

Tomaž Smrkolj¹

Oblika eritrocita in njegova deformabilnost pri spremenjenih zunanjih pogojih²

Erythrocyte shape and deformability due to variations in external factors

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: eritrociti – učinki zdravil, eritrocit deformabilnost, natrijev salicilat, diamid

Med pretakanjem krvi morajo eritrociti stalno spreminjati svojo obliko, zato je njihova deformabilnost ena njihovih osnovnih lastnosti. V raziskavi smo skušali ugotoviti vlogo podmembranskega beljakovinskega ogrodja pri mehanski stabilnosti eritrocitov. Predvidevali smo, da bodo spremenjene mehanske lastnosti ogrodja vplivale na deformabilnost membrane eritrocita. Membranske lastnosti, ki pogojujejo deformabilnost eritrocitov, smo zasledovali z opazovanjem spremembe oblike, ki jo eritrociti zavzamejo ob spreminjanju zunanjih pogojev. Za spreminjanje oblike eritrocitov smo uporabili natrijev salicilat, ki spremeni bikonkavni disk, to je fiziološko oblika eritrocita, v ehinocit-kroglo s številnimi membranskimi izrastki. Nato smo utrdili podmembransko beljakovinsko ogrodje z diamidom in ponovno opazovali spremembo oblike ob dodatku natrijevega salicilata. Rezultati so pokazali, da diamid zmanjša deformabilnost eritrocitove membrane. Zmanjšanje je odvisno od koncentracije diamida. Deformabilnost membrane je določena z mehanskimi lastnostmi podmembranskega beljakovinskega ogrodja. Zmanjšanje deformabilnosti je posledica utrditve ogrodja.

ABSTRACT

KEY WORDS: erythrocytes – drug effects, erythrocyte deformability, sodium salicylate, diamide

Changes in erythrocyte shape are necessary in the circulation of blood, therefore deformability is one of the basic properties of erythrocytes. A research project was conducted in order to determine the role of the submembrane protein skeleton in the mechanical stability of erythrocytes. Our hypothesis suggested that changes in the mechanical properties of the protein skeleton should result in changed deformability of the erythrocyte membrane. The properties affecting the deformability of erythrocytes were determined by observing changes in erythrocyte shape resulting from variations in external factors. Changes in erythrocyte shape were induced using sodium salicylate, which transforms biconcave discs (the physiological shape of the erythrocytes) into echinocytes, i. e. spheres with numerous membrane spicules. Diamide was added to strengthen the submembraneous protein skeleton and shape changes resulting from the addition of sodium salicylate were observed again. The results suggest that diamide lowers the deformability of the erythrocyte membrane. The degree of decrease in deformability depends on diamide concentration. Membrane deformability depends on the mechanical characteristics of the submembrane protein skeleton. Lower deformability is the result of higher skeleton strength.

¹ Tomaž Smrkolj, štud. med., Inštitut za biofiziko, Medicinska fakulteta, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana.

² Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovim priznanjem študentom za leto 1996.

UVOD

Človeški eritrociti (rdeče krvničke) so krvne celice, katerih naloga je prenos kisika iz pljuč do tkiv in ogljikovega dioksida iz tkiv v pljuča. Njihovo funkcijo odražata oblika in zgradba. V procesu eritropoeze retikulociti (predstopnja eritrocitov) izgubijo jedro in se skoraj do celna napolnijo z beljakovino hemoglobinom, kar omogoča eritrocitom, da prenašajo potrebne količine dihalnih plinov. Tudi oblika eritrocita je prilagojena fiziološkim potrebam pri prenosu kisika. Fiziološka oblika eritrocita, če ga opazujemo v fiziološki raztopini pod mikroskopom, je bikonkavni disk. Normalni eritrociti imajo premer od 7,5 do 8,3 μm in so debeli okrog 1,7 μm . Njihova povprečna prostornina je 95 μm^3 , povprečna površina pa 138 μm^2 (1). Razmerje prostornin eritrocita in krogle z enako površino je 0,6 zaradi sploščene oblike eritrocita. Tako je izpolnjen geometrijski pogoj, da eritrociti lahko spremenijo svojo obliko. Če bi bil eritrocit okrogel, bi ne mogel spremeniti oblike in bi ne mogel preiti skozi tanke kapilare, ki imajo premer odprtine med 3 in 12 μm ali v vranici celo 0,5 μm (1).

