

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Barbara SOBOTIČ

**VPLIV NO IN HgCl<sub>2</sub> NA TRANSPORT VODE IN  
OBLIKO HUMANEGA ERITROCITA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Barbara SOBOTIČ

**VPLIV NO IN HgCl<sub>2</sub> NA TRANSPORT VODE IN OBLIKO  
HUMANEGA ERITROCITA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF NO AND HgCl<sub>2</sub> ON WATER TRANSPORT AND  
SHAPE OF HUMAN ERYTHROCYTE**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Z diplomskim delom, ki je bilo opravljeno v laboratoriju za magnetno resonanco Odseka za fiziko trdne snovi na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani, zaključujem univerzitetni študij biologije na Oddelku za biologijo, Biotehniške Fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorja imenovala prof.dr. Gojmira Lahajnarja in za somentorja prof.dr. Slavka Pečarja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Gregor Zupančič  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

Član: prof. dr. Peter Maček  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 5. 9. 2007

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Barbara Sobotič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 577.2:612.014:546.3(043.2)=863  
KG eritrociti/človeški eritrociti/volumske spremembe/oblika eritrocitov/transport vode/  
/Hg/NO/NMR/  
AV SOBOTIČ, Barbara  
SA LAHAJNAR, Gojmir (mentor)/PEČAR, Slavko (somentor)/MAČEK, Peter  
(recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2007  
IN VPLIV NO IN HgCl<sub>2</sub> NA TRANSPORT VODE IN OBLIKO HUMANEGA  
ERITROCITA  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XVI, 110 str., 17 pregl., 47 sl., 185 vir.  
IJ sl  
JI sl/en

AI Ion težke kovine Hg<sup>2+</sup> povzroča krčenje človeških eritrocitov. Proste tiolne (-SH) skupine, ki se nahajajo v številnih membranskih kanalčkih, so znano vezavno mesto teh -SH reaktivnih ionov. Možna razlaga krčenja je aktivacija K<sup>+</sup>-selektivnega Gárdosevega kanalčka zaradi vezave iona na njegovo -SH skupino, kar povzroči iztok znotrajceličnega K<sup>+</sup>, ki ga spremlja osmotsko volumsko krčenje eritrocita. Hg<sup>2+</sup> povzroči prehod eritrocitov iz nativne bikonkavne v ehinocitno obliko in sproži brstenje membrane pri majhnem deležu eritrocitov. Natrijev nitroprusid (NNP) kot donor NO v reakciji s prostimi -SH skupinami ne povzroča volumskih sprememb ali sprememb oblike eritrocita. Najverjetneje povzroči prehodno zmanjšanje difuzijske vodne permeabilnosti membrane eritrocita, ki pa jo z dano metodo nismo uspeli zanesljivo dokazati. Za študij transporta vode skozi membrano eritrocita smo uporabili pulzno metodo protonske jedrske magnetne resonance (<sup>1</sup>H-NMR) merjenja relaksacijske funkcije  $M(t)$  transversalne ( $T_2$ ) magnetizacije protonov vode, ki se izmenjuje med diamagnetnim znotrajceličnim prostorom in paramagnetno označeno (10 mM Mn<sup>2+</sup>) zunajcelično raztopino v vzorcih 20 % hematokrita. Izbrana NMR metoda omogoča zasledovanje časovne konstante  $\tau_{exch}$  difuzijske izmenjave znotrajcelične vode in volumskega razmerja  $V_{in}/V_{out}$  znotrajcelične in zunajcelične vode eritrocitnega vzorca ter določitev ravnovesne difuzijske vodne permeabilnosti ( $P_d$ ) eritrocitne membrane. Hg<sup>2+</sup> je povzročil sočasno zmanjševanje  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$ , kar kaže na inducirano zmanjšanje celičnega volumna. Na sproščanje NO iz NNP sklepamo zaradi hitrega prehodnega skrajšanja  $T_{2,a}$  protonov znotrajcelične vode zaradi paramagnetnega vpliva NO. NO je povzročil podaljšanje  $\tau_{exch}$  ob konstantnem razmerju  $V_{in}/V_{out}$ , iz česar sklepamo na zmanjšanje  $P_d$ . Za študij volumskih in oblikovnih sprememb eritrocitov smo kot neodvisno metodo uporabili tudi svetlobni mikroskop.

## KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDK 577.2:612.014:546.3(043.2)=863  
CX erythrocytes/human erythrocytes/volume changes/erythrocyte shape/water  
transport/ /Hg/NO/NMR/  
AU SOBOTIČ, Barbara  
AA LAHAJNAR, Gojmir (supervisor)/PEČAR, Slavko (co-advisor)/MAČEK, Peter  
(reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2007  
TI VPLIV NO IN HgCl<sub>2</sub> NA TRANSPORT VODE IN OBLIKO HUMANEGA  
ERITROCITA  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XVI, 110 p., 17 tab., 47 fig., 185 ref.  
LA sl  
AL sl/en

AB The heavy metal ion Hg<sup>2+</sup> induces shrinkage of human erythrocytes. These thiol-reactive ions can bind to free thiol (-SH) group, which is located on numerous membrane channels. The activation of K<sup>+</sup>-selective Gárdos channel by binding of Hg<sup>2+</sup> on its -SH group, which leads to leakage of intracellular K<sup>+</sup> and osmotic volume shrinkage, is a possible explanation for the observed cell volume decrease. Hg<sup>2+</sup> causes erythrocyte transition from native biconcave to echinocyte shape and triggers membrane microvesiculation in a small portion of erythrocytes. Sodium nitroprusside (SNP) as an NO donor in the reaction with free -SH groups does not alter erythrocyte shape or volume. It most probably causes a transient decrease of the erythrocyte membrane diffusional water permeability, which we could not prove with certainty using our present method. The induced erythrocyte volume and membrane water permeability changes were deduced from variations in the measured proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) transverse (*T*<sub>2</sub>) relaxation functions *M*(*t*) of water exchanging between the diamagnetic intracellular and paramagnetic (10 mM Mn<sup>2+</sup>) extracellular compartments of the 20 % hematocrit samples. This pulse NMR technique allows the determination of the time constant  $\tau_{exch}$  of exchange of the intracellular water and thus of the diffusional water permeability (*P*<sub>*d*</sub>) of the erythrocyte membrane, as well as the volume ratio *V*<sub>*in*</sub>/*V*<sub>*out*</sub> of intracellular and extracellular water of the erythrocyte sample. Hg<sup>2+</sup> caused a simultaneous decrease of  $\tau_{exch}$  and *V*<sub>*in*</sub>/*V*<sub>*out*</sub>, which indicates a decrease of cell volume. The release of NO from SNP is deduced from the fast transient shortening of *T*<sub>2,*a*</sub> of the intracellular water protons. NO caused lengthening of  $\tau_{exch}$  at constant *V*<sub>*in*</sub>/*V*<sub>*out*</sub> ratio, from which a decrease in *P*<sub>*d*</sub> was deduced. In addition, a light microscope was used as an independent method to study volume and shape changes of human erythrocytes.

## KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORD DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	IX
	KAZALO SLIK	X
	KAZALO PRILOG	XIII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	NAMEN DELA IN HIPOTEZE	3
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b>	<b>5</b>
2.1	SPLOŠNE LASTNOSTI ERITROCITOV	5
2.2	OBLIKA ERITROCITA	6
<b>2.2.1</b>	<b>Sprememba bikonkavne oblike eritrocitov</b>	<b>7</b>
2.2.1.1	Model sklopljenega lipidnega dvosloja	7
2.2.1.2	Brstenje (mikrovezikulacija) eritrocitov	9
2.3	VZDRŽEVANJE VOLUMNA ERITROCITOV	10
<b>2.3.1</b>	<b>Membranski transport ionov v eritrocitih</b>	<b>10</b>
2.3.1.1	Membranske črpalke	12
2.3.1.2	Prenašalci ionov skozi membrano eritrocita	12
2.3.1.2.1	Anionski izmenjevalec AE1	13
2.3.1.3	Ostali kanalčki	14
2.3.1.3.1	Gárdosev kanalček	14
2.3.1.3.2	Vodni kanalček AQP-1	15
2.3.1.3.3	Neselektivni kationski kanalčki (NSC)	16
2.4	APOPTOZA ERITROCITOV	17
<b>2.4.1</b>	<b>Znotrajcelična koncentracija Ca<sup>2+</sup> in asimetrija sestave lipidnega dvosloja</b>	<b>18</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Aktivacija ciklooksigenaze, nastanek prostaglandina E<sub>2</sub> in aktivacija neselektivnih kationskih kanalčkov</b>	<b>18</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Tvorba trombocite aktivirajočega faktorja in stimulacija sfingomielinaze</b>	<b>18</b>
2.5	DELOVANJE Hg <sup>2+</sup> in DUŠIKOVEGA OKSIDA (NO)	19
<b>2.5.1</b>	<b>Hg<sup>2+</sup></b>	<b>19</b>
2.5.1.1	Vpliv na obliko eritrocitov	20
2.5.1.2	Inhibicija encimov, kanalčkov in spremembe v citoskeletu	20

2.5.1.2.1	<b>Blokada AQP-1</b>	21
2.5.1.3	Aktivacija Gárdosevega kanalčka s Hg <sup>2+</sup> in vloga v sprožitvi eritroze	22
2.5.1.4	Nastanek reaktivnih oblik kisika in oksidacija membranskih lipidov	22
<b>2.5.2</b>	<b>Dušikov oksid (NO)</b>	<b>22</b>
2.5.2.1	Sinteza NO v telesu	23
2.5.2.2	Pretvorbe NO v telesu	23
2.5.2.2.1	<b>Reakcije s kisikom</b>	<b>23</b>
2.5.2.2.2	<b>Reakcije s tioli</b>	<b>24</b>
2.5.2.2.3	<b>Reakcije s kovinskimi kompleksi</b>	<b>24</b>
2.5.2.3	Biološka vloga v telesu	24
2.5.2.3.1	<b>Relaksacija gladkih mišic</b>	<b>25</b>
2.5.2.3.2	<b>Spreminjanje dostopnosti NO z eritrociti</b>	<b>26</b>
2.5.2.3.2.1	Reakcija NO s hemoglobinom	26
2.5.2.3.2.2	Zmanjšanje privzema NO skozi eritrocitno membrano	28
2.5.2.3.3	<b>Prenašalci NO <i>in vivo</i></b>	<b>29</b>
2.5.2.3.4	<b>Vpliv NO na makroskopske lastnosti eritrocitov: agregabilnost, deformabilnost, spremembe oblike in volumna</b>	<b>30</b>
2.5.2.4	Natrijev nitroprusid	31
2.5.2.5	Nastanek reaktivnih oblik kisika in oksidacija membranskih lipidov	33
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE DELA</b>	<b>34</b>
3.1	MATERIAL	34
3.1.1	<b>Priprava pufrov in drugih raztopin</b>	<b>34</b>
3.1.2	<b>Priprava eritrocitov</b>	<b>35</b>
3.1.3	<b>Priprava vzorcev</b>	<b>36</b>
3.1.3.1	Vzorci za NMR meritve	36
3.1.3.1.1	Vzorci z 20 % hematokritom	36
3.1.3.1.2	Vzorec s 100 % hematokritom	36
3.1.3.1.3	Vzorec izoosmotskega pufru za eritrocite (B) ter vzorci z raztopinami NNP, KFC, N-acetilcisteina in MnCl <sub>2</sub>	36
3.1.3.2	Vzorci za mikroskopiranje	37
3.1.3.2.1	Vzorci z 0.5 % hematokritom z MnCl <sub>2</sub> in NNP ali HgCl <sub>2</sub>	37
3.1.3.2.2	Vzorci z 0.5 % hematokritom in NNP ali HgCl <sub>2</sub>	37
3.1.3.2.3	Vzorci z 0.5 % hematokritom z MnCl <sub>2</sub>	37
3.1.3.2.4	Vzorci z 0.5 % hematokritom v izoosmotskem pufru za eritrocite	38
3.2	METODE	38
3.2.1	<b>Metoda pulzne jedrske magnetne resonance (NMR)</b>	<b>38</b>
3.2.1.1	Študij hitrosti ravnovesne difuzijske izmenjave vode skozi eritrocitno membrano z merjenjem transverzalne protonske NMR relaksacijske funkcije	39
3.2.1.1.1	Difuzijska vodna permeabilnost eritrocitne membrane in $\tau_{exch}$	42
3.2.1.2	Tehnična izvedba NMR poskusa	45

<b>3.2.2</b>	<b>Mikroskopiranje</b>	<b>47</b>
3.2.2.1	Tehnična izvedba mikroskopiranja	47
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>49</b>
4.1	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	51
4.2	ANALIZA VPLIVA HgCl <sub>2</sub> IN NNP NA $\tau_{exch}$ IN $V_{in}/V_{out}$ Z NMR METODO	52
<b>4.2.1</b>	<b>Meritve transverzalnega relaksacijskega časa protonov vode (<math>T_2</math>)</b>	<b>52</b>
4.2.1.1	Meritve $T_2$ v diamagnetnem vzorcu s 100 % hematokritom	52
4.2.1.2	Meritve $T_2$ v paramagnetnem vzorcu 10 mM raztopine MnCl <sub>2</sub>	53
<b>4.2.2</b>	<b>Prikaz kontrolnih velikosti parametrov <math>\tau_{exch}</math> in <math>V_{in}/V_{out}</math></b>	<b>53</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Slikovni prikaz vpliva HgCl<sub>2</sub> na človeške eritrocite</b>	<b>55</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Slikovni prikaz vpliva NNP na človeške eritrocite.</b>	<b>56</b>
4.2.4.1	1mM NNP	56
4.2.4.2	0.5 mM NNP	58
4.2.4.3	0.25 mM NNP	60
4.2.4.4	0.1 mM NNP	62
4.2.4.5	0.05 mM NNP	64
4.2.4.6	0.025 mM NNP	65
<b>4.2.5</b>	<b>Paramagnetne lastnosti NNP reakcijskih produktov</b>	<b>67</b>
4.3	ANALIZA VPLIVA HgCl <sub>2</sub> IN NNP NA VOLUMEN IN OBLIKO ČLOVEŠKIH ERITROCITOV S SVETLOBNIM MIKROSKOPOM	68
<b>4.3.1</b>	<b>1.3.1 Spremembe volumna človeških eritrocitov zaradi vpliva HgCl<sub>2</sub> in NNP</b>	<b>68</b>
<b>4.3.2</b>	<b>1.3.2. Spremembe oblike človeških eritrocitov zaradi vpliva HgCl<sub>2</sub> in NNP</b>	<b>69</b>
4.3.2.1	Spremembe oblike človeških eritrocitov zaradi vpliva HgCl <sub>2</sub>	69
4.3.2.2	Spremembe oblike človeških eritrocitov zaradi vpliva NNP	73
4.3.2.3	Spremembe oblike človeških eritrocitov v paramagnetno označenih NMR vzorcih	75
4.3.2.4	Spremembe oblike človeških eritrocitov zaradi pridruženih vplivov pri proučevanju vpliva HgCl <sub>2</sub> in NNP pri mikroskopiranju	76
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>80</b>
5.1	RAZPRAVA	80
<b>5.1.1</b>	<b>Uporaba pulzne metode NMR protonov vode</b>	<b>80</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Uporaba mikroskopiranja</b>	<b>81</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Vpliv Hg<sup>2+</sup> na človeške eritrocite</b>	<b>81</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Vpliv NO na človeške eritrocite</b>	<b>86</b>
5.2	SKLEPI	90
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>93</b>



<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>95</b>
7.1	DRUGI VIRI	110

## **ZAHVALA**

## **PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1.	Vzorci z 20 % hematokritom za merjenje z NMR.	46
Preglednica 2.	Vzorec s 100 % hematokritom za merjenje z NMR.	46
Preglednica 3.	Vzorci za preučevanje paramagnetnih efektov NNP in njegovih produktov za merjenje z NMR.	46
Preglednica 4.	Vzorec z 10 mM MnCl <sub>2</sub> za merjenje z NMR.	46
Preglednica 5.	Pregled vzorcev za mikroskopiranje.	48
Preglednica 6.	Izmerjene velikosti $T_2$ na 100 % hematokritu.	53
Preglednica 7.	Izmerjeni velikosti $T_2$ raztopine 10mM MnCl <sub>2</sub> .	53
Preglednica 8.	Analiza vpliva NNP na časovno spreminjanje izmerjenega transverzalnega relaksacijskega časa $T'_{2,a}$ protonov znotajcelične vode v vzorcih 20 % hematokrita.	66
Preglednica 9.	Vpliv NNP na paramagnetnost vzorca.	67
Preglednica 10.	Vpliv NNP na paramagnetnost vzorca v prisotnosti –SH skupin N-acetilcisteina, v hipoosmotskem pufru za eritrocite.	67
Preglednica 11.	Časovno spreminjanje premera eritrocita zaradi vpliva HgCl <sub>2</sub> .	68
Preglednica 12.	Časovno spreminjanje premera eritrocita zaradi vpliva NNP.	68
Preglednica 13.	Časovno spreminjanje števila oblikovno spremenjenih eritrocitov in deleža eritrocitnih duhkov zaradi vpliva HgCl <sub>2</sub> .	69
Preglednica 14.	Časovno spreminjanje števila brstečih eritrocitov zaradi vpliva HgCl <sub>2</sub> .	69
Preglednica 15.	Časovno spreminjanje deleža oblikovno spremenjenih eritrocitov in deleža eritrocitnih duhkov zaradi vpliva NNP.	73
Preglednica 16.	Časovno spreminjanje deleža oblikovno spremenjenih eritrocitov in deleža eritrocitnih duhkov zaradi vpliva sestavin izoosmotskega pufra za eritrocite (A).	76
Preglednica 17.	Časovno spreminjanje deleža oblikovno spremenjenih eritrocitov in deleža eritrocitnih duhkov zaradi vpliva MnCl <sub>2</sub> .	77

## KAZALO SLIK

Slika 1.	Mikrografija človeških eritrocitov s prepoznavno bikonkavno obliko ( <a href="http://biology.uwsp.edu/faculty/SSepsenw">http://biology.uwsp.edu/faculty/SSepsenw</a> ).	5
Slika 2.	Topografska lokalizacija membranskih proteinov človeškega eritrocita in njihove povezave (De Rosa in sod., 2007).	6
Slika 3.	Različne oblike eritrocitov (Svetina in sod., 2004).	8
Slika 4.	A: Mikrografija eritrocitov, inkubiranih v mediju s pH $\approx$ 11 (Iglič in sod., 1998). B,C,D: Mikrografija eritrocitov, inkubiranih v mediju s pH $\approx$ 5 (Bobrowska-Hägerstrand in sod., 1998).	10
Slika 5.	Shema nekaterih transportnih poti v membrani humanega eritrocita. (Bernhardt in Weiss, 2003; Maher in Kuchel, 2003).	11
Slika 6.	Shematski povzetek prevodnostnega mehanizma kanalčka AQP-1 in spreminjanja premera skozi poro kanalčka (de Groot in sod., 2007).	16
Slika 7.	Povzetek signalnih poti in dogajanja pri eritrozi (Lang in sod., 2005).	19
Slika 8.	Shematski prikaz bakterijskega kanalčka AqpZ (Savage in Stroud, 2007).	22
Slika 9.	Shematski prikaz pretvorb NNP v oksičnih in anoksičnih pogojih v prisotnosti tiolov (Wang in Ting, 2005).	32
Slika 10.	Shematski prikaz pretvorbe NNP v sesalskem tkivu (Wang in Ting, 2005).	32
Slika 11.	Shematski prikaz pretvorbe NNP (Grossi in D'Angelo, 2005).	33
Slika 12.	Primer protonske NMR transverzalne relaksacijske funkcije $M(t)$ vode v vzorcu paramagnetno označene suspenzije govejih eritrocitov (Lahajnar, 1992).	42
Slika 13.	Prikaz merilnega signala NMR spektrometra za vzorce z različnimi raztopinami.	50
Slika 14.	Prikaz merilnega signala NMR spektrometra za vzorce z $\approx$ 100 % hematokritom.	50
Slika 15.	Prikaz merilnega signala NMR spektrometra za vzorce z 20 % hematokritom, ki so zunajcelično paramagnetno označeni z 10 mM raztopino MnCl <sub>2</sub> .	51
Slika 16.	Časovna so-odvisnost kontrolnih parametrov $\tau_{exch}$ (A) in $V_{in}/V_{out}$ (B) v paramagnetno označenem vzorcu z 20 % hematokritom več krvodajalcev v času od 23.2. do 30. 5. 2007.	54

Slika 17.	Vpliv 1 mM HgCl <sub>2</sub> na časovno konstanto $\tau_{exch}$ difuzijske vodne izmenjave znotrajcelične vode v zunajcelično paramagnetno označenem vzorcu z 20 % hematokritom.	55
Slika 18.	Vpliv 1 mM HgCl <sub>2</sub> na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode $V_{in}/V_{out}$ v zunajcelično paramagnetno označenem vzorcu z 20 % hematokritom.	55
Slika 19.	Vpliv 1 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode ( $T'_{2,a}$ ).	56
Slika 20.	Vpliv 1 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode $V_{in}/V_{out}$ v suspenziji eritrocitov.	57
Slika 21.	Vpliv 0.5 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode ( $T'_{2,a}$ ).	58
Slika 22.	Vpliv 0.5 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode $V_{in}/V_{out}$ v suspenziji eritrocitov.	59
Slika 23.	Vpliv 0.25 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode ( $T'_{2,a}$ ).	60
Slika 24.	Vpliv 0.25 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode $V_{in}/V_{out}$ v suspenziji eritrocitov.	61
Slika 25.	Vpliv 0.1 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode ( $T'_{2,a}$ ).	62
Slika 26.	Vpliv 0.1 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode $V_{in}/V_{out}$ v suspenziji eritrocitov.	63
Slika 27.	Vpliv 0.05 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode ( $T'_{2,a}$ ).	64
Slika 28.	Vpliv 0.05 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode $V_{in}/V_{out}$ v suspenziji eritrocitov.	64
Slika 29.	Vpliv 0.025 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode ( $T'_{2,a}$ ).	65
Slika 30.	Vpliv 0.025 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode $V_{in}/V_{out}$ v suspenziji eritrocitov.	65
Slika 31.	Mikrografija 0.5 % hematokrita v izoosmotski raztopini NaCl, po 20 minutah (kontrola).	70
Slika 32.	Mikrografija 0.5 % hematokrita v izoosmotski raztopini NaCl, po 60 minutah (kontrola).	70
Slika 33.	Mikrografija 0.5 % hematokrita z 25 $\mu$ M HgCl <sub>2</sub> po 20 minutah.	71

Slika 34.	Mikrografija 0.5 % hematokrita z 25 µM HgCl <sub>2</sub> po 60 minutah.	71
Slika 35.	Mikrografija 0.5 % hematokrita z 25 µM HgCl <sub>2</sub> po 60 minutah.	72
Slika 36.	Mikrografija 0.5 % hematokrita z 0.1 mM HgCl <sub>2</sub> po 45 minutah.	72
Slika 37.	Mikrografija 0.5 % hematokrita z 0.1 m M HgCl <sub>2</sub> po 45 minutah.	73
Slika 38.	Mikrografija 0.5 % hematokrita z 0.25 µM NNP po 20 minutah.	74
Slika 39.	Mikrografija 0.5 % hematokrita z 0.25 µM NNP po 60 minutah.	74
Slika 40.	Mikrografija NMR vzorca kontrole, redčenega na 0.5 % hematokrit z izoosmotskim pufrom za eritrocite (A), po 20 minutah.	75
Slika 41.	Mikrografija NMR vzorca z dodanim 1mM HgCl <sub>2</sub> , redčenega na 0.5 % hematokrit z izoosmotskim pufrom za eritrocite (A), po 20 minutah.	75
Slika 42.	Mikrografija NMR vzorca z 1mM NNP, redčenega na 0.5 % hematokrit z izoosmotskim pufrom za eritrocite (A), po 20 minutah.	76
Slika 43.	Mikrografija 0.5 % hematokrita z 0.25 mM MnCl <sub>2</sub> , po 20 minutah.	77
Slika 44.	Mikrografija 0.5 % hematokrita v v izoosmotski raztopini NaCl takoj po pripravi.	78
Slika 45.	Mikrografija 0.5 % hematokrita v izoosmotski raztopini NaCl po 10 minutah osvetljevanja.	78
Slika 46.	Mikrografija 0.5 % hematokrita v izoosmotski raztopini NaCl takoj po pripravi.	79
Slika 47.	Mikrografija 0.5 % hematokrita v izoosmotskem pufu za eritrocite (A) takoj po pripravi.	79

## KAZALO PRILOG

- PRILOGA 1. Teoretične osnove NMR
- PRILOGA 2. Velikosti  $\Delta\tau_{exch}$ ,  $\Delta V_{in}/V_{out}$ ,  $\Delta V_{eritrocit}$  in  $\Delta pA$  za zunajcelično paramagnetno označene vzorce z 20 % hematokritom in 1 mM HgCl<sub>2</sub>.
- PRILOGA 3. Prikaz izmerjenega  $T'_{2,a}$  na vzorcu z 20 % hematokritom in 0.25 mM NNP.
- PRILOGA 4. Prikaz izmerjenega  $T'_{2,a}$  na vzorcu z 20 % hematokritom in 0.1 mM NNP.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Å	Ångström; 1 Å = 10 <sup>-10</sup> m = 0.1 nm
AE1	anionski izmenjevalec-1
PKB	proteinska kinaza B
Ala	alanin
Arg	arginin
ar/R	restrikcijaska regija v pori akvaporina-1 z aromatsko aminokislino in argininom
Asn	asparagin
AQP-1	vodni kanalček-1 (akvaporin-1)
ATP	adenozin trifosfat
ΔA	razlika med površinama zunanjega in notranjega sloja membrane eritrocita
ΔA <sub>0</sub>	razlika med sproščenima površinama zunanjega in notranjega sloja membrane eritrocita
ΔpA	izračunan hipotetični upad difuzijske vodne permeabilnosti
βCys93	cistein 93 v beta podenoti hemoglobina
BH <sub>4</sub>	(6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat
eNOS	konstitutivna NO sintaza
GTP	gvanozin trifosfat
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
Cys	cistein
deoksiHb	deoksihemoglobin
DIDS	diizotiocianostilben sulfonska kislina
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDRF	od endotelija odvisni vazodilatacijski dejavnik (ang. <i>endothelial-derived relaxing factor</i> )
EDTA	etilendiamintetraacetat
eNOS	endotelijska NO sintaza
FAD	flavindinukleotid
FID	upad signala proste precesije (ang. <i>Free Induction Decay</i> )
GSH	glutation
Hb	hemoglobin
Hb-Fe-NO	nitrozil hemoglobin
Hb-SNO	S-nitrozohemoglobin
His	histidin
KCC	K <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> kotransporter
iNOS	inducibilna NO sintaza
kD	kilodalton, 1000 daltonov; dalton je definiran kot masa nevezanega atoma vodika <sup>2</sup> H v osnovnem stanju; D ≈ 1.66 × 10 <sup>-24</sup> g

---

KFC	kalijev fericianid (K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])
L	liter
M	molarnost, mol/L
$M(t)$	relaksacijska funkcija transverzalne ( $T_2$ ) magnetizacije protonov vode
metHb	methemoglobin
MHz	megahertz, 10 <sup>6</sup> 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
NADPH	adenindinukleotid fosfat
NKCC	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> kottransporter
nM	nanomolarnost, nmol/L
nm	nanometer
NMR	jedrska magnetna resonanca (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NNP	natrijev nitroprusid, Na <sub>2</sub> [Fe(CN) <sub>5</sub> NO].2H <sub>2</sub> O
NO	radikal dušikovega oksida ( $\cdot$ NO)
NOS	$\cdot$ NO sintaza
nNOS	nevronska $\cdot$ NO sintaza
NPA	motiv treh aminokislin, asparagina, prolina in alanina, v pori akvaporina-1
NSC	neselektivni kationski kanalčki
obr./min	obrati na minuto
oksiHb	oksihemoglobin
$P_a$	delež celokupnega protonskega NMR signala znotrajcelične vode (okolje a)
$P_b$	delež celokupnega protonskega NMR signala zunajcelične vode (okolje b)
$P'_a/P'_b$	navidezno razmerje med deležem celokupnega protonskega NMR signala znotrajcelične vode (okolje a) in deležem celokupnega protonskega NMR signala zunajcelične vode (okolje b)
PAF	trombocite aktivirajoči faktor (ang. <i>platelet activation factor</i> )
pCMB	parakloromerkuribenzoid
pCMBS	parakloromerkuribenzen sulfonat
$P_d$	difuzijska vodna permeabilnost oz. koeficient difuzijske vodne permeabilnosti
PE	fosfatidiletanolamin
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
pH	negativni desetiški logaritem efektivne koncentracije H <sup>+</sup>
Phe	fenilalanin
PLA <sub>2</sub>	fosfolipaza A <sub>2</sub>



Pro	prolin
PS	fosfatidilserin
rad	radian; enota za merjenje kota (1 rad = 57,4 °)
rf	radiofrekvenčni
ROS	reaktivne oblike kisika (ang. <i>reactive oxygen species</i> )
RPV	regulativno povečanje celičnega volumna
RZV	regulativno zmanjšanje celičnega volumna
<i>s</i>	površina eritrocita
SH	tiolna oz. sulfhidrilna skupina
SNP	ang. <i>sodium nitroprusside</i>
SOD	superoksidna dismutaza
$T_2$	časovna konstanta: spin-spinski ali transverzalni relaksacijski čas
$T_{2,a}$	časovna konstanta: spin-spinski ali transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode v NMR vzorcu
$T_{2,b}$	časovna konstanta: spin-spinski ali transverzalni relaksacijski čas protonov zunajcelične vode v NMR vzorcu
$T'_{2,a}$	izmerjena časovna konstanta: spin-spinski ali transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode v NMR vzorcu
tGC	topna guanilat ciklaza
TNF	tumorje nekrotizirajoči faktor (ang. <i>tumor necrosis factor</i> )
TRIS HCl	tris (hidroksimetil) aminometan (2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol) z dodatkom kisline HCl
<i>v</i>	volumen znotrajcelične vode eritrocita
<i>v/v</i>	volumsko razmerje
$V_{in}/V_{out}$	razmerje znotrajcelične in zunajcelične vode eritrocitnega vzorca
μL	mikroliter
$\tau_{exch}$	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 osmotsko inducirane prehajanja vode skozi celično membrano.

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 in transporta vode je pomembno poznavanje transportnih poti v celični membrani. Največje število študij membranskih transportnih poti je bilo izvedenih na membrani eritrocita. Eritrociti so visoko specializirane celice, ki so zaradi svoje relativno preproste strukture in lahke dostopnosti med najboljše raziskanimi celicami. V fizioloških pogojih (pH 7.4, ~ 330 mOsm) imajo človeški eritrociti 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.

Plazmatske membrane vseh celic so do neke mere prepustne za vodo kot rezultat počasne difuzije individualnih molekul skozi lipidni dvosloj. Na koncu petdesetih let prejšnjega stoletja so naleteli na zelo zanimiv fenomen pri preučevanju vodne permeabilnosti membran človeških eritrocitov. Odkrili so, da je neravnovesni difuzijski (osmotski) transport vode skozi membrane eritrocitov v anizoosmotskih pogojih do šestkrat večji kot ravnovesni difuzijski transport vode v izoosmotskih pogojih, slednji pa je bil dvakrat večji kot ravnovesni difuzijski transport vode skozi umetni lipidni dvosloj (Paganeli in Solomon, 1957; Sidel in Solomon, 1957; Moura in sod., 1984).

Rešitev te uganke se je ponudila, kot je v znanosti pogosto, naključno, ko je skupina Agreja in sod. leta 1988 izolirala do takrat še neznan 28 kD velik protein, ki so ga poimenovali CHIP28 (*channel-like-integral-protein 28*) (Preston in sod., 1993). Kasneje se je izkazalo, da je ta najdba odgovor na vprašanje o poteh transporta vode preko membrane. Šlo je namreč za prvi izolirani specializirani vodni kanalček – akvaporin 1 ali

AQP-1, ki je odgovoren za izključni in obojesmerni transport molekul vode preko membrane.

Difuzija ne ustvarja neto toka preko membrane in je proces ravnovesnega izoosmotskega okolja. Polovica ravnovesne difuzijske vodne permeabilnosti membran eritrocitov gre na račun AQP-1, drugo polovico pa prispeva prehod vode preko lipidnega dvosloja (Macey in Farmer, 1970). S tem lahko razložimo dvakrat večjo ravnovesno difuzijsko permeabilnost membrane eritrocitov v primerjavi z umetnimi lipidnimi membranami.

V primeru transmembranskega osmotskega neravnovesja voda skozi membrane prehaja z osmozo. Za neto tok skozi membrano eritrocitov je odgovorno gibanje molekul vode skozi akvaporine. Tako je neravnovesna difuzijska (osmotska) permeabilnost membrane eritrocitov šestkrat večja od njihove ravnovesne difuzijske permeabilnosti. Njihova neravnovesna difuzijska permeabilnost pa je desetkrat večja od neravnovesne difuzijske permeabilnosti umetnih lipidnih dvoslojev, kjer ni neto toka skozi membrano, saj sta ravnovesna in neravnovesna difuzijska permeabilnost sta enaki.

Po odkritju prvega akvaporina so začeli iskati njegove blokatorje. Ker ima v ožini kanalčka izpostavljeno –SH skupino cisteina 189, se kot kandidati ponujajo –SH reaktivni reagenti. Živosrebrovi organski spojini p-kloromerkuribenzoat (pCMB) in p-kloromerkuribenzen sulfonat (pCMBS) sta do danes edina znana učinkovita blokatorja AQP-1 posredovanega vodnega transporta v človeških eritrocitih (Browning in Wilkins, 2003).

Druga –SH reagenta sta na primer ion Hg<sup>2+</sup> in radikal  $\cdot$ NO (dalje NO). Če se morda zdi, da je o prvem že mnogo znanega, je pa NO pravi »grdi raček« majhnih signalnih molekul, ki mu do devetdesetih let prejšnjega stoletja niso pripisovali nobene vloge v človeškem telesu. Danes vemo, da je kratkoživa signalna molekula, ki sodeluje v številnih fizioloških procesih. Lahko reagira s kisikom, superoksidom in drugimi radikali, kot tudi s tioli in kovinskimi kompleksi, najpomembnejši med njimi so hemski obroči (Lancaster, 2000). Ob spremeni v »belega laboda« pa se mu odpira ne le vloga v kardiovaskularnem sistemu, kjer je bil prvič opisan, ampak tudi v živčnem, gastrointestinalnem in urogenitalnem sistemu.

Podobno kot je bila uganka o akvaporinih dolgo časa nerešena, tudi NO čaka na svojo razrešitev. NO je bil v človeškem telesu prvič prepoznan kot EDRF (od endotelija odvisni vazodilatacijski dejavnik, ang. *endothelial-derived relaxing factor*), ki ga izloča endotelij žil in povzroči relaksacijo gladkih mišic in s tem padec krvnega tlaka. Za njegovo odkritje je bila leta 1998 podeljena tudi Nobelova nagrada za medicino. Zaradi njegove kratke življenjske dobe v krvožilju (izredno hitro reagira s hemoglobinom v eritrocitih) še vedno

ostaja nejasno, kako NO prispe do gladkih mišic, kateri prenašalci NO aktivnosti so v to vpleteni in kako so med seboj povezani.

Natrijev nitroprusid (NNP) je NO donor, ki je bil v uporabi kot vazodilatator že dolgo časa pred spoznanjem o vlogi NO v telesu. Kljub novim odkritjem mehanizem njegovega delovanja še vedno ni natanko pojasnjen in čaka nova srečna naključja.

Za zasledovanje vpliva Hg<sup>2+</sup> (v obliki HgCl<sub>2</sub>) in NO (iz NNP) na transport vode in obliko humanega eritrocita je na voljo večje število metod. Mi smo se odločili, da bomo za študij transporta vode preko membrane eritrocitov uporabili merjenje transverzalne protonske magnetizacije s pulzno metodo jedrske magnetne resonance (NMR) protonov znotrajcelične vode. Metoda omogoča neinvazivno zasledovanje spremembe časovne konstante difuzijske izmenjave znotrajcelične vode, kot tudi zasledovanje volumskih sprememb eritrocitov preko merjenja spremembe razmerja med znotraj- in zunajcelično množino vode. Kot pomoč pri interpretaciji rezultatov smo si pomagali z opazovanjem eritrocitov pod svetlobnim mikroskopom, kar nam je omogočilo tudi zasledovanje vpliva Hg<sup>2+</sup> in NO na obliko človeških eritrocitov.

## 1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Delovna hipoteza diplomske naloge, zasnovana na podlagi znanih izsledkov iz strokovne literature o delovanju iona Hg<sup>2+</sup> in radikala NO na transport vode in obliko človeškega eritrocita, je naslednja:

- Z neposredno aktivacijo od Ca<sup>2+</sup> odvisnega K<sup>+</sup>-kanalčka (Gárdosevega kanalčka) lahko Hg<sup>2+</sup> povzroči povečan iztok znotrajceličnih ionov K<sup>+</sup> in s tem osmotsko inducirano volumsko krčenje eritrocita.
- Hg<sup>2+</sup> z vezavo na Cys189 akvaporina AQP-1 v ožini pore lahko blokira kanalček.
- Reakcija Hg<sup>2+</sup> s sulfhidrilnimi (-SH) skupinami citoskeleta, ki povzroči prečne povezave tipa -S-Hg-S- in hkratna inkorporacija Hg<sup>2+</sup> v zunanji del lipidnega dvosloja, lahko izzove brstenje membrane.
- Uporabljene koncentracije ionov morda zadoščajo za sprožitev apoptoze človeškega eritrocita (eriptoze). Znano je, da je spremenjeno delovanje Gárdosevega kanalčka del mehanizma apoptoze, ki se kaže v nepovratnem zmanjševanju celičnega volumna in brstenju membrane.

- Produkti oksidacije NO lahko reagirajo z štirimi cisteinskimi ostanki v AQP-1 (predvsem Cys189) in tako s tvorbo nitrozotiolov začasno blokirajo kanalček.
- Ker je radikal NO paramagnetna molekula, lahko njeno sproščanje iz natrijevega nitroprusida v eritrocitni suspenziji dobro zasledujemo z NMR tehniko in s tem dokažemo njeno od svetlobe neodvisno sproščanje.
- NO naj ne bi imel vpliva na obliko in volumen človeškega eritrocita.

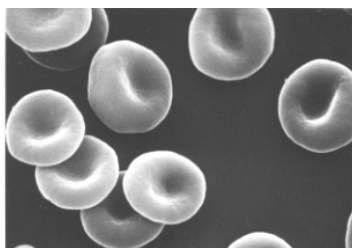
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SPLOŠNE LASTNOSTI ERITROCITOV

Zreli eritrociti 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 in jedra v eritrocitih ni proteinske sinteze, reakcij dihalne verige in celične delitve.

V mirujočem stanju ima eritrocit obliko bikonkavnega diska (Slika 1). Okoli 95 % eritrocitov ima volumen med 60 in 120  $\mu\text{m}^3$  in povprečni premer od 7.2 do 7.4  $\mu\text{m}$  (Wiggers, 2003).

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



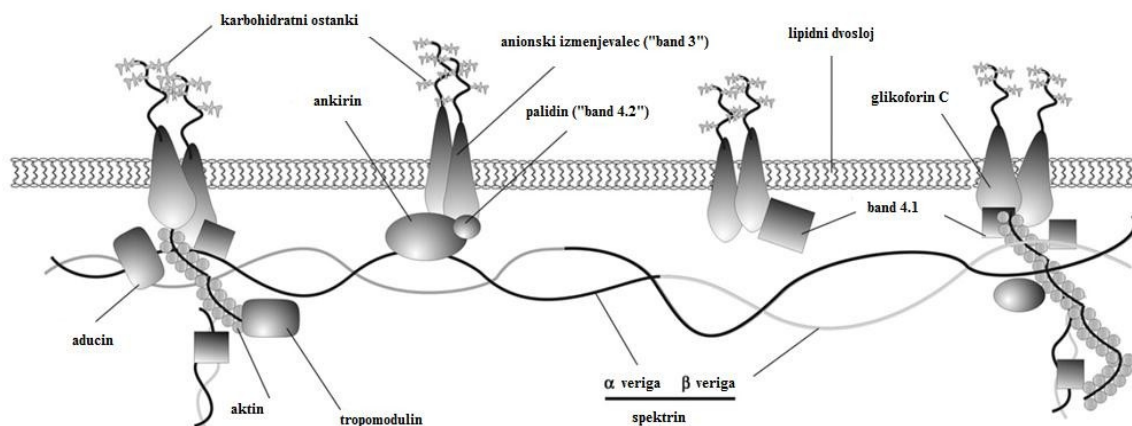
**Slika 1.** Mikrografija človeških eritrocitov s prepoznavno bikonkavno obliko. (<http://biology.uwsp.edu/faculty/SSepsenw>)

Sestava nepoškodovanih eritrocitov je naslednja (Yawata, 2003):

- voda ( $721 \pm 17$  mg/mL eritrocitov),
- proteini (371 mg/mL eritrocitov), od tega
- hemoglobin (335 mg/mL eritrocitov ali 280 milijonov molekul Hb na celico),
- lipidi (5.1 mg/mL eritrocitov) in
- ogljikovi hidrati (80 mg/mL eritrocitov).

Hemoglobin predstavlja več kot 95 % vseh proteinov v eritrocitu in je odgovoren za prenos kisika in ogljikovega dioksida. V citosolu poteka glikoliza in pentoza fosfatna pot za pridobivanje ATP in redukcijskega potenciala, 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, ki je na citosolni strani tik pod lipidnim dvoslojem. Povezavo celične membrane in citoskeletnih proteinov omogočajo sidrni proteini (palidin, ankirin, band 4.1), ki povezujejo spektrine in aktin s citoplazemsko domeno anionskega izmenjevalca AE1 in glikoforinov (Slika 2) (De Rosa in sod., 2007).



**Slika 2.** Topografska lokalizacija membranskih proteinov človeškega eritrocita in njihove povezave (De Rosa in sod., 2007).

## 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. Eritrociti nimajo notranje strukture, zato njihovo obliko določajo fizikalne lastnosti membrane in celični volumen (Svetina in sod., 2004.) Membrano sestavljata dva esencialna dela: lipidni dvosloj in membranski citoskelet, ki je pritrjen na notranji sloj membrane. Elastične lastnosti membrane in citoskeleta tako vplivajo na oblikovne spremembe kot tudi na odzivanje na zunanji stres, kar opišemo kot deformabilnost eritrocitov.

Oblika eritrocitov je prilagojena njihovi najpomembnejši funkciji - prenosu kisika in ogljikovega dioksida. Ugodno razmerje med velikostjo površine eritrocita in njegovo prostornino omogoča olajšan prenos plinov skozi celično membrano ter lažje premikanje eritrocitov po krvnem obtoku. Eritrociti se ob prerivanju skozi kapilare 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 oblike jim omogoča 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).

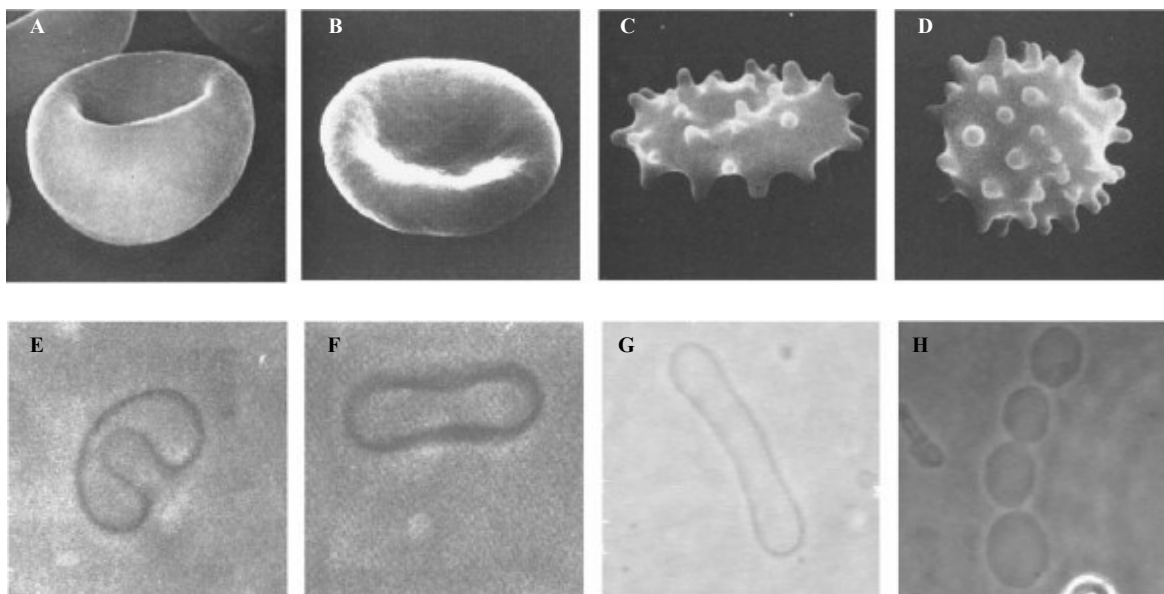
V fizioloških pogojih eritrociti vzdržujejo nekroglasto, nativno bikonkavno obliko. Predpogoj vseh nekroglastih celic je prebitek celične površine, ustvarjen z aktivnim izčrpavanjem ionov in vode. Količina znotrajcelične tekočine je edini citoplazemski parameter, ki neposredno določa celični volumen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

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 nastanek 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 sprememb celične membrane in citoskeleta. Tovrstne spremembe 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 (Deuticke, 2003).

### 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 izovolumske spremembe oblike eritrocitov zaradi asimetričnih sprememb med površinama lipidnih slojev v membrani. Lipidna sloja sta povezana s hidrofobnimi interakcijami, ki ju držijo skupaj. Pravimo, da sta sloja sklopljena, vendar se ob lateralnih pritiskih lahko sprostita neodvisno drug od drugega. Mehanska odzivnost fosfolipidnega dvosloja je odvisna od ekspanzivnosti dvosloja in njegove lokalne in nelokalne ukrivljenosti. Ker je energija, ki bi bila potrebna za kompresijo dvosloja nekaj redov večja kot energija za njegovo ukrivitev velja, da je površina med spremembami oblike konstantna.





**Slika 3.** : Različne oblike eritrocitov. Razlika med površino zunanega in notranjega dela lipidnega dvosloja ( $\Delta A$ ) narašča od leve proti desni. **A:** stomatocit, **B:** diskocit, **C:** ehinocit I, **D:** ehinocit III. **E,F,G,H:** za primerjavo različne oblike fosfolipidnih veziklov ob enakih pogojih kot zgoraj prikazani eritrociti (Svetina in sod., 2004).

Spremembe eritrocitov tipa diskocit-stomatocit (Slika 3A), lahko primerjamo z oblikovnimi spremembami fosfolipidnih veziklov (Slika 3E). Eritrocitni prehod iz diskoidne v stomatocitno obliko je identičen z ustrežajočo spremembo fosfolipidnih veziklov. Spremembo lahko interpretiramo kot zmanjšanje razlike med površino zunanega in notranjega sloja membrane. Citoskelet ne igra vloge pri nastanku stomatocitov, saj se položaj citoskeletnih elementov v stomatocitu ne razlikuje dosti od položaja v diskocitu (Svetina in sod., 2004).

Citoskelet je dvodimenzionalna struktura, ki se lahko premika le lateralno. Vpliv viskoelastičnih lastnosti citoskeleta je viden, kadar je razlika med površinama zunanega in notranjega sloja ( $\Delta A$ ) večja od razlike med površinama sproščenih dvoslojev ( $\Delta A_0$ ). V tem primeru eritrociti ne sledijo oblikovnim spremembam fosfolipidnih veziklov (Slika 3G, 3H), ki tvorijo povezane sferične oblike, ampak nastanejo ehinociti (Slika 3C, 3D). Prispevek citoskeleta je zelo pomemben pri velikih deformacijah, kot je nastanek ehinocitov, saj je odziv citoskeleta nelinearen in se močno poveča ob velikih pritiskih. Tako se morajo relativno ploščati deli citoskeleta ukriviti v notranjost bodic ehinocita. Za stabilno formacijo bodic moramo upoštevati tako elastičnost citoskeleta kot elastičnost membranskega dvosloja (Svetina in sod., 2004).

Po modelu sklopljenega lipidnega dvosloja 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<sup>2+</sup>, idr. so znani povzročitelji ehinocitoze. Stomatocitne oblike pa povzročajo fosfatidilholin, 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; Svetina in sod., 2004).

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

Spremenjene oblike eritrocitov imajo manjšo deformabilnost od diskocitov (Gimsa in Ried, 1995).

