

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Janja GORŠEK

**OSMOTSKE VOLUMSKE SPREMEMBE
HUMANEGA ERITROCITA ZARADI VPLIVA Hg^{2+} ,
 Pb^{2+} IN Cd^{2+} NA DELOVANJE MEMBRANSKIH
KANALČKOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Janja GORŠEK

**OSMOTSKE VOLUMSKE SPREMEMBE HUMANEGA
ERITROCITA ZARADI VPLIVA Hg^{2+} , Pb^{2+} IN Cd^{2+} NA DELOVANJE
MEMBRANSKIH KANALČKOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**OSMOTIC VOLUME CHANGES IN HUMAN ERYTHROCYTE DUE
TO EFFECTS OF Hg^{2+} , Pb^{2+} AND Cd^{2+} ON MEMBRANE CHANNELS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Biokemijski del naloge in meritve z NMR smo opravili na Institutu Jozef Stefan v Ljubljani v Laboratoriju za magnetno resonanco Odseka za fiziko trdne snovi. Odvzem krvi je bil izveden na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Gojmirja Lahajnarja in za somentorja prof. dr. Slavka Pečarja. Za recenzenta je bil imenovan prof. dr. David Stopar.

Mentor: prof. dr. Gojmir Lahajnar

Somentor: prof. dr. Slavko Pečar

Recenzent: prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Gojmir Lahajnar
Institut Jozef Stefan v Ljubljani, Odsek za fiziko trdne snovi

Član: prof. dr. Slavko Pečar
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Član: prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Janja Goršek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 612.1:577.3.08(043)=863
KG eritrociti/humani eritrociti/volumske spremembe/membranski kanalčki
eritrocitov/ioni težkih kovin/Hg/Pb/Cd/NMR/
AV GORŠEK, Janja
SA LAHAJNAR, Gojmir (mentor)/PEČAR, Slavko (somentor)/STOPAR, David
(recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2007
IN OSMOTSKE VOLUMSKE SPREMEMBE HUMANEGA ERITROCITA
ZARADI VPLIVA Hg^{2+} , Pb^{2+} IN Cd^{2+} NA DELOVANJE MEMBRANSKIH
KANALČKOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIII, 71 str., 1 pregl., 16 sl., 5 pril., 107 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Ioni težkih kovin (Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+}) povzročajo volumske spremembe humanih eritrocitov z delovanjem na kationske kanalčke celične membrane. Prosta tiolna (-SH) skupina, ki se nahaja v aktivnem mestu številnih proteinskih membranskih kanalčkov, med njimi sta tudi Gárdosev kanalček in Ca^{2+} -črpalka, je znano vezavno mesto teh SH-reaktivnih ionov. Posledica aktivacije K^{+} -selektivnega Gárdosevega kanalčka zaradi vezave iona na kanalček je izločanje znotrajceličnega K^{+} , ki ga spremlja osmotsko volumsko krčenje eritrocita. Posledica interakcije ionov Cd^{2+} s Ca^{2+} -črpalko je inhibicija črpalke, zato se poveča znotrajcelični koncentracijski nivo Ca^{2+} in poveča osmotski vdor vode v celico. Za študij induciranih volumskih sprememb eritrocitov smo uporabili pulzno metodo protonske jedrske magnetne resonance (^1H -NMR) merjenja relaksacijske funkcije $M(t)$ transverzalne (T_2) magnetizacije protonov vode, ki se izmenjuje med diamagnetnim znotrajceličnim prostorom in paramagnetno označeno (10 mM Mn^{2+}) zunajcelično raztopino v vzorcih 20 % hematokrita humanih eritrocitov. Izbrana NMR metoda omogoča zasledovanje časovne konstante τ_{exch} difuzijske izmenjave znotrajcelične vode in volumskega razmerja $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ znotrajcelične in zunajcelične vode eritrocitnega vzorca. Iona Hg^{2+} in Pb^{2+} sta povzročila sočasno zmanjševanje obeh parametrov, kar kaže na inducirano zmanjšanje celičnega volumna. Inkubacija eritrocitov z ioni Cd^{2+} je vplivala samo na τ_{exch} (sprva se le-ta rahlo skrajša, nato pa po 9 min inkubacije podaljša za 1 ms na približno kontrolno raven), a v mnogo manjši meri. Po podaljšanju se vrednost τ_{exch} ustali in do konca inkubacije ne spreminja več.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDK 612.1:577.3.08(043)=863
 CX erythrocytes/human erythrocytes/volume changes/erythrocyte membrane channels/heavy metal ions/Hg/Pb/Cd/NMR
 AU GORŠEK, Janja
 AA LAHAJNAR, Gojmir (supervisor)/PEČAR, Slavko (co-advisor)/STOPAR, David (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2007
 TI OSMOTIC VOLUME CHANGES IN HUMAN ERYTHROCYTE DUE TO EFFECTS OF Hg^{2+} , Pb^{2+} AND Cd^{2+} ON MEMBRANE CHANNELS
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XIII, 71 p., 1 tab., 16 fig., 5 ann., 107 ref.
 LA sl
 AL sl/en

AB Heavy metal ions (Hg^{2+} , Pb^{2+} , and Cd^{2+}) induce volume changes of human erythrocytes by acting on their membrane cation channels. The free thiol (-SH) group located in the active site of numerous membrane protein channels, such as the Gárdos channel and the Ca^{2+} -pump, is known to interact with these SH-reacting ions. Activation of the K^{+} -selective Gárdos channel by metal ion binding and subsequent loss of intracellular K^{+} result in osmotically obliged cell water efflux and osmotic volume shrinkage of erythrocytes. However, interaction of Cd^{2+} with the membrane Ca^{2+} -pump leads to its inhibition and therefore to accumulation of the intracellular Ca^{2+} , accompanied by an osmotically obliged water influx. The induced erythrocyte volume changes were deduced from variations in the measured proton nuclear magnetic resonance (^1H -NMR) transverse (T_2) relaxation functions $M(t)$ of water exchanging between the diamagnetic intracellular and paramagnetic (10 mM Mn^{2+}) extracellular compartments of the 20 % hematocrit samples. This pulse NMR technique allows determination of the time constant τ_{exch} of exchange of the intracellular water and of the volume ratio $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ of intracellular and extracellular water of the erythrocyte sample. It was found that Hg^{2+} and Pb^{2+} ions induce simultaneous decrease of τ_{exch} and $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$, suggesting a cell volume decrease. On the other hand, erythrocyte incubation with Cd^{2+} influenced only the τ_{exch} parameter (initial decrease, followed by a weak increase of 1 ms to a near control level after 9 min of incubation), but in a much lesser extent. After the lengthening the value of τ_{exch} stayed unchanged throughout incubation period.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORD DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VIII
	KAZALO SLIK	IX
	KAZALO PRILOG	XI
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	SPLOŠNE LASTNOSTI ERITROCITOV	3
2.2	OBLIKA ERITROCITA	4
2.2.1	Sprememba bikonkavne oblike eritrocitov	5
2.2.1.1	Model sklopljenega lipidnega dvosloja	6
2.3	VZDRŽEVANJE VOLUMNA ERITROCITOV	7
2.3.1	Membranski transport ionov v eritrocitih	8
2.3.1.1	Membranske črpalke	9
2.3.1.2	Prenašalci ionov skozi membrano eritrocita	9
2.3.1.2.1	Anionski izmenjevalec AE1	10
2.3.1.3	Ostali kanali	11
2.3.1.3.1	Vodni kanalček	11
2.3.1.3.2	Gárdosev kanalček	12
2.3.1.3.3	Neselektivni kationski kanalčki (NSC)	13
2.4	APOPTOZA ERITROCITOV	13
2.4.1	Znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} in asimetrija sestave lipidnega dvosloja	13
2.4.2	Vloga Gárdosevega kanalčka v apoptozi	14
2.5	DELOVANJE IONOV Hg^{2+} , Pb^{2+} IN Cd^{2+} NA MOLEKULSKEM NIVOJU	15
2.5.1	Toksičnost Hg^{2+}	15
2.5.1.1	Inhibicija encimov in kanalčkov	15
2.5.1.2	Aktivacija Gárdosevega kanalčka s Hg^{2+}	15

2.5.2	Toksičnost Pb^{2+}	16
2.5.2.1	Svinec inhibira številne encime	16
2.5.2.2	Kompetitivna vezava ionov Pb^{2+} na encime	17
2.5.3	Toksičnost Cd^{2+}	17
2.5.3.1	Podobnost s Ca^{2+} in porušitev homeostaze Ca^{2+} v celici	18
2.5.3.2	Vezava Cd^{2+} na tiolne skupine proteinov	18
2.5.4	Nastanek reaktivnih oblik kisika in oksidacija membranskih lipidov	18
3	MATERIAL IN METODE DELA	20
3.1	MATERIAL	20
3.1.1	Priprava pufrov in drugih raztopin	20
3.1.2	Priprava eritrocitov	21
3.1.3	Priprava vzorcev	21
3.2	METODE	22
3.2.1	Metoda pulzne jedrske magnetne resonance (NMR)	22
3.2.1.1	Teoretične osnove NMR	23
3.2.1.1.1	Kvantno mehanski opis jedrskih spinov	23
3.2.1.1.2	Interakcija jedrskih spinov s statičnim magnetnim poljem	24
3.2.1.1.3	Relaksacijski procesi	26
3.2.1.1.4	Gibanje jedrske makroskopske magnetizacije v magnetnem polju	29
3.2.1.1.5	Rotirajoči koordinatni sistem	30
3.2.1.1.6	Magnetizacija v rotirajočem koordinatnem sistemu	30
3.2.1.1.7	Radiofrekvenčni pulz in signal proste precesije	31
3.2.1.1.8	Merjenje T_2 z metodo spinskega odmeva	32
3.2.1.1.9	Carr-Purcellova pulzna metoda merjenja T_2	33
3.2.2	Študij hitrosti ravnovesne difuzijske izmenjave vode skozi eritrocitno membrano z merjenjem transverzalne protonske NMR relaksacijske funkcije	34
3.2.2.1	Difuzijska vodna permeabilnost eritrocitne membrane in τ_{exh}	37
3.2.3	Tehnična izvedba NMR poskusa	39
4	REZULTATI	41
4.1	ANALIZA UČINKOV IONOV Hg^{2+} , Pb^{2+} IN Cd^{2+} NA τ_{exh} IN V_{in}/V_{out}	42
4.1.1	Grafični prikaz kontrolnih vrednosti parametrov τ_{exh} in V_{in}/V_{out}	42
4.1.2	Grafični prikaz vpliva živosrebrovega klorida na humane eritrocite	43
4.1.2.1	Analiza učinkov iona Hg^{2+} na humane eritrocite	44
4.1.3	Grafični prikaz vpliva svinčevega acetata na humane eritrocite	45
4.1.3.1	Analiza učinkov iona Pb^{2+} na humane eritrocite	48
4.1.4	Grafični prikaz vpliva kadmijevega klorida na humane eritrocite	49

4.1.4.1	Analiza učinkov iona Cd^{2+} na humane eritrocite	51
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1	RAZPRAVA	52
5.1.1	Statistična analiza rezultatov	52
5.1.2	Uporaba pulzne metode NMR protonov vode	53
5.1.3	Vpliv ionov Hg^{2+} na humane eritrocite	54
5.1.4	Vpliv ionov Pb^{2+} na humane eritrocite	55
5.1.5	Vpliv ionov Cd^{2+} na humane eritrocite	58
5.2	SKLEPI	59
6	POVZETEK	61
7	VIRI	63

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1.	Pregled vzorcev za merjenje z NMR.	40
----------------	------------------------------------	----

KAZALO SLIK

Slika 1.	Slika humanih eritrocitov s prepoznavno bikonkavno obliko (Red Blood Cells, 2006).	3
Slika 2.	Topografska lokalizacija membranskih proteinov humanega eritrocita in njihove povezave (Capretta, 2005).	4
Slika 3.	A: Ehinocitna ali bodičasta oblika humanega eritrocita (Biomembranes, 2004). B: Stomatocitna ali čašasta oblika humanega eritrocita (Kimzey in sod., 2002).	6
Slika 4.	Shematska predstavitev hipoteze sklopljenega lipidnega dvosloja (Helmkamp, 2003).	7
Slika 5.	Shema nekaterih transportnih poti v membrani humanega eritrocita (Bernhardt in Weiss, 2003: 84; Maher in Kuchel, 2003: 1184).	8
Slika 6.	A: Magnetna energijska nivoja jeder s spinskim kvantnim številom $I = 1/2$. B: Možne orientacije jedrskega spina $1/2$ v polju $\vec{H}_0$ (Škof, 1998: 22).	25
Slika 7.	Lorentzova oblika NMR absorpcijske krivulje (Škof, 1998: 25).	28
Slika 8.	A: Radiofrekvenčni (rf) pulz $\pi/2$ polja $\vec{H}_1$ vzdolž osi x' zasuje magnetizacijo $\vec{M}$. B: $\vec{M}$ upada zaradi spin-spinske relaksacije in nehomogenosti magnetnega polja $\Delta\vec{H}_0$ eksponentno s časovno konstanto $T_2^\square$. D: Časovni potek izhodnega signala proste precesije (FID) (Škof, 1998: 30).	32
Slika 9.	Opazovani signal časovnega poteka transversalne magnetizacije v CPMG metodi (Škof, 1998: 32).	34
Slika 10.	Primer protonske NMR transversalne relaksacijske funkcije $M(t)$ vode v vzorcu paramagnetno označene suspenzije govejih eritrocitov (Lahajnar, 1992: 196).	37
Slika 11.	Grafična predstavitev časovne odvisnosti kontrolnih parametrov τ_{exch} in V_{in}/V_{out} v vzorcu 20 % hematokrita več krvodajalcev v času od 23.2. do 25. 5. 2006.	42
Slika 12.	Grafična predstavitev vpliva 1 mM HgCl_2 na volumsko krčenje humanih eritrocitov.	43
Slika 13.	Grafična predstavitev vpliva 0.1 mM Pb^{2+} ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) na (A) časovno konstanto τ_{exch} za izmenjavo celične vode in (B) volumsko razmerje V_{in}/V_{out} znotrajcelične in zunajcelične vode v vzorcu 20 % hematokrita.	45

Slika 14.	Grafična predstavitev vpliva 0.05 mM Pb^{2+} ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) na (A) časovno konstanto τ_{exch} za izmenjavo celične vode in (B) volumsko razmerje V_{in}/V_{out} znotrajcelične in zunajcelične vode v vzorcu 20 % hematokrita.	46
Slika 15.	Grafična predstavitev vpliva 0.0125 mM Pb^{2+} ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) na (A) časovno konstanto τ_{exch} za izmenjavo celične vode in (B) volumsko razmerje V_{in}/V_{out} znotrajcelične in zunajcelične vode v vzorcu 20 % hematokrita.	47
Slika 16.	Grafična predstavitev vpliva 1 mM Cd^{2+} (CdCl_2) na (A) časovno konstanto τ_{exch} za izmenjavo celične vode in (B) volumsko razmerje V_{in}/V_{out} znotrajcelične in zunajcelične vode v vzorcu 20 % hematokrita.	50

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A1. Primerjava treh časovnih odvisnosti τ_{exch} in V_{in}/V_{out} na vzorcih 20 % hematokrita različnih krvodajalcev in 1 mM HgCl_2 .
- PRILOGA B1. Primerjava treh časovnih odvisnosti τ_{exch} in V_{in}/V_{out} na vzorcih z 20 % hematokritom različnih krvodajalcev in 0.1 mM $\text{Pb}(\text{acetat})_2$.
- PRILOGA B2. Primerjava treh časovnih odvisnosti τ_{exch} in V_{in}/V_{out} na vzorcih z 20 % hematokritom različnih krvodajalcev in 0.05 mM $\text{Pb}(\text{acetat})_2$.
- PRILOGA B3. Primerjava treh časovnih odvisnosti τ_{exch} in V_{in}/V_{out} na vzorcih z 20 % hematokritom različnih krvodajalcev in 0.0125 mM $\text{Pb}(\text{acetat})_2$.
- PRILOGA C1. Primerjava treh časovnih odvisnosti τ_{exch} in V_{in}/V_{out} na vzorcih 20 % hematokrita različnih krvodajalcev in 1 mM CdCl_2 .

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Å	Ångström; $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m} = 0.1 \text{ nm}$
AE1	anionski izmenjevalec-1
AQP-1	vodni kanalček-1 (akvaporin-1)
ATP	adenozin trifosfat
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
DIDS	diizotiocianostilben sulfonska kislina
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraacetat
FID	signal proste precesije (Free Induction Decay)
Hb	hemoglobin
HbS	mutirana oblika hemoglobina, ki se pojavlja pri srpasti anemiji
KCC	K^+ - Cl^- kotransporter
L	liter
M	molarnost, mol/L
$M(t)$	relaksacijska funkcija transverzalne (T_2) magnetizacije protonov vode
MHz	megahertz, 10^6 Hz
mL	mililiter
mM	milimolarnost, mmol/L
mol	enota za količino snovi (1 mol je količina elementa ali spojine, ki ustreza relativni atomski ali molekulski masi, izraženi v gramih)
mOsm	miliosmolarnost; mosmol/L
NKCC	Na^+ - K^+ - 2Cl^- kotransporter
nM	nanomolarnost, nmol/L
NMR	jedrska magnetna resonanca (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NSC	neselektivni kationski kanalčki
obr./min	obrati na minuto
P_d	difuzijska vodna permeabilnost oz. koeficient difuzijske vodne permeabilnosti
PE	fosfatidiletanolamin
PGE_2	prostaglandin E_2
PS	fosfatidilserin
rad	radian; enota za merjenje kota ($1 \text{ rad} = 57,4^\circ$)
rf	radiofrekvenčni
ROS	reaktivne oblike kisika (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
RPV	regulativno povečanje celičnega volumna
RZV	regulativno zmanjšanje celičnega volumna
s	površina eritrocita
SH	tiolna oz. sulfhidrilna skupina

SOD	superoksidna dismutaza
T_2	časovna konstanta: spin-spinski ali transverzalni relaksacijski čas
TRIS HCl	tris (hidroksimetil) aminometan (=2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol) z dodatkom kisline HCl
v	volumen znotrajcelične vode eritrocita
v/v	volumsko razmerje
V_{in}/V_{out}	razmerje znotrajcelične in zunajcelične vode eritrocitnega vzorca
μL	mikroliter
τ_{exch}	časovna konstanta difuzijske izmenjave znotrajcelične vode skozi membrano eritrocita

1 UVOD

Uravnavanje celičnega volumna je osnovna funkcija, ki so jo celice razvile in ohranile v teku evolucije. Vsakršna sprememba v znotrajcelični ali zunajcelični osmolarnosti vpliva na celični volumen zaradi hitrega osmotskega prehajanja vode skozi celično membrano. Membrane večine živalskih celic so visoko prepustne za vodo zaradi številnih kopij vodnega kanalčka (akvaporina AQP-1), a hkrati občutljive za povečan hidrostatski tlak. Celice so zato razvile mehanizme, s katerimi lahko prilagajajo znotrajcelično osmolarnost in tako vzdržujejo konstantni celični volumen. V procesu uravnavanja znotrajceličnega volumna so najpomembnejši ioni, saj le-ti ob nenadni spremembi zunajcelične osmolarnosti prispevajo kar dve tretjini aktivnosti, bodisi z izstopom iz celice ali vstopom vanjo. V normalnih eritrocitih sesalcev, na primer, okrog 70 % znotrajceličnega volumna zavzema voda; vsakršna sprememba celičnega volumna je torej povezana s prehajanjem vode skozi celično membrano (Lang in sod., 1998).

Za razumevanje procesa uravnavanja celičnega volumna je pomembno poznavanje transportnih poti v celični membrani. Največje število študij membranskih transportnih poti je bilo izvedenih na membrani eritrocita. Eritrociti ali rdeče krvne celice so visoko specializirane celice, ki so zaradi svoje relativno preproste strukture, lažje dostopnosti ter izredne fleksibilnosti celične membrane med najboljše raziskanimi celicami. V fizioloških pogojih (pH 7.4, ~ 330 mOsm) imajo normalni humani eritrociti stabilno obliko bikonkavnega diska. Odvisno od lastnosti okolice in svojega metabolizma pa lahko zavzamejo različne oblike in velikosti. Zaradi vsega naštetega je eritrocit modelna celica za številne tovrstne raziskave.

Novejše odkritje je programirana celična smrt ali apoptoza eritrocita (eriptoza). Do nedavnega je namreč veljala domneva, da procesa apoptoze pri eritrocitih ni zaradi odsotnosti mitohondrijev in jedra. Danes pa vemo, da je premestitev fosfatidilserina, fosfolipida na citosolni strani lipidnega dvosloja nativne celice, na zunajcelično stran eritrocitne membrane, ki jo npr. inducirata iona Hg^{2+} in Pb^{2+} , signal za makrofage, da takšne eritrocite razgradijo (fagocitoza). Med značilnimi celičnimi spremembami, ki spremljajo apoptozo eritrocitov, je tudi nepovratno volumsko krčenje eritrocita (Kempe in sod., 2005; Eisele in sod., 2006).

Znano je, da ioni težkih kovin vplivajo na različne membranske transportne poti in na mnoge procese znotraj celic. Danes, ko onesnaževanje okolja s temi kovinami predstavlja globalni problem, so v teku intenzivne raziskave za boljše razumevanje njihovega toksičnega vpliva na žive organizme. Tovrstna problematika je osredotočena predvsem na mehanizem nastanka bolezenskih stanj kot posledice delovanja teh ionov na celične

komponente. Škodljivi učinki teh kovin se lahko kažejo v nevrotoksičnosti, nefrotoksičnosti ali hepatotoksičnosti (Bingham in sod., 2001).

Iz študija vpliva na geometrijo humanega eritrocita s stališča znotrajceličnega volumna, ob pregledu znanih dejstev ter analizi rezultatov sledi, da ioni težkih kovin (Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+}) povzročajo volumske spremembe eritrocitov z delovanjem na kationske kanalčke v membrani eritrocita (Eisele in sod., 2006; Lahajnar in sod., 2006; Kempe in sod., 2005; Benders in sod., 1997). Za razumevanje efektov, ki jih ti ioni povzročajo, moramo poznati delovanje kanalčkov, ki s prenašanjem ionov K^+ , Na^+ in Ca^{2+} uravnavajo celični volumen. Spremenjeno delovanje teh kanalčkov se izrazi v volumskih spremembah eritrocita.

Za zasledovanje vpliva ionov težkih kovin na geometrijo eritrocitov je na voljo večje število metod. Mi smo se odločili, da bomo za študij induciranih volumskih sprememb eritrocitov uporabili pulzno metodo jedrske magnetne resonance protonov (NMR) merjenja transversalne protonske magnetizacije znotrajcelične vode. Metoda omogoča neinvazivno zasledovanje volumskih sprememb eritrocitov preko merjenja spremembe razmerja med znotraj- in zunajcelično množino vode, kot tudi spremembe časovne konstante difuzijske izmenjave znotrajcelične vode.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Delovna hipoteza diplomske naloge, zasnovana na podlagi znanih izsledkov iz strokovne literature o delovanju ionov Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+} na membrano humanega eritrocita, je naslednja:

- Z neposredno aktivacijo od Ca^{2+} odvisnega K^+ -kanalčka (Gárdosevega kanalčka) lahko Hg^{2+} in Pb^{2+} povzročita povečan iztok znotrajceličnih ionov K^+ in s tem osmotsko inducirano volumsko krčenje eritrocita.
- Ioni Cd^{2+} zaradi kemijske sorodnosti z ioni Ca^{2+} , kompetitivno blokirajo delovanje Ca^{2+} -črpalke. Zaradi povečane znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} eritrocit nabrekne. Po drugi strani naj bi povišani koncentracijski nivo znotrajceličnega Cd^{2+} aktiviral Gárdosev kanalček. Domnevamo, da se bosta učinka nabrekanja in krčenja celice lahko v znatni meri izravnala.
- Zanima nas, ali bodo uporabljene koncentracije ionov zadoščale za sprožitev apoptoze humanega eritrocita (eriptoze). Znano je, da je spremenjeno delovanje Gárdosevega kanalčka del mehanizma apoptoze, ki se kaže v nepovratnem zmanjševanju celičnega volumna.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNE LASTNOSTI ERITROCITOV

Zreli eritrociti sesalcev sodijo v zvrst najbolj visoko specializiranih celic. Njihova najpomembnejša vloga je prenos kisika iz pljuč do tkiv in odvajanje ogljikovega dioksida, ki nastane ob celičnem dihanju. Zaradi odsotnosti citoplazemskih organelov (jedro, mitohondriji in ribosomi) v eritrocitih ne nastajajo novi proteini, ni reakcij dihalne verige ter procesa delitve celic z mitozo.

V mirujočem stanju ima normalni eritrocit obliko sploščene krogle, poglobljene na nasprotnih dveh delih – ima obliko bikonkavnega diska (Slika 1). Povprečni celični volumen pri zdravih osebah je $85 - 91 \mu\text{m}^3$. Okoli 95 % normalnih eritrocitov ima volumen med 60 in $120 \mu\text{m}^3$ in povprečni premer od 7,2 do 7,4 μm (Wiggers, 2003).

Življenjska doba eritrocitov je omejena. V povprečju živi posamezen eritrocit v krvnem obtoku le okrog 120 dni. Ostareli eritrociti se nalagajo v vranici, kjer jih makrofagi razgradijo. Železo iz hemoglobina se reciklira in porabi pri sintezi novih molekul hemoglobina (Halliwell in Gutteridge, 1999).



Slika 1. Slika humanih eritrocitov s prepoznavno bikonkavno obliko. Znotrajcelični hemoglobin daje eritrocitom značilno rdečo barvo (Red Blood Cells, 2006).

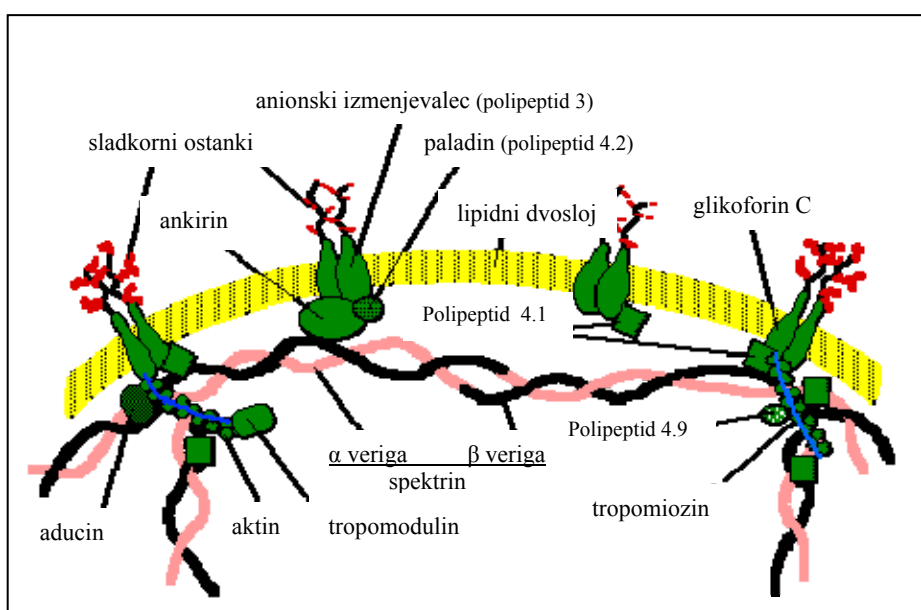
Sestava nepoškodovanih eritrocitov je naslednja (Yawata, 2003):

- voda ($721 \pm 17 \text{ mg/mL}$ eritrocitov),
- proteini (371 mg/mL eritrocitov),
- hemoglobin (335 mg/mL eritrocitov ali 280 milijonov molekul Hb na celico),
- lipidi ($5,1 \text{ mg/mL}$ eritrocitov) in
- ogljikovi hidrati (80 mg/mL eritrocitov).

Več kot 95 % vseh proteinov eritrocita je odgovornih za prenos kisika (hemoglobini). V

citrosolu so prisotni tudi glikolitični encimi za pridobivanje energije, saj je prav vzdrževanje nativne oblike eritrocita energijsko zelo zahteven proces (Yawata, 2003).

Citoskeletno mrežo eritrocitov, odgovorno za vzdrževanje nativne oblike celice, sestavlja preplet proteinskih molekul spektrina in aktina. Nahaja se na citosolni strani tik pod lipidnim dvoslojem. Povezavo celične membrane in citoskeletnih proteinov omogočajo sidrni proteini (ankirin in polipeptid 4.2), ki povežejo spektrine in aktin s citoplazemsko domeno anionskega izmenjevalca AE1 (ang. *anion exchanger 1*) in glikoforinov (Slika 2) (Yawata, 2003).



Slika 2. Topografska lokalizacija membranskih proteinov humanega eritrocita in njihove povezave (Capretta, 2005).

2.2 OBLIKA ERITROCITA

Nenavadna bikonkavna, diskasta oblika eritrocitov sesalcev je vse od odkritja mikroskopa vzbujala zanimanje številnih raziskovalcev z različnih področij, od teoretične fizike do klinične medicine. Značilna oblika zrelih eritrocitov sesalcev temelji na statičnih in dinamičnih lastnostih plazemske membrane, na katere vplivajo kemijska sestava, molekulska razporeditev in fizikalne lastnosti glavnih komponent membrane, torej lipidov in proteinov.

Oblika eritrocitov je prilagojena njihovi najpomembnejši funkciji - prenosu kisika iz pljuč do tkiv. Ugodno razmerje med velikostjo površine eritrocita in njegovo prostornino

omogoča olajšan prenos plinov (kisika in ogljikovega dioksida) skozi celično membrano ter lažje premikanje eritrocitov po krvnem obtoku. V vranici so namreč reže med endotelijskimi celicami ozke. Eritrociti se ob prerivanju skozi reže občutno deformirajo, a se kmalu po prehodu povrnejo v prvotno normalno obliko, ne da bi se ob tem izgubila njihova integriteta. Pravimo, da so eritrociti dobro deformabilni. Sposobnost spreminjanja nativne oblike jim omogoča tudi lažje premikanje po kapilarah, navkljub visokemu nativnemu hematokritu (okoli 44 %) (Deuticke, 2003; Yawata, 2003).