Membrana eritrocita je zgrajena iz dveh plasti membranskih lipidov, v eno ali v obe plasti hkrati pa so potopljene membranske beljakovine. Membranski lipidi so fosfo- in sfingolipidi, njihova razporeditev med notranjo in zunanjo plastjo je nesimetrična. Tako na zunanji strani prevladujeta sfingomielin in fosfatidilholin, na notranji pa fosfatidiletanolamin in fosfatidilserin. Sestavina membrane je tudi holesterol. Posebnost eritrocitov je podmembranska mreža beljakovin, ki daje membrani trdnost in elastičnost. Najpomembnejše beljakovine te mreže so spektrin, aktin, beljakovina 4.1 in beljakovina 4.9. Med seboj in z membrano se ta mreža povezuje preko posebnih beljakovinskih kompleksov, v katerih sodelujejo transmembranske beljakovine (glikoforin in band 3 beljakovina), aducin in tropomiozin (2). Če podmembransko mrežo raztegnemo, vidimo, da je sestavljena večinoma iz šesterokotnikov, pa tudi petero- (3%) in sedmerokotnikov (8%) (3).

Spektrin je beljakovina, ki tvori dolge, tanke, elastične niti, katerih dolžina v raztegnjenem stanju je 194 nm. Osnova spektrinskih vlaken je dimer z dvema podenotama (α in β).

Prevladujoča oblika v mreži je tetramer (85%) (3), našli pa so tudi di- in oligomere te beljakovine. Preko β -podenote se spektrin in z njim celotna beljakovinska mreža veže na ankirin, ta pa se nato veže na band 3 beljakovino, lahko pa se mreža veže tudi na beljakovino 4.1. Ta se nato poveže z band 3 beljakovino ali glikoforinom C ali celo neposredno s fosfatidilserinom (2). Aktin je v eritrocitih v obliki kratkih, debelih vlaken, sestavljenih iz 12 do 14 aktinskih podenot. Vezavo med aktinom in spektrinom omogoča aducin, ki povečuje afiniteto spektrina do vezave z aktinom (2).

Oblika in deformabilnost membrane eritrocita in s tem celotne celice ni stalna, temveč je fiziološko in patološko spremenljiva. Fiziološko spreminjanje oblike se pojavlja pri prehodu skozi ozke kapilare, kjer mora biti oblika eritrocita prilagodljiva stenam kapilare in s tem membrana razmeroma mehka. Nasprotno pa mora biti v velikih krvnih žilah in srcu membrana eritrocita zelo nedeformabilna zaradi velikih turbulentnih tokov. Hitro kroženje krvi v krvnem obtoku zato narekuje tudi hitro in dinamično prilagajanje elastičnosti in trdnosti eritrocitne membrane. Mehanizmi za spreminjanje elastičnih lastnosti membrane oziroma njene trdnosti vključujejo: fosforilacijo beljakovin ogrodja, spreminjanje koncentracije magnezija, 2,3-difosfoglicerata (v odvisnosti od oksigeniranosti hemoglobina) in kalcija posredno preko delovanja kalmodulina (2).

Za razumevanje obnašanja eritrocita pri raznih pogojih je pomembno poznati elastične lastnosti membrane, ki jih določamo na osnovi meritev (4). Zelo dobro so raziskane elastične lastnosti membrane kot celote, medtem ko je vloga posameznih plasti dokaj neznana. Posebej zanimiva je vloga podmembranskega beljakovinskega ogrodja, saj so ugotovili, da sprememba v beljakovinski mreži zaradi genetskih sprememb vpliva na mehanske lastnosti membrane (5).

S spreminjanjem eksperimentalnih dejavnikov lahko iz običajne diskoidne oblike eritrocitov dobimo še dve: ehinocitno in stomatocitno. Stomatocitne oblike dobimo, če na diskocite učinkujemo s kationskimi amfifilnimi reagenti, npr. fenotiazinom ali klorpromazinom (1).

Ehinocite dobimo, če eritrocite speremo v fiziološki raztopini in jih nato opazujemo na steklenem objektu in krovnem steklu. Prav tako lahko ehinocitne oblike dobimo

s pomočjo nepolarnih ali anionskih amfifilnih kemikalij npr. maščobnih kislin, lecitina, žolčnih kislin, barbituratov, dipiridamola, fenilbutazona in salicilata (1). Prehod od diskocitne do ehinocitne oblike je postopen in zajema 4 stopnje: ehinocit 1 je diskoiden in nepravilne oblike, ehinocit 2 je ploščat z že opaznimi izrastki, ehinocit 3 je okrogel ali jajčast z 10 do 30 majhnimi membranskimi izrastki, ki pri sferoehinocitu (4. stopnja) postanejo večji.