#### 2.2.1.2 Brstenje (mikrovezikulacija) eritrocitov

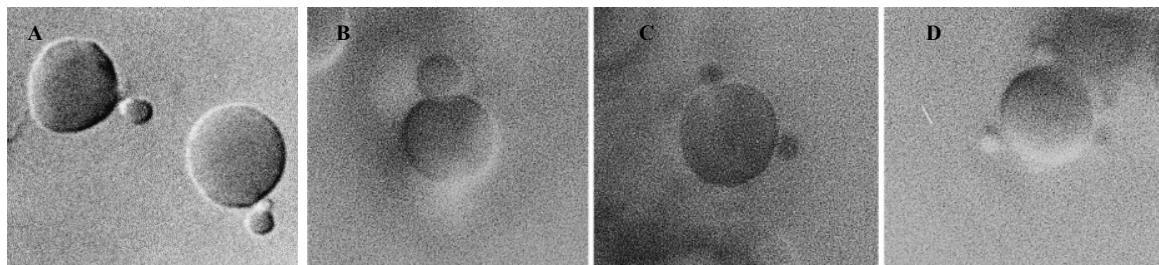
Brstenje eritrocitov je bilo opaženo pod določenimi eksperimentalnimi pogoji. Do njega pride najverjetneje zaradi povečanja razlike med površinama zunanjega in notranjega sloja ( $\Delta A$ ). Nastali brsti večinoma ne vsebujejo spektrina in aktina. Motnja v povezavah med citoskeletom in lipidno membrano je glavna značilnost brstenja eritrocitov (Iglič in sod., 1998).

Znižanje znotrajceličnega pH, zaradi inkubacije v mediju z nizkim pH, zmanjša  $\Delta A$ , kar privede do nastanka stomatocitov. Sledeča agregacija citoskeleta in s tem hipno zmanjšanje površine relaksiranega citoskeleta lahko povzroči nezvezne prehode od stomatocitne k sferični obliki s hčerinskimi celicami (Bobrowska-Hägerstrand in sod., 1998).

Eritrociti, ki jih prenesemo iz nevtralnega medija v medij z visokim pH (pH $\approx$ 11), tvorijo populacijo sferičnih celic z eno ali več manjših sferičnih hčerinskih celic približno enake velikosti (Iglič in sod., 1998). Zvišanje znotrajceličnega pH po doslej še nepoznanem mehanizmu poveča  $\Delta A$ . Ker pride zaradi povišanega pH do prekinitve stikov med lipidi in citoskeletom, se lipidni sloj obnaša kot lipidni vezikli in tvori mikrosfere (Iglič in sod., 1998).

Brstenje membrane nastopi tudi ob fosforilaciji tirozina anionskega izmenjevalca (AE1) (Minetti in sod., 2004), ob aktivaciji Gárdosevega kanalčka ali ob porasti znotrajcelične koncentracije Ca<sup>2+</sup> (Lang in sod., 2005). To povzroči povečan iztok ionov K<sup>+</sup>, krčenje in

sproščanje brstov (mikroveziklov). Brstenje membrane spremlja proces programirane celične smrti (eriptoza) (Lang in sod., 2005).



**Slika 4.** : **A:** Mikrografija eritrocitov, inkubiranih v mediju s pH $\approx$ 11 (Iglič in sod., 1998). **B,C,D:** Mikrografija eritrocitov, inkubiranih v mediju s pH  $\approx$  5 (Bobrowska-Hägerstrand in sod., 1998).

### 2.3 VZDRŽEVANJE VOLUMNA ERITROCITOV

Za vzdrževanje konstantnega volumna so celice razvile mnogo regulatornih mehanizmov. Ob vsaki 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 Donnanov efekt. Ob spremembi zunajcelične ali znotrajcelične osmolarnosti, inducirani transmembranski tok vode povzroči nabrekanje ali krčenje eritrocitov. Vzpostavitev normalnega volumna se zagotavlja s transportom ionov skozi ionske kanalčke, s pomočjo ionskih prenašalcev ali črpalk. Med vsemi ionskimi transportnimi sistemi je najpomembnejša Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> črpalka, ki v največji meri uravnava transmembranske gradientne ionov. S tem se vzpostavi usmerjen tok vode, ki uravnava 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, kar imenujemo 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, ki se imenuje regulatorno povečanje celičnega volumna ali RPV (Lang in sod., 1998; Wehner in sod., 2003).

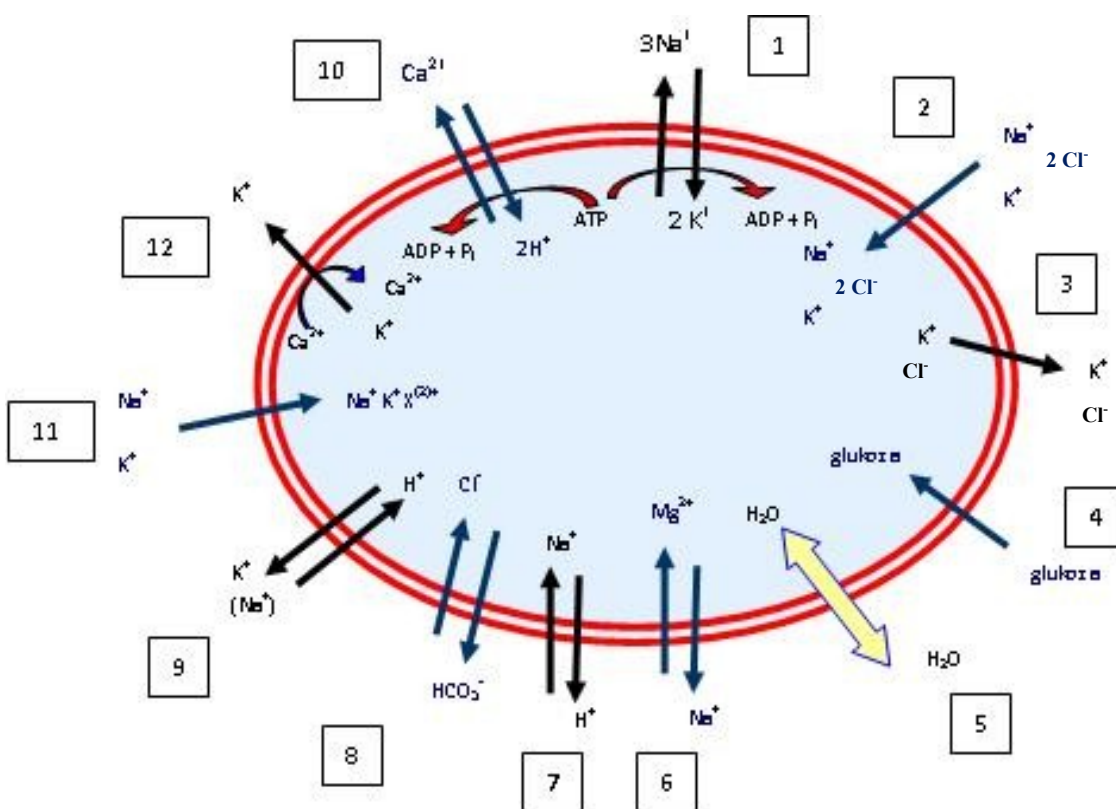
#### 2.3.1 Membranski transport ionov v eritrocitih

Ena od značilnosti celic je neenakomerna porazdelitev anorganskih ionov med zunajceličnim prostorom in notranjostjo celice. Taka porazdelitev je bistvena za

uravnavanje celičnih metabolnih procesov in procesov prenosa celičnih signalov. Vzdrževanje znotrajceličnih koncentracij ionov, kot tudi celičnega volumna, temelji na povezanem delovanju aktivnih in pasivnih transportnih procesov.

Koncentracije ionov v citoplazmi eritrocitov in krvni plazmi so različne. V krvni plazmi zdravih ljudi prevladujejo ioni Na<sup>+</sup> (140 mM) in Cl<sup>-</sup> (110mM), sledijo ioni K<sup>+</sup> (5 mM) in Ca<sup>2+</sup> (1.5 mM). Znotraj eritrocita so koncentracije teh ionov drugačne, prevladujejo ioni K<sup>+</sup> (140 mM), sledijo ioni Na<sup>+</sup> (10 mM) in Cl<sup>-</sup> (2 mM) ter Ca<sup>2+</sup> (60 nM) (Apps in sod., 1992). Za vzdrževanje stalnih 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<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> črpalka, **2:** Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> kotransporter, **3:** K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> kotransporter, **4:** glukozni prenašalec, **5:** vodni kanalček (AQP-1), **6:** Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> izmenjevalec, **7:** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmenjevalec, **8:** anionski (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>) izmenjevalec (AE1), **9:** K<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> izmenjevalec, **10:** Ca<sup>2+</sup>-črpalka, **11:** neselektivni kationski kanalček in **12:** Gárdosev kanalček (Bernhardt in Weiss, 2003; Maher in Kuchel, 2003).

### 2.3.1.1 Membranske črpalke

Znani sta dve od ATP odvisni kationski črpalke, ki v notranjosti celice vzdržujeta nizke koncentracije Na<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup> ter visoke koncentracije K<sup>+</sup> s črpanjem ionov v nasprotni smeri njihovih elektrokemijskih gradientov. Za ta energetsko neugoden proces koristita energijo hidrolize ATP.

Ena je Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaza ali Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-črpalka (Slika 5 (1)). Ta izčrpava ione Na<sup>+</sup> iz celice v zameno za K<sup>+</sup>, in sicer v razmerju 3 : 2 (Sachs, 2003). Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaza z izčrpavanjem Na<sup>+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup>-ATPaza (Slika 5 (10)). Z aktivnim izčrpavanjem ionov Ca<sup>2+</sup> s to črpalko se vzdržuje izredno nizka koncentracija ionov Ca<sup>2+</sup> v celici (okoli 60 nM). Povišane znotrajcelične koncentracije Ca<sup>2+</sup> namreč vodijo do ehinocitogene deformacije membrane, proteolize, dehidracije in znižane deformabilnosti eritrocitov (Yawata, 2003).

Obe črpalke v človeških eritrocitih ustvarjata glavne gradiente kationov preko membrane in zagotavljata integriteto ter normalno preživetje eritrocitov. Črpalke za delovanje porabljata energijo hidrolize ATP, pri čemer vir energije predstavlja glukoza, ki se v celico prenese s pospešeno difuzijo preko posebnega prenašalca (glukoznega prenašalca, (Slika 5 (4)) (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<sup>+</sup> - Cl<sup>-</sup> kotransporter,
- Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> kotransporter,
- Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> izmenjevalec,
- K<sup>+</sup> (Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> izmenjevalec,
- anionski izmenjevalec (AE1) in
- Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmenjevalec.

S prenašalci poteka transport ionov s pospešeno difuzijo v smeri njihovega elektrokemijskega gradienta. Prenašalci imajo afiniteto za ione, ki jih transportirajo in so zanje specifični ter kažejo saturacijsko kinetiko prenosa (Wehner in sod., 2003).

V procesu vzdrževanja celičnega volumna eritrocitov imata največjo vlogo kottransporterja Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> in K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>, ki sta del mehanizma homeostaze znotrajceličnega volumna. Osmotsko krčenje celic vzpodbudi mehanizme sprejema ionov (RPV) preko kottransporterja Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> (NKCC) (Slika 5 (2)), Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmenjevalca (Slika 5 (7)) ali drugih Na<sup>+</sup> kanalčkov. Ob osmotskem nabrekanju pa se aktivirajo mehanizmi odstranjevanja ionov iz celice (RZV) preko K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> kottransporterjev (KCC) (Slika 5 (3)) ali preko ločenih K<sup>+</sup> in Cl<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmenjevalca je v uravnavanju velikosti pH citosolne raztopine (Apps in sod., 1992). Njegova aktivnost je največja v zgodnji fazi zorenja eritrocitov, kasneje pa se zmanjša (Yawata, 2003). Tudi aktivnost K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> kottransporterja 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).

Eritrociti sesalcev s starostjo izgubijo sposobnost uravnavanja svojega celičnega volumna, čeprav imajo v membrani še prisoten K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> kottransporter, 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 1,2x10<sup>6</sup> kopij AE1 (Lucien in sod., 2002). Njegova transmembranska domena posreduje izmenjavo znotrajceličnega HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> za zunajcelični Cl<sup>-</sup>.

Karbonska anhidraza v eritrocitu pospešuje hidracijo CO<sub>2</sub> v ogljikovo kislino (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Ob ionizaciji H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nastane poleg bikarbonata (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) še H<sup>+</sup>, ki se veže na hemoglobin (Bohrov efekt), kar olajša sproščanje kisika s hemoglobinskih molekul v tkivih. Bikarbonat se prenese z eritrociti nazaj v pljuča. AE1 prenaša nastali HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iz eritrocitov v krvno plazmo v zameno za Cl<sup>-</sup>. Ko se hemoglobin pljučih spet oksidira, se H<sup>+</sup> sprosti. V reakciji s sproščenim H<sup>+</sup> s HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> se tvori CO<sub>2</sub>, ki se z izdihovanjem izloči iz telesa. Na ta način se prenese okoli 60 % CO<sub>2</sub> iz tkiv v pljuča in izloči iz telesa.

Izmenjava anionov preko AE1 poteka po mehanizmu ping-pong kot pospešena difuzija. 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 Cl<sup>-</sup> in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. 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).

### 2.3.1.3 Ostali kanalčki

V celicah eritrocitov najdemo še druge kanalčke, kot so vodni kanalček ali akvaporin-1 (AQP-1), od Ca<sup>2+</sup> odvisni K<sup>+</sup>-kanalček (Gárdosev kanalček) in neselektivni kationski kanalčki (NSC). Ioni skozi kanalčke prehajajo s difuzijo v smeri elektrokemijskega gradienta.

#### 2.3.1.3.1 Gárdosev kanalček

Ta kanalček nosi ime po G. Gárdosu, ki je prvi opisal od Ca<sup>2+</sup> odvisni tok ionov K<sup>+</sup> skozi K<sup>+</sup> kanalčke (Gárdos, 1958). Ob povečani citosolni koncentraciji Ca<sup>2+</sup> se aktivira in prepušča ione K<sup>+</sup> iz eritrocita (Slika 5 (12)). V membrani eritrocita je prisotnih od 100 do 200 kopij tega kanalčka (Maher in Kuchel, 2003). Njegovo delovanje uravnava ciklični adenozin monofosfat (cAMP) in kalmodulin (Bennekou in Christophersen, 2003). V zrelih eritrocitih predstavljajo ti kanalčki najbrž pasivni mehanizem uravnave celičnega volumna, ki je učinkovitejši od delovanja Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-črpalke (Martinov in sod., 1999).

Na vse štiri podenote citoplazemske domene kanalčka je tesno vezan Ca<sup>2+</sup> vezavni protein kalmodulin. Ob vezavi Ca<sup>2+</sup> nastopi konformacijska sprememba kanalčka, ki odpre kanalček za K<sup>+</sup>. Ca<sup>2+</sup> poveča prepustnost Gárdosevega kanalčka za K<sup>+</sup> tako, da poveča frekvenco odpiranja kanalčka, ne podaljša pa časa odprtosti kanala (Maher in Kuchel, 2003).

V fizioloških pogojih, in v mediju brez ionov K<sup>+</sup>, je Gárdosev kanalček zaprt, saj se znotrajcelična koncentracija Ca<sup>2+</sup> vzdržuje na zelo nizkem nivoju (60 nM) zaradi stalnega izčrpavanja ionov Ca<sup>2+</sup> s Ca<sup>2+</sup>-črpalke. Povečana znotrajcelična koncentracija Ca<sup>2+</sup> je lahko signal za spremenjeno prepustnost membrane, saj se v tem primeru v nekaj sekundah odzovejo od Ca<sup>2+</sup> odvisni Gárdosevi K<sup>+</sup>-kanalčki, ki z iztokom ionov K<sup>+</sup> preprečijo osmotsko nabrekanje celic.

Divalentni ioni kovin so znani aktivatorji Gárdosevega kanalčka. Najmočnejši aktivator je Ca<sup>2+</sup>, sledijo mu Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> in Ba<sup>2+</sup>. Ostali ioni, kot so Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> in Zn<sup>2+</sup>, ne izzovejo aktivacije kanalčka (Cao in Houamed, 1999; Maher in Kuchel, 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmenjevalec (Slika 5 (7)), ki je del RPV, in naj bi skušal izničiti učinke krčenja celice (Lang in sod., 1998).

### 2.3.1.3.2 Vodni kanalček AQP-1

Vodni kanalček ali akvaporin-1 (AQP-1) (Slika 5 (5)) je konstitutivno odprt, osmotsko reguliran, obojesmerni, močno selektiven integralni membranski protein, specifičen zgolj za transport molekul vode (de Groot in Grubmüller, 2005). Vsi ostali nenabiti topljenci in ioni, vključno s protoni (H<sup>+</sup>) oz. H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, ne morejo prečkati kanala. Prav neprepustnost za H<sup>+</sup> je nujna za vzdrževanje membranskega potenciala bioloških membran, kar je bistvenega pomena za bioenergetiko celic.

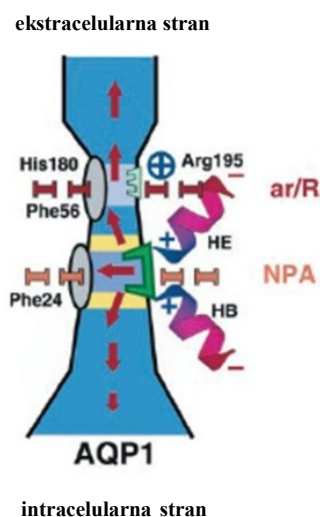
V membrani eritrocitov sesalcev se nahaja samo eden predstavnik številne družine akvaporinov, akvaporin-1 (AQP-1), ki ima najvišjo prevodnost za vodo. Membrana posameznega eritrocita vsebuje okrog 160.000 do 200.000 monomernih kopij akvaporinov, ki so organizirani v tetramere (Lucien in sod., 2002; Smith in Agre, 1991). Za razliko od ionskih kančkov, se kanal za vodo ne nahaja v sredinski osi tetramera, ampak v vsakem monomeru posebej. Pretok vode skozi te kanale je precej velik, v velikostnem redu 10<sup>9</sup> molekul/s, saj v prevodnostni mehanizem niso vpletene počasne konformacijske spremembe kanala. Za primerjavo, tok skozi ionske kanalčke je v velikostnem redu 10<sup>8</sup> ionov/s in tok skozi črpalke v velikostnem redu 300 molekul/s (Borgnia in sod., 1999).

AQP-1 se nahaja tudi v tkivih za transport tekočin, kot so npr. ledvični tubuli, žlezni epitelij (Schrier in sod., 2004) in horoidni pleksus (Moon in sod., 2006; Griesdale in Honey, 2004), kot tudi v endoteliju alveolov, očesni leči (Schrier in sod., 2004), enteričnih nevronih (Nagahama in sod., 2006) in peritonealni membrani (Devuystin in Ni, 2006).

Izključno in hkrati visoko prevodnost za molekule vode zagotavlja dvostopenjski filter v pori kanalčka (de Groot in sod., 2003a). Prva stopnja filtra je nizko hidrofoben aminokislinski NPA motiv (Asn-Pro-Ala) v centralnem delu kanalčka. Druga stopnja filtra je aromatska aminokislina/arginin (ar/R) konstriksijska regija. Aminokislinski ostanki v ožini kanala omogočajo nadomestek za pretrgane vodikove vezi med molekulami vode, ki



morajo samostojno prečkati ožino kanalčka, kar znatno zniža aktivacijsko energijo za prehod in omogoča visoko permeacijsko stopnjo. Te interakcije so najmočnejše v območjih obeh filtrov (de Groot in sod., 2003b). Zaradi lokalnega električnega polja v regiji NPA, se dipoli vode organizirajo v vzorec s simetrijskim centrom v tej regiji. ar/R filter je najožji del kanala, s premerom 2,8 Å, kar ustreza van der Waalsonovem premeru molekule vode. Pozitivno nabita aminokislinska ostanka (Arg195 in His 180) v ar/R tvorita vodikove vezi z molekulami vode. Ker se protoni med molekulami vode prenašajo po Grotthussovem mehanizmu preko vodikovih vezi, je zaradi njihove prekinitve v obeh filterih, reorientacije in elektrostatske bariere električnega polja v regiji NPA, pretok protonov onemogočen. Ožina kanalčka, lokalno električno polje in reorientacija dipolov in pozitivno nabiti aminokislinski ostanki pa preprečujejo prehod ostalim permeantom (de Groot in sod., 2003a). Opisana struktura kanalčka je splošno znana pod imenom model peščene ure.



**Slika 6.** Shematski povzetek prevodnostnega mehanizma kanalčka AQP-1 in spreminjanja premera skozi poro kanalčka. Svetlo modro je območje najšibkejših vodikovih vezi med molekulami vode (NPA (oranžni) in ar/R (rdeči) filter). Območje najmočnejših interakcij protein-voda je označeno z zeleno. Sivi elipsi predstavljata aromatska aminokislinska ostanka. Hidrofobni Phe24 sili molekule vode v interakcijo z NPA regijo. Hidrofobni Phe56 sili molekule vode v ar/R filter. Rdeče puščice prikazujejo orientacijo dipolov vode. Rumena obroča predstavljata hidrofobni regiji, ki sta energijski oviri za prehod molekul vode (de Groot in sod., 2007).

### 2.3.1.3.3 Neselektivni kationski kanalčki (NSC)

V membrani eritrocitov se 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<sup>-</sup> (Huber

in sod., 2001). Kanalček NSC je prepusten za Ca<sup>2+</sup> in se aktivira s prostaglandinom E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), 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), igrajo pa vlogo tudi v procesu apoptoze eritrocitov (Eisele in sod., 2006).

## 2.4 APOPTOZA ERITROCITOV

Organizem mora imeti razvit mehanizem za odstranjevanje starejših ali okvarjenih eritrocitov, saj lahko nekontrolirana hemoliza eritrocitov aktivira vnetni odgovor, prost hemoglobin pa izredno hitro nevtralizira dušikov oksid, ki je vazoaktivni mediator. 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 poti aktivacije kaspaz. Ekstrinzična pot se začne z vezavo liganda smrti (iz družine tumorje nekrotizirajočih faktorjev (TNF)) na receptor smrti, intrinzično pot pa sprožijo mitohondrijske poškodbe zaradi oksidativnega stresa. Preko skupnih in ločenih poti aktivacij kaspaz in tvorbe apoptosoma, se preko obeh poti izvrši apoptoza (Zimmerman in sod., 2001; Turk in sod., 2007).

Do nedavnega je veljalo, da pri eritrocitih apoptoza ne obstaja, ker je ta proces vezan na mitohondrije, ki jih v eritrocitu ni. Čeprav vsebuje eritrocit nekatere kaspaze, se le-te v zrelem eritrocitu nikoli ne aktivirajo (Berg in sod., 2001). Proces programirane smrti pri eritrocitih imenujemo eriptoza, ker se apoptoza eritrocitov zaradi odsotnosti celičnih organelov razlikuje od apoptoze drugih celic (Bratosin in sod., 2001; Lang in sod., 2003a). Eriptoza nam odkriva od mitohondrijev neodvisne poti izvršitve apoptoze.

Eriptozo karakterizirajo nepovratno celično krčenje, brstenje membrane, aktivacija proteaz in premestitev fosfolipida fosfatidil serina (PS) v zunanji sloj membrane. Slednja sproži degradacijo eritrocitov z makrofagi (Lang in sod., 2005). Eriptozo sproži povečana zunajcelična osmolarnost, oksidativen stres ali energijska deprivacija (Lang in sod., 2005). Do zdaj sta bili odkriti dve signalni poti, ki vodita do eriptoze. Na eni strani nastanek prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) preko aktivacije ciklooksigenaze vodi do odprtja neselektivnih kationskih kanalčkov (NSC), kar poveča intracelularno koncentracijo Ca<sup>2+</sup>. Povišan nivo Ca<sup>2+</sup> v celici je lahko tudi signal spremenjene prepustnosti celične membrane zaradi ostarelosti ali okvare eritrocitov (Brovelli in Minetti, 2003). Na drugi strani pa aktivacija fosfolipaze A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) vodi do sproščanja trombocite aktivirajočega faktorja (PAF), izpostavitve ceramida in aktivacije Gárdosevega kanalčka (Lang in sod., 2005).

### 2.4.1 Znotrajcelična koncentracija Ca<sup>2+</sup> in asimetrija sestave lipidnega dvosloja

V zunanjem sloju membrane prevladuje fosfatidilholin in sfingomielin, v notranjem pa fosfatidiletanolamin (PE) in fosfatidilserin (PS), slednji se nahaja izključno v notranjem sloju (Lopez-Revuelta in sod., 2007). Nativno asimetrijo sestave lipidnega dvosloja vzdržujejo različni encimi. Tako od ATP-odvisna aminofosfolipid translokaza (flipaza) aktivno prenaša PS in v manjši meri PE iz zunanjega v notranji lipidni sloj in je tako vzdržuje neenakomerno porazdelitev PS in PE med obema slojema v membrani (Kuypers in sod., 1998; Devaux, 1999; Lopez-Revuelta in sod., 2007).

Pomemben signal za pričetek eriptoze je povečana znotrajcelična koncentracija Ca<sup>2+</sup>, ki vstopi preko aktiviranih kationskih kanalčkov. Povečana znotrajcelična koncentracija Ca<sup>2+</sup> aktivira encim *skramblazo*, ki neselektivno premešča lipide iz notranjega v zunanji sloj, s tem pa povečuje delež PS v zunanjem sloju. Posledica tega je razpad nativne asimetrije zaradi zvečanja PS na citosolni polovici membranskega dvosloja (Yawata, 2003), kar je signal za makrofage, ki se vežejo na izpostavljene zunajcelične skupine PS eritrocitne membrane in celice fagocitirajo. Na ta način se iz organizma odstranjujejo ostareli, nefunkcionalni eritrociti (Bratosin in sod., 2001).

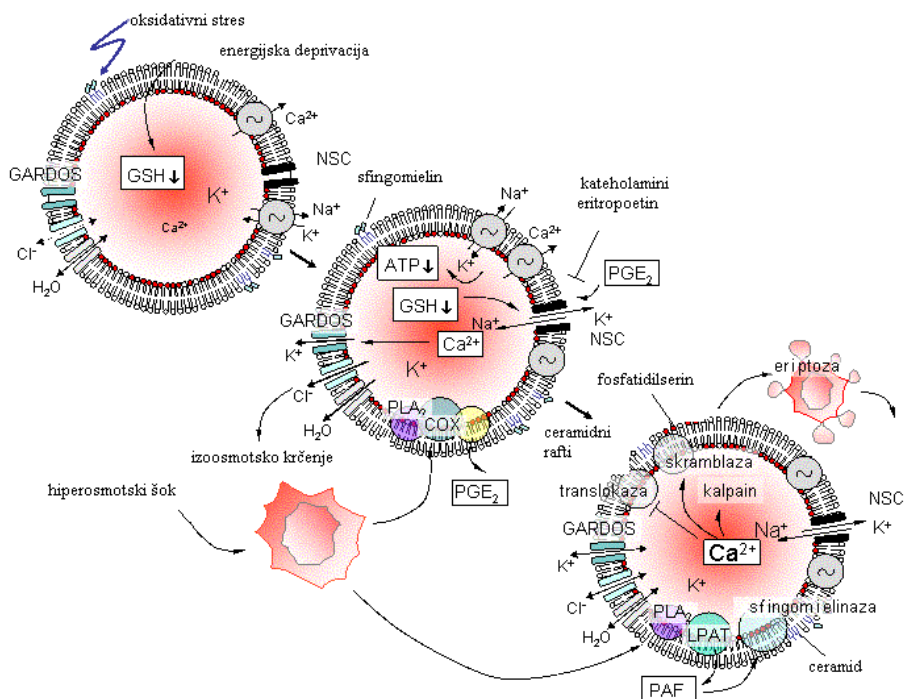
### 2.4.2 Aktivacija ciklooksigenaze, nastanek prostaglandina E<sub>2</sub> in aktivacija neselektivnih kationskih kanalčkov

Hiperosmotski šok, oksidativni stres in energijska deprivacija (zmanjšan razpoložljiv reducirani glutation (GSH) oslabi antioksidativno obrambo v vodi v oksidativni stres) ter odstranitev Cl<sup>-</sup> povzročita sproščanje PGE<sub>2</sub>, ki aktivira NSC (Lang in sod., 2007). Zaradi tega se poveča intracelularna koncentracija Ca<sup>2+</sup>, kar stimulira izpostavitvev PS s posredovanjem skramblaze in odprtje od Ca<sup>2+</sup> odvisnih K<sup>+</sup> kanalčkov (Gárdosevi kanalčki). Povečano izhajanje K<sup>+</sup> ionov povzroči hiperpolarizacijo membrane in iztok Cl<sup>-</sup> iz celice. Temu sledi osmotsko izhajanje vode in krčenje celice (Maher in Kuchel, 2003; Lang in sod., 2003a; Bortner in Cidlowski, 2002; Bortner in sod., 1997). To še dodatno okrepi signal za eriptozo. PGE<sub>2</sub> aktivira tudi od Ca<sup>2+</sup> odvisno cisteinsko endopeptidazo  $\mu$ -kalpain, ki degradira citoskelet. Povišana intracelularna koncentracija Ca<sup>2+</sup> na koncu vodi tudi v vezikulacijo membrane (Lang in sod., 2005).

### 2.4.3 Tvorba trombocite aktivirajočega faktorja in stimulacija sfingomielinaze

Eritrociti ob močnem krčenju poleg PGE<sub>2</sub> tvorijo tudi PAF, ki je odgovoren za regulacijo vnetja, tromboze, in aterogeneze (Lang in sod., 2005). PAF stimulira sfingomielinazo, ki

cepi sfingomielin in sprošča ceramid. Tako osmotski šok vodi do pojava ceramida na površini eritrocitov, poleg tega pa sproži tudi vezikulacijo membrane in izpostavitvev PS. PAF aktivira Gárdoseve kanalčke tako, da jih naredi bolj občutljive za znotrajcelični Ca<sup>2+</sup> (Lang in sod., 2003a). Za signalizacija preko PAF povišana intracelularna koncentracija Ca<sup>2+</sup> ni nujna, zato je povišan nivo PAF vsaj delno odgovoren za od Ca<sup>2+</sup> neodvisno, s ceramidom posredovano eriptozo (Lang in sod., 2003a).



**Slika 7.** Povzetek signalnih poti in dogajanja pri eriptozii. ATP: adozintrifosfat, GSH: glutation, PGE<sub>2</sub>: prostaglandin E<sub>2</sub>, NSC: neselektivni kationski kanalčki, PLA<sub>2</sub>: fosfolipaza A<sub>2</sub>, COX: ciklooksigenaza, PAF: trombocitni stimulirajoči faktor, LPAT: lizo-PAF acetil transferaza (Lang in sod., 2005).

## 2.5 DELOVANJE Hg<sup>2+</sup> in DUŠIKOVEGA OKSIDA (NO)

### 2.5.1 Hg<sup>2+</sup>

Elementarno živo srebro je dokaj inertno in netoksično. Se pa hitro oksidira v ion Hg<sup>2+</sup>, ki lahko reagira s proteini in drugimi biološko pomembnimi molekulami. Hg<sup>2+</sup> tvori relativno stabilne kovalentne vezi z ogljikom, zato ga najdemo tudi v organskih spojinah. Človek je živosrebovim spojinam izpostavljen preko hrane (predvsem morskega izvora) ter preko kozmetičnih in terapevtskih pripravkov, kot so zobna belila, antiseptiki in zobne plombe na osnovi Hg amalgana (Foulkes, 2001).

Skozi celično membrano eritrocita vstopa Hg<sup>2+</sup> v elektronevtralni obliki, bodisi kot HgCl<sub>2</sub> ali Hg(OH)<sub>2</sub> (Gutknecht, 1981; Bragadin in sod., 2005). V notranjosti celice pa Hg<sup>2+</sup> reagira s številnimi molekulami, predvsem s tiolnimi (-SH) skupinami proteinov.

### 2.5.1.1 Vpliv na obliko eritrocitov

HgCl<sub>2</sub> se rad kopiči v lipidnem dvosloju in ima visoko afiniteto za primarne amino skupine fosfolipidov. Posledično lahko spremeni fluidnost membrane ali izgubo njene integritete, kar v živčnih celicah vodi do nevrotoksičnosti (Girault in sod., 1997). Pri eritrocitih inducira krenacijo (nenormalne oblike membrane s koničastimi oblikami), ki variira med maloštevilnimi zaobljenimi izboklinami in generaliziranim pojavom ehinocitoze (Suwalsky in sod., 2000). Možen je tudi pojav stomatocitov, vendar le v zelo majhnem številu (Suwalsky in sod., 2000).

Interakcija Hg<sup>2+</sup> z večimi negativno nabitimi glavami lipidov lahko inducira tesnejše pakiranje v hidrofobno-hidrofilni fazi. To bi lahko zmanjšalo prehajanje molekul vode in/ali zmanjšalo dinamiko vodnih molekul, ki oblikujejo visoko strukturirano okolje v področju polarnih fosfolipidnih glav. Hg<sup>2+</sup> pa prav tako vpliva na pakiranje acilnih verig v hidrofobnem jedru dvosloja (Suwalsky in sod., 2000).

Ehinociti in stomatociti se tvorijo ob spremembi razlike med površinama zunanega in notranjega sloja ( $\Delta A$ ) membrane. Raziskave Zollaja (1997) kažejo, da se Hg<sup>2+</sup> preferenčno kopiči v zunanjem sloju. To bi razložilo nastanek ehinocitov ob dodanem HgCl<sub>2</sub>. Obstajajo pa tudi nasprotujoče študije, ki kažejo, da se Hg<sup>2+</sup> preferenčno kompleksira s fosfatidiletanolaminom in fosfatidilserinom, ki sta prisotna v notranjem sloju, kar bi vodilo do nastanka stomatocitov (Devaux, 1999).

### 2.5.1.2 Inhibicija encimov, kanalčkov in spremembe v citoskeletu

Hg<sup>2+</sup> 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 v celični membrani. Z vezavo na -SH skupine encimov lahko Hg<sup>2+</sup> zavre njihovo delovanje. Na delovanje celičnih komponent vpliva nastanek prečnih povezav tipa -S-Hg-S-, ki lahko povežejo oddaljene tiolne skupine proteinov in tako spremenijo njihovo konformacijo. Topografska sprememba membranskih proteinov zaradi vezave Hg<sup>2+</sup> olajša fosforilacijo številnih proteinov, zlasti palidina (band 4.2), ki ima med citoskeletnimi elementi največje število vezavnih mest za Hg<sup>2+</sup>. Palidin se po obdelavi celične membrane s Hg<sup>2+</sup> poveže z mrežo spektrinov in fosforilira s proteinsko kinazo

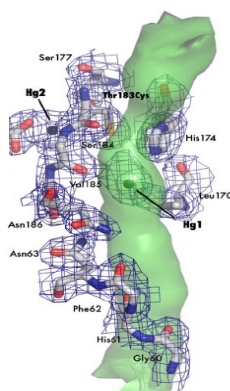
(Suzuki in Ikebuchi, 1985). Hg<sup>2+</sup> ima visoko afiniteto še do aaminskih, fosfatnih in karboksilnih skupin.

#### 2.5.1.2.1 Blokada AQP-1

V ožini kanalčka akvaporina je tiolna skupina (na Cys189) dovzetna za inhibicijo z živosrebovimi spojinami (Preston in sod., 1993). Znano je, da živosrebove spojine, z vezavo na Cys 189, popolnoma blokirajo kanalček akvaporinov, vendar inhibicija ni specifična. V strukturi AQP-1 so namreč prisotne še tri druge za Hg<sup>2+</sup> dostopne tiolne skupine. Od živosrebovih spojin sta *p*CMB (*p*-kloromerkuribenzoat) in *p*-CMBS (*p*-kloromerkuribenzen sulfonat) edina znana učinkovita inhibitorja delovanja AQP-1, ki sta bila neposredno uporabljena na človeških eritrocitih (Brahm, 1982; Browning in Wilkins, 2003).

Veliko posrednih dokazov za blokado pore kanalčka AQP-1 v humanih eritrocitih obstaja tudi za HgCl<sub>2</sub>, ki dokazano blokira človeški AQP-1, kadar je kloniran v membrano jajčeca žabe krepljičarke *Xenopus laevis* in v različne celične kulture (Yang in sod., 2006). Prav tako blokira AQP-1 v podganjih eritrocitih (Yang in sod., 2006). Mutante AQP-1, ki imajo Cys189 zamenjan z drugim aminokislinskim ostankom, so neobčutljive na blokado s HgCl<sub>2</sub> (Preston in sod., 1993).

Vezava Hg<sup>2+</sup> na Cys 189 naj bi sterično ovirala prehod molekul vode brez konformacijskih sprememb kanalčka, kar so pokazali na bakterijskem strukturnem analogu AqpZ *Eserichie coli*, ki ima na mestu 183 (kar ustreza mestu 189 AQP-1) originalen treonin zamenjan s cisteinom. Tak kanalček veže dva Hg<sup>2+</sup>, enega direktno v lumnu pore in drugega intersticijsko vezanega v žepu tik izven pore (Savage in Stroud, 2007).



**Slika 8.** Shematski prikaz bakterijskega kanalčka AqpZ. Površina pore je označena zeleno. Označene so aminokisliline, ki sodelujejo pri vezavi vode z vodikovo vezjo. Zelena sfera predstavlja Hg<sup>2+</sup>, vezan na Cys183 v pori, modra pa vezanega na isti Cys183 v žepu ob pori (Savage in Stroud, 2007).

### 2.5.1.3 Aktivacija Gárdosevega kanalčka s Hg<sup>2+</sup> in vloga v sprožitvi eritroze

Hg<sup>2+</sup> prehodno aktivira Gárdosev kanalček neodvisno od Ca<sup>2+</sup> preko interakcij z njegovimi –SH skupinami. Povečano izhajanje K<sup>+</sup> povzroči hiperpolarizacijo membrane in iztok Cl<sup>-</sup> iz celice. Temu sledi osmotsko izhajanje vode iz celice in s tem krčenje celice (Lang in sod., 2003a,b; Jungwirth in sod., 1991).

Ioni Hg<sup>2+</sup> z aktivacijo skremblaze povzročijo izpostavitve fosfolipidnih molekul PS na zunanjo stran lipidnega dvosloja membrane eritrocitov. Aktivirajo tudi sfingomielinazo, ki sprošča ceramid (Eisele in sod., 2006). Izpostavljeni PS je ligand za receptorje makrofagov in omogoča neškodljivo degradacijo eritrocitov (Eisele in sod., 2006).

### 2.5.1.4 Nastanek reaktivnih oblik kisika in oksidacija membranskih lipidov

Splošen toksični učinek Hg<sup>2+</sup> je padec koncentracije prostih znotrajceličnih tiolnih skupin, kar neposredno omogoča razvoj oksidativnega stresa. Oksidativni stres je posledica neravnovesja v nastajanju in odstranjevanju reaktivnih oblik kisika (ROS) v tkivih in celičnih komponentah. Do teh poškodb pride na celičnih membranah, DNK in proteinih (Hsu in Guo, 2002). Med tovrstne poškodbe sodi tudi lipidna peroksidacija (Bucio in sod., 1995; Foulkes, 2001).

Hg<sup>2+</sup> posredno pripomore k nastanku ROS. Nastali radikali (hidroksilni radikali, superoksidni anioni in vodikov peroksid) reagirajo s fosfolipidi celične membrane. Oksidacija membranskih lipidov z ROS povzroči nastajanje togih domen fosfolipidov v membrani, kjer je omogočena pospešena reakcija z radikali (Adonaylo in Oteiza, 1999; Silbergeld, 2003). Hidroperoksidi lipidnih molekul v celični membrani 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; Adonaylo in Oteiza, 1999; Ribarov in Benov, 1981; Brandao in sod., 2005; Silbergeld, 2003). 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.

## 2.5.2 Dušikov oksid (NO)

Dušikov oksid NO (NO v nadaljevanju) je kratkoživi mediator, ki sodeluje v številnih procesih v organizmih (Ignarro, 2002). Njegovo odkritje v bioloških sistemih je povzročilo precejšnje presenečenje, saj je do tedaj veljal le za škodljiv, brezbarven

pramagnetni plin, ki je sestavina izpušnih plinov, stalna sestavina smoga, nastaja pa tudi v razelektritvah v atmosferi (Fukuto in sod., 2000; Byrne-Habič in sod., 2004).

### 2.5.2.1 Sinteza NO v telesu

Sintezo NO v telesu katalizirajo NO sintaze (NOS), ki so flavohemski encimi. Substrat je aminokislina L-arginin, ki ga encim pretvori v NO in citrulin ob prisotnosti nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfata (NADPH) in O<sub>2</sub>. Udeleženi so še kofaktorji (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>), flavinadenindinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN) in železov protoporfirin IX (hem). Aktivnost je odvisna tudi od vezave kalmodulina in koncentracije ionov Ca<sup>2+</sup>, dodatno se regulira preko post-translacijskih mehanizmov, fosforilacije ter preko negativne povratne zanke z NO, ki encim inhibira (Moncada in Higgs, 2002; Wink in sod., 1998; Wang in Ting, 2005). Pri sesalcih NOS nastopajo v treh oblikah: endotelijska NOS (eNOS), nevronska NOS (nNOS) in inducibilna NOS (iNOS). Prvi dve sta konstitutivno prisotni (skupno ju imenujemo cNOS), se aktivirata s povišano koncentracijo Ca<sup>2+</sup> in generirata majhne kratkotrajne tokove NO, ki imajo regulatorno vlogo. iNOS se aktivira s citokini in je prisotna v imunskih celicah. Sintetizira večje količine NO, ki povzročijo indirektno citotoksične efekte (Wink in sod., 1998).

### 2.5.2.2 Pretvorbe NO v telesu

#### 2.5.2.2.1 Reakcije s kisikom

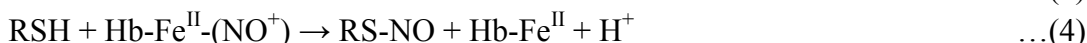
O<sub>2</sub> je v membranah v trikrat višji koncentraciji kot v vodni fazi, NO pa je v njih celo devetkrat bolj koncentriran kot v vodi. (Subczynski in Hyde, 1983; Shaw in Vosper, 1977; Ye in sod., 2001). Iz tega je razvidno, da je membrana daleč najpomembnejše mesto avtooksidacije NO. V njej poteka 90 % vseh reakcij NO s kisikom, kljub temu, da membrane predstavljajo samo 3 % prostornine celice (Liu in sod., 1998; Ye in sod., 2001; Ignaro, 2000; Möller in sod., 2007). NO se v reakciji s kisikom pretvori v radikal  $\dot{\text{N}}\text{O}_2$ , ki hitro dimerizira v N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Ta povzroča nitroziliranje aminov (nastanek kancerogenih nitrozaminov) in s tioli tvori nitrozotiole. Raziskave kažejo, da je najverjetnejša pretvorba  $\dot{\text{N}}\text{O}_2$  v nitrit z enoelektronsko redukcijo. V primeru velikih koncentracij  $\dot{\text{N}}\text{O}_2$  lahko pride do nitriranja tirozinov in njihove radikalske dimerizacije. NO z NO<sub>2</sub> tvori N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Ta v vodi hitro razpade. V membrani, kjer ni dosti molekul vode, je bolj dolgoživ in sposoben nitroziranja (nastanek nitrozotiolov); peptidi z -SH skupinami imajo visoko afiniteto za N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Wink in sod., 1994; Wink in sod., 1996; Wink in sod., 1998). V reakciji s superoksidnim radikalom da peroksinitrit ( $\dot{\text{O}}\text{ONO}$ ), ki lahko sproži lipidno peroksidacijo (O'Reilly in sod., 2002; Byrne-Habič in sod., 2004).



Razpolovni čas NO v telesu je med 1 in 10 sekundami (Lancaster, 2000), kar je mnogo krajše kot razpolovni čas zaradi reakcij s kisikom (40 minut (Fukuto in sod., 2000; Byrne-Habič in sod., 2004)). Iz tega sklepamo, da obstajajo pomembnejše reakcije pretvorbe NO kot je avtooksidacija.

#### 2.5.2.2.2 Reakcije s tioli

S-nitrozotioli nastanejo v reakciji z N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, s transnitroziranjem ali s posredniško vlogo NO, vezanega na hemsko železo (Hu in Chou, 2006). Te reakcije so pomembne, saj ima nitroziliranje tiolnih skupin aminokislinskih ostankov proteinov (encimi, kanalčki, transkripcijski faktorji, G-proteini) reverzibilni vpliv na njihovo funkcijo. S-nitrozilacija je v mnogih pogledih analogna fosforilaciji. Možno je, da je vzporedna efektorska pot za uravnavanje celičnih funkcij (Gaston in sod., 2006).



#### 2.5.2.2.3 Reakcije s kovinskimi kompleksi

Obstajajo trije glavni tipi reakcij NO s kovinami: direktna reakcija NO s kovinskim centrom, NO redoks reakcija z dioksigen kovinskim kompleksom in reakcija z visokovalentnim oksokompleksom (Herold in Rehmann, 2003). Nitroziranje hemskega železa v metaloproteinih, kot so topna guanilat ciklaza, monooksigenaze, ciklooksigenaze, citokromi, hemoxygenaze, katalaze in NOS, je najpogostejša in najpomembnejša med njimi. Vezava NO lahko povzroči aktivacijo ali inaktivacijo encima. V vaskularnem sistemu pa ima poleg tega vezava NO na hemoglobin velik pomen, saj ta deluje kot ponor NO in kot njegov morebiten prenašalec (Ignarro, 2002).

#### 2.5.2.3 Biološka vloga v telesu

NO je udeležen v vrsti fizioloških in patofizioloških procesov v telesu. Njegova vloga je bila najprej opisana v kardiovaskularnem sistemu, za kar je bila leta 1998 podeljena tudi Nobelova nagrada za medicino. NO ima pomembno vlogo tudi v centralnem živčnem sistemu kot neurotransmiter v procesu pomnjenja, na periferiji je pomemben pri delovanju neadrnergičnega in neholinergičnega živčevja, ki sodeluje pri nekaterih oblikah vazodilatacije. Vključen je v regulacijo respiratornih, urogenitalnih in gastrointestinalnih

funkcij ter regulacijo kontraktilnosti srca. Je del citotoksične obrambe imunskih celic (Ignarro, 2002).

Večina njegovih fizioloških učinkov je vezana na aktivacijo topne guanilat ciklaze (tGC), citotoksičnost pa je povezana z reaktivnostjo njegovih oksidiranih oblik. Spekter njegovega regulatornega delovanja na molekularni ravni je zelo širok, saj preko modificiranja dostopnih –SH skupin in kovinskih kompleksov vpliva na delovanje številnih encimov, kanalčkov, integralnih membranskih proteinov in genskih regulatornih elementov.

V nadaljevanju bomo natančneje opisali vlogo NO v reologiji krvi (tu vpliva na endotelij žil, gladke mišice, trombocite, eritrocite, levkocite) (Wink in sod., 1998; Ignarro, 2000).

#### 2.5.2.3.1 Relaksacija gladkih mišic

V normalnih, bazalnih pogojih, cNOS v endoteliju žil konstantno sintetizira nizke koncentracije NO. Višji nivo sinteze se lahko sproži z od proteinske kinaze B (PKB) odvisno fosforilacijo zaradi zvečanja strižnih sil na endotelij (povečan pretok, povečana rigidnost eritrocitov), zaradi vezave ligandov (acetilholin, bradikinin, substanca-P, adenzin in druge vazoaktivne snovi) na receptorje ali zaradi hipoksije (Cohen in Adachi, 2006). To povzroči sproščanje znotrajceličnih zalog Ca<sup>2+</sup> in aktivacijo cNOS. V endoteliju je še druga izooblika NOS, iNOS, ki se aktivira ob vnetju z bakterijskimi eksotoksini (lipopolisaharid) in citokini (TNF, interlevkini). Aktivirana iNOS je do tisočkrat bolj aktivna kot cNOS. Sproščeni NO difundira v kri in v ob endoteliju ležeče gladke mišice. Ali se transportira kot NO ali preko posebnih NO-prenašalcev do danes še ni pojasnjeno. V gladki mišici NO aktivira topno guanilat ciklazo (tGC) z vezavo na železo v njenem hemskem obroču, kar povzroči konformacijsko spremembo (Wink in sod., 1998). tGC gvanozintrifosfat (GTP) pretvarja v ciklični gvanozinmonofosfat (cGMP), ki je sekundarni znotrajcelični sporočevalec. Povišana koncentracija cGMP inhibira prehajanje Ca<sup>2+</sup> in znižuje njegovo intracelularno koncentracijo, aktivira od cGMP-odvisne K<sup>+</sup> kanalčke, kar vodi k hiperpolarizaciji in relaksaciji (Kimura in sod., 2005; Cohen in Adachi, 2006). Poleg tega stimulira od cGMP-odvisno proteinsko kinazo, ki aktivira miozinsko kinazo lahke verige, kar prav tako vodi do relaksacije gladkih mišic (Kimura in sod., 2005). tGC je regulirana z negativno povratno zanko: inaktivira jo od cGMP-odvisna fosfodiesteraza (Friebe in Koesling, 2003).

Tudi aktivnost NOS je negativno povratno regulirana s svojim produktom, dušikovim oksidom. Ker NO in O<sub>2</sub> tekmujeta za isto vezavno mesto na hemu, predstavlja NOS tako

senzor kot regulator za O<sub>2</sub> pri uravnavanju pretoka krvi in s tem preskrbe tkiva z O<sub>2</sub> (Byrne-Habič in sod., 2004).