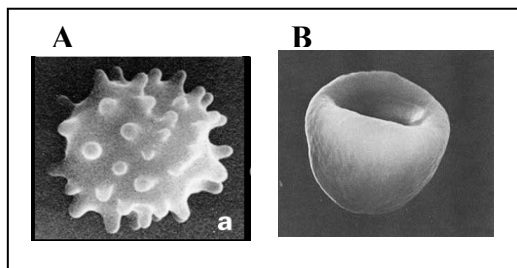
2.2.1 Sprememba bikonkavne oblike eritrocitov

Spremenjena oblika eritrocitov je lahko posledica dejavnikov, ki so vzrok ali povod sprememb v celičnem volumnu, ali posledica sprememb oblike v odsotnosti celičnih volumskih sprememb (Deuticke, 2003).

V fizioloških pogojih eritrociti vzdržujejo nekroglasto, nativno bikonkavno obliko. Predpogoj vseh nekroglastih celic je prebitek celične površine, ustvarjen z aktivnim izčrpavanjem ionov in vode. Količina znotrajcelične tekočine je edini citoplazemski parameter, ki neposredno določa celični volumen normalnih eritrocitov sesalcev. Ostale sestavine citoplazme, kot so ATP, kationi ali H^+ , ga določajo posredno, bodisi z nadzorom mehanizmov za vzdrževanje celičnega volumna ali z modifikacijo celične membrane.

Povečevanje celičnega volumna ob nespremenjeni velikosti celične površine ali zmanjšanje površine celice ob nespremenjenem znotrajceličnem volumnu vodi do izgube značilne bikonkavne oblike eritrocita. Končni rezultat obeh procesov je privzem **sferocitne (kroglaste) oblike** eritrocitov (Deuticke, 2003).

Drugi tip sprememb oblike eritrocitov je posledica dejavnikov, ki ne spremenijo znotrajceličnega volumna. Oblikovne spremembe tega tipa so posledica strukturne modifikacije celične membrane. Tovrstne modifikacije oblike včasih vodijo do sprememb v celičnem volumnu, kar razmejuje opisano razdelitev oblikovnih sprememb. Predstavnici tega tipa sprememb oblike sta **ehinocitna in stomatocitna oblika**, imenovani tudi bodičasta in čašasta oblika (Slika 3) (Deuticke, 2003).



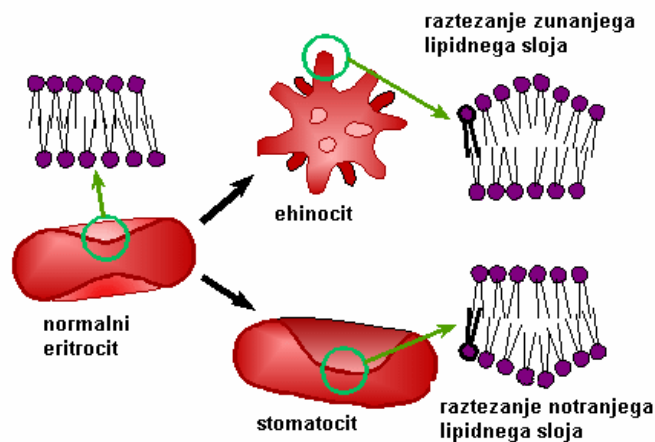
Slika 3. A: Ehinocitna ali bodičasta oblika humanega eritrocita (Biomembranes, 2004).
B: Stomatocitna ali čašasta oblika humanega eritrocita (Kimzey in sod., 2002).

2.2.1.1 Model sklopljenega lipidnega dvosloja

Pojav ehinocitnih in stomatocitnih oblik eritrocita razlaga hipoteza t.i. **sklopljenega lipidnega dvosloja** (ang. *bilayer couple hypothesis*), ki sta jo postavila Sheetz in Singer (1974). Hipoteza razlaga pojav različnih celičnih oblik kot posledico različne razširitve lipidnih slojev, npr. zaradi vgradnje tujih molekul v posamezno plast dvosloja. Lipidna sloja sta povezana s hidrofobnimi interakcijami, ki ju držijo skupaj. Pravimo, da sta sloja sklopljena. Ob razširitvi zunanje plasti dvosloja oz. skrčenju notranjega lipidnega sloja, nastane bodičast eritrocit oz. **ehinocit** (Slika 3A, Slika 4). In obratno, ob razširitvi notranjega lipidnega sloja pride do upogibanja membrane in nastanka čašaste oblike eritrocita oz. nastanka **stomatocita** (Slika 3B, Slika 4). V splošnem hipoteza predvideva, da se bodo spremembe v razmerju med notranjo in zunanjo površino lipidnega sloja izrazile v spremenjeni obliki eritrocitov - bodisi v ehinocitni ali stomatocitni obliki.

Po tem modelu lahko vse snovi, ki se vgrajujejo v lipidno membrano, spremenijo obliko eritrocita. Kationske spojine se zlahka kopičijo v notranjem negativno nabitem sloju, anionske spojine pa v zunanjem nevtralnem sloju. Klorpromazin, vinblastin, saponin, etanol, Ca^{2+} , idr. so znani povzročitelji ehinocitoze. Stomatocitne oblike pa povzročajo lecitin, holična kislina, Triton-X, idr. Obliko lipidnega dvosloja eritrocitov znatno spremeni že majhna sprememba v velikosti notranje ali zunanje površine sloja (manj kot 0,4 %) (Sheetz in Singer, 1974; Deuticke, 2003; Yawata, 2003).

Model sklopljenega lipidnega dvosloja je zelo popularen in predstavlja osnovo mnogim novejšim hipotezam o pojavu ehinocitnih in stomatocitnih oblik (Gimsa in Ried, 1995; Gedde in Heustis, 1997; Gimsa, 1998; Glaser, 1998; Rasia in Bollini, 1998; Tachev in sod., 2004; Betz in sod., 2006).



Slika 4. Shematska predstavitev hipoteze sklopljenega lipidnega dvosloja (Helmkamp, 2003). Vijolične krogle z dvojnimi repi predstavljajo fosfolipide lipidnega dvosloja membrane celice. Sprememba v obliki eritrocita je po hipotezi Sheetza in Singerja posledica diferencialne razširitve notranjega ali zunanega lipidnega sloja. Razširitev zunanega lipidnega sloja, glede na notranji lipidni sloj, spremeni normalno diskasto obliko eritrocita v ehinocitno obliko. Obratno, razširitev notranjega sloja vodi v nastanek stomatocitnih oblik.

2.3 VZDRŽEVANJE VOLUMNA ERITROCITOV

Za vzdrževanje konstantnega volumna so celice razvile mnogo regulatornih mehanizmov. Ob vsaki najmanjši spremembi celičnega volumna se ti mehanizmi aktivirajo in uravnajo volumen na normalno velikost. V citosolu eritrocitov se nahajajo anionske makromolekule (proteini, organski fosfati, idr.), ki jih membrana ne prepušča. Te molekule ustvarjajo osmotski tlak oz. Donnanov efekt. Ob nenadni spremembi zunajcelične ali znotrajcelične osmolarnosti, pasivni transmembranski tok vode povzroči nabrekanje ali krčenje eritrocitov. Vzpostavitev normalnega volumna se zagotavlja s transportom ionov skozi ionske kanalčke ali s pomočjo ionskih prenašalcev. S tem se vzpostavi usmerjen tok vode, ki uravna volumen celice na normalno velikost (Sardini in sod., 2003).

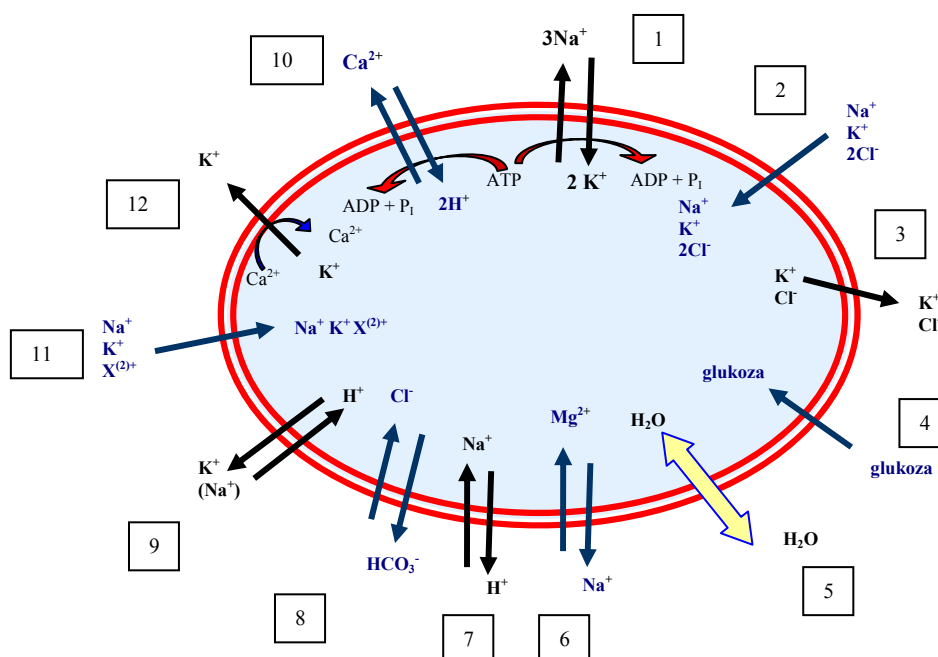
V hipotoničnem mediju začnejo eritrociti nabrekati. To je signal za vključitev mehanizmov za zmanjšanje celičnega volumna t.i. **regulatorno zmanjšanje celičnega volumna ali RZV**. Mehanizem RZV deluje dokler se celični volumen ne približa normalni, optimalni velikosti. Krčenje eritrocitov (npr. v hipertoničnem mediju) aktivira drug niz mehanizmov za povečevanje celičnega volumna do normalne velikosti t.i. **regulatorno povečanje celičnega volumna ali RPV** (Lang in sod., 1998).

2.3.1 Membranski transport ionov v eritrocitih

Ena od značilnosti celic sesalcev je neenakomerna in neravnovesna porazdelitev anorganskih ionov preko celične membrane. Taka porazdelitev je bistvena za normalno uravnavanje celičnih metabolnih procesov in procesov prenosa signalov. Vzdrževanje znotrajceličnih koncentracij kationov, kot tudi celičnega volumna, temelji na uravnoteženem delovanju aktivnih in pasivnih transportnih procesov.

Koncentracije kationov v znotrajcelični raztopini eritrocitov in krvni plazmi so različne. V krvni plazmi zdravih ljudi prevladujejo ioni Na^+ (140 mM), sledijo ioni K^+ (5 mM) ter Ca^{2+} (1.5 mM). V znotrajcelični raztopini eritrocita so koncentracije teh ionov drugačne, prevladujejo ioni K^+ (140 mM), sledijo ioni Na^+ (10 mM) in Ca^{2+} (60 nM) (Apps in sod., 1992). Za vzdrževanje normalnih transmembranskih ionskih gradientov in stalnega celičnega volumna so v membrani eritrocita posebni sistemi (Yawata, 2003), to so:

- membranske črpalke za aktivno izčrpavanje ionov,
- prenašalci za prenos topljencev skozi membrano in
- ostali kanalčki (vodni kanalček, Gárdosev kanalček in neselektivni kationski kanalčki).



Slika 5. Shema nekaterih transportnih poti v membrani humanega eritrocita: 1 Na^+ - K^+ črpalka, 2 Na^+ - K^+ - 2Cl^- kotransporter, 3 K^+ - Cl^- kotransporter, 4 glukozni prenašalec, 5 vodni kanalček (AQP-1), 6 $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ izmenjevalec, 7 Na^+/H^+ izmenjevalec, 8 anionski ($\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$) izmenjevalec AE1, 9 $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ izmenjevalec, 10 Ca^{2+} -črpalka, 11 neselektivni napetostni kationski kanalček in 12 Gárdosev kanalček. Prikazane so preferenčne smeri transporta ionov (Bernhardt in Weiss, 2003: 84; Maher in Kuchel, 2003: 1184).

2.3.1.1 Membranske črpalke

Znani sta dve od ATP odvisni kationski črpalke, ki v notranjosti celice vzdržujeta nizke koncentracije Na^+ in Ca^{2+} ter visoke koncentracije K^+ .

Ena je Na^+/K^+ -ATPaza ali Na^+/K^+ -črpalka (Slika 5 (1)). Ta izčrpava ione Na^+ iz celice v zameno za K^+ , in sicer v razmerju 3 : 2 (Sachs, 2003). Na^+/K^+ -ATPaza z izčrpavanjem Na^+ uravnava celični volumen, vendar le ob manjših spremembah prepustnosti celične membrane. Ob večjih spremembah prepustnosti (3 do 4-krat) pride do hemolize (Martinov in sod., 1999).

Druga je od Mg^{2+} odvisna Ca^{2+} -ATPaza (Slika 5 (10)). Njeno delovanje nadzira Ca^{2+} -vezavni protein, kalmodulin. Z aktivnim izčrpavanjem ionov Ca^{2+} s to črpalko se vzdržuje izredno nizka koncentracija ionov Ca^{2+} v celici (okoli 60 nM). Povišane znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} namreč vodijo do ehinocitogene deformacije membrane, proteolize, dehidracije in znižane deformabilnosti eritrocitov (Yawata, 2003).

Obe črpalke v humanih eritrocitih ustvarjata glavne gradiente kationov skozi membrano in zagotavljata integriteto ter normalno preživetje eritrocitov. Črpalke za delovanje porabljata energijo hidrolize adenozijskih nukleotidov (ATP), pri čemer vir energije predstavlja glukoza, ki se v celico prenese preko posebnega prenašalca (glukoznega transporterja, Slika 5 (4)) brez porabe energije (Yawata, 2003).

2.3.1.2 Prenašalci ionov skozi membrano eritrocita

Večina celic se v nekaj sekundah odzove na nenadno nabrekanje oz. krčenje celic, tako da aktivirajo membranske prenašalce. V membrani eritrocitov najdemo naslednje prenašalce ionov:

- K^+/Cl^- kotransporter,
- $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransporter,
- $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ izmenjevalec,
- $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ izmenjevalec,
- anionski izmenjevalec (AE1) in
- Na^+/H^+ izmenjevalec.

Vloga in delovanje nekaterih prenašalcev v eritrocitih še ni jasna. Obstajajo pa o tem hipoteze, podrobneje predstavljene v delu Bernhardta in Elloryja (2003).

V procesu vzdrževanja celičnega volumna eritrocitov imajo največjo vlogo $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ in K^+/Cl^- kotransporterji, ki so del mehanizma homeostaze znotrajceličnega volumna.

Osmotsko krčenje celic vzpodbudi mehanizme sprejema ionov (RPV) preko $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ kotransporterja (NKCC) (Slika 5 (2)), Na^+/H^+ izmenjevalca (Slika 5 (7)) ali drugih Na^+ kanalčkov. Ob osmotskem nabrekanju pa se aktivirajo mehanizmi odstranjevanja ionov iz celice (RZV) preko $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ kotransporterjev (KCC) (Slika 5 (3)) ali ločenih K^+ in Cl^- kanalov (Lang in sod., 1998; Gibson in Ellory, 2003; Lytle, 2003).

Nekateri prenašalci so aktivni samo v določeni fazi razvoja celice ali samo v nekaterih bolezenskih stanjih. Vloga Na^+/H^+ izmenjevalca je v uravnavanju vrednosti pH citosolne raztopine (Apps in sod., 1992). Njegova aktivnost je največja v zgodnji fazi zorenja eritrocitov, kasneje pa se zmanjša (Yawata, 2003). Tudi aktivnost $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ kotransporterja je večja v mlajših eritrocitih. Z zorenjem celic pa preneha delovati, a se lahko še vedno aktivira ob povečanem hidrostatskem tlaku ali ob spremenjenem redoks stanju celice in tako povzroči skrčenje celice (Teti in sod., 2005). Pri eritrocitih, ki nosijo HbS (spremenjena oblika hemoglobina zaradi mutacije v beta verigi globina), je kotransport $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ povečan, delno zaradi neposredne interakcije kotransporterja z mutirano obliko hemoglobina (Gibson in Ellory, 2003).

Eritrociti sesalcev s starostjo izgubijo sposobnost regulacije svojega celičnega volumna, čeprav imajo v membrani še prisoten $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ kotransporter, ki se aktivira ob nabrekanju celic. Izpostavljenost dolgotrajnemu osmotskemu stresu (npr. eritrociti v destilirani vodi), povzroči pospešeno pokanje celic. Drži pa, da imajo eritrociti v membrani prisotne črpalke in prenašalce ionov, ki omogočajo njihovo preživetje ob kratkotrajnih osmotskih stresih, kot na primer po prehodu skozi hipertonično sredico ledvic (Yawata, 2003).

2.3.1.2.1 Anionski izmenjevalec AE1

AE1 (Slika 5 (8)) je eden večjih integralnih proteinov v celicah eritrocitov, poznan po imenu anionski izmenjevalec-1 (AE1). Je transmembranski glikoprotein in predstavlja od 20 do 30 % teže vseh membranskih proteinov. Membrana posameznega eritrocita vsebuje okrog 1.2×10^6 kopij AE1. Njegova transmembranska domena posreduje izmenjavo znotrajceličnega HCO_3^- za zunajcelični Cl^- .

Bikarbonat (HCO_3^-) nastane iz CO_2 ob posredovanju encima karbonske anhidraze v eritrocitu. AE1 prenaša nastali HCO_3^- iz eritrocitov v krvno plazmo v zameno za Cl^- . Ob ionizaciji H_2CO_3 nastane poleg HCO_3^- še H^+ , ki se veže na hemoglobin (Bohrov efekt), kar olajša sproščanje kisika s hemoglobinskih molekul. V pljučih se iz HCO_3^- tvori CO_2 , ki se z izdihanjem izloči iz telesa. Na ta način se prenese okoli 60 % CO_2 iz tkiv v pljuča in izloči iz telesa.

Izmenjava anionov poteka po mehanizmu ping-pong. Znotrajcelični anion vstopi v

transportni kanal in se prenese na zunanjo stran, kjer se sprostí s kanalčka v zunajcelični prostor. Kanal ostane v odprti konformaciji, dokler se nanj ne veže zunajcelični anion in sproži obraten cikel. Izmenjava poteka hitro, povprečno v času 50 ms za ion klorida in bikarbonata. Kanal ni specifičen, preko njega se lahko prenesejo še drugi, večji ioni (sulfat, fosfat, fosfoenolpiruvat in superoksid) ter anionski kompleksi ionov težkih kovin (Yawata, 2003).

Oksidativni in osmotski stres zmanjšata delovanje AE1. Snovi, ki oksidirajo tiolne (-SH) skupine, prečno povežejo molekule AE1 in zmanjšajo vsebnost tiolnih skupin na integralnih proteinih v eritrocitni membrani. Sprememba v celičnem redoks stanju aktivira K^+ -Cl⁻ kotransporterje, kar vodi v skrčenje eritrocitov. Skrčenje celic, tudi ob osmotskem stresu, inhibira delovanje tirozinske fosfataze in aktivira tirozinsko kinazo, kar poveča nivo fosforiliranega AE1. Zmanjšana aktivnost AE1 je torej posledica bodisi spremenjene strukture AE1 zaradi oksidacije tiolnih skupin ali povečane fosforilacije tirozinskega ostanka na kanalčku (Teti in sod., 2005).

2.3.1.3 Ostali kanali

V celicah eritrocitov najdemo še druge kanale, kot so vodni kanalček ali akvaporin-1 (AQP-1), od Ca^{2+} odvisni K^+ -kanalček (Gárdosev kanalček) in neselektivni kationski kanalčki (NSC).

2.3.1.3.1 Vodni kanalček

Vodni kanalček ali akvaporin-1 (AQP-1) (Slika 5 (5)) je konstitutivno odprt, osmotsko reguliran, močno selektiven membranski kanalček, specifičen zgolj za prenašanje molekul vode. Vsi ostali nenabiti topljenci in ioni, vključno z ioni H^+ (oz. H_3O^+), ne morejo prečkati kanala. Prav neprepustnost za H^+ je nujna za vzdrževanje membranskega potenciala bioloških membran, kar je bistvenega pomena za bioenergetiko celic.

V membrani eritrocitov sesalcev se nahaja eden od predstavnikov številne družine akvaporinov, akvaporin-1 (AQP-1). Membrana posameznega eritrocita vsebuje okrog 120.000 do 160.000 monomernih kopij akvaporinov, ki sicer nastopajo v tetramernih skupkih. AQP-1 se nahaja tudi v drugih membranah specializiranih epitelnih celic (Browning in Wilkins, 2003).

V ožini kanalčka akvaporina je tiolna skupina (na aminokislinskem ostanku Cys 189) dovzetna za inhibicijo z živosrebrovimi spojinami. Znano je, da organske živosrebrove spojine, z vezavo Hg^{2+} na Cys 189, popolnoma blokirajo kanalček akvaporinov, vendar inhibicija ni specifična. V strukturi AQP-1 so namreč prisotne še tri druge za Hg^{2+}

dostopne tiolne skupine. Od živosrebrvih spojin sta *p*CMB (*p*-kloromerkuribenzoat) in *p*-CMBS (*p*-kloromerkuribenzen sulfonat) edina znana učinkovita inhibitorja delovanja AQP-1 (Browning in Wilkins, 2003).

2.3.1.3.2 Gárdosev kanalček

Obstoj od Ca^{2+} odvisne transportne poti ionov K^+ skozi t.i. K^+ -kanalčke je prvi dokazal G. Gárdos (Gárdos, 1958), po katerem kanalček sedaj nosi ime. Ta kanalček se ob povečani citosolni koncentraciji Ca^{2+} aktivira in prepušča ione K^+ iz eritrocita (Slika 5 (12)). Predvideva se, da je v membrani eritrocita prisotnih od 100 do 200 kopij tega kanalčka. Njegovo delovanje uravnava kalpromotin in ciklični adenzin monofosfat (cAMP) (Bennekou in Christophersen, 2003). V zrelih eritrocitih predstavljajo ti kanalčki najbrž pasivni mehanizem uravnave celičnega volumna, ki je učinkovitejši od delovanja Na^+ - K^+ -črpalke (Martinov in sod., 1999).

Na vse štiri podenote citoplazemske domene kanalčka naj bi bil tesno vezan protein kalmodulin, ki veže Ca^{2+} . Konformacijska sprememba kanalčka, ki nastane ob vezavi Ca^{2+} , odpre kanalček za K^+ . Ca^{2+} poveča prepustnost Gárdosevega kanalčka za K^+ tako, da poveča frekvenco odpiranja kanalčka, ne podaljša pa časa odprtosti kanala. Ni še znano, ali je za aktivacijo kanalčka dovolj eden ali dva iona Ca^{2+} (Maher in Kuchel, 2003).

V fizioloških pogojih, in v mediju brez ionov K^+ , je Gárdosev kanalček zaprt, saj se znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} vzdržuje na zelo nizkem nivoju (60 nM) zaradi stalnega izčrpavanja ionov Ca^{2+} s Ca^{2+} -črpalko. Povečana znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} je namreč lahko signal za spremenjeno prepustnost membrane. Takrat se v času nekaj sekund odzovejo od Ca^{2+} odvisni Gárdosevi K^+ -kanalčki, ki z iztokom ionov K^+ preprečijo osmotsko nabrekanje celic.

Divalentni ioni kovin so znani aktivatorji Gárdosevega kanalčka. Najmočnejši aktivator je Ca^{2+} , sledijo mu Pb^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} in Ba^{2+} . Ostali ioni, kot so Co^{2+} , Fe^{2+} in Zn^{2+} , ne izzovejo aktivacije kanalčka (Cao in Houamed, 1999; Maher in Kuchel, 2003). Znano je, da Ca^{2+} in Pb^{2+} tekmujeta za vezavno mesto na znotrajcelični domeni kanalčka (Bennekou in Christophersen, 2003).

Za krčenje srpastih eritrocitov (eritrociti, ki nosijo mutirano obliko hemoglobina) je v večji meri odgovoren Gárdosev kanalček, ki s krčenjem celice vzpodbuja polimerizacijo hemoglobina. V takih pogojih se aktivira Na^+/H^+ izmenjevalec (Slika 5 (7)), ki je del RPV, in naj bi skušal izničiti učinke krčenja celice (Lang in sod., 1998).

2.3.1.3.3 Neselektivni kationski kanalčki (NSC)

Poleg Gárdosevega kanalčka se v membrani eritrocitov nahajajo tudi neselektivni kationski kanalčki (NSC), katerih obstoj je bil do nedavnega sporen (Huber in sod., 2001). Predvideva se, da posamezen eritrocit vsebuje okoli 300 kanalčkov NSC, ki so aktivni ob krčenju in inhibirani ob nabrekanju celice, ali ob povečanem koncentracijskem nivoju znotrajceličnega Cl^- . Kanalček NSC je prepusten za Ca^{2+} in se aktivira s prostaglandinom E_2 (PGE_2), podobno kot Gárdosev kanalček. Fiziološka vloga NSC kanalčkov je verjetno v skupnem delovanju z Gárdosevim kanalčkom v procesu strjevanja krvi (Kaestner in Bernhardt, 2002; Bennekou in Christophersen, 2003).

2.4 APOPTOZA ERITROCITOV

Eritrociti imajo omejeno življenjsko dobo, zato mora imeti organizem razvit mehanizem za odstranjevanje starejših ali okvarjenih eritrocitov, saj lahko nekontrolirana hemoliza in sproščanje celične vsebine eritrocitov v krvno plazmo sproži vnetne procese. V drugih celičnih tipih je programirana celična smrt (apoptoza) primarni mehanizem odstranjevanja celic, za katerega je značilna aktivacija kaskade kaspaz (cisteinske proteaze, ki so specifične za aspartatne ostanke). Obstajata dve glavni poti aktivacije kaspaz. Ena je odvisna od sodelovanja mitohondrijev in druga od interakcije med receptorjem smrti in njegovim ligandom. V končni fazi obe poti vodita do aktivacije kaspaz in posledične cepitve specifičnih substratov v celici, kar se odraža na biokemijskih in morfoloških lastnostih celice (Zimmermann in sod., 2001).

Do nedavnega je veljala domneva, da pri eritrocitih apoptoza ne obstaja, ker je ta proces vezan na mitohondrije in jedro, torej na organele, ki jih eritrocit nima. Čeprav vsebuje eritrocit nekatere kaspaze, se le-te v zrelem eritrocitu nikoli ne aktivirajo (Berg in sod., 2001). Znano je, da ionomicin (Ca^{2+} -ionofor) v eritrocitih sproži proces podoben apoptozi. Eritrociti se pričnejo krčiti, na membrani se pojavljajo mikrovezikli, bikonkavna oblika eritrocita se spremeni v sferocitno, opazne so spremembe na citoskeletu zaradi razpada proteinov (spektrinov) in poruši se asimetrija fosfatidilserina v celični membrani. Nekateri ta proces imenujejo **eriptoza**, ker se apoptoza eritrocitov zaradi odsotnosti organelov razlikuje od apoptoze drugih celic (Bratosin in sod., 2001; Lang in sod., 2003a).

2.4.1 Znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} in asimetrija sestave lipidnega dvosloja

Pomemben signal za pričetek apoptoze eritrocitov je povečana znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} . Ca^{2+} vstopi v eritrocite preko kationskih kanalčkov, ki se aktivirajo po osmotskem šoku, bodisi zaradi povečane zunajcelične osmolarnosti, po oksidativnem stresu ali po

izpraznitvi energijskih zalog. Povišan nivo Ca^{2+} v celici je lahko tudi signal spremenjene prepustnosti celične membrane zaradi ostarelosti ali okvare eritrocitov. Aktivacija kationskih kanalčkov vodi v razpad nativne asimetrije fosfatidilserina (PS) in posledično do fagocitoze (Bratosin in sod., 2001; Lang in sod., 2003a). Ca^{2+} lahko spremeni diskocitno obliko eritrocitov v ehinocitno in povzroči sproščanje mikroveziklov z vrha bodic ehinocitov, kot so pokazali poskusi narejeni *in vitro* na membranah eritrocitov (Deuticke, 2003).

Nativno asimetrijo sestave lipidnega dvosloja vzdržujejo različni encimi. Največji delež fosfolipidov PS in PE najdemo v notranjem lipidnem sloju. Povečana znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} aktivira encim *skramblazo*, ki začne premeščati molekule PS na zunanji lipidni sloj, kjer naj bi bile prisotne le v manjšem številu. Makrofagi se z receptorji za prepoznavo molekul PS vežejo na izpostavljene zunajcelične skupine PS eritrocitov, čemur sledi fagocitoza, torej prevzem in razgradnja eritrocita v notranjosti makrofaga. Na ta način se iz organizma odstranjujejo ostareli, nefunkcionalni eritrociti (Yawata, 2003).

2.4.2 Vloga Gárdosevega kanalčka v apoptozi

Znano je, da se pri apoptozi izgubljajo ioni K^{+} iz celice. Zmanjševanje znotrajcelične koncentracije K^{+} pa ni samo posledica iztoka K^{+} , ampak tudi inhibicije vnosa K^{+} v celico z $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPazo}$. V anizotoničnih pogojih celica hitro (v nekaj sekundah) spremeni svoj volumen. Pri apoptozi pa se volumen zmanjšuje počasi (več minut) in se nikoli več ne povrne na normalno velikost. Nepovratno zmanjševanje celičnega volumna je značilnost apoptoze. Ko se proces apoptoze začne, se izvrši do konca. Vprašanje je, ali so mehanizmi za uravnavanje celičnega volumna med apoptozo inhibirani ali pa aktivni, a jih močnejši signal celične smrti zakriva (Bortner in sod., 1998; Bortner in Cidlowski, 2002).