Ehinocitno transformacijo razložimo s tem, da neka kemikalija vstopi v zunanji sloj membrane, ki vsebuje predvsem nevtralne fosfolipide, in s tem poveča površino tega sloja, tako poveča razliko med površinama obeh slojev in s tem povprečno ukrivljenost membrane ter povzroči nastanek izrastkov, značilnih za ehinocite (7). Za ukrivljenost membrane je pomembna razlika v površinah notranjega in zunanjega lipidnega sloja (5). Pri prostornini $95 \mu\text{m}^3$ in površini $138 \mu\text{m}^2$ je pri diskocitu potrebna razlika površin $0,41 \mu\text{m}^2$, pri sferoehinocitu pa $0,93 \mu\text{m}^2$ (8). Ob upoštevanju modela, ki predvideva, da kemična snov vstopi v membransko plast in s tem poveča njeno površino, lahko hitro sklepamo, da je povečanje površine in s tem sprememba oblike odvisna od koncentracije te kemične snovi. Kljub temu da zgoraj navedeni mehanizem za ehinocitno spremembo ne vključuje ogrodja, se ne moremo ogniti dejstvu, da ogrodje kot tretja plast tudi sodeluje v teh transformacijah. Pri analizi vpliva ogrodja na mehanske lastnosti membrane smo membrano obravnavali kot triplastno strukturo, sestavljeno iz dveh plasti lipidov in beljakovinskega ogrodja (9).

Namen naše naloge je bil raziskati vlogo ogrodja pri mehanski stabilnosti eritrocitov, in sicer z opazovanjem sprememb v eritrocitu po določeni modifikaciji ogrodja. Haest in sodelavci so leta 1980 ugotovili, da z diamidom lahko učinkovito vplivamo na lastnosti ogrodja in s tem splošne eritrocitove mehanske lastnosti, kar so tudi raziskali in kvantitativno izmerili spremembe v deformabilnosti membrane po delovanju dveh različnih koncentracij diamida s pomočjo reoskopa (6). V našem primeru pa smo deformabilnost ocenjevali na osnovi spremembe oblike eritrocita zaradi zunanjih dejavnikov ter povečanje ali zmanjšanje deformabilnosti povezali z različnimi koncentracijami diamida, v prisotnosti katerega smo inkubirali eritrocite. Tako

smo lahko posredno skleпали tudi na spreminjene mehanske lastnosti ogrodja.

MATERIALI IN METODE

Priprava eritrocitov in inkubacija z SH-reagenti

Najprej smo izmerili hematokritsko vrednost suspenzije človeških eritrocitov v fiziološki raztopini. Suspenzijo eritrocitov v fiziološki raztopini (154 mmol/l NaCl) smo centrifugirali pri $2500/\text{min}$ 10 minut in nato odstranili supernatant. Dodali smo 9 prostornin raztopine A (90 mmol/l KCl , 45 mmol/l NaCl , $10 \text{ mmol/l Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, $44 \text{ mmol/l saharoze}$, $0,05\% \text{ albuminov}$, $\text{pH } 8,0$) in centrifugirali tako nastalo suspenzijo pri $2500/\text{min}$ 10 minut. Po odstranitvi supernatanta smo dodali 1 prostornino 100 mmol/l jodoacetata in suspenzijo inkubirali pri 37°C 15 minut. Sledilo je 3-kratno spiranje z raztopino A ($\text{pH } 8,0$), med dvema spiranjema smo centrifugirali pri $2500/\text{min}$ 10 minut in odstranili supernatant. Nato smo inkubirali eritrocite v $0,05$, $0,1$, $0,25$ in $0,5 \text{ mmol/l}$ raztopini diamida pri 37°C 15 minut (po Haestu in sodelavcih) (6).

Postopki za spreminjanje oblike eritrocitov

Po inkubaciji v raztopini z izbrano koncentracijo diamida (glej Priprava eritrocitov in inkubacija s SH-reagenti), smo 3-krat spirali z raztopino A ($\text{pH } 7,4$), med dvema spiranjema smo centrifugirali pri $2500/\text{min}$ 10 minut. Po spiranju smo dodali ustrezne koncentracije natrijevega salicilata tako, da smo dobili hematokritsko vrednost 2% .

Suspenzijo smo centrifugirali pri $1000/\text{min}$ 1 minuto in nato odpipetirali zgoščeno suspenzijo pri dnu, saj bi drugače v vidnem polju mikroskopa opazovali premajhno število eritrocitov, ker je pri 2% hematokritu suspenzija redka (po Haestu in sodelavcih) (6).

Zajem in obdelava slike eritrocitov

Kapljico suspenzije smo prenesli na objektno steklo, ga pokrili in opazovali eritrocite pod 1000 -kratno povečavo (z imerzijskim objektivom) ter nato s pomočjo videokamere posneli sliko v vidnem polju na videotrak. Sledila je digitalizacija slike in prenos na PC-računalnik, nato pa izris slike s tiskalnikom.