Obstajajo tudi dokazi o prisotnosti obeh izooblik NOS v eritrocitih (Jubelin in Gierman, 1996), vendar v strokovni literaturi o tem še ni bilo doseženo soglasje (Ignarro, 2002).

### 2.5.2.3.2 Spreminjanje dostopnosti NO z eritrociti

#### 2.5.2.3.2.1 Reakcija NO s hemoglobinom

NO izredno hitro reagira s kovinskimi kompleksi, kot je hem v hemoglobinu (Hb) (Eich in sod., 1996; Liao in sod., 1999; Herold in Röck, 2002; Huang Z. in sod., 2001; Huang in sod., 2002).



Večina raziskovalcev se strinja, da sta konstanti vezave NO na oksihemoglobin (oksiHb) in deoksihemoglobin (deoksiHb) enaki ( $k_{\text{Hb}} = 3\text{-}5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), kar pomeni, da je razmerje nastalih produktov odvisno od oksigenacije Hb (Eich in sod., 1996; Liaro in sod., 1999; Herold in Röck, 2002; Huang Z. in sod., 2001; Huang in sod., 2002; Yonetani in sod., 1998; Wajnberg in sod., 1996; Kon, 1968). Ker se oksigenacija Hb v arterijsko-venskem gradientu giblje med 100 in 75 % (v mirovanju), je glavni produkt reakcije med NO in Hb nitrit in methemoglobin (metHb), ki predstavlja glavno pot zmanjševanja bioaktivnost NO (Jiang in sod., 2007). To je zlasti pomembno pri odstranjevanju presežnega NO v sepsi. Obstajajo tudi nasprotujoči podatki, po katerih se NO do 100-krat hitreje veže na deoksiHb in tako naj bi v fizioloških pogojih nastala znatno večja količina Hb-Fe-NO, kot pri neselektivni vezavi NO (Pawloski in sod., 2001; Gow in sod., 1999; Gross in sod., 1999 cit. po Huang Z. in sod., 2001).

Afiniteta NO je 100-krat večja za hema  $\alpha$ -podenot deoksiHb, kot za njegova hema v  $\beta$ -podenotah. V fizioloških pogojih, ko je koncentracija NO mnogo manjša kot je koncentracija prostih hemskih obročev, je prevladujoči produkt reakcije deoksiHb z NO  $\alpha$ -nitrozilHb ( $\alpha[\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}]_2\beta[\text{Fe}^{\text{II}}]_2$ ). Ta je kooperativni, alosterično občutljiv, nizkoafinitetni prenašalec O<sub>2</sub> (Yonetani in sod., 1998). Fiziološke koncentracije NO tako ne ovirajo prenosa O<sub>2</sub>. NO se obnaša drugače kot drugi dvoatomarni ligandi Hb. Medtem kot O<sub>2</sub> in CO favorizirata 6-koordinacijsko vezavo, NO favorizira 5-koordinacijsko vezavo na železo. Njegova vezava oslabi ali celo razcepi vez med železom in histidinom v hemu. (Ravno ta lastnost omogoča efekte NO na encimih s hemi, kot je npr. tGC). Razcep

vezi Fe-His v hemu hemoglobin stabilizira v T-stanju, zmanjša afiniteto za O<sub>2</sub>, oziroma zveča oddajanje O<sub>2</sub>. S tem NO pospeši disociacijo O<sub>2</sub> ob nizkem parcialnem tlaku O<sub>2</sub> (Kosaka in sod., 1996; Yonetani in sod., 1998; Hobbs in sod., 2002).

Oksigenirani nitrozirajoči NO produkti reagirajo s cisteinom 93 na β-podenoti Hb (βCys93), kar vodi v nastanek Hb-nitrozotilov (Hb-SNO) (reakcija (7)) (Jia in sod., 1996; Herold in Röck, 2002; Hobbs in sod., 2002).



To reakcijo nastajanja nitrozirajočih produktov z oksidacijo NO zmanjšuje 5-20-krat hitrejša kinetika reakcije med hemom Hb in NO, kot pa je med NO in O<sub>2</sub>, vendar kopičenje NO in O<sub>2</sub> v membrani omogoča zadostno količino oksigeniranih produktov, za nitroziranje βCys93 (Vladimirov in sod., 2000). Hb-SNO lahko nastanejo tudi z intramolekularno premestitvijo NO iz hema na βCys93 v deoksiHb (reakcija (8)) (Gow in sod., 1999; Pawloski, 2001). Slednji proces je sporen, saj zanj naj ne bi obstajali jasni dokazi (Xu in sod., 2003)



βCys93 je visoko konzervativna aminokislina v hemoglobinskih sekvencah sesalcev, zato ima najverjetneje biološko vlogo. Transnitrozilacija βCys93 je uravnavana z alosterično konformacijo Hb tetramera. R-stanje(oksiHb) nitrozilacijo pospešuje, T-stanje (deoksiHb) pa destabilizira βCys93-SNO (Jia in sod., 1996; Rigs, 1961; Benesh in Benesh, 1962; Herold in Röck, 2002). Tako znižan parcialni tlak O<sub>2</sub> povzroči disociacijo NO. Tak sistem preferenčno prenaša NO v tkiva z veliko porabo O<sub>2</sub>, tam razširi žile in s tem zagotovi zadostno oskrbo o oksigenirano krvjo. Drugi avtorji (Hobbs in sod., 2002; Xu in sod., 2003; Vladimirov in sod., 2000) temu nasprotujejo. Po njihovem je vloga βCys93 samo v preprečevanju kopičenja Fe-nitrozil kompleksov (Hb-Fe-NO) z omogočanjem prenosa NO iz celic.

Afiniteta NO za hem je zelo visoka ( $K_d = 10^{-3} - 10^{-5}$ ) (Vladimirov in sod., 2000; Moore in Gibson, 1976; Azizi in sod., 2005). Ob sprostitvi znotraj eritrocita traja približno 1 μs, da ga veže nov Hb, ob tem pa NO prepotuje 0.05 μm (Azizi in sod., 2005). To dejstvo predstavlja problem za Hb-Fe-NO modele, ki predpostavljajo ponovno sproščanje vezanega NO iz eritrocitov v zunajcelični prostor.

#### 2.5.2.3.2.2 Zmanjšan privzem NO skozi eritrocitno membrano

NO je majhna napolarna molekula, ki zlahka prečka lipidni dvosloj (Abraham in sod., 2000), zato je razlika med reakcijskima konstantama eritrocitov in prostega hemoglobina z NO presenetljiva. Znano je, da mikromolarne koncentracije prostega Hb, zaradi sproščanja hemoglobina iz eritrocitov v raznih patoloških stanjih, preprečijo fiziološke efekte NO *in vivo*, medtem ko milimolarne koncentracije Hb v eritrocitih njegovo aktivnost le delno zmanjšajo (Jeffers in sod., 2006). Eritrocitni privzem NO je 500-1000 krat manjši od prostega hemoglobina (Liu in sod., 1998; Vaughn K.T. in sod., 2001).

Razlogi za zmanjšan NO privzem v eritrocite so lahko: (i) področje brez eritrocitov ob endoteliju žil zaradi hidrodinamskih sil – to lahko zavzame do 25 % premera žile (Liao in sod., 1999), (ii) zunajcelična difuzijska upornost zunanega sloja tekočine okoli eritrocitov (Vaughn in sod., 2000; Tsoukias, 2002), (iii) notranje difuzijske ovire (Vaughn in sod., 2000) in (iiii) submembranska citoskeletna ovira (Huang K.T. in sod., 2001, Han in Liao, 2005). Slednja je najbolj verjeten razlog, saj je stalno prisotna. Gosti preplet citoskeletnih elementov onemogoča prosto difuzijsko prehajanje NO, saj mora prehajati skozi pore v prepletu, kar zelo upočasni vstopanje. Konstanta za privzem NO je podobna velikosti konstante za privzem O<sub>2</sub>, kar kaže na to, da O<sub>2</sub> in NO vstopata po približno enaki poti. Prehajanje NO še dodatno ovirajo NO-nereaktivni proteini, kot so metHb (preferečna oblika hemoglobina za vezavo na citoskelet), hemokromi, in Heinzova telesca, ki lahko celo zamašijo pore za prehod NO v citoskeletu. Modulacije v strukturi citoskeleta spremenijo konstanto prehajanja NO, kar kaže na možnost *in vivo* regulacije privzema NO v eritrocite (Huang in sod., 2001). Ohranjanje biološke aktivnosti in zadostne koncentracije NO bi bil lahko eden izmed razlogov, zakaj se hemoglobin ne nahaja prosto v krvi, ampak v eritrocitih.

Če predpostavimo, da je difuzijski tok NO preko membran eritrocitov večji od hitrosti njegove avtooksidacije v časovni enoti, predstavljata delež celotne površine eritrocita glede na luminalno površino žile in delež luminalne površine glede na volumen žile glavna geometrijska faktorja porabe NO. Ta dva določata delež "pobeglega" NO, ki difundira skozi endotelij v gladke mišice in delež, ki ga prestrežejo eritrociti. Tako je v večjih žilah poraba NO večja, v manjših pa je večja difuzija v gladke mišice. Hitrost porabe NO je določena samo s hitrostjo, s katero NO vstopa v eritrocit (permeabilnostni koeficient  $P_d = 0.1 - 40 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ ) (Lancaster, 2000; Vaung in sod., 2000; Tsoukias in Popel, 2002).

### 2.5.2.3.3 Prenašalci NO *in vivo*

V fizioloških pogojih reakcije NO z oksigeniranim hemoglobinom predstavljajo najpomembnejšo pot zmanjševanja njegove bioaktivnosti. Koncentracija hemoglobina v plazmi je  $\approx 10$  mM, koncentracija NO, ki ga izloča endotelij je  $\approx 400$  nM, EC<sub>50</sub> NO za tCG pa je  $\approx 20$  nM (Hobbs in sod., 2002). Zaradi obstoječih koncentracijskih razmerij in kratkega razpolovnega časa NO v plazmi, ki je v območju nekaj sekund (Rassaf in sod., 2002; Palmerini in sod., 2003), se postavlja vprašanje, ali se NO shranjuje v obliki stabilnih NO zvrsti, ki se lahko pretvarjajo nazaj v NO, ko je to potrebno, ali pa mehanizmi za zmanjševanje privzema NO v eritrocite zadostujejo za ohranjanje zadostnih koncentracij NO v plazmi.

Obstajata dve temeljno različni teoriji ohranjanja NO aktivnosti. Prva predpostavlja, da je NO endokrini mediator, njegova aktivnost pa se ohranja z mehanizmi omejevanja porabe NO z eritrociti. Opira se na meritve, ki ne kažejo arterijsko-venskih gradientov hipotetičnih prenašalcev NO-aktivnosti (Lancaster, 2000).

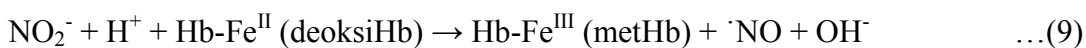
Druga teorija pa obravnava NO kot parakrini mediator, njegovo aktivnost pa omogočajo različni *in vivo* prenašalci NO: (i) nizkomolekularni S-nitrozotoli (S-nitrozocistein (Jia in sod., 1996; Sandmann in sod., 2005)), (ii) visokomolekularni S-nitrozotoli (S-nitrozoalbumin (Rassaf in sod., 2002), S-nitrozohemoglobin (Rogers in sod., 2007, De Rosa in sod., 2007; Jia in sod., 1996; Kim-Shapiro, 2004; Stamler, 1997)) (iii) NO-kovinski kompleksi ((Hb-Fe-NO) (Byrne-Habič in sod., 2004)) in (iiii) nitrit (Cosby, 2003; Gladwin in sod., 2003, 2006; Huang K.T. in sod., 2001; Kim-Shapiro, 2004; Rogers in sod., 2007; Laterreur in English, 2007). Podprta je z meritvami, ki so pokazale arterijsko-venske gradiente Hb-SNO, Hb-Fe-NO in nitrita (Rassaf in sod., 2002; Rogers in sod., 2007; De Rosa in sod., 2007; Jia in sod., 1996; Kim-Shapiro, 2004; Stamler, 1997; Cosby, 2003; Gladwin in sod., 2003, 2006; Huan K.T. in sod., 2001; Laterreur in English, 2007).

Trenutno obstajata dve hipotezi, ki vključujeta hemoglobin v globalno kroženje NO v kardiovaskularnem sistemu, ki se povezuje z zaznavanjem koncentracije kisika oz. hipoksično vazodilatacijo.

S-nitrozohemoglobinska (Hb-SNO) hipoteza je podprta z dejstvom, da je koncentracija hemoglobina, ki ima vezan NO na cistein 93 v beta podenoti (Hb-SNO) v arterijski krvi dosti višja kot v venozni, kar nakazuje ciklični metabolizem Hb-SNO med kroženjem po krvnem obtoku (Jia in sod., 1996; Stamler, 1997). Čeprav se večina NO odstrani v obliki nitrata, naj bi zadostna količina NO reagirala z deoksiHb. Tu naj bi prišlo do intramolekularne premestitve NO na cistein 93 v beta podenoti in do nastanka Hb-SNO

(Gow in sod., 1999; Pawloski in sod., 2001). Tako se 80 % NO vezanega na deoksiHb pretvori v Hb-SNO (Laterreur in English, 2007), ki se nato oksigenira. Ob kasnejšem sproščanju O<sub>2</sub> v hipoksičnih pogojih bi ob konformacijski spremembi Hb prišlo do premestitve NO s transnitrozilacijo na citosolni del anionskega izmenjevalca (AE1), preko njega pa bi prišel NO v lumen žile (Pawloski in sod., 2001). Drugi predvidevajo, da so vpleteni nizkomolekularni nitrozotoli, kot prenašalci NO v lumen žile (Jia in sod., 1996; Sandmann in sod., 2005; Zhang in Hogg, 2004). Tako naj bi se NO sproščal s hemoglobina ob znižanem parcialnem tlaku O<sub>2</sub> in omogočil vazodilatacijo.

Druga hipoteza temelji na Hb-posredovani nitritni redukciji, pri kateri naj bi shranjevalni bazen za aktivnost NO predstavljal nitrit (Cosby, 2003; Gladwin in sod., 2003, 2006; Huang K.T. in sod., 2001; Kim-Shapiro, 2004; Rogers in sod., 2007; Laterreur in English, 2007). Opira se na poskuse, ki kažejo povečanje nitrita in Hb-Fe-NO v plazmi po inhalaciji NO brez povečanja koncentracije S-nitrozotiolov. Prav tako se opira na arterijsko-venski gradient nitrita v humani plazmi in vazodilatorni učinek intravenozno dodanega nitrita. Tako naj bi oksigenacija hemoglobina določala njegovo funkcijo kot nitritna oksidaza (ob visokem parcialnem tlaku O<sub>2</sub>) (reakcija (5)) ali nitritna reduktaza (ob nizkem parcialnem tlaku O<sub>2</sub>), ki bi nitrit pretvarjala v NO (reakcija (9)). Reduktazna aktivnost se povečuje z nižanjem pH (kar ustreza manj oksigeniranim tkivom). Aktivnost je povezana z nastankom NO-Hb aduktov (primarno Hb-Fe-NO in v manjši meri Hb-SNO) in stimulira krvni pretok.



Problem hipoteze je, kako pojasniti uspešen pobeg nastalega NO pred deoksiHb, ne da bi prišlo do tvorbe Hb-Fe-NO (reakcija (6)). Transport nitrita v eritrocit je mogoč v obliki nitrozne kisline preko AE1 (Gladwin in sod., 2003), vendar manjkajo jasni dokazi za ustrezne transportne poti. Hb po tej teoriji deluje kot kisikov senzor in hipoksični vazodilatator, kar je vzporednica s prvo hipotezo.

#### **2.5.2.3.4 Vpliv NO na makroskopske lastnosti eritrocitov: agregabilnost, deformabilnost, spremembe oblike in volumna**

Pretok, agregabilnost in deformabilnost eritrocitov so tri glavne komponente reologije krvi (Starzyk in sod., 1999). V velikih žilah je najpomembnejši pretok, agregabilnost in deformabilnost sta odločujoča v manjših žilah. Eritrociti z zvečano tendenco k agregaciji so v mikrovaskularnem sistemu manj mobilni, zato povečajo upor in strižne sile, ki delujejo na endotelij (Kim-Shapiro, 2004). Zmanjšana deformabilnost sili eritrocite k

migraciji iz centralne osi žile k endoteliju, kar prav tako poveča upor in strižne sile (Barkurt in sod., 2004).

Kot že omenjeno, povečane strižne sile aktivirajo endotelijsko NOS. Sproščeni NO zmanjšuje agregabilnost in povečuje deformabilnost membran eritrocitov, kar potrjujejo številni avtorji (Bor-Kucukatay in sod., 2003; Bor-Kucukatay in sod., 2005; Tsuda in sod., 2002; Tsuda in Nishio, 2004; Korbut in sod., 2003; Chmiel in sod., 2001; Baskurt in sod., 2004) Natančen mehanizem delovanja ni poznan, predvidevajo pa, da gre za cGMP-posredovan efekt, v katerega naj bi bili vpleteni tudi K<sup>+</sup> kanalčki. To je podkrepljeno z dejstvom, da eritrociti vsebujejo tGC (Conran in sod., 2004), prav tako naj bi tudi sami sintetizirali NO z iNOS in cNOS (Jubelin in German, 1996).

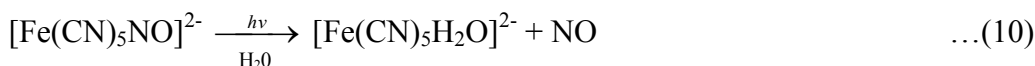
NO ne povzroča spremembe volumna ali oblike eritrocitov ob nespremenjenih zunanjih pogojih (Bor-Kucukatay in sod., 2003). O pojavu ehinocitov poročajo samo ob zelo visokih koncentracijah (10<sup>-2</sup>M). Takšne koncentracije tudi znižujejo deformabilnost eritrocitov, najverjetneje zaradi posrednih učinkov NO (preko njegovih oksidiranih oblik, ki povzročajo poškodbe membrane in citoskeleta) (Bor-Kucukatay in sod., 2003).

NO preprečuje agregacijo trombocitov in adhezijo trombocitov ter levkocitov (Bozzo in sod., 2000; Yapislar in sod., 2007).

#### 2.5.2.4 Natrijev nitroprusid

Natrijev nitroprusid ((Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO]) (NNP) je natrijeva sol nitrozopentacianoferata. Je diamagneten (Rochelle in sod., 2002; Roncaroli in sod., 2007). V klinični medicini je zelo uveljavljen preparat za hitro zniževanje krvnega tlaka po intravenozni aplikaciji, čeprav natančen mehanizem njegovega delovanja še vedno ni poznan (Kumar in Clark, 2005). V eksperimentalnem delu je NNP pogosto uporabljen kot donor NO.

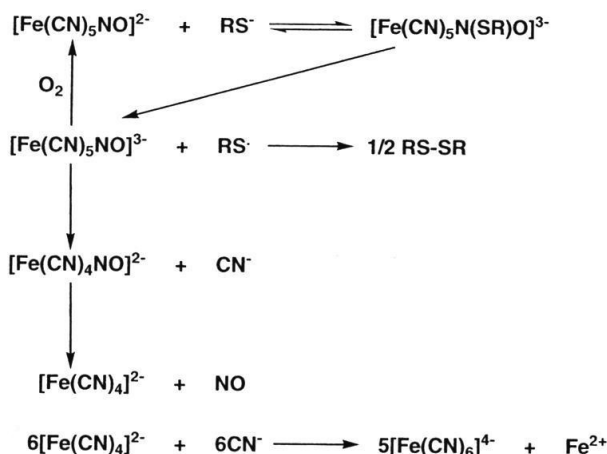
Do sedaj je bila opisana samo fotokemična reakcija, ki vodi k sproščanju NO iz NNP, kadar je ta v raztopini (enačba (10)). Ta izplen je nizek, 0.20 do 0.30 pri valovnih dolžinah svetlobe med 320 in 420 nm (Lancaster, 2000).



Mahony in sod. (1984) so potrdili, da je NNP v raztopini v temi stabilen. V sesalskih tkivih pa se tudi brez vira svetlobe zelo hitro sproščajo znatne količine NO, kar dokazuje takojšna učinkovitost NNP kot vazodilatatorja (Kumar in Clark, 2005). V hitro temotno reakcijo z NNP so vpleteni tioli, ki so prisotni v skoraj vseh tkivih. Ti NNP reducirajo v



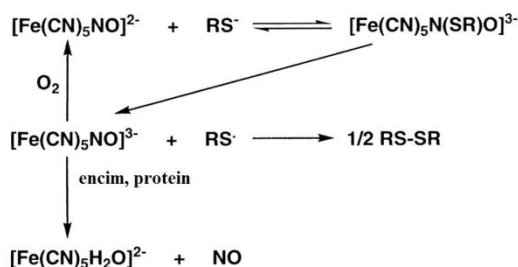
$[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{RS})\text{O}]^{3-}$ , ta pa se lahko povratno oksidira ali pa razpade na  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$  in tiolski radikal  $\text{RS}^\cdot$ , ki nato tvori disulfidni mostiček (Wang in Ting, 2005; Videla in sod., 2006; Vaughn in sod., 2006).  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$  s transeeliminacijo odda  $\text{CN}^-$ , nastali produkt je sposoben prenesti NO na ustrezno tarčo (Slika 9) (Wang in Ting, 2005; Kruszyna in sod., 1993; Rochelle in sod., 2002).



**Slika 9.** Shematski prikaz pretvorb NNP v oksidnih in anoksidnih pogojih v prisotnosti tiolov (Wang in Ting, 2005).

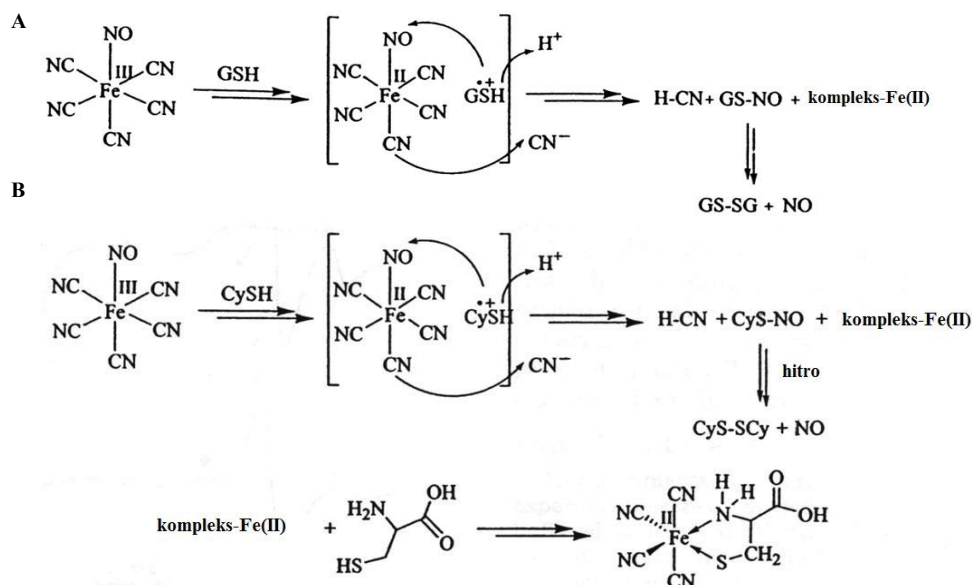
V anoksidnih pogojih se tako preko cianotranseeliminacije sprošča  $\text{CN}^-$  in nato NO, kar pa je malo verjeten mehanizem za dobro oksigenirano vaskularno tkivo. Prav tako ni znano, da bi NNP sproščal  $\text{CN}^-$  ione ob medicinskih aplikacijah (Butler in sod., 1988). Opaženo sproščanje  $\text{CN}^-$  je morda posledica fotodekompozicije NNP med analizo  $\text{CN}^-$ , v krvi pa do sproščanja ne pride (Shafer in sod., 1993).

Wang in Ting (2005) predlagata mehanizem sproščanja NO, pri katerem poleg tiolov sodeluje še majhen membranski vezani protein ali encim (kot unikatna komponenta sesalskega tkiva), ki pretvori NNP v NO (Slika 10).



**Slika 10.** Shematski prikaz pretvorbe NNP v sesalskem tkivu (Wang in Ting, 2005).

Grossi in D'Angelo (2005) pa predlagata mehanizem, po katerem so tiolne skupine (v glutationu, cisteinu) zadosten pogoj za sproščanje NO. Tu je vključeno tudi sproščanje CN<sup>-</sup>. Predviden potek je prikazan na sliki 11. Nastanek diglutationa po dodatku NNP eritrocitni suspenziji potrjujejo tudi drugi avtorji (Butler in sod., 1988).



**Slika 11.** Shematski prikaz pretvorbe NNP. Sproščanje NO poteka preko mehanizma z elektronskim prenosom in ne preko direktne cepitve vezi med železom in nitrozilom, v katero je vpletena tiolna skupina in ne njen tiolat. NO spontano sproščajo njeni stranski produkti. A: reakcija NNP z glutationom; B: reakcija NNP s cisteinom. GSH: glutation, CySH: cistein (Grossi in in D'Angelo, 2005).

### 2.5.2.5 Nastanek reaktivnih oblik kisika in oksidacija membranskih lipidov

NO kot radikal lahko reagira z drugimi radikali, ki se pojavljajo v celici. V procesu lipidne peroksidacije lahko prekine verižno radikalsko reakcijo tako, da reagira bodisi z lipidnim radikalom, prožilcem lipidne peroksidacije, ali pa reagira s kovinskimi ioni železa in bakra ter s tem zmanjša njihovo katalitično vpletenost v lipidno peroksidacijo. V primeru lipidne peroksidacije NO deluje kot antioksidant, hkrati pa jo njegov derivat - peroksinitrit (OONO) lahko sproži (Byrne-Habič in sod., 2004; Wink in sod., 1998).

Peroksinitrit nastane v reakciji med NO ali N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in superoksidnim radikalom. Nastali produkt je zelo močan oksidant, ki povzroči oksidacijo lipidov, polet tega pa še nitrira tirozin in reagira s purinskimi bazami. Poškodbe s peroksinitritom so verjetne le, kadar koncentracija NO močno presega fiziološko in/ali ob zmanjšani dostopnosti superoksid dismutaze (Byrne-Habič in sod., 2004). Peroksinitrit lahko povzroči senescenco eritrocitov ali celo sproži eriptozo (Matarrese in sod., 2005; Pietraforte in sod., 2007).

### 3 MATERIAL IN METODE DELA

#### 3.1 MATERIAL

Raziskavo smo izvedli na človeških eritrocitih. Krvodajalci so bili mladi moški prostovoljci in sicer za vsakokratno raziskavo po eden. Eritrocite smo izolirali iz sveže venske 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 uravnali z 1 M raztopino HCl (Kemika, Zagreb) in 1 M raztopino NaOH (Kemika, Zagreb).

Raztopino manganovega klorida (MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O) (Merck, Nemčija) smo uporabili za paramagnetno dopiranje zunajceličnega prostora vzorčnih suspenzij človeških eritrocitov pri NMR poskusih za vzorce z 20 % hematokritom.

Vpliv HgCl<sub>2</sub> in NNP na transmembranski transport vode in volumen eritrocitov smo zasledovali ob dodatkih raztopin živosrebrovega klorida (HgCl<sub>2</sub>) (Kemika, Zagreb), in natrijevega nitroprusida (NNP) (Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO]·2H<sub>2</sub>O) (Riedel-de Haën A.-G.), pri eni koncentraciji prvega in pri več koncentracijah drugega efektorja v eritrocitnih suspenzijah.

Paramagnetne lastnosti reakcijskih produktov natrijevega nitroprusida smo preučevali s pomočjo raztopin kalijevega fericianida (KFC) [K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (Fluka), natrijevega nitroprusida (Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO]·2H<sub>2</sub>O) (Riedel-de Haën A.-G.) in L-acetilcisteina (Sigma) v hiposmotskem pufru za eritrocite.

##### 3.1.1 Priprava pufrov in drugih raztopin

Pripravili smo naslednje pufre in raztopine:

1. izosmotski pufer za eritrocite (A) (130 mM NaCl, 30 mM saharoza, 20 mM TRIS HCl, pH 7.4, 330 mOsm);
2. izosmotski smotski pufer za eritrocite (B) (135 mM NaCl, 20 mM TRIS HCl, pH 7.4, 310 mOsm);
3. 40 mM raztopino MnCl<sub>2</sub> pripravljeno v ustreznem pufru (75 mM NaCl, 20 mM TRIS HCl, pH 7.4, 190 mOsm) za pripravo 10 mM koncentracije Mn<sup>2+</sup> v vzorcu (končna osmolarnost je 330 mOsm) in v 94 mM NaCl za pripravo 0.25 mM koncentracije Mn<sup>2+</sup> v vzorcu (končna osmolarnost je 308 mOsm);

4. raztopino 8 mM HgCl<sub>2</sub> v izoosmotskem pufru za eritrocite (B) za pripravo 1 mM koncentracije Hg<sup>2+</sup> v vzorcu in v 140.5 mM NaCl za pripravo 0.1 mM in 25 μM koncentracije Hg<sup>2+</sup> v vzorcu;
5. raztopino 8 mM NNP v izoosmotskem pufru za eritrocite (B) za pripravo 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.1 mM, 0.05 mM in 0.025 mM koncentracij NNP v vzorcu in v 140.5 mM NaCl za pripravo 25 μM koncentracije v vzorcu (raztopini smo zaščitili pred svetlobo z alufolijo);
6. raztopino 10 mM KFC v izoosmotskem pufru za eritrocite (B) za pripravo 1 mM, 0.3 mM in 0.1 mM koncentracij v vzorcu;
7. raztopino 10 mM N-acetil cisteina v izoosmotskem pufru za eritrocite (B) za pripravo 2 mM in 1 mM koncentracije v vzorcu;
8. izoosmotsko raztopino NaCl (154 mM NaCl);
9. raztopino 94 mM NaCl;
10. raztopino 100 mM NaCl;
11. raztopino 140.5 mM NaCl.

Osmolarnost je bila določena računsko, pH pufrov smo izmerili s pH-metrom. Vse raztopine smo pripravili na dan poskusa.

### 3.1.2 Priprava eritrocitov

V poskusu smo uporabljali sveže človeške eritrocite. Odvzem venske 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 °C), kjer smo jo nadalje obdelali. Izolacijo eritrocitov smo izvedli na dan odvzema krvi, v eni uri po odvzemu.

Svežo kri smo centrifugirali 5 min pri 3500 obr./min, previdno odstranili supernatant (krvna plazma) in tanek bel sloj levkocitov. Usedlini smo dodali izoosmotski pufer za eritrocite (B) (310 mOsm) v razmerju 1:3 (v/v) ter eritrocite spirali trikrat. Zadnje spiranje smo izvedli z izoosmotskim pufrom (A) (330 mOsm), prav tako v trikratnem volumnu. Z dna epruvete smo odvzeli gosto suspenzijo očiščenih eritrocitov (to smo proglasili za 100 % hematokrit) in pripravili 40 % hematokrit v izoosmotskem pufru za eritrocite (A), ki smo ga uporabili za pripravo vzorcev z 20 % hematokritom za NMR meritve, in 40 % hematokrit v izoosmotski raztopini NaCl, ki smo jo uporabili za pripravo vzorcev z 0.5 % hematokritom za opazovanje pod svetlobnim mikroskopom.

Za resuspendirane eritrocite smo vedno uporabljali epruvete, ovite z alufolijo kot zaščito pred svetlobo.

### 3.1.3 Priprava vzorcev

Vzorci smo pripravili tik pred meritvijo. Paramagnetni ioni Mn<sup>2+</sup> začnejo po več kot 3 urah prodirati skozi celično membrano eritrocita in tako kvariti razliko v NMR relaksaciji med diamagnetnim znotrajceličnim prostorom in zunajcelično paramagnetno raztopino (Lahajnar in sod., 1992). Zato zanesljivost meritev s časom pada. Tako smo izbrali časovni okvir 120 minut za posamezno časovno odvisno meritev. Izbrana efektorja, Hg<sup>2+</sup> v HgCl<sub>2</sub> in NNP, kot donor NO sta diamagnetna, zato ne vplivata na NMR relaksacijo.

V literaturi ni podatkov, da bi Mn<sup>2+</sup> blokiral eritrocitne kalačke, tako da njegova uporaba ne vpliva na transmembranski ionski transport.

Vse NMR meritve na eritrocitih smo izvedli v izoosmotskih in izotoničnih pogojih; pri 330 mOsm in pH = 7.4. Vsi vzorci za mikroskopiranje so imeli osmolarnost 308 mOsm, kar ustreza osmolarnosti izoosmotske raztopine NaCl, razen vzorcev, ki smo jih redčili z izoosmotskim pufrom za eritrocite (A). Ti so imeli osmolarnost 330 mOsm.

#### 3.1.3.1 Vzorci za NMR meritve

##### 3.1.3.1.1 Vzorca z 20 % hematokritom

K 200 µl 40 % suspenzije eritrocitov v izoosmotskem pufru za eritrocite (A) smo dodali 100 µl 40 mM raztopine MnCl<sub>2</sub> ter 100 µl raztopine efektorja (HgCl<sub>2</sub>, NNP). Tako je bila koncentracija Mn<sup>2+</sup> ionov v vzorčni suspenziji vedno 10 mM, koncentracija efektorja pa 4-kratno razredčena glede na izhodno koncentracijo. Kontrolnim vzorcem smo namesto raztopine efektorja dodali 100 µl izoosmotskega pufra za eritrocite (A).

##### 3.1.3.1.2 Vzorec s 100 % hematokritom

Uporabili smo 300 µl 100 % hematokrita.

##### 3.1.3.1.3 Vzorec izoosmotskega pufra za eritrocite (B) ter vzorci z raztopinami NNP, KFC, N-acetilcisteina in MnCl<sub>2</sub>

Za vzorec z izoosmotskim pufrom za eritrocite (B) smo vzeli izoosmotski pufer (B), ki smo ga uporabljali za vzorce z eritrociti.

Za vzorce z raztopinami NNP, KFC, MnCl<sub>2</sub> in N-acetilcisteina smo pripravili ustrezno koncentracijo NNP (2m M, 1 mM, 0.5 mM, 0.1 mM), KFC (1 mM, 0.5 mM, 0.1 mM), N-acetilcisteina (2 mM, 1 mM) in MnCl<sub>2</sub> (10 mM) v izoosmotskem puftru za eritrocite (B). Te raztopine (razen 2m M NNP in 2 m M N-acetilcisteina) so bili vzorci za NMR meritve. Vzorec z 1mM NNP in z 1mM N-acetilcisteinom smo pripravili tako, da smo 200 µl 2mM N-acetilcisteina dodali 200 µl 2 mM NNP.

### 3.1.3.2 Vzorci za mikroskopiranje

#### 3.1.3.2.1 Vzorci z 0.5 % hematokritom z MnCl<sub>2</sub> in NNP ali HgCl<sub>2</sub>

Za mikroskopiranje smo vzorce in kontrole v prvem koraku pripravili po enakem postopku kot vzorce z 20 % hematokritom za NMR meritve tik pred mikroskopiranjem (glej 3.1.3.1.2). Pred nanosom na objektno steklo smo v drugem koraku 200 µl tako pripravljenega vzorca dodali v 39.8 ml izoosmotskega puftra za eritrocite (A), da smo dobili 0.5 % suspenzijo eritrocitov. Končna koncentracija MnCl<sub>2</sub> je bila 0.25 mM, končna koncentracija efektorjev pa je bila 25 µM. Pred vsakim nanosom na objektno steklo smo vzorec dobro premešali z vibracijskim mešalom.

#### 3.1.3.2.2 Vzorci z 0.5 % hematokritom in NNP ali HgCl<sub>2</sub>

V prvem koraku smo k 200 µl 40 % suspenzije eritrocitov v izoosmotski raztopini NaCl dodali 200 µl izoosmotske raztopine NaCl in 100 µl 1mM raztopine efektorja (HgCl<sub>2</sub>, NNP) v 140.5 mM raztopini NaCl oz. 100 µl 4mM raztopine HgCl<sub>2</sub> v 100 mM raztopini NaCl. Pred nanosom na objektno steklo smo v drugem koraku 200 µl tako pripravljenega vzorca dodali v 39.8 ml izoosmotske raztopine NaCl, da smo dobili 0.5 % suspenzijo eritrocitov. Končna koncentracija efektorjev je bila 25 µM. Pred vsakim nanosom na objektno steklo smo vzorec dobro premešali z vibracijskim mešalom. Kontrolnim vzorcem smo v prvem koraku namesto raztopine efektorja dodali 100 µl izoosmotske raztopine NaCl.

#### 3.1.3.2.3 Vzorci z 0.5 % hematokritom z MnCl<sub>2</sub>

Vzorec smo pripravili kot je opisano pod 3.1.3.2.2, le da smo v prvem koraku 100µl 1mM raztopine efektorjev zamenjali z 10 mM raztopino MnCl<sub>2</sub> v 94 mM NaCl. Končna koncentracija MnCl<sub>2</sub> je bila 0.25 mM. Pred vsakim nanosom na objektno steklo smo vzorec dobro premešali z vibracijskim mešalom. Kontrolni vzorec je bil enak kontroli pod 3.1.3.2.2.

#### 3.1.3.2.4 Vzorci z 0.5 % hematokritom v izoosmotskem pufru za eritrocite

V prvem koraku smo k 200 µl 40 % suspenzije eritrocitov v izoosmotskem pufru za eritrocite (A) dodali 200 µl izoosmotskega pufra za eritrocite (A). V drugem koraku smo 200 µl tako pripravljenega vzorca dodali v 39.8 ml izoosmotskega pufra za eritrocite (A), da smo dobili 0.5 % suspenzijo eritrocitov. Kontrolni vzorec je bil enak kontroli pod 3.1.3.2.2.

## 3.2 METODE

Učinke omenjenih efektorjev na transport vode skozi membrano eritrocita v odvisnosti od časa inkubacije smo študirali s t.i. T<sub>2</sub>-NMR metodo preko merjenja značilno dvoeksponencialne transverzalne (T<sub>2</sub>) NMR relaksacijske funkcije protonov vode v vzorcih, ki se izmenjuje pod izoosmotskimi pogoji z difuzijo skozi membrano eritrocitov med diamagnetnim znotrajceličnim prostorom in paramagnetno označeno zunajcelično raztopino (vzorci z 20 % hematokritom in 10 mM MnCl<sub>2</sub> v zunajcelični raztopini).

Uporabili smo tudi diamagnetne vzorce (100 % hematokrit). V primeru 100 % hematokrita je zunajcelične vode zanemarljivo malo, zato je relaksacijska funkcija protonov vode enoeksponencialna.

Merjenje transverzalnega relaksacijskega časa protonov vode v raztopinah KFC, NNP in N-acetilcisteina nam je služilo kot dopolnilo za razumevanje spremembe znotrajceličnega relaksacijskega časa protonov vode pri eritrocitih, inkubiranih z NNP.

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

- časovno konstanto  $\tau_{exch}$  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 in permeabilnostno 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  $\tau_{exch}$  difuzijske izmenjave vode.  $\tau_{exch}$  določimo z analizo časovnega poteka daljšega položnega dela izmerjene NMR transverzalne relaksacijske funkcije protonov molekul znotrajcelične

vode, ki se izmenjuje z vodo zunajceličnega prostora, slednjega paramagnetno označenega z Mn<sup>2+</sup>.  $\tau_{exch}$  je z difuzijsko vodno permeabilnostjo ( $P_d$ ) eritrocitne membrane povezan z izrazom:

$$P_d = \frac{v}{s} \cdot \frac{1}{\tau_{exch}}, \quad \dots (11)$$

kjer je  $v$  volumen znotrajcelične vode posameznega eritrocita (okoli 70 % celotnega notranjega izoosmotskega volumna normalnega eritrocita),  $s$  zunanja površina eritrocita in  $\tau_{exch}$  časovna konstanta difuzijske izmenjave znotrajcelične 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 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 človeških eritrocitov smo uporabili CPMG metodo merjenja transverzalne relaksacije protonov vode v vzorcih suspenzije eritrocitov, zunajcelično označene s paramagnetnimi ioni Mn<sup>2+</sup>.

Zaradi interakcije protonskih spinov z nesparjenimi elektroni ionov Mn<sup>2+</sup> 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 ( $T_{2,a} \approx 78$  ms) in zunajcelična raztopina z ioni Mn<sup>2+</sup> (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  $\approx 1$  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 glavnem določa povprečna življenjska doba vode v eritrocitu ( $\tau_a$ ) in znaša približno 14 ms. Seveda poleg izmenjave življenjsko dobo protonske magnetizacije znotrajcelične vode določa tudi počasnejša transverzalna NMR relaksacija s časovno konstanto  $\approx 78$  ms. Nas zanima časovna konstanta  $\tau_{exch}$ ,



določena s povprečnim časom  $\tau_a$  difuzijske izmenjave znotrajcelične vode skozi eritrocitno membrano.

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 15 ponazorjena s črtno 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<sup>2+</sup> (Lahajnar, 1990, 1992). V takem primeru se  $T_{2,a}$  določi iz dobljene monoeksponencialne funkcije:

$$M(t) = M_0 \cdot e^{-t/T_{2,a}}. \quad \dots (12)$$

Glede na to, da se molekule izmenjujejo med dvema zelo različnima relaksacijskima področjema, je pričakovati, da bo izmenjevalni transverzalni NMR signal  $M(t)$  dvoeksponencialna funkcija časa. Izkaže se, da je primeru paramagnetno označene vzorčne suspenzije eritrocitov opaziti 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:

$$\begin{aligned} \frac{d(\Delta m_a)}{dt} &= -\left(\frac{\Delta m_a}{T_{2,a}}\right) - \left(\frac{\Delta m_a}{\tau_a}\right) + \left(\frac{\Delta m_b}{\tau_b}\right), \\ \frac{d(\Delta m_b)}{dt} &= -\left(\frac{\Delta m_b}{T_{2,b}}\right) - \left(\frac{\Delta m_b}{\tau_b}\right) + \left(\frac{\Delta m_a}{\tau_a}\right). \end{aligned} \quad \dots (13)$$

Enačbi (13) podajata opis časovnega poteka odmikov  $\Delta m_a$ ,  $\Delta m_b$  transverzalnih protonskih magnetizacij od ravnovesnih vrednosti v okoljih  $a$  in  $b$ . Parametra  $\tau_a$  in  $\tau_b$  sta povprečni življenjski dobi vodnih molekul v okolju  $a$  in  $b$ .

Rešitev gibalnih enačb (13) nam definira dvoeksponencialno transverzalno NMR relaksacijsko funkcijo  $M(t)$ :

$$M(t) = P'_a \cdot e^{-t/T'_{2,a}} + P'_b \cdot e^{-t/T'_{2,b}}. \quad \dots (14)$$

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

$$P'_a = 1 - P'_b, \quad \dots (15)$$

$$P'_b = \frac{1}{2} - \frac{1}{4} \frac{\left[ (P_b - P_a) \cdot \left( \frac{1}{T_{2,a}} - \frac{1}{T_{2,b}} \right) + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \right]}{C_2}, \quad \dots (16)$$

$$\frac{1}{T'_{2,a}} = C_1 - C_2, \quad \dots (17)$$

$$\frac{1}{T'_{2,b}} = C_1 + C_2, \quad \dots (18)$$

$$C_1 = \frac{1}{2} \left[ \frac{1}{T_{2,a}} + \frac{1}{T_{2,b}} + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \right], \quad \dots (19)$$

$$C_2 = \frac{1}{2} \left[ \left[ \frac{1}{T_{2,b}} - \frac{1}{T_{2,a}} + \frac{1}{\tau_b} - \frac{1}{\tau_a} \right]^2 + \frac{4}{\tau_a \cdot \tau_b} \right]^{\frac{1}{2}}. \quad \dots (20)$$

Tu sta  $P_a$  in  $P_b$  resnična deleža celokupnega protonskega NMR signala vode v okoljih  $a$  in  $b$ ,  $\tau_a$  in  $\tau_b$  pa sta povprečni življenjski dobi molekul vode v teh dveh okoljih zaradi difuzije molekul vode med okoljema  $a$  in  $b$ .

Torej velja:

$$P_a + P_b = 1 \quad \dots (21)$$

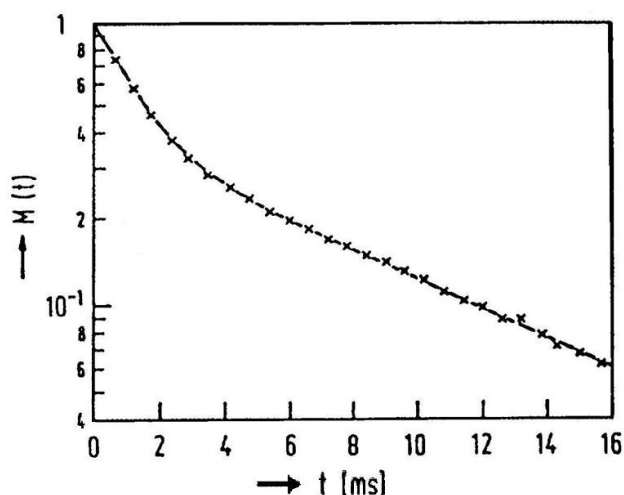
in zaradi mikroskopskega ravnovesja izmenjave tudi:

$$\frac{P_a}{\tau_a} = \frac{P_b}{\tau_b}. \quad \dots (22)$$

$T_{2,a}$  je dejanski transverzalni 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  $b$ ).

Povprečni čas izmenjave znotrajcelične vode ( $\tau_{exch}$ ) je istoveten s časovno konstanto  $\tau_a$  difuzijske izmenjave znotrajcelične vode v zunajcelični prostor, torej  $\tau_{exch} = \tau_a$  (glej Lahajnar in sod., 2006).

Grafični prikaz tipične eksperimentalne dvoekspencialne transverzalne protonske NMR relaksacijske funkcije zunajcelično paramagnetno označene suspenzije sesalskih eritrocitov je podan na Sliki 12 (Lahajnar, 1992).



**Slika 12.** 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  $\tau_{exch} \equiv \tau_a$  difuzijske izmenjave znotrajcelične vode (Lahajnar, 1992).

Parametri, ki jih določimo z analizo eksperimentalne transversalne relaksacijske krivulje, so:  $P_a$ ,  $\tau_{exch} = \tau_a$ ,  $T_{2,b}$ . Parametra  $P_b$  in  $\tau_b$  sta z njimi povezana preko enačb ((21), (22)),  $T_{2,a}$  pa je potrebno izmeriti neodvisno na gosti paramagnetno neoznačeni suspenziji eritrocitov (100% hematokrit).

### 3.2.1.1.1 Difuzijska vodna permeabilnost eritrocitne membrane in $\tau_{exch}$

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

$$P_d \equiv P_{d,tot} = P_{d,lipid} + P_{d,AQP} = \frac{v}{s} \cdot \frac{1}{\tau_{exch}}, \quad \dots (23)$$

kjer je  $P_{d,lip}$  difuzijska vodna permeabilnost lipidnega dela membrane,  $P_{d,AQP}$  difuzijska vodna permeabilnost membrane zaradi difuzije vode skozi akvaporine celične membrane,  $v$  volumen znotrajcelične vode posameznega eritrocita,  $s$  zunanja površina eritrocita in

$\tau_{exch}$  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 zunanega 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<sup>2+</sup> 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  $\tau_{exch}$ , ter od naravne transverzale relaksacije protonov z relaksacijskim časom  $T_{2,a}$ ) 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:

$$J_{w,tot} = J_{w,lip} + J_{w,AQP} = P_d(c_{in} - c_{out}), \quad c_{in} > c_{out} \quad \dots (24)$$

pri čemer sta  $c_{in}$  in  $c_{out}$  znotraj- in zunajcelični koncentraciji magnetno označene vode (v mol/cm<sup>3</sup>),  $P_d$  pa je celokupna difuzijska vodna permeabilnost eritrocitne membrane.

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):

$$\frac{d(c_{in} - c_{out})}{dt} = -s P \left( \frac{1}{v_{in}} + \frac{1}{v_{out}} \right) (c_{in} - c_{out}), \quad \dots (25)$$

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),  $v_{out}$  pa 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 (25) predstavljajo recipročno časovno konstanto  $1/\tau$ :

$$\frac{1}{\tau} = s \cdot P \left( \frac{1}{v_{in}} + \frac{1}{v_{out}} \right) \quad \dots (26)$$

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 v odsotnosti hitre zunajcelične relaksacije ustrezalo pogoju, da 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  $P_{d,tot} = P_{d,lipid} + P_{d,AQP}$ .