Krčenje celice in izguba ionov Cl^{-} iz celice sproži sintezo prostaglandina E_2 (PGE_2) iz membranskih fosfolipidov. PGE_2 stimulira neselektivne kationske kanale (NSC) in poveča vstop Ca^{2+} v celico, kar stimulira skramblazo in premeščanje molekul PS na zunanji lipidni sloj celice. Povečana znotrajcelična koncentracija prostega Ca^{2+} aktivira tudi od Ca^{2+} odvisno proteazo, μ -kalpain, ki razgradi komponente citoskeleta. Površina celične membrane je zato videti nagubana oz. mehurčkasta (Lang in sod., 2005).

2.5 DELOVANJE IONOV Hg^{2+} , Pb^{2+} IN Cd^{2+} NA MOLEKULSKEM NIVOJU

2.5.1 Toksičnost Hg^{2+}

Elementarno živo srebro je dokaj inertno in netoksično. Se pa hitro oksidira v Hg^{2+} , ki lahko reagira s proteini in drugimi biološko pomembnimi molekulami. Hg^{2+} tvori relativno stabilne kovalentne vezi z ogljikom, zato ga najdemo tudi v organskih spojinah. Človek je živosrebrovim spojinam izpostavljen preko hrane (predvsem ribje) ter kozmetičnih in terapevtskih pripravkov, kot so zobna belila, antiseptiki in zobne plombe (Foulkes, 2001).

Skozi celično membrano eritrocita vstopajo ioni Hg^{2+} v elektronevtralni obliki, bodisi kot HgCl_2 ali $\text{Hg}(\text{OH})_2$ (Bragadin in sod., 2005). HgCl_2 se rad kopiči v lipidnem dvosloju in ima visoko afiniteto za primarne amino skupine fosfolipidov PS in PE. Posledično lahko spremeni fluidnost membrane ali izgubo njene integritete, kar v živčnih celicah vodi do nevrotoksičnosti (Girault in sod., 1997). V notranjosti celice pa reagira s številnimi molekulami, predvsem s tiolnimi (-SH) skupinami proteinov.

2.5.1.1 Inhibicija encimov in kanalčkov

Hg^{2+} reagira z vrsto bioloških molekul v krvi in tkivih, predvsem z vezavo na tiolne skupine proteinov. Tiolne skupine so zelo razširjene v aktivnih mestih encimov ter v ionskih in vodnih kanalčkih (glej 2.3.1.3.1) v celični membrani. Z vezavo na njihova aktivna mesta lahko ioni Hg^{2+} zavrejo njihovo delovanje. Na delovanje celičnih komponent vpliva tudi tvorba disulfidnih mostičkov (S-Hg-S), ki lahko povežejo oddaljene tiolne skupine proteinov in tako spremenijo konformacijo proteina. Topografska sprememba membranskih proteinov zaradi vezave ionov Hg^{2+} (ali Cd^{2+}) olajša fosforilacijo številnih proteinov, zlasti polipeptida 4.2 (glej 2.1), ki ima za Hg^{2+} največje število vezavnih mest. Polipeptid 4.2 se po obdelavi celične membrane z ioni Hg^{2+} poveže z mrežo spektrinov in fosforilira s proteinsko kinazo (Suzuki in sod., 1985). Ioni Hg^{2+} imajo visoko afiniteto še do aaminskih, fosfatnih in karboksilnih skupin.

2.5.1.2 Aktivacija Gárdosevega kanalčka s Hg^{2+}

Pred kratkim je skupina Floriana Langa (Eisele in sod., 2006) pokazala, da ioni Hg^{2+} aktivirajo Gárdosev kanalček neodvisno od Ca^{2+} ter stimulirajo izpostavitve fosfolipidnih molekul PS na zunanjo stran lipidnega dvosloja membrane eritrocitov. Povečano izhajanje ionov K^+ iz celice povzroči osmotsko izhajanje vode iz celice in s tem krčenje celice. Mehanizem regulativnega povečanja volumna (RPV) v normalnih pogojih povrne celični

volumen na normalno velikost. Izhajanje ionov K^+ iz celice je ena od značilnosti procesa apoptoze, vendar ni docela znana meja med učinkovitostjo mehanizma RPV in apoptoze.

2.5.2 Toksičnost Pb^{2+}

Onesnaževanje okolja s svincem postaja eden glavnih problemov sodobnega sveta. Znano je, da so za ljudi in ostale organizme škodljive že zelo nizke koncentracije svinca. Številne študije so pokazale, da svinec deluje toksično na proces hematopoeze, povzroča hipertenzijo, pa tudi neplodnost pri moških. V zadnjem času prihaja v ospredje raziskav njegova nevrotoksičnost. Do danes toksični učinek svinca na organizem še ni docela pojasnjen (Goyer, 2001; Baranowska-Bosiacka in sod., 2003).

Glavna vhodna pot svinca (Pb) v organizem je s hrano in vodo. Po vstopu v kri se okoli 96 % prostega svinca nahaja v eritrocitih. Nekaj ionov Pb^{2+} se veže na celično membrano (Suwalsky in sod., 2003), ostali pa vstopijo v celice skozi kanalček anionskega izmenjevalca (AE1) (Bannon in sod., 2000), najverjetneje v obliki $PbCO_3$ (Simons, 1986b) ali $(PbCO_3Cl)^-$ (Gimenez in sod., 1993). V znotrajceličnem prostoru se večina Pb^{2+} veže s tiolnimi skupinami znotrajceličnih proteinov in s hemoglobinom. Razmerje med vezanim in prostim Pb^{2+} v citosolu se ocenjuje na okoli 6000:1 (Simons, 1986a).

Toksični učinek svinca na eritrocite temelji na:

- sposobnosti tvorbe kompleksnih spojin s tiolnimi, karboksilnimi in imidazolnimi skupinami proteinov, zlasti encimov;
- kompetitivni vezavi ionov Pb^{2+} na vezavna mesta ionov Zn^{2+} in Mg^{2+} v encimih;
- pospeševanju reakcij z radikali.

2.5.2.1 Svinec inhibira številne encime

Ioni svinca in drugih kovin (Hg in Cd) imajo razmeroma visoko afiniteto za tiolne skupine. Inhibicija encimske aktivnosti v eritrocitih se nanaša predvsem na encime energijskega metabolizma (encimi glikolize in poti pentoze fosfata) (Lachant in sod., 1984). Izguba bikonkavne oblike, ki sledi, je posledica okvarjenega energijskega metabolizma (Baranowska-Bosiacka in Hlynczak, 2003), deloma tudi zaradi zmanjšane stopnje fosforilacije spektrina, citoskeletnega proteina odgovornega za izredno fleksibilnost celične membrane, ki je odvisna od citosolne koncentracije ATP (Belloni-Olivi in sod., 1996).

Okvarjena sinteza hema zaradi delovanja ionov Pb^{2+} je posledica inhibicije encima ALAD (citosolni encim dehidrataza δ -aminolevulinske kisline (ALA)), ki sodeluje pri sintezi

protoporfirinskega obroča hema v hemoglobinu (Goyer, 2001). Anemija, povzročena s svincem, ni le posledica okvarjene sinteze hema, temveč tudi hemolize. Svinec naj bi hemolizo povzročal posredno s povečanjem dovzetnosti eritrocitov za mehanski in osmotski stres (glej 2.5.4). K povečani krhkosti eritrocitov lahko ioni Pb^{2+} prispevajo tudi z inhibicijo $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaze}$.

2.5.2.2 Kompetitivna vezava ionov Pb^{2+} na encime

Pb^{2+} in nekateri drugi ioni lahko zamenjajo Ca^{2+} v Ca^{2+} -ATPazi membrane človeških eritrocitov in stimulirajo njeno delovanje. Ca^{2+} in Pb^{2+} tekmujeta za vezavno mesto na kalmodulinu (vezavnem proteinu za Ca^{2+}) na Ca^{2+} -črpalki, zato je ob prisotnosti ionov Ca^{2+} aktivni transport Pb^{2+} iz eritrocitov v celici zmanjšan (Simons, 1988; Campagna in sod., 2000).

V eritrocitih ioni Pb^{2+} aktivirajo encim skramblazo (glej 2.4.1). Delovanje skramblaze, ki je povečano v procesu apoptoze, vodi do fagocitoze. V proces apoptoze je vpletena tudi aktivacija Gárdosevih kanalčkov. Svinec je znan aktivator Gárdosevih kanalčkov v membrani eritrocita. Kompetitivna vezava iona Pb^{2+} na mesto Ca^{2+} aktivira kanalček in povzroči povečan iztok ionov K^+ iz celice. Sledi izhajanje vode na račun osmoze in eritrocit se skrči (Kempe in sod., 2005).

2.5.3 Toksičnost Cd^{2+}

Kadmij (Cd) je toksična kovina. Pri ljudeh povzroča levkemijo, raka pljuč, testisov in prostate (Jakubowski, 2001). Karcinogeni potencial te kovine se kaže v sprožitvi lipidne peroksidacije, ki je pomemben dogodek v procesu karcinogeneze (Karbownik in sod., 2001). V nukleiranih celicah povzroči transformacijo v tumorske celice predvsem preko genskih mutacij in pospešene celične rasti (Waisberg in sod., 2003).

Največji industrijski onesnaževalci zraka s Cd so talilnice, obrati za sežiganje plastike, obrati za proizvodnjo barvil ter metalurška industrija. Pomembni viri onesnaževanja zraka s Cd so tudi fosilna goriva in cestni promet. Atmosferski Cd je večinoma v obliki kadmijevega oksida in kadmijevega klorida. Pri nekadilski populaciji predstavlja hrana najbolj pomembno pot zastrupitve s Cd, saj ga tako rastline kot živali kopičijo v svojih tkivih. Pri kadilcih se s cigaretним dimom absorbira približno 50 % Cd, odvisno od velikosti in topnosti delcev v pljučih (Jakubowski, 2001).

2.5.3.1 Podobnost s Ca^{2+} in porušitev homeostaze Ca^{2+} v celici

Cd^{2+} in Ca^{2+} imata podobna ionska radija, elektronegativnost Cd^{2+} pa je podobna kot za Zn^{2+} . Te lastnosti mu omogočajo vstop v celico preko Ca^{2+} -kanalčkov (Hinkle in sod., 1987), kjer se lahko vpleta v številne fiziološke funkcije ionov Ca^{2+} in Zn^{2+} . V celice vstopa tudi preko anionskega izmenjevalca (AE1) v obliki anionskih kompleksov (Lou in sod., 1991). Kot Ca^{2+} tudi Cd^{2+} lahko aktivira Gárdosev kanalček (Cao in Houamed, 1999).

Homeostaza Ca^{2+} v celici in s Ca^{2+} povezane funkcije so zelo občutljive in kritične tarče delovanja toksičnih kovin. Znano je, da izpostavitve celic ionom Cd^{2+} poveča koncentracijski nivo znotrajceličnega Ca^{2+} (Misra in sod., 2002; Waisberg in sod., 2003). Cd^{2+} poveča znotrajcelično koncentracijo Ca^{2+} tako, da poveča prepustnost celične membrane za Ca^{2+} ali inhibira Ca^{2+} -črpalko. Ca^{2+} -črpalka ima na vezavnem mestu za Ca^{2+} tiolno skupino. Cd^{2+} omeji izločanje Ca^{2+} iz celice, zato ker tekmuje s Ca^{2+} za vezavno mesto na tem encimu (Verbost in sod., 1989; Benders in sod., 1997; Wätjen in sod., 2001).

Povečan znotrajcelični koncentracijski nivo Ca^{2+} lahko povzroči spremembo oblike eritrocita iz bikonkavne v ehinocitno. Tudi sam Cd^{2+} reagira s celično membrano in povzroči nastanek ehinocitov, tako da se vgradi v zunanji lipidni sloj celične membrane eritrocitov (Suwalsky in sod., 2004).

2.5.3.2 Vezava Cd^{2+} na tiolne skupine proteinov

Ioni Cd^{2+} imajo visoko afiniteto za tiolne skupine (-SH), a ne večje kot jo imajo ioni Hg^{2+} , sledi afiniteta za fosfatne skupine $((\text{RO})_2\text{P}(=\text{O})-\text{O}^-)$, kloride (Cl^-) in karboksilne skupine (RCOO^-). Vezava kadmija na tiolne skupine, ki jih najdemo predvsem v aktivnih mestih encimov, povzroči inaktivacijo encimov. Posledice so različne, od motenja sinteze nukleinskih kislin do motenja procesov oksidativne fosforilacije (Jakubowski, 2001). Tarče delovanja Cd^{2+} so tudi tiolne skupine na proteinih citoskeleta, ki so odgovorni za vzdrževanje oblike eritrocitov in za njihovo deformabilnost (Mojžiš in František, 2000).

2.5.4 Nastanek reaktivnih oblik kisika in oksidacija membranskih lipidov

Vsi trije obravnavani ioni kovin, Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+} , posredno pripomorejo k nastanku reaktivnih oblik kisika (ROS). Nastali radikali (hidroksilni radikali, superoksidni anioni, dušikov oksid in vodikov peroksid) reagirajo s fosfolipidi celične membrane. Oksidacija membranskih lipidov z ROS povzroči nastajanje rigidnih domen fosfolipidov na membrani, kjer je omogočena pospešena reakcija z radikali (Adonaylo in sod., 1999; Silbergeld, 2003). Hidroperoksidi lipidnih molekul v celični membrani pa oslabijo

hidrofobne povezave med sosednjimi fosfolipidi, kar olajša vstop vode v celico. Okvarjena funkcija in struktura membrane vodi v hemolizo eritrocitov (El-Missiry in Abou-Seifb, 2000). Razpadni produkti lipidnih hidroperoksidov, kot je malondialdehid, škodujejo celici, ker reagirajo s celičnimi membranskimi proteini in oslabijo strukturo membrane. ROS delujejo tudi kot mediatorji apoptoze v eritrocitih. Membrane eritrocitov so za lipidno peroksidacijo in toksičnost Cd^{2+} manj občutljive kot membrane drugih celic (Demir in Öner, 1995), kar ni presenetljivo spričo dejstva, da so eritrociti kot prenašalci kisika izpostavljeni vplivu tega oksidanta.

Splošen toksični učinek Hg^{2+} je sprememba v koncentraciji prostih znotrajceličnih tiolnih skupin, kar neposredno vodi do mnogih poškodb, kakršen je oksidativni stres. Oksidativni stres je posledica neravnovesja v nastajanju in odstranjevanju ROS v tkivih in celičnih komponentah. Do teh poškodb pride na celičnih membranah, DNK in proteinih (Hsu in Guo, 2002). Med tovrstne poškodbe sodita tudi lipidna peroksidacija in okvara mitohondrijev (Bucio in sod., 1995; Foulkes, 2001).

V prisotnosti hemoglobina ioni Pb^{2+} stimulirajo nastanek ROS. Reakcijo katalizirajo ioni železa (Fe^{2+}) iz hemoglobina. Poleg tega ioni Pb^{2+} inhibirajo encime, ki ščitijo celice pred oksidativnimi poškodbami z radikali. Ti encimi so: superoksidna dismutaza (SOD), katalaza, glutation peroksidaza (GPx) in glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD) (Goyer, 2001; Hsu in Guo, 2002).

Ioni Cd^{2+} lahko znižajo vsebnost celičnega glutationa, ki ščiti celice pred ROS, zmanjšajo aktivnost encimov SOD, glutationske peroksidaze in katalaze, porušijo homeostazo Ca^{2+} in spremenijo aktivnosti mnogih proteinskih kinaz (Sarkar in sod., 1998; Waisberg in sod., 2003; El-Demerdash in sod., 2004; Uchida in sod., 2004; Yano in Marcondes, 2005; López in sod., 2006; Pathak in Khandelwal, 2006).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

Raziskavo smo izvedli na človeških eritrocitih. Kri so darovali zdravi, mladi moški prostovoljci, in sicer za vsakokratno raziskavo po eden. Eritrocite smo izolirali iz sveže krvi, ki je bila predhodno obdelana z EDTA (etilendiamintetraacetat). V postopku izolacije in priprave vzorcev smo uporabljali pufre, sestavljene iz naslednjih kemikalij: NaCl (Kemika, Zagreb), tris (hidroksimetil) aminometan (TRIS HCl; Kemika, Zagreb), saharoza (Kemika, Zagreb). Vrednost pH pufrskih raztopin smo uravnavali z 1 M raztopino HCl (Kemika, Zagreb) in 1 M raztopino NaOH (Kemika, Zagreb).

Raztopino manganovega klorida ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Nemčija) smo uporabili za paramagnetno dopiranje zunajceličnega prostora vzorčnih suspenzij humanih eritrocitov pri NMR poskusih.

Vpliv ionov Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+} na volumske spremembe eritrocitov smo zasledovali ob dodatkih raztopin živosrebrovega klorida (HgCl_2) (Kemika, Zagreb), svinčevega acetata ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Kemika, Zagreb) in kadmijevega klorida (CdCl_2) (Kemika, Zagreb) pri več koncentracijah teh efektorjev v celičnih suspenzijah.

3.1.1 Priprava pufrov in drugih raztopin

Pripravili smo naslednje pufre:

1. izoosmotski pufer za eritrocite (130 mM NaCl, 30 mM saharoza, 20 mM TRIS HCl, pH 7.4);
2. hipoosmotski pufer za eritrocite (135 mM NaCl, 20 mM TRIS HCl, pH 7.4);
3. 40 mM raztopino MnCl_2 pripravljeno v ustreznem pufru za pripravo 10 mM koncentracije ionov Mn^{2+} v vzorcu (75 mM NaCl, 20 mM TRIS HCl, pH 7.4);
4. raztopino 8 mM HgCl_2 v hipoosmotskem pufru za eritrocite za pripravo 1 mM koncentracije ionov Hg^{2+} v vzorcu;
5. raztopino 0.8 mM $\text{Pb}(\text{acetat})_2$ v izoosmotskem pufru za pripravo naslednjih koncentracij ionov Pb^{2+} v vzorcu: 0.1 mM, 0.05 mM in 0.0125 mM;
6. raztopino 4 mM CdCl_2 v ustreznem pufru (124 mM NaCl, 30 mM saharoza, 20 mM TRIS HCl, pH 7.4) za pripravo naslednjih koncentracij ionov Cd^{2+} v vzorcu: 1 mM, 0.5 mM in 0.05 mM.

3.1.2 Priprava eritrocitov

V poskusu smo uporabljali sveže humane eritrocite. Odvzem krvi je bil strokovno izveden na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani, kjer so krvi dodali EDTA proti koagulaciji. V laboratorij smo jo prenesli v hladni posodi ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), kjer smo jo nadalje obdelali. Izolacijo eritrocitov smo izvedli na dan odvzema krvi.

Svežo kri smo centrifugirali 5 min pri 3500 obr./min, previdno odstranili supernatant (krvna plazma) in tanek bel sloj levkocitov. Usedlini smo dodali rahlo hipoosmotski pufer za eritrocite (310 mOsm) v razmerju 1:3 (v/v) ter eritrocite spirali trikrat. Zadnje spiranje smo izvedli z izoosmotskim pufrom (330 mOsm), prav tako v trikratnem volumnu. Z dna epruvete smo odvzeli gosto suspenzijo očiščenih eritrocitov in pripravili 40 % hematokrit, ki smo ga uporabili za pripravo vzorcev z 20 % hematokritom.

3.1.3 Priprava vzorcev

Vzorci smo pripravili tik pred meritvijo. Paramagnetni ioni Mn^{2+} lahko čez dalj časa (po več urah) začnejo prodirati skozi celično membrano eritrocita in tako kvariti razliko v NMR relaksaciji med diamagnetnim znotrajceličnim prostorom in zunajcelično paramagnetno raztopino. Po daljšem času meritve zato niso več zanesljive. Izbrani efektorski ioni (Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+}) so diamagnetni, zato ne vplivajo na NMR relaksacijo.

K 200 μl 40 % suspenzije eritrocitov smo dodali 100 μl 40 mM raztopine MnCl_2 ter 100 μl raztopine efektorja (Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+}), katerega vpliv na eritrocit študiramo. Tako je bila koncentracija Mn^{2+} ionov v vzorčni suspenziji vedno 10 mM, koncentracija efektorja pa 4-kratno razredčena glede na izhodno koncentracijo. Kontrolnim vzorcem smo namesto raztopine efektorja dodali izoosmotski pufer za eritrocite.

3.2 METODE

Učinke omenjenih efektorjev na eritrocit v odvisnosti od časa inkubacije smo študirali s t.i. T_2 -NMR metodo preko merjenja značilno dvoeksponencialne transverzalne (T_2) NMR relaksacijske funkcije protonov vode v vzorcih, ki se pod izoosmotskimi pogoji izmenjuje z difuzijo skozi membrano eritrocitov med diamagnetnim znotrajceličnim prostorom in paramagnetno označeno zunajcelično raztopino.

V nadaljevanju sledi teoretski opis, kako nam uporabljena NMR metoda omogoča določiti 2 parametra,

- časovno konstanto τ_{exch} za izmenjavo znotrajcelične vode ter
- razmerje V_{in}/V_{out} volumnov znotrajcelične (V_{in}) in zunajcelične (V_{out}) vode,

ki merita učinek danega efektorja na volumsko spremembo eritrocita v odvisnosti od časa delovanja efektorja.

3.2.1 Metoda pulzne jedrske magnetne resonance (NMR)

Z metodo pulzne jedrske magnetne resonance smo merili časovno konstanto τ_{exch} difuzijske izmenjave vode. τ_{exch} je prvenstveno določen s časovnim potekom položnega dela NMR transverzalne relaksacijske funkcije protonov molekul vode, ki se izmenjuje med znotraj- in zunajceličnim prostorom, slednjim paramagnetno označenim z Mn^{2+} . τ_{exch} je z difuzijsko vodno permeabilnostjo (P_d) eritrocitne membrane povezan z izrazom:

$$P_d = \frac{v}{s} \cdot \frac{1}{\tau_{exch}}, \quad \dots (1)$$

kjer je v volumen znotrajcelične vode posameznega eritrocita (okoli 70 % celotnega notranjega izoosmotskega volumna normalnega eritrocita), s zunanja površina eritrocita in τ_{exch} časovna konstanta difuzijske izmenjave vode skozi membrano eritrocita.

Za določevanje NMR transverzalne relaksacijske funkcije smo uporabili t.i. Carr-Purcell-Meiboom-Gillovo (CPMG) pulzno tehniko. Za razumevanje te metode so v nadaljevanju podane osnove pulzne NMR.

3.2.1.1 Teoretične osnove NMR

(povzeto po Becker in Farrar, 1971; Gadian, 1982; Lahajnar, 1990; 1992; Škof, 1998)

3.2.1.1.1 Kvantno mehanski opis jedrskih spinov

Temelj jedrske magnetne resonance (NMR) so magnetne interakcije jedrskih spinov. Po načelih kvantne mehanike zavzame spinska vrtilna količina, $\vec{p}$, le diskretne merljive vrednosti, ki so določene s spinskim kvantnim številom I :

$$\vec{p} = I\hbar . \quad \dots (2)$$

Velikost spinske vrtilne količine je podana z izrazom:

$$p = \hbar \left\{ I(I+1) \right\}^{\frac{1}{2}} , \quad \dots (3)$$

kjer je $\hbar = h/2\pi$, pri čemer je h Planckova konstanta ($h = 6.6 \cdot 10^{-34}$ Js).

Jedrsko spinsko kvantno število I , imenovano tudi spin jedra, je:

- celoštevilčno ($I = 1, 2, 3, \dots$), če gre za jedra s sodim masnim in lihim vrstnim številom (^2H , ^{14}N , ...),
- nič ($I = 0$), če gre za jedra s sodim masnim in sodim vrstnim številom (^{12}C , ^{16}O , ^{40}Ca , ...), ali
- lihi mnogokratnik $\frac{1}{2}$ ($I = 1/2, 3/2, 5/2, \dots$), če gre za jedra z lihim masnim številom (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ...).

Spinska vrtilna količina $\vec{p}$ je vektorske narave ter je določena z velikostjo in s smerjo. Njene merljive vrednosti so kvantizirane s kvantnim številom m , kar pomeni, da je projekcija spinske vrtilne količine v smeri osi z določena z izrazom:

$$p_z = m\hbar . \quad \dots (4)$$

Pri tem m lahko zavzame $2I + 1$ diskretnih vrednosti:

$$m = I, I-1, \dots, (-I+1), -I \quad \dots (5)$$

Zaradi jedrskega naboja imajo jedra z od nič različno spinsko vrtilno količino tudi jedrski magnetni moment $\vec{\mu}$, ki ima isto smer kot spinska vrtilna količina, njegova velikost pa je podana z izrazom:

$$\mu = \gamma \cdot p , \quad \dots (6)$$

kjer je γ giromagnetno razmerje, ki je značilna konstanta za dano vrsto magnetnega jedra.

Za NMR spektroskopijo v biologiji in biokemiji so najbolj zanimiva jedra s spinom $I = \frac{1}{2}$ (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ...), od katerih ima jedro vodika ^1H največje giromagnetno razmerje. Praviloma dajejo jedra s spinom $I = \frac{1}{2}$ (zaradi odsotnosti kvadrupolnega momenta) ozke resonančne črte in s tem omogočajo NMR spektroskopijo visoke ločljivosti.

3.2.1.1.2 Interakcija jedrskih spinov s statičnim magnetnim poljem

Če vzpostavimo statično magnetno polje H_0 vzdolž osi z , zaradi interakcije med tem poljem in jedrskim magnetnim momentom, jedro pridobi energijo E , katere velikost je podana z izrazom:

$$E = -\vec{\mu} \vec{H}_0 = -\mu_z H_0, \quad \dots (7)$$

pri čemer je μ_z komponenta jedrskega magnetnega momenta v smeri osi z zunanjega magnetnega polja.

Za zunanje magnetno polje $\vec{H}_0$, usmerjeno vzdolž smeri osi z , jedrskim spinskim stanjem z magnetnim kvantnim številom m ustrezajo naslednji energijski nivoji:

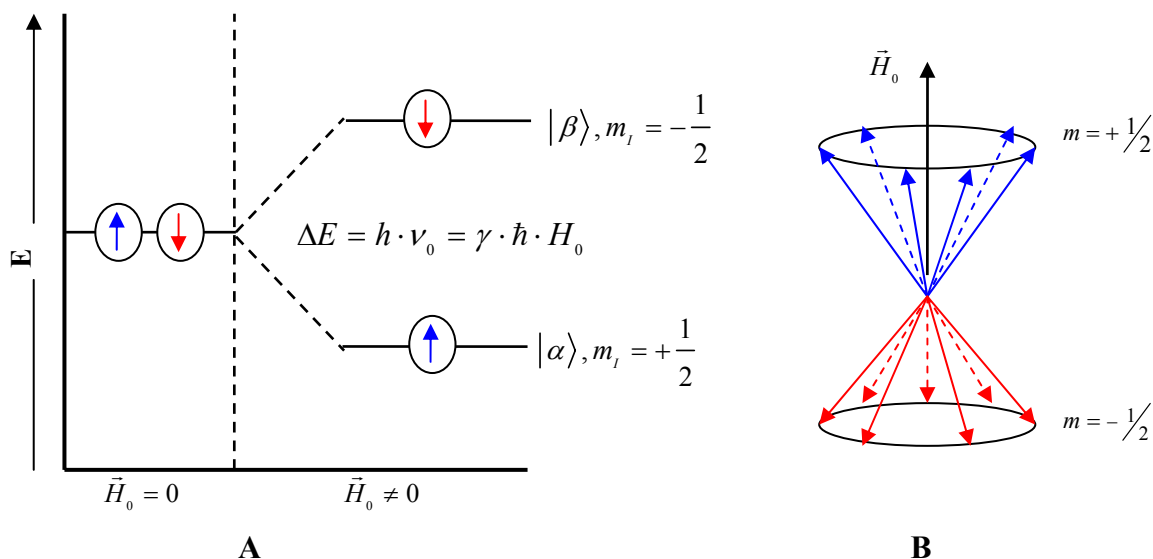
$$E_m = -\gamma \hbar H_0 m_I = -\gamma \hbar H_0 I_z, \quad \dots (8)$$

kjer je I_z dovoljena diskretna komponenta m_I v smeri osi zunanjega magnetnega polja $\vec{H}_0$. Ker m_I lahko zavzame le diskretne vrednosti izmed I , $I-1$, ..., $-I$, se jedrska energijska stanja cepijo v $2I + 1$ nivojev z medsebojnim energijskim razmakom:

$$\Delta E = \frac{\mu H_0}{I} = \gamma \cdot \hbar \cdot H_0. \quad \dots (9)$$

Iz zveze (5) sledi, da sta za jedra s spinom $I = \frac{1}{2}$ (na primer jedro vodika) možni dve projekciji m_I ($+\frac{1}{2}$ in $-\frac{1}{2}$) vzdolž in v nasprotni smeri zunanjega magnetnega polja H_0 . Opisujeta ju spinski stanji $|\alpha\rangle$ in $|\beta\rangle$ s paralelno ($m_I = +\frac{1}{2}$) in antiparalelno ($m_I = -\frac{1}{2}$) orientacijo spina glede na smer $\vec{H}_0$. V odsotnosti zunanjega polja $\vec{H}_0$ sta stanji $|\alpha\rangle$ in $|\beta\rangle$ energijsko degenerirani. V prisotnosti zunanjega magnetnega polja $\vec{H}_0$ pa v soglasju z enačbo (8) pride do razcepa teh magnetnih energijskih stanj jedrskih spinov, z energijama $E_\alpha = -\gamma \cdot \hbar \cdot H_0 \cdot (+1/2)$ za paralelno in $E_\beta = -\gamma \cdot \hbar \cdot H_0 \cdot (-1/2)$ za antiparalelno orientacijo spina.

