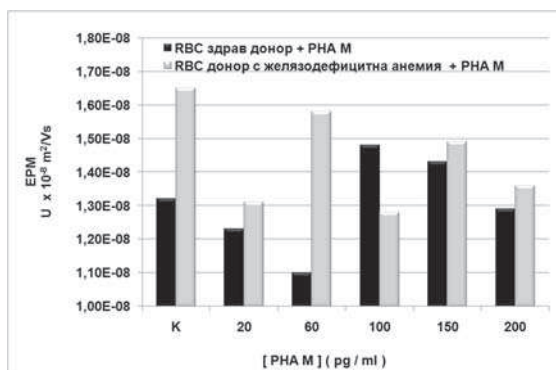


Снимка 2. Еритроцитни мембрани от пациенти с β-таласемия, третирани с FITC Con A.

Наблюдава се интензивна флуоресценция след третирането на еритроцитните мембрани от здрав донор с FITC Con A, която се определя от високата степен на свързване на лектина с мембраните. Патологията води до по-слаба флуоресценция на еритроцитните мембрани от пациенти с β -таласемия след третирането им с FITC Con A.

Установено е, че РНАМ не предизвиква статистически значими изменения в електрофоретичната подвижност на еритроцити в норма, докато в присъствието на (1 mM) феро йони се наблюдава силно повишаване на свързването при дози от 60, 150 и 200 $\mu\text{g/ml}$ РНА М. Това означава, че феро йоните улесняват процеса на нарастване на електрокинетичния потенциал. Регистрирано е понижаване на електрофоретичната подвижност при доза от 60 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,001$) и и увеличаването ѝ при доза от 150 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,028$) РНА М в еритроцитна суспензия от пациенти с желязодефицитна анемия (фиг. 1).

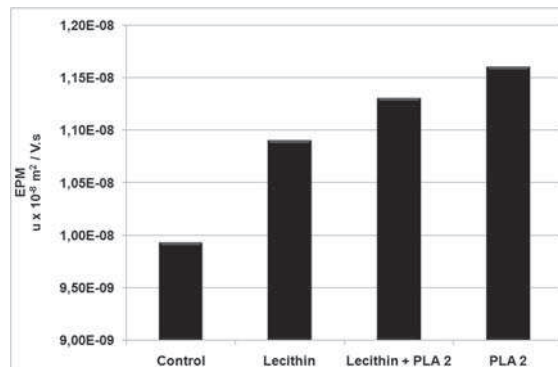
В присъствието на 100 $\mu\text{g/ml}$ РНА М ($p < 0,009$) и 200 $\mu\text{g/ml}$ РНА М ($p < 0,001$) се наблюдава значимо нарастване на електрофоретичната подвижност на еритроцити от пациенти с хетерозиготна β -таласемия. Дзета потенциалът се увеличава от -14,6 mV за нетретираните еритроцити до -18,3 mV при еритроцити от пациенти с β -таласемия в присъствие на 200 $\mu\text{g/ml}$



Фиг. 1. Електрофоретична подвижност на човешки еритроцити от здрав донор и пациенти с желязодефицитна анемия, суспендирани в PBS pH 7.4, в присъствие на phytohemagglutinin M (РНА М).

ml РНА М, а σ нараства с $0,0034 \text{ C/m}^2$ след третиране с максималната доза лектин.

Лецитинът е електрически неутрален в рН областта от 4 до 5. Електрофоретичната му подвижност ще бъде близка до нула и това определя незначителните стойности на дзета и повърхностния потенциал на мембраната на интерфейса. Свързването на катион и/или анион модифицира този потенциал. Установено е, че Ca^{2+} и лецитина се характеризират с динамично свързване, при което фосфатните глави на липидите се изместват и се увеличава електрофоретичната подвижност. Дзета потенциалът, в присъствието на лецитин и Ca^{2+} , се увеличава с $\sim 1,6 \text{ mV}$ ($\zeta = -18,9 \text{ mV}$) спрямо ζ на контролните RBC ($\zeta = -17,3 \text{ mV}$). Добавянето на фосфолипаза A_2 към предварително третираните с лецитин еритроцити, води до увеличаване на ζ потенциала с $\sim 2,4 \text{ mV}$ ($\zeta = -19,7 \text{ mV}$). Взаимодействието на PLA2 с еритроцитната мембрана ($\zeta = -20,1 \text{ mV}$)



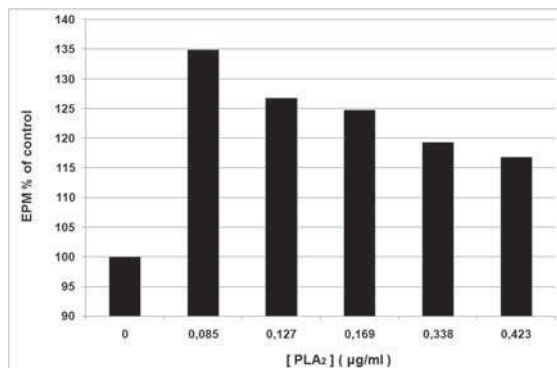
Фиг. 2. Електрофоретична подвижност на човешки еритроцити от здрав донор в H buffer след третиране с лецитин [$8 \mu\text{g/ml}$] и PLA₂ [$0,169 \mu\text{g/ml}$].