Časovno konstanto  $\tau_{exch}$ , dobljeno z analizo meritev, določata prispevka difuzije znotrajcelične vode skozi AQP-1 in skozi lipidni sloj. Za naš poskus ( $v_{out} \gg v_{in}$ ) sledi skladno z enačbo (58), da je difuzijska vodna permeabilnost eritrocitne membrane:

$$P_{d,tot} \equiv P_d = \frac{v}{s} \cdot \frac{1}{\tau_{exch}}. \quad \dots (27)$$

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

Pri sobni temperaturi je razmerje  $v/s$  za izotonične humane eritrocite  $4.56 \times 10^{-5}$  cm (Brahm, 1982), tako da pri eksperimentalno dobljeni povprečni kontrolni velikosti  $\tau_{exch} = 14.3$  ms iz enačbe (27) izračunana velikost koeficienta permeabilnosti  $P_d$  znaša  $3.2 \times 10^{-3}$  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 (27) lahko analiziramo vpliv izbranih snovi na lastnosti membrane humanih eritrocitov. Kadar reagent povzroči podaljšanje časovne konstante izmenjave vode s  $\tau_{exch}$  na  $\tau_{exch}^*$ , 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 (Lahajnar in sod., 2006):

$$\left( \frac{P_d - P_d^*}{P_d} \right) = 1 - \left( \frac{\tau_{exch}}{\tau_{exch}^*} \right) \quad \dots (28)$$

### 3.2.1.2 Tehnična izvedba NMR poskusa

Iz pripravljenih vzorčnih suspenzij (točka 3.1.3.1) smo v teflonsko merilno posodico, katere stene ne vsebujejo vodika in je zato primerna za NMR meritve jeter vodika, prenesli 300  $\mu$ L vzorca, zaprli, dobro pretresli in namestili v radiofrekvenčno sondo NMR spektrometra. Stresanje vzorcev pred vsako meritvijo v seriji meritev je nujno zaradi težnje eritrocitov po agregaciji (nastanek rouleau-ja) in usedanju. Usedanje in agregacija eritrocitov učinkovito povečuje celični volumen in zmanjšuje učinkovito izmenjevalno celično površino eritrocitov. Rezultati meritev v pogojih sesedanja celic ne dajejo pravih velikosti  $\tau_{exch}$  in s tem difuzijske vodne permeabilnosti  $P_d$ .

Na vsakem vzorcu z 20 in s 100 % hematokritom (Preglednica 1,2) smo opravili po tri do štiri neodvisne meritve. Meritve smo izvajali pri temperaturi  $T = 21 \pm 1$  °C. Časovno zasledovanje membranske difuzijske permeabilnosti za vodo ter celičnega volumna pod vplivom efektorja je potekalo približno 120 minut. Neodvisnost izmerjene časovne konstante  $T'_{2,a}$  in razmerja  $P'_a/P'_b$  od časa meritve za kontrolne vzorce pa je dokaz, da ioni Mn<sup>2+</sup> v teku NMR merjenj na preiskovanem vzorcu niso prešli v znotrajcelični prostor eritrocitov oz. da so sami eritrociti v času merjenja stabilni.

Pri vzorcih, kjer smo preučevali paramagnetne efekte v posameznih raztopinah (Preglednica 3), smo meritve ponovili dvakrat. Merili smo jih v daljših časovnih intervalih, ker niso kazali časovne odvisnosti.

Meritve smo opravili pri resonančni frekvenci protonov  $\nu_H = 100$  MHz na pulznem NMR spektrometru Bruker Biospec System (Bruker, Rheinstetten, Nemčija), opremljenim s superprevodnim magnetom (Oxford Instruments Ltd., Anglija). Izmerjene dvoeksponencialne in enoeksponencialne transverzalne relaksacijske funkcije  $M(t)$  smo analizirali s pomočjo računalniškega programa, ki je omogočil določitev časa počasne relaksacije protonov vode v znotrajceličnem prostoru ( $T'_{2,a}$ ), in časa hitre relaksacije protonov vode v paramagnetno označenem zunajceličnem prostoru ( $T'_{2,b}$ ) in deleža signala molekul vode v eritrocitih ( $P'_a$ ) (pri vzorcih z 20 % hematokritom). V okviru izrazov (14)–(22) in z neodvisno izmerjenim  $T_{2,a}$  in  $T_{2,b}$  smo izračunali  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$ . Delež zunajcelične vode je:  $P_b = I - P_a$ . Dobljeno razmerje  $P'_a/P'_b$  torej določa velikost volumskega razmerja  $V_{in}/V_{out}$  znotraj- in zunajcelične vode eritrocitnega vzorca.

**Preglednica 1.** Vzorci z 20 % hematokritom za merjenje z NMR.

Številka vzorca	Sestava vzorca*
1	ČE + 10 mM MnCl <sub>2</sub> (kontrola)
2	ČE + 10 mM MnCl <sub>2</sub> + 1 mM HgCl <sub>2</sub>
3	ČE + 10 mM MnCl <sub>2</sub> + 1 mM NNP
4	ČE + 10 mM MnCl <sub>2</sub> + 0.5 mM NNP
5	ČE + 10 mM MnCl <sub>2</sub> + 0.25 mM NNP
6	ČE + 10 mM MnCl <sub>2</sub> + 0.1 mM NNP
7	ČE + 10 mM MnCl <sub>2</sub> + 0.05 mM NNP
8	ČE + 10 mM MnCl <sub>2</sub> + 0.025 mM NNP

\* ČE – človeški eritrociti (20 % hematokrit) v izoosmotskem pufru za eritrocite (A). V preglednici podane koncentracije ionskih efektorjev so končne koncentracije v vzorcu. Končna osmolarnost vzorca znaša 330 mOsm.

**Preglednica 2.** Vzorec s 100 % hematokritom za merjenje z NMR.

Številka vzorca	Sestava vzorca*
1	ČE

\* ČE – človeški eritrociti (100 % hematokrit)

**Preglednica 3.** Vzorci za preučevanje paramagnetnih efektov NNP in njegovih produktov za merjenje z NMR.

Številka vzorca	Sestava vzorca
1	izoosmotski pufer za eritrocite (B)
2	1 mM KFC v izoosmotskem pufru za eritrocite (B)
3	0.3 mM KFC v izoosmotskem pufru za eritrocite (B)
4	0.1 mM KFC v izoosmotskem pufru za eritrocite (B)
5	1 mM NNP v izoosmotskem pufru za eritrocite (B)
6	0.3 mM NNP v izoosmotskem pufru za eritrocite (B)
7	0.1 mM NNP v izoosmotskem pufru za eritrocite (B)
8	1 mM N-acetilcistein v izoosmotskem pufru za eritrocite (B)
9	1 mM N-acetilcistein + 1mM NNP v izoosmotskem pufru za eritrocite (B)

**Preglednica 4.** Vzorec z 10mM MnCl<sub>2</sub> za merjenje z NMR.

Številka vzorca	Sestava vzorca
1	10 mM MnCl <sub>2</sub> v izoosmotskem pufru za eritrocite (B)

### 3.2.2 Mikroskopiranje

Mikroskopiranje smo izvedli na svetlobnem mikroskopu tipa: Nikon 80i, s kamero DS-Fi1 in s programom za krmiljenje mikroskopa in zajemaje slike: Nikon-NIS elements BR. Vse mikrografije so opremljene z ustreznim merilom.

#### 3.2.2.1 Tehnična izvedba mikroskopiranja

Vzorci smo pripravili, kot je opisano pod 3.1.3.2. Vzorce smo tik pred mikroskopiranjem redčili s izoosmotsko raztopino NaCl ali z izoosmotskim pufrom (A) na 0.5 % hematokrit, saj smo le tako lahko dobili uporabne mikrografije.

Za študijo vpliva efektorja na obliko človeškega eritrocita smo uporabili objektna stekla s konkavno vdolbino, na katerih se lahko eritrociti dokaj prosto gibljejo in spreminjajo obliko. Na ta objektna stekla smo v vdolbino nanesti 75 µl vzorca. Opazovali smo kvalitativno spremembo oblike eritrocitov, ki je nismo kvantificirali, saj so eritrociti kazali trend kopičenja spremenjenih oblik na robovih vdolbine.

Za študijo spreminjanja volumna in oceno deleža oblikovno spremenjenih eritrocitov smo uporabili ravna objektna stekla, da smo zagotovili naključno razporejanje eritrocitov po celotni površini objektnega stekla. Na ta objektna stekla smo nanesti 35 µl vzorca.

Spreminjanje vzorcev smo opazovali v časovni odvisnosti pri časih 1, 10, 20, 45 in 60 minut po dodatku efektorja. Kot kontrola so služili eritrociti v izoosmotski raztopini NaCl. Vzorce smo ob vsaki meritvi vzeli iz zaloge in jih nanesti na objektno steklo. Na vsakem preparatu smo naredili deset naključnih slik.



**Preglednica 5.** Pregled vzorcev za mikroskopiranje.

Številka vzorca	Sestava vzorca*
1	ČE 1 v izoosmotskem pufru za eritrocite (A)
2	ČE 1 + 0.25 mM MnCl <sub>2</sub>
3	ČE 1 + 0.25 mM MnCl <sub>2</sub> + 25 μM HgCl <sub>2</sub>
4	ČE 1 + 0.25 mM MnCl <sub>2</sub> + 25 μM NNP
5	ČE 2 v izoosmotski raztopini NaCl (kontrola)
6	ČE 2 + 0.1 mM HgCl <sub>2</sub>
7	ČE 2 + 25 μM HgCl <sub>2</sub>
8	ČE 2 + 25 μM NNP
9	ČE 2 + 0.25 mM MnCl <sub>2</sub>

\* ČE 1 – človeški eritrociti (0.5 % hematokrit v izoosmotskem pufru za eritrocite (A)), ČE 2 – človeški eritrociti (0.5 % hematokrit v izoosmotski raztopini NaCl). V preglednici podane koncentracije efektorjev so končne koncentracije v vzorcu. Končna osmolarnost vzorca znaša 308 mOsm, razen pri vzorcih 1-4 v izoosmotskem pufru (A), kjer je končna osmolarnost 330 mOsm.

## 4 REZULTATI

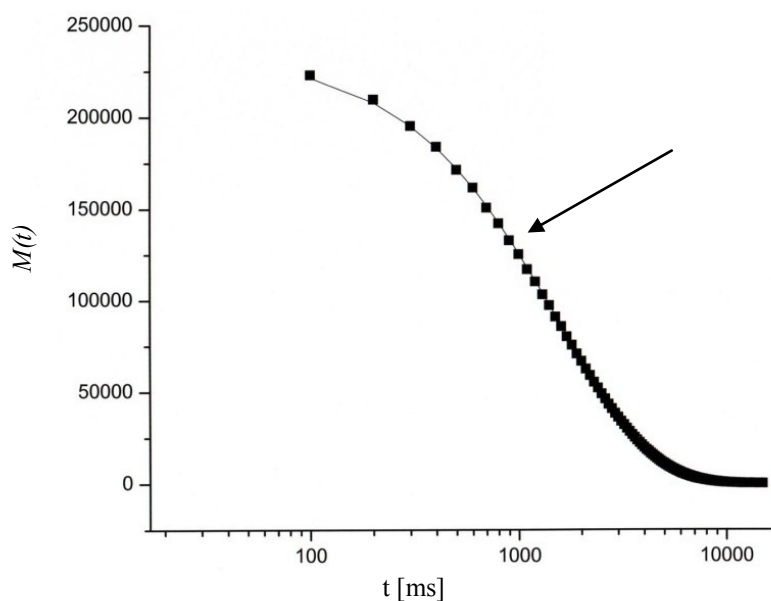
Na naslednjih straneh so predstavljeni rezultati meritev na človeških eritrocitih s pulzno NMR metodo protonov znotrajcelične vode (CPMG NMR) v obliki časovnih odvisnosti parametrov  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$  za HgCl<sub>2</sub> ter  $T'_{2,a}$  in  $V_{in}/V_{out}$  za NNP. Za oba efektoja (NNP in HgCl<sub>2</sub>) smo opravili po tri do štiri neodvisne meritve na vzorcih z 20 % hematokritom. Pri študiji vpliva NNP smo opravili meritve tudi na raztopinah NNP, KFC in N-acetilcisteina, kjer smo preučevali paramagnetne efekte NNP. Neodvisno smo izmerili  $T_2$  na diamagnetnem vzorcu tesno pakiranih eritrocitov, ki ustreza relaksacijskem času protonov znotrajcelične vode v človeških eritrocitih. Izmerili smo tudi  $T_2$  raztopine 10mM MnCl<sub>2</sub>, ki ustreza relaksacijskem času protonov zunajcelične vode v paramagnetnem vzorcu z 20 % hematokritom.

Predstavljeni so tudi rezultati opazovanja vpliva efektorjev (NNP in HgCl<sub>2</sub>) pod svetlobnim mikroskopom. Podane so časovno odvisne meritve premera eritrocitov, deleža oblikovno spremenjenih eritrocitov, deleža eritrocitov z membranskimi brsti in deleža eritrocitnih duhkov ter časovno odvisno opazovanje eritrocitne oblike preko mikrofografij.

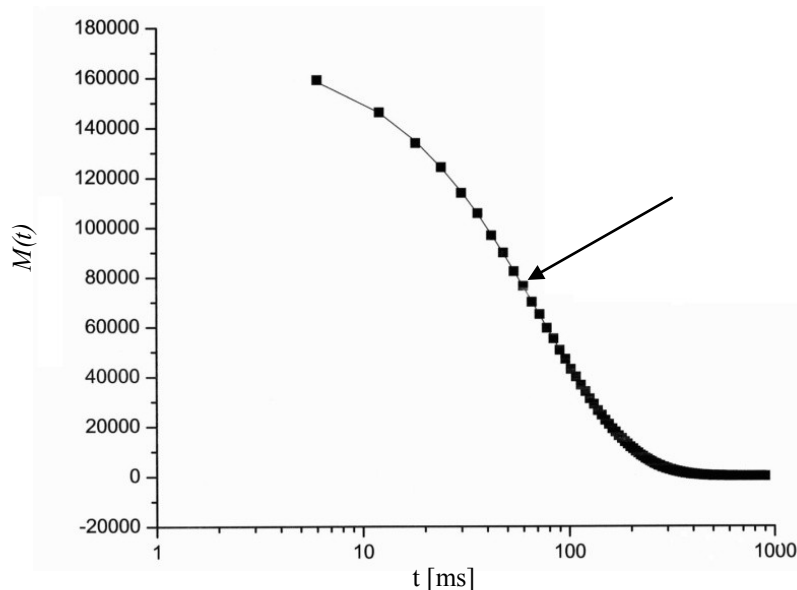
Kontrolna velikost  $\tau_{exch}$  (20 % hematokrit) eritrocitov se je spreminjala od krvodajalca do krvodajalca. Meritve učinkov posameznih efektorjev iste koncentracije na vzorcih 20 % hematokrita, pridobljenih od različnih krvodajalcev ali od istega krvodajalca ob različnih dneh so med seboj pokazale znatno variabilnost v velikosti parametrov  $\tau_{exch}$ . Iz Slike 16 A je jasno razvidna medsebojna variabilnost parametra  $\tau_{exch}$  v kontrolnih vzorcih.

Za natančno določitev časovne konstante difuzijske izmenjave znotrajcelične vode skozi membrano eritrocita ( $\tau_{exch}$ ) paramagnetno označenih vzorcev z 20 % hematokritom izhajamo iz analize izmerjene časovne konstante »efektivnega« transverzalnega relaksacijskega časa protonov znotrajcelične vode ( $T'_{2,a}$ ), ki ga določimo iz položnega dela transverzalne NMR relaksacijske krivulje (Slika 15), s pomočjo izrazov (12)-(20), ob znanih  $T_{2,a} = 78$  ms (neodvisno izmerjen na diamagnetnem vzorcu s 100 % hematokritom),  $T_{2,b} = 1.1$  ms (neodvisno izmerjena na raztopini 10 mM MnCl<sub>2</sub> v hipoosmotskem pufru za eritrocite), ter  $P_a = 0.149$  in  $P_b = 1 - P_a = 0.851$  ( $P_a$  in  $P_b$  sta dejanska deleža znotrajcelične in zunajcelične vode v vzorcu).

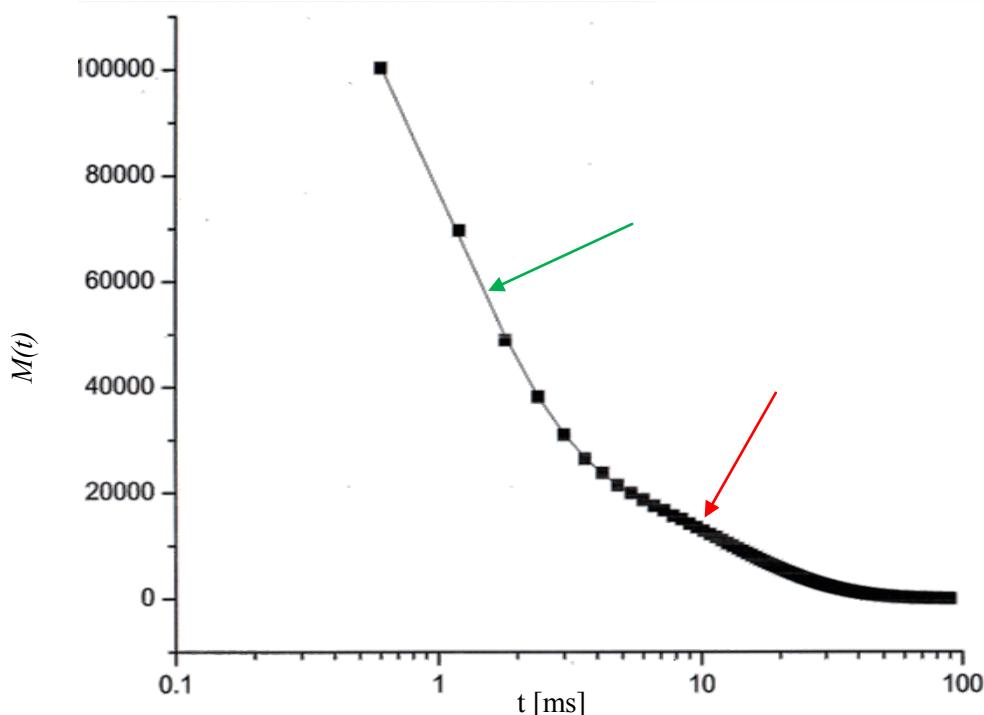
Natančno določitev razmerja znotrajcelične in zunajcelične vode eritrocitnega vzorca ( $V_{in}/V_{out}$ ) omogoča analiza izmerjenega razmerja med deležem celokupnega protonskega NMR signala znotrajcelične in zunajcelične vode ( $P'_a/P'_b$ ) (Slika 15), s pomočjo izrazov (12)-(20).



**Slika 13.** Prikaz merilnega signala NMR spektrometra za vzorce z različnimi raztopinami. Enoeksponencialna krivulja je teoretska prilagoditev izmerjenih točk funkcije  $M(t)$ , določenih z vrhovi spinskih odmevov (kvadratici). Transverzalni relaksacijski čas  $T_2$  protonov vode določimo iz strmine naklona krivulje (puščica).



**Slika 14.** Prikaz merilnega signala NMR spektrometra za vzorce z  $\approx 100$  % hematokritom. Enoeksponencialna krivulja je teoretska prilagoditev izmerjenih točk funkcije  $M(t)$ , določenih z vrhovi spinskih odmevov (kvadratici). Transverzalni relaksacijski čas  $T_2$  protonov znotrajcelične vode določimo iz strmine naklona krivulje (puščica).



**Slika 15.** Prikaz merilnega signala NMR spektrometra za vzorce z 20% hematokritom, ki so zunajcelično paramagnetno označeni z 10 mM raztopino MnCl<sub>2</sub>. Dvoeksponencialna krivulja je teoretska prilagoditev izmerjenih točk funkcije  $M(t)$ , določenih z vrhovi spinskih odmevov (kvadratki). »Efektivni« transverzalni relaksacijski čas  $T'_{2,b}$  protonov zunajcelične vode določimo iz strmine hitro padajočega začetnega dela krivulje (zelena puščica), »efektivni« transverzalni relaksacijski čas  $T'_{2,a}$  protonov znotrajcelične vode določimo iz strmine počasneje padajočega nadaljnega dela krivulje (rdečega puščica). Iz deležev signala zunajcelične vode (določa začetni strmo padajoči del krivulje) in znotrajcelične vode (določa počasneje padajoči nadaljnji del krivulje) določimo  $P'_a$  in  $P'_b$ .

Ker pri meritvah paramagnetno označenih vzorcev z 20 % hematokritom z dodanim NNP upravičeno domnevamo (glej poglavje 5.1.4.), da je prišlo do časovno odvisnega spreminjanja  $T_{2,a}$  protonov znotrajcelične vode zaradi efekta NO, sproščenega iz NNP, je prikazana časovna odvisnost izmerjenega parametra  $T'_{2,a}$  in ne izračunanega parametra  $\tau_{exch}$ .

#### 4.1 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Za statistično analizo podatkov smo uporabili program SPSS 15.0.

Meritve vzorcev z NMR zaradi tehničnih razlogov nismo mogli ponavljati vedno v enakih časovnih intervalih, zato posameznih izmerjenih vrednosti ekvivalentnih vzorcev v določenem času ne moremo opisati s standardnimi statističnimi parametri kot je aritmetična sredina, standardni odklon in standardna napaka aritmetične sredine. Ker

predpostavljamo, da so dejanske vrednosti kontrole konstantne, razumemo minimalna odstopanja v merjenih parametrih kot posledico merske napake. Zato smo izmerjenim parametrom kontrol NMR vzorcev ocenili 95 % interval zaupanja po studentovi t-razporeditvi, predhodno pa smo testirali, ali vrednosti res ustrezajo tej razporeditvi. Ob predpostavki, da je pri meritvah vzorcev možnost enake napake kot pri meritvi kontrole, smo superponirali absolutne velikosti razmika med aritmetično sredino kontrole in njeno ocenjeno zgornjo in spodnjo mejo zaupanja na posamezno izmerjeno velikost parametra vzorca. Tako imajo po naši predpostavki vse meritve vzorca enako absolutno napako, ki smo jo ocenili na podlagi variabilnosti kontrole. Ker se ocene merske napake iz velikosti dobljenih parametrov kontrol ob različnih dnevih in od različnih krvodajalcev razlikujejo, smo vsaki meritvi pripisali napako, ocenjeno iz njej ustrezajoče kontrole. Za testiranje, ali se določena velikost izmerka statistično pomembno razlikuje ( $p < 0.05$ ), smo uporabili t-test za ugotavljanje značilnosti razlik med aritmetično sredino vzorca in v naprej določeno vrednostjo (ang. *one-sample student t-test*). Pri tem je bila upoštevana nezanesljivost meritve zaradi merske napake, ocenjena na podlagi ustrezajoče kontrole. S temi statističnimi orodji smo si pomagali pri oceni ali so razlike, predvsem pri majhnih odstopanjih pri vzorcih z 20 % hematokritom z dodanim NNP, statistično pomembne. Na podlagi zgoraj navedenih statističnih testov ne moremo oceniti resnične statistično pomembne razlike, saj sam sama zastavitev poskusa in meritev, kot že omenjeno, tega ne omogoča.

Pri analizi časovno odvisnega spreminjanja premera eritrocitov, deleža oblikovno spremenjenih eritrocitov, deleža eritrocitnih duhkov in deleža eritrocitov z membranskimi brsti zaradi vpliva različnih efektorjev, ki smo jih opazovali pod mikroskopom, smo uporabili enosmerno analizo variance (primerja varianco znotraj vzorca in med vzorci) in post hoc test LSD (primerja razliko med aritmetičnimi sredinami vzorcev),  $p < 0.05$ .

## 4.2 ANALIZA VPLIVA HgCl<sub>2</sub> IN NNP NA $\tau_{exch}$ IN $V_{in}/V_{out}$ Z NMR METODO

### 4.2.1 Meritve transversalnega relaksacijskega časa protonov vode ( $T_2$ )

#### 4.2.1.1 Meritve $T_2$ v diamagnetnem vzorcu s 100 % hematokritom

Transverzalni relaksacijski čas protonov vode  $T_2$  smo zmerili na diamagnetnem vzorcu tesno pakiranih človeških eritrocitov (hematokrit  $\approx 100$  %) v štirih neodvisnih poskusih (Slika 14).

**Preglednica 6.** Izmerjene velikosti  $T_2$  na 100 % hematokritu\*.

100 % hematokrit $T_2$ [ms]
79.5
73.6
73.3
77.9

$$T_2 = 78.0 \pm 1.6 \text{ ms } (\bar{x} \pm SE); (n=4)$$

\* Povprečje izmerjenih velikosti ustreza transverzalnemu relaksacijskemu času protonov znotrajcelične vode  $T_{2,a}$  v vzorcih s poljubnih hematokritom (v našem primeru za velja za vzorce z 20 %). Prikazane so povprečne velikosti  $T_2$  štirih neodvisnih meritev pri temperaturi  $21 \pm 1$  °C.

#### 4.2.1.2 Meritve $T_2$ v paramagnetnem vzorcu 10 mM raztopine MnCl<sub>2</sub>

Transverzalni relaksacijski čas protonov vode  $T_2$  smo zmerili na paramagnetnem vzorcu 10 mM raztopine MnCl<sub>2</sub> v izoosmotskem pufru za eritrocite (B) v dveh neodvisnih poskusih (Slika 13).

**Preglednica 7.** Izmerjeni velikosti  $T_2$  raztopine 10 mM MnCl<sub>2</sub>\*.

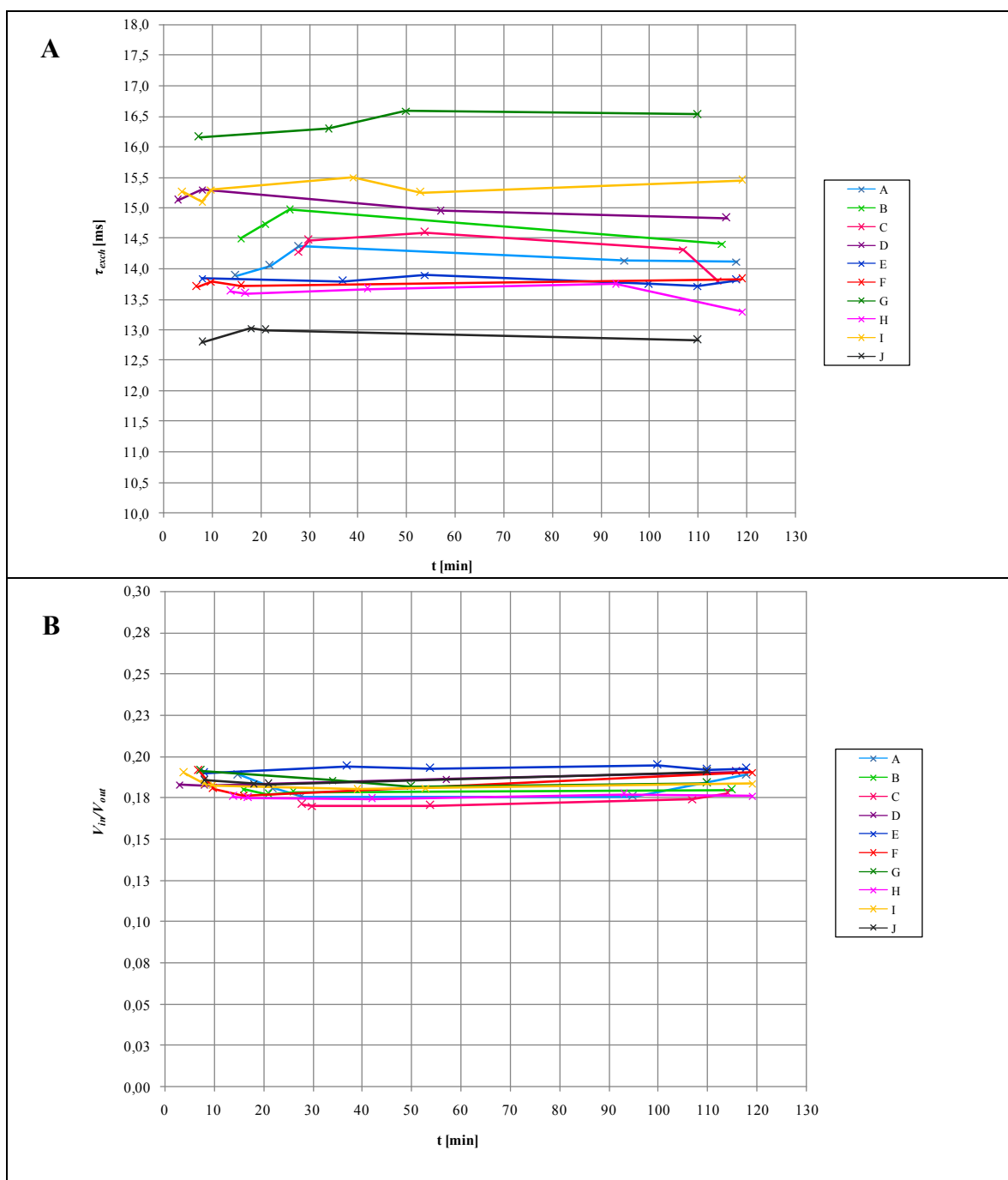
koncentracija [mM]	MnCl <sub>2</sub> $T_2$ [ms]
10	1.0
	1.3

$$T_2 = 1.1 \pm 0.2 \text{ ms } (\bar{x} \pm SE); (n=2)$$

\* Povprečje izmerjenih velikosti ustreza transverzalnemu relaksacijskemu času protonov vode  $T_{2,b}$  v zunajcelični raztopini v vzorcih z 20 % hematokritom in 10 mM MnCl<sub>2</sub>. Prikazani sta velikosti obeh neodvisnih meritev pri temperaturi  $21 \pm 1$  °C.

#### 4.2.2 Prikaz kontrolnih velikosti parametrov $\tau_{exch}$ in $V_{in}/V_{out}$

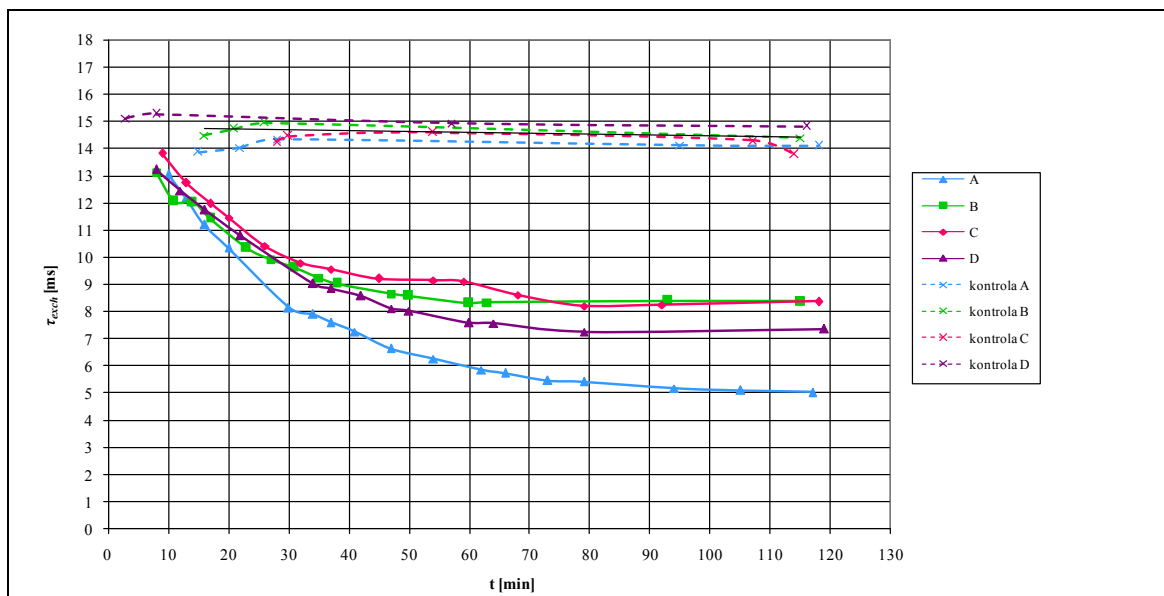
Kontrolna vrednost  $\tau_{exch}$  paramagnetno označenega 20 % hematokrita z 10 mM MnCl<sub>2</sub> je  $14.5 \pm 0.3 \text{ ms } (\bar{x} \pm SE); (n=10)$ . Povprečja  $\tau_{exch}$  meritev kontrole v različnih dnevih so med 12.9 in 16.4 ms. Kontrolna vrednost  $V_{in}/V_{out}$  paramagnetno označenega 20 % hematokrita z 10mM MnCl<sub>2</sub> je  $0.18 \pm 0.002 (\bar{x} \pm SE); (n=10)$ . Povprečja  $V_{in}/V_{out}$  posameznih meritev kontrole so med 0.17 in 0.19.



**Slika 16.** Časovna so-odvisnost kontrolnih parametrov  $\tau_{exch}$  (**A**) in  $V_{in}/V_{out}$  (**B**) v paramagnetno označenem vzorcu z 20 % hematokritom več krvodajalcev v času od 23.2. do 30. 5. 2007\*.

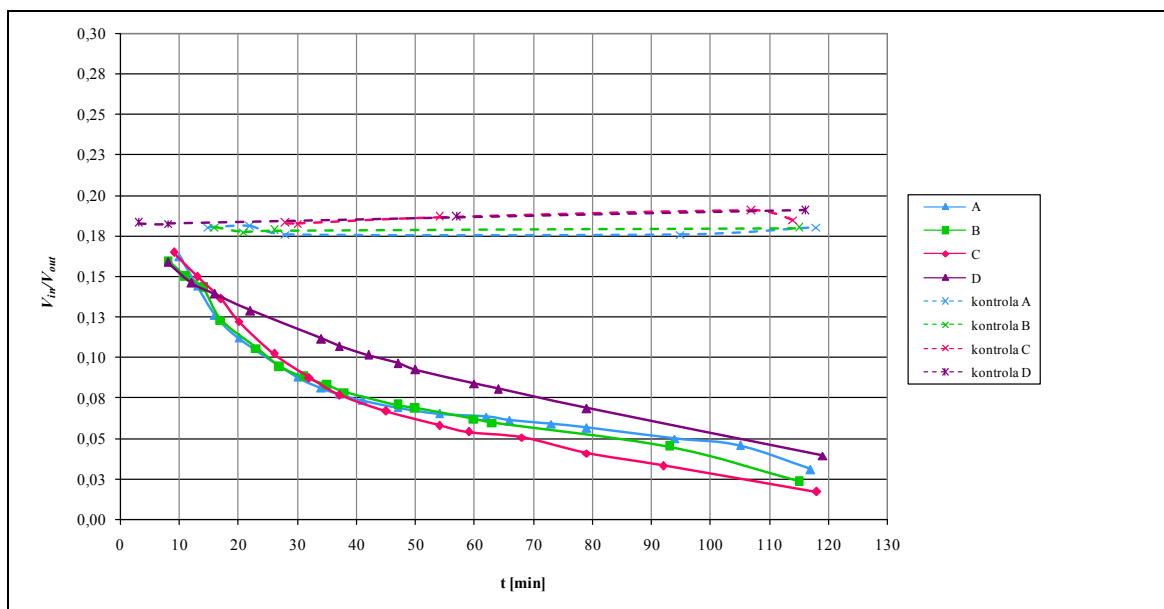
\* Posamezna črka označuje dan meritve. Temperaturno območje meritev:  $21 \pm 1$  °C.

### 4.2.3 Slikovni prikaz vpliva HgCl<sub>2</sub> na človeške eritrocite



**Slika 17.** Vpliv 1 mM HgCl<sub>2</sub> na časovno konstanto  $\tau_{exch}$  difuzijske vodne izmenjave znotrajcelične vode v zunajcelično paramagnetno označenem vzorcu z 20 % hematokritom\*.

\* HgCl<sub>2</sub> je povzročil skrajšanje časovne konstante  $\tau_{exch}$  izmenjave celične vode v vzorcu pri temperaturi  $21 \pm 1$  °C. Prikazane so štiri neodvisne meritve, označene s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.



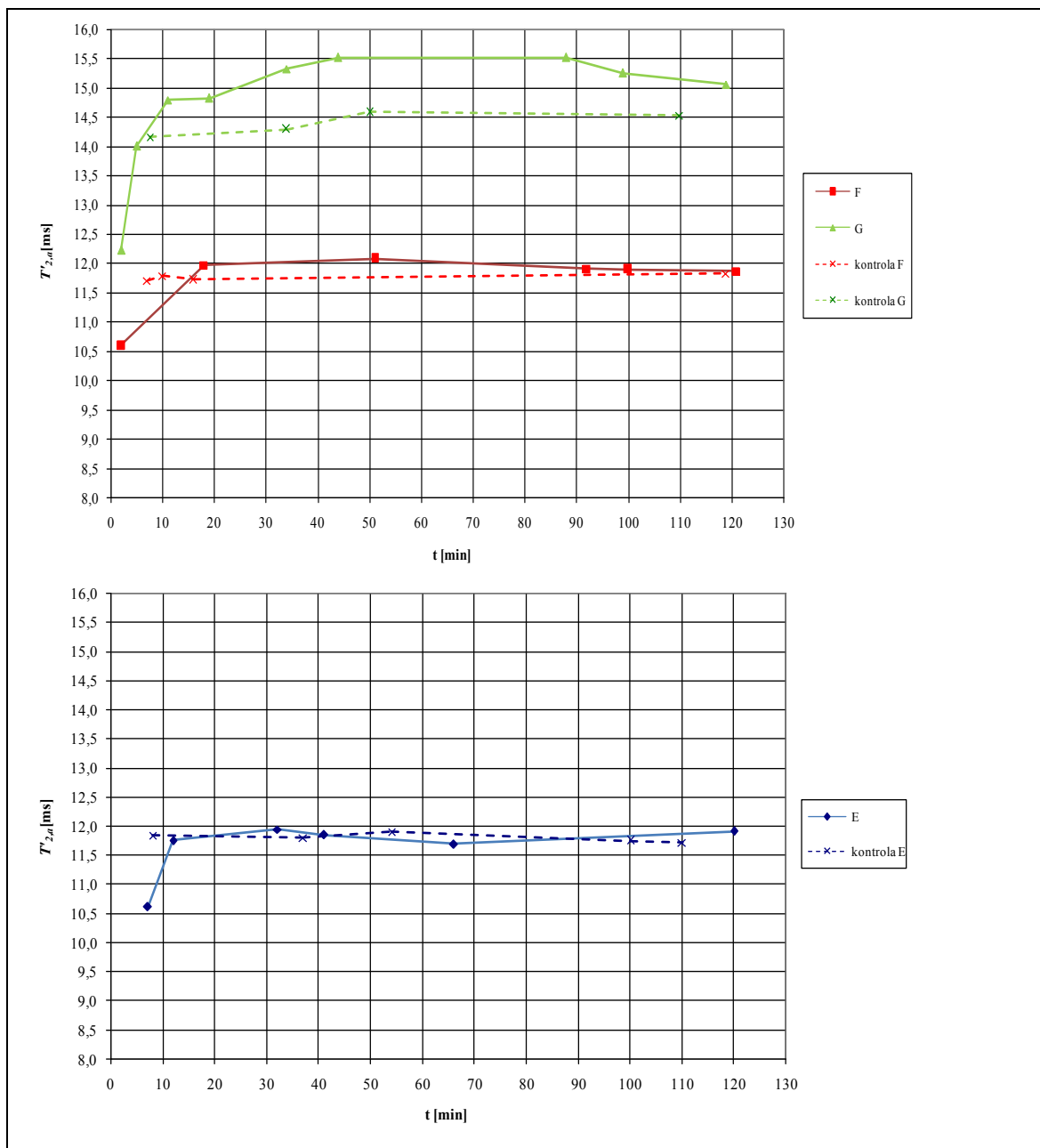
**Slika 18.** Vpliv 1 mM HgCl<sub>2</sub> na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode  $V_{in}/V_{out}$  v zunajcelično paramagnetno označenem vzorcu z 20 % hematokritom\*.

\* HgCl<sub>2</sub> je povzročil zmanjšanje razmerja  $V_{in}/V_{out}$  v vzorcu pri temperaturi  $21 \pm 1$  °C. Prikazane so štiri neodvisne meritve, označene s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.



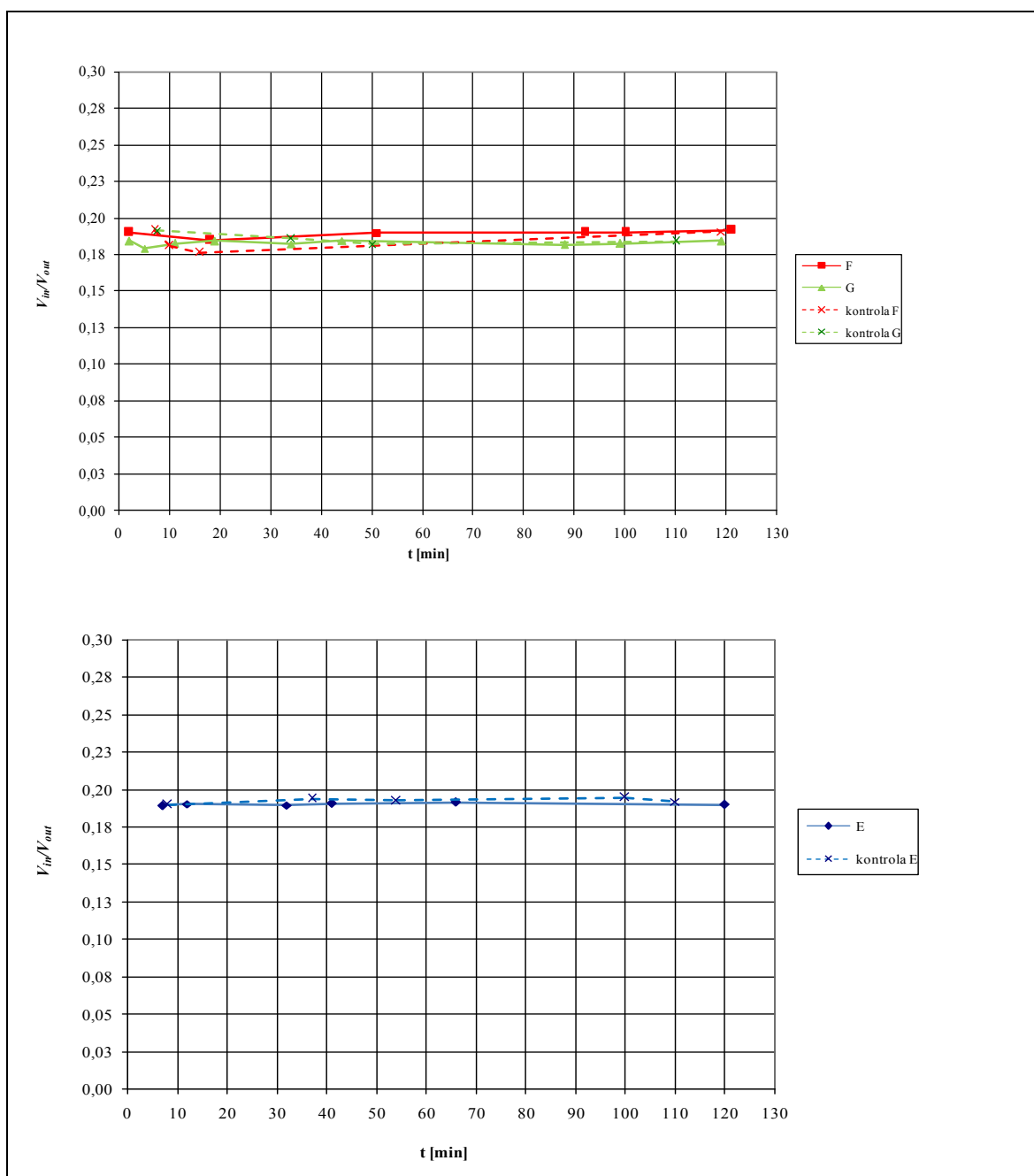
## 4.2.4 Slikovni prikaz vpliva NNP na človeške eritrocite.

### 4.2.4.1 1mM NNP



Slika 19. Vpliv 1 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode ( $T'_{2,a}$ )\*.

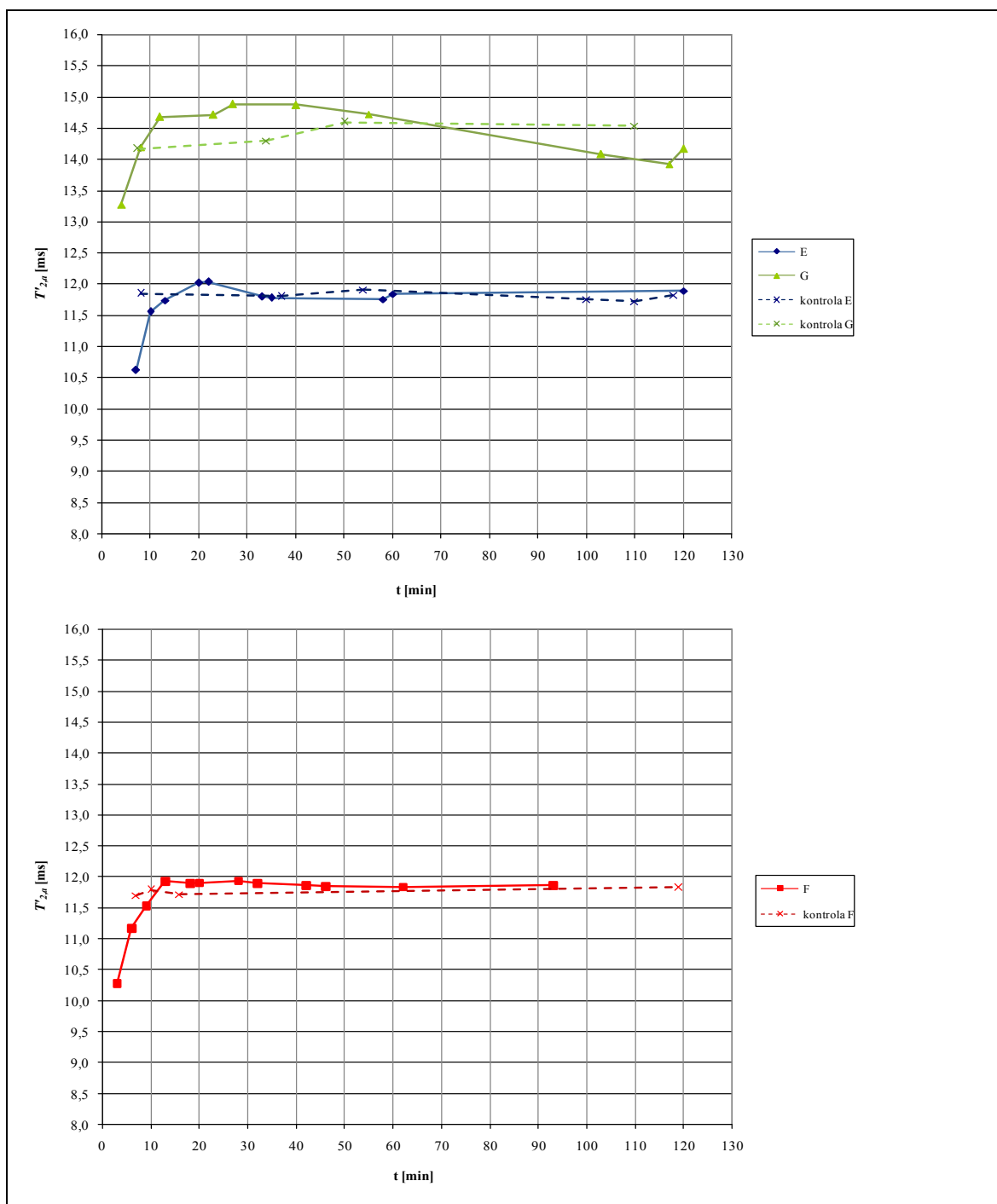
\* NNP je povzročil začetno skrajšanje, nato podaljšanje ter počasno vrnitev tega parametra v območje kontrolne velikosti v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Prikazane so tri neodvisne meritve, označene s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.



**Slika 20.** Vpliv 1 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode  $V_{in}/V_{out}$  v suspenziji eritrocitov\*.