To je grafično prikazano na Sliki 6: nižji energijski nivo ($m_I = +\frac{1}{2}$) ustreza paralelni orientaciji magnetnega momenta (v smeri $\vec{H}_0$), višji energijski nivo ($m_I = -\frac{1}{2}$) pa antiparalelni orientaciji (v nasprotni smeri $\vec{H}_0$).



Slika 6. A: Magnetna energijska nivoja jeder s spinskim kvantnim številom $I = 1/2$.

B: Možne orientacije jedrskega spina $1/2$ v polju $\vec{H}_0$.

Projekcije I vzdolž smeri $\vec{H}_0$ so določene s kvantnim številom m_I (Škof, 1998: 22).

V odsotnosti zunanega magnetnega polja $\vec{H}_0$ je enako število protonov (oz. jeder s spinom $I = 1/2$) v stanjih $|\alpha\rangle$ in $|\beta\rangle$ s paralelno oz. antiparalelno orientacijo spina. V prisotnosti $\vec{H}_0$ pa imamo presežek števila jeder na spodnjem energijskem nivoju, kar je določeno z Boltzmannovo porazdelitvijo:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{-\Delta E/kT} \quad \dots (10)$$

N_α in N_β predstavljata število jeder v stanjih $|\alpha\rangle$ oz. $|\beta\rangle$, $\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \gamma \hbar H_0$ pomeni energijsko razliko med nivojema stanj $|\beta\rangle$ in $|\alpha\rangle$, k je Boltzmannova konstanta ($k = 1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$) in T je absolutna temperatura. Relativni presežek $(N_\alpha - N_\beta)/N_\alpha$ protonov v nižjem energijskem stanju je v NMR spektroskopiji izredno majhen ($\approx 10^{-5}$). Vendar je prav ta presežek v zasedbi energijskih stanj protonov s paralelno spinsko orientacijo vzrok končne (makroskopske) magnetizacije vzorca vzdolž smeri $\vec{H}_0$ v stanju termičnega ravnovesja spinov.

Do vzbujanja (prehoda) viška jedrskih spinov iz spodnjega na zgornji energijski nivo pride ob obsevanju vzorca z radiofrekvenčnim (rf) elektromagnetnim poljem primerne frekvence ($\nu_{rf} = \nu_0$). Pod pogojem, da je energija kvantov radiofrekvenčnega valovanja $h\nu_0$ obsevalnega elektromagnetnega polja enaka energijski razliki ΔE spinskih nivojev (Slika

6A), pride do resonančne absorpcije energije vzbujevalnega rf magnetnega valovanja. Resonančna frekvenca je podana z Bohrovim izrazom:

$$\nu_0 = \frac{\Delta E}{h} = \frac{\gamma H_0}{2\pi} \quad \dots (11)$$

oziroma

$$\omega_0 = \gamma H_0, \quad \dots (12)$$

kjer je ω_0 Larmorjeva precesijska ali krožna frekvenca ($\omega_0 = 2\pi\nu_0$).

Pri tem mora biti vektor vzbujevalnega radiofrekvenčnega magnetnega polja pravokoten na zunanje statično magnetno polje $\vec{H}_0$. Iz izraza (10) je razvidno, da bo v ravnovesju razlika v zasedbi obeh energijskih stanj tem večja, čim večji je razmak pripadajočih nivojev. Posledica bo večja absorpcija energije in povečana občutljivost NMR, kar dosežemo z uporabo močnejšega polja $\vec{H}_0$ (enačba (11)). Resonančnemu pogoju (11) zadostimo na dva načina:

- s spreminjanjem jakosti magnetnega polja H_0 pri konstantni frekvenci ν_0 , ali
- s spreminjanjem frekvence ν_0 vzbujevalnega rf polja pri konstantnem polju H_0 .

V praksi se uporablja drugi način, ker dosti lažje in natančneje uravnavamo frekvenco kot pa jakost magnetnega polja.

NMR resonančne frekvence vzbujevalnega nihajočega magnetnega polja ležijo v radiofrekvenčnem (rf) območju (od nekaj 10 MHz do nekaj 100 MHz, odvisno od vrste jeder in velikosti H_0). Absorpcijo energije rf polja zaznamo kot spremembo električne napetosti v vzbujevalni rf tuljavici. Ojačana napetost nam predstavlja NMR signal.

3.2.1.1.3 Relaksacijski procesi

Delovanje resonančnega vzbujevalnega rf polja poruši termično ravnotežno porazdelitev jedrskih spinov. Po izključitvi vzbujevalnega elektromagnetnega sevanja sledi proces vračanja (relaksacije) spinskega sistema v prvotno termično ravnovesje z okolico (s kristalno mrežo ali toplotnim rezervoarjem molekulskih gibanj - ali na kratko - z »mrežo«). Vračanje komponente z neravnovesne magnetizacije $M(t)$ proti termično ravnovesni vrednosti M_0 je dinamični proces prvega reda. Časovni potek je torej eksponencialen s časovno konstanto T_1 :

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{-t/T_1}\right) \quad \dots (13)$$

Proces imenujemo *spin-mrežna relaksacija* (to pomeni, da se vzbujeni spini vračajo v prvotno stanje z oddajanjem energije mreži) in pripadajoča konstanta T_1 se zato imenuje spin-mrežni ali longitudinalni relaksacijski čas; to je čas, ki označuje povprečno

življenjsko dobo jeder v vzbujenem energijskem stanju. Proces relaksacije vključuje izmenjavo magnetne energije med jedrskimi spini in njihovimi magnetnimi komponentami (lokalnimi magnetnimi polji) kristalne mreže.

Življenjsko dobo vzbujenih spinov omejuje, poleg časovne konstante T_1 , še časovna konstanta T_2 druge vrste relaksacijskega procesa, t.i. *spin-spinska ali transverzalna relaksacija*. To je proces vračanja transverzalne (xy) komponente magnetizacije proti ravnotežni vrednosti 0. V procesu gre za vzajemno zamenjavo magnetnih energijskih stanj med sosednjimi jedrskimi spini (flip-flop), brez izmenjave energije z »mrežo«. Zato v nasprotju s spin-mrežno relaksacijo spin-spinska relaksacija ne spremeni zasedbe magnetnih energijskih nivojev, je pa vzrok končne življenjske dobe vzbujenih jeder, določene s časovno konstanto T_2 , ki je praviloma krajša od T_1 . Končna življenjska doba jeder na danem energijskem nivoju pa je v soglasju s Heisenbergovim načelom nedoločljivosti vzrok končni širini NMR resonančnih črt. Po tem načelu je namreč istočasna določitev energije (E) danega nivoja in njegove življenjske dobe (t) omejena z natančnostjo, ki jo določa pogoj $\Delta E \cdot \Delta t \geq h$. Minimalna širina ($\Delta \nu_{1/2}$) NMR resonančne črte je torej omejena z maksimalno življenjsko dobo (T_1) jedrskega spina na danem nivoju: $h \cdot \Delta \nu_{1/2} \cdot T_1 \geq h$. Od tod:

$$\Delta \nu_{1/2} \geq \frac{1}{T_1}, \quad \dots (14)$$

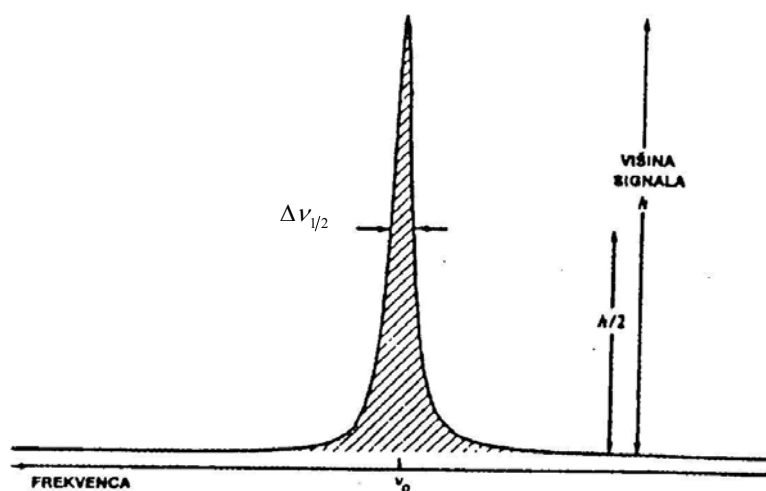
kjer je $\Delta \nu_{1/2}$ širina resonančne črte pri polovični višini signala.

Širina resonančnih črt pa je, kot že omenjeno, običajno večja zaradi praviloma hitrejšje ($T_2 \leq T_1$) spin-spinske relaksacije, in tako velja:

$$\Delta \nu_{1/2} \approx \frac{1}{T_2}. \quad \dots (15)$$

Pri natančnejši obravnavi običajno T_2 povezujemo s širino Lorentzove absorpcijske krivulje, pogoste oblike NMR signala (črte) molekul v raztopini. Tedaj velja:

$$\Delta \nu_{1/2} = \frac{1}{\pi \cdot T_2}. \quad \dots (16)$$



Slika 7. Lorentzova oblika NMR absorpcijske krivulje (Škof, 1998: 25).

Kadar zunanje magnetno polje ni homogeno, čutijo jedra v različnih delih vzorca različne velikosti polja in imajo zato resonančno absorpcijo izpolnjeno pri rahlo različnih frekvencah. To dodatno prispeva k razširitvi črt. Prispevek k širini NMR črte zaradi nehomogenosti polja ΔH_0 je:

$$\Delta \nu_{1/2}(\text{nehom}) = \frac{\gamma \cdot \Delta H_0}{2\pi}. \quad \dots (17)$$

Izmerjena širina $\Delta \nu_{1/2}$ (*opaz*) NMR črte nam v soglasju z enačbo (16) definira transverzalni relaksacijski čas T_2^* :

$$\Delta \nu_{1/2}(\text{opaz}) = \frac{1}{\pi \cdot T_2^*}, \quad \dots (18)$$

ki vključuje prispevka naravne širine NMR črte in nehomogenosti magnetnega polja:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \cdot \Delta H_0}{2}. \quad \dots (19)$$

Ker T_2 ne more biti nikoli daljši od T_1 , velja:

$$T_2^* \leq T_2 \leq T_1. \quad \dots (20)$$

V trdnih snoveh je $T_1 \gg T_2$, v tekočinah pa je $T_1 \approx T_2$. Dobro ločljive, ozke NMR črte dobimo v primeru, ko so molekule v vzorcu gibljivejše. Če je namreč molekularno gibanje počasno, močnejše (manj izpovprečene) dipolne interakcije med spini znatno razširijo NMR črte. Oblika in širina NMR signala pa je poleg spin-mrežne in spin-spinske relaksacije odvisna tudi od števila jeder z enakim kemijskim okoljem, od kemijske izmenjave med kemijsko (magnetno) neekvivalentnimi mesti in od nehomogenosti magnetnega polja.

3.2.1.1.4 Gibanje jedrske makroskopske magnetizacije v magnetnem polju

Gibanje jedrske makroskopske magnetizacije v zunanjem magnetnem polju najlažje opišemo z Blochovimi fenomenološkimi gibalnimi enačbami. Izhodišče je klasična gibalna enačba magnetnega momenta $\vec{\mu}$ v magnetnem polju $\vec{H}$, ki je poljubno usmerjeno:

$$\frac{d\vec{p}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{H}. \quad \dots (21)$$

Enačba nam pove, da je sunek spinske vrtilne količine jedra ($d\vec{p}/dt$) enak navoru magnetnega polja $\vec{H}$ na magnetni moment jedra $\vec{\mu}$.

Ob upoštevanju zveze $\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{p}$ iz izraza (21) sledi:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \frac{d\vec{p}}{dt} = \gamma \cdot \vec{\mu} \times \vec{H}. \quad \dots (22)$$

Opazovana makroskopska magnetizacija $\vec{M}$ je vektorska vsota vseh jedrskih magnetnih momentov $\vec{\mu}$ v vzorcu, zato s seštevanjem po vseh $\vec{\mu}$ iz enačbe (22) sledi:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \cdot \vec{M} \times \vec{H}. \quad \dots (23)$$

Magnetno polje $\vec{H}$ je vsota statičnega polja $\vec{H}_0$ v smeri osi z in magnetnega vektorja $\vec{H}_1$ rf polja, rotirajočega s krožno frekvenco ω v ravnini xy . Komponente $\vec{H}$ so torej:

$$\begin{aligned} H_x &= H_1 \cdot \cos \omega t \\ H_y &= -H_1 \cdot \sin \omega t \\ H_z &= H_0 \end{aligned} \quad \dots (24)$$

Končno obliko Blochovih enačb dobimo, če vektorsko enačbo (23) zapišemo v komponentni obliki, upoštevajoč izraze (24), in tako dobljene enačbe za gibanje posameznih komponent dopolnimo še z njihovimi časovnimi spremembami magnetizacije zaradi relaksacijskih procesov. Kot vemo, komponenti magnetizacije M_x in M_y relaksirata proti ravnovesni vrednosti 0 s časovno konstanto T_2 , komponenta M_z pa proti ravnovesni vrednosti M_0 s časovno konstanto T_1 . Tako sledi:

$$\begin{aligned}\frac{dM_x}{dt} &= \gamma(M_y H_0 + M_z H_1 \sin \omega t) - \frac{M_x}{T_2}, \\ \frac{dM_y}{dt} &= \gamma(M_z H_1 \cos \omega t - M_x H_0) - \frac{M_y}{T_2}, \\ \frac{dM_z}{dt} &= -\gamma(M_x H_1 \sin \omega t + M_y H_1 \cos \omega t) - \frac{(M_z - M_0)}{T_1}.\end{aligned}\quad \dots (25)$$

3.2.1.1.5 Rotirajoči koordinatni sistem

Opis gibanja magnetizacije lahko poenostavimo, če ga obravnavamo v rotirajočem koordinatnem sistemu, ki rotira s frekvenco $\vec{\omega}$ okoli osi $z \parallel \vec{H}_0$ v istem smislu kot precesirajo jedrski magnetni momenti. Izkaže se, da se v takem sistemu gibalna enačba (23) transformira v naslednjo obliko:

$$\left[\frac{d\vec{M}}{dt} \right]_{rot} = \gamma \cdot \vec{M} \times \vec{H}_{eff}. \quad \dots (26)$$

Tu pomeni $\vec{H}_{eff} = \vec{H} + \frac{\vec{\omega}}{\gamma}$ efektivno magnetno polje, pri čemer predstavlja člen $\frac{\vec{\omega}}{\gamma}$ navidezno (fiktivno) magnetno polje zaradi rotacije.

3.2.1.1.6 Magnetizacija v rotirajočem koordinatnem sistemu

V primeru, ko je prisotno samo magnetno polje $\vec{H}_0$, usmerjeno vzdolž osi z , je $\vec{H} = \vec{H}_0$. V koordinatnem sistemu, ki rotira okoli osi z s krožno frekvenco $\vec{\omega} = -\gamma \cdot \vec{H}_0$, velja torej:

$$\vec{H}_{eff} = \vec{H} + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} = \vec{H}_0 - \left[\frac{\gamma \cdot \vec{H}_0}{\gamma} \right] = 0. \quad \dots (27)$$

Negativni predznak pomeni, da gre pri $\gamma > 0$ za rotacijo v smeri urinih kazalcev. Iz enačbe (26) sledi, da se makroskopska magnetizacija v takem sistemu s časom ne spreminja. To tudi pomeni, da v laboratorijskem (statičnem) sistemu tedaj magnetizacija precesira s krožno frekvenco $\vec{\omega} = -\gamma \cdot \vec{H}_0$ okoli osi $z \parallel \vec{H}_0$, ki jo imenujemo Larmorjeva frekvenca, sam pojav pa Larmorjeva precesija.

Vključimo poleg $\vec{H}_0$ sedaj še radiofrekvenčno magnetno polje $\vec{H}_1$, ki rotira s frekvenco $\vec{\omega}$ v ravnini $x'y'$ pravokotno na $\vec{H}_0$. V rotirajočem koordinatnem sistemu (pri frekvenci ω) je efektivno polje sedaj:

$$\vec{H}_{eff} = \vec{H}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} + \vec{H}_1. \quad \dots (28)$$

V resonanci ($\omega = \omega_0$) je fiktivno polje ($\frac{\vec{\omega}}{\gamma}$) ravno nasprotno enako $\vec{H}_0$. Preostane le polje $\vec{H}_1$ v ravnini $x'y'$, ki interagira z magnetizacijo $\vec{M}$. Ker $\vec{H}_1$ rotira s frekvenco rotirajočega sistema, lahko poljubno izberemo smer $\vec{H}_1$ vzdolž osi x' rotirajočega sistema. V tem primeru nam enačba (27) pove, da $\vec{M}$ precesira okrog osi x' (to je okrog $\vec{H}_1$). V času t_p se $\vec{M}$ zasučje okrog osi x' za kot Φ :

$$\Phi = \gamma H_1 t_p \text{ (v radianih)} \quad \dots (29)$$

To je osnovna enačba v zvezi z obravnavo pulznih NMR metod.

3.2.1.1.7 Radiofrekvenčni pulz in signal proste precesije

Pulz vzbujevalnega rf polja mora zadoščati naslednjim pogojem:

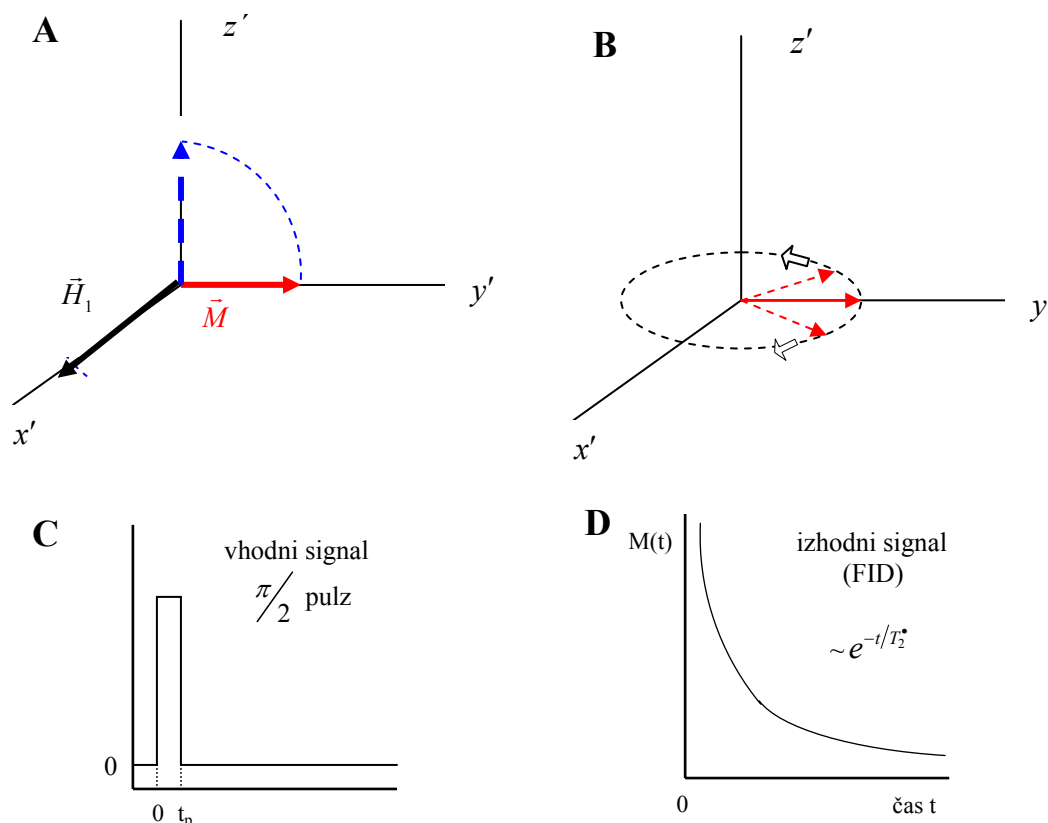
- dovolj velika intenziteta sevanja za vzbujanje vseh absorbirajočih jeder,
- trajanje pulza mora biti zelo kratko, mnogo krajše od T_1 in T_2 tako, da se izognemo poteku relaksacijskih procesov v času trajanja rf pulza.

Če vključimo rf polje $\vec{H}_1$ resonančne frekvence ω_0 vzdolž osi x' rotirajočega polja v pulzu trajanja $t_{\pi/2}$, se magnetizacija $\vec{M}$ zasučje iz začetne smeri z (vzporedne s $\vec{H}_0$) v smer y' rotirajočega sistema (torej za kot $\pi/2$). Govorimo o t.i. *rf pulzu* $\pi/2$. Po izključitvi polja $\vec{H}_1$ detektiramo signal inducirane električne napetosti v cilindrični tuljavici z osjo vzdolž osi x ali y laboratorijskega koordinatnega sistema. Izmerjeni signal je sorazmeren trenutni amplitudi magnetizacije M_{xy} , ki je fiksna vzdolž osi y' rotirajočega sistema oz. ki precesira s frekvenco ω_0 v ravnini xy laboratorijskega sistema (prav zato se v tuljavici inducira napetost). Inducirani napetostni signal imenujemo **signal proste precesije (FID)** (ang. *Free Induction Decay – FID*), kar označuje prosto precesijo spinov po izključitvi rf pulza.

Zaradi spin-spinske relaksacije (T_2) ter zaradi nehomogenosti magnetnega polja (ΔH_0), magnetizacija M_{xy} upada eksponentialno s časovno konstanto T_2^* proti ravnovesni vrednosti 0. Na enak način upada tudi napetostni signal $U(t)$ proste precesije v tuljavici:

$$U(t) \propto M_{xy}(t) = M_0 e^{-t/T_2^*}. \quad \dots (30)$$

Ker spin-spinska relaksacija poteče mnogo hitreje kot spin-mrežna, karakterizira upadanje signala proste precesije v glavnem le T_2^* .



Slika 8. **A:** Radiofrekvenčni (rf) pulz $\pi/2$ polja $\vec{H}_1$ vzdolž osi x' , katerega obliko prikazuje slika **C**, zasučje magnetizacijo $\vec{M}$ iz smeri osi z' v smer y' rotirajočega sistema. **B:** $\vec{M}$ upada zaradi spin-spinske relaksacije in nehomogenosti magnetnega polja ΔH_0 eksponentno s časovno konstanto T_2^* . **D:** Časovni potek izhodnega signala proste precesije (FID). (Škof, 1998: 30)

3.2.1.1.8 Merjenje T_2 z metodo spinskega odmeva

Metoda spinskega odmeva nam omogoča izogniti se napakam pri merjenju T_2 zaradi nehomogenosti zunanega magnetnega polja ΔH_0 . Metoda, ki jo je predložil E.L. Hahn, sestoji iz zaporedja pulzov: $\pi/2 - \tau - \pi$ in merjenja amplitude spinskih odmevov v času 2τ (τ je čas med pulzoma). S pulzom $\pi/2$ vzdolž osi x' zasučemo magnetizacijo za kot 90° iz smeri z' v smer y' . Sledi pahljačasta razpršitev spinov v ravnini $x'y'$ zaradi nekoliko različnih precesijskih hitrosti posameznih spinov v različnih delih vzorca (kot posledica nehomogenosti magnetnega polja ΔH_0), kar opazujemo kot signal proste precesije (FID). Po času τ vključimo še pulz π . Le-ta zasučje pahljačo spinov za kot 180° iz smeri $+y'$ v smer $-y'$. Ker se smer precesije spinov ohranja, se pahljačasto razpršeni spini po pulzu π začnejo ponovno zbirati. To zaznamo kot jačanje napetosti v rf tuljavici.

V času 2τ po pulzu $\pi/2$ se pahljača spinov popolnoma refokusira in inducirana napetost v tuljavi doseže maksimalno vrednost. Nadaljnje gibanje spinov povzroči ponovno izgubo fazne povezave in padec napetosti. Signal inducirane napetosti po pulzu π imenujemo **spinski odmev**. Zaradi ireverzibilne spin-spinske relaksacije se amplituda spinskega odmeva z večanjem intervala 2τ manjša eksponentialno s časovno konstanto T_2 :

$$A(2\tau) \propto e^{-2\tau/T_2}. \quad \dots (31)$$

Difuzija molekul, ki nosijo spine, skozi različne dele nehomogenega polja $\vec{H}_0$, dodatno prispeva k zmanjšanju amplitude spinskega odmeva v času. Vpliv difuzije je odvisen od gradienta magnetnega polja G , ki je merilo nehomogenosti polja $\vec{H}_0$, koeficienta translacijske difuzije D molekul, ki nosijo resonančne spine, in časa, v katerem se proces difuzije odvija. Ob upoštevanju tudi vpliva difuzije je amplituda spinskega odmeva podana z izrazom:

$$A(2\tau) \propto e^{-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{2}{3}\gamma^2 \cdot G^2 \cdot D \cdot \tau^3}, \quad \dots (32)$$

kjer je τ časovni razmik med pulzoma $\pi/2$ in π .

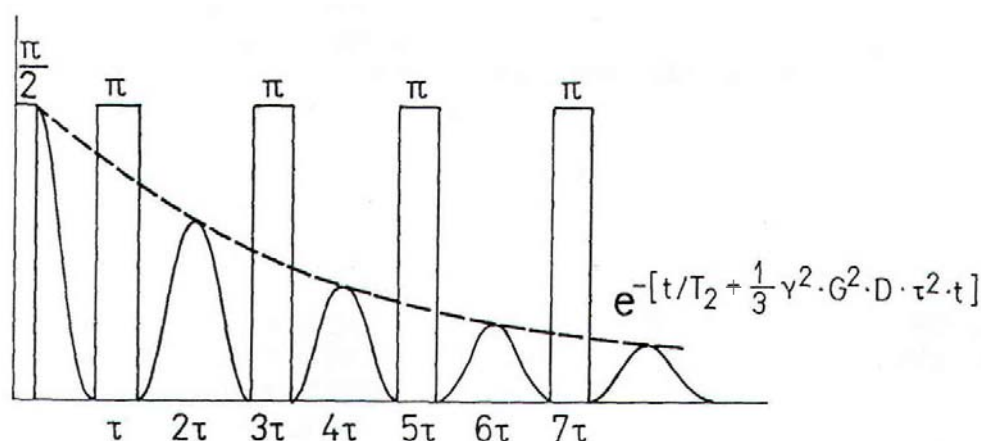
3.2.1.1.9 Carr-Purcellova pulzna metoda merjenja T_2

Vpliv difuzije je zaradi faktorja τ^3 zelo povečan pri daljših τ . Temu se izognemo z uporabo Carr-Purcellove tehnike. Predstavlja modifikacijo prej opisane Hahnove metode spinskega odmeva. Pulzna sekvenca Carr-Purcellove metode je: $\pi/2 - \tau - \pi - 2\tau - \pi \dots$. Vsi rf pulzi so vključeni v smeri osi $+x'$. Po prvem pulzu $\pi/2$ si sledijo pulzi π v časih τ , 3τ , $5\tau \dots$ in povzročijo spinske odmeve izmenoma vzdolž $+y'$ oz. $-y'$ osi v časih 2τ ($-y'$), 4τ ($+y'$), 6τ ($-y'$) ... Ovojnice amplitud spinskih odmevov - tako pozitivnih kot negativnih - je eksponentialna funkcija časa t :

$$A(t) \propto e^{-\frac{t}{T_2} - \frac{1}{3}\gamma^2 \cdot G^2 \cdot D \cdot \tau^2 \cdot t}. \quad \dots (33)$$

Z izbiro dovolj kratke vrednosti τ postane drugi (difuzijski) člen v eksponentu izraza (33) poljubno majhen. Prednost Carr-Purcellove metode je prihranek na času, saj v eni sami sekvenci pulzov ustvarimo zaporedje n spinskih odmevov, medtem ko pri nemodificirani Hahnovi metodi potrebujemo n pulznih sekvenc, da ustvarimo vseh n odmevov. Časovni potek ovojnice teh odmevov nam določa T_2 .

Modificirano obliko Carr-Purcellove metode predstavlja Carr-Purcell-Meiboom-Gillova (CPMG) metoda. Gre za isto zaporedje pulzov kot v nemodificirani metodi, le da so pulzi π vključeni vzdolž y' osi in ne vzdolž x' (torej so fazno premaknjeni za 90° proti začetnemu pulzu $\pi/2$). Na ta način dobimo vse spinske odmeve v pozitivni ($+y'$) smeri (t.j. vsi spinski odmevi so enakega predznaka), obenem pa odpravimo tudi težave nenatančnega refokusiranja spinov na račun možnih nenatančnosti v nastavitvi dolžine rf pulzov.



Slika 9. Opazovani signal časovnega poteka transverzalne magnetizacije v CPMG metodi. Z izbiro dovolj kratkega časa τ lahko postane difuzijski (drugi) člen v eksponentu časovne funkcije, ki opisuje ovojnico spinskih odmevov, poljubno majhen, kar nam omogoča določitev prave velikosti transverznega relaksacijskega časa T_2 (Škof, 1998: 32).

3.2.2 Študij hitrosti ravnovesne difuzijske izmenjave vode skozi eritrocitno membrano z merjenjem transverzalne protonske NMR relaksacijske funkcije

Za študij ravnovesne difuzijske izmenjave vode skozi celično membrano humanih eritrocitov smo uporabili CPMG metodo merjenja transverzalne relaksacije protonov vode v vzorcih suspenzije eritrocitov, zunajcelično označene s paramagnetnimi ioni Mn^{2+} .