Kvantitativna obdelava je potekala na podlagi natisnjenih slik. Na vsaki sliki smo določili število diskocitov, ehinocitov in vmesnih oblik (takih, ki še niso bili ehinociti, vendar so bile spremembe oblike membrane že opazne).

REZULTATI

Oblike eritrocitov

Najprej smo pripravili raztopini, ki sta na slikah jasno pokazali razlike med diskocitom in ehinocitom. Raztopina brez natrijevega salicilata je dala sliko, na kateri so sami diskociti, 20 mmol/l raztopina natrijevega salicilata pa povzročila, da so skoraj vsi diskociti prešli v ehinocite.

Vpliv natrijevega salicilata na obliko eritrocitov pri različnih koncentracijah diamida

Pri vsaki koncentraciji natrijevega salicilata smo naredili več slik, odvisno od gotote eri-

trocitov v vidnem polju, tako da smo prešteli vsaj 100 eritrocitov pri posamezni koncentraciji natrijevega salicilata. Rezultati so prikazani v tabelah 1–5. Skoraj pri vseh meritvah je moč opaziti, da je določen odstotek ehinocitov prisoten tudi v raztopinah brez dodanega natrijevega salicilata (glej tabele pri koncentraciji natrijevega salicilata 0), zato smo se odločili, da razliko med odstotkom diskocitov in 100 % imenujemo ozadje, ker očitno ni nastala zaradi delovanja natrijevega salicilata, temveč zaradi variacij v uporabljenih vzorcih. Za vrednotenje rezultatov in risanje grafov smo zato uporabili popravljenе vrednosti odstotka diskocitov in vsote ehinocitov in vmesnih oblik. Popravljenе vrednosti dobimo, če odstotku diskocitov pri vsaki koncentraciji natrijevega salicilata prištejemo vrednost ozadja, oziroma vsoti ehinocitov in vmesnih oblik odštejemo to vrednost.

Tabela 1. Število posameznih oblik eritrocitov pri različnih koncentracijah natrijevega salicilata, brez inkubacije z diamidom. Ozadje = 0 %. c (Na-sal) – koncentracija natrijevega salicilata v mmol/l; n (d) in % (d) – število in odstotek diskocitov; n (v) in % (v) – število in odstotek eritrocitov vmesne oblike; n (e) in % (e) – število in odstotek ehinocitov; n (skupaj) – število vseh eritrocitov; % (e + v) vsota odstotkov ehinocitov in eritrocitov vmesne oblike.

c (Na-sal)	n (d)	n (v)	n (e)	n (skupaj)	% (d)	% (v)	% (e)	% (e + v)
0	216	0	0	216	100	0	0	0
5	124	35	21	180	68,9	19,4	11,7	31,1
6	111	64	35	210	52,9	30,5	16,7	47,2
10	130	107	58	295	44,1	36,3	19,7	56
12	130	125	97	352	36,9	35,5	27,6	63,1
15	85	144	151	380	22,4	37,9	39,7	77,6
20	6	18	304	328	1,8	5,5	92,7	98,2

Tabela 2. Število posameznih oblik eritrocitov pri različnih koncentracijah natrijevega salicilata, po inkubaciji z 0,05 mmol/l diamidom. Ozadje = 5,6 %. c (Na-sal) – koncentracija natrijevega salicilata v mmol/l; n (d) in % (d) – število in odstotek diskocitov; n (v) in % (v) – število in odstotek eritrocitov vmesne oblike; n (e) in % (e) – število in odstotek ehinocitov; n (skupaj) – število vseh eritrocitov; % (e + v) vsota odstotkov ehinocitov in eritrocitov vmesne oblike.

c (Na-sal)	n (d)	n (v)	n (e)	n (skupaj)	% (d)	% (v)	% (e)	% (e + v)
0	101	6	0	107	94,4	5,6	0	5,6
5	190	18	4	212	89,6	8,5	1,9	10,4
6	150	58	14	222	67,6	26,1	6,3	32,4
10	107	190	45	342	31,3	55,6	13,2	68,8
12	49	94	61	204	24	46,1	29,9	76
15	34	91	81	206	16,5	44,2	39,3	83,5
20	0	13	253	266	0	4,9	95,1	100

Tabela 3. Število posameznih oblik eritrocitov pri različnih koncentracijah natrijevega salicilata, po inkubaciji z 0,1 mmol/l diamidom. Ozadje = 3,9%. c (Na-sal) – koncentracija natrijevega salicilata v mmol/l; n (d) in % (d) – število in odstotek diskocitov; n (v) in % (v) – število in odstotek eritrocitov vmesne oblike; n (e) in % (e) – število in odstotek ehinocitov; n (skupaj) – število vseh eritrocitov; % (e + v) vsota odstotkov ehinocitov in eritrocitov vmesne oblike.