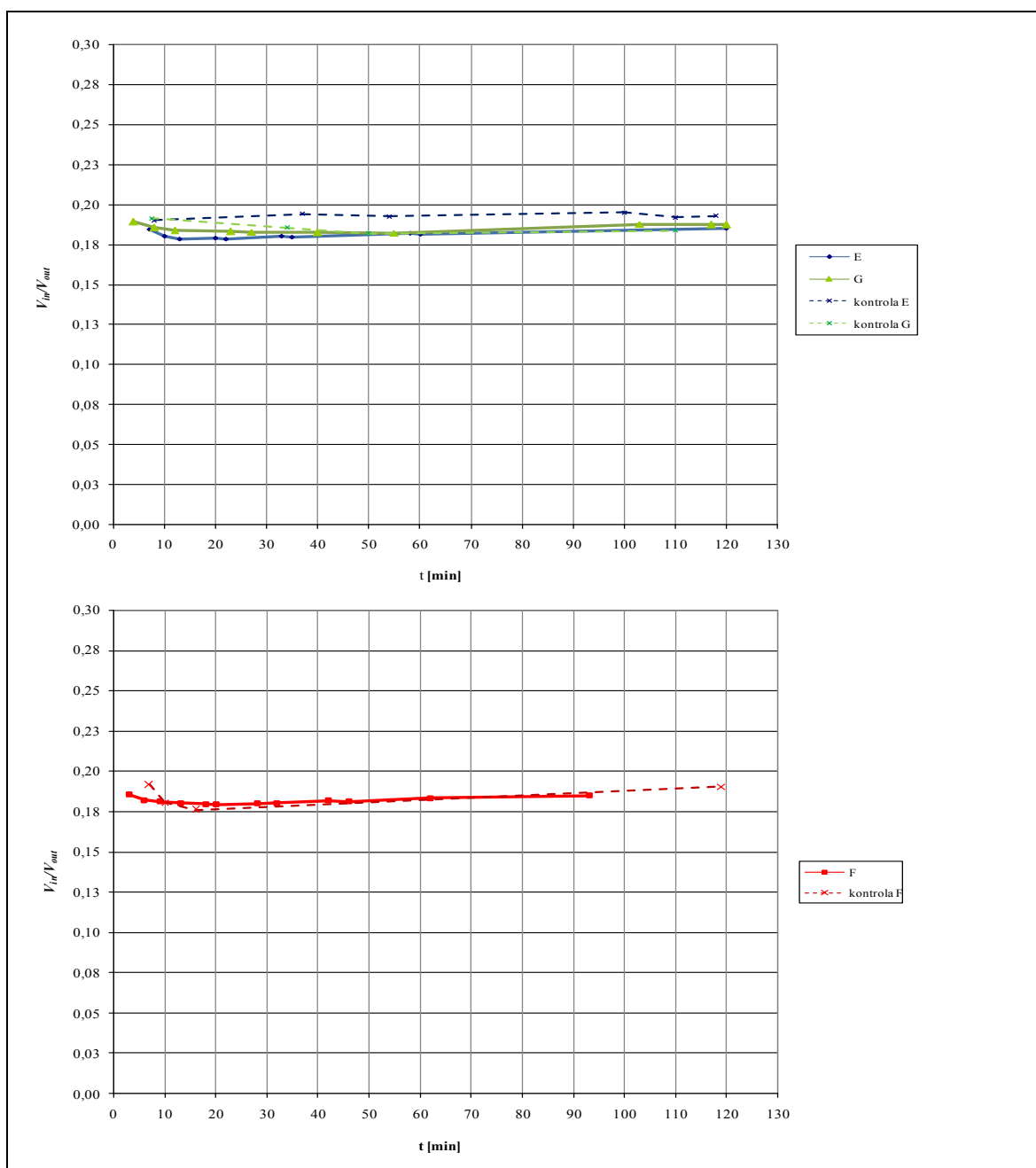
\* NNP ni povzročil spremembe v razmerju  $V_{in}/V_{out}$  v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1$  °C. Prikazane so tri neodvisne meritve, označene s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.

## 4.2.4.2 0.5 mM NNP



**Slika 21.** Vpliv 0.5 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode ( $T'_{2,a}$ )\*.

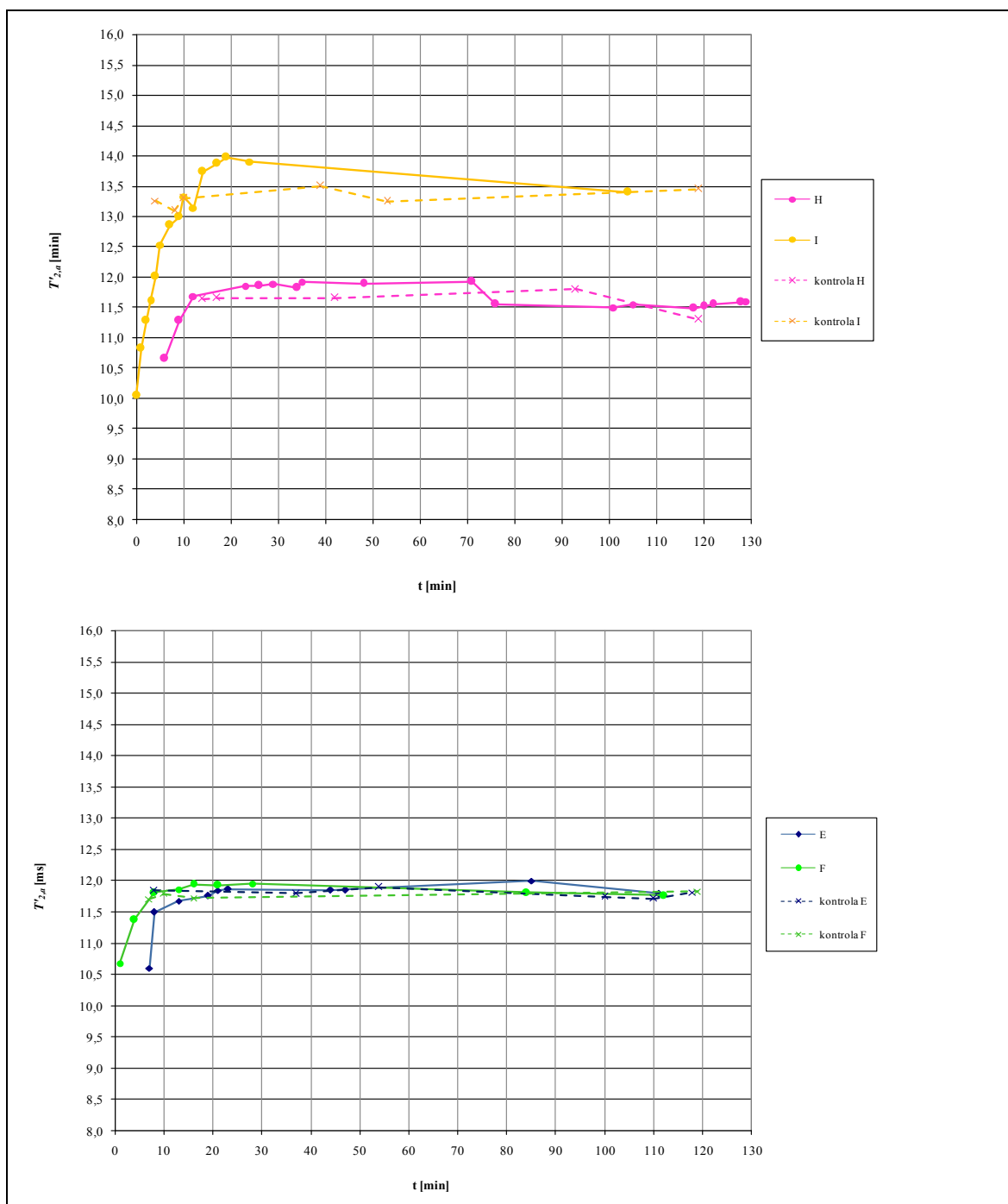
\* NNP je povzročil začetno skrajšanje, nato podaljšanje ter počasno vrnitev tega parametra v območje kontrolne velikosti v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Prikazane so tri neodvisne meritve, označene s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah



**Slika 22.** Vpliv 0.5 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode  $V_{in}/V_{out}$  v suspenziji eritrocitov\*.

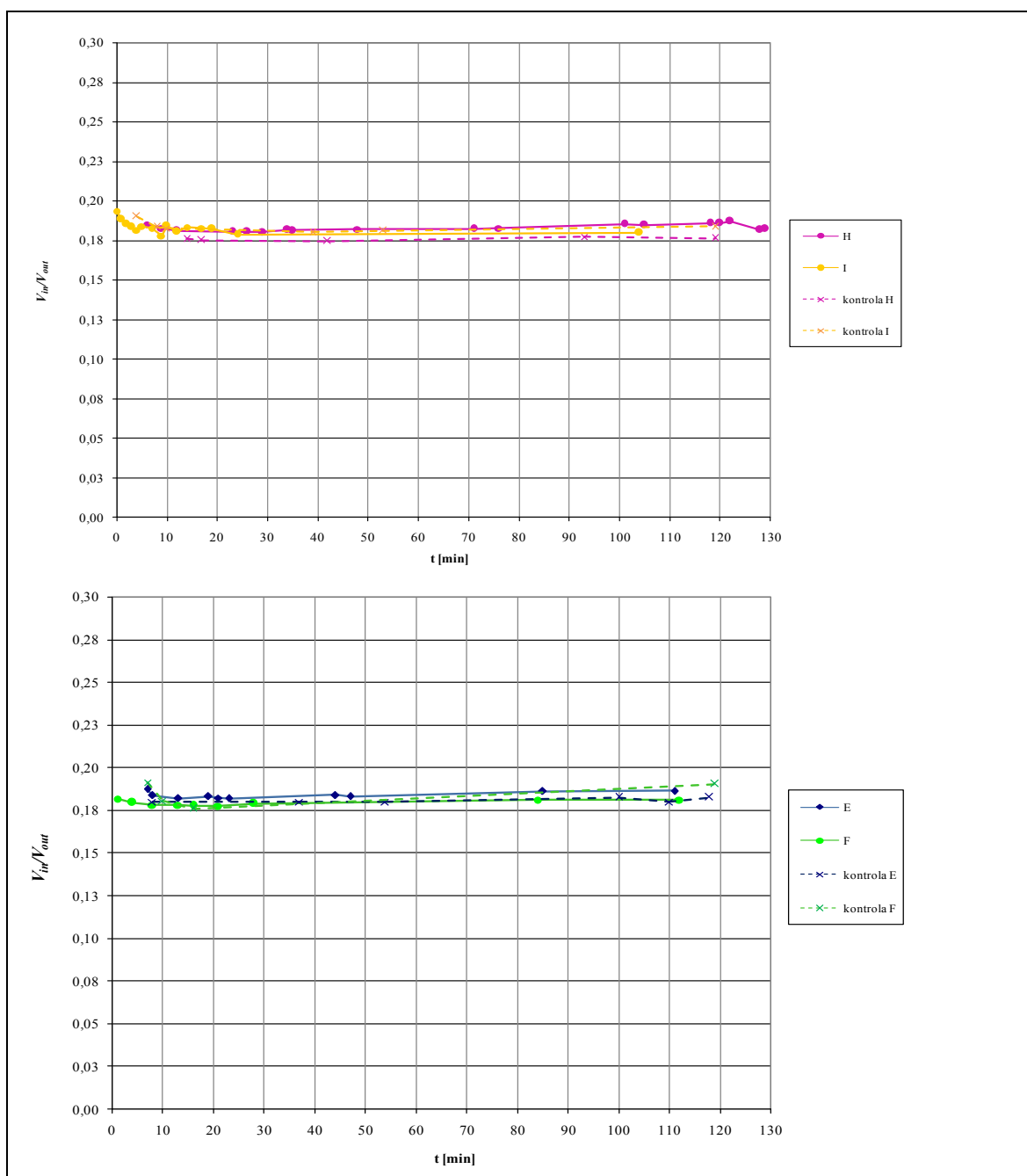
\* NNP ni povzročil spremembe v razmerju  $V_{in}/V_{out}$  v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1$  °C. Prikazane so tri neodvisne meritve, označene s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.

## 4.2.4.3 0.25 mM NNP



**Slika 23.** Vpliv 0.25 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotajcelične vode ( $T'_{2,a}$ )\*.

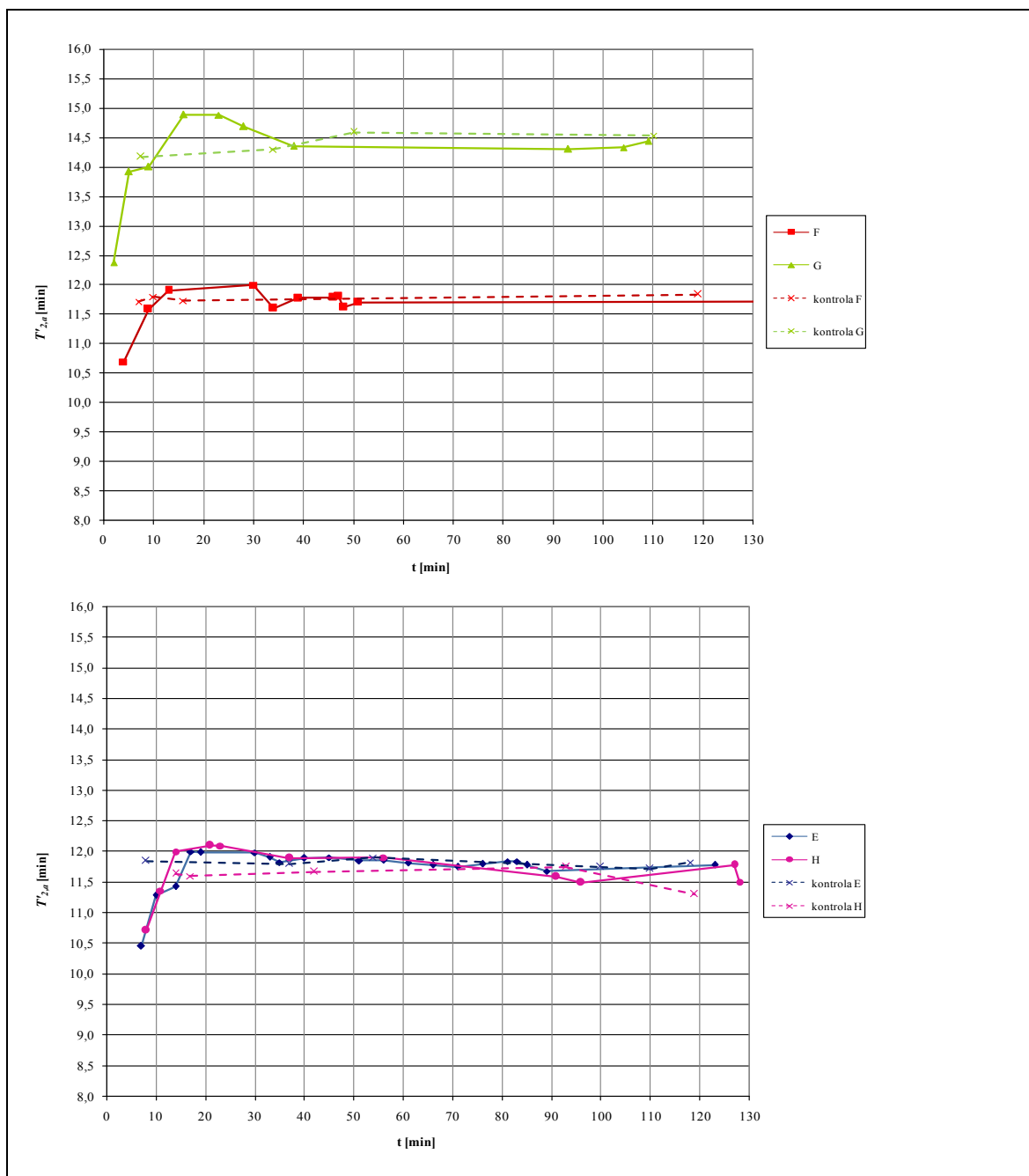
\* NNP je povzročil začetno skrajšanje, nato podaljšanje ter počasno vrnitev tega parametra v območje kontrolne velikosti v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Prikazane so štiri neodvisne meritve, označene s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.



**Slika 24.** Vpliv 0.25 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode  $V_{in}/V_{out}$  v suspenziji eritrocitov\*.

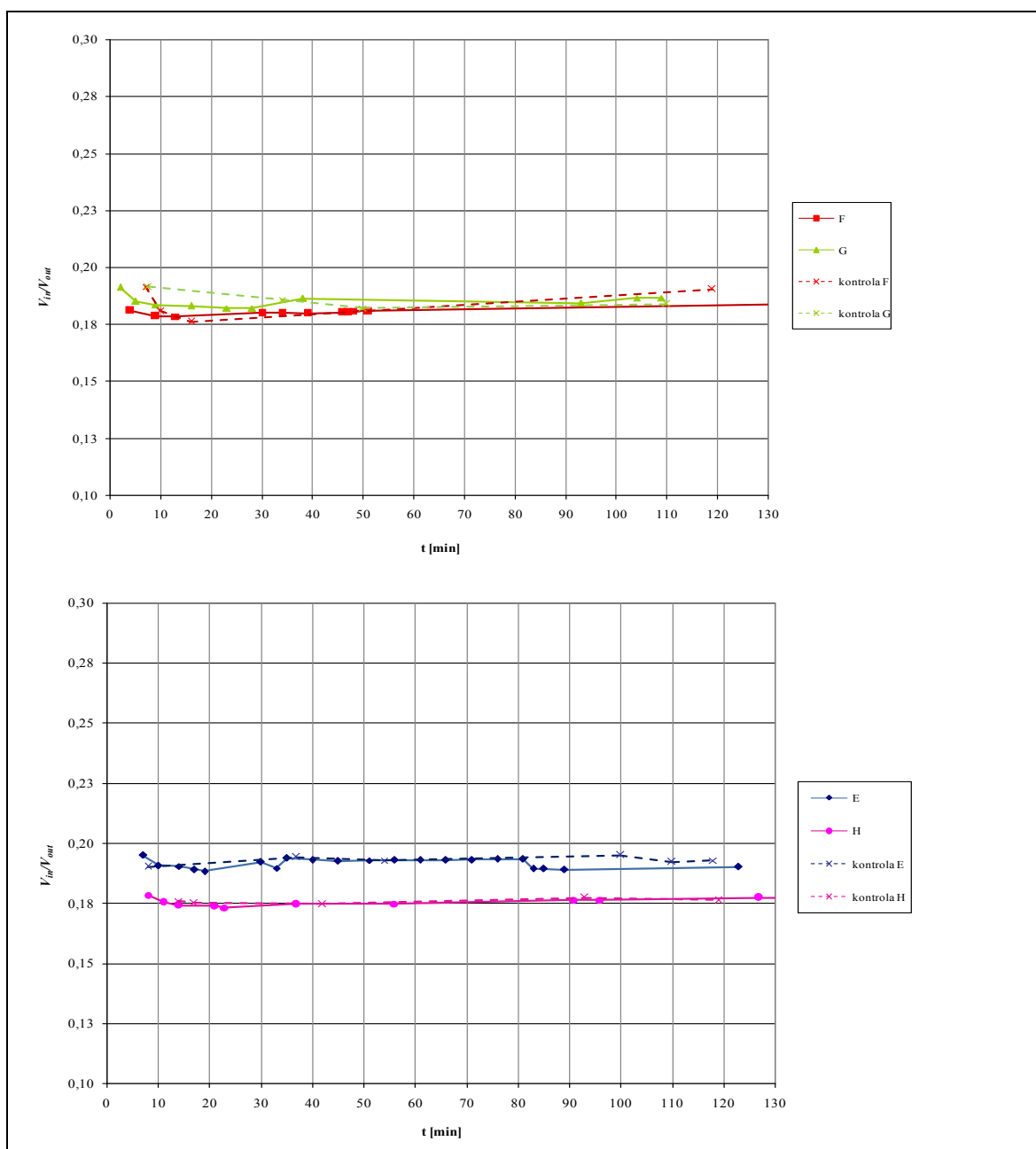
\* NNP ni povzročil spremembe v razmerju  $V_{in}/V_{out}$  v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Prikazane so štiri neodvisne meritve, označene s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.

## 4.2.4.4 0.1 mM NNP



**Slika 25.** Vpliv 0.1 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotajcelične vode ( $T'_{2,a}$ )\*.

\* NNP je povzročil začetno skrajšanje, nato podaljšanje ter počasno vrnitev tega parametra v območje kontrolne velikosti v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Prikazane so štiri neodvisne meritve, označene s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.

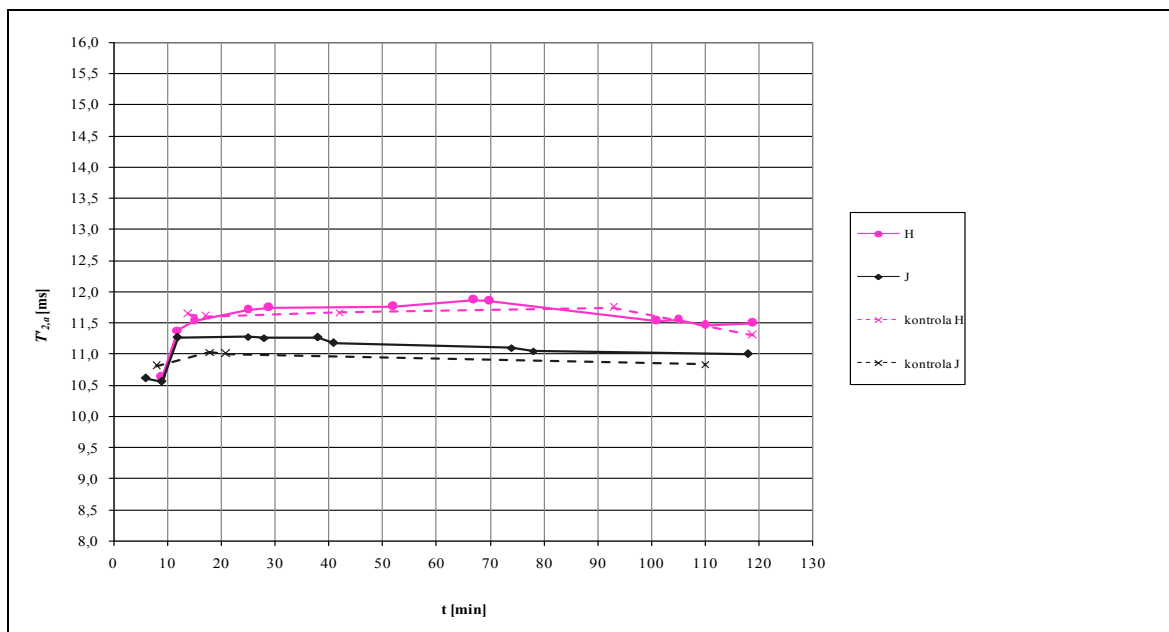


**Slika 26.** Vpliv 0.1 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode  $V_{in}/V_{out}$  v suspenziji eritrocitov\*.

\* NNP ni povzročil spremembe v razmerju  $V_{in}/V_{out}$  v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Prikazane so štiri neodvisne meritve, označene s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.

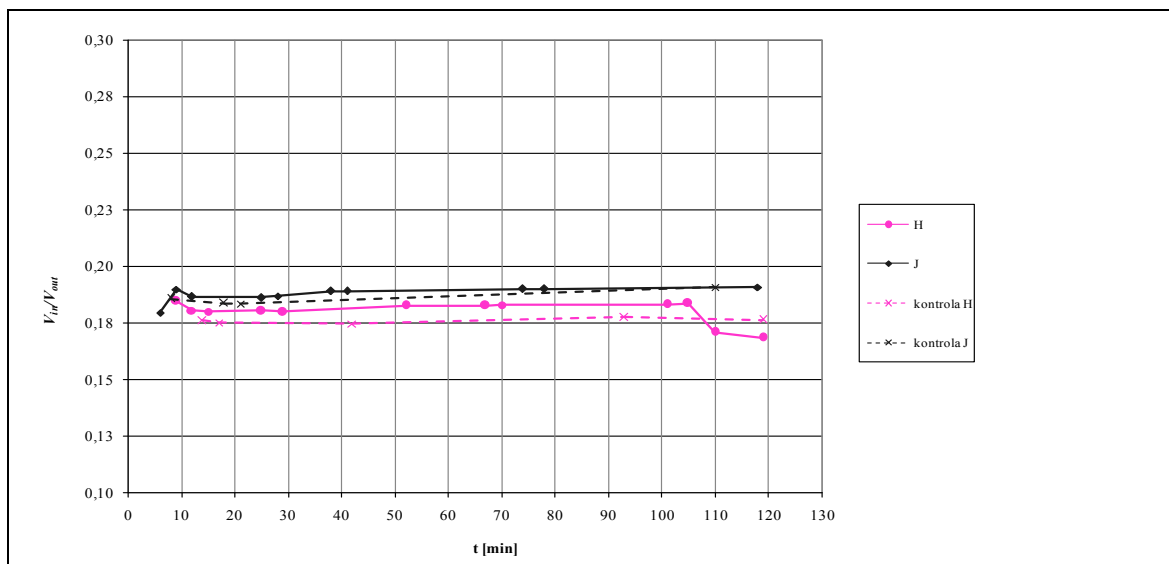


## 4.2.4.5 0.05 mM NNP



**Slika 27.** Vpliv 0.05 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotajcelične vode ( $T'_{2,a}$ )\*.

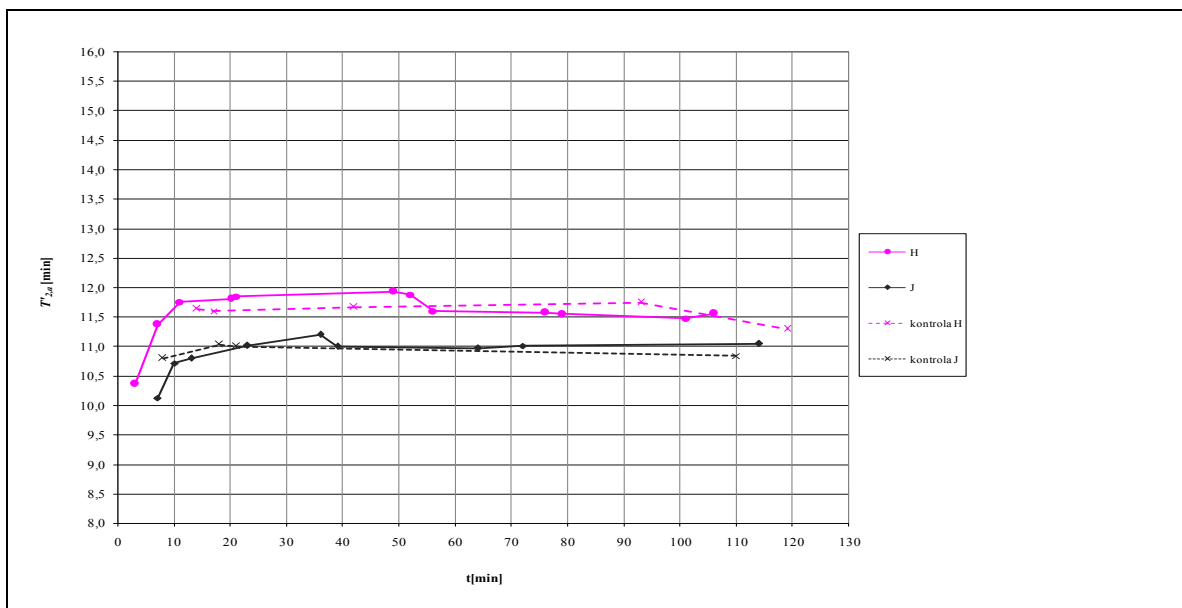
\* NNP je povzročil začetno skrajšanje, nato podaljšanje ter počasno vrnitev tega parametra v območje kontrolne velikosti v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Prikazani sta dve neodvisni meritvi, označeni s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.



**Slika 28.** Vpliv 0.05 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode  $V_{in}/V_{out}$  v suspenziji eritrocitov\*.

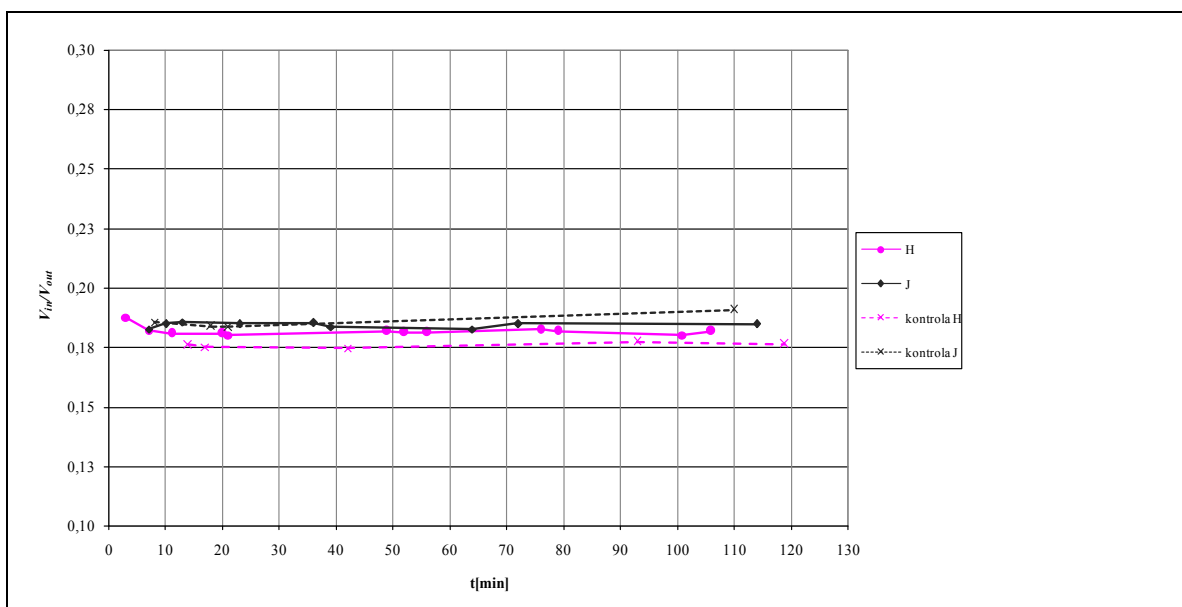
\* NNP ni povzročil spremembe v razmerju  $V_{in}/V_{out}$  v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Prikazani sta dve neodvisni meritvi, označeni s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.

## 4.2.4.6 0.025 mM NNP



**Slika 29.** Vpliv 0.025 mM NNP na izmerjen transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode ( $T'_{2,a}$ )\*.

\* NNP je povzročil začetno skrajšanje, nato podaljšanje ter počasno vrnitev tega parametra v območje kontrolne velikosti v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Prikazani sta dve neodvisni meritvi, označeni s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.



**Slika 30.** Vpliv 0.025 mM NNP na razmerje med znotraj- in zunajceličnim volumnom vode  $V_{in}/V_{out}$  v suspenziji eritrocitov\*.

\* NNP ni povzročil spremembe v razmerju  $V_{in}/V_{out}$  v vzorcu 20 % hematokrita pri temperaturi  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Prikazani sta dve neodvisni meritvi, označeni s črko, ki označuje dan poskusa, v različnih barvah.

**Preglednica 8:** Analiza vpliva NNP na časovno spreminjanje izmerjenega transverzalnega relaksacijskega časa  $T'_{2,a}$  protonov znotrajcelične vode v vzorcih 20 % hematokrita\*.

koncentracija NNP [mM]	vzorec	$T_{2,a \text{ min}}$ [ms]	$\Delta T_{2,a \text{ min}}$ [%]	$\tau_{\text{exch max}}$ [ms]	$\Delta \tau_{\text{exch max}}$ [%]	$\Delta P_d \text{ max}$ [%]
1	E	71.3*	91.4	11.9	101.1	98.9
	F	71.4*	91.5	11.8	101.0	99.0
	G	67.7*	86.8	15.4	106.9	93.1
0.5	E	71.3*	91.4	12.0	101.6	98.4
	F	70.3*	91.4	11.9	101.6	98.4
	G	72.6*	93.1	14.8	102.9	97.1
0.25	E	71.2*	91.3	12.0	101.4	98.6
	F	72.7*	93.2	12.0	102.7	97.3
	H	71.8*	92.1	11.8	101.4	98.6
	I	61.4*	78.7	13.8	103.9	96.1
0.1	E	70.3*	90.2	12.0	101.4	98.6
	F	72.9*	93.5	12.1	103.7	96.3
	H	71.9*	92.2	11.8	101.6	98.4
	G	68.4*	87.7	14.9	103.6	96.4
0.05	J	76.2	97.7	11.2	102.8	97.2
	H	72.5*	93.0	11.9	102.0	98.0
0.025	J	73.2*	93.9	11.1	102.2	97.8
	H	70.9*	91.0	11.9	102.5	97.5

\*  $T_{2,a \text{ min}}$  je najkrajši ugotovljeni transverzalni relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode, izračunan na podlagi največjega izmerjenega skrajšanja  $T'_{2,a}$  takoj po dodatku NNP (časovni razpon do prve meritve: 0-5 min)\*.  $\Delta T_{2,a \text{ min}}$  je delež velikosti tega skrajšanja  $T_{2,a \text{ min}}$  glede na kontrolo velikost  $T_{2,a} = 78$  ms (slednja izmerjena neodvisno na diamagnetnem vzorcu s 100 % hematokritom).  $\tau_{\text{exch max}}$  je največja izračunana časovna konstanta difuzijske izmenjave znotrajcelične vode na podlagi najdaljšega izmerjenega  $T'_{2,a}$  inkubiranega vzorca (izmerjen v časovnem razponu 20-40 minut inkubacije)\*\*.  $\Delta \tau_{\text{exch max}}$  je delež izračunane največje velikosti  $\tau_{\text{exch}}$  inkubiranega vzorca glede na kontrolo velikost  $\tau_{\text{exch}}$ .  $\Delta P_d \text{ max}$  je največje izračunano zmanjšanje difuzijske vodne permeabilnosti membrane na podlagi najdaljšega izmerjenega  $T'_{2,a}$ \*\*\*. V preglednici so z \* so označeni rezultati  $T_{2,a \text{ min}}$  in  $\tau_{\text{exch}}$ , ki se statistično pomembno razlikujejo od kontrole,  $p < 0.05$  (studentov t-test) (glej razlago pod 4.1).

Kontrolne velikosti parametra  $T'_{2,a}$  za merjene vzorce E-J ( $\bar{x} \pm SE$ ) so: E:  $11.8 \pm 0.1$  ms, F:  $11.7 \pm 0.1$  ms, G:  $14.4 \pm 0.3$  ms, H:  $11.6 \pm 0.2$  ms, I:  $13.3 \pm 0.1$  ms, J:  $10.9 \pm 0.2$  ms.

Kontrolna vrednost  $T_{2,a}$  je 78 ms (neodvisno izmerjena na diamagnetnem vzorcu 100 % hematokrita).

Za analizo izmerjenega  $T'_{2,a}$  pri vzorcih z 20% hematokritom zadošča izredno dober približek enačbe (17) za izračun  $\tau_{\text{exch}}$ :

$$\frac{1}{T'_{2,a}} = \frac{1}{\tau_{\text{exch}}} + \frac{1}{T_{2,a}} \quad \dots(29)$$

Iz enačbe (29) je razvidno, da na spreminjanje izmerjenega  $T'_{2,a}$  vpliva sprememba časovne konstante difuzijske izmenjave znotrajcelične vode skozi membrano ( $\tau_{\text{exch}}$ ) in sprememba transverzalnega relaksacijskega časa protonov znotrajcelične vode ( $T_{2,a}$ ).

\* Izračun  $T_{2,a \text{ min}}$  je narejen na predpostavki, da je začetno največje izmerjeno skrajšanje  $T'_{2,a}$  zgolj posledica skrajšanja  $T_{2,a}$  znotrajcelične vode eritrocitov zaradi paramagnetnega efekta NO, ob nespremenjenem  $\tau_{exch}$  ( $\tau_{exch}$  inkubiranega vzorca =  $\tau_{exch}$  kontrole).

\*\* Izračun  $\tau_{exch \text{ max}}$  je narejen na predpostavki, da je največje izmerjeno podaljšanje  $T'_{2,a}$  zgolj posledica podaljšanja  $\tau_{exch}$ , pri  $T_{2,a}$  inkubiranega vzorca =  $T_{2,a}$  kontrole (78 ms).

\*\*\* Izračun  $\Delta P_d \text{ max}$  je narejen na podlagi enačb (27)-(28); pri tem je  $\tau_{exch}^* = \tau_{exch \text{ max}}$ ,  $P_d^* = P_d \text{ max}$  ter  $\tau_{exch}$  in  $P_d =$  kontrolni velikosti  $\tau_{exch}$  in  $P_d$  ustreznega vzorca.

Če efekta skrajšanja  $T_{2,a}$  in podaljšanja  $\tau_{exch}$  sovpadata, so izračunane velikosti  $T_{2,a \text{ min}}$ ,  $\Delta T_{2,a \text{ min}}$ ,  $\tau_{exch \text{ max}}$ ,  $\Delta \tau_{exch \text{ max}}$  in  $\Delta P_d \text{ max}$  podcenjene. Tako je realno skrajšanje  $T_{2,a}$  in podaljšanje  $\tau_{exch}$  dosti večje, njun skupni efekt pa se medsebojno zamaskira.

#### 4.2.5 Paramagnetne lastnosti NNP reakcijskih produktov

Uporabljeni so bili vzorci, opisani pod 3.1.3.1.5

**Preglednica 9.** Vpliv NNP na paramagnetnost vzorca\*.

koncentracija [mM]	KFC $T_2$ [ms]	NNP $T_2$ [ms]
1	1173	1154
	1142	1084
0.3	1136	1082
	1098	1036
0.1	1172	1171
	1122	1090

\* Primerjava med  $T_2$  različnih koncentracij raztopin kalijevega fericianida (KFC) in NNP v izoosmotskem pufru za eritrocite (B). Kontrolna velikost  $T_2$  izoosmotskega pufra za eritrocite (B) je 1151 ms. Prikazani sta velikosti  $T_2$  obeh neodvisnih meritev.

**Preglednica 10.** Vpliv NNP na paramagnetnost vzorca v prisotnosti –SH skupin N-acetilcisteina, v izoosmotskem pufru za eritrocite (B)\*.

koncentracija [mM]	N-acetilcistein $T_2$ [ms]	NNP $T_2$ [ms]	NNP + N-acetilcistein $T_2$ [ms]
1	1025	1015	890
	1021	1007	900

\* Kontrolna velikost  $T_2$  izoosmotskega pufra za eritrocite (B) je 1117 ms. Prikazani sta velikosti  $T_2$  obeh neodvisnih meritev.

### 4.3 ANALIZA VPLIVA HgCl<sub>2</sub> IN NNP NA VOLUMEN IN OBLIKO ČLOVEŠKIH ERITROCITOV S SVETLOBNIM MIKROSKOPOM

#### 4.3.1 1.3.1 Spremembe volumna človeških eritrocitov zaradi vpliva HgCl<sub>2</sub> in NNP

Uporabljeni so bili vzorci z 0.5 % hematokritom in 25 µM HgCl<sub>2</sub> ali NNP v izoosmotski raztopini NaCl, opisani po pod 3.1.3.2.2. Premeri eritrocitov so bili izmerjeni na slikah, posnetih na ravnih objektnih steklih. Kontrolni vzorec je bil 0.5 % hematokrit v izoosmotski raztopini NaCl.

**Preglednica 11.** Časovno spreminjanje premera eritrocita zaradi vpliva HgCl<sub>2</sub>\*.

t [min]	premer eritrocita v kontroli $\bar{x} \pm SE$ [µm]	premer eritrocita z dodanim 25 µM HgCl <sub>2</sub> $\bar{x} \pm SE$ [µm]
1	7.3 ± 0.06	7.4 ± 0.06
10	7.4 ± 0.09	7.3 ± 0.09
20	7.2 ± 0.04	7.2 ± 0.06
45	7.3 ± 0.15	7.0 ± 0.06*
60	7.3 ± 0.05	6.9 ± 0.07*

\* Podana je aritmetična sredina in standardna napaka ocene aritmetične sredine. Z \* so označeni rezultati, ki se statistično pomembno razlikujejo ( $p < 0.05$ ) od premera kontrole v ustreznem času, brez upoštevanja merske napake odčitka premera. Uporabljena je enosmerna analiza variance, LSD post hoc test. Za vsako meritev je bilo narejenih deset naključnih posnetkov preparata (n=10), povprečno število eritrocitov na posnetek je 70±3.

**Preglednica 12.** Časovno spreminjanje premera eritrocita zaradi vpliva NNP\*.

t [min]	premer eritrocita v kontroli $\bar{x} \pm SE$ [µm]	premer eritrocita z dodanim 25 µM NNP $\bar{x} \pm SE$ [µm]
1	7.3 ± 0.06	7.4 ± 0.14
10	7.4 ± 0.09	7.3 ± 0.08
20	7.2 ± 0.04	7.3 ± 0.05
45	7.3 ± 0.15	7.2 ± 0.06
60	7.3 ± 0.05	7.3 ± 0.03

\* Podana je aritmetična sredina in standardna napaka ocene aritmetične sredine. Z \* so označeni rezultati, ki se statistično pomembno razlikujejo ( $p < 0.05$ ) od premera kontrole v ustreznem času, brez upoštevanja merske napake odčitka premera. Uporabljena je enosmerna analiza variance, LSD post hoc test. Za vsako meritev je bilo narejenih deset naključnih posnetkov preparata (n=10), povprečno število eritrocitov na posnetek je 70±3.

Dobljeni podatki kontrole in vzorcev se pri obeh neodvisnih poskusih niso pomembno razlikovali, zato smo prikazali rezultate ene ponovitve.

Napaka odčitka premera eritrocita na mikrografiji znaša 0.25 µm. (To je preračunana napaka odčitka 0.25 mm na mikrografiji.)

### 4.3.2 1.3.2. Spremembe oblike človeških eritrocitov zaradi vpliva HgCl<sub>2</sub> in NNP

Uporabljeni so bili vzorci s 0.5 % hematokritom in HgCl<sub>2</sub> (0.1 mM ali 25 μM) ali NNP (25 μM) v izoosmotski raztopini NaCl, opisani pod 3.1.3.2.2. Deleži oblikovno spremenjenih eritrocitov in eritrocitnih duhkov so bili določeni na mikrografijah, posnetih na ravnih objektnih steklih, priložene mikrografije pa so posnete na vzorcih na objektnih steklih z vdolbino. Vzorec z 0.1 mM HgCl<sub>2</sub> je bil posnet samo na steklu z vdolbino, zato zanj delež oblikovno spremenjenih eritrocitov in eritrocitnih duhkov ni bil številčno določen. Kontrolni vzorec je bil 0.5 % hematokrit v izoosmotski raztopini NaCl.

#### 4.3.2.1 Spremembe oblike človeških eritrocitov zaradi vpliva HgCl<sub>2</sub>

**Preglednica 13.** Časovno spreminjanje števila oblikovno spremenjenih eritrocitov in deleža eritrocitnih duhkov zaradi vpliva HgCl<sub>2</sub>\*.

t [min]	delež oblikovno spremenjenih eritrocitov v kontroli $\bar{x} \pm SE$	delež eritrocitnih duhkov v kontroli $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež oblikovno spremenjenih eritrocitov v vzorcu z 25 μM HgCl <sub>2</sub> $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež eritrocitnih duhkov v vzorcu z 25 μM HgCl <sub>2</sub> $\bar{x} \pm SE$ [%]
1	0.22 ± 0.10	3.02 ± 1.20	50.45 ± 2.56*	3.01 ± 0.89
10	1.07 ± 0.07	1.01 ± 0.86	54.37 ± 3.49*	5.97 ± 0.34*
20	2.67 ± 0.03	2.34 ± 0.44	83.57 ± 5.67*	7.36 ± 1.12*
45	1.08 ± 1.02	2.07 ± 0.99	97.28 ± 3.38*	12.47 ± 6.09*
60	2.98 ± 0.37	1.92 ± 0.54	98.02 ± 1.94*	15.18 ± 7.39*

\* Podana je aritmetična sredina in standardna napaka ocene aritmetične sredine. Z \* so označeni rezultati, ki se statistično pomembno razlikujejo ( $p < 0.05$ ) od velikosti kontrole v ustreznem času. Uporabljena je enosmerna analiza variance, LSD post hoc test. Za vsako meritev je bilo narejenih deset naključnih posnetkov preparata ( $n=10$ ), povprečno število eritrocitov na posnetek je  $70 \pm 3$ .

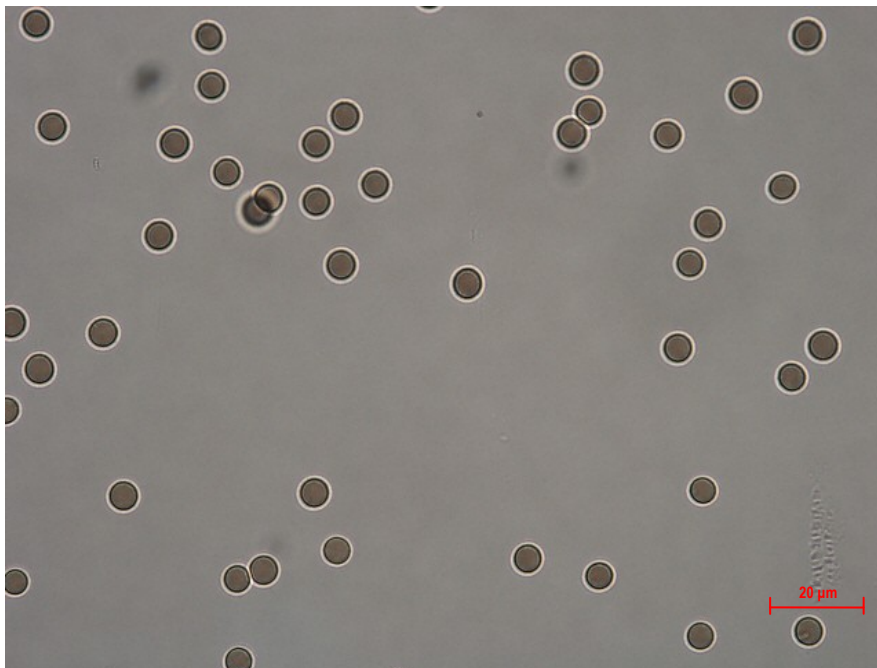
Dobljeni podatki kontrole in vzorcev se pri obeh neodvisnih poskusih niso pomembno razlikovali, zato smo prikazali rezultate ene ponovitve.

**Preglednica 14.** Časovnega spreminjanja števila brstečih eritrocitov zaradi vpliva HgCl<sub>2</sub>\*.

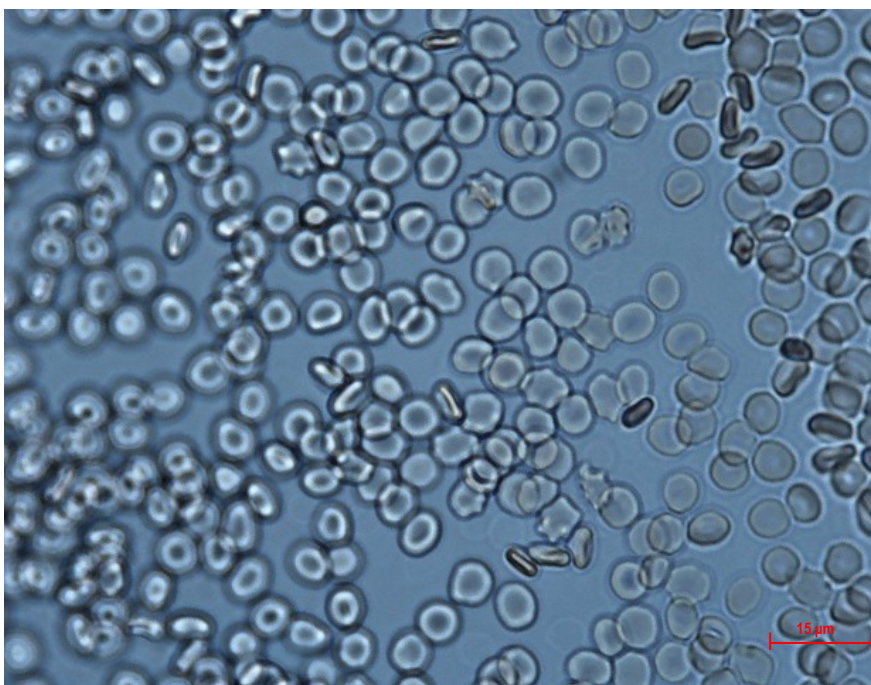
t [min]	delež brstečih eritrocitov v kontroli $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež brstečih eritrocitov v vzorcu z 25 μM HgCl <sub>2</sub> $\bar{x} \pm SE$ [%]
1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
20	0.00 ± 0.00	5.21 ± 0.75*
45	0.00 ± 0.00	7.59 ± 0.48*
60	0.00 ± 0.00	10.07 ± 1.49*

\* Podana je aritmetična sredina in standardna napaka ocene aritmetične sredine. Z \* so označeni rezultati, ki se statistično pomembno razlikujejo ( $p < 0.05$ ) od velikosti kontrole v ustreznem času. Uporabljena je enosmerna analiza variance, LSD post hoc test. Za vsako meritev je bilo narejenih deset naključnih posnetkov preparata ( $n=10$ ), povprečno število eritrocitov na posnetek je  $70 \pm 3$ .