Zaradi interakcije protonskih spinov z nesparjenimi elektroni ionov Mn^{2+} je transverzalna relaksacija protonov zunajcelične vode močno pospešena. S stališča razlage NMR poskusov na teh vzorcih obstajata torej dve različni relaksacijski mesti protonov vode: znotrajcelično področje nepoškodovanih eritrocitov (okolje a) z daljšim transverzalnim relaksacijskim časom ($T_{2,a} \approx 100$ ms) in zunajcelična raztopina z ioni Mn^{2+} (okolje b) z bistveno krajšim relaksacijskim časom: $T_{2,b} \approx 1$ ms. Molekule vode - in s tem resonančni spini protonov - se z difuzijo izmenjujejo med okoljema a in b . Ob izstopu molekul vode iz celice v zunanjo raztopino njihovi protonski spini zrelaksirajo proti nič zelo hitro (v času ≈ 1 ms) in v eritrocit vstopajoča voda ima tako že skoraj v celoti zrelaksirano protonsko

transverzalno polarizacijo. Zaradi stacionarnega izhajanja molekul vode iz eritrocita je prej omenjena daljša časovna konstanta protonov znotrajcelične vode v resnici skrajšana na »efektivno« velikost $\sim T'_{2,a}$, ki jo v bistvu določa povprečna življenjska doba vode v eritrocitu (τ_a) in znaša približno 10 ms. Čas difuzijske izmenjave vode skozi eritrocitno membrano (τ_{exch}), t.j. parameter, ki nas zanima, je torej praktično določen s povprečno življenjsko dobo vode v eritrocitu (τ_a).

S CPMG tehniko smo opazovali transverzalno NMR relaksacijsko funkcijo $M(t)$ protonov vode, ki jo določa ovojnica spinskih odmevov v CPMG pulzni metodi (ovojnica je na Sliki 9 ponazorjena s črtkano črto). Za neodvisno določitev naravnega relaksacijskega časa $T_{2,a}$ protonov znotrajcelične vode je s to metodo potrebno meriti protonsko transverzalno relaksacijo vzorcev goste suspenzije eritrocitov brez dodatka Mn^{2+} (Lahajnar, 1990, 1992). V takem primeru se $T_{2,a}$ določi iz dobljene monoeksponencialne funkcije:

$$M(t) = M_0 \cdot e^{-t/T_{2,a}}. \quad \dots (34)$$

V primeru paramagnetno označene vzorčne suspenzije eritrocitov pa je bila opazovana relaksacijska krivulja $M(t)$ izrazito dvoeksponencialne oblike. Funkcijo $M(t)$ lahko zato predstavimo z rešitvijo sistema sklopljenih gibalnih enačb transverzalne magnetizacije protonov molekul vode, ki se izmenjujejo med znotraj- in zunajceličnim prostorom:

$$\begin{aligned} \frac{d(\Delta m_a)}{dt} &= -\left(\frac{\Delta m_a}{T_{2,a}}\right) - \left(\frac{\Delta m_a}{\tau_a}\right) + \left(\frac{\Delta m_b}{\tau_b}\right), \\ \frac{d(\Delta m_b)}{dt} &= -\left(\frac{\Delta m_b}{T_{2,b}}\right) - \left(\frac{\Delta m_b}{\tau_b}\right) + \left(\frac{\Delta m_a}{\tau_a}\right). \end{aligned} \quad \dots (35)$$

Enačbi (35) podajata opis časovnega poteka odmikov Δm_a , Δm_b transverzalnih protonskih magnetizacij od ravnovesnih vrednosti v okoljih a in b . Parametra τ_a , τ_b sta povprečni življenjski dobi vodnih molekul v okolju a in b .

Rešitev gibalnih enačb (35) nam definira dvoeksponencialno transverzalno relaksacijsko funkcijo $M(t)$:

$$M(t) = P'_a \cdot e^{-t/T'_{2,a}} + P'_b \cdot e^{-t/T'_{2,b}}. \quad \dots (36)$$

Parametri P'_a , P'_b , $T'_{2,a}$, $T'_{2,b}$ so podani z naslednjimi zvezami:

$$P'_a = 1 - P'_b, \quad \dots (37)$$

$$P'_b = \frac{1}{2} - \frac{1}{4} \frac{\left[(P_b - P_a) \cdot \left(\frac{1}{T_{2,a}} - \frac{1}{T_{2,b}} \right) + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \right]}{C_2}, \quad \dots (38)$$

$$\frac{1}{T'_{2,a}} = C_1 - C_2, \quad \dots (39)$$

$$\frac{1}{T'_{2,b}} = C_1 + C_2, \quad \dots (40)$$

$$C_1 = \frac{1}{2} \left[\frac{1}{T_{2,a}} + \frac{1}{T_{2,b}} + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \right], \quad \dots (41)$$

$$C_2 = \frac{1}{2} \left[\left[\frac{1}{T_{2,b}} - \frac{1}{T_{2,a}} + \frac{1}{\tau_b} - \frac{1}{\tau_a} \right]^2 + \frac{4}{\tau_a \cdot \tau_b} \right]^{\frac{1}{2}}. \quad \dots (42)$$

Tu sta P_a in P_b resnična deleža celokupnega protonskega NMR signala vode v okoljih a in b , τ_a in τ_b pa sta povprečni življenjski dobi molekul vode v teh dveh okoljih.

Torej velja

$$P_a + P_b = 1 \quad \dots (43)$$

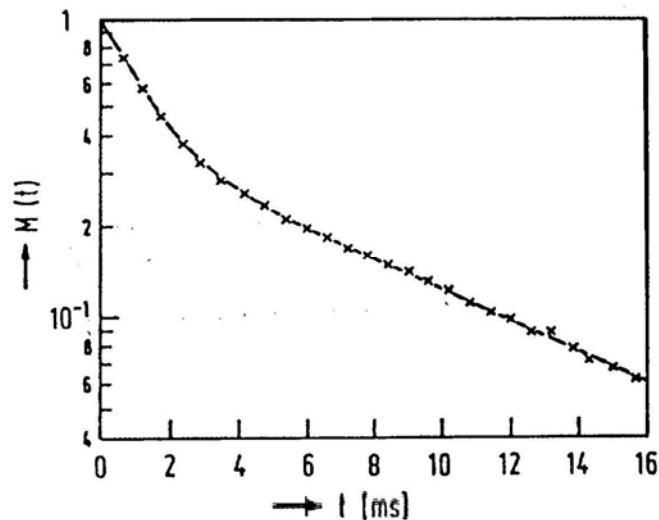
in zaradi mikroskopskega ravnovesja izmenjave tudi:

$$\frac{P_a}{\tau_a} = \frac{P_b}{\tau_b}. \quad \dots (44)$$

$T_{2,a}$ je dejanski transversalni relaksacijski čas protonov vode v nepoškodovanih eritrocitih (v okolju a) in $T_{2,b}$ dejanski relaksacijski čas protonov vode v paramagnetno označenem zunajceličnem prostoru suspenzije eritrocitov (v okolju b).

Difuzijski čas izmenjave vode iz eritrocita je istoveten s povprečno življenjsko dobo molekul vode v notranjosti eritrocita, torej $\tau_{\text{exch}} = \tau_a$ (glej Lahajnar in sod., 2006).

Grafični prikaz tipične eksperimentalne dvoekspponentialne transversalne protonske NMR relaksacijske funkcije paramagnetno označene suspenzije eritrocitov sesalcev je podan na Sliki 10 (Lahajnar, 1992).



Slika 10. Primer protonske NMR transversalne relaksacijske funkcije $M(t)$ vode v vzorcu paramagnetno označene suspenzije govejih eritrocitov. Krivulja je teoretska prilagoditev izmerjenih točk funkcije $M(t)$, določenih z vrhovi spinskih odmevov (križci) s pomočjo CPMG pulzne NMR metode. Razviden je dvoekspontni potek funkcije $M(t)$, s strmo padajočim začetnim delom, določenim s kratko časovno konstanto $T'_{2,b}$, ki jo v glavnem določa hitra transversalna NMR relaksacija protonov vode v paramagnetnem zunajceličnem prostoru, in z nadaljnjim položnejšim delom, ki ga opisuje daljši »efektivni« relaksacijski čas $T'_{2,a}$, ki je v največji meri določen s časovno konstanto τ_{exch} difuzijske izmenjave vode (Lahajnar, 1992: 196).

Parametri, ki jih določimo z analizo eksperimentalne transversalne relaksacijske krivulje, so P_a , $\tau_{\text{exch}} = \tau_a$, $T_{2,b}$. Parametra P_b in τ_b sta z njimi povezana preko enačb (43, 44), $T_{2,a}$ pa je potrebno izmeriti neodvisno na gosti paramagnetno neoznačeni suspenziji.

3.2.2.1 Difuzijska vodna permeabilnost eritrocitne membrane in τ_{exch}

S to metodo pulzne NMR smo določali časovno konstanto τ_{exch} difuzijske izmenjave vode skozi membrano humanih eritrocitov. Po dodatku ionskih efektorjev k suspenziji eritrocitov smo zasledovali volumen eritrocita preko τ_{exch} in razmerja med znotraj- in zunajcelično količino vode $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$. Kot že omenjeno v podpoglavju (3.2.1), je celokupna difuzijska vodna permeabilnost eritrocitne membrane ($P_d \equiv P_{d,\text{tot}}$) enaka (Lahajnar in sod., 2006):

$$P_d \equiv P_{d,\text{tot}} = P_{d,\text{lipid}} + P_{d,\text{AQP}} = \frac{v}{s} \cdot \frac{1}{\tau_{\text{exch}}}, \quad \dots (45)$$

kjer je $P_{d,\text{lip}}$ difuzijska vodna permeabilnost lipidnega dela membrane, $P_{d,\text{AQP}}$ difuzijska vodna permeabilnost membrane zaradi difuzije vode skozi akvaporine celične membrane, v volumen znotrajcelične vode posameznega eritrocita, s zunanja površina eritrocita in τ_{exch} časovna konstanta difuzijske izmenjave znotrajcelične vode skozi membrano eritrocita.

Pri pulzni CPMG metodi NMR z začetnim radiofrekvenčnim pulzom $\pi/2$ reorientiramo spine protonov vode v vzorcu v smer pravokotno (= transverzalno) na smer zunanjega statičnega magnetnega polja. Nastala transverzalna magnetizacija služi kot magnetna oznaka vodnih molekul v vzorcu. Tako magnetno označene molekule zaznamo kot NMR signal transverzalne protonske magnetizacije. Paramagnetni ioni Mn^{2+} v zunajceličnem prostoru hitro relaksirajo to komponento magnetizacije na velikost nič. Magnetno označene molekule vode se torej praktično nahajajo samo v znotrajceličnem prostoru, in časovni razvoj njihovega signala NMR protonske magnetizacije (odvisen od hitrosti izhajanja vode iz tega prostora v zunajcelični prostor, ki jo določa časovna konstanta τ_{exch}) študiramo pod vplivom delovanja posameznega efektorja.

Celokupni iztok tako označene vode ($J_{w,tot}$) iz eritrocitov je vsota prispevkov difuzijskega iztoka označene vode skozi lipidni del ($J_{w,lip}$) in skozi akvaporinske kanalčke AQP ($J_{w,AQP}$) membrane, in se v soglasju s 1. Fickovim zakonom glasi:

$$J_{w,tot} = J_{w,lip} + J_{w,AQP} = P_d(c_{in} - c_{out}), \quad c_{in} > c_{out} \quad \dots (46)$$

pri čemer sta c_{in} in c_{out} znotraj- in zunajcelični koncentraciji magnetno označene vode (v mol/cm^3).

Hitrost časovnega spreminjanja koncentracijske razlike ($c_{in} - c_{out}$) na račun katerekoli poti izhajanja vode iz eritrocita (bodisi skozi lipidni del, skozi kanalčke, celokupno pot) določa enačba (Lahajnar in sod., 2006):

$$\frac{d(c_{in} - c_{out})}{dt} = -s P \left(\frac{1}{v_{in}} + \frac{1}{v_{out}} \right) (c_{in} - c_{out}), \quad \dots (47)$$

kjer je P koeficient permeabilnosti, ki se nanaša bodisi na kanalčke ($P_{d,AQP}$) ali na lipidni del ($P_{d,lip}$), ali na celokupno pot ($P_{d,tot}$). s je zunajcelična površina membrane eritrocita, v_{in} je znotrajcelični volumen vode posameznega eritrocita (okoli 70 % skupnega izotoničnega celičnega volumna normalnih eritrocitov) in v_{out} je pripadajoči zunajcelični volumen vode izotoničnega eritrocita v celični suspenziji s hematokritom h ($v_{out} = [(1-h)/0.70h] \cdot v_{in}$). Pri tem od časa neodvisni faktorji na desni strani enačbe (47) predstavljajo recipročno časovno konstanto $1/\tau$:

$$\frac{1}{\tau} = s \cdot P \left(\frac{1}{v_{in}} + \frac{1}{v_{out}} \right) \quad \dots (48)$$

Za naš poskus lahko privzamemo, da je v_{out} zelo velik ($v_{out} \gg v_{in}$) in da ne vsebuje označene vode ($c_{out} = 0$), kar ustreza dejstvu, da je zunajcelična koncentracija magnetno označenih molekul zaradi hitre paramagnetne relaksacije praktično enaka nič in tudi ne

narašča v času s prehajanjem označenih molekul vode iz znotrajceličnega prostora, kar bi bilo res le, če je zunajcelični prostor zelo velik glede na notranji prostor ($v_{out} \gg v_{in}$). Ker je celokupni iztok vode iz eritrocita enak vsoti tokov vode skozi kanalčke AQP-1 in skozi lipidni del membrane, je celokupni koeficient vodne permeabilnosti enak vsoti koeficientov permeabilnosti za tok skozi lipidni del ($P_{d,lip}$) in skozi kanalčke ($P_{d,AQP}$), torej $P_{d,tot} = P_{d,lip} + P_{d,AQP}$.

Časovno konstanto τ_{exch} , dobljeno z analizo meritev, določata prispevka vodne difuzije skozi AQP-1 in skozi lipidni sloj. Za naš poskus ($v_{out} \gg v_{in}$) je skladno z enačbo (48) difuzijska vodna permeabilnost eritrocitne membrane torej:

$$P_{d,tot} \equiv P_d = \frac{v}{s} \cdot \frac{1}{\tau_{exch}}. \quad \dots (49)$$

Iz eksperimentalnih transversalnih NMR relaksacijskih funkcij $M(t)$ izračunane velikosti parametra τ_{exch} in razmerja med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode, $V_{in}/V_{out} = P_d/P_b$, v suspenziji eritrocitov so določene na $\pm 7\%$ natančno (Lahajnar in sod., 2006).

Pri sobni temperaturi je razmerje v/s za izotonične humane eritrocite 4.56×10^{-5} cm (Brahm, 1982), tako da pri eksperimentalno dobljeni povprečni kontrolni velikosti $\tau_{exch} = 12.3$ ms iz enačbe (49) izračunana velikost koeficienta permeabilnosti P_d znaša 3.7×10^{-3} cm/s. To je v območju $(3 - 4) \times 10^{-3}$ cm/s največkrat citirane velikosti P_d za humani eritrocit (Brahm, 1982).

S pomočjo izraza (49) lahko analiziramo vpliv nekaterih snovi na lastnosti membrane humanih eritrocitov. Kadar reagent povzroči podaljšanje časovne konstante izmenjave vode s τ_{exch} na τ_{exch}^* , a ob tem ne spremeni razmerja V_{in}/V_{out} (v ostane nespremenjen), se ustrezna stopnja inhibicije permeabilnosti (s P_d na P_d^*) izračuna iz enačbe:

$$\left(\frac{P_d - P_d^*}{P_d} \right) = 1 - \left(\frac{\tau_{exch}}{\tau_{exch}^*} \right) \quad \dots (50)$$

Lahajnar in sod. (2006) so pokazali, da v primeru 1 mM $HgCl_2$ pride do hkratnega skrajšanja časa τ_{exch} in zmanjšanja razmerja V_{in}/V_{out} , ne spremeni pa se P_d . Zmanjšanje razmerja V_{in}/V_{out} pomeni zmanjšanje volumna (v) znotrajcelične vode eritrocita in s tem skrčenje njegovega celičnega volumna.

3.2.3 Tehnična izvedba NMR poskusa

Iz pripravljenih vzročnih suspenzij (točki 3.1.2 in 3.1.3) smo v teflonsko merilno posodico, ki ne vsebuje vodika in je zato primerna za NMR meritve jeder vodika, prenesli približno

300 μL vzorca, dobro pretresli in namestili v radiofrekvenčno sondo NMR spektrometra. Stresanje vzorcev pred vsako meritvijo je nujno zaradi težnje eritrocitov po agregaciji in usedanju. Sesedanje eritrocitov učinkovito povečuje celični volumen in zmanjšuje učinkovito izmenjevalno celično površino eritrocitov. Rezultati meritev v pogojih sesedanja celic ne dajejo pravih velikosti τ_{exch} in s tem difuzijske vodne permeabilnosti P_d .

Na vsakem vzorcu z 20 % hematokritom in določeno koncentracijo efektorskega iona smo opravili po tri neodvisne meritve. Meritve smo izvajali pri temperaturi $T = 21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Časovno zasledovanje membranske difuzijske permeabilnosti za vodo ter celičnega volumna pod vplivom efektorja je potekalo od ene do dveh ur. Tudi velikost τ_{exch} za kontrolne vzorce smo zasledovali v odvisnosti od časa po njihovi pripravi. Neodvisnost τ_{exch} od tega časa za kontrolne vzorce pa je dokaz, da ioni Mn^{2+} v teku NMR merjenj na preiskovanem vzorcu niso prešli v znotrajcelični prostor eritrocitov.

Meritve smo opravili pri resonančni frekvenci protonov $\nu_H = 100 \text{ MHz}$ na pulznem NMR spektrometru Bruker Biospec System (Bruker, Rheinstetten, Nemčija), opremljenem s superprevodnim magnetom (Oxford Instruments Ltd., Anglija). Izmerjene dvoeksponencialne transverzalne relaksacijske funkcije $M(t)$ smo analizirali v okviru izrazov (36) – (42) s pomočjo računalniškega programa, ki je omogočil določitev časovne konstante difuzijske izmenjave znotrajcelične vode skozi eritrocit (τ_{exch}), časa hitre relaksacije protonov vode v paramagnetno označenem zunajceličnem prostoru ($T_{2,b}$) in deleža molekul vode v eritrocitih (P_a). Delež zunajcelične vode: $P_b = 1 - P_a$. Dobljeno razmerje P_a/P_b torej določa velikost volumskega razmerja V_{in}/V_{out} znotraj- in zunajcelične vode eritrocitnega vzorca.

Preglednica 1. Pregled vzorcev za merjenje z NMR.

Številka vzorca	Sestava vzorca*
1	HE (kontrola)
2	HE + 1 mM HgCl_2
3	HE + 0.1 mM $\text{Pb}(\text{acetat})_2$
4	HE + 0.05 mM $\text{Pb}(\text{acetat})_2$
5	HE + 0.0125 mM $\text{Pb}(\text{acetat})_2$
6	HE + 1 mM CdCl_2

*Opomba: HE – humani eritrociti (20 % hematokrit) v pufru za eritrocite + 10 mM MnCl_2 . V preglednici podane koncentracije ionskih efektorjev so končne koncentracije v vzorcu.

4 REZULTATI

Na naslednjih straneh so predstavljeni rezultati meritev na humanih eritrocitih s pulzno NMR metodo protonov znotrajcelične vode (CPMG NMR) v obliki časovnih odvisnosti merjenih parametrov (τ_{exch} , V_{in}/V_{out}). Za vsak ionski efektor (Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+}) smo opravili po tri neodvisne meritve, vendar dobljenih vrednosti meritev nismo povprečili zaradi prevelike variabilnosti v hematoloških parametrih med posameznimi darovalci krvi.

Zaradi različnih velikosti eritrocitov imamo tako v vzorcu 20 % hematokrita večje eritrocite, z večjim celičnim volumnom, in manjše eritrocite, z manjšim celičnim volumnom. Kontrolna vrednost τ_{exch} eritrocitov krvodajalcev se je spreminjala od poskusa do poskusa. Meritve učinkov posameznih efektorjev iste koncentracije na vzorcih 20 % hematokrita pridobljenih v različnih obdobjih ali dneh odvzema krvi so med drugim pokazale znatno variabilnost v velikosti parametrov τ_{exch} in V_{in}/V_{out} (glej Sliko 11 in Priloge).

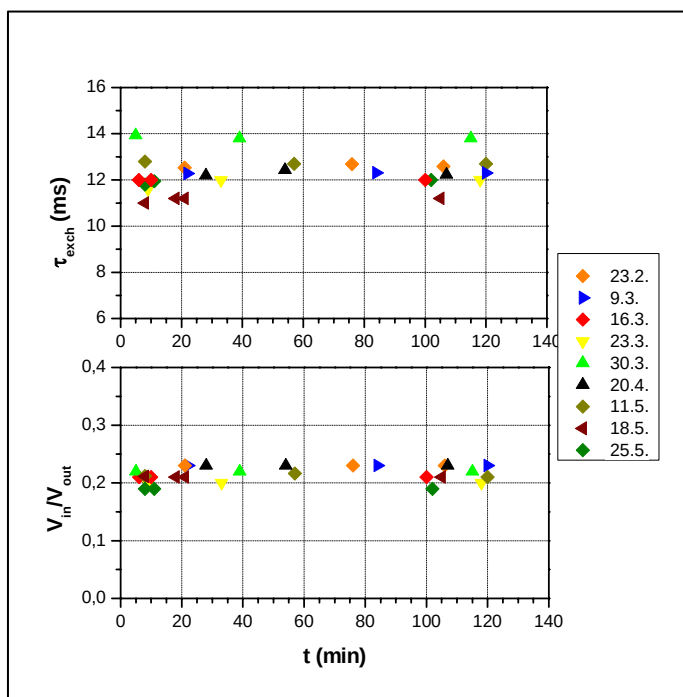
Primerjava meritev narejenih na vzorcih z dodanim efektorjem s kontrolnim vzorcem je smiselna, če za interpretacijo učinkov efektorjev na eritrocite uporabimo grafični prikaz meritve v primerjavi s kontrolo izmerjeno isti dan, na vzorcu narejenem iz iste zaloge krvi. Zanimali so nas učinki teh ionov (primerjava trenda krivulj) in ne dejanske velikosti izmerjenih parametrov. Odstopanja so bila različna, a učinek podoben. Za bolj primerljive rezultate bi morali poskus izvesti na vzorcih ene same osebe, na eni sami zalogi krvi, kar pa iz tehničnih razlogov ni bilo mogoče.

Morda je smiselno poudariti, da daje metoda analize dvokomponentne transverzalne relaksacijske funkcije magnetizacije $M(t)$ protonov vode v suspenziji eritrocitov v okviru modela točnejše rezultate pri parametru τ_{exch} kot pri V_{in}/V_{out} . Velikost razmerja V_{in}/V_{out} med znotraj- in zunajceličnim volumnom v vzorcu je bila izračunana z analizo funkcije $M(t)$, ki jo določa več parametrov, medtem ko je velikost parametra τ_{exch} možno dokaj zanesljivo oceniti že zgolj iz strmine položnejšega dela krivulje izmerjene funkcije $M(t)$. Pričakovati je, da je zato določevanje velikosti razmerja V_{in}/V_{out} manj natančno od določevanja τ_{exch} .

4.1 ANALIZA UČINKOV IONOV Hg^{2+} , Pb^{2+} IN Cd^{2+} NA τ_{exch} IN $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$

4.1.1 Grafični prikaz kontrolnih vrednosti parametrov τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$

Na Sliki 11 so grafično predstavljene kontrolne vrednosti merjenih parametrov (τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$) vzorcev 20 % hematokrita, izmerjene na suspenziji eritrocitov več krvodajalcev.

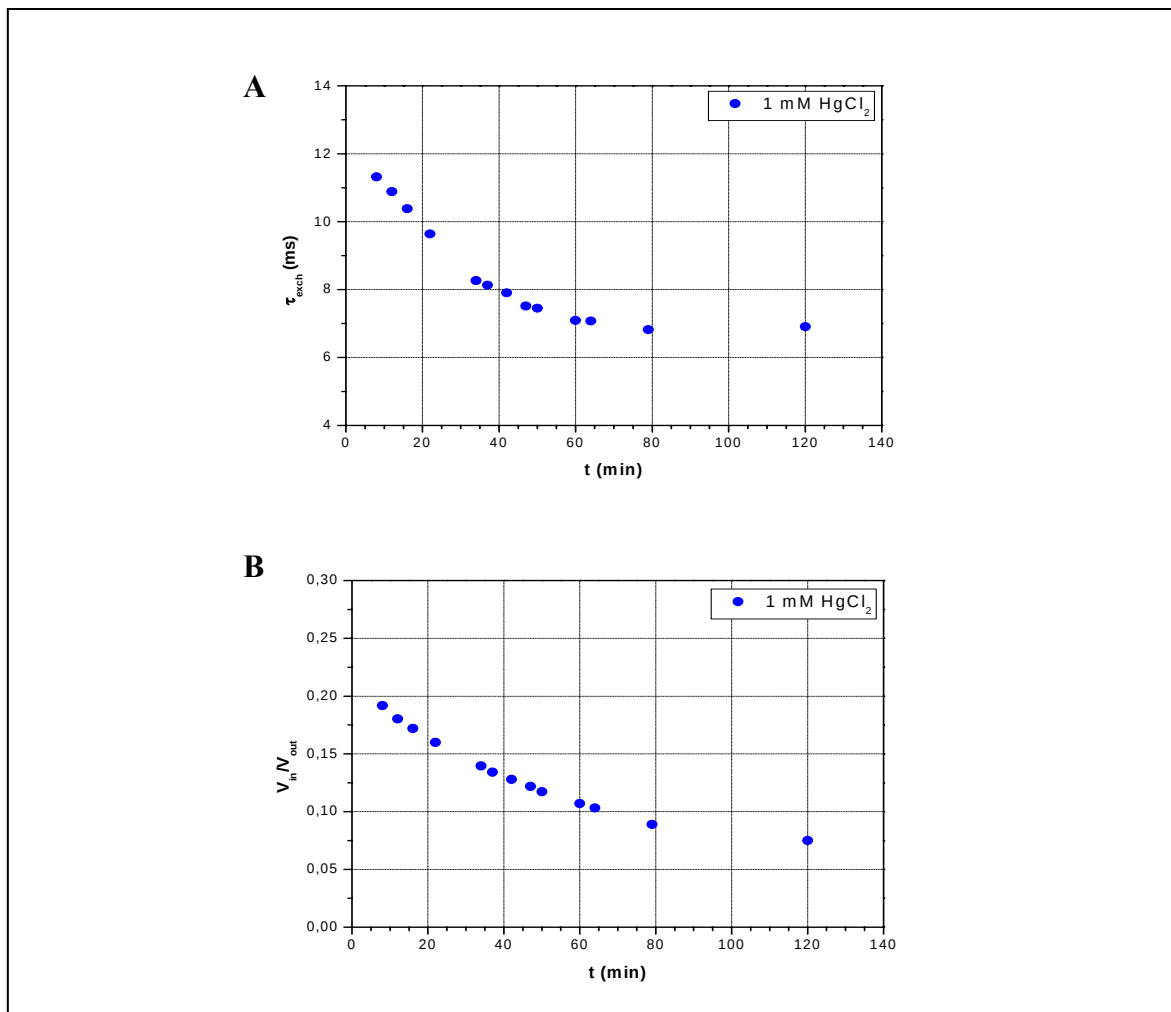


Slika 11. Grafična predstavitev časovne odvisnosti kontrolnih parametrov τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ v vzorcu 20 % hematokrita več krvodajalcev v času od 23.2. do 25. 5. 2006. Temperaturno območje meritev: 21 ± 2 °C.

Kontrolne vrednosti τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ izmerjene na vzorcih eritrocitov več darovalcev krvi so se razlikovale. V povprečju se je časovna konstanta τ_{exch} gibala okoli 12,3 ms, $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ pa okoli 0,22. Območje nahajanja kontrolnih vrednosti τ_{exch} je segalo od 11,0 do 14,0 ms, območje kontrolnih vrednosti $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ pa od 0,19 do 0,23.

4.1.2 Grafični prikaz vpliva živosrebrovega klorida na humane eritrocite

Učinek ionov Hg^{2+} na volumsko krčenje humanega eritrocita se kaže v sočasnem upadanju merjenih parametrov τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ v odvisnosti od časa inkubacije 20 % hematokrita z 1 mM HgCl_2 (Slika 12).



Slika 12. Grafična predstavitev vpliva 1 mM HgCl_2 na volumsko krčenje humanih eritrocitov. HgCl_2 je povzročil (A) skrajšanje časovne konstante τ_{exch} za izmenjavo celične vode in (B) sočasno zmanjšanje volumskega razmerja $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ znotrajcelične in zunajcelične vode v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi 21 °C. Predstavljene točke so meritev enega poskusa zaradi lažje primerjave s kontrolnimi meritvami. Odstopanja med posameznimi meritvami so v območju od 2–9 % za τ_{exch} in 19–26 % za $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$. Velikost obeh od časa neodvisnih parametrov v kontrolnem vzorcu v pogojih merjenja: $\tau_{\text{exch}} = 11,2$ ms, $V_{\text{in}}/V_{\text{out}} = 0,21$.

4.1.2.1 Analiza učinkov iona Hg^{2+} na humane eritrocite

Suspenziji humanih eritrocitov smo dodali izoosmotsko raztopino HgCl_2 v končni koncentraciji 1 mM. Takoj po dodatku iona Hg^{2+} je bil vzorec prenešen v merilno sondo in pomerjen. Prvih 30 minut smo vzorec merili pogosteje, in sicer v intervalu 3-10 min, kasneje manj pogosto (na 10 – 20 min).