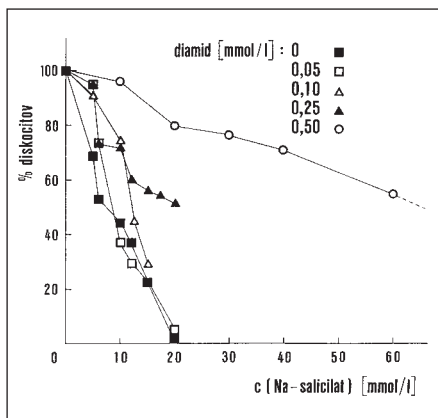
c (Na-sal)	n (d)	n (v)	n (e)	n (skupaj)	% (d)	% (v)	% (e)	% (e + v)
0	171	3	4	178	96,1	1,7	2,2	3,9
5	326	34	13	373	87,4	9,1	3,5	12,6
10	224	75	20	319	70,2	23,5	6,3	29,8
12	147	163	52	362	40,6	45	14,4	59,4
15	51	102	47	200	25,5	51	23,5	74,5

Tabela 4. Število posameznih oblik eritrocitov pri različnih koncentracijah natrijevega salicilata, po inkubaciji z 0,25 mmol/l diamidom. Ozadje = 12,8%. c (Na-sal) – koncentracija natrijevega salicilata v mmol/l; n (d) in % (d) – število in odstotek diskocitov; n (v) in % (v) – število in odstotek eritrocitov vmesne oblike; n (e) in % (e) – število in odstotek ehinocitov; n (skupaj) – število vseh eritrocitov; % (e + v) vsota odstotkov ehinocitov in eritrocitov vmesne oblike.

c (Na-sal)	n (d)	n (v)	n (e)	n (skupaj)	% (d)	% (v)	% (e)	% (e + v)
0	342	31	19	392	87,2	7,9	4,8	12,7
5	258	39	35	332	77,7	11,7	10,5	22,2
6	73	29	19	121	60,3	24	15,7	39,7
10	153	61	44	258	59,3	23,6	17,1	40,7
12	82	61	31	174	47,1	35,1	17,8	52,9
15	143	92	99	334	42,8	27,5	29,6	57,1
17,5	134	115	72	321	41,7	35,8	22,4	58,2
20	118	106	81	305	38,7	34,8	26,6	61,4

Tabela 5. Število posameznih oblik eritrocitov pri različnih koncentracijah natrijevega salicilata, po inkubaciji z 0,5 mmol/l diamidom. Ozadje = 7,7%. c (Na-sal) – koncentracija natrijevega salicilata v mmol/l; n (d) in % (d) – število in odstotek diskocitov; n (v) in % (v) – število in odstotek eritrocitov vmesne oblike; n (e) in % (e) – število in odstotek ehinocitov; n (skupaj) – število vseh eritrocitov; % (e + v) vsota odstotkov ehinocitov in eritrocitov vmesne oblike.

c (Na-sal)	n (d)	n (v)	n (e)	n (skupaj)	% (d)	% (v)	% (e)	% (e + v)
0	155	13	0	168	92,3	7,7	0	7,7
10	332	37	8	377	88,1	9,8	2,1	11,9
20	284	85	28	397	71,5	21,4	7,1	28,5
30	163	45	29	237	68,8	19	12,2	31,2
40	81	31	17	129	62,8	24	13,2	37,2
60	199	156	72	427	46,6	36,5	16,9	53,4



Slika 1. Odvisnost odstotka diskocitov od koncentracije natrijevega salicilata po inkubaciji v raztopinah diamida različnih koncentracij.

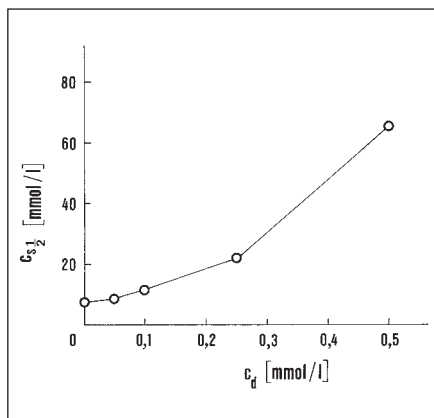
Tabela 6. Koncentracija natrijevega salicilata, pri kateri je odstotek diskocitov enak 50%, ($c_{s1/2}$) v odvisnosti od koncentracije diamida (c_d).

c_d (mmol/l)	$c_{s1/2}$ (mmol/l)
0,00	7,5
0,05	8,6
0,10	11,8
0,25	22,0
0,50	65,5

RAZPRAVLJANJE

V našem delu smo preučevali vpliv podmembranskega beljakovinskega ogrodja pri deformabilnosti eritrocitove membrane, zato smo z reagenti, ki spreminjajo obliko membrane, delovali na eritrocite, katerih ogrodje smo utrdili do različnih stopenj z različnimi koncentracijami diamida.