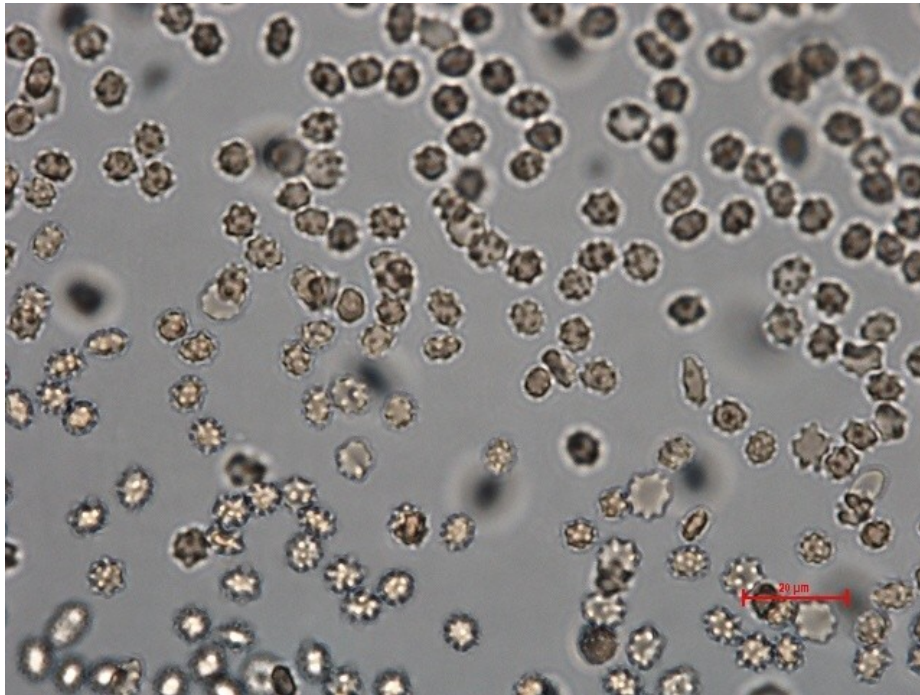
Dobljeni podatki kontrole in vzorcev se pri obeh neodvisnih poskusih niso pomembno razlikovali, zato smo prikazali rezultate ene ponovitve. Kot brsteče eritrocite smo upoštevali tiste, ki so imeli pridružene majhne hčerinske brste (glej Slika 35).



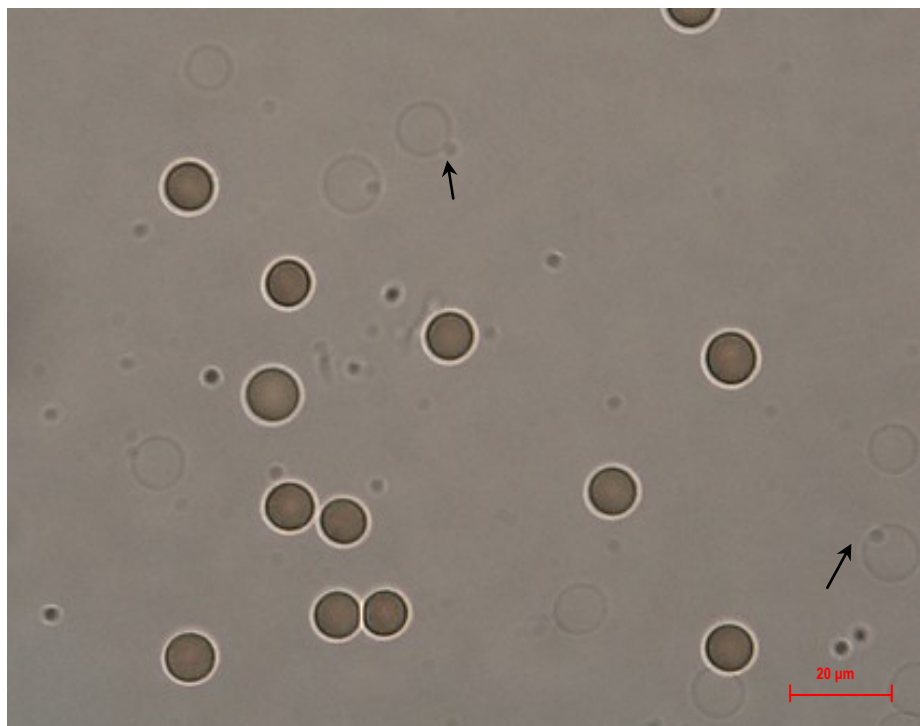
**Slika 31.** Mikrografija 0.5 % hematokrita v izosmotski raztopini NaCl po 20 minutah (kontrola). Vidna je nativna diskoidna oblika eritrocitov.



**Slika 32.** Mikrografija 0.5 % hematokrita v izosmotski raztopini NaCl po 60 minutah (kontrola). Vidna je nativna diskoidna oblika eritrocitov z minimalnim deležem ehinocitov.

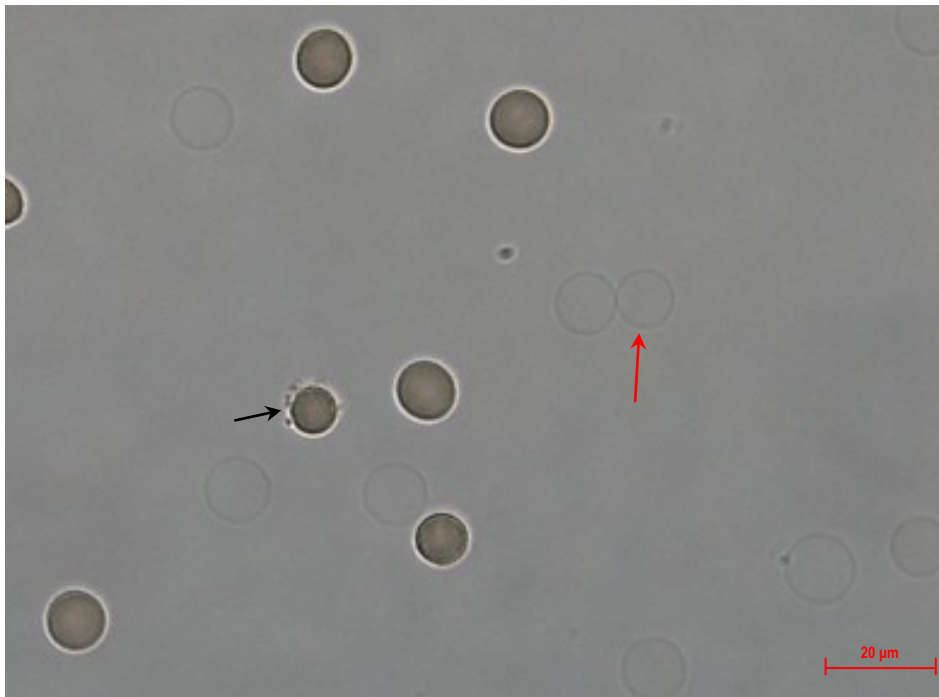


**Slika 33.** Mikrografija 0.5 % hematokrita z 25 μM HgCl<sub>2</sub> po 20 minutah. Koncentracijsko razmerje ustreza 20 % hematokritu z 1 mM HgCl<sub>2</sub>. HgCl<sub>2</sub> povzroči nastanek ehinocitov. Časovno se delež ehinocitov veča (Preglednica 13).

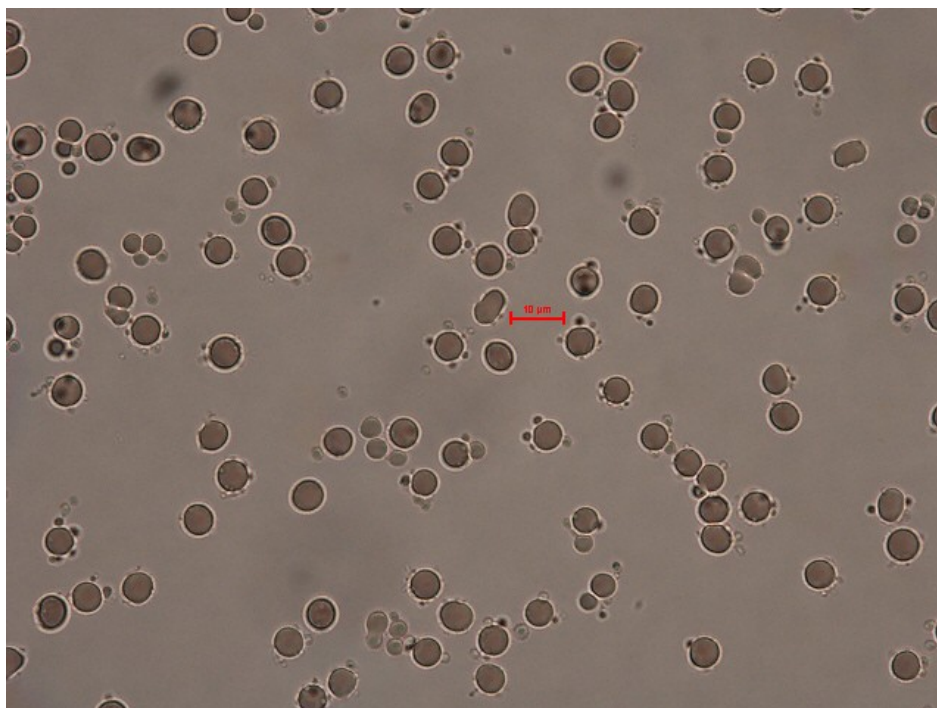


**Slika 34.** Mikrografija 0.5% hematokrita z 25 μM HgCl<sub>2</sub> po 60 minutah. Koncentracijsko razmerje ustreza 20 % hematokritu z 1 mM HgCl<sub>2</sub>. HgCl<sub>2</sub> povzroči nastanek mikroveziklov (črna puščica).

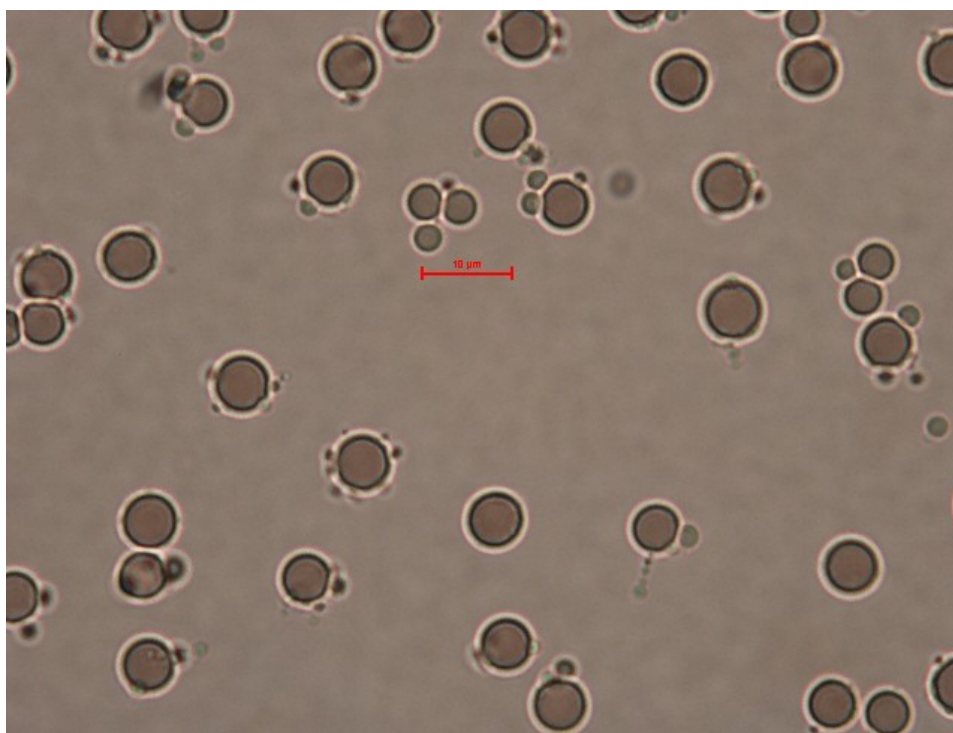




**Slika 35.** Mikrografija 0.5% hematokrita z 25  $\mu\text{M}$  HgCl<sub>2</sub> po 60 minutah. HgCl<sub>2</sub> povzroči nastanek mikroveziklov (črna puščica). Na sliki so tudi eritrocitni duhki (rdeča puščica).



**Slika 36.** Mikrografija 0.5% hematokrita z 0.1 mM HgCl<sub>2</sub> po 45 minutah. HgCl<sub>2</sub> povzroči nastanek mikroveziklov, ki so številnejši in večji kot pri štirikrat nižji koncentraciji (to je 25  $\mu\text{M}$  HgCl<sub>2</sub>).



Slika 37. Mikrografija 0.5% hematokrita z 0.1 mM HgCl<sub>2</sub> po 45 minutah. Prikazan je povečan del slike 36.

#### 4.3.2.2 Spremembe oblike človeških eritrocitov zaradi vpliva NNP

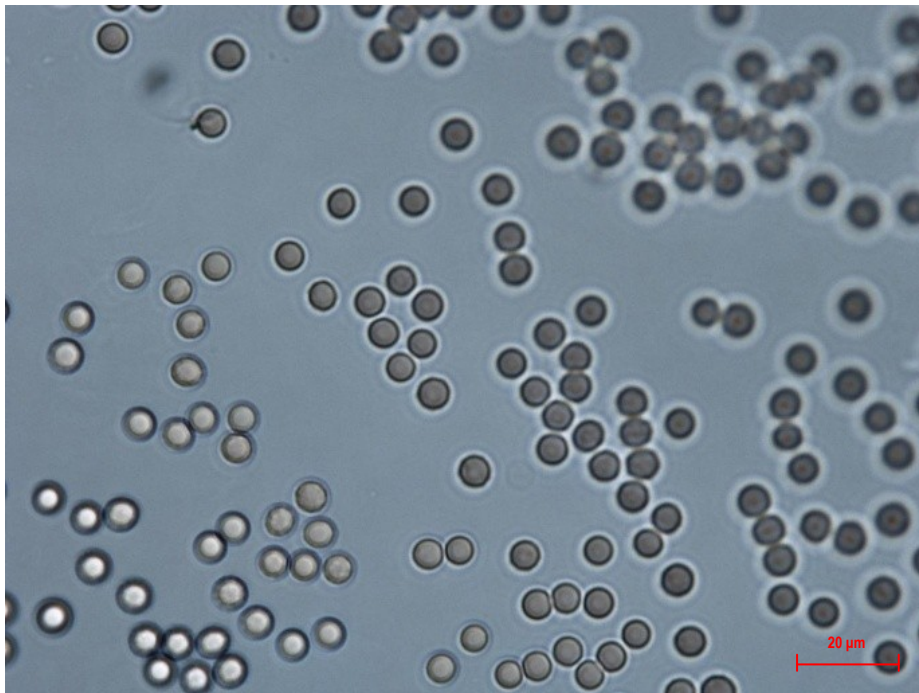
**Preglednica 15.** Časovno spreminjanje deleža oblikovno spremenjenih eritrocitov in deleža eritrocitnih duhkov zaradi vpliva NNP\*.

t [min]	delež oblikovno spremenjenih eritrocitov v kontroli $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež eritrocitnih duhkov v kontroli $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež oblikovno spremenjenih eritrocitov v vzorcu z 25 $\mu$ M NNP $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež eritrocitnih duhkov v vzorcu z 25 $\mu$ M NNP $\bar{x} \pm SE$ [%]
1	0.22 $\pm$ 0.10	3.02 $\pm$ 1.02	1.89 $\pm$ 0.61	1.26 $\pm$ 0.70
10	1.07 $\pm$ 0.07	1.01 $\pm$ 0.86	2.35 $\pm$ 0.23	1.01 $\pm$ 0.86
20	2.67 $\pm$ 0.03	2.34 $\pm$ 0.44	4.27 $\pm$ 0.09	2.56 $\pm$ 0.04
45	4.08 $\pm$ 1.02	2.07 $\pm$ 0.99	8.29 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.69
60	3.98 $\pm$ 0.37	1.92 $\pm$ 0.54	7.72 $\pm$ 0.34	1.52 $\pm$ 0.34

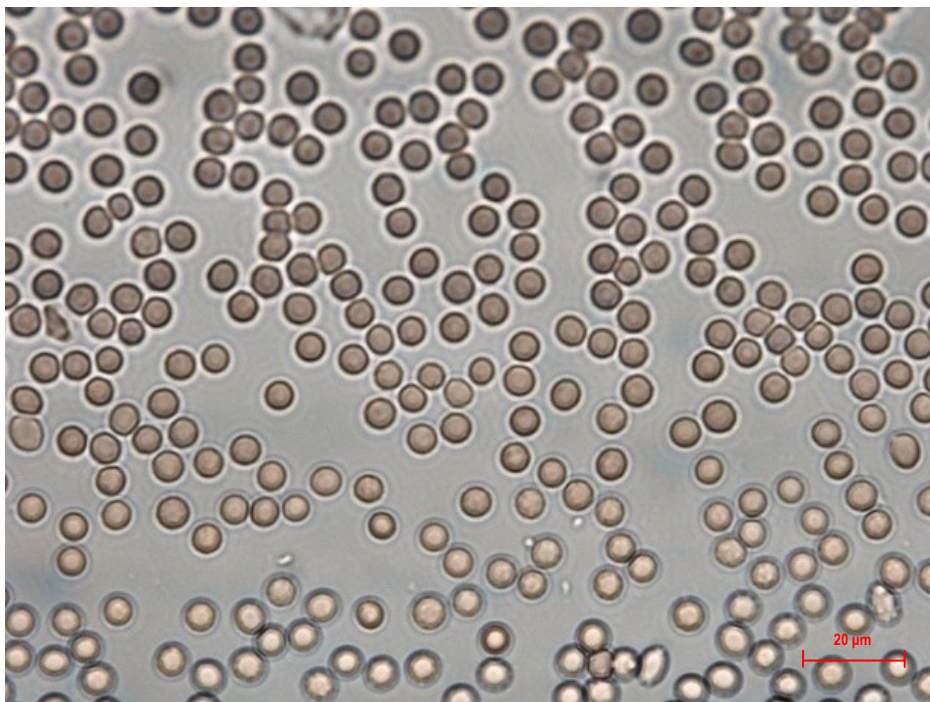
\* Podana je aritmetična sredina in standardna napaka aritmetične sredine. Z \* so označeni rezultati, ki se statistično pomembno razlikujejo ( $p < 0.05$ ) od velikosti kontrole v ustreznem času. Uporabljena je enosmerna analiza variance, LSD post hoc test. Za vsako meritev je bilo narejenih deset naključnih posnetkov preparata ( $n=10$ ), povprečno število eritrocitov na posnetek je  $70 \pm 3$ .

Dobljeni podatki kontrole in vzorcev se pri obeh neodvisnih poskusih niso pomembno razlikovali, zato smo prikazali rezultate ene ponovitve.

Kontrole slike ustrezajo kontrolnim slikam pod 4.3.2.1, Slika 31 in 32.



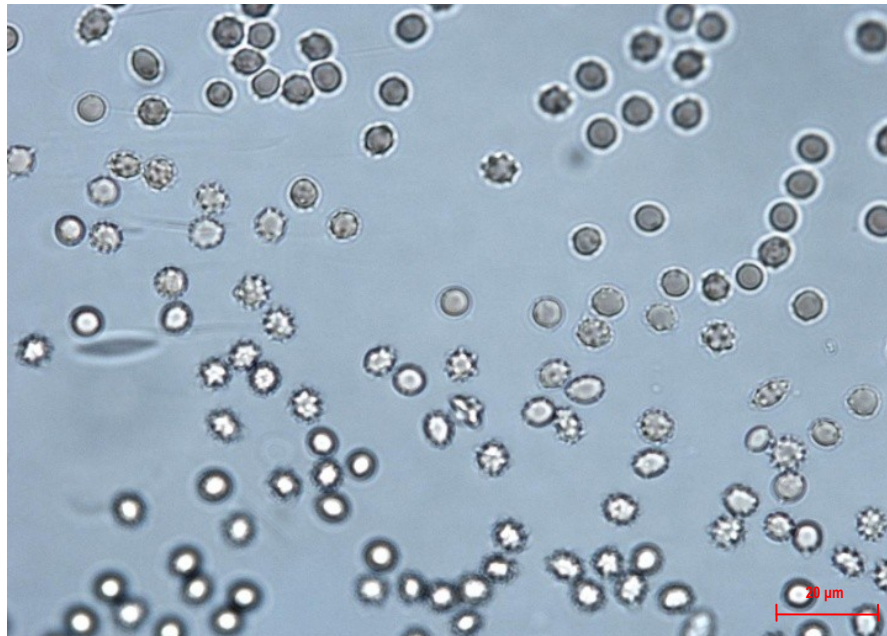
**Slika 38.** Mikrografija 0.5 % hematokrita z 25 μM NNP po 20 minutah. Koncentracijsko razmerje ustreza 20% hematokritu z 1 mM NNP. NNP ne povzroča sprememb v geometriji eritrocita. Vidna je nativna diskoidna oblika eritrocitov.



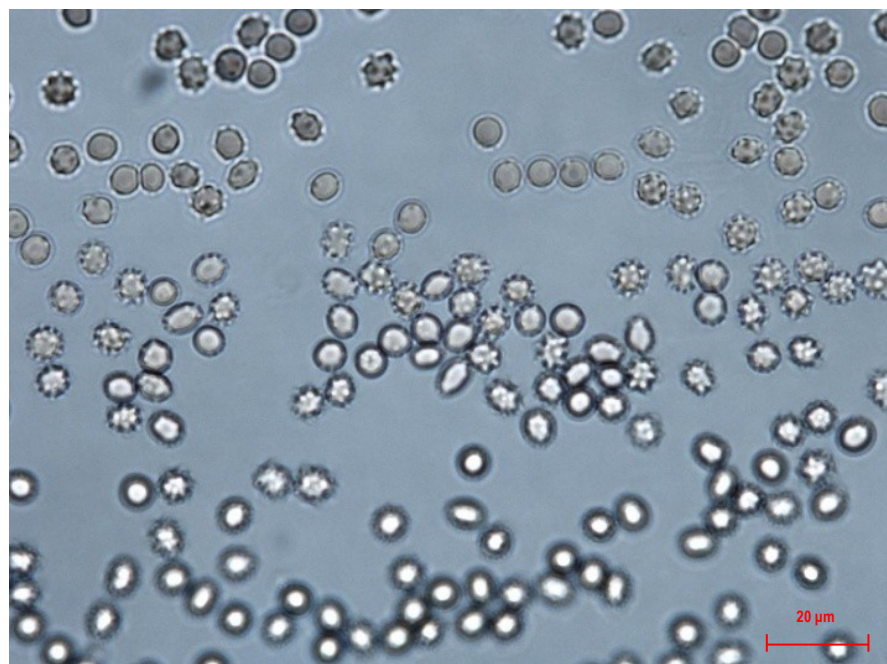
**Slika 39.** Mikrografija 0.5% hematokrita z 25 μM NNP po 60 minutah. NNP ne povzroča sprememb v geometriji eritrocita. Vidna je nativna diskoidna oblika eritrocitov z minimalnim deležem ehinocitov.

#### 4.3.2.3 Spremembe oblike človeških eritrocitov v paramagnetno označenih NMR vzorcih

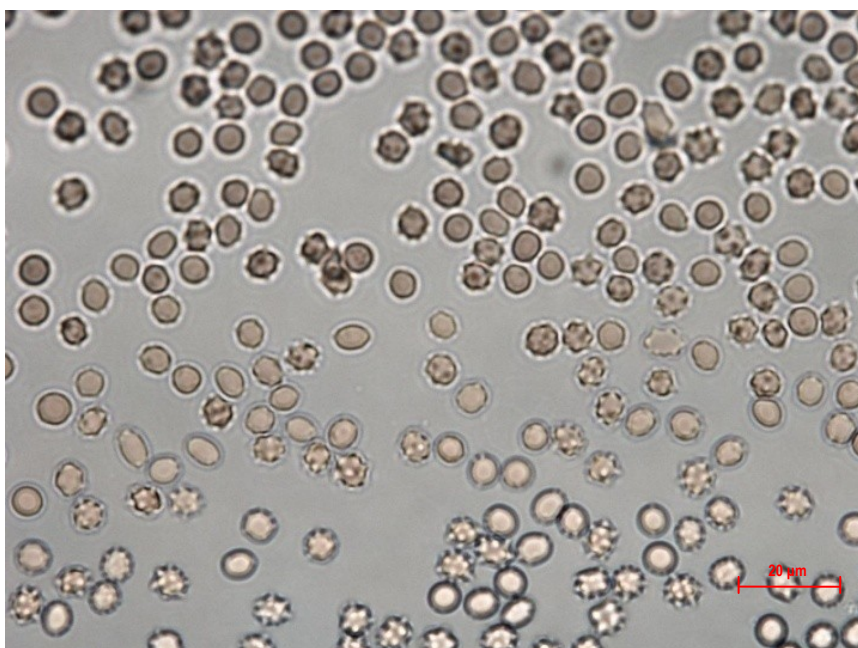
Uporabljeni so bili NMR vzorci z 20 % hematokritom, redčeni na 0.5 % končni hematokrit z izoosmotskim pufrom za eritrocite (A), opisani pod 3.1.3.2.1



**Slika 40.** Mikrografija NMR vzorca kontrole, redčenega na 0.5 % hematokrit z izoosmotskim pufrom za eritrocite (A), po 20 minutah.



**Slika 41.** Mikrografija NMR vzorca 1 mM HgCl<sub>2</sub>, redčenega na 0.5 % hematokrit z izoosmotskim pufrom za eritrocite (A), po 20 minutah.



**Slika 42.** Mikrografija NMR vzorca z 1 mM NNP, redčenega na 0.5 % hematokrit z izoosmotskim pufrom za eritrocite (A), po 20 minutah.

#### 4.3.2.4 Spremembe oblike človeških eritrocitov zaradi pridruženih vplivov pri proučevanju vpliva HgCl<sub>2</sub> in NNP pri mikroskopiranju

Uporabljen je bil vzorec 0.5 % hematokrita v izoosmotski raztopini NaCl z 0.25 mM MnCl<sub>2</sub>, opisan pod 3.1.3.2.3, in vzorec 0.5 % hematokrita v izoosmotski raztopini NaCl, opisan pod 3.1.3.2.2 (kontrola), ter vzorec 0.5 % hematokrita v izoosmotskem pufru za eritrocite (A), opisan pod 3.1.3.2.4.

**Preglednica 16.** Časovno spreminjanje deleža oblikovno spremenjenih eritrocitov in deleža eritrocitnih duhkov zaradi vpliva sestavin izoosmotskega pufru za eritrocite (A)\*.

t [min]	delež oblikovno spremenjenih eritrocitov v kontroli $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež eritrocitnih duhkov v kontroli $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež oblikovno spremenjenih eritrocitov redčenih z izoosmotskim pufrom za eritrocite (A) $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež eritrocitnih duhkov redčenih z izoosmotskim pufrom za eritrocite (A) $\bar{x} \pm SE$ [%]
1	0.22 ± 0.10	3.02 ± 1.20	50.32 ± 0.02*	1.02 ± 0.20
10	1.07 ± 0.07	1.01 ± 0.86	49.56 ± 0.11*	1.81 ± 0.16
20	2.67 ± 0.03	2.34 ± 0.44	43.12 ± 0.07*	2.34 ± 0.44
45	4.08 ± 1.02	2.07 ± 0.99	52.78 ± 0.13*	2.14 ± 0.09
60	3.98 ± 0.37	1.92 ± 0.54	52.01 ± 0.09*	1.42 ± 0.14

\* Podana je aritmetična sredina in standardna napaka ocene aritmetične sredine. Z \* so označeni rezultati, ki se statistično pomembno razlikujejo ( $p < 0.05$ ) od velikosti kontrole v ustreznem času. Uporabljena je enosmerna analiza variance, LSD post hoc test. Za vsako meritev je bilo narejenih deset naključnih posnetkov preparata ( $n=10$ ), povprečno število eritrocitov na posnetek je  $70 \pm 3$ .

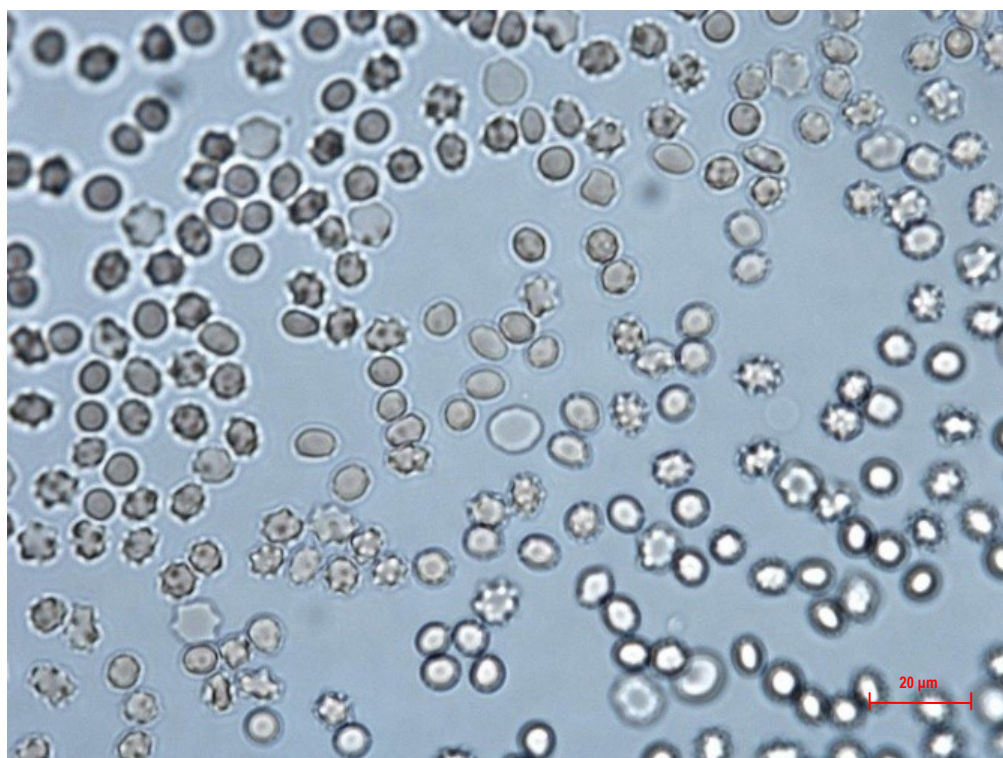
Dobljeni podatki kontrole in vzorcev se pri obeh neodvisnih poskusih niso pomembno razlikovali, zato smo prikazali rezultate ene ponovitve.

**Preglednica 17.** Časovno spreminjanje deleža oblikovno spremenjenih eritrocitov in deleža eritrocitnih duhkov zaradi vpliva MnCl<sub>2</sub>\*.

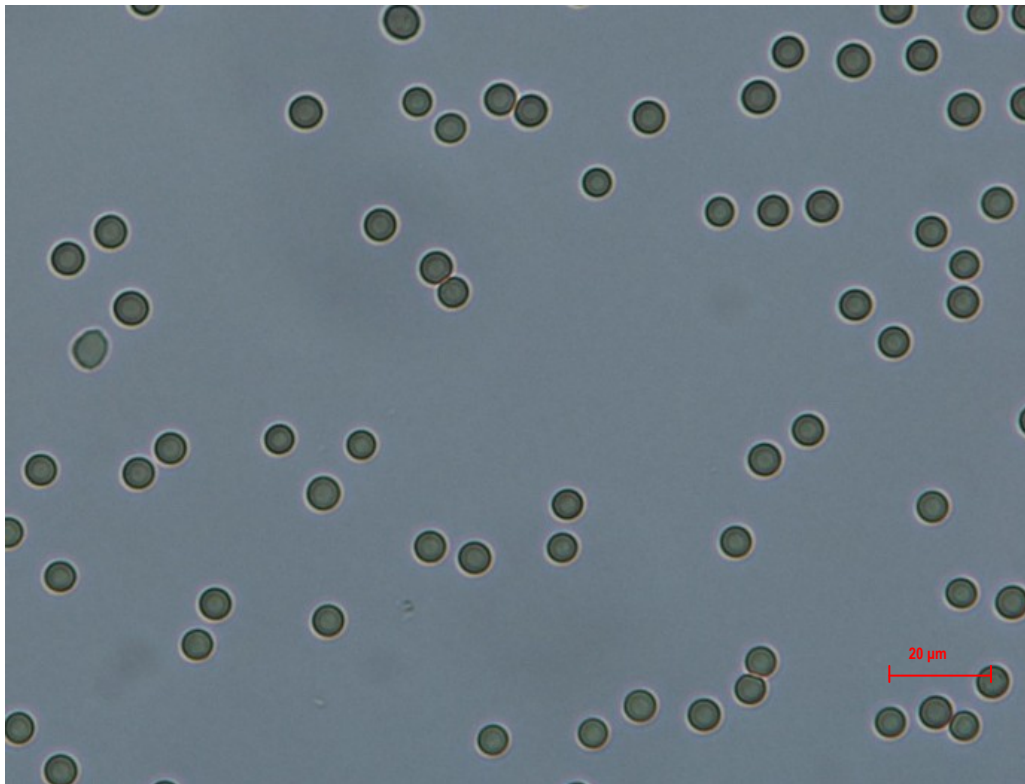
t [min]	delež oblikovno spremenjenih eritrocitov v kontroli $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež eritrocitnih duhkov v kontroli $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež oblikovno spremenjenih eritrocitov v vzorcu z 0.25 mM MnCl <sub>2</sub> $\bar{x} \pm SE$ [%]	delež eritrocitnih duhkov v vzorcu z 0.25 mM MnCl <sub>2</sub> $\bar{x} \pm SE$ [%]
1	0.22 ± 0.10	1.02 ± 1.20	45.23 ± 0.07*	2.86 ± 0.03*
10	1.07 ± 0.07	1.01 ± 0.86	70.45 ± 0.50*	1.57 ± 0.07
20	2.67 ± 0.03	2.34 ± 0.44	80.45 ± 0.03*	2.45 ± 0.51
45	4.08 ± 1.02	2.07 ± 0.99	99.56 ± 0.61*	3.23 ± 0.68*
60	3.98 ± 0.37	1.92 ± 0.54	99.83 ± 0.01*	2.78 ± 0.77*

\* Podana je aritmetična sredina in standardna napaka ocene aritmetične sredine. Z \* so označeni rezultati, ki se statistično pomembno razlikujejo ( $p < 0.05$ ) od velikosti kontrole v ustreznem času. Uporabljena je enosmerna analiza variance, LSD post hoc test. Za vsako meritev je bilo narejenih deset naključnih posnetkov preparata ( $n=10$ ), povprečno število eritrocitov na posnetek je  $70 \pm 3$ .

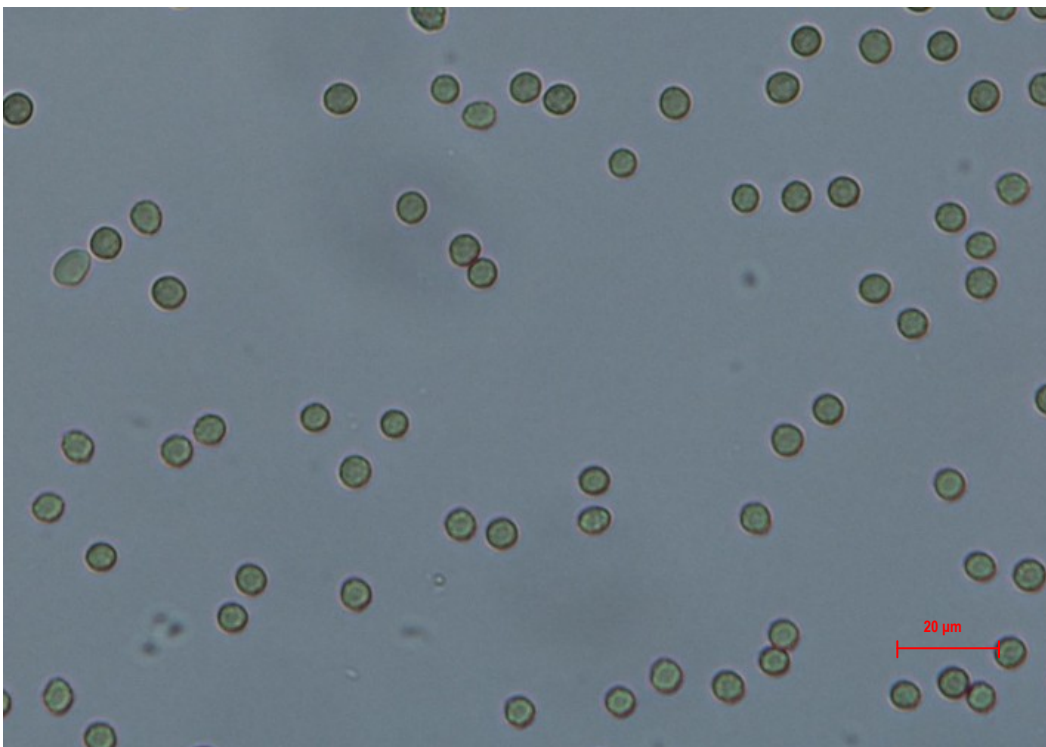
Dobljene vrednosti kontrole in vzorcev se pri obeh poskusih niso pomembno razlikovale, zato smo prikazali rezultate ene ponovitve.



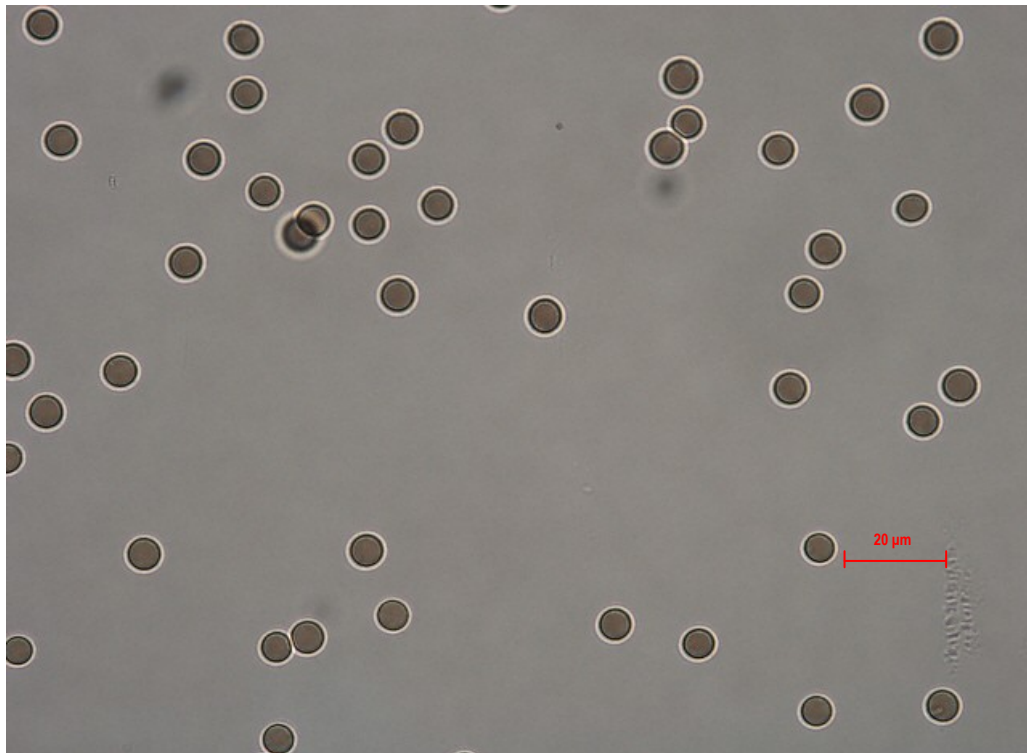
**Slika 43.** Mikrografija 0.5% hematokrita z 0.25 mM MnCl<sub>2</sub> po 20 minutah. MnCl<sub>2</sub> povzroča nastanek ehinocitov.



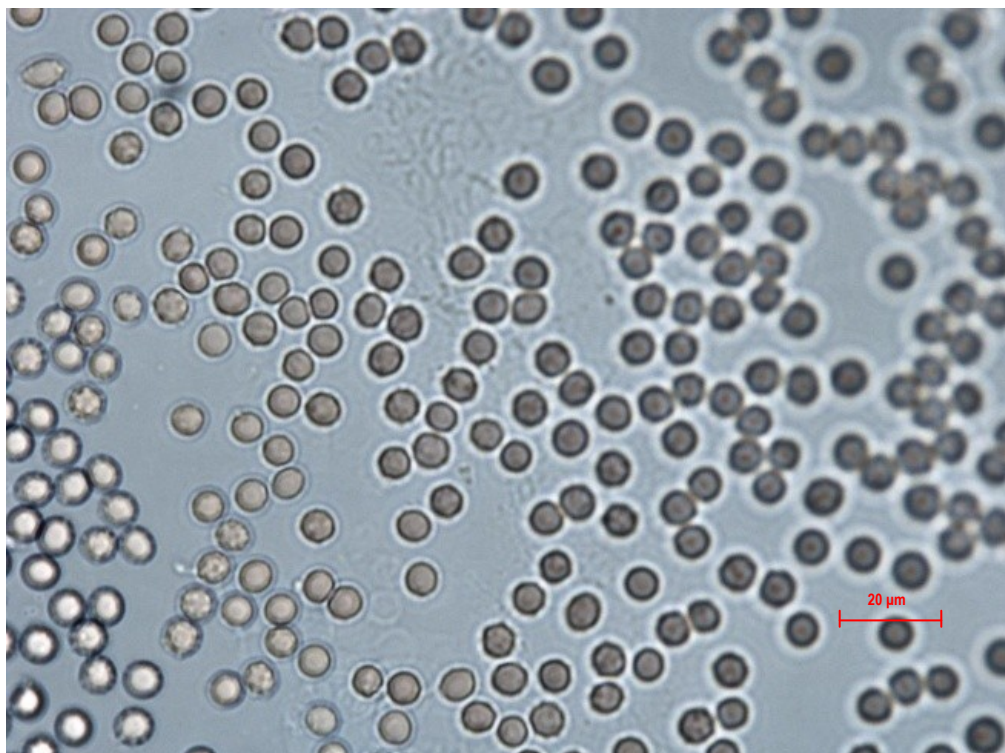
**Slika 44.** Mikrografija 0.5 % hematokrita v izoosmotski raztopini NaCl takoj po pripravi.



**Slika 45.** Mikrografija 0.5 % hematokrita v izoosmotski raztopini NaCl po 10 minutah osvetljevanja. Eritrociti preidejo v ehinocitno/krenirano obliko.



**Slika 46.** Mikrografija 0.5 % hematokrita v izosmotski raztopini NaCl takoj po pripravi.



**Slika 47.** Mikrografija 0.5 % hematokrita v izosmotskem pufri za eritrocite (A) takoj po pripravi. Pojavi se nekaj ehinocitov.



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Uporaba pulzne metode NMR protonov vode

Pri tej metodi NMR za paramagnetno označevanje vzorcev 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 ovira za ione, zato ta metoda ni primerna za ugotavljanje učinka efektorjev čez daljši čas inkubacije (daljši kot ~ 3 ure).

Metoda omogoča zasledovanje časovne konstante  $\tau_{exch}$  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.

Realni merski napaki v določevanju parametrov ( $V_{in}/V_{out}$  in  $\tau_{exch}$ ) na vzorcih z HgCl<sub>2</sub> se s časom izvajanja meritev povečujeta. 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 nezanesljivost v določevanju  $\tau_{exch}$  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  $\tau_{exch}$  kontrolnega vzorca (Slika 16).

Majhno težavo pri izvajanju meritev je povzročalo tudi spreminjanje temperature v resonatorju NMR spektrometra. Parameter  $\tau_{exch}$  je namreč temperaturno odvisen. Z višanjem temperature se krajša. Temperaturni interval naših meritev v različnih dnevih poskusov je bil k sreči dovolj ozek - med 20 in 22 °C, kar bistveno ne vpliva na zanesljivost meritev  $\tau_{exch}$  in tudi ni razlog za razlike med posameznimi kontrolnimi vrednostmi.

### 5.1.2 Uporaba mikroskopiranja

Mikroskopiranje nam je bilo v pomoč pri interpretaciji rezultatov meritev NMR protonov vode. Uporabili smo ga kot neodvisno metodo za merjenje spreminjanja volumna zaradi vpliva NNP in HgCl<sub>2</sub>. Hkrati pa smo lahko opazovali oblikovne spremembe in izsledke kombinirali z rezultati NMR metode.

Pridruženi vplivi pri mikroskopiranju, kot so svetloba, MnCl<sub>2</sub> in sestavine pufru za eritrocite, bi ovirali sledenje vplivu HgCl<sub>2</sub> in NNP na človeške eritrocite zaradi nastanka kreniranih oblik eritrocitov in ehinocitov. Zato smo uporabili samo eritrocite, suspendirane v fiziološki raztopini, in ne redčenih vzorcev za NMR meritve. Ti vzorci so zaradi večje izpostavljenosti svetlobe in različne sestave medija (fiziološka raztopina v primerjavi s puffrom za eritrocite z MnCl<sub>2</sub>) sicer slabše primerljivi z vzorci za NMR meritve, a njihovo vrednotenje drugače ne bi bilo mogoče, saj je ehinocitnim oblikam zelo težko določiti natančen premer. Prav tako je mogoče objektivno oceniti samo kvantitativno spremembo oblike (število oblikovno spremenjenih eritrocitov), kvalitativne pa ne (stopnja spremembe oblike). Tukaj bi se lahko pridruženi efekti seštevali z učinkom HgCl<sub>2</sub> in NNP, tako da bi podcenili njun efekt.

### 5.1.3 Vpliv Hg<sup>2+</sup> na človeške eritrocite

Spojina HgCl<sub>2</sub>, uporabljena kot vir Hg<sup>2+</sup>, ne disociira v celoti, ker ima vez Hg–Cl dokajšen značaj kovalentne vezi. V raztopini so poleg nedisociirane spojine HgCl<sub>2</sub> še HgCl<sup>+</sup> in Hg<sup>2+</sup>. Skozi celično membrano eritrocita vstopa Hg<sup>2+</sup> v elektronevtralni obliki, bodisi kot HgCl<sub>2</sub> ali Hg(OH)<sub>2</sub> (Gutknecht, 1981; Bragadin in sod., 2005). Tako z meritvami vpliva Hg<sup>2+</sup> na eritrocite merimo potek kemijske reakcije med Hg<sup>2+</sup> in –SH skupinami zunajceličnih in znotrajceličnih tarč, ki potekajo hkrati. Posledice teh reakcij se kažejo kot učinki na obliko in funkcijo eritrocita. Oblikovne spremembe se kažejo kot brstenje membrane in nastanek ehinocitov, funkcionalne spremembe pa kot zmanjševanje celičnega volumna in v majhnem zmanjšanju membranske prepustnosti za vodo.

Metoda pulzne NMR protonov znotrajcelične vode je pokazala, da se ob inkubaciji eritrocitov s HgCl<sub>2</sub> konstanta  $\tau_{exch}$  difuzijske izmenjave znotrajcelične vode krajša in se po 80 minutah ustali. To pomeni, da se je povprečna življenjska doba molekule vode znotraj eritrocita skrajšala. Skrajšanje življenjske dobe je lahko posledica zmanjšane volumna celice, zmanjšanje permeabilnosti za vodo ali prehajanja Mn<sup>2+</sup> ionov v znotrajcelični prostor. Slednje lahko izključimo, saj so kontrolni vzorci konstantni, Mn<sup>2+</sup> začne prehajati skozi membrano po več kot 3 urah (Lahajnar, 1992).

Sočasno se zmanjšuje tudi razmerje  $V_{in}/V_{out}$  med znotrajcelično in zunajcelično vodo, ki pa ne doseže ustalitve in se manjša kontinuirano. Zmanjšano razmerje  $V_{in}/V_{out}$  je lahko posledica zmanjšane volumna celice ali hemolize. Po naših ocenah je zmanjševanje  $V_{in}/V_{out}$  kombinacija dveh efektov: (i) krčenja eritrocitov, kar podpira tudi krajšanje  $\tau_{exch}$  in (ii) hemolize. Pri obeh procesih gre za izgubljanje znotrajcelične vode v paramagnetno dopiran zunajcelični prostor, kar zmanjšuje razmerje  $V_{in}/V_{out}$ . Iz spreminjanja  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$  ocenjujemo, da se krčenje ustavi približno po 80 minutah od dodatka HgCl<sub>2</sub>, hemoliza pa se nadaljuje do konca merjenja.

Spremenjeno razmerje  $V_{in}/V_{out}$  ima zelo majhen vpliv na izračun parametra  $\tau_{exch}$  (80 % zmanjšanje volumna znotrajcelične vode pomeni podaljšanje izmerjenega  $T'_{2,a}$  za 0.16 ms, ob manjših spremembah razmerja je razlika še manjša). Iz tega sledi logičen sklep na podlagi enačb (12)-(22), da je skrajševanje  $\tau_{exch}$  skoraj popolnoma neodvisno od razmerja  $V_{in}/V_{out}$  in je lahko samo posledica **zmanjšane volumna znotrajceličnega volumna**, ob predpostavki, da je membranska prevodnost za vodo ( $P_d$ ) nespremenjena.

Vzporedni poskus preučevanja vpliva Hg<sup>2+</sup> na volumen eritrocitov pod mikroskopom je potrdil zmanjšanje premera eritrocitov, iz česar sklepamo na zmanjšanje volumna. Opazno pa je majhno zmanjšanje premera v primerjavi s hitrim, znatnim zmanjšanjem razmerja  $V_{in}/V_{out}$ , ki ga opazimo pri NMR meritvah. Možno je, da se eritrociti krčijo najprej s tanjšanjem eritrocitnega diska, nato pa z manjšanjem premera in nagubanjem površine. Ta poskus je bil podvržen eksperimentalni napaki zaradi ročnega odčitavanja premerov z mikrogafij, kar zmanjšuje težo teh izsledkov. Čeprav je dejanska velikost zmanjšanja premera vprašljiva je trend njegovega zmanjševanja v času nesporen.