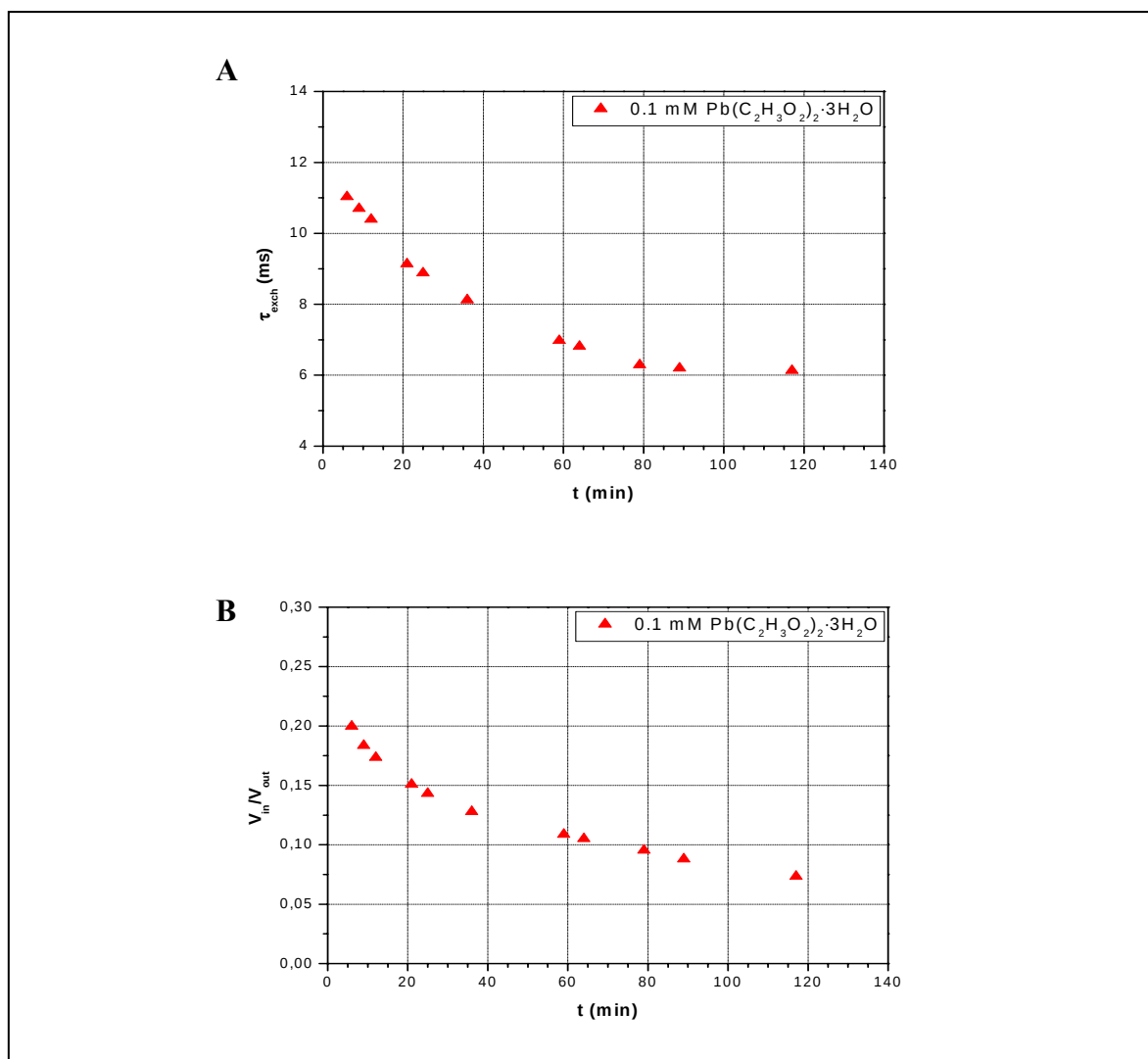
Učinek, ki so ga ioni Hg^{2+} povzročili na humanih eritrocitih, je jasno razviden iz Slike 12A. HgCl_2 je povzročil skrajšanje časovne konstante τ_{exch} v vzorcu 20 % hematokrita. Z začetne kontrolne vrednosti $\tau_{exch} = 11,2$ ms je efektor po 120 minutah skrajšal velikost τ_{exch} na okoli 6,9 ms. Pomeni, da se je povprečna življenjska doba (τ_{exch}) molekul vode v eritrocitu skrajšala za okoli 4,3 ms. Sočasna primerjava s Sliko 12B, ki prikazuje časovno spreminjanje razmerja V_{in}/V_{out} , pokaže, da je skrajšanje τ_{exch} posledica predvsem zmanjšanja znotrajceličnega volumna vode eritrocitov. Razmerje V_{in}/V_{out} se je zmanjšalo z 0,21 na 0,07. Rezultati potrjujejo ugotovitve Lahajnarja in sod. (2006), ki so pri enakem hematokritu in koncentraciji HgCl_2 dobili podobne rezultate.

Zanimivo, razmerje V_{in}/V_{out} po 120 minutah inkubacije s Hg^{2+} , navkljub ustalitvi τ_{exch} na konstantni vrednosti, ne kaže stabilizacije, ampak se s časom počasi še zmanjšuje. Glede na to, da je skupina Lahajnarja (2006) opazila ustalitev obeh parametrov po 120-tih minutah, sklepamo, da je opaženo zmanjševanje volumna še tudi po 2 urah delovanja Hg^{2+} lahko tudi posledica večje merske napake in ne dejanskega zmanjševanja volumna. Kot že omenjeno, daje metoda bolj natančne rezultate za τ_{exch} kot za V_{in}/V_{out} . Omenjeno je razvidno že iz primerjave ocene napake za meritve τ_{exch} in V_{in}/V_{out} (2 – 9 % za τ_{exch} , 19 – 26 % za V_{in}/V_{out}).

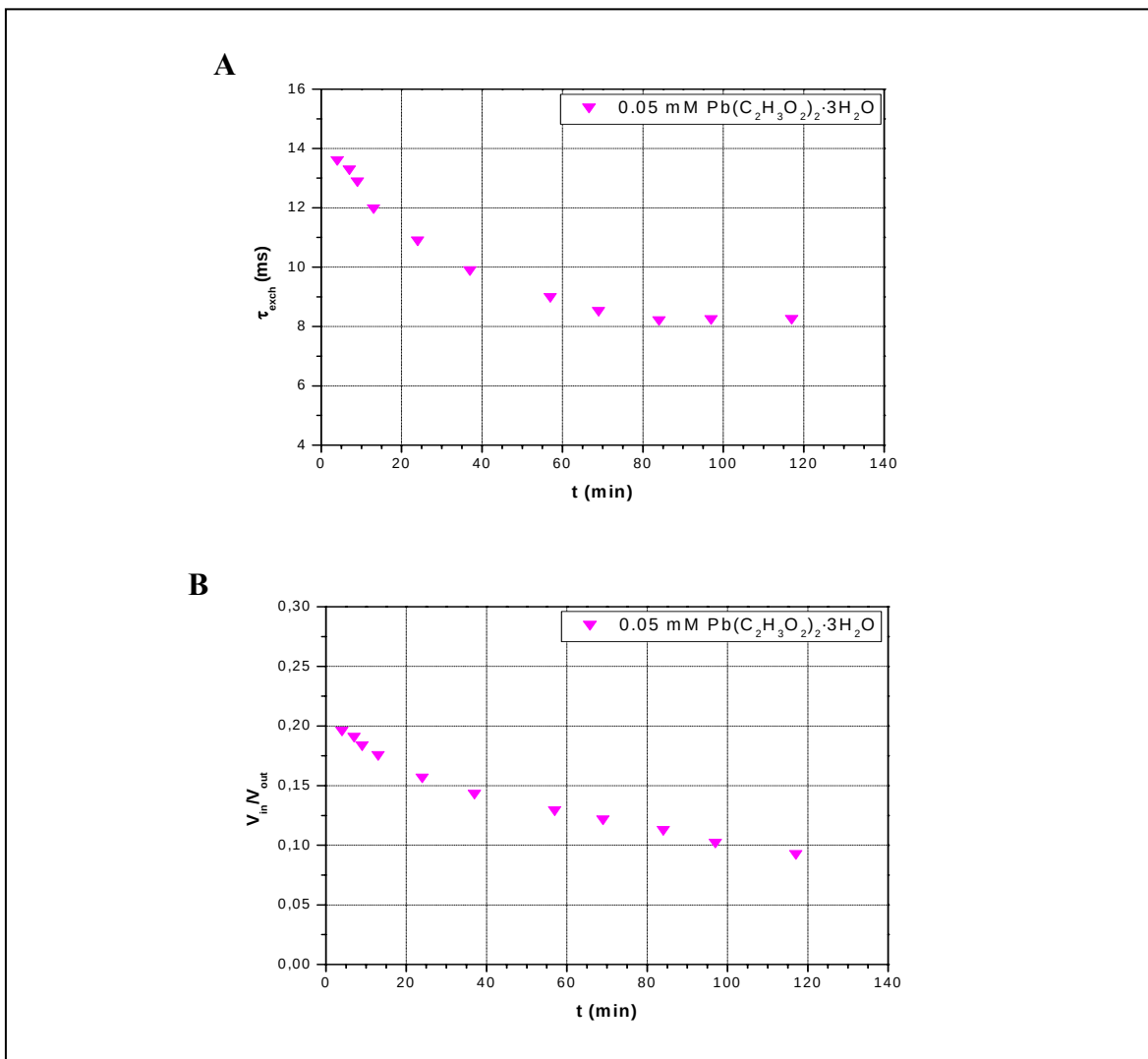
Med časom izvajanja meritev ni bilo opaziti povečane hemolize eritrocitov kot možne posledice delovanja Hg^{2+} . Zmanjševanje volumna eritrocitov torej ni posledica hemolize, temveč krčenja eritrocitov inducirane s HgCl_2 . Pred kratkim je bilo dokazano, da ioni Hg^{2+} sprožijo aktivacijo od Ca^{2+} odvisnih K^+ -kanalčkov (Gárdosevih kanalčkov) v membrani eritrocita (Eisele in sod., 2006), ki z iztokom ionov K^+ iz celice povzročijo krčenje eritrocitov. Opažene volumske spremembe eritrocitov, nastale pod vplivom delovanja ionov Hg^{2+} , so torej najverjetneje posledica aktivacije Gárdosevih kanalčkov v membrani eritrocita.

4.1.3 Grafični prikaz vpliva svinčevega acetata na humane eritrocite

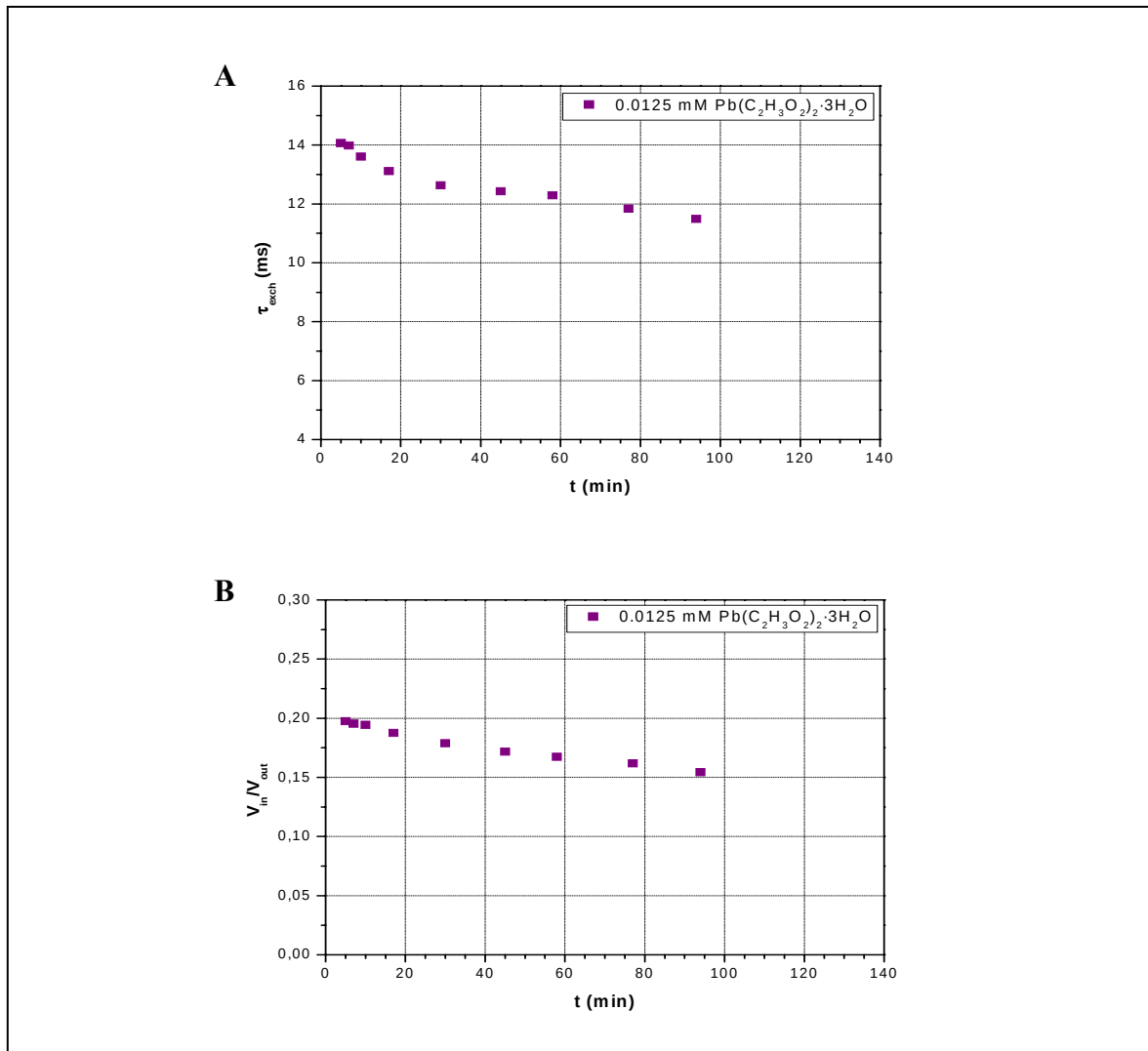
Učinek ionov Pb^{2+} na volumsko krčenje humanega eritrocita se kaže kot sočasno upadanje merjenih parametrov τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ v odvisnosti od časa inkubacije 20 % hematokrita s svinčevim acetatom ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) koncentracij 0.1 mM (Slika 13), 0.05 mM (Slika 14) in 0.0125 mM (Slika 15).



Slika 13. Grafična predstavitev vpliva 0.1 mM Pb^{2+} ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) na (A) časovno konstanto τ_{exch} za izmenjavo celične vode in (B) volumsko razmerje $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ znotrajcelične in zunajcelične vode v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi 20,5 °C. Pb^{2+} je povzročil skrajšanje τ_{exch} (A) in zmanjšanje $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ (B). Predstavljene točke so meritve enega poskusa. Odstopanja med posameznimi meritvami pri teh pogojih so v območju od 7 – 20 % za τ_{exch} in 14 – 28 % za $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$. Od časa neodvisna kontrolna parametra v pogojih merjenja: $\tau_{\text{exch}} = 11,3$ ms, $V_{\text{in}}/V_{\text{out}} = 0,21$.



Slika 14. Grafična predstavitev vpliva 0.05 mM Pb^{2+} ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) na (A) časovno konstanto τ_{exch} za izmenjavo celične vode in (B) volumsko razmerje $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ znotrajcelične in zunajcelične vode v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi $21,5^\circ\text{C}$. Pb^{2+} je povzročil skrajšanje τ_{exch} (A) in zmanjšanje $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ (B). Predstavljene so točke meritev enega poskusa. Odstopanja med ostalimi meritvami pri teh pogojih so v območju od 7 – 20 % za τ_{exch} in 14 – 28 % za $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$. Velikosti obeh od časa neodvisnih parametrov kontrolnega vzorca v pogojih merjenja: $\tau_{\text{exch}} = 13,8 \text{ ms}$, $V_{\text{in}}/V_{\text{out}} = 0,22$.



Slika 15. Grafična predstavitev vpliva 0.0125 mM Pb^{2+} ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) na (A) časovno konstanto τ_{exch} za izmenjavo celične vode in (B) volumsko razmerje V_{in}/V_{out} znotrajcelične in zunajcelične vode v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi 21,5 °C. Pb^{2+} je povzročil skrajšanje τ_{exch} (A) in zmanjšanje razmerja V_{in}/V_{out} (B). Predstavljene so točke meritev enega poskusa. Odstopanja med ostalimi meritvami pri teh pogojih so v območju od 7 – 20 % za τ_{exch} in 14 – 28 % za V_{in}/V_{out} . Velikosti teh od časa neodvisnih parametrov za kontrolni vzorec v pogojih merjenja: $\tau_{exch} = 13,8$ ms, $V_{in}/V_{out} = 0,22$.

4.1.3.1 Analiza učinkov iona Pb^{2+} na humane eritrocite

Suspenziji humanih eritrocitov smo dodali izoosmotsko raztopino svinčevega acetata ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Takoj po dodatku ionov Pb^{2+} je bil vzorec prenešen v merilno sondo in pomešan. Prvih 30 minut smo vzorec merili pogosteje, in sicer v intervalu 3-10 min, kasneje v daljših intervalih.

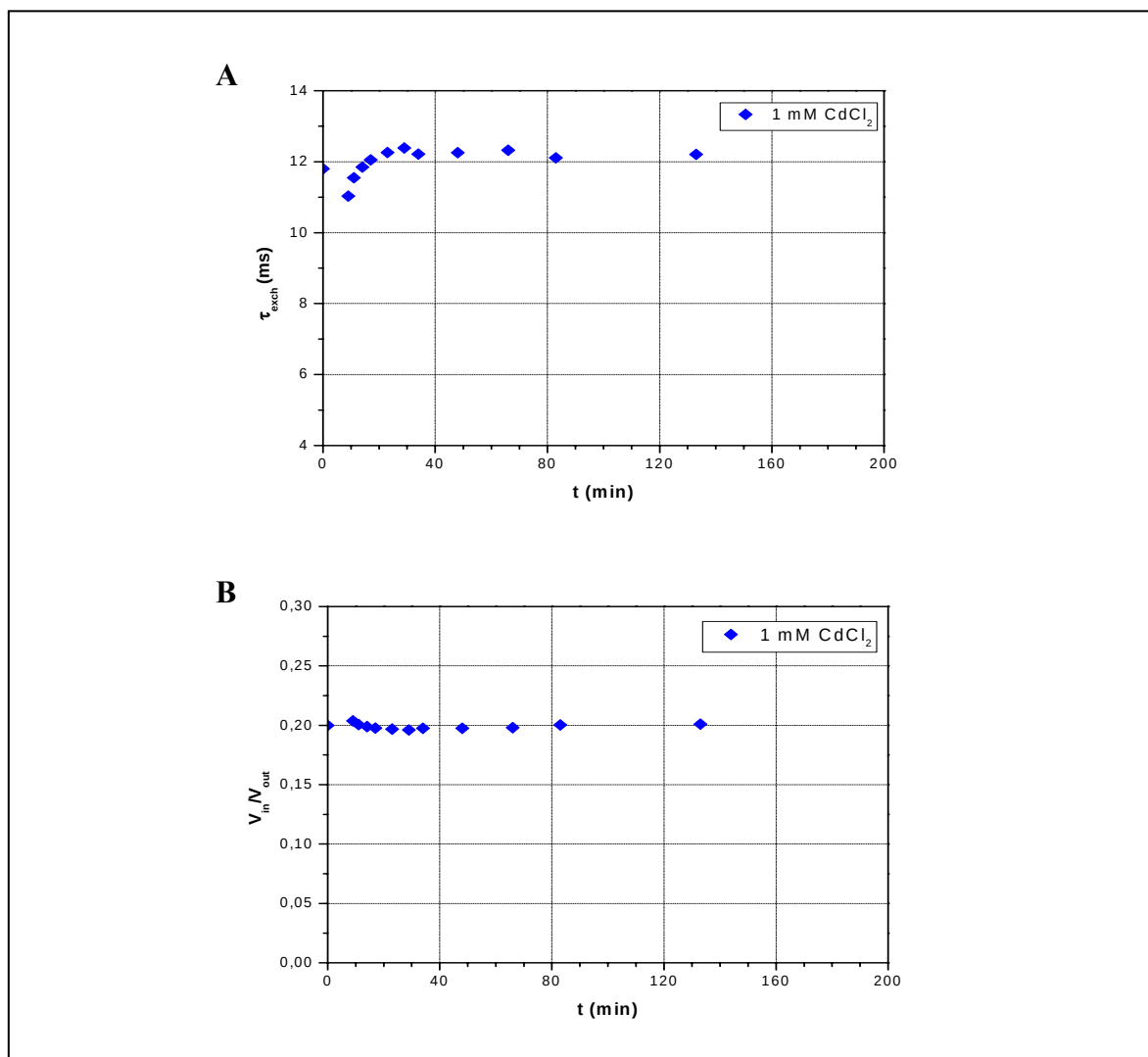
Svinčev acetat, uporabljen kot vir ionov Pb^{2+} , je vodotopen, vendar pri raztapljanju v izoosmotskem pufru ob prisotnosti ionov Cl^- tvori netopen svinčev klorid. Preliminarni poskusi so pokazali, da je 1 mM koncentracija svinčevega acetata previsoka, saj poleg tvorbe oborine povzroča hemolizo 20 % hematokrita eritrocitov. Iz tega razloga smo morali poiskati ustrezne koncentracije, ki niso povzročale niti hemolize niti tvorile oborine. Izkazalo se je, da naštetima pogoja ustrezajo koncentracije svinčevega acetata pod 0.1 mM.

Slike 13, 14 in 15 prikazujejo časovni potek spreminjanja τ_{exch} in V_{in}/V_{out} ob dodatku treh različnih koncentracij svinčevega acetata, in sicer 0.1 mM, 0.05 mM in 0.0125 mM. Pri vseh treh uporabljenih koncentracijah smo opazili skrajševanje časovne konstante τ_{exch} ob sočasnem zmanjševanju razmerja V_{in}/V_{out} . Vpliv ionov Pb^{2+} na eritrocite je koncentracijsko odvisen. Učinek se ob zmanjševanju koncentracije zmanjšuje. Koncentraciji 0.1 mM in 0.05 mM Pb^{2+} sta povzročili znatno večje spremembe v merjenih parametrih (τ_{exch} , V_{in}/V_{out}) kot 0.0125 mM Pb^{2+} . Koncentraciji 0.1 in 0.05 mM sta povzročili skrajšanje τ_{exch} , obe za okoli 5,4 ms. Sklepamo, da se učinek ionov Pb^{2+} v tem koncentracijskem območju prekriva in je v okviru napake. Najmanjša uporabljena koncentracija, 0.0125 mM Pb^{2+} , je skrajšala τ_{exch} le za 2,5 ms.

Učinek Pb^{2+} je podoben učinku ionov Hg^{2+} (Slika 12). Pri obeh gre za skrajševanje τ_{exch} ob sočasnem zmanjševanju volumna eritrocitov. Tako pri Hg^{2+} kot pri Pb^{2+} se po približno 100 minutah τ_{exch} ustali, medtem pa volumen še vedno pada in ne kaže znakov ustalitve. Vse naštetto nas vodi k misli, da je delovanje obeh ionov, Hg^{2+} in Pb^{2+} , na molekulskem nivoju podobno. Leta 2005 je bilo objavljeno (Kempe in sod., 2005), da ioni Pb^{2+} aktivirajo Gárdosev kanalček neodvisno od Ca^{2+} in povzročijo iztok ionov K^+ ter osmotsko izhajanje vode. Krčenje celic je torej najverjetneje posledica iztoka vode in ne porušitve membranske integritete celice.

4.1.4 Grafični prikaz vpliva kadmijevega klorida na humane eritrocite

Učinek ionov Cd^{2+} na časovno konstanto τ_{exch} difuzijske izmenjave znotrajcelične vode in volumsko razmerje V_{in}/V_{out} znotrajcelične in zunajcelične vode v 20 % hematokritu humanih eritrocitov, inkubiranem z 1 mM CdCl_2 , je prikazan na Sliki 16. Rezultati kažejo, da je učinek ionov Cd^{2+} na parametra τ_{exch} in V_{in}/V_{out} dosti manj izrazit od učinkov ostalih dveh ionov (Hg^{2+} in Pb^{2+}) zato, ker se parameter τ_{exch} že po začetnem skrajšanju (za okoli 1 ms) začne vračati (po 9 min inkubacije s Cd^{2+}) proti kontrolni velikosti, pri čemer se razmerje V_{in}/V_{out} ne spreminja. Vsekakor je opazno, da so velikosti sprememb parametrov τ_{exch} in V_{in}/V_{out} pod vplivom ionov Cd^{2+} dosti manjše od onih, ki jih inducirata iona Hg^{2+} in Pb^{2+} .



Slika 16. Grafična predstavitev vpliva 1 mM Cd^{2+} (CdCl_2) na (A) časovno konstanto τ_{exch} za izmenjavo celične vode in (B) volumsko razmerje $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ znotrajcelične in zunajcelične vode v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi 19,5 °C. Predstavljene so točke meritev enega poskusa. Odstopanja med ostalimi meritvami pri teh pogojih so v območju od 2 – 4 % za τ_{exch} in 10 – 15 % za $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$. Velikost obeh od časa neodvisnih kontrolnih parametrov v pogojih merjenja: $\tau_{\text{exch}} = 11,8$ ms, $V_{\text{in}}/V_{\text{out}} = 0,20$.

4.1.4.1 Analiza učinkov iona Cd^{2+} na humane eritrocite

Suspenziji humanih eritrocitov smo dodali izoosmotsko raztopino kadmijevega klorida (CdCl_2). Takoj po dodatku ionov Cd^{2+} je bil vzorec prenešen v merilno sondo in pomeščen. Prvih 30 minut smo vzorec merili pogosteje, in sicer v intervalu 3-10 min, kasneje v daljših časovnih intervalih.

S preliminarnimi poskusi smo poiskali koncentracijo, s katero bi najbolj opazovali učinke povzročene na humanih eritrocitih. Odločili smo se za koncentracijo 1 mM, ker so bili učinki pri nižjih uporabljenih koncentracijah CdCl_2 še manjši in znotraj okvira napake. Višje koncentracije pa niso znatno vplivale na merjene parametre.

Meritve pokažejo, da je bil kontrolni parameter τ_{exch} za 1 ms daljši od prve izmerjene velikosti τ_{exch} 9 minut po dodatku 1 mM CdCl_2 v vzorčno suspenzijo (Slika 16A). Učinek iona Cd^{2+} na eritrocit se je očitno pokazal že v prvih 9 minutah, torej še pred prvo opravljeno meritvijo po dodatku efektorja. Izvedene meritve pa vsekakor pokažejo, da se po 9 minutah τ_{exch} začne že daljšati in po 60 minutah inkubacije s Cd^{2+} doseže svoj vrh pri 12,4 ms in se v nadaljevanju inkubacije ustali na 12,2 ms.

Obnašanje časovne odvisnosti konstante τ_{exch} ob dodatku Cd^{2+} je najverjetneje posledica delovanja iona Cd^{2+} na več mestih. Cd^{2+} se namreč lahko vpleta v vse celične poti, ki vključujejo Ca^{2+} . Podobna velikost ionskih radijev Cd^{2+} (0,97 Å) in Ca^{2+} (0,99 Å) omogoča vezavo Cd^{2+} na vsa Ca^{2+} -vezavna mesta (Souza in sod., 1996). Cd^{2+} torej tekmuje s Ca^{2+} za nativna vezavna mesta Ca^{2+} , vendar ob vezavi ne deluje enako kot Ca^{2+} . Funkcija Ca^{2+} -črpalk je zato ob vezavi Cd^{2+} na Ca^{2+} -vezavno mesto prizadeta, kar vodi v povišanje znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} (Verboost in sod., 1989). Kot že omenjeno pa višje znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} aktivirajo Gárdosev kanalček. Nekateri celo navajajo (Cao in Houamed, 1999), da lahko sam Cd^{2+} aktivira kanalček neodvisno od Ca^{2+} .

Če združimo opisane učinke Cd^{2+} z rezultati, lahko ugotovimo, da ostaja razmerje V_{in}/V_{out} ves čas inkubacije nespremenjeno. Možno je, da sta se učinka krčenja zaradi aktivacije Gárdosevih kanalčkov in nabrekanja eritrocita zaradi inhibicije Ca^{2+} -črpalke pod vplivom delovanja ionov Cd^{2+} izravnala, kar opazimo kot nespreminjanje parametrov τ_{exch} in V_{in}/V_{out} v kasnejšem obdobju inkubacije eritrocitov s Cd^{2+} . K uravnavi volumna k normalnim velikostim verjetno prispevajo še mehanizmi za povečanje celičnega volumna (RPV).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Z razvojem in širjenjem industrije je onesnaževanje s težkimi kovinami postalo del našega vsakdana. Zastrupitve s kovinami, kot so živosrebrove spojine, svinec in kadmij, so vedno bolj pogoste in niso omejene samo na delavce v industriji. Zastrupimo se lahko s pijačo, hrano ali z vdihavanjem strupenih plinov ali aerosolov. Ob nujnosti ukrepov preventive in zaščite izhaja tudi želja po razumevanju delovanja toksičnih snovi na molekulskem nivoju.

Številne študije povsod po svetu preučujejo vplive toksičnih snovi in iščejo učinkovita sredstva za boj proti boleznim, ki jih povzročajo. Eritrocit je zelo uporaben sistem za preučevanje takih vplivov. Je podrobno preučena, lahko dostopna in zato tudi zelo uporabna celica v različnih študijah. Po vstopu toksičnih snovi v kri so krvne celice prva tarča napada na organizem. To je bil tudi povod za našo študijo o vplivu ionov težkih kovin na eritrocite. V nadaljevanju razpravljamo o opaženih efektih ionov na humane eritrocite.

5.1.1 Statistična analiza rezultatov

Poskus smo zastavili tako, da je bila kri odvzeta več zdravim moškim prostovoljcem (Zavod za transfuzijsko medicino, Ljubljana). Za vsak ionski efektor (Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+}) smo opravili po tri neodvisne meritve, vendar dobljenih vrednosti meritev nismo povprečili. Meritve učinkov posameznih efektorjev iste koncentracije na vzorcih 20 % hematokrita pridobljenih v različnih obdobjih ali dneh odvzema krvi so med drugim pokazale znatno variabilnost v velikosti parametrov τ_{exch} in V_{in}/V_{out} (glej Priloge). Med ljudmi se namreč hematološki parametri, kot sta velikost in volumen eritrocita, razlikujejo (Slika 11). To so lastnosti posameznika.