Opazovali smo spreminjanje deleža posameznih oblik eritrocitov z naraščanjem koncentracije natrijevega salicilata in naraščanjem koncentracije diamida, v katerem smo inkubirali eritrocite. Vrednost % (e+v) je v naših eksperimentalnih pogojih bolj zanesljiva za ocenjevanje dogajanj kot vrednosti % (e) in % (v) posebej. V metodah smo namreč že omenili, da je štetje potekalo na osnovi slike. Precej zanesljivo se da oceniti, da ima neki eritrocit obliko diskocita, toda ločevanje med ehinocitom in vmesno obliko je včasih težavno,



Slika 2. Odvisnost koncentracije natrijevega salicilata, pri kateri je odstotek diskocitov enak 50%, ($c_{s1/2}$) od koncentracije diamida (c_d).

ker se iz slike ne da natančno količinsko oceniti stopnje deformacije. Tako smo med štetjem lahko neki zgodnji ehinocit šteli še za vmesno obliko, pozno vmesno obliko pa že za ehinocit, zato kaže vrednostima % (e) in % (v) pripisovati manjšo težo.

Iz rezultatov lahko vidimo, da zvišanje koncentracije natrijevega salicilata pomeni tudi večanje vsote deležev ehinocitov in vmesnih oblik v populaciji eritrocitov, kar potrjuje ugotovitve, da je natrijev salicilat ehinocitni dejavnik (10). Njegov učinek razlagamo z razliko površin notranjega in zunanega lipidnega sloja: $\Delta A_1 - A_2$ kjer je A_1 površina zunanega in A_2 notranjega lipidnega sloja. Po tem mehanizmu torej ne upoštevamo mehanskih lastnosti ogrodja, ki neutrjen praktično ne vpliva na deformabilnost in obliko membrane (4). Za ploskovni prožnostni modul ogrodja (K_p) v tem primeru lahko rečemo, da je bistveno manjši od ploskovnih prožnostnih modulov zunanje (K_1) oziroma notranje lipidne plasti (K_2). Pozitivna razlika ΔA povzroči ehinocitno transformacijo, in sicer je transformacija tem bolj izrazita, čim večja je ta razlika. Povečanje zunanje površine v primerjavi z notranjo nastane zaradi množičnejšega vklapljanja molekul natrijevega salicilata v zunanji lipidni sloj membrane. Natrijev salicilat je namreč negativno nabit in ga fosfatidilserin, ki je tudi negativno nabit in ga je več v notranjem lipidnem sloju, odbija (11). Najdemo pa tudi

drugo razlago, po kateri pride do razlike v površinah zaradi delovanja ehinocitnih dejavnikov na band 3 beljakovine, ki spreminijo svojo konformacijo tako, da se poveča površina zunanje plasti (12).

Izračun vrednosti % (e + v) nam posredno pove, kako močno se eritrociti deformirajo z naraščajočo koncentracijo natrijevega salicilata, pri čemer privzamemo, da je odstotek spremenjenih eritrocitov v populaciji % (e + v) pokazatelj deformacije, ki bi jo utrpel povprečen eritrocit. Tako je pri nizkih koncentracijah natrijevega salicilata vrednost % (e + v) majhna, pri višjih pa večja. Zanimiva je tudi oblika krivulje, če % (e + v) nanašamo v odvisnosti od koncentracije natrijevega salicilata, ki je sigmoidna.

Iz odvisnosti odstotka spremenjenih diskocitov od koncentracije natrijevega salicilata (slika 1) opazimo, da predhodna inkubacija suspenzije v diamidu zmanjša deformabilnost eritrocitov, kar so ugotovili tudi Haest in sodelavci (6). Učinek določene koncentracije natrijevega salicilata je odvisen od prisotnosti in koncentracije diamida. V modelu, ki ga za mehanske lastnosti membrane eritroci-

ta predvidevajo Svetina in sodelavci (9), definiramo 3 ploskovne prožnostne module: po enega za vsako lipidno plast (K_1, K_2), zadnji modul pa opisuje vpliv podmembranskega beljakovinskega ogrodja (K_s). Modula, ki se nanašata na lipidno dvoplast, nista odvisna od prisotnosti diamida, za modul, ki se nanaša na beljakovinsko ogrodje pod membrano, pa je to pričakovano. Sam mehanizem delovanja diamida na prožnostne lastnosti ogrodja je še dokaj nejasen, znano pa je, da diamid zamreži povezave med molekulami spektrina (6) z oksidacijo SH-skupin, ki med seboj nato tvorijo disulfidne mostičke. Poveča se tudi število spektrinskih molekul v dimerni obliki.