Iz primerjave velikosti relativne spremembe  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$  (Priloga 2, sprememba parametra A) lahko sklepamo na spremembo oz. konstantnost v difuzijski permeabilnosti membrane za vodo ( $P_d$ ) (enačba (27)). Zmanjševanje  $\tau_{exch}$  lahko v celoti pripišemo zmanjševanju celičnega volumna le ob pogoju, da  $P_d$  ostaja nespremenjen. Zmanjševanje parametra A (v našem primeru se razmerje  $V_{in}/V_{out}$  zmanjšuje v večji meri kot se  $\tau_{exch}$ , krajša) kaže na ekvivalentno zmanjševanje  $P_d$ . Hemoliza zmanjšuje razmerje  $V_{in}/V_{out}$  in tako navidezno povečuje zmanjšanje znotrajceličnega volumna, kar se kaže kot navidezno zmanjšanje permeabilnosti za vodo ( $P_d$ ). V polovici vzorcev (Priloga 2, vzorca A in D) lahko opazimo dokaj sočasno zmanjševanje obeh parametrov do 80. minute in izračunan hipotetični upad  $P_d$  na do 80 % kontrolne velikosti po 80 minutah inkubacije. Za tem se sicer parameter A zmanjšuje dalje, vendar to ni pripisati zmanjševanju  $P_d$ , ampak hemolizi vzorca. Druga polovica vzorcev kaže znatno večje zmanjševanje parametra A že pred 80. minuto, kar lahko pripišemo zgodnejši hemolizi.

Organske živosrebrove spojine dokumentirano blokirajo celotno difuzijsko pot vode skozi AQP-1 v eritrocitni membrani in s tem zmanjšajo  $P_d$  na 50 % izhodiščne vrednosti (Brahm, 1982; Lahajnar in sod., 2006), kar je razumljivo, saj vemo, da AQP-1 prispeva le k polovici difuzijske permeabilnosti, drugo polovico pa prispeva lipidni dvosloj (Macey in Farmer, 1970). Temu ustrezno bi lahko pričakovali, da bo tudi HgCl<sub>2</sub> kazal podobne učinke blokade AQP-1 z vezavo Hg<sup>2+</sup> na Cys189 v ožini pore kanalčka. V literaturi je pogosto naveden kot učinkovit blokator AQP-1, vendar njegova aktivnost na človeških eritrocitih še nikoli ni bila dokazana.

Glede na izsledke NMR meritev, Hg<sup>2+</sup> blokira majhen del vseh AQP-1, ostalo zmanjševanje parametra A pa je najverjetneje posledica hemolize. Hemoliza je posledica reakcij Hg<sup>2+</sup> z -SH skupinami v eritrocitu in posrednim nastankom ROS, ki poškodujejo membrano (Adonaylo in Oteiza, 1999; Ribarov in Benov, 1981; Brondao in sod., 2005; Silbergeld, 2003; El-Missiry in Abou-Seifb, 2000). Da ima hemoliza pomembno vlogo nekje po 80 minutah inkubacije kaže tudi zmanjšanje parametra A pod 50 % (na 20 % pri vzorcu B in C po 120 minutah), kar je praktično nemogoče razložiti kot zmanjšanje  $P_d$ .

Pojav hemolize, ki se s časom povečuje, potrjujejo tudi rezultati štetja eritrocitnih duhkov na mikrografijah (Preglednica 13). Če primerjamo večanje deležev eritrocitnih duhkov s parametrom A, vidimo, da je dejansko zmanjšanje  $P_d$  verjetno dosti manjše od 20 %, saj se ugotovljeni delež eritrocitnih duhkov, ki zmanjšujejo delež znotrajcelične vode (zmanjšanje  $V_{in}/V_{out}$ ), bliža 15 % pri 60 minutah. Kombinacija izsledkov NMR meritev in mikroskopije nas privede do zaključka, da razlika med relativnim zmanjšanjem  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$  ni nastala zaradi zmanjšanja  $P_d$ , ampak zaradi hemolize. Navidezno povečevanje razlike sovpada z večanjem hemolize (trend povečevanja deležev eritrocitnih duhkov), kar razloži minimalno razliko na začetku (rezultat majhne stopnje hemolize) in njeno večanje s časom. Delež eritrocitnih duhkov je sicer dober pokazatelj prisotnosti hemolize in njenega trenda, vendar iz njega ne moremo sklepati na dejansko stopnjo hemolize vzorca.

Iz vsega navedenega sklepamo, da do obsežne blokade AQP-1 s Hg<sup>2+</sup> ni prišlo, saj razlika med spremembo  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$  ne pomeni skrajšanja  $P_d$ . Da  $P_d$  ostaja dejansko nespremenjen je potrdila tudi skupina Lahajnarja in sod. (2006).

Dobljeni rezultati dopuščajo le **maloobsežno, minimalno blokado AQP-1** pod vplivom Hg<sup>2+</sup>, ki se najverjetneje giba v območju pod 5 %. Tako se izognemo paradoksu vpliva Hg<sup>2+</sup>, ki naj bi po eni strani povzročil popolno blokado AQP-1 (Preston in sod., 1993), a bi naj po drugi strani z aktivacijo Gárdosevega kanalčka povzročil močno krčenje eritrocitov na račun iztoka vode skozi AQP-1 (Eisele in sod., 2004). Pri tem se je treba zavedati, da je osmotska permeabilnost za vodo membrane eritrocita nekajkrat večja od difuzijske ravno na račun prisotnosti AQP-1 (ker je osmoza vode skozi akvaporine desetkrat večja kot

skozi lipidni dvosloj (Moura in sod., 1984), medtem ko sta difuzijska in osmotska permeabilnost za lipidni del membrane enaki (Paganelli in Solomon, 1957; Sidel in Solomon, 1957). Pri popolni blokadi AQP-1 je torej nemogoče doseči velik iztok vode in posledično krčenje eritrocita. Le skozi AQP-1 je možno usmerjeno prehajanje molekul vode, ki je odgovorno za večjo osmotsko permeabilnost membrane eritrocita za vodo v primerjavi z difuzijsko, skozi lipidni dvosloj pa se voda v obeh primerih (difuzija in osmoza) izmenjuje neusmerjeno, kar ne omogoča učinkovitega toka vode skozi lipidni dvosloj.

Hg<sup>2+</sup> povzroči skrčenje eritrocitov najverjetneje zaradi aktivacije od Ca<sup>2+</sup> odvisnega K<sup>+</sup>-kanalčka (Gárdosevega kanalčka), če predpostavimo, da gre v naših vzorcih za enak proces, kot sta ga pred kratkim opisali skupini Langa (Eisele in sod., 2006) in Lahajnarja (Lahajnar in sod., 2006). Ti so pokazali, da do krčenja eritrocita pride zaradi iztoka K<sup>+</sup> skozi Gárdosev kanalček, ki ga aktivira Hg<sup>2+</sup> neodvisno od Ca<sup>2+</sup>, čemur sledi iztok Cl<sup>-</sup> zaradi ohranjanja elektronevtralnosti in posledično izhajanje vode na račun osmoze.

Gárdosev kanalček se mora aktivirati z znotrajcelične strani in je v fizioloških pogojih neaktiven (Bennekou in Christophersen, 2003). Ker HgCl<sub>2</sub> dobro prehaja skozi membrano (Gutknecht, 1981; Bragadin in sod., 2005), je aktivacija Gárdosevega kanalčka s Hg<sup>2+</sup> zelo verjetna. Visoka afiniteta Hg<sup>2+</sup> 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<sup>+</sup> (Jungwirth in sod., 1991).

V eritrocitu pa poleg omenjenega obstajajo še vrsta drugih možnih mest delovanja Hg<sup>2+</sup> (drugi kanalčki, encimi, prenašalci ipd. z razpoložljivimi –SH skupinami). Zato je zgoraj navedena razlaga verjeten opis dogajanja, je pa ne moremo jemati kot dokončno.

Poleg funkcionalnih sprememb smo opazili tudi oblikovne spremembe eritrocitov, ki se s časom in koncentracijo Hg<sup>2+</sup> večajo. Tako tudi tu opazujemo posledice kemijske reakcije med Hg<sup>2+</sup> in njegovimi tarčami, ki poteka vzporedno z reakcijo s tarčami, ki povzročijo funkcionalne spremembe. Tukaj gre poleg –SH skupin najverjetneje še za negativno nabite fosfolipide v zunanjem lipidnem sloju membrane.

Pod mikroskopom smo opazili prehod eritrocitov iz diskocitne v **ehinocitno obliko**, kot posledico vpliva Hg<sup>2+</sup>. To je v skladu z ugotovitvami Suwalskega in sod. (2000) in Zollaja (1999), ter kaže na to, da se Hg<sup>2+</sup> preferenčno kopiči v zunanjem lipidnem dvosloju, kjer interagira z negativno nabitimi skupinami lipidov in poveča razliko v površini med zunanjim in notranjim slojem membrane ( $\Delta A$ ). Ker že zelo majhna sprememba  $\Delta A$  (0.4 % (Svetina in sod., 2004)) povzroči nastanek ehinocitov, uporabljena koncentracija 1mM

HgCl<sub>2</sub> za ta efekt zadostuje. Čeprav nekateri avtorji poročajo o pojavu stomatocitov (Dewaux, 1994), jih mi nismo opazili.

Delež oblikovno spremenjenih eritrocitov se s časom veča. Po desetih minutah je že pri 50 % in se po 60 minutah poveča skoraj na 100 %. Delež smo določili na ravnem objektnem steklu, ki sicer omogoča naključno razporejanje, razporeditev v monosloj in povečan pritisk pa onemogoča popolno ekspanzijo eritrocitov, tako da ni možno razlikovati med skrčenimi/kreniranimi eritrociti in ehinociti. Na objektnem steklu z vdolbino je omogočeno prosto gibanje, vendar smo opazili grupiranje spremenjenih oblik na robu vdolbine objektnega stekla, kar bi izkrivilo oceno deleža oblikovnih sprememb pri naključnem izbiranju polja na vzorcu.

Inkubacija eritrocitov z Hg<sup>2+</sup> **sproži brstenje eritrocitne membrane**. Glavna karakteristika brstenja membrane je motnja interakcije med membrano in citoskeletom (Iglič in sod., 1998). Kot že omenjeno, Hg<sup>2+</sup> reagira z -SH skupinami in povzroči nastanek -S-Hg-S- povezav. Protein spektrin je zelo številčen v citoskeletu in ima prosto dostopne -SH skupine (Speicher in sod., 1983). Možno je, da Hg<sup>2+</sup> povzroči premreženje spektrinskih molekul in s tem skrčenje citoskeleta, tako da se ta ne prilega več na membrano. Poleg tega je znano, da se Hg<sup>2+</sup> veže na sidrni protein palidin in povzroči, da se ta poveže z mrežo spektrinov in fosforilira (Suzuki in Ibekuchi, 1985). Zmanjšane interakcije med lipidi in citoskeletom ob sočasnem povečanju površine zunanjšega lipidnega dvosloja zaradi vrivanja Hg<sup>2+</sup> privedejo do brstenja membrane eritrocita. Ta predviden potek se naslanja na razlago pojava brstenja membrane ob inkubaciji eritrocitov v visokem (Iglič in sod., 1998) ali nizkem pH (Bobrowska-Hägerstrand in sod., 1998). V obeh primerih pride do zmanjšanih interakcij membrane s citoskeletom (ta se skrči) in povečanju površine zunanjšega sloja membrane.

Obstaja pa še alternativna razlaga brstenja membrane, ki predvideva sprožitev eriptoze zaradi delovanja Hg<sup>2+</sup>. Eriptoza je nepovraten proces, ki med drugim vodi v brstenje membrane in zmanjšanje volumna celice (Lang in sod., 2005). Proti tej razlagi govori podatek skupine Lahajnarja in sod. (2006), ki so ob dodatku merkaptetanola 20 % suspenziji eritrocitov, ki je bila inkubirana z 1 mM HgCl<sub>2</sub>, opazili ponovno večanje  $V_{in}/V_{out}$  in podaljšanje  $\tau_{exch}$ , vendar ne na začetni nivo. Očitno je, da so v tem koncentracijskem razmerju med eritrociti in HgCl<sub>2</sub> učinki Hg<sup>2+</sup> do neke mere reverzibilni. To pa je v nasprotju z nepovratnostjo zmanjševanja volumna v procesu eriptoze. Verjetno Hg<sup>2+</sup> sproži eriptoza pri majhni populaciji eritrocitov (s tem tudi brstenje membrane), ostalo brstenje membrane pa je posledica motenj v interakciji med citoskeletom in lipidnim dvoslojem. Vzroka brstenja membrane z danimi rezultati ne moremo z gotovostjo opisati.

Pri uporabljeni končni koncentraciji 0.25  $\mu\text{M}$  HgCl<sub>2</sub>, v vzorcih za mikroskopiranje, ki ustreza razmerju med 20 % hematokritom in 1 mM HgCl<sub>2</sub>, se brstenje membrane pojavi pri majhni populaciji po daljšem času inkubacije, zato nima vpliva na začetne hitre spremembe  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$  pri NMR meritvah. Bolj izrazito je pri štirikrat večji koncentraciji, kar kaže na koncentracijsko odvisnost.

#### 5.1.4 Vpliv NO na človeške eritrocite

Natrijev nitroprusid (NNP) je donor NO skupine ob interakcijah z –SH skupinami. Na človeških eritrocitih povzroči dva predvidoma vzporedna efekta, različno intenzivna in z različno kinetiko. Ob interakciji NNP z eritrocitno membrano (najverjetneje –SH skupinami membranskih proteinov) povzroči intenzivnejši kratkotrajni paramagnetni efekt in dolgotrajnejšo, manj intenzivno zmanjšanje permeabilnosti eritrocitne membrane za vodo. Tako z meritvami vpliva NNP na eritrocite merimo posledice kemijske reakcije med NNP in –SH skupinami zunajceličnih in znotrajceličnih tarč, ki potekajo hkrati, kot tudi sledimo paramagnetnim produktom reakcije. Posledice teh reakcij se kažejo kot učinki na funkcijo eritrocita in na paramagnetnost znotrajceličnega prostora.

V uporabljenem razponu koncentracij NNP kot donor NO **nima vpliva na volumen in obliko** eritrocitov, prav tako ne povzroča hemolize. To je tudi v skladu s pričakovanji na podlagi objav drugih avtorjev (Bor-Kucukatay in sod., 2003). Konstantnost volumna smo potrdili z dvema neodvisnima metodama, z NMR in mikroskopijo.

Z metodo pulzne NMR protonov vode ob inkubaciji eritrocitov z NNP vidimo, da izmerjena časovna konstanta transverzalnega relaksacijskega časa protonov znotrajcelične vode ( $T'_{2,a}$ ) v vzorcu z 20 % hematokritom po prehodnem začetnem skrajšanju začne naraščati in doseže nivo kontrole do prvih 10 minut inkubacije, nakar ta nivo preseže in se kasneje asimptotično približuje kontrolnemu nivoju. Razmerje  $V_{in}/V_{out}$  ostaja vseskozi konstantno.

Analiza izmerjenega  $T'_{2,a}$  transverzalne relaksacije protonov znotrajcelične vode sledi iz enačbe (29), iz katere je razvidno, da na spreminjanje izmerjenega  $T'_{2,a}$  vpliva sprememba konstante difuzijske izmenjave znotrajcelične vode skozi membrano ( $\tau_{exch}$ ) in sprememba relaksacijskega časa protonov znotrajcelične vode ( $T_{2,a}$ ). Domnevamo, da je opaženo hitro začetno skrajšanje izmerjenega  $T'_{2,a}$  posledica nastanka paramagnetnih zvrsti, ki skrajšajo relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode ( $T_{2,a}$ ). Paramagnetne zvrsti so produkti reakcije NNP z –SH skupinami, in/ali produkti v tej reakciji nastalih zvrsti z drugimi celičnimi elementi. Vsled te reakcije se ustvari paramagnetno okolje, ki skrajša relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode ( $T_{2,a}$ ).

Obenem se pa časovna konstanta difuzijske izmenjave vode skozi membrano ( $\tau_{exch}$ ) podaljša zaradi steričnih ovir difuzije molekul vode skozi lipidni dvosloj in/ali akvaporine, kot posledica sproščanja NO iz NNP. Ko začetni paramagnetni efekt zamre ( $T_{2,a}$  vzorca =  $T_{2,a}$  kontrole), je v nadaljevanju opaženo podaljšanje  $T'_{2,a}$  najverjetneje posledica podaljšanega  $\tau_{exch}$  (ki bi bilo v začetku, če je bilo prisotno, zamaskirano z izdatnim paramagnetnim efektom NO).

Preverili smo, ali NNP v raztopini hipoosmotskega pufru za eritrocite v temi spontano sprošča paramagnetne zvrsti. S primerjavo  $T_2$  raztopin NNP in kalijevega fericianida (KFC) različnih koncentracij smo preverili ali koordinacijsko vezano železo prispeva k paramagnetnosti in če prihaja do sproščanja drugih paramagnetnih zvrsti, razen železa (Preglednica 9). KFC je po strukturi enak NNP, le da ima NO ligand zamenjan s CN<sup>-</sup>. Če prihaja do sproščanja železa, bi se to pokazalo v krajšanju  $T_2$  z višanjem koncentracije topljenca. Če NNP spontano sprošča NO, ki je paramagnetni radikal (Ignarro, 2002), bi se to pokazalo v skrajšanju  $T_2$  ob višanju koncentracije NNP,  $T_2$  pa bi ostal nespremenjen v raztopinah s KFC. Ker je bil  $T_2$  raztopin NNP in KFC koncentracijsko neodvisen in se med raztopinama ni razlikoval, sklepamo, da je NNP v raztopini hipoosmotskega pufru stabilen. Ne prihaja do spontanega sproščanja NO, železov ion je vezan v stabilnem kompleksu. To je dokaz, da sam NNP v temi brez interakcije z eritrociti ne povzroča paramagnetnih efektov.

Da bi ugotovili, ali -SH skupine sprožijo nastanek paramagnetnih produktov iz NNP, smo neodvisno primerjali  $T_2$  raztopin NNP, N-acetilcisteina in ekvimolarne raztopine NNP in N-acetilcisteina (Preglednica 10). N-acetilcistein je modelna aminokislina z -SH skupino. Služi nam kot poenostavljen model reakcije NNP z -SH skupinami eritrocita. Analiza rezultatov pokaže skrajšanje izmerjenega  $T_2$  relaksacijskega časa protonov vode v vzorcu z NNP in N-acetilcisteinom v primerjavi s samo raztopino NNP in samo raztopino N-acetilcisteina. Skrajšanje  $T_2$  razlagamo s sproščanjem paramagnetnega NO z NNP ob interakciji z -SH skupino N-acetilcisteina. Enak proces verjetno poteka med NNP in eritrociti in tako prihaja do nastanka paramagnetnega NO.

Eritrociti delujejo kot ponor za NO aktivnost *in vivo*. Z NNP sproščeni NO se preferenčno kopiči v membrani (porazdelitveno razmerje je 9:1), kjer poteka tudi večina njegovih reakcij s kisikom (porazdelitveno razmerje je 3:1). (Liu in sod., 1998; Ye in sod., 2001; Lancaster, 2000). Stohastična difuzija NO iz membrane omogoča reakcije s celičnimi tarčami. NO lahko reagira s hemoglobinom, produkti NO oksidacije (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> in N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) pa nitrozilirajo -SH skupine.

NO izredno hitro reagira s kovinskimi kompleksi, kot je hem v hemoglobinu (Hb) (Eich in sod., 1996; Liao in sod., 1999; Herold in Röck, 2002; Huang Z. in sod., 2001;



Huang in sod., 2002). Večina raziskovalcev se strinja, da sta konstanti vezave NO na oksihb in deoksihb enaki ( $k_{Hb} = 3-5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), kar pomeni, da je razmerje nastalih produktov odvisno od oksigenacije Hb (Eich in sod., 1996; Liaro in sod., 1999; Herold in Röck, 2002; Huang Z. in sod., 2001; Huang in sod., 2002; Yonetani in sod., 1998; Wajnberg in sod., 1996; Kon, 1968). Ker je v venski krvi približno 75 % oksigeniranega hemoglobina (Cumar in Clark, 2005), če je oseba v mirovanju, je glavni produkt reakcije med NO in Hb nitrit in metHb, ki predstavlja glavno pot zmanjševanja bioaktivnost NO, manjši delež nastalega produkta pa predstavlja Hb-Fe-NO.

Nitroziliranje –SH skupin z N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> zmanjšuje 5-20-krat hitrejša kinetika reakcije med hemoglobinskim hemom in NO, kot pa je med NO in O<sub>2</sub>, vendar kopičenje NO in O<sub>2</sub> v membrani omogoča zadostno količino oksigeniranih produktov za nitroziliranje (Vladimirov in sod., 2000; Möller in sod., 2007; Liu in sod., 1997; Ye in sod., 2001; Lancaster, 2000). Nastala N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> in N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sta v vodnem okolju kratkoživa, zato je logično, da največ nitrozotiolov nastane tik ob membrani. Tako je možno, da reagirajo tudi s prosto tiolno skupino Cys 189 v ožini pore kanalčka AQP-1, ga s tem delno blokirajo in tako vplivajo na znižanje vodne permeabilnosti membrane.

Tiolne skupine hemoglobina so najštevilčnejše v eritrocitu in kar za desetkrat presegajo tiolne skupine glutationa, ki so po številčnosti na drugem mestu. Za njimi sledijo ostale tiolne skupine na kanalčkih, prenašalcih in encimih. Tako si lahko ustvarimo predstavo o različnih tarčah oksigeniranih NO oblik in verjetnosti AQP-1 kot tarče za vezavo. Bližje kot se nahajajo membrani in v večji koncentraciji, bolj verjetno je, da bo prišlo do nitroziliranja na določeni tarči. Tako je AQP-1, čeprav se nahaja v eritrocitu samo v 200.000 kopijah v primerjavi z 280.000.000 kopijami hemoglobina v posameznem eritrocitu, s svojo lokacijo v membrani dovolj verjetna tarča za N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> in N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

NO je paramagnetna molekula, ki skrajša relaksacijski čas protonov znotrajcelične vode, če pride v znotrajcelični prostor. Ker NNP in NO prehajata membrano eritrocitov (Bor-Kucukatay in sod., 2003; Liu in sod., 1998; Ye in sod., 2001), je zelo verjetna domneva, da z NNP sproščeni NO skrajša  $T_{2,a}$  protonov znotrajcelične vode, kar vidimo kot skrajšanje  $T'_{2,a}$ . Takojšnji upad  $T'_{2,a}$  po dodatku NNP razumemo kot sprostitvev molekul NO z NNP ob reakciji z –SH skupinami eritrocita in vstop NO v znotrajcelični prostor. Upadanje skrajšanja  $T'_{2,a}$  povzroči poraba NO v reakciji s hemoglobinom, ki ima ustrezno hitro kinetiko, reakcije s kisikom pa so za to prepočasne.

NO pa povzroča tudi drug paramagnetni efekt, ki je dolgotrajnejši od same življenjske dobe NO v znotrajceličnem prostoru eritrocita. Z vezavo NO na diamagnetni oksihemoglobin nastane nitrit in methemoglobin, ki je paramagnetni (Zborowski in sod., 2003; Eisenstadt in sod., 1981). Fe<sup>3+</sup> methemoglobina predstavlja relaksacijske centre za

protone molekul vode in tako skrajša  $T_{2,a}$  (Eisenstadt, 1981). Ker je oksihemoglobin prevladujoča oblika hemoglobina v našem vzorcu in je tudi najpogostejša tarča za NO v eritrocitu, ta efekt ni zanemarljiv in predstavlja vir paramagnetnosti, ki je lahko dolgotrajnejši kot tisti zaradi NO, ki ga zmanjšuje izredno kratka življenjska doba tega paramagnetnega radikala. Methemoglobin pretvarjajo nazaj v oksihemoglobin methemoglobin reduktaze, ki vzpostavijo prejšnje diamagnetno stanje (Kuma, 1981). Kinetika porasta  $T'_{2,a}$  do 10. minute je zato najverjetneje kombinacija reakcije NO radikala in pretvarjanja methemoglobina nazaj v oksihemoglobin (Lukyanenko in sod., 2004). Reakcija NO z deoksihemoglobinom, ki da nitrozilhemoglobin na magnetizacijo vzorca ne vpliva, saj sta oba paramagnetna (Ducrocq in sod., 1996, cit. po Wajnberg in sod., 1996; Jia in sod., 1996; Duewell in sod., 1996).

NO lahko povzroči tudi diamagnetne efekte z zmanjšanjem koncentracije O<sub>2</sub> v citoplazmi. O<sub>2</sub> je biradikal in zato paramagneten. Reakcije NO z O<sub>2</sub>, ki dajo diamagnetne produkte NO oksigenacije, bi naredile vzorec bolj diamagneten. Ta efekt zelo malo verjeten, saj NO v citoplazmi skoraj takoj reagira s hemoglobinom, diamagnetni produkti reakcije NO z O<sub>2</sub> pa na relaksacijo protonov znotrajcelične vode ne vplivajo.

Naše meritve začetnega skrajšanja  $T'_{2,a}$  so posreden dokaz o sproščanju NO iz NNP v sistemu z človeškimi eritrociti. Ker je vzorec zaprt v merilni posodici, je vpliv svetlobe izključen in lahko govorimo o **svetlobno neodvisnem sproščanju**.

Nitrozilacija Cys189 z NO oksidiranimi produkti lahko razloži rahlo začasno podaljšanje  $T'_{2,a}$  ob nespremenjenem  $V_{in}/V_{out}$ , ki nastopi po približno 10 minutah po dodatku NNP. To pomeni, da je zaradi začasne blokade pore AQP-1 z nitrozotiolom prišlo do podaljšanja konstante difuzijske izmenjave vode skozi membrano ( $\tau_{exch}$ ) oziroma do **zmanjšanja difuzijske vodne permeabilnosti membrane humanega eritrocita** ( $P_d$ ). K zmanjšanju  $P_d$  lahko prispeva tudi NO, ki se kopiči v membrani in ovira difuzijski prehod molekul vode skozi lipidni dvosloj.

Pri vseh uporabljenih koncentracijah podaljšanje  $T'_{2,a}$  nikoli ne preseže 7 % kontrolne velikosti (Preglednica 8). Povečanje ne kaže korelacije z uporabljeno koncentracijo NNP, kar je lahko posledica dejstva, da so razlike v efektih med različnimi koncentracijami v območju velikosti merske napake. Ob predpostavljene nezanesljivosti meritev, ocenjenih iz variabilnosti kontrole, to podaljšanje ni statistično pomembno. Vsekakor pa obstaja nesporen trend podaljšanja  $T'_{2,a}$  oz. zmanjšanja  $P_d$ , vendar je z dano metodo ugotovljena razlika v primerjavi s kontrolo premajhna, da bi lahko zmanjšanje  $P_d$  z gotovostjo potrdili.

Podaljšanje  $T'_{2,a}$  lahko zakriva vzporedni efekt skrajšanja  $T_{2,a}$  zaradi paramagnetnega NO, ki se sčasoma sprošča z NNP in hkrati ustvarja paramagnetni methemoglobin.

Rezultati meritev 20 % hematokrita kažejo še en zanimiv efekt, to je daljšanje izmerjenega  $T'_{2,a}$  nad kontrolno vrednost, ko vzorec ne stresamo in skrajšanje izmerjenega  $T'_{2,a}$  po stresanju (Priloga 3 in 4). Ta efekt je dosti bolj izrazit pri vzorcih z NNP kot pa z HgCl<sub>2</sub> (rezultati niso prikazani). Ker je 40 % hematokrit, ki mu dodamo raztopino NNP, viskozna snov, ne dosežemo dobrega premešanja, to pa dodatno preprečuje tudi površina teflonske posode, ki je hidrofobna. Tako najverjetneje ob stresanju vzorca omogočimo reakcijo med NNP in eritrociti, ki poprej še niso bili v stiku, sledi sproščanje NO in nastajanje methemoglobina, kar vidimo kot skrajšanje  $T'_{2,a}$  po stresanju zaradi skrajšanja  $T_{2,a}$  znotrajcelične vode. To nam pokaže, da zelo težko ocenimo dejansko količino NO, ki se sprosti z NNP, oz. količino NNP, ki pride v stik z eritrociti.

Ker efekta stresanja ne moremo dobro ločiti od efekta posedanja eritrocitov, smo se odločili za vsakokratno pretresanje vzorcev. Tako lahko stresanje vzorca, ki skrajšuje  $T_{2,a}$  zakrije efekt nitrozilacije Cys189, ki podaljšuje  $T'_{2,a}$  zaradi podaljšanja  $\tau_{exch}$ , s čimer se skladajo izsledki Lahajnarja in sod. (2006), ki so z 0.25 mM NNP v 20 % hematokritu dosegli 12 % podaljšanje  $T'_{2,a}$  ob tem, da vzorcev niso stresali.

Tako ni bilo možno natančno izračunati realnega podaljšanja  $\tau_{exch}$ , saj nismo mogli zanesljivo kvantificirati skrajšanje  $T_{2,a}$  zaradi paramagnetizma NO in tudi ne oceniti realnega zmanjšanja  $P_d$ , ki je verjetno največji v začetku meritve in se s časom zmanjšuje. Na začetku meritve je koncentracija paramagnetnega NO in methemoglobina največja, zato nam ta efekt, če je res prisoten, to zakriva.

## 5.2 SKLEPI

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

- Inkubacija človeških eritrocitov s **Hg<sup>2+</sup>** povzroči skrajšanje časovne konstante  $\tau_{exch}$  izmenjave znotrajcelične vode in zmanjšanje volumskega razmerja  $V_{in}/V_{out}$  znotrajcelične in zunajcelične vode inkubiranega vzorca eritrocitov, kar kaže na **krčenje eritrocitov**. Ta ugotovitev je bila potrjena z neodvisno metodo.

Krčenje eritrocitov je lahko, glede na obstoječe dokaze, posledica aktivacije od Ca<sup>2+</sup> odvisnega K<sup>+</sup>-kanalčka (Gárdosevega kanalčka), ki povzroči iztok K<sup>+</sup> iz celice in posledično osmotsko izgubo celične vode (Eisele in sod., 2006; Lahajnar in sod., 2006). Pri tem moramo upoštevati raznovrstnost tarč (prostih -SH skupin, ki so v celici na voljo), ki se nahajajo na različnih kanalčkih, transporterjih, encimih itd. Gárdosev kanalček je

možna, a ne edina tarča delovanja Hg<sup>2+</sup>. Iz dobljenih rezultatov ne moremo z docela zanesljivo opisati vzroka krčenja eritrocitov.

- Hg<sup>2+</sup> verjetno sproža eriptozo. Naši rezultati kažejo, da je v primeru Hg<sup>2+</sup> pojav eriptoze v razpoložljivem času 120 min možen. Verjetno se aktivirajo od Ca<sup>2+</sup> odvisni K<sup>+</sup>-kanalčki, ki dokazano sodelujejo v procesu eriptoze, ki jih Hg<sup>2+</sup> aktivira neodvisno od Ca<sup>2+</sup>. To podpira tudi opaženi pojav brstenja membrane. Nejasno pa je ali je vzrok tega pojava v eriptози ali v disorganizaciji citoskeleta. Pojava eriptoze z obstoječimi rezultati ne moremo potrditi. Proti eriptози govorijo tudi izsledki Lahajnarja in sod. (2006), ki kažejo na ponovno podaljšanje  $\tau_{exch}$  in zvečanje  $V_{in}/V_{out}$  ob dodatku merkaptotetanolu eritrocitom, ki so bili inkubirani z HgCl<sub>2</sub>.
- Možna je tudi minimalna blokada AQP-1 s Hg<sup>2+</sup> in s tem zmanjšanje  $P_d$ , na kar lahko sklepamo iz neenakih relativnih sprememb  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$ . Zaradi prisotne hemolize in velikosti merskih napak ni možno oceniti ali se relativni spremembi  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$  resnično razlikujeta. Sklepamo, da  $P_d$  ostaja konstanten.
- Hg<sup>2+</sup> povzroča nastanek ehinocitov. Možne so tudi krenacijske oblike zaradi krčenja eritrocita, ki so podobne ehinocitom, a imajo zmanjšan volumen. Po 60 minutah inkubacije so oblikovno spremenjeni skoraj vsi eritrociti.
- Brstenje membrane je najverjetneje rezultat dveh vzporedno potekajočih procesov: (i) eriptoze in (ii) premreženja citoskeleta ter hkratnega povečanja razlike med površino zunanje in notranje sloja membrane eritrocita ( $\Delta A$ ) zaradi Hg<sup>2+</sup>.
- NO ne vpliva na volumen in obliko humanih eritrocitov.
- Sproščanje NO z NNP je vidno razvidno iz izmerjenega skrajšanja  $T'_{2,a}$  protonov znotrajcelične vode takoj po dodatku NNP, zaradi njegovih paramagnetnih učinkov v vzorcih z 20 % hematokritom, kar skrajša relaksacijski čas protonov  $T_{2,a}$  znotrajcelične vode.
- Blokade AQP-1 in/ali lipidne poti difuzijskega prehoda vode skozi membrano zaradi vpliva NO ne moremo povsem zanesljivo potrditi, ker je podaljšanje izmerjenega  $T'_{2,a}$  in s tem izračunanega  $\tau_{exch}$  v vzorcih z 20 % hematokritom premajhno.

Raziskavo vpliva NO in HgCl<sub>2</sub> na sveže človeške eritrocite z metodo pulzne NMR protonov vode bi se dalo izboljšati v naslednjih pogledih:

- z izvedbo celotnega poskusa v enem dnevu (inkubacije z obema efektorjema, v vseh preučevanih koncentracijah) na eritrocitih ene same osebe; merjenje teh vzorcev ob enakih časih za določitev statističnih parametrov za boljši opis vzorcev;
- z uporabo računalniškega programa za merjenje površine eritrocitov na mikrografijah. S tem bi dobili bolj zanesljive podatke o spreminjanju volumna, ki je neposredno povezan s površino eritrocita na mikrografiji.
- z uporabo K<sup>+</sup>-elektrode za spremljanje iztoka K<sup>+</sup> v zunajcelično raztopino (neposredno spremljanje aktivnosti Gárdosevih kanalčkov);
- Z uporabo inhibitorjev Gárdosevega kanalčka (npr. klotrimazol);
- izboljšanjem eksperimentalne metode, ki bi omogočilo takojšnjo merjene vzorcev z NNP po pripravi za določitev resničnega skrajšanja izmerjenega  $T'_{2,d}$ ;
- merjenje magnetne susceptibilnosti eritrocitov, inkubiranih z NNP.

## 6 POVZETEK

Eritrocit je zelo uporaben sistem za preučevanje celičnega vodnega transporta. Ta vrsta celice je podrobno preučena in zato tudi uporabna kot modelni sistem v različnih študijah. Poleg tega so po vstopu toksičnih snovi, kot je Hg<sup>2+</sup> v kri, eritrociti med njihovimi prvimi tarčami. NO pa je nesporno eden izmed najvažnejših vazoaktivnih snovi, katerega aktivnost se modulira tudi z eritrociti.

Poskus smo zastavili tako, da je bila venska kri odvzeta več zdravim moškim prostovoljcem (Zavod za transfuzijsko medicino, Ljubljana). Po izolaciji eritrocitov smo 20 % hematokrit izpostavili 120-minutnemu delovanju HgCl<sub>2</sub> ali NNP različnih koncentracij. Za študij sprememb transporta vode skozi membrane eritrocitov kot posledice inkubacije s HgCl<sub>2</sub> ali NNP smo uporabili pulzno metodo jedrske magnetne resonance (NMR) merjenja protonske transversalne magnetizacije znotrajcelične vode, ki se izmenjuje z vodo zunajcelične raztopine. Pri tej NMR metodi paramagnetno označimo zunajcelično raztopino z ioni mangana (Mn<sup>2+</sup>) v 10 mM koncentraciji, ki ustvari zadostno razliko med protonsko NMR relaksacijo znotrajcelične in zunajcelične vode (Lahajnar, 1992). Neodvisno smo izmerili  $T_2$  transversalne relaksacije protonov znotrajcelične vode v eritrocitih na diamagnetnem vzorcu s 100 % hematokritom. Meritve smo opravili tudi na diamagnetnih in paramagnetnih vzorcih različnih raztopin. Izmerili smo  $T_2$  relaksacijski čas protonov vode v raztopinah MnCl<sub>2</sub>, NNP, KFC in N-acetilcisteina. Z slednjimi razložimo skrajšanje  $T_{2,a}$  znotrajcelične vode v eritrocitih zaradi paramagnetnih efektov NO.

Izbrana NMR metoda omogoča zasledovanje časovne konstante  $\tau_{exch}$  difuzijske izmenjave vode med znotrajceličnim in zunajceličnim prostorom ter razmerja  $V_{in}/V_{out}$  med znotrajceličnim in zunajceličnim volumnom vode eritrocitnega vzorca v odvisnosti od časa inkubacije eritrocitov z danim efektorjem. Oba parametra določimo iz grafa dvoeksponencialne relaksacijske funkcije  $M(t)$  transversalne magnetizacije protonov vode v paramagnetno označenem vzorcu. Zmanjševanje razmerja med amplitudama protonskega signala vode iz znotrajceličnega in zunajceličnega prostora povečuje mersko napako v določevanju  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$  po daljšem času inkubacije s HgCl<sub>2</sub>.

Inkubacija humanih eritrocitov z Hg<sup>2+</sup> povzroči skrajševanje časovne konstante  $\tau_{exch}$  in zmanjševanje volumnskega razmerja  $V_{in}/V_{out}$  inkubiranega vzorca eritrocitov, kar kaže na krčenje eritrocitov. Krčenje eritrocitov je glede na obstoječe dokaze iz literature posledica aktivacije od Ca<sup>2+</sup> odvisnega K<sup>+</sup>-kanalčka (Gárdosevega kanalčka), ki poveča iztok K<sup>+</sup> iz celice in posledično osmotsko izgubo celične vode (Eisele in sod., 2006).

Hg<sup>2+</sup> naj bi sprožil apoptozo eritrocitov (eriptozo) (Lang in sod., 2003a,b, 2005). Naši rezultati kažejo, da je pojav eriptoze v razpoložljivem času 120 min možen, ker verjetno pride do močne aktivacije K<sup>+</sup>-kanalčkov, ki dokazano sodelujejo v procesu eriptoze, prav tako vidimo tudi brstenje membrane. Temu nasprotujejo rezultati Lahajnarja in sod. (2006), ki so pokazali, da so vplivi Hg<sup>2+</sup> v teh koncentracijah delno reverzibilni. Če je apoptoza prisotna, prizadene samo majhen del eritrocitov.

Inkubacija človeških eritrocitov z NNP, ki je donor NO, povzroči ob konstantnem volumskem razmerju  $V_{in}/V_{out}$  majhno podaljšanje izmerjene časovne konstante  $T'_{2,a}$  transverzalne relaksacije protonov znotrajcelične vode, iz česar sklepamo na zmanjšanje  $P_d$  zaradi nitroziliranja tiolne skupine v ožini pore AQP-1 in/ali zaradi oviranja difuzijskega prehoda vode skozi lipidni dvosloj zaradi nakopičenega NO. Podaljšanje  $T'_{2,a}$  ni statistično pomembno, ker je meja natančnosti dane metode v območju efekta, kaže pa stalno tendenco pri vseh uporabljenih koncentracijah v vseh vzorcih.

Sproščanje paramagnetnega NO iz NNP ob interakciji z eritrociti lahko spremljamo kot takojšnje skrajšanje  $T'_{2,a}$  po dodatku NNP zaradi dejanskega skrajšanja znotrajceličnega relaksacijskega časa protonov vode ( $T_{2,a}$ ) bodisi zaradi paramagnetnega učinka sproščenega NO ali zaradi nastajanja paramagnetnega hemoglobina (Eisenstadt in sod., 1981) iz diamagnetnega oksihemoglobina (Zborowski in sod., 2003). V obeh primerih se skrajša relaksacijski čas  $T_{2,a}$  protonov znotrajcelične vode in s tem tudi  $T'_{2,a}$ . Tako lahko potrdimo svetlobno neodvisno sproščanje NO z NNP v sistemu z eritrociti.

Paramagnetne efekte produktov NNP smo dodatno preverili na raztopinah NNP, KFC, N-acetilcisteina in na raztopini NNP z dodanim ekvimolarnim N-acetilcisteinom. Pokazali smo, da pride do sproščanja NO z NNP ob prisotnosti tiolnih skupin in da je železo v NNP v stabilnem kompleksu ter ne povzroča paramagnetnih efektov.

NNP kot donor NO v reakciji z –SH skupinami ne povzroča volumskih ali oblikovnih sprememb eritrocitov v območju uporabljenih koncentracij.

Rezultati diplomskega dela dajejo zanimive izsledke, ki so v skladu z najnovejšimi spoznanji o od Ca<sup>2+</sup> neodvisni aktivaciji Gárdosevega kanalčka s Hg<sup>2+</sup>, kot tudi eksperimentalni dokaz svetlobno neodvisnega sproščanja NO z NNP v sistemu z eritrociti. Kljub temu ostaja dovolj odprtih vprašanj za nadaljnje raziskave v smeri študija vodnega transporta in sprememb oblike humanih eritrocitov.

## 7 VIRI

- Abraham M.H., Gola J.M.R., Cometto-Muniz E., Cain W.S. 2000. The salvation properties of nitric oxide. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions*, 2: 2067-2070
- Adonaylo V.N., Oteiza P.I. 1999. Hg<sup>2+</sup> promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. *Toxicology*, 132: 13-32
- Azizi F., Kielbasa J.E., Adyiga A.M., Maree R.D., Frazier M., Yakubu M., Shields H., King B., Kim-Shapiro D.B. 2005. Rates of nitric oxide dissociation from hemoglobin. *Free Radical Biology & Medicine*, 39: 145-151
- Baskurt K.O., Yalcin O., Ozdem S., Armstrong J.K., Meiselman H.J. 2004. Modulation of endothelial nitric oxide synthase expression by red blood cell aggregation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286: 222-229
- Benesch R.E. in Benesch R. 1962. The influence of oxygation on the reactivity of the –SH groups of hemoglobin. *Biochemistry*, 1: 735-738
- Bennekou P., Christophersen P. 2003. Ion channels. V: Red cell membrane transport in health and disease. Bernhardt I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 139-152.
- 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. Bernhardt I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 83-109.
- Betz T., Bakowsky U., Müller M.R., Lehr C.M., Bernhardt 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](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.
- Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Mieselman H.J., Oguz K. 2003. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 284: 1577-1584



- Bor-Kucukatay M., Mieselman H.J., Oguz K. 2005. Modulation of density-fractionated RBC deformability by nitric oxide. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 33: 363-367
- Borgnia M., Nielsen S., Engel A. Agre P. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annual Reviews in Biochemistry*, 68:425-428
- 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<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> 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.
- Brandão R, Lara FS, Pagliosa LB, Soares FA, Rocha JB, Nogueira CW, Farina M. 2005. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. *Drug and Chemical Toxicology*, 28,4: 397-407.
- 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.
- Bobrowska-Hägerstrand M., Hägerstrand H., Iglič A. 1998. Membrane skeleton and red blood cell vesiculation at low pH. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1371: 123-128
- Bozzo J., Hernandez R.M., Galan A.M., Heras M., Ordinas A., Escolar G. 2000. Antiplatelet effects of sodium nitroprusside in flowing human blood: Studies under normoxic and hypoxic conditions. *Thrombosis Research*, 97: 217-225
- Bucio L., Souza V., Albores A., Sierra A., Chávez E., Cárabez A., Gutiérrez-Ruiz M.C. 1995. Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*, 102: 285-299.

- Buttler A.R., Calsy-Herrison A.M., Glidwell C., Johnson I.J. 1988. The oxidation of glutathione by nitroprusside: Change in glutathione in intact erythrocytes during incubation with sodium nitroprusside as detected by <sup>1</sup>H spin echo NMR spectroscopy. *Inorganica Chimica Acta*, 151, 4: 281-286
- Byrne-Habič B., Mravljak J., Pečar S. 2004. Dušikov oksid I: lastnosti, kemična reaktivnost in nastajanje NO v organizmu. *Farmakološki Vestnik*, 55: 469-478
- Cao Y.J., Houamed K.M. 1999. Activation of recombinant human SK4 channels by metal cations. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 446: 137-141
- Chmiel B., Turczynski B., Szczesny S. 2001. The influence of nitrogen oxide on erythrocyte deformability in rats exposed to stress of water immersion. *Current Topics in Biophysics*, 25, 1: 27-31
- Cohen R.A., Adachi T. 2006. Nitric-Oxide -Induced Vasodilatation: Regulation by physiologic S-Glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 16, 4: 109-114
- Conran N., Oresco-Santos C., Acosta H.C., Fattori A., Saad S.T.O., Costa F.F. 2004. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. *British Journal of Haematology*, 124, 4: 547-558
- Cosby K. 2003. Nitrite reduction to nitric oxide by oxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature Medicine*, 10, 9: 1498-1505
- Csu X., Cho M., Spencer N.Y., Patel N., Huang Z., Shields H., King S.B., Gladwin M.T., Hogg N., Kim-Shapiro D.B. 2003. Measurements of nitric oxide on the heme iron and β-thiol of human hemoglobin during cycles of oxygenation and deoxygenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 11303-11308
- de Groot B.L., Grubmüller H. 2005. The dynamics and energetic of water permeation and proton exclusion in aquaporins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15: 176-183
- de Groot B.L., Grubmüller H. 2007. Water permeation across biological membranes: mechanisms and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, 294: 2353-2356
- de Groot B.L., Frigato T., Engel A., Grubmüller H. 2003b. The Structure of the Aquaporin-1 Water Channel: A Comparison between Cryo-electron Microscopy and X-ray Crystallography. *Journal of Molecular Biology*, 325, 3: 485-493
- de Groot B.L., Frigato T., Helms V., Grubmüller H. 2003a. The Mechanism of Proton Exclusion in the Aquaporin-1 Water Channel. *Journal of Molecular Biology*, 333, 2: 279-293

- De Rosa M. C., Carelli Alinovi C., Galtieri A., Scatena R., Giardina B. 2007. The plasma membrane of erythrocytes plays a fundamental role in the transport of oxygen, carbon dioxide and nitric oxide and in the maintenance of the reduced state of the heme iron. *Gene* (neobjavljeno)
- Derganc J., Božič B., Žekš B. 2003. Equilibrium shapes of erythrocytes in rouleau formation. *Biophysical Journal*, 84: 1486-1492
- 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.
- Devaux P.F., 1999. Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry *Chemistry and Physics of Lipids*, 73: 107-120
- Devuyst O., Ni J. 2006. Aquaporin-1 in the peritoneal membrane: Implications for water transport across capillaries and peritoneal dialysis. *Biochimica et Biophysica Acta- Biomembranes*, 1758, 8: 1078-1084
- Duewell S., Kasserra C.E., Jezzard P., Balaban R.S. 1996. Evaluation of methemoglobin as an autologous intravascular MRI contrast agent. *Magnetic resonance in medicine*, 35: 787-789
- Eich R.F., Li T., Lemon D.D., Doherty D.H., Cury S.R., Aitken J.F., Mathews A.J., Johnson K.A., Smith R.D. 1996. Mechanism of NO induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*, 35: 6979-6983
- 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.
- Eisenstadt M. 1981. NMR proton relaxation of protein and water protons in methemoglobin solutions. *Biophysics Journal*, 33:469-474
- 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., Cohrssen B., Powell C.H. (eds.) 5<sup>th</sup> ed. Vol.2. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 327- 352.
- Friebe A., Koesling D. 2003. Regulation of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase. *Circulation Research*, 93: 96-105

- Fukuto J.M., Chou J.Y., Switzer C.H. 2000. Chemical properties of nitric oxide and related nitrogen oxides. V: Ignarro L.J. (ed.) Nitric oxide: Biology and pathobiology. San Diego, Academic Press: 23-40
- 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.
- Gaston B., Singel D., Doctor A., Stamler J.S. 2006. S-nitrosothiol signaling in respiratory biology. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173: 1186-1193
- 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<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport in vertebrate red cells. V: Red cell membrane transport in health and disease. Bernhardt I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 197-220.
- 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, <sup>31</sup>P and <sup>199</sup>Hg NMR. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1325: 250-262.
- Gladwin M.T., Crawford J.H., Patel R.P. 2003. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free radical Biology & Medicine*, 36: 707-717
- Gladwin M.T., Raat N.J.H., Shiva S., Dezfulian C., Hogg N., Kim-Shapiro D.B., Patel R. 2006. Nitrite as a nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilatation. *Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 291: 2026-2035
- Glaser R. 1998. Does the transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ) or the intracellular pH (pH<sub>i</sub>) control the shape of human erythrocytes? *Biophysical Journal*, 75: 569-570.