предизвиква допълнително увеличаване на ζ с $\sim 2,9 \text{ mV}$ (Фиг. 2).

Слабото увеличаване на електрокинетичния потенциал въз основа на посочените ефекти се дължи на свързването на Ca^{2+} към еритроцитната мембрана. Калциевите катиони спомагат за активирането на повече отрицателни заряди на липидни групи по външната повърх-

ност на мембраната в сравнение с електрокинетичните свойства на контролни еритроцити.

Най-ниската концентрация на третиране на еритроцити с PLA₂ (0,085 µg/ml) довежда до силен електростатичен ефект на повишаване на ЕФП с 35% спрямо нетретираните с PLA₂ еритроцити (Фиг. 3). Този ефект се подсилва и от присъствието на Ca²⁺ йони в суспензионната среда.



Фиг. 3. Ефект на Електрофоретична подвижност на човешки еритроцити от здрав донор в H buffer, третирани с фосфолипаза A₂ спрямо величината ѝ за контролни еритроцити без PLA₂.

По-високите концентрации на въздействие на PLA₂ (0,338 µg/ml и 0,423 µg/ml) върху еритроцитните мембрани предизвикват понижаване на електрофоретичния ефект. Така дзета потенциалът в контролните еритроцити ($\zeta = -13,0$ mV) се повишава до $\zeta = -17,6$ mV (в присъствие на 0,085 µg/ml PLA₂) и намалява до -15 mV при концентрации на въздействие от 0,338 µg/ml и 0,423 µg/ml. Фосфолипаза A₂ се свързва с еритроцитната мембрана електростатично, като ефектът е на повишаване на електрокинетичния потенциал спрямо този на нетретираните мембрани.

Установено е, че PLA₂ взаимодейства с външната повърхност на еритроцитната мембрана, като взаимодействие ѝ с липидите променя мембранната стабилност. Електрокинетичният потенциал на

третираните с фосфолипаза A₂ еритроцити се стреми да увеличи отрицателната си плътност с цел предотвратяване агрегацията на еритроцитите, т.е. увеличават се силите на отблъскване между частиците, които ще доминират над електростатичните сили на привличане.

Дискусия и Заключение

Промяната в електрокинетичните свойства на еритроцити от пациенти с желязодефицитна анемия и на такива с β -таласемия е свързана съответно с понижаване или увеличаване на тяхната електрофоретична подвижност при взаимодействие с определени дози лектин в суспензионната среда. Свързването на лектина с еритроцитната мембрана при патология води до експонирането на повече отрицателно заредени групи по повърхността ѝ.

Високите концентрации на фосфолипаза A₂ повлиява само ензимната активност, като фармакологичната активност на PLA₂ проявява специфичност при влиянието ѝ върху електростатиката на мембраната.

Благодарности: Изследванията са финансирани от Националния фонд Научни изследвания при Министерството на Образованието, Младежта и Науката (проект DO-02-83/08)

Литература

1. Abramson H, Moyer L. The electrical charge of mammalian red blood cells. *J Gen Physiol* 1935, 601-607
2. Atanasov VN, Danchev D, Mitewa M, et al. Hemolytic and anticoagulant study of the neurotoxin vipoxin and its components-basic phospholipase A₂ and an acidic inhibitor. *Biochemistry (Moscow)* 2009; 74(3): 276-280.
3. Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake

venom phospholipase A2 enzymes.
Toxicon 2003; 42: 827-840.

4. Levine S, Levine M, Sharp A, et al.
Theory of the electokinetic behavior of human erythrocytes. *Biophys J* 1983; 42: 127-135.
5. McLaughlin SG. *Electrostatic potentials at membrane solution interfaces.* *Curr Topics Membr Trans* 1977; 9: 71-121.
6. Nishiguchi E, Okubo K, Nakamura S.
Adhesion of human red blood cells and surface charge of the membrane. *Cell Struct Funct* 1998; 23: 143-152.
7. Sharon N, Lis H. *History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules.* *Glycobiology* 2004; 14(11): 53-62
8. Six DA, Dennis EA. *The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization.* *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2000; 1488: 1-19

Адрес за кореспонденция:

Доц. Виржиния Долчинкова
Катедра Биофизика и Радиобиология
Биологически факултет при СУ
„Свети Климент Охридски”
Бул. „Драган Цанков” № 8
1164 гр. София
Email: virjird@biofac.uni-sofia.bg