Z utrditvijo ogrodja dvoplasten model membrane, s katerim smo razlagali ehinocitno transformacijo z natrijev salicilatom, postane triplasten, kajti ogrodje postane viden dejavnik pri deformabilnosti membrane. Njegov učinek opišemo z efektivno razliko površin. Kot je bilo povedano v uvodu, je razlika površin med zunanjo in notranjo lipidno plastjo pri diskocitu $0,41 \mu\text{m}^2$, pri sferoehinocitu pa $0,93 \mu\text{m}^2$. Efektivno razliko površin zapišemo s formulo (9):

$$\Delta A(\text{efek.}) = \frac{(h(K_1 + K_s) + h_{23}K_s)K_1A_{10} + (h_{23}K_s - hK_1)K_1A_{20} - (hK_1 + 2h_{23}K_1)K_sA_{30}}{K_1(K_1 + K_s)h + 2K_1K_s h_{23} + 2K_1K_s \frac{h_{23}^2}{h}}$$

h je oddaljenost med sredinama obeh lipidnih plasti, h_{23} pa oddaljenost med ogrodjem in sredino notranje plasti, A_{10}, A_{20}, A_{30} so ravnovesne površine zunanje in notranje lipid-

ne plasti ter ogrodja. Če formuli za efektivno razliko površin pri ehinocitu in diskocitu odštejemo, dobimo:

$$\Delta(\Delta A(\text{efek.})) = \Delta A(\text{efek.})_{eh} - \Delta A(\text{efek.})_d = \frac{h((K_2 + K_s) + h_{23}K_s)K_1(A_{1,eh} - A_{1,d})}{K_1(K_2 + K_s)h + 2K_1K_s h_{23} + K_s(K_1 + K_2) \frac{h_{23}^2}{h}}$$

Za poenostavitev formule definirajmo dve vrednosti: $r = \frac{K_s}{K_1}$ in $\beta = \frac{h_{23}}{h}$ in napišimo izraz za razliko efektivnih razlik površin ehinocita in diskocita:

$$\Delta(\Delta A(\text{efek.})) = \frac{(A_{1,eh} - A_{1,d})(1 + r + r\beta)}{1 + r + 2r\beta(1 + \beta)} \quad \frac{(1 + \beta)(A_{1,eh} - A_{1,d})}{1 + 2\beta(1 + \beta)}$$

Dokler je vpliv ogrodja zanemarljiv ($K_s = 0$ in $r = 0$), velja:

$$\Delta(\Delta A(\text{efek.})) = A_{1,eh} - A_{1,d}$$

Ko pa K_s narašča (ogrodje postaja trdnjše), se $\Delta(\Delta A(\text{efek.}))$ zmanjšuje, ker se r povečuje in pri $r = \infty$ vidimo, da je enaka

Tabelirajmo vrednost $p = \frac{1+\beta}{1+2\beta(1+\beta)}$, ki podaja razmerje med razliko efektivnih razlik površin $\Delta(\Delta A(\text{efek.}))$ ter razliko površin zunanje plasti ehinocita in diskocita $A_{1,\text{eh}} - A_{1,\text{d}}$.

Tabela 7. Odvisnost vrednosti p od β .

β	p
1	0,40
2	0,23
3	0,16
4	0,12

Iz tabele vidimo, da je pri β večjih od ena, $\Delta(\Delta A(\text{efek.}))$ precej manjša od $A_{1,\text{eh}} - A_{1,\text{d}}$, kar pomeni, da moramo za $\Delta(\Delta A(\text{efek.}))$, ki je potrebna za ehinocitno transformacijo ($0,53 \mu\text{m}^2$) z natrijev salicilat, povzročiti zelo veliko ΔA_1 . Torej za transformacijo po inkubaciji z diamidom potrebujemo veliko višjo koncentracijo natrijevega salicilata.