Povprečenje meritev na vzorcih različnih prostovoljcev ali istega prostovoljca v različnih obdobjih odvzema se torej ne zdi primerno. V poglavju 4 je zato vsaka posamezna grafična predstavitev rezultatov rezultat meritev enega poskusa, torej z eritrociti enega samega prostovoljca, predvsem zaradi lažje primerjave s kontrolnimi vrednostmi. Iz preostalih meritev pa smo ocenili odstopanja med posameznimi meritvami. Le-ta so navedena v besedilu pod vsako sliko. Za nas niso bile pomembne stroge velikosti parametrov τ_{exch} in V_{in}/V_{out} , ampak trend njihovega poteka pod vplivom ionov Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+} . Posebej smo se posvetili analizi volumskih sprememb eritrocitov zaradi delovanja teh ionov.

5.1.2 Uporaba pulzne metode NMR protonov vode

Metoda uporabljene pulzne jedrske magnetne resonance (NMR) protonov vode se v tovrstnih študijah dandanes uporablja le v redkih primerih. Ogromno raziskovalcev na tem področju danes uporablja t.i. »patch-clamp« tehniko, ki jim omogoča študij na eni sami celici, celo na enem samem kanalčku celice. Brez dvoma zelo uporabna metoda, a tudi meritve z metodo pulzne NMR protonov znotrajcelične vode nam nudijo edinstvene podatke, ki jih druge tehnike ne omogočajo.

Pri tej metodi NMR za paramagnetno označevanje uporabljamo ione mangana (Mn^{2+}) v 10 mM koncentraciji. Že večkrat je bilo pokazano, da je ta koncentracija najbolj primerna (Lahajnar, 1992), ker ustvari zadostno razliko med znotrajcelično in zunajcelično protonsko NMR relaksacijo. Celična membrana seveda ni trajna bariera za ione, zato ta metoda ni primerna za ugotavljanje učinka efektorjev čez daljši čas inkubacije (daljši kot ~ 3 ure).

Metoda omogoča zasledovanje časovne konstante τ_{exch} difuzije vode iz znotrajceličnega v zunajcelični prostor in razmerja med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode V_{in}/V_{out} v suspenziji eritrocitov v odvisnosti od časa inkubacije celic z danim efektorjem. Parametra določimo iz grafa dvoekspencialne relaksacijske funkcije $M(t)$ transverzalne magnetizacije protonov vode v vzorcu.

Merski napaki v določevanju parametrov (V_{in}/V_{out} in τ_{exch}) se s časom izvajanja meritev povečujejo. Na začetku poskusa imamo namreč v suspenziji eritrocite z večjim volumnom, zato je amplituda protonskega signala vode iz znotrajceličnega prostora večja. Sčasoma, ko se zaradi delovanja ionov zmanjša celični volumen, se zmanjša tudi amplituda tega signala. Zmanjševanje razmerja med amplitudama protonskega signala vode iz znotrajceličnega in zunajceličnega prostora je zato razlog za večjo mersko napako v določevanju τ_{exch} in V_{in}/V_{out} po daljšem času inkubacije. K napaki delno prispeva tudi počasno prehajanje ionov Mn^{2+} v znotrajcelični prostor, vendar je ta učinek za čase inkubacije eritrocitov z ionskimi efektorji do 120 min zanemarljiv, kar dokazuje, na primer, konstantnost velikosti τ_{exch} kontrolnega vzorca (Slika 11).

Delno težavo pri izvajanju meritev je povzročala tudi rahlo različna temperatura merilne sonde NMR spektrometra. Parameter τ_{exch} je namreč temperaturno odvisen: Z višanjem temperature se krajša. Temperaturni interval naših meritev v različnih dnevih poskusov je bil k sreči dovolj ozek - med 19,5 in 23 °C.

5.1.3 Vpliv ionov Hg^{2+} na humane eritrocite

Rezultati so potrdili, kar sta pred kratkim dokazali skupini Floriana Langa (Eisele in sod., 2006) in Gojmirja Lahajnarja (Lahajnar in sod., 2006) o vplivu živosrebrnih ionov na humane eritrocite. Hg^{2+} povzroči skrčenje eritrocitov (Slika 12) zaradi aktivacije od Ca^{2+} odvisnega K^+ -selektivnega kanalčka (Gárdosevega kanalčka). Do krčenja eritrocita pride zaradi iztoka ionov K^+ , čemur sledi iztok ionov Cl^- zaradi ohranjanja elektronevtralnosti, in posledično izhajanje vode na račun osmoze.

Metoda pulzne NMR protonov znotrajcelične vode je pokazala, da so se eritrociti ob inkubaciji s Hg^{2+} začeli krčiti. Časovna konstanta τ_{exch} difuzijske izmenjave znotrajcelične vode se je v času inkubacije (120 min) skrajšala glede na kontrolno velikost, kar pomeni, da se je skrajšala povprečna življenjska doba molekul vode v eritrocitu. Življenjska doba vode v eritrocitu se – ob nespremenjeni vodni permeabilnosti P_d celične membrane - lahko zmanjša le, če se zmanjša tudi znotrajcelični volumen vode eritrocita (enačba (1)). Predpostavka velja v pogojih nespremenjene površine celice (s). Skupina Lahajnarja je dokazala, da HgCl_2 ne spremeni P_d membrane eritrocita v primerljivih pogojih merjenja (20 % hematokrit, 1 mM HgCl_2). Potemtakem lahko sklepamo, da je bilo opaženo skrajševanje τ_{exch} res posledica zmanjševanja celičnega volumna in ne povečane hemolize. Stopnja hemolize je bila po dveh urah inkubacije z 1 mM HgCl_2 zanemarljiva, kar potrjuje naše sklepe. Poleg τ_{exch} smo prek merjenja razmerja $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ neposredno spremljali tudi znotrajcelični volumen vode eritrocitov. Volumen eritrocitov se je zmanjševal skupaj s krajšanjem τ_{exch} (Slika 12B).

Krčenje eritrocitov je bila najverjetneje posledica aktivacije Gárdosevih kanalčkov. V fizioloških pogojih Gárdosev kanalček ni aktiven, kot tudi ne v mediju brez dodanih ionov K^+ . Povečana znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} , kot posledica spremenjene aktivnosti Ca^{2+} -črpalke, aktivira kanalček, ki začne prepuščati ione K^+ iz celice. Nekateri dvovalentni ioni pa so sposobni aktivirati Gárdosev kanalček tudi neodvisno od Ca^{2+} (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} in Hg^{2+}). Znano je, da je mesto delovanja Hg^{2+} na znotrajcelični strani Gárdosevega kanalčka (Bennekou in Christophersen, 2003). To pomeni, da morajo ioni Hg^{2+} preiti skozi membrano v notranjost celice do mesta delovanja na Gárdosevem kanalčku. Spojina HgCl_2 , uporabljena kot vir ionov Hg^{2+} , ne disociira v celoti, ker ima vez $\text{Hg}-\text{Cl}$ dokajšen značaj kovalentne vezi. To pomeni, da so v raztopini poleg nedisociirane spojine HgCl_2 še HgCl^+ in ioni Hg^{2+} . Ker HgCl_2 dobro prehaja skozi membrano (Gutknecht, 1981), je delovanje Hg^{2+} na Gárdosev kanalček zelo verjetno. Visoka afiniteta Hg^{2+} do tiolnih skupin na Gárdosevem kanalčku pa naj bi bila odgovorna za spremenjeno aktivnost tega kanalčka in s tem povečano prepustnost celične membrane za K^+ (Jungwirth in sod., 1991).

Skupina Floriana Langa (Eisele in sod., 2006) je dokazala, da lahko ioni Hg^{2+} v humanih eritrocitih sprožijo proces programirane celične smrti oz. apoptozo. Eden od značilnih znakov apoptoze je vztrajno, nepovratno upadanje volumna (Lang in sod., 1998), predvsem zaradi aktivacije Gárdosevega kanalčka. V našem primeru ne moremo zagotovo trditi ali so ioni Hg^{2+} sprožili apoptozo ali ne. Resda opazimo konstantno zmanjševanje celičnega volumna (Slika 12B), a dopuščamo, da imajo rezultati po daljšem času inkubacije večjo mersko napako. Menimo, da bi se v primeru apoptoze po 120-tih minutah moral še naprej krajšati tudi τ_{exch} , česar pa nismo opazili. Velikost τ_{exch} se po 100-tih minutah ustali, kar pomeni, da se s celico nič ne dogaja, vsaj glede njenega volumna ne. Kljub temu apoptoza ni izključena, saj ne vemo kaj se dogaja z eritrociti po daljši inkubaciji s Hg^{2+} (več kot 120 minut inkubacije). Izhajanje ionov K^+ iz celice zaradi delovanja Gárdosevega kanalčka ne more potekati v nedogled. Ali se ob tem aktivirajo tudi mehanizmi vzdrževanja volumna, ne moremo zagotovo trditi. Parameter τ_{exch} se resda po 100-tih minutah ustali, vendar ne vemo koliko k temu prispeva aktivacija mehanizma RPV, ki preprečuje nadaljnjo zmanjševanje celičnega volumna.

Iz ugotovitev Lahajnarja in sod. (2006) sklepamo, da se po inkubaciji s Hg^{2+} apoptoza ne sproži v celotni populaciji celic eritrocitov. Po dodatku merkaptetanola v suspenzijo eritrocitov, predhodno inkubirano 60 min s HgCl_2 , se delu celic volumen poveča. Rezultati kažejo, da so učinki Hg^{2+} do neke mere reverzibilni. Apoptotično zmanjševanje volumna pa je nepovraten proces. Kaj se dejansko zgodi po dveh urah inkubacije? Odgovora na vprašanje, ali ima merkaptetanol še reverzibilen učinek (redukcija tiolnih skupin), nam metoda NMR ne daje, niti nam ne omogoča ugotavljanja odstotka celic, v katerih proces apoptoze poteka.

5.1.4 Vpliv ionov Pb^{2+} na humane eritrocite

Rezultati poskusa z ioni svinca (Pb^{2+}) v 20 % hematokritu so v skladu z ugotovitvami skupine Floriana Langa (Kempe in sod., 2005), da ti povzročijo krčenje humanih eritrocitov zaradi neposredne aktivacije Gárdosevih kanalčkov v membrani eritrocitov.

Kot vir svinčevih ionov smo uporabili svinčev acetat. Uporabljene raztopine so vsebovale kloridne ione (Cl^-), ki povzročajo obarjanje ionov Pb^{2+} v netopno belo oborino svinčevega klorida (PbCl_2). Težavi smo se izognili s pripravo svinčevih raztopin s koncentracijami nižjimi od 1 mM, kjer je topnost PbCl_2 večja, in s tem tudi odpravljen problem nastanka oborine.

Krčenje eritrocitov smo zaznali preko krajšanja časovne konstante τ_{exch} v časovnem intervalu inkubacije 120-tih minut. Učinek Pb^{2+} je podoben učinku ionov Hg^{2+} na eritrocite. Pri obeh, Hg^{2+} in Pb^{2+} , smo – kot rečeno – opazili krajšanje τ_{exch} , zmanjševanje

razmerja V_{in}/V_{out} in torej krčenje celičnega volumna s časom po dodatku efektorskega iona. Vse tri koncentracije dodanih ionov Pb^{2+} (0.1 mM, 0.05 mM in 0.0125 mM Pb^{2+}) so povzročile volumsko krčenje eritrocitov. Preliminarni poskusi so pokazali, da svinec pri 1 mM koncentraciji povzroča hemolizo. Učinki Pb^{2+} , prikazani v podpoglavju 4.1.3, so bili zato merjeni pri nižjih koncentracijah Pb^{2+} , takih, ki ne povzročajo hemolize, vsaj ne v roku prvih 120 minut inkubacije eritrocitov s temi ioni.

Predvidevajo, da je anionski izmenjevalec AE1, ki prenaša anione med celico in njeno okolico, odgovoren za prenos ionov Pb^{2+} v notranjost celice v obliki anionskih kompleksov ($\text{Pb}(\text{CO}_3)_2$ ali kot ternarni kompleks $\text{Pb}(\text{CO}_3)_2$ -anion) (Simons, 1986b). V citosolu se Pb^{2+} veže na hemoglobin, kar zmanjša koncentracijo prostih ionov Pb^{2+} v citosolni raztopini (Simons, 1986b).

Tako kot ioni Hg^{2+} , tudi ioni Pb^{2+} neposredno (neodvisno od Ca^{2+}) aktivirajo Gárdoseve kanalčke v membrani eritrocitov in zaradi iztoka ionov K^+ iz znotrajceličnega prostora povzročijo krčenje eritrocitov. Mesto vezave Pb^{2+} na Gárdosev kanalček je na znotrajcelični strani eritrocitne membrane, na istem mestu kot je vezavno mesto za Ca^{2+} . Skupina Langa (Kempe in sod., 2005) predvideva, da so za aktivacijo Gárdosevega kanalčka v nativnih eritrocitih dovoljšnje že submikromolarne koncentracije Pb^{2+} , upoštevajoč vezavo Pb^{2+} na citosolni hemoglobin. Njihovi rezultati so pokazali, da se Gárdosev kanalček aktivira pri 0.01 mM zunajcelični koncentraciji ionov Pb^{2+} v zelo kratkem času. Dokaz, da je bil za krčenje eritrocitov odgovoren Gárdosev kanalček, je podala inkubacija eritrocitov z inhibitorji kanalčka. Najnižja inkubacijska koncentracija Pb^{2+} , s katero smo izvedli poskus, je bila 4 nM (rezultati niso prikazani), vendar nismo opazili nikakršnih sprememb v τ_{exch} ali V_{in}/V_{out} . Iz tega sklepamo, da se pri tej koncentraciji Gárdosev kanalček še ne aktivira, verjetno zaradi prvenstvene vezave prostih citosolnih ionov Pb^{2+} na hemoglobin.

Številni dokazi potrjujejo vpletenost Pb^{2+} pri aktivaciji apoptoze eritrocitov (Kempe in sod., 2005). Aktivacija K^+ -kanalčkov in posledično krčenje eritrocitov sprožita delovanje skramblaze. Skramblaza je encim, ki premešča molekule fosfatidilserina (PS) iz notranjega lipidnega monosloja v zunanje, kar je signal za makrofage, da razgradijo eritrocite s tako modificirano membrano (Lang in sod., 1998; Lang in sod., 2003a; Lang in sod., 2003b; Brovelli in Minetti, 2003; Lang in sod., 2005). Obstoječi viri dajejo nesporen dokaz, da ioni Pb^{2+} sprožijo apoptozo, kar je verjetno res tudi v primeru naših poskusov inkubacije humanih eritrocitov z ioni Pb^{2+} .

Po dodatku Pb^{2+} smo opazili zmanjševanje volumna eritrocitov, kar je eden od znakov apoptoze. Pri vseh treh koncentracijah Pb^{2+} se je časovna konstanta τ_{exch} po 80 minutah inkubacije ustalila in se ni več spreminjala tudi nadaljnjih 40 minut inkubacije, torej sklepamo, da se volumen eritrocitov ni več spreminjal (ob upoštevanju enačbe (1)). Kar pri

tem moti, je razmerje V_{in}/V_{out} , ki se v kasnejšem obdobju inkubacije ne ustali, ampak kaže znake nadaljnega – čeprav zelo zmanjšanega – upadanja. Čeprav smo preverili stopnjo hemolize (bila je zanemarljiva), je najverjetnejša razlaga ta, da je merska napaka v določitvi razmerja V_{in}/V_{out} po daljšem času inkubacije večja, in torej v obsegu opaženega počasnega upadanja razmerja V_{in}/V_{out} v kasnejšem obdobju inkubacije.

Še enkrat poudarjamo, da daje metoda analize dvokomponentne transversalne funkcije magnetizacije $M(t)$ protonov vode v suspenziji eritrocitov v okviru modela točnejše rezultate pri parametru τ_{exch} kot pri V_{in}/V_{out} . Velikost razmerja V_{in}/V_{out} med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode v vzorcu je bila izračunana z analizo funkcije $M(t)$, ki jo določa več parametrov, medtem ko je velikost parametra τ_{exch} možno dokaj zanesljivo oceniti že zgolj iz strmine položnejšega dela krivulje izmerjene funkcije $M(t)$. Pričakovati je, da je zato določevanje velikosti razmerja V_{in}/V_{out} manj natančno od določevanja τ_{exch} .

Pri apoptozi se ne zmanjšuje samo volumen eritrocitov (Bortner in Cidlowski, 2002). Aktivirajo se encimi, ki cepijo proteine citoskeleta, zato je taka celica bolj dovzetna za mehanski stres. Poleg tega začne celica izgubljati membrano, in sicer v obliki membranskih veziklov (Lang in sod., 2005). Ne smemo pozabiti tudi na nastanek ROS, pri čemer sodeluje Pb^{2+} , ki zmanjšujejo tesnost celične membrane in jo naredijo še bolj dovzetno za mehanski stres (Stohs in Bagchi, 1995; Adonaylo in Oteiza, 1999). V tem primeru je na enačbi (1) sloneča korelacija med volumnom eritrocita in τ_{exch} lahko vprašljiva. Izkaže pa se, da možnost tako spremenjenih lastnosti eritrocitne membrane lahko izvezamo – vsaj kar zadeva njeno difuzijsko vodno permeabilnost P_d . Z uporabo matematičnega modela Lahajnarja in sod. (2006), uporabljenega za primer inkubacije humanih eritrocitov z ioni Hg^{2+} , je bilo namreč na osnovi izmerjenih parametrov τ_{exch} in V_{in}/V_{out} v teku inkubacije ter začetnih (kontrolnih) velikosti τ_{exch} in V_{in}/V_{out} možno določiti velikost P_d membrane za poljubno dobo inkubacije. Ker sta učinka efektorskih ionov Hg^{2+} in Pb^{2+} zelo podobna (glej Sliki 12 in 13), je omenjeni model primeren za podobno oceno P_d tudi v primeru inkubacije z ioni Pb^{2+} . In izkaže se, na primer, da se v primeru obeh vrst ionov velikost P_d , tudi v poznem obdobju inkubacije, v okviru merske napake ne razlikuje od velikosti P_d kontrole.

Od ostalih mehanizmov, ki bi lahko sprožili apoptozo po inkubaciji eritrocitov s Pb^{2+} , je znižanje citosolne koncentracije ATP. Pb^{2+} inaktivira številne encime glikolize in poti pentoze fosfata (Lachant in sod., 1984.), kar zmanjšuje količino ATP v celici. Celica pa potrebuje energijo za vzdrževanje svoje nativne oblike (zagotavljajo jo predvsem spektrini). Zmanjšana količina ATP zato lahko vodi do apoptoze (Baranowska-Bosiacka in Hlynczak, 2003).

5.1.5 Vpliv ionov Cd^{2+} na humane eritrocite

Ioni kadmija (Cd^{2+}) so delovali na eritrocite manj uničujoče, vsaj kar zadeva spremembo τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ v prvih dveh urah njihovega delovanja, za razliko od opaženega znatnega učinka Hg^{2+} in Pb^{2+} v enakem časovnem intervalu. Ioni Cd^{2+} lahko delujejo na več mestih, kar jim omogoča podobnost ionskih radijev Cd^{2+} in Ca^{2+} in posledična zmožnost kompetitivne vezave Cd^{2+} na vsa Ca^{2+} -vezavna mesta (Souza in sod., 1996). Funkcija Ca^{2+} -črpalk je zato ob vezavi Cd^{2+} na Ca^{2+} -vezavno mesto prizadeta, kar vodi v povišanje znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} (Verboost in sod., 1989). Višje znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} pa vodijo do modifikacije številnih celičnih poti, med njimi tudi aktivacija Gárdosevih kanalčkov (Cao in Houamed, 1999) in sprožitev apoptoze.

Ca^{2+} ima v celici vlogo sekundarnega obveščevalca. Vsako povečanje nivoja Ca^{2+} aktivira številne celične poti in signalizira spremembe, bodisi v okolici ali znotraj celice. Vzdrževanje nizke koncentracije Ca^{2+} je predpogoj za uspešno delovanje in preživetje celic. Največkrat opisan način delovanja Cd^{2+} na celico je preko porušitve homeostaze Ca^{2+} v celicah (Benters in sod., 1997; Suzuki in sod., 2004; Pathak in Khandelwal, 2006). V celice Cd^{2+} najlažje vstopa skozi Ca^{2+} -kanalčke (Hinkle in sod., 1987; Souza in sod., 1996), pa tudi preko anionskega izmenjevalca (AE1) v obliki anionskih kompleksov (Lou in sod., 1991).

Vpliv ionov Cd^{2+} na časovno konstanto τ_{exch} difuzijske izmenjave znotrajcelične vode in volumsko razmerje $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ znotrajcelične in zunajcelične vode v 20 % hematokritu humanih eritrocitov inkubiranih z 1 mM CdCl_2 (Slika 16) je dosti manj izrazit od učinkov ostalih dveh ionov (Hg^{2+} in Pb^{2+}). Parameter τ_{exch} se že po začetnem skrajšanju (iz kontrolne vrednosti 11,8 ms na 11,0 ms) začne po 9 min inkubacije s Cd^{2+} vračati proti kontrolni velikosti, pri čemer se razmerje $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ ne spreminja.

Možno je, da sta se učinka krčenja zaradi aktivacije Gárdosevih kanalčkov (Cao in Houamed, 1999; Maher in Kuchel, 2003) in nabrekanja eritrocita zaradi inhibicije Ca^{2+} -črpalke (Verboost in sod., 1989) pod vplivom delovanja ionov Cd^{2+} izravnala, kar opazimo kot nespreminjanje parametrov τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ v kasnejšem obdobju inkubacije eritrocitov s Cd^{2+} . K uravnavi volumna k normalnim velikostim verjetno prispevajo še mehanizmi za povečanje celičnega volumna (RPV).

Čeprav obstajajo dokazi, da lahko tudi Cd^{2+} sproži proces apoptoze v različnih celicah (Wätjen in Beyersmann, 2004; Pathak in Khandelwal, 2006), tega pojava v našem poskusu nismo zasledili. Čas inkubacije eritrocitov s Cd^{2+} je bil zaradi časovne omejitve naše metode verjetno prekratek. Znano je, da je Cd^{2+} karcinogen in povzroča, med drugim, raka na jetrih, vendar, kot poročajo drugi (Karmakar in sod., 2000), je za opažene spremembe v

jetrnih in hematoloških parametrov potrebna vsaj 21-dnevna inkubacija s CdCl_2 *in vivo*. Vsekakor bi bilo zanimivo vedeti, v kakšni koncentraciji in po kolikšnem času se v eritrocitih sproži proces apoptoze kot posledica delovanja ionov Cd^{2+} . Do apoptoze lahko pride tudi zaradi posrednega sodelovanja Cd^{2+} pri nastanku ROS (Hansen in sod., 2006), ki oslabijo celično membrano, povečajo njeno prepustnost in tako povečajo vdor ionov Ca^{2+} . Povečana citosolna koncentracija Ca^{2+} pa, kot že omenjeno, lahko inducira apoptozo. Vendar, kot opisujejo drugi (Demir in Öner, 1995), je eritrocitna membrana dokaj odporna proti vplivom ROS.

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov meritev z metodo pulzne NMR protonov vode smo prišli do naslednjih sklepov in ugotovitev:

- Inkubacija humanih eritrocitov z ioni Hg^{2+} ali Pb^{2+} povzroči skrajšanje časovne konstante τ_{exch} difuzijske izmenjave znotrajcelične vode in zmanjšanje volumskega razmerja V_{in}/V_{out} znotrajcelične in zunajcelične vode inkubiranega vzorca eritrocitov, kar kaže na **krčenje eritrocitov**.

Krčenje eritrocitov je glede na obstoječe dokaze posledica aktivacije od Ca^{2+} odvisnega K^+ -kanalčka (Gárdosevega kanalčka), ki poveča iztok ionov K^+ iz celice in posledično osmotsko izgubo celične vode (Kempe in sod., 2005; Eisele in sod., 2006; Lahajnar in sod., 2006).

- Inkubacija humanih eritrocitov z ioni Cd^{2+} v začetku povzroči skrajšanje časovne konstante τ_{exch} , čemur sledi povratek na približno kontrolno raven. Razmerje V_{in}/V_{out} ostaja do konca inkubacije nespremenjeno.

Možno je, da je za skrajšanje τ_{exch} odgovorna aktivacija Gárdosevih kanalčkov (Cao in Houamed, 1999) in za podaljšanje τ_{exch} na približno kontrolno raven inhibicija Ca^{2+} -črpalke s Cd^{2+} (Verboost in sod., 1989). Konstantnost τ_{exch} in V_{in}/V_{out} bi lahko bila posledica izravnave krčenja in nabrekanja eritrocitov preko mehanizmov na katere delujejo ioni Cd^{2+} .

- Vsi trije ioni (Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+}) naj bi povzročali programirano celično smrt oz. apoptozo. Naši rezultati kažejo, da je v primeru ionov Hg^{2+} in Pb^{2+} pojav apoptoze v razpoložljivem času 120 min zelo verjeten, ker oba iona močno aktivirata K^+ -kanalčke, ki dokazano sodelujejo v procesu apoptoze. Razpoložljivi čas inkubacije eritrocitov s Cd^{2+} je bil žal prekratek, da bi lahko zagotovo trdili, ali tudi ti ioni sprožijo apoptozo humanega eritrocita ali ne.

Raziskavo vpliva ionov težkih kovin na sveže humane eritrocite z metodo pulzne NMR protonov vode bi se dalo izboljšali v naslednjih pogledih:

- Z izvedbo celotnega poskusa v enem dnevu (inkubacije z vsemi efektorji, v vseh preučevanih koncentracijah) na eritrocitih ene same osebe;
- Z uporabo K^+ -elektrode za spremljanje iztoka ionov K^+ v zunajcelično raztopino (neposredno spremljanje aktivnosti Gárdosevih kanalčkov);
- S primerjavo rezultatov inkubacije eritrocitov z efektorskimi ioni v mediju z dodanimi ioni Ca^{2+} in brez njih;
- Z uporabo inhibitorjev anionskega izmenjevalca AE1 (npr. DIDS) in Gárdosevega kanalčka (npr. klotrimazol);
- S spremljanjem morfologije eritrocitov zaradi delovanja ionov težkih kovin pod svetlobnim mikroskopom.

6 POVZETEK

Z razvojem in širjenjem industrije je onesnaževanje s težkimi kovinami postalo del našega vsakdana. Zastrupitve s kovinami, kot so živosrebrove spojine, svinec in kadmij, so vedno bolj pogoste in zato so v teku intenzivne raziskave, osredotočene predvsem na mehanizem nastanka bolezenskih stanj kot posledice delovanja ionov teh kovin na celične komponente. Škodljivi učinki teh kovin se, na primer, kažejo v nevrotoksičnosti, nefrotoksičnosti in hepatotoksičnosti (Bingham in sod., 2001). Rdeča krvna celica (eritrocit) je zelo uporaben sistem za preučevanje vplivov ionov težkih kovin na celice. Ta vrsta celice je podrobno preučena in zato tudi uporabna kot modelni sistem v različnih študijah. Poleg tega so po vstopu toksičnih snovi v kri krvne celice med njihovimi prvimi tarčami napada.

Ob pregledu znanih dejstev ter analizi rezultatov sledi, da ioni težkih kovin (Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+}) povzročajo volumske spremembe eritrocitov z delovanjem na kationske kanalčke v celični membrani (Eisele in sod., 2006; Lahajnar in sod., 2006; Kempe in sod., 2005; Benders in sod., 1997). Spremenjeno delovanje teh kanalčkov se izrazi v spremenjenih znotrajceličnih koncentracijah kationov in posledično v osmotskih volumskih spremembah eritrocita. To je bil tudi povod za našo študijo o vplivu ionov težkih kovin na volumske spremembe humanih eritrocitov.

Poskus smo zastavili tako, da je bila kri odvzeta več zdravim moškim prostovoljcem (Zavod za transfuzijsko medicino, Ljubljana). Po izolaciji eritrocitov smo 20 % hematokrit izpostavili 120-minutnemu delovanju posameznih ionov težkih kovin (Hg^{2+} , Pb^{2+} ali Cd^{2+}) različnih koncentracij. Za študij volumskih sprememb eritrocitov kot posledice inkubacije z ioni teh kovin smo uporabili pulzno metodo jedrske magnetne resonance (NMR) merjenja protonske transverzalne magnetizacije znotrajcelične vode, ki se izmenjuje z vodo zunajcelične raztopine. Metoda omogoča neinvazivno zasledovanje volumskih sprememb eritrocitov preko merjenja spremembe volumskega razmerja znotrajcelične in zunajcelične vode. Pri tej NMR metodi paramagnetno označimo zunajcelično raztopino z ioni mangana (Mn^{2+}) v 10 mM koncentraciji, ki ustvari zadostno razliko med protonsko NMR relaksacijo znotrajcelične in zunajcelične vode (Lahajnar, 1992).

Izbrana NMR metoda omogoča zasledovanje časovne konstante τ_{exch} difuzijske izmenjave vode med znotrajceličnim in zunajceličnim prostorom ter razmerja med znotrajceličnim in zunajceličnim volumnom vode V_{in}/V_{out} eritrocitnega vzorca v odvisnosti od časa inkubacije celic z danim efektorjem. Oba parametra določimo iz grafa dvoeksponencialne relaksacijske funkcije $M(t)$ transverzalne magnetizacije protonov vode v vzorcu. Zmanjševanje razmerja med amplitudama protonskega signala vode iz znotrajceličnega in zunajceličnega prostora povečuje mersko napako v določevanju τ_{exch} in V_{in}/V_{out} po daljšem

času inkubacije. K napaki delno prispeva tudi počasno prehajanje ionov Mn^{2+} v znotrajcelični prostor, vendar je ta učinek za čase inkubacije eritrocitov z ionskimi efektorji do 120 min zanemarljiv, kar dokazuje, na primer, konstantnost velikosti τ_{exch} kontrolnega vzorca.