- Gow A.J., Luchsinger B.P., Powloski D.J., Singel J.S., Stamler B.P. 1999. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 9027-9032
- Griesdale D.E.G., Honey C.R. 2004. Aquaporins and brain edema. *Molecular biology*, 61, 5: 418-421
- Grossi L., D'Angelo S. 2004. Sodium Nitroprusside: Mechanism of NO Release Mediated by Sulfhydryl-Containing Molecules. *Journal of Medical Chemistry*, 48: 2622-2626
- Gutknecht J. 1981. Inorganic mercury (Hg<sup>2+</sup>) transport through lipid bilayer membranes. *Journal of Membrane Biology*, 61: 61-66.
- Han T.H., Liao J.C. 2005. Erythrocyte nitric oxide transport reduced by a submembrane cytoskeletal barrier. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1723: 135-142
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.
- Herold S., Rehmann F.J.K. 2003. Kinetics of the reaction of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. *Free Radical Biology & Medicine*, 5: 531-545
- Herold S., Röck G. 2002. Mechanistic studies of S-nitrosothiol formation by NO<sup>•</sup>/O<sub>2</sub> and by NO<sup>•</sup>/methemoglobin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 436: 386-396
- Hobbs A.J., Gladwin M.T., Patel R.P., Williams D.L.H., Butler A.R. 2002. Haemoglobin: NO transporter, NO activator or None of the above?. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23, 9: 406-411
- Hsu P.C., Guo Y.L. 2002. Antioxidant nutrients and mercury toxicity. *Toxicology*, 180: 33-44.
- (<http://biology.uwsp.edu/faculty/SSepsenw>) (3.avg. 2007)
- Hu T.M., Chou T.C. 2006. The kinetics of thiol-mediated decomposition of S-nitrosothiols. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 8, 3: 485-492
- Huang K.T., Han T.H., Hyduke D.R., Vaughn M.W., Van Herle H., Hein T.W., Zhang C., Kuo L., Liao J.C. 2001. Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes. *Physiology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 11771-11776

- Huang Z., Louderback J.G., Goyal M., Azizi F. King B., Kim-Shapiro D.B. 2001. Nitric oxide binding to oxygenated hemoglobin under physiological conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1568: 252-260
- Huang Z., Ucer K.B., Murphy T., Williams R.T., King B., Kim-Shapiro D.B. 2002. Kinetics of nitric oxide binding to R-state hemoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292: 812-818
- 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.
- Iglič A., Hägerstrand H., Kralj-Iglič V., Bobrowska-Hägerstrand. 1998. A possible physical mechanism of red blood cell vesiculation obtained by incubation at high pH. *Journal of Biomechanics*, 31: 151-156
- Ignarro L.J. 2002. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 53, 4: 503-514
- Jeffers A., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B. 2006. Computation of plasma hemoglobin nitric oxide scavenging in hemolytic anemias. *Free Radical Biology & Medicine*, 41: 1557-1565
- Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. 1996. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, 380: 221-226
- Jiang J.J., Corbett B.J., Hogg N., Mason R.P. 2007. An electron paramagnetic resonance investigation of the oxygen dependence of the arterial-venous gradient of nitrosyl hemoglobin in blood circulation. *Free Radical Biology & Medicine* (neobjavljeno)
- Jubelin B.C., Gierman J.L. 1996. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *American Journal of Hypertension*, 9, 12: 214-219
- 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.
- Kim-Shapiro D.B. 2004. Hemoglobin-nitric oxide cooperativity: Is NO the third respiratory ligand?. *Free Radical Biology & Medicine*, 36: 402-412
- Kimura M. 2005. Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacology & Therapeutics*, 106, 2:233-266

- Kon H. 1968. Paramagnetic resonance study of nitric oxide hemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 243, 16: 4350-4357
- Korbut A.R., Madej J., Adamek-Guzik T., Korbut R. 2003. Secretory dysfunction of vascular endothelium limits the effect of angiotensin converting enzyme inhibitor quinapril on aggregation of erythrocytes in experimental hypertension. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54: 397-408
- Kosaka H., Seiyama A. 1996. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218: 749-752
- Kruszyna H., Kruszyna R., Rochelle L.G., Smith R.P., Wilcox D.E. Effects of temperature, oxygen, heme ligands and sulfhydryl alkylation on the reactions of nitroprusside and nitroglycerin with hemoglobin. *Biochemical Pharmacology*, 46, 1: 95-102
- Kuma F. 1981. Properties of methemoglobin reductase and kinetic study of methemoglobin reduction. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 10: 5518-5523
- Kumar P.J., Clark M.L. 2005. *Clinical medicine*. 6. izdaja. Edinburgh, Elsevier Saunders: 1508 str.
- Kuypers F.A., Yuan J., Lewis R.A., Snyder L.M., Kiefer C.R., Bunyaratvej A., Fucharoen S., Ma L., Styles L., de Jong K., Schrier S.L. 1998. Membrane Phospholipid Asymmetry in Human Thalassemia. *Blood*, 91, 8: 3044-3051
- 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., Pečar S., Sepe A. 2006. Na-nitroprusside and HgCl<sub>2</sub> modify the water permeability and volume of human erythrocytes. *Bioelectrochemistry*, 71: 163-169.
- Lancaster J.R. 2000. The physical properties of nitric oxide: Determinants of the dynamic of NO in Tissue. V: Ignarro J.L. (ed.). *Nitric oxide: Biology and Pathobiology*. San Diego, Academic Press: 209-223
- 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 F., Huber S.M., Szabo I., Gulbins E. 2007. Plasma membrane ion channels in suicidal cell death. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (neobjavljeno)
- Lang P.A., Kaiser S., Myssina S., Wieder T., Lang F., Huber S.M. 2003b. Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 285: C1553-C1560.
- 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.
- Laterreur J., English A.M. 2007. Hemoglobin S-nitrosylation on oxygenation of nitrite/deoxyhemoglobin incubation is attenuated by methemoglobin. *Journal of Inorganic Chemistry* (neobjavljeno)
- Liao J.C., Hein T.W., Vaughn M.W., Huang K.T., Kuo L. 1999. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Physiology*, 96: 8757-8761
- Liu X., Miller M.J.S., Joshi M.S., Sadowska-Krowicka H., Clark D.A., Lancaster A. 1998. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 18709-18713
- Liu X., Miller M.J.S., Joshi M.S., Thomas D.D., Lancaster J.R. 1997. Accelerated reaction of nitric oxide with O<sub>2</sub> within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 2175-2179
- Lopez-Revuelta A., Sanchez-Gallego J.I., Garcia-Montero A., Hernandez-Hernandez A., Sanchez-Yague J., Llanillo M. 2007. Membrane cholesterol in the regulation of aminophospholipid asymmetry and phagocytosis in oxidized erythrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 42: 1106-1118
- Lucien N., Sidoux-Walter F., Roudier N., Ripoché P., Huet M., Trinh-Trang-Tan M., Cartron J., Bailly P. 2002. Antigenic and Functional Properties of the Human Red Blood Cell Urea Transporter hUT-B1. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 37: 34101-34108
- Lukyanenko L.M., Kozlova N. M., Slobozhanina E. I. 2004. Activity of membrane-bound NADH-methemoglobin reductase and physical state of lipids in erythrocyte membranes. *Bioelectrochemistry*, 62, 2:191-193
- Lytle C. 2003. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransport. V: Red cell membrane transport in health and disease. Bernhardt I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 173-195.



- Macey R.L., Farmer R.E.L. 1970. Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 211, 1:104-106
- Maher A.D., Kuchel P.W. 2003. The Gárdos channel: a review of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 1182–1197.
- Mahony C., Brown J.E., Stargel W.W., Verghese C.P., Bjornsson T.D. 1984. In vitro stability of sodium nitroprusside solutions for intravenous administration. *Journal of Pharmaceutical Science.*, 73, 6: 838-839
- Martinov M.V., Vitvitsky V.M., Ataulakhanov F.I. 1999. Volume stabilization in human erythrocytes: combined effects of Ca<sup>2+</sup>-dependent potassium channels and adenylate metabolism. *Biophysical Chemistry*, 80: 199-215.
- Matarrese P., Straface E., Pietraforte D., Gambardella L., Vona R., Maccaglia A., Minetti M., Malorni W. 2005. Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 19: 416-420
- Minetti G., Ciana A., Baldolini C. 2004. Differential sorting of tyrosine kinases and phosphotyrosine phosphatases acting on band 3 during vesiculation of human erythrocytes. *Journal of Biochemistry*, 377: 489–497
- Möller M., Li Q., Viturri D.A., Robinson J.M., Lancaster J.R., Denicola A. 2007. Membrane »lens« effect: Focusing the formation of reactive nitrogen oxides from the NO/O<sub>2</sub> reaction. *Chemical Research in Toxicology*, 20: 709-714
- Moncada S., Higgs A. 2002. The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine*, 329: 2002-2012
- Moon Y., Hong S.J., Shin D., Jung Y. 2006. Increased aquaporin-1 expression in choroid plexus epithelium after systemic hyponatremia. *Neuroscience Letters*, 395: 1–6
- Moore E.G., Gibson Q.H. 1976. Cooperativity in dissociation of nitric oxide from hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 251: 2788-2784
- Moura, T. F., Macey, R. I., Chien, D. Y., Karan, D., and Santos, H. 1984. Thermodynamics of all-or-none water channel closure in red blood cells. *Journal of Membrane Biology*. 81: 105–111
- Nagahama M., Ma N., Semba R., Naruse S. 2006. Aquaporin 1 immunoreactive enteric neurons in the rat ileum. *Neuroscience Letters*, 395: 206–210

- O'Reilly P., Hickman-Davis J.M., AcArdele P. 2002. The role of nitric oxide in lung innate immunity: Modulation by surfactant protein-A. V: Vallyarhan C., Castranova V., Shi X. (eds.). Oxygen/nitrogen radicals: Cell injury and disease. Norwell, Kluwer Academic Publishers, 155-166
- Paganelli C. V., Solomon A.K. 1957. The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *Journal of General Physiology*, 41: 259-277
- Palmerini C.A., Arienti G., Palombari R. 2003. Electrochemical determination of nitric oxide and of its derivatives. *Talanta*, 61: 37-41
- Pawloksi J.R. 2001. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature*, 406: 622-626
- Pietraforte D., Matarrese P., Straface E., Gambardella L., Metere A., Scorza G., Leto T.L., Malorni W., Minetti M. 2007. Two different pathways are involved in peroxynitrite-induced senescence and apoptosis of human erythrocytes. *Free Radical Biology*, 42:202-214
- Preston G.M., Jung J.S., Guggino W.B., Agre P. 1993. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 17-20
- 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.
- Rassaf T., Preik M., Kleinbongard P., Lauer T., Heiß, Feelisch M., Kelm M. 2002. Evidence of in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 9:1241-1248
- Ribarov S.R., Benov L.C. 1981. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 640,3: 721-726
- Riggs A.F. 1961. The binding of N-ethylmaleimide by human hemoglobin and its effect upon oxygen equilibrium. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 26066-26075
- Rochelle L.G., Kruszyna H., Kruszyna R., Barchowsky A., Wilcox D.E., Smith R. 2002. Bioactivation of nitroprusside by porcine endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 128, 1: 123-128
- Rogers S.C., Khalatbari A., Datta B.N., Ellery S., Paul V., Frenneaux M.P., James P.E. 2007. NO metabolite flux across the human coronary circulation. *Cardiovascular Research*, 75: 434-441

- Roncaroli F., Videla M., Slep L.D., Olabe J.A. 2007. New features in the redox coordination chemistry of metal nitrosyls {M-NO<sup>+</sup>; M-NO<sup>•</sup>; M-NO<sup>-</sup>(HNO)}. *Coordination Chemistry Reviews*, 251: 1903-1930
- Sachs J.R. 2003. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump. V: *Red cell membrane transport in health and disease*. Bernhardt I., Ellory J.C. (eds.). Berlin, Springer: 111-137.
- Sandmann J., Schwedhelm K.S., Tsikas D. 2005. Specific transport of S-nitrosocysteine in human red blood cells: Implications for formation of S-nitrosothiols and transport of NO bioactivity within the vasculature. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 579: 4119-4124
- 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.
- Savage D.F., Stroud R.M. Structural Basis of Aquaporin Inhibition by Mercury. *Journal of Molecular Biology*, 368, 3: 607-617.
- Schrier R. W., Chen Y.-C., Cadnapaphornchai M. A., 2004. From finch to fish to man: Role of aquaporins in body fluid and brain water regulation. *Neuroscience*, 129: 897-904
- Shafer P.R., Wilcox D.E., Kruszyna H., Kruszyna R., Smith R.P. 1993. Decomposition and specific exchange of the transcyanide ligand on nitroprusside is facilitated by hemoglobin. *Biochemical Pharmacology*, 46, 1: 95-102
- Shaw A.W., Vosper A.J. 1977. Solubility of nitric oxide in aqueous and nonaqueous solvents. *Journal of the Chemical Society- Farraday Transactions*, 8: 1239-1244
- 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.
- Sidel V.W., Solomon A.K. 1957. Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *Journal of General Physiology*, 41: 243-257
- Silbergeld E. K. 2003. Facilitative mechanisms of mercury as a carcinogen. *Mutation Research*, 533:121-133.
- Smith, B. L., and P. Agre. 1991. Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multi-subunit oligomer similar to channel proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 420, 266:6407- 6415

- Speicher D.W., Davis G., Marchesi V.T. 1983. Structure of human erythrocyte spectrin. II. The sequence of the alpha-I domain. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 24: 14938-14947
- Stamler J.S. 1997. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*, 276: 2034-2037
- Starzyk D., Korbut R., Gryglewski R.J. 1999. Effects of nitric oxide and prostacyclin on deformability and aggregability of red blood cells of rats *ex vivo* and *in vitro*. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 50: 629-637
- Stohs S.J., Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 2: 321-336.
- Subczynski W.K., Hyde J.S. 1983. Concentration of oxygen in lipid bilayer using a spin-label method. *Biophysics Journal*, 41: 283-286
- Suwalsky M., Ungerer B., Villena F., Cuevas F., Sotomayor C.P. 2000. HgCl<sub>2</sub> disrupts the structure of the human erythrocyte membrane and model phospholipid bilayers. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 81: 267-273.
- 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.
- Svetina S., Kuzman D., Waugh R.E., Zihlerl P., Žekš B. 2004. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behavior of red blood cells. *Bioelectrochemistry*, 62: 107-113
- 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.
- Tsoukias N.M., Popel A.S. 2002. Erythrocyte consumption of nitric oxide in presence and absence of plasma-based hemoglobin. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 282:2265-2277
- Tsuda K., Kimura K., Nishio I. 2002. Leptin improves membrane fluidity of erythrocytes in humans via a nitric oxide-dependent mechanism-an electron paramagnetic resonance investigation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297: 672-681

- Tsuda K., Nishio I. 2004. Leptin and membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *American Journal of Hematology*, 17: 375-379
- Turk B., Stoka V. 2007. Protease signaling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *Federation of European Biochemical Societies Letters* (neobjavljeno)
- Vaughn M.W., Huang K.T., Kuo L., Liao J.C. 2000. Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 2342-2348
- Vaughn M.W., Huang K., Kuo L., Liao J.C. 2001. Erythrocyte consumption of nitric oxide: competition experiment and model analysis. *Nitric oxide*, 5: 18-31
- Vaughn M.W., Huang K.T., Kuo L., Liaolabe J.A. 2006. Reactivity of reduced nitroprusside, [Fe(CN)<sub>5</sub>NO<sup>-</sup>]<sup>3-</sup>, toward oxygen. *Journal of American Chemical Society*, 129: 278-279
- Videla M., Roncaroli F., Slep L.D., Olabe J.A. 2006. Reactivity of reduced nitroprusside, [Fe(CN)<sub>5</sub>NO<sup>-</sup>]<sup>3-</sup>, toward oxygen. *Journal of the American Chemical Society Communications*, 129: 278-279
- Vladimirov Y., Borisenko G., Boriskina N., Kazarinov K., Osipov A. 2002. NO-hemoglobin may be a light-sensitive source of nitric oxide both in solution and in red blood cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 59: 115-122
- Wajnberg E., Benski G., El-Jaick J., Alves O.C. 1996. Nitrosyl hemoglobin: EPR above 80 K. *International Journal of Biological Macromolecules*, 18: 231-235
- Wang P.G., Cai T.B., Taniguchi N. 2005. *Nitric Oxide Donors*. Weinheim, Wiley-VCH: 407 str.
- Wehner F., Olsen H., Tinel H., Kinne-Saffran E., Kinne R.K.H. 2003. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport and signal transduction. *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology*, 148: 1-80
- 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.
- Wink D.A., Grosham M.B., Miles A.M., Nims R.W., Krishna M.C., Pacelli R., Teague D., Poore C.M.B., Cook J.C. 1996. Methods for the determination of selectivity of the reactive nitrogen oxide species for various substrates. *Methods in Enzymology*, 268: 120-130

- Wink D. A., Mitchell J.B. 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free radical Biology & Medicine*, 25: 434-456
- Wink D.A., Nims R.W., Darbyshire J.F., Christodoulou D., Huaber I., Cox G.,E., Laval F., Laval J., Cook J.A., Krishna M.C., DeGraff W., Mitchell J.B. 1994. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solution at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. *Chemical Research in Toxicology*, 7: 519-525
- Yang B, Kyung J. Kim A.S., Verkman A.S., 2006. Comparative efficacy of HgCl<sub>2</sub> with candidate aquaporin-1inhibitors DMSO, gold, TEA and acetazolamide. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 580: 6679–6684
- Yapıslar H., Aydoğan S., Borlu M., Ascıoğlu Ö. 2007. Decreased nitric oxide and increased platelet aggregation levels in patients with Benet's disease. *Thrombosis Research*, 119:416-465
- Yawata Y. 2003. Cell membrane: The red blood cell as a model. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: 454 str.
- Ye J.S., Ottova A., Tien H.T., Sheu F.S. 2001. Nitric oxide enhances the capacitance of self-assembled, supported bilayer lipid membranes. *Electrochemistry Communications*; 3: 580-584
- Yonetani T., Tsuneshige A., Zhou Y., Chen X. 1998. Electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies of  $\alpha$ -nitrosyl hemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 32: 20323-20333
- Zborowski M., Osters G.R., Moore L.R., Milliron S. 2003. Red blood cell magnetophoresis. *Biophysical Journal*, 84: 2638-2645
- Zhang Y., Hogg N. 2004. The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 7891-7896
- Ziherl P., Svetina S. 2007. Flat and sigmoidally curved contact zones in vesicle-vesicle adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104,3: 761–765
- 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.

## 7.1 DRUGI VIRI

- Brubnjak Jevtić B. 1999. Strategija za kakovostno in racionalno rabo krvi. V: Strokovno srečanje ob 50-letnici Oddelka za transfuziologijo in imunohematologijo. Zbornik predavanj, Maribor, 3-4 dec. 1999. Maribor, Splošna bolnišnica Maribor: 113-124
- Maračić I. 2006. Priprava kakovostnih krvnih pripravkov za zdravljenje hemostatskih motenj. V: Hemostatske motnje: Strokovno srečanje ob 30-letnici hemostaziološke dejavnosti v Splošni bolnišnici Maribor, Maribor, 26. maj 2006. Maribor, Splošna bolnišnica Maribor: 47-70

## ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju, prof.dr. Gojmiru Lahajnarju za izredno potrpežljivo in vztrajno vzpodbujanje, usmerjanje ter vodstvo pri mojem raziskovalnem delu.

Iskreno se zahvaljujem tudi svojemu somentorju prof.dr. Slavku Pečarju za neizčrpen vir informacij in prijazno pomoč. Njegova strokovnost mi je bila vedno v vzgled.

Hvala Janji Goršek, za pomoč pri delu in iskanju primernih darovalcev krvi.

Hvala vsem prostovoljnim darovalcem krvi: Kostadinu Kosevu, Andreju Markoti, Darkotu Lamovšku in Roku Koširju.

Za pomoč pri meritvah na NMR pulznem spektrometru se iskreno zahvaljujem Ani Sepe. Zahvala gre tudi dr. Poloni Umek, ki nam je omogočila uporabo primerne prostora za izvedbo poskusa.

Posebna zahvala gre Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani, zlasti Marjeti Golli-Gadžijev, za prijaznost in ogromno olajšanje pri izvedbi poskusa. Hvala.

Prav posebna zahvalo pa si zaslužijo vsi sodelavci v laboratoriju za EPR na IJS, posebej Iztok Dogša, ki mi je z nesebično pomočjo omogočil delo s svetlobnim mikroskopom in za to žrtvoval mnogo ur svojega prostega časa. Prav tako se zahvaljujem vsem ostalim, ki so mi pomagali z prijaznimi in skrbnimi nasveti, posebej še Marjani Nemeč.

Na zadnje bi se rada iz vsega srca se zahvalila očetu in mami ter vsej svoji družini, ki mi je stala ob strani, me podpirala in vzpodbujala vsa leta študija. Hvala!



## PRILOGA

### PRILOGA 1: Teoretične osnove NMR

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

#### 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  $\vec{I}$ :

$$\vec{p} = \vec{I}\hbar . \quad \dots (1)$$

Velikost spinske vrtilne količine je podana z izrazom:

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

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

$$p_z = m\hbar . \quad \dots (3)$$

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

$$m = I, I-1, \dots, (-I+1), -I \quad \dots (4)$$

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:

$$\mu = \gamma \cdot p, \quad \dots (5)$$

kjer je  $\gamma$  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.

## 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:

$$E = -\vec{\mu}\vec{H}_0 = -\mu_z H_0, \quad \dots (6)$$

pri čemer je  $\mu_z$  komponenta jedrskega magnetnega momenta v smeri osi  $z$  zunanega magnetnega polja.

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

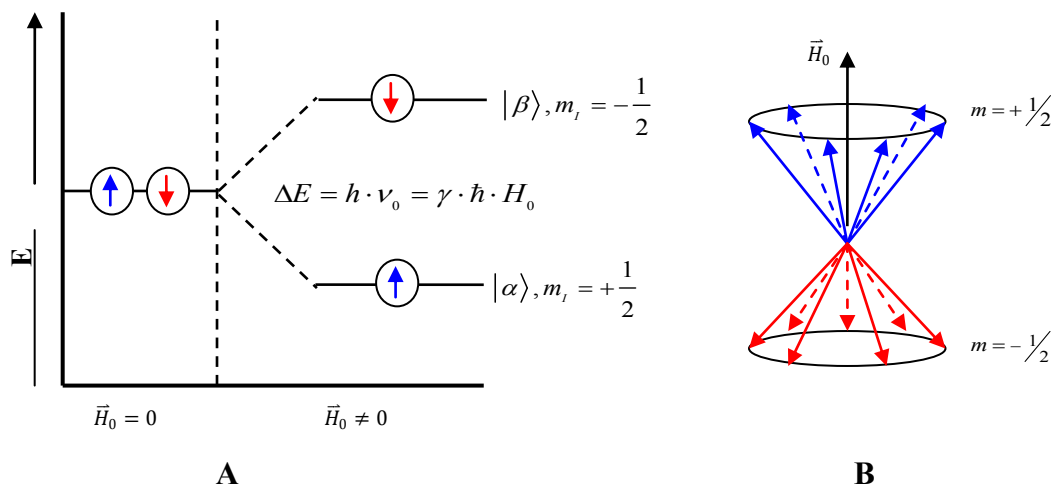
$$E_m = -\gamma\hbar H_0 m_I = -\gamma\hbar H_0 I_z, \quad \dots (7)$$

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

$$\Delta E = \frac{\mu H_0}{I} = \gamma \cdot \hbar \cdot H_0. \quad \dots (8)$$

Iz zveze (4) 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 zunanega magnetnega polja  $\vec{H}_0$ . 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 zunanega polja  $\vec{H}_0$  sta stanji  $|\alpha\rangle$  in  $|\beta\rangle$  energijsko degenerirani. V prisotnosti zunanega magnetnega polja  $\vec{H}_0$  pa v soglasju z enačbo (7) 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 1: nižji energijski nivo ( $m_l = +\frac{1}{2}$ ) ustreza paralelni orientaciji magnetnega momenta (v smeri  $\vec{H}_0$ ), višji energijski nivo ( $m_l = -\frac{1}{2}$ ) pa antiparalelni orientaciji (v nasprotni smeri  $\vec{H}_0$ ).



**Slika 48.** A: Magnetna energijska nivoja jeder s spinskim kvantnim številom  $I = \frac{1}{2}$ . B: Možne orientacije jedrskega spina  $\frac{1}{2}$  v polju  $\vec{H}_0$ . Projekcije  $I$  vzdolž smeri  $\vec{H}_0$  so določene s kvantnim številom  $m_l$  (Gadian, 1982).

V odsotnosti zunanjega magnetnega polja  $\vec{H}_0$  je enako število protonov (oz. jeder s spinom  $I = \frac{1}{2}$ ) 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:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} < 1 \quad \dots (9)$$

V izrazu (9)  $N_\alpha$  in  $N_\beta$  predstavljata število jeder v stanjih  $|\alpha\rangle$  oz.  $|\beta\rangle$ . 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  $\Delta E$  spinskih nivojev (Slika 12A), pride do resonančne absorpcije energije vzbujevalnega rf magnetnega valovanja. Resonančna frekvenca je podana z Bohrovim izrazom:

$$\nu_0 = \frac{\Delta E}{h} = \frac{\gamma H_0}{2\pi} \quad \dots (10)$$

oziroma

$$\omega_0 = \gamma H_0, \quad \dots (11)$$

kjer je  $\omega_0$  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 (9) 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 (10)). Resonančnemu pogoju (10) zadostimo na dva načina:

- s spreminjanjem jakosti magnetnega polja  $H_0$  pri konstantni frekvenci  $\nu_0$ , ali
- s spreminjanjem frekvence  $\nu_0$  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 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  $T_1$ :

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad \dots (12)$$

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 transversalna relaksacija*. To je proces vračanja transversalne ( $xy$ ) 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:

$$\Delta\nu_{1/2} \geq \frac{1}{T_1}, \quad \dots (13)$$

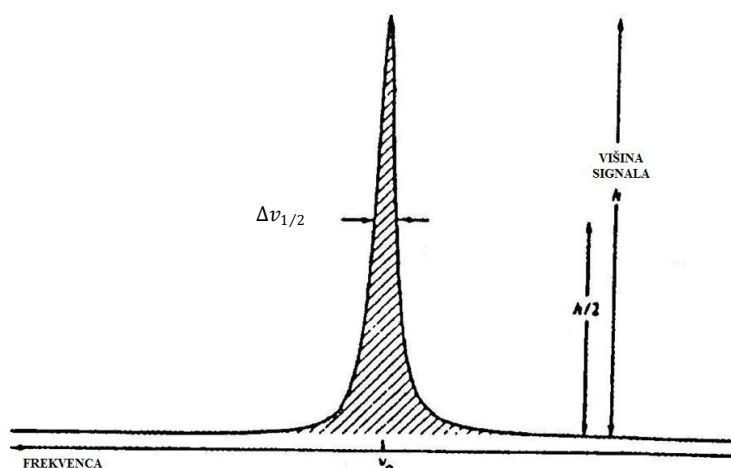
kjer je  $\Delta\nu_{1/2}$  širina resonančne črte pri polovični višini signala.

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

$$\Delta\nu_{1/2} \approx \frac{1}{T_2}. \quad \dots (14)$$

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

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



**Slika 2.** Lorentzova oblika NMR absorpcijske krivulje (Gadian, 1982).

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  $\Delta H_0$  je:

$$\Delta\nu_{1/2}(\text{nehom}) = \frac{\gamma \cdot \Delta H_0}{2\pi} \quad \dots (16)$$

Izmerjena širina  $\Delta\nu_{1/2}(\text{opaz})$  NMR črte nam v soglasju z enačbo (15) definira transverzalni relaksacijski čas  $T_2^*$ :

$$\Delta\nu_{1/2}(\text{opaz}) = \frac{1}{\pi \cdot T_2^*} \quad \dots (17)$$

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

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \cdot \Delta H_0}{2} \quad \dots (18)$$

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

$$T_2^* \leq T_2 \leq T_1 \quad \dots (19)$$

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.

#### 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:

$$\frac{d\vec{p}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{H}. \quad \dots (20)$$

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:

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

Opazovana makroskopska magnetizacija  $\vec{M}$  je vektorska vsota vseh jedrskih magnetnih momentov  $\vec{\mu}$  v vzorcu, zato s seštevanjem po vseh  $\mu$  iz enačbe (21) sledi:

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

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  $\vec{\omega}$  v ravnini  $xy$ . Komponente  $\vec{H}$  so:

$$\begin{aligned} H_x &= H_1 \cdot \cos \omega t \\ H_y &= -H_1 \cdot \sin \omega t \\ H_z &= H_0 \end{aligned} \quad \dots (23)$$

Končno obliko Blochovih enačb dobimo, če vektorsko enačbo (20) zapišemo v komponentni obliki, upoštevajoč izraze (23), 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:

$$\begin{aligned}\frac{dM_x}{dt} &= \gamma (M_y H_0 + M_z H_1 \sin \omega t) - \frac{M_x}{T_2}, \\ \frac{dM_y}{dt} &= \gamma (M_z H_1 \cos \omega t - M_x H_0) - \frac{M_y}{T_2}, \\ \frac{dM_z}{dt} &= -\gamma (M_x H_1 \sin \omega t + M_y H_1 \cos \omega t) - \frac{(M_z - M_0)}{T_1}.\end{aligned}\quad \dots (24)$$

## 5 Rotirajoči koordinatni sistem

Opis gibanja magnetizacije lahko poenostavimo, če ga obravnavamo v rotirajočem koordinatnem sistemu, ki rotira s frekvenco  $\bar{\omega}$  okoli osi  $z \parallel \vec{H}_0$  v istem smislu kot precesirajo jedrski magnetni momenti. Izkaže se, da se v takem sistemu gibalna enačba (22) transformira v naslednjo obliko:

$$\left[ \frac{d\vec{M}}{dt} \right]_{rot} = \gamma \cdot \vec{M} \times \vec{H}_{eff}.\quad \dots (25)$$

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

## 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  $\bar{\omega} = -\gamma \cdot \vec{H}_0$ , velja:

$$\vec{H}_{eff} = \vec{H} + \frac{\bar{\omega}}{\gamma} = \vec{H}_0 - \left[ \frac{\gamma \cdot \vec{H}_0}{\gamma} \right] = 0\quad \dots (26)$$

Negativni predznak pomeni, da gre pri  $\gamma > 0$  za rotacijo v smeri urinih kazalcev. Iz enačbe (25) 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  $\bar{\omega} = -\gamma \cdot \vec{H}_0$  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  $\bar{\omega}$  v ravnini  $x'y'$  pravokotno na  $\vec{H}_0$ . V rotirajočem koordinatnem sistemu (pri frekvenci  $\omega$ ) je efektivno polje sedaj:



$$\vec{H}_{eff} = \vec{H}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} + \vec{H}_1. \quad \dots (27)$$

V resonanci ( $\omega = \omega_0$ ) je fiktivno polje ( $\frac{\vec{\omega}}{\gamma}$ ) ravno nasprotno enako. 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 (26) 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  $\Phi$ :

$$\Phi = \gamma H_1 t_p \quad (\text{v radianih}) \quad \dots (28)$$

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

## 7 Radiofrekvenčni pulz in signal proste precesije

Pulz vzbujevalnega rf polja mora zadoščati naslednjim pogojem:

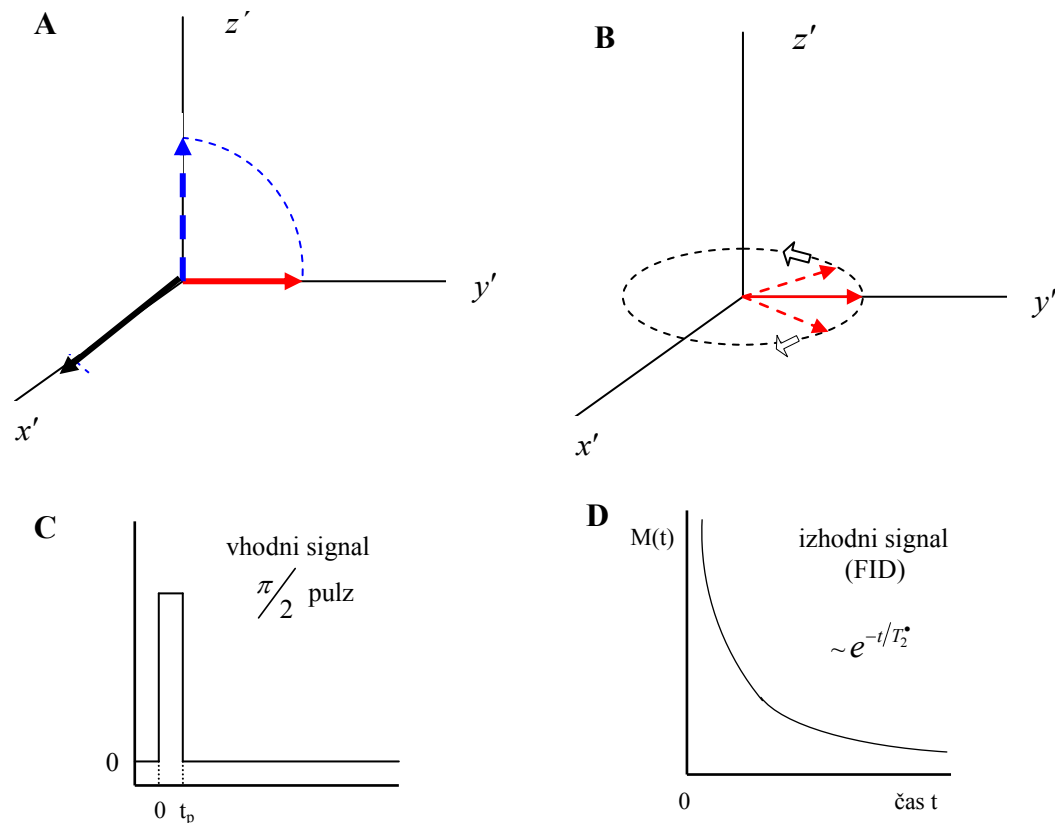
- dovolj velika intenziteta sevanja za vzbujanje vseh absorbirajočih jeder,
- trajanje pulza mora biti zelo kratko, mnogo krajše od  $T_1$  in  $T_2$  tako, da se izognemo poteku relaksacijskih procesov v času trajanja rf pulza.

Če vključimo rf polje  $\vec{H}_1$  resonančne frekvence  $\vec{\omega}_0$  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  $\vec{\omega}_0$  v ravnini  $xy$  laboratorijskega sistema (prav zato se v tuljavici inducira napetost). Inducirani napetostni signal imenujemo upad signala 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 ( $\Delta H_0$ ), magnetizacija  $M_{xy}$  upada eksponencialno s časovno konstanto  $T_2^*$  proti ravnovesni vrednosti 0. Na enak način upada tudi napetostni signal  $U(t)$  proste precesije v tuljavici:

$$U(t) \propto M_{xy}(t) = M_0 e^{-t/T_2^*}. \quad \dots (29)$$

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



**Slika 49.** **A:** Radiofrekvenčni (rf) pulz  $\pi/2$  polja  $\vec{H}_1$  vzdolž osi  $x'$ . **B:** Upad  $\vec{M}$  zaradi spin-spin ske relaksacije in nehomogenosti magnetnega polja  $\Delta H_0$  eksponentno s časovno konstanto  $T_2^*$ . **C:** Oblika radiofrekvenčnega (rf) pulza  $\pi/2$  polja  $\vec{H}_1$  vzdolž osi  $x'$ . **D:** Časovni potek izhodnega upada signala proste precesije (FID) (Farrar in Becker; 1971).

## 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  $\Delta H_0$ . Metoda, ki jo je predložil E.L. Hahn (1950), sestoji iz zaporedja pulzov:  $\pi/2 - \tau - \pi$  in merjenja amplitude spinskih odmevov v času  $2\tau$  ( $\tau$  je časovni razmik med pulzoma  $\pi/2$  in  $\pi$ ). S pulzom  $\pi/2$  vzdolž osi  $x'$  zasučemo magnetizacijo za kot  $90^\circ$  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  $\Delta H_0$ ), kar

opazujemo kot upad signala proste precesije (FID). Po času  $\tau$  vključimo še pulz  $\pi$ . Le-ta zasuče pahljačo spinov za kot  $180^\circ$  iz smeri  $+y'$  v smer  $-y'$ . Ker se smer precesije spinov ohranja, se pahljačasto razpršeni spini po pulzu  $\pi$  začnejo ponovno zbirati. To zaznamo kot jačanje napetosti v rf tuljavici.

V času  $2\tau$  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  $\pi$  imenujemo spinski odmev. Zaradi ireverzibilne spin-spinske relaksacije se amplituda spinskega odmeva z večanjem intervala  $2\tau$  manjša eksponencialno s časovno konstanto  $T_2$ :

$$A(2\tau) \propto e^{-2\tau/T_2}. \quad \dots (30)$$

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 vpliva difuzije je amplituda spinskega odmeva podana z izrazom:

$$A(2\tau) \propto e^{-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{2}{3}\gamma^2 \cdot G^2 \cdot D \cdot \tau^3}, \quad \dots (31)$$

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

## 9 Carr-Purcellova pulzna metoda merjenja $T_2$

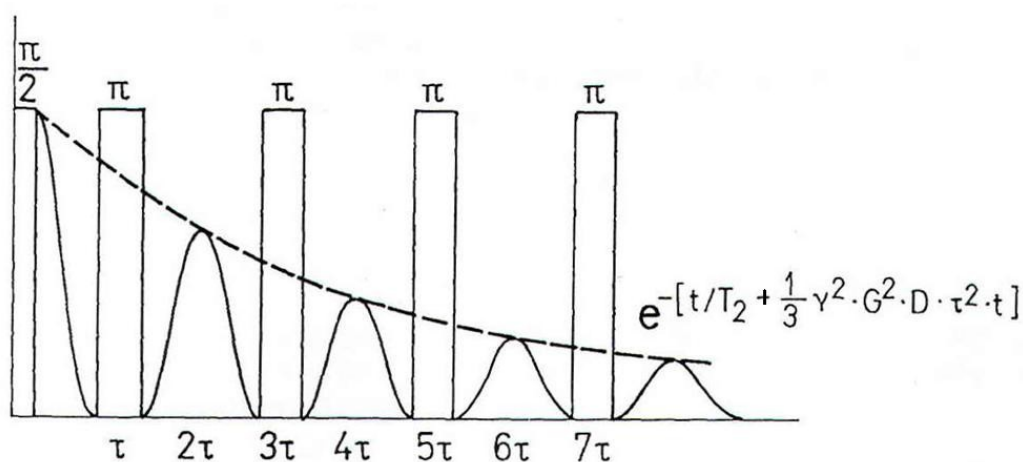
Vpliv difuzije je zaradi faktorja  $\tau^3$  zelo povečan pri daljših  $\tau$ . Temu se izognemo z uporabo Carr-Purcellove tehnike. Predstavlja modifikacijo prej opisane Hahnove metode spinskega odmeva. Pulzna sekvenca Carr-Purcellove metode je:  $\pi/2 - \tau - \pi - 2\tau - \pi \dots$ . Vsi rf pulzi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

$$A(t) \propto e^{-\frac{t}{T_2} - \frac{1}{3}\gamma^2 \cdot G^2 \cdot D \cdot \tau^2 \cdot t}. \quad \dots (32)$$

Z izbiro dovolj kratke vrednosti  $\tau$  postane drugi (difuzijski) člen v eksponentu izraza (32) 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  $\pi$  vključeni vzdolž  $y'$  osi in ne vzdolž  $x'$  (torej so fazno premaknjeni za  $90^\circ$  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.

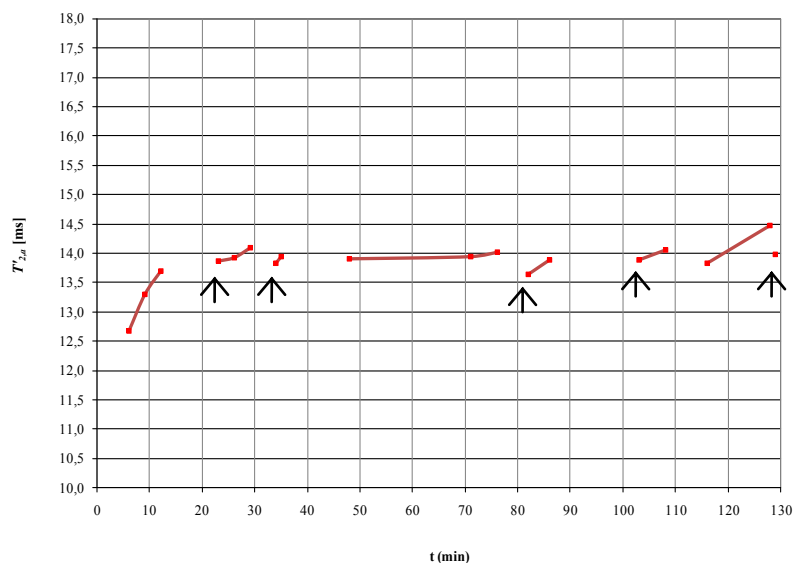


**Slika 50.** Opazovani signal časovnega poteka transverzalne magnetizacije v CPMG metodi. Z izbiro dovolj kratkega časa  $\tau$  lahko postane difuzijski (drugi) člen v eksponentu časovne funkcije, ki opisuje ovojnico spinskih odmevov, poljubno majhen, kar nam omogoča določitev prave velikosti transverzalnega relaksacijskega časa  $T_2$  (Gadian, 1982).

**PRILOGA 2.** Velikosti  $\Delta\tau_{exch}$ ,  $\Delta V_{in}/V_{out}$ ,  $\Delta V_{eritrocit}$  in  $\Delta pA$  za zunajcelično paramagnetno označene vzorce z 20 % hematokritom in 1 mM HgCl<sub>2</sub>\*.

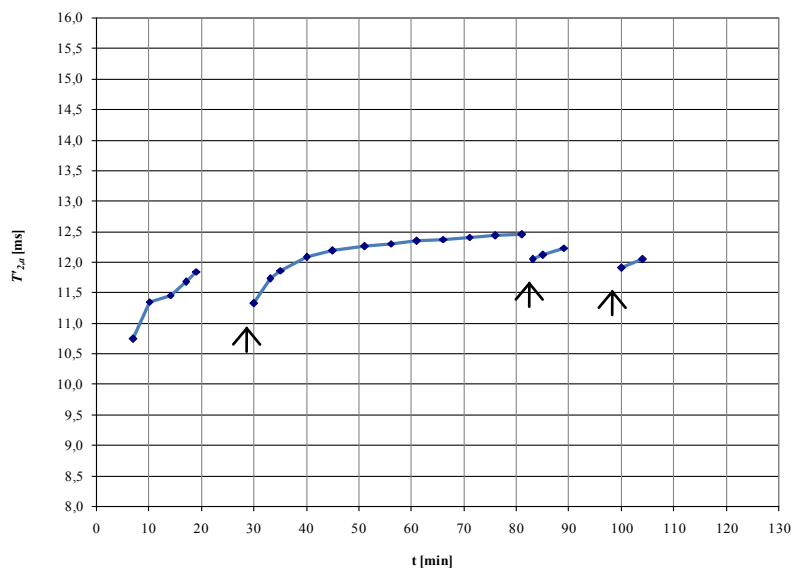
vzorec A					vzorec B				
t [min]	$\Delta\tau_{exch}$ [%]	$\Delta V_{in}/V_{out}$ [%]	$\Delta V_{eritrocit}$ [%]	$\Delta pA$ [%]	t [min]	$\Delta\tau_{exch}$ [%]	$\Delta V_{in}/V_{out}$ [%]	$\Delta V_{eritrocit}$ [%]	$\Delta pA$ [%]
10	93.4	90.8*	93.6	98.0	8	90.3*	89.3*	92.5	99.6
13	86.9*	80.7*	86.5	93.7	11	82.9*	83.8*	88.6	101.6
16	80.3*	70.5*	79.4	88.7	14	82.7*	79.9*	85.9	97.1
20	74.1*	62.6*	73.8	85.2	17	78.6*	68.8*	78.2	88.0
30	58.3*	49.3*	64.5	85.3	23	71.2*	59.1*	71.3	83.5
34	56.6*	45.6*	61.8	81.0	27	68.0*	52.7*	66.9	77.7
37	54.5*	43.3*	60.3	80.2	31	66.2*	49.1*	64.4	74.7
47	47.6*	38.8*	57.1	82.1	35	63.6*	46.3*	62.4	73.3
54	44.8*	36.6*	55.6	82.4	38	62.1*	43.9*	60.7	71.2
62	42.0*	35.5*	54.9	85.4	47	59.5*	39.5*	57.6	66.7
66	41.1*	34.2*	53.9	84.0	50	59.0*	38.3*	56.8	65.3
73	39.2*	33.0*	53.1	84.9	60	57.1*	34.6*	54.2	61.0
79	38.9*	31.7*	52.2	82.2	63	57.3*	33.4*	53.4	58.6
94	37.1*	27.9*	49.5	75.9	93	57.7*	25.2*	47.6	43.9
105	36.6*	25.6*	48.0	70.7	115	67.1*	13.1*	39.1	22.8
117	36.0*	17.3*	42.1	48.5					
$\tau_{exch} = 14.0 \pm 0.2$ ; $V_{in}/V_{out} = 0.19 \pm 0.002$					$\tau_{exch} = 14.6 \pm 0.2$ ; $V_{in}/V_{out} = 0.18 \pm 0.001$				
vzorec C					vzorec D				
t [min]	$\Delta\tau_{exch}$ [%]	$\Delta V_{in}/V_{out}$ [%]	$\Delta V_{eritrocit}$ [%]	$\Delta pA$ [%]	t [min]	$\Delta\tau_{exch}$ [%]	$\Delta V_{in}/V_{out}$ [%]	$\Delta V_{eritrocit}$ [%]	$\Delta pA$ [%]
9	96.9	88.9*	92.2	91.8	8	95.5	85.6*	89.9	97.2
13	89.2*	80.8*	86.6	90.6	12	94.8	78.6*	85.1	95.0
17	83.9*	73.4*	81.4	87.5	16	92.8*	74.9*	82.5	95.8
20	80.2*	65.9*	76.1	82.1	22	91.2*	69.4*	78.6	96.7
26	73.0*	55.0*	68.6	75.5	34	80.8*	60.1*	72.1	101.1
32	68.6*	47.1*	63.0	68.7	37	79.7*	57.6*	70.4	97.8
37	66.9*	41.4*	59.0	61.9	42	75.7*	54.7*	68.3	95.9
45	64.5*	36.0*	55.3	55.9	47	73.9*	51.9*	66.4	96.3
54	64.1*	31.2*	51.9	48.8	50	68.0*	49.8*	64.9	93.4
59	63.5*	29.1*	50.4	45.8	60	62.3*	45.1*	61.6	89.5
68	60.4*	27.3*	49.1	45.3	64	47.4*	43.4*	60.4	86.3
79	57.5*	22.1*	45.5	38.5	79	47.9*	36.9*	55.9	76.5
92	57.8*	17.8*	42.5	31.0	119	47.8*	21.2*	44.8	43.3
118	58.7*	9.2*	36.5	15.7					
$\tau_{exch} = 14.3 \pm 0.2$ ; $V_{in}/V_{out} = 0.17 \pm 0.001$					$\tau_{exch} = 15.1 \pm 0.1$ ; $V_{in}/V_{out} = 0.19 \pm 0.02$				

\*  $\Delta\tau_{exch}$  in  $\Delta V_{in}/V_{out}$  sta izračunana deleža parametrov glede na kontrolno vrednost.  $\Delta V_{eritrocit}$  je izračunan delež volumna eritrocita glede na kontrolo (ob predpostavki, da 70 % volumna eritrocita predstavlja voda), če ne upoštevamo hemolize. Sprememba parametra A ( $\Delta pA$ ) je izračunan hipotetični upad difuzijske vodne permeabilnosti (enačba (11) v poglavju 3.2.1 v diplomskem delu), če ne upoštevamo hemolize. Z \* so označeni rezultati  $\Delta\tau_{exch}$  in  $\Delta V_{in}/V_{out}$ , ki se statistično pomembno razlikujejo od kontrole,  $p < 0.05$  (studentov t-test) (glej razlago v poglavju 4.1 v diplomskem delu). Ustrezna kontrolna vrednost  $\tau_{exch}$  in  $V_{in}/V_{out}$  je predstavljena kot aritmetična sredina  $\pm$  standardna napaka ocene aritmetične sredine pod vsako tabelo. Neodvisne meritve so označene s črko, ki označuje dan poskusa.



**PRILOGA 3.** Prikaz izmerjenega  $T'_{2,a}$  na vzorcu z 20 % hematokritom in 0.25 mM NNP\*.

\* Puščice prikazujejo čas pretresanja vzorca.



**PRILOGA 4.** Prikaz izmerjenega  $T'_{2,a}$  na vzorcu z 20 % hematokritom in 0.1 mM NNP\*.

\* Puščice prikazujejo čas pretresanja vzorca.

Namen prikaza časovno odvisnih meritev  $T'_{2,a}$  transverzalnega relaksacijskega časa protonov znotrajcelične vode z metodo NMR v zunajcelično paramagnetno označenih vzorcih z 20 % hematokritom in dodanim NNP je prikaz efekta stresanja. Izbrani sta dve poljubni koncentraciji NNP. Ti vzorci niso bili stresani pred vsako meritvijo, ampak samo nekajkrat, čas stresanja je označen s puščico.