V naši raziskavi sicer nismo mogli neposredno izmeriti modula K_s z opazovanjem deformacij eritrocitov, vendar smo z opazovanjem sprememb koncentracije natrijevega salicilata, ki je potrebna za vidno spremembo oblike večjega števila celic, pri zvišanju koncentracije diamida dobili ne samo kvalitativne, temveč tudi kvantitativne vrednosti, ki posredno opisujejo deformabilnost eritrocita in s tem spreminjanje tretjega prožnostnega modula (K_s). Prikladna vrednost za ugotavljanje učinka diamida na deformabilnost membrane je $c_{s1/2}$, ki podaja koncentracijo natrijevega salicilata, pri kateri je polovica eritrocitov spremenjena bodisi v vmesno obliko ali ehinocite, oziroma je polovica eritrocitov še nespremenjenih – diskocitov. Tako lahko K_s ocenimo tudi kvantitativno. Večji K_s pomeni manj deformabilno membrano in s tem višjo koncentracijo natrijevega salicilata, potrebno za transformacijo 50 % diskocitov. Povečana trdnost se odrazi na vrednosti $c_{s1/2}$. Vprašajmo se torej, kako je prožnostni modul ogrodja in z njim $c_{s1/2}$, odvisen od koncentracije diamida c_d . Iz tabele 6 in slike 2

vidimo, da odnos med $c_{s1/2}$ in c_d ni linearen, temveč je $c_{s1/2}$ neka potenčna funkcija c_d . Zvišanje koncentracije diamida progresivno povečuje trdnost membrane, vendar je mehanizem, ki je odgovoren za takšno odvisnost, neznan.

Razpravljanje naj zaključimo z ugotovitvijo, da eksperimentalni podatki podpirajo predlagane modele in mehanizme za ehinocitne transformacije ter povečanje trdnosti beljakovinskega ogrodja, vendar pa lahko nastopajo tudi drugačni pojavi. V literaturi najdemo podatek, da pri določenih ehinocitnih transformacijah pride do trganja ogrodja od membrane, kar je razlog, da v ehinocitnih izrastkih le-tega niso našli (3). Postavlja se vprašanje, ali bi torej utrditev ogrodja lahko preprečila trganje in s tem nastanek izrastkov. Natančnejše ugotovitve o učinku diamida na lastnosti ogrodja, predvsem na molekularni ravni, bi morda zagotovile vsaj nekaj podatkov, ki bi lahko dali odgovor na zgornje vprašanje.

ZAKLJUČKI

Sprememba oblike eritrocita je tesno povezana z deformabilnostjo membrane, ki je določena z mehanskimi lastnostmi obeh lipidnih slojev in beljakovinskega ogrodja tik pod membrano. Spremembo oblike, ki nastane v okolju z natrijev salicilat, zmanjšamo z utrjevanjem podmembranskega beljakovinskega ogrodja z dodatkom diamida. S fizikalnim modelom membrane eritrocita smo pokazali, da je zmanjšanje efektivne razlike površin dveh lipidnih slojev, ki neposredno določa obliko eritrocita, odvisno od utrditve beljakovinskega ogrodja.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Saši Svetini za vodenje in nasvete pri tem delu.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Marjanu Grosu in dr. Sonji Vrhovec za uvajanje v laboratorijsko delo ter mag. Primožu Peterlinu in Marjanu Kozamerniku za pomoč pri računalniški obdelavi in izdelavi slikovnega gradiva.

LITERATURA

1. Bessis M. *Living Blood Cells and their Ultrastructure*. Berlin: Springer-Verlag; 1973. p. 140–83.
2. Bennett V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta* 1989; 988: 107–21.
3. Liu S, Derick LH. Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton: Structure-function relationships. *Sem Hematol* 1992; 29: 231–43.
4. Mohandas N, Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biomol Struct* 1994; 23: 787–818.
5. Chabanel A, Sung KLP, Rapiejko J, Prchal JT, Palek J, Liu SC, Chien S. Viscoelastic properties of red cell membrane in hereditary elliptocytosis. *Blood* 1989; 73: 592–95.
6. Haest CWM, Fischer TM, Plasa G, Deuticke B. Stabilization of erythrocyte shape by a chemical increase in membrane shear stiffness. *Blood Cells* 1980; 6: 539–53.
7. Beck JS. Echinocyte Formation: A test case for mechanisms of cell shape changes. *J Theor Biol* 1978; 71: 515–24.
8. Beck JS. Relations between membrane monolayers in some red cell shape transformations. *J Theor Biol* 1978; 75: 487–501.
9. Svetina S, Brumen M, Žekš B. The Role of Membrane Elastic Properties and Cell Volume in the Formation of Red Blood Cell Shapes. In: Benga Gh, Tager JM, editors. *Biomembranes Basic and Medical Research*. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 177–87.
10. Vrhovec S. *Vpliv membransko aktivnih učinkovin na vesikulacijo eritrocitov*. Doktorsko delo. Ljubljana 1990. p. 2–91.
11. Sheetz MP, Singer SJ. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Nat Acad Sci USA* 1974; 71: 4457–61.
12. Gimsa J, Ried C. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? *Mol Membr Biol* 1995; 12: 247–54.

Prispelo 16. 9. 1999.