Inkubacija humanih eritrocitov z ioni Hg^{2+} ali Pb^{2+} povzroči skrajševanje časovne konstante τ_{exch} in zmanjševanje volumskega razmerja V_{in}/V_{out} inkubiranega vzorca eritrocitov, kar kaže na krčenje eritrocitov. Rezultati poskusa so pokazali, da je delovanje ionov Hg^{2+} in Pb^{2+} dokaj podobno, tako kvalitativno kot kvantitativno. Krčenje eritrocitov je glede na obstoječe dokaze posledica aktivacije od Ca^{2+} odvisnega K^{+} -kanalčka (Gárdosevega kanalčka), ki poveča iztok ionov K^{+} iz celice in posledično osmotsko izgubo celične vode (Kempe in sod., 2005; Eisele in sod., 2006; Lahajnar in sod., 2006).

Ioni Cd^{2+} so na humanih eritrocitih povzročili dosti manj izrazite učinke. Parameter τ_{exch} se že po začetnem skrajšanju (za okoli 1 ms) začne po 9 min inkubacije s Cd^{2+} vračati proti kontrolni velikosti, pri čemer se razmerje V_{in}/V_{out} ne spreminja. Možno je, da sta se učinka krčenja zaradi aktivacije Gárdosevih kanalčkov (Cao in Houamed, 1999; Maher in Kuchel, 2003) in nabrekanja eritrocita zaradi inhibicije Ca^{2+} -črpalke (Verbost in sod., 1989) pod vplivom delovanja ionov Cd^{2+} izravnala, kar opazimo kot nespreminjanje parametrov τ_{exch} in V_{in}/V_{out} v kasnejšem obdobju inkubacije eritrocitov s Cd^{2+} . K uravnavi volumna k normalnim velikostim verjetno prispevajo še mehanizmi za povečanje celičnega volumna (RPV).

Vsi trije ioni (Hg^{2+} , Pb^{2+} in Cd^{2+}) naj bi povzročali programirano celično smrt ali apoptozo. Naši rezultati kažejo, da je v primeru ionov Hg^{2+} in Pb^{2+} pojav apoptoze humanega eritrocita v razpoložljivem času 120 min zelo verjeten, ker oba iona močno aktivirata K^{+} -kanalčke, ki dokazano sodelujejo v procesu apoptoze. Razpoložljivi čas inkubacije eritrocitov s Cd^{2+} je bil žal prekratek, da bi lahko zagotovo trdili, ali tudi ta ion sproži apoptozo humanega eritrocita ali ne.

Rezultati diplomskega dela potrjujejo zastavljeno hipotezo in so v skladu z že v literaturi opisanimi učinki, ki jih ti ioni povzročajo na molekulskem nivoju. Kljub temu ostaja dovolj odprtih vprašanj za nadaljnje raziskave v smeri študija induciranih volumskih sprememb humanih eritrocitov.

7 VIRI

- Adonaylo V.N., Oteiza P.I. 1999. Pb^{2+} promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. *Toxicology*, 132: 19-32.
- Apps D.K., Cohen B.B., Steel C.M. 1992. *Biochemistry: A concise text for medical students*. 5th ed. London, Baillière Tindall: 448 str.
- Bannon D.I., Olivi L., Bressler J. 2000. The role of anion exchange in the uptake of Pb by human erythrocytes and Madin-Darby canine kidney cells. *Toxicology*, 147: 101-107.
- Baranowska-Bosiacka I., Hlynczak A.J. 2003. The effect of lead ions on the energy metabolism of human erythrocytes in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 134: 403-416.
- Belloni-Olivi L., Anadata G., Goldstein W., Bressler J.P. 1996. Phosphorylation of membrane proteins in erythrocytes treated with lead. *Biochemical Journal*, 315: 401-406.
- Bennekou P., Christophersen P. 2003. Ion channels. V: Red cell membrane transport in health and disease. Bernhard I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 139-152.
- Benters J., Flogel U., Schafer T., Leibfritz D., Hechtenberg S., Beyersmann D. 1997. Study of the interactions of cadmium and zinc ions with cellular calcium homeostasis using ^{19}F -NMR spectroscopy. *Biochemical Journal*, 322: 793-799.
- Berg C.P., Engels I.H., Rothbart A., Lauber K., Renz A., Schlosser S.F., Schulze-Osthoff K., Wesselborg S. 2001. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 8: 1197-1206.
- Bernhardt I., Weiss E. 2003. Passive membrane permeability for ions and the membrane potential. V: Red cell membrane transport in health and disease. Bernhard I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 83-109.
- Betz T., Bakowsky U., Müller M.R., Lehr C.M., Bernhard I. 2006. Conformational change in membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry*, http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6W72-4JN1227-9-1&_cdi=6614&_user=4776866&_orig=search&_coverDate=01%2F31%2F2007&_sk=999299998&view=c&wchp=dGLbVtz-zSkWz&md5=91123516842c42faa58bb6ef3ea5c98a&ie=/sdarticle.pdf (21. dec. 2006) : 5 str.

- Bingham E., Cohrssen B., Powell C.H. 2001. Patty's toxicology. 5th ed. Vol. 2. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 840 str.
- Biomembranes. 2004. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko. (18. okt. 2004)
<http://physics.fe.uni-lj.si/projects/biomembranes.htm> (22.sept. 2006): 1 str.
- Bortner C.D., Cidlowski J.A. 2002. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death and Differentiation*, 9: 1307-1310.
- Bortner C.D., Hughes F.M., Cidlowski J.A. 1997. A primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 51: 32436-32442.
- Bragadin M., Manente S., Cima F. 2005. A new proposal regarding the transport mechanism of mercury in biological membranes. *Inorganica Chimica Acta*, 358: 1237-1240.
- Brahm J. 1982. Diffusional water permeability of human erythrocytes and their ghosts. *Journal of General Physiology*, 79: 791-819.
- Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quantannens B., Tissier J.P., Slomianny C., Sartiaux C., Alonso C., Huart J.J., Montreuil J., Ameisen J.C. 2001. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 8: 1143-1156.
- Brovelli A., Minetti G. 2003. Red cell ageing. V: Red cell membrane transport in health and disease. Bernhardt I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 673-690.
- Browning J., Wilkins R. 2003. Water permeability. V: Red cell membrane transport in health and disease. Bernhardt I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 477-488.
- Bucio L., Souza V., Albores A., Sierra A., Chávez E., Cáramez A., Gutiérrez-Ruiz M.C. 1995. Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*, 102: 285-299.
- Campagna D., Huel G., Hellier G., Girard F., Sahuquillo J., Fagot-Campagna A., Godin J., Blot P. 2000. Negative relationships between erythrocyte Ca-pump activity and lead levels in mothers and newborns. *Life Sciences*, 68: 203-215.
- Cao Y. J., Houamed K. M. 1999. Activation of recombinant human SK4 channels by metal cations. *FEBS Letters*, 446: 137-141.

- Capretta D.R. 2006. Organization of erythrocyte membrane. Houston, Rice University. (23. maj 2005)
<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/rbcmembrane.html>
(22.sept.2006): 1 str.
- Cordero J.F., Rodriguez P.J., Romero P.J. 2004. Differences in intramembrane particle distribution in young and old human erythrocytes. *Cell Biology International*, 28: 423-431.
- Demir S., Öner G. 1995. The effects of cadmium on the fragility of red blood cell. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 8, 2: 75-78.
- Deuticke B. 2003. Membrane lipids and proteins as a basis of red cell shape and its alterations. V: *Red cell membrane transport in health and disease*. Bernhardt I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 27-60.
- Dumaswala U.J., Zhuo L., Jacobsen D.W., Jain S.K., Sukalski S.A. 1999. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: Role of glutathione. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 9/10: 1041-1049.
- Duranton C., Huber S.M., Lang F. 2002. Oxidation induces a Cl^- -dependent cation conductance in human red blood cells. *Journal of Physiology*, 539: 847-855.
- Eisele K., Lang P.A., Kempe D.S., Klarl B.A., Niemöller O., Wieder T., Huber S.M., Duranton C., Lang F. 2006. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 210: 116-122.
- El-Demerdash F.M., Yousef M.I., Kedwany F.S., Baghdadi H.H. 2004. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biological parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 1563-1571.
- El-Missiry M.A., Abou-Seif M. 2000. Photosensitization induced reactive oxygen species and oxidative damage in human erythrocytes. *Cancer Letters*, 158: 155-163.
- Farrar T.C., Becker E.D. 1971. *Pulse and Fourier transform NMR: Introduction to theory and methods*. London and New York, Academic Press: 115 str.
- Foulkes E. 2001. *Mercury*. V: *Patty's toxicology*. Bingham E., Cohn B., Powell C.H. (eds.) 5th ed. Vol.2. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 327- 352.
- Gadian D.G. 1982. *NMR and its application to living systems*. New York, Oxford University Press: 197 str.
- Gárdos G. 1958. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 30: 653-654.

- Gedde M.M., Huestis W.H. 1997. Membrane potential and human erythrocyte shape. *Biophysical Journal*, 72: 1220-1233.
- Gibson J.S., Ellory J.C. 2003. K^+ - Cl^- cotransport in vertebrate red cells. V: Red cell membrane transport in health and disease. Bernhardt I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 197-220.
- Gimenez I., Garay R., Alda J.O. 1993. Molybdenum uptake through the anion exchanger in human erythrocytes. *Pflügers Archiv*, 424: 245-249.
- Gimsa J. 1995. Red cell echinocytogenesis is correlated to the recruitment of external band-3 conformations. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 38: 99-103.
- Gimsa J. 1998. A possible molecular mechanism governing human erythrocyte shape. *Biophysical Journal*, 75: 568-569.
- Gimsa J., Ried C. 1995. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? *Biophysical Journal*, 75: 569-570.
- Girault L., Boudou A., Dufourc E.J. 1997. Methyl mercury interactions with phospholipid membranes as reported by fluorescence, ^{31}P and ^{199}Hg NMR. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1325: 250-262.
- Glaser R. 1998. Does the transmembrane potential ($\Delta\psi$) or the intracellular pH (pH_i) control the shape of human erythrocytes? *Biophysical Journal*, 75: 569-570.
- Goyer R.A. 2001. Lead. V: Patty's toxicology. Bingham E., Cofrissen B., Powell C.H. (eds.) 5th ed. Vol.2. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 611- 676.
- Gutknecht J. 1981. Inorganic mercury (Hg^{2+}) transport through lipid bilayer membranes. *Journal of Membrane Biology*, 61: 61-66.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.
- Hansen J.M., Zhang H., Jones D.P. 2006. Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2 and glutathione by metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 40: 138-145.
- Helmkamp G.M. 2003. Organization of the human erythrocyte membrane. Kansas City, University of Kansas Medical Center.
<http://www.kumc.edu/research/medicine/biochemistry/bioc800/mem02fra.htm>
(22. sept. 2006): 22 str.
- Hinkle P.M., Kinsella P.A., Osterhous K.C. 1987. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *Journal of Biology and Chemistry*, 262: 16333-16337.

- Hsu P.C., Guo Y.L. 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*, 180: 33-44.
- Huber S.M., Gamper N., Lang F. 2001. Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *European Journal of Physiology*, 441: 551-558.
- Jakubowski M. 2001. Zinc and cadmium. V: Patty's toxicology. Bingham E., Cohrssen B., Powell C.H. (eds.) 5th ed. Vol.2. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 253- 326.
- Jungwirth A., Ritter M., Paulmichl M., Lang F. 1991. Activation of cell membrane potassium conductance by mercury in cultured renal epithelioid (MDCK) cells. *Journal of Cellular Physiology*, 146: 25-33.
- Kaestner L., Bernhardt I. 2002. Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry*, 55: 71-74.
- Karbownik M., Gitto E., Lewinski A., Reiter R.J. 2001. Induction of lipid peroxidation in hamster organs by carcinogenic cadmium: amelioration by melatonin. *Cell Biology and Toxicology*, 17: 33-40.
- Karmakar R., Bhattacharya R., Chatterjee M. 2000. Biochemical, haematological and histopathological study in relation to time-related cadmium-induced hepatotoxicity in mice. *Biometals*, 13: 231-239.
- Kempe D.S., Lang P.A., Eisele K., Klarl B.A., Wieder T., Huber S.M., Duranton C., Lang F. 2005. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 288: C396-C402.
- Kimzey S.L., Fischer C.L., Johnson P.C., Ritzmann S.E., Mengel C.E. 2002. SP-368 Biomedical results of Apollo: Hematology and immunology. Washington, NASA. (28. feb. 2002)
<http://history.nasa.gov/SP-368/s3ch3.htm> (22.sept. 2006): 32 str.
- Lachant N.E., Tomoda A., Tanaka K.R. 1984. Inhibition of pentose phosphate shunt by lead: potential mechanism for hemolysis in lead poisoning. *Blood*, 63: 518-524.
- Lahajnar G. 1990. On the measurements and mechanism of water transport across the erythrocyte membrane. *Vestnik Slovenskega kemijskega društva*, 37: 149-170.
- Lahajnar G. 1992. Diffusional water permeability of bovine erythrocytes: A pulse nuclear magnetic resonance study. *Croatica Chimica Acta*, 65:191-200.
- Lahajnar G., Maček P., Zupančič I. 2000. Suppression of red cell diffusional water permeability by lipophilic solutes. *Bioelectrochemistry*, 52: 179-185.
- Lahajnar G., Pečar S., Sepe A. 2006. Na-nitroprusside and HgCl_2 modify the water permeability and volume of human erythrocytes. *Bioelectrochemistry*, 71: 163-169.

- Lang F., Busch G.L., Ritter M., Völkl H., Waldegger S., Gulbins E., Häussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*, 78, 1: 247-306.
- Lang K.S., Duranton C., Poehlmann H., Myssina S., Bauer C., Lang F., Wieder T., Huber S.M. 2003a. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death and Differentiation*, 10: 249-256.
- Lang K.S., Lang P.A., Bauer C., Duranton C., Wieder T., Huber S.M., Lang F. 2005. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 15: 195-202.
- Lang P.A., Kaiser S., Myssina S., Wieder T., Lang F., Huber S.M. 2003b. Role of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human erythrocyte apoptosis. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 285: C1553-C1560.
- Liu Z.P. 2003. Lead poisoning combined with cadmium in sheep and horses in the vicinity of non-ferrous metal smelters. *Science of the Total Environment*, 309: 117-126.
- López E., Arce C., Oset-Gasque M.J., Cañadas S., González M.P. 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radical Biology & Medicine*, 40: 940-951.
- Lou M., Garay R., Alda J.O. 1991. Cadmium uptake through the anion exchanger in human red blood cells. *Journal of Physiology*, 443: 123-136.
- Lytle C. 2003. Na^{+} - K^{+} - 2Cl^{-} cotransport. V: *Red cell membrane transport in health and disease*. Bernhardt I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 173-195.
- Maher A.D., Kuchel P.W. 2003. The Gárdos channel: a review of the Ca^{2+} -activated K^{+} channel in human erythrocytes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 1182-1197.
- Martinov M.V., Vitvitsky V.M., Ataulakhanov F.I. 1999. Volume stabilization in human erythrocytes: combined effects of Ca^{2+} -dependent potassium channels and adenylate metabolism. *Biophysical Chemistry*, 80: 199-215.
- Misra U.K., Gawdi G., Akabani G., Pizzo S.V. 2002. Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: The role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cellular Signalling*, 14: 327-340.
- Mojžiš J., František N. 2000. Cadmium-induced changes in cation-osmotic haemolysis in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 8: 79-81.
- Pathak N., Khandelwal S. 2006. Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium. *Toxicology*, 220: 26-36.

Rasia M., Bollini A. 1998. Red blood cell shape as a function of medium's ionic strength and pH. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1372: 198-204.

Red Blood Cells. 2006. Redmont, Microsoft Corporation. (20. sept. 2006)
http://encarta.msn.com/media_701701822_761575542_-1_1/Red_Blood_Cells.html
(22.sept. 2006): 1 str.

Sachs J.R. 2003. Na^+/K^+ pump. V: Red cell membrane transport in health and disease. Bernhardt I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 111-137.

Sardini A., Amey J.S., Weylandt K.H., Nobles M., Valverde M.A., Higgins C.F. 2003. Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1618: 153-162.

Sarkar S., Yadav P., Bhatnagar D. 1998. Lipid peroxidative damage on cadmium exposure and alterations in antioxidant system in rat erythrocytes: A study in relation to time. *BioMetals*, 11: 153-157.

Sheetz M.P., Singer S.J. 1974. Biological membranes as bilayer couples. A mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71: 4457-4461.

Silbergeld E. K. 2003. Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. *Mutation Research*, 533:121-133.

Simons T.J.B. 1986a. Passive transport and binding of lead by human red blood cells. *Journal of Physiology*, 378: 267-286.

Simons T.J.B. 1986b. The role of anion transport in the passive movement of lead across the human red cell membrane. *Journal of Physiology*, 378: 287-312.

Simons T.J.B. 1988. Active transport of lead by the calcium pump in human red cell ghosts. *Journal of Physiology*, 405: 105-113.

Souza V., Bucio L., Jay D., Chávez E., Gutiérrez-Ruiz M.C. 1996. Effect of cadmium on calcium transport in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*, 112: 97-104.

Stohs S.J., Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 2: 321-336.

Suwalsky M., Ungerer B., Villena F., Cuevas F., Sotomayor C.P. 2000. $HgCl_2$ disrupts the structure of the human erythrocyte membrane and model phospholipid bilayers. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 81: 267-273.

- Suwalsky M., Villena F., Norris B., Cuevas F., Sotomayor C.P. 2004. Cadmium-induced changes in the membrane of human erythrocytes and molecular models. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98: 1061-1066.
- Suwalsky M., Villena F., Norris B., Cuevas F., Sotomayor C.P., Zatta P. 2003. Effects of lead on the human erythrocyte membrane and molecular models. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97: 308-313.
- Suzuki K., Ikebuchi H., Terao T. 1985. Mercuric and cadmium ions stimulate phosphorylation of band 4.2 protein on human erythrocyte membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 7: 4526-4530.
- Suzuki N., Yamamoto M., Watanabe K., Kambegawa A., Hattori A. 2004. Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from the suppression of scale bone cells: the scale is a good model for the evaluation of heavy metals in bone metabolism. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 22: 439-446.
- Škof U. 1998. Vpliv alkoholov na difuzijsko permeabilnost vode skozi eritrocitno membrano. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo: 1-67.
- Tachev K.D., Danov K.D., Kralchevsky P.A. 2004. On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34: 123-140.
- Teti D., Crupi M., Busà M., Valenti A., Loddo S., Mondello M., Romano L. 2005. Chemical and pathological oxidative influences on band 3 protein anion-exchanger. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 16: 77-86.
- Uchida M., Teranishi H., Aoshima K., Katoh T., Kasuya M., Inadera H. 2004. Reduction of erythrocyte catalase and superoxide dismutase activities in male inhabitants of a cadmium-polluted area in Jinzu river basin, Japan. *Toxicology Letters*, 151: 451-457.
- Verboost P.M., Flik G., Pang P.K.T., Lock R.A.C., Wendelaar-Bonga S.E. 1989. Cadmium inhibition of the erythrocyte Ca^{2+} pump. A molecular interpretation. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 10: 5613-5615.
- Vitvitsky V.M., Frolova E.V., Martinov M.V., Komarova S.V., Ataullakhanov F.I. 2000. Anion permeability and erythrocyte swelling. *Bioelectrochemistry*, 52: 169-177.
- Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192: 95-117.
- Wätjen W., Benters J., Haase H., Schwede F., Jastorff B., Beyersmann D. 2001. Zn^{2+} and Cd^{2+} increase the cyclic GMP level in PC12 cells by inhibition of the cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Toxicology*, 157: 167-175.

- Wätjen W., Beyersmann D. 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: Influence of oxidative stress. *BioMetals*, 17: 65-78.
- Wiggers T. B. 2003. The mature red cell and erythrocyte membrane. CLS 312 Hematology Lecture Clinical Lab Science. Mississippi, The University of Mississippi Medical Center. (23. sept. 2003)
<http://cls.umc.edu/COURSES/CLS312/membrane.doc> (22. sept. 2006): 7 str.
- Yano C.L., Marcondes M.C.C.G. 2005. Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro. *Free Radical Biology & Medicine*, 39: 1378-1384.
- Yawata Y. 2003. Cell membrane: The red blood cell as a model. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: 454 str.
- Zimmermann K.C., Bonzon C., Green D.R. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, 92: 57-70.
- Zolla L., Lupidi G., Bellelli A., Amiconi G. 1997. Effect of mercuric ions on human erythrocytes. Relationship between hypotonic swelling and cell aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1328: 273-280.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju, prof. dr. Gojmirju Lahajnarju, za številne vzpodbude, za kritični pregled besedila ter za zaupanje vame v času največjih dvomov. Ob vstopu v večsah krut svet znanosti si ne bi mogla želeli boljšega učitelja.

Zahvaljujem se prof. dr. Slavku Pečarju, somentorju, za pomoč pri zasnovi in izvedbi biokemijskega dela naloge ter za prijetne, pozitivne pogovore.

Hvala Barbari Sobotič, sotrpinki, za pomoč pri delu in iskanju primernih darovalcev krvi.

Za pomoč pri meritvah na NMR pulznem spektrometru se iskreno zahvaljujem Ani Sepe. Zahvala gre tudi dr. Poloni Umek za pomoč pri iskanju primerne prostora za izvedbo poskusa in za pomoč pri grafični obdelavi podatkov.

Posebna zahvala gre Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani, zlasti dr. Marjeti Gadzi, za prijaznost in ogromno olajšanje izvedbe poskusa. Hvala.

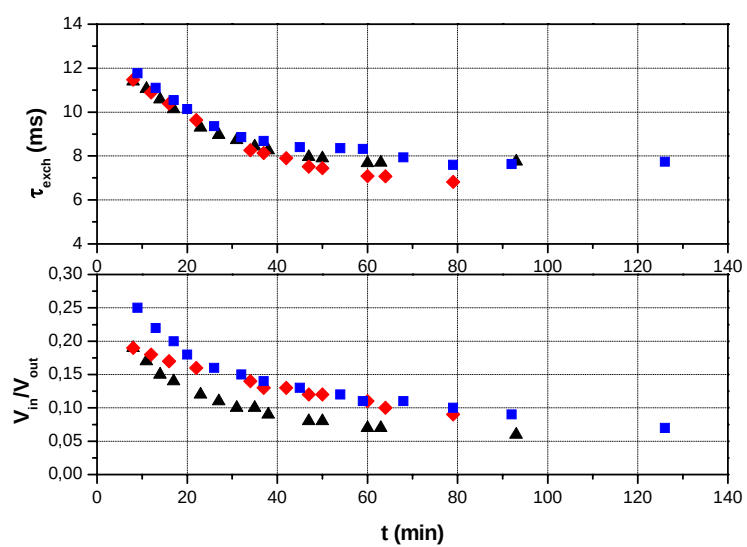
Iz vsega srca se zahvaljujem svoji družini, ki mi je stala ob strani, me podpirala in vzpodbujala vsa leta študija. Srčna hvala tudi moji ljubezni Darku, da je delil z mano trenutke sreče in nesreče.

Hvala vsem, ki ste kakorkoli sodelovali pri nastanku diplomskega dela, bodisi z jutranjimi kavicami ali z vzpodbudnimi besedami.

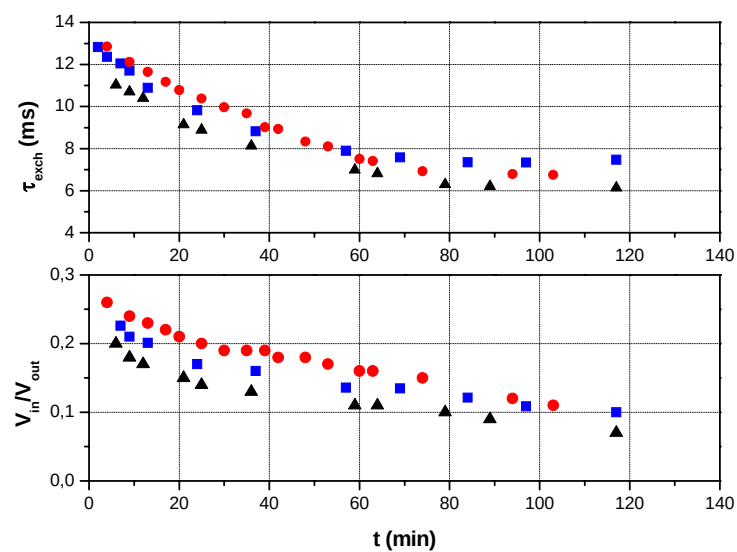
Hvala!

PRILOGE

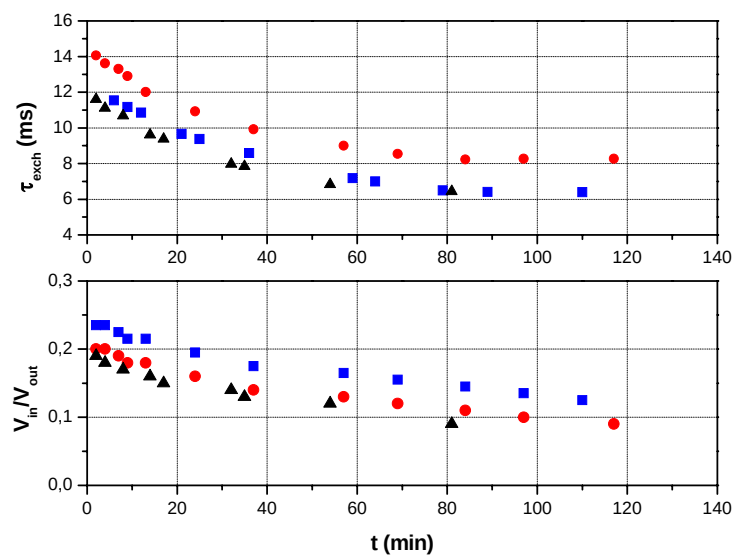
Namen rezultatov v Prilogi je prikaz variabilnosti merskih podatkov dane koncentracije vrste efektorja na vzorcih 20 % hematokrita dobljenih iz krvi darovalcev v različnih obdobjih odvzema krvi.



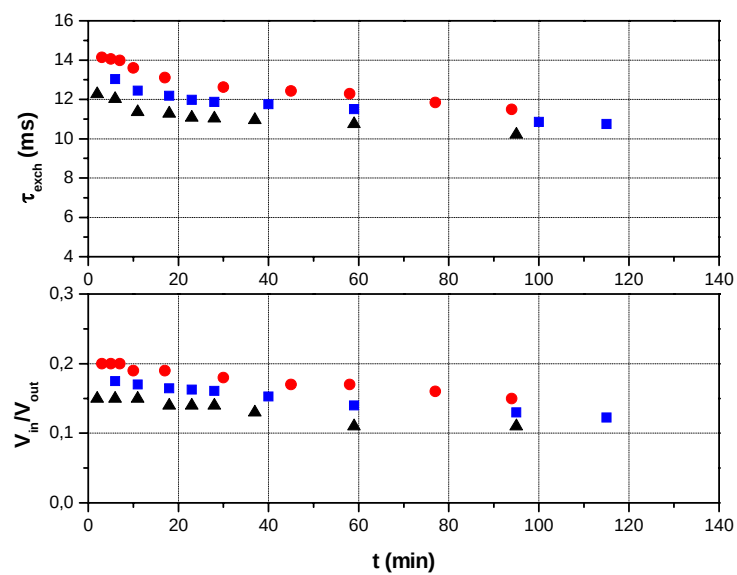
Priloga A1: Primerjava treh časovnih odvisnosti τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ na vzorcih 20 % hematokrita različnih krvodajalcev in 1 mM HgCl_2 .



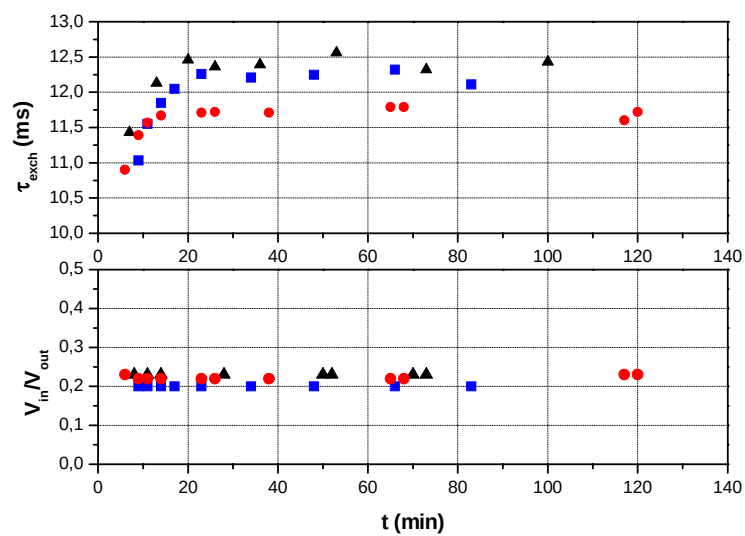
Priloga B1: Primerjava treh časovnih odvisnosti τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ na vzorcih z 20 % hematokritom različnih krvodajalcev in 0.1 mM Pb(acetat)₂.



Priloga B2: Primerjava treh časovnih odvisnosti τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ na vzorcih z 20 % hematokritom različnih krvodajalcev in 0.05 mM Pb(acetat)₂.



Priloga B3: Primerjava treh časovnih odvisnosti τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ na vzorcih z 20 % hematokritom različnih krvodajalcev in 0.0125 mM Pb(acetat)₂.



Priloga C1: Primerjava treh časovnih odvisnosti τ_{exch} in $V_{\text{in}}/V_{\text{out}}$ na vzorcih z 20 % hematokritom različnih krvodajalcev in 1 mM CdCl₂.