УДК 57.085.2.043:612.111

ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ І БАРАНА ДО ГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ ЗАЛЕЖНО ВІД ТЕМПЕРАТУРИ, pH СЕРЕДОВИЩА ТА ПРИСУТНОСТІ АЛКАНОЛІВ

[1]С. В. Меліхова, [1]О. Є. Ніпот, [2]Д. І. Александрова, [1]В. В. Черепанов

[1]Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
[2]Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна

Встановлено, що еритроцити барана більш чутливі до змін температури і менш чутливі до змін pH середовища при дії такого стресового чинника як гіпертонічний шок, ніж еритроцити людини, що зумовлено різним білковим і фосфоліпідним складом мембран еритроцитів людини і барана. Показано, що бутанол, на відміну від гексанолу, захищає еритроцити барана та людини в умовах гіпертонічного шоку. Захисний ефект бутанолу по відношенню до еритроцитів барана не залежить від pH середовища, а по відношенню до еритроцитів людини спостерігається при нефізіологічних значеннях pH

Ключові слова: ЕРИТРОЦИТ, МЕМБРАНА, pH СЕРЕДОВИЩА, ГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК, БУТАНОЛ, ГЕКСАНОЛ.

Важливим напрямком досліджень у сучасній біологічній науці є вивчення чутливості клітин людини і тварин до стресових факторів у різних умовах навколишнього середовища. Модифікація мембранної структури клітин різними хімічними сполуками та зміна умов навколишнього середовища викликають зміну чутливості клітин до дії стресових факторів, зокрема до осмотичного навантаження [1–4]. Так, добре відомий захисний вплив амфіфільних сполук та алканолів на еритроцити людини в умовах, коли змінюються температурні та осмотичні параметри середовища [1, 2]. Особливий інтерес становить вивчення реакції клітин на стресові чинники з використанням еритроцитів різних видів, зокрема порівняння еритроцитів людини і барана, що відрізняються за білковим і фосфоліпідним складом [5, 6]. Різниці у вмісті білків і в співвідношенні окремих фосфоліпідів між бішарами мембран еритроцитів визначають фізичні властивості клітин, і, як наслідок, реакцію на стресові чинники, при різних умовах навколишнього середовища та при впливі модифікаторів, що змінюють характеристики мембрани клітин.

Матеріали і методи

Еритроцити одержували зі свіжоконсервованої крові, заготовленої на глюгіцировому консерванті. Після видалення плазми эритроцити тричі відмивали шляхом центрифугування при 1500 g протягом 3 хв. в 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 Моль/л хлорид натрію, 0,01 Моль/л трис-буфер, pH 7,4). Лейкоцити і супернатант видаляли методом аспірації. Осад еритроцитів містив у середньому 80 % клітин. Еритроцити у вигляді щільного осаду зберігали при 4 ^{o}C і використовували в дослідженнях протягом 4 години.

Гіпертонічний шок моделювали таким чином. Аліквоту суспензії еритроцитів (40 % гематокрит) переносили в гіпертонічний розчин NaCl (4,00 Моль/л), що містить бутанол у концентраціях 0–125 ммоль або гексанол у концентраціях 0–0,15 ммоль, що мають різні значення pH (5,5; 7,4; 9,0). Клітини інкубували 10 хв. при 37 ^{o}C або 0 ^{o}C, потім центрифугували протягом 3 хв. При 3000g. Вміст гемоглобіну, що вийшов у суперфосфат, визначали спектрофотометричним методом.

Отримані результати опрацьовували статистично методом Стьюдента-Фішера.

Результати й обговорення

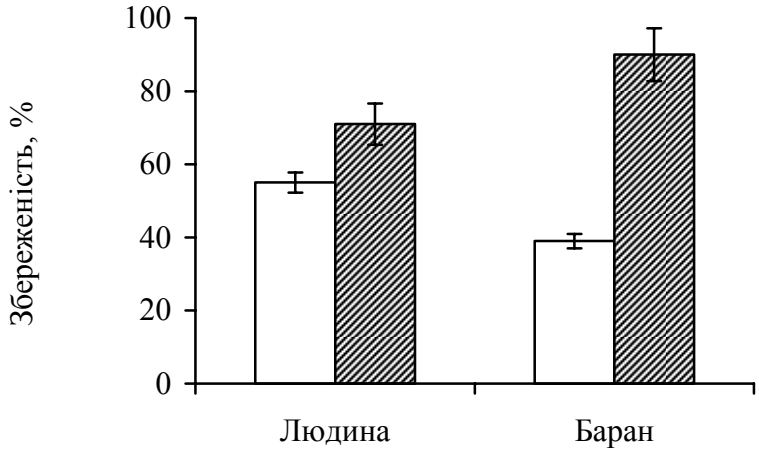

Рис.1. Збереженість еритроцитів людини і барана при гіпертонічному шоку при температурах 0 °С — ▨ і 37 °С — □

На рис. 1 показана залежність збереженності еритроцитів людини і барана в умовах гіпертонічного шоку при температурах 0 °С і 37 °С. Видно, що чутливість еритроцитів обох видів, до гіпертонічного шоку, значно вище при температурі 37 °С, ніж при температурі 0 °С. Слід зазначити, що залежність збереженності еритроцитів барана від температури середовища інкубації, в умовах гіпертонічного шоку, більш виражена, ніж еритроцитів людини. Збереження еритроцитів барана після інкубації в 4,0 М гіпертонічному розчині NaCl при температурі 0 °С складає 90 %, що перевищує збереження еритроцитів людини у тих же умовах. При цьому збереження еритроцитів барана в 4,0 М гіпертонічному розчині NaCl при температурі 37 °С менше ніж еритроцитів людини у тих же умовах. Таким чином, еритроцити барана набагато чутливіші до температурних умов під час такої стресової дії як гіпертонічний шок, ніж еритроцити людини. Це може бути пов’язано з різним фосфоліпідним складом мембран еритроцитів барана і людини. Відомо, що особливістю еритроцитів жуйних тварин є відсутність у мембрані їх клітин фосфатидилхоліну і велика кількість фосфатидилсеріну, сфінгомієліну і фосфатидилінозитолу [6]. Разом з цим, відомо, що якщо мембрана переважно складається з насичених фосфоліпідів, таких як сфінгомієлін, фосфатидилінозитол, фосфатидилсерін, то це приводить до формування більш впорядкованих доменів, стан яких при різних температурних і осмотичних умовах відрізнятиметься від стану менш впорядкованих доменів, що складаються з ненасичених фосфоліпідів, таких як фосфатидидилхолін [7, 8]. Існування впорядкованих доменів фосфоліпідів приводить до формування різнорідних за щільностю ділянок у мембрані, особливо при температурі 37 °С, коли збільшується рухомість мембранних фосфоліпідів, що збільшує вірогідність виникнення її пошкодження при осмотичному навантаженні. З іншого боку, наявність впорядкованих доменів, у які включені деякі мембранні білки, може сприяти збереженню зв’язків мембрана-цитоскелет, порушення яких є однією з причин виникнення пошкодження мембран в умовах гіпертонічного шоку при температурі 0 °С [4]. Слід також відзначити, що проникність мембрани еритроцитів для води при температурі 37 °С у людини майже в 2 рази більша, ніж у барана [9]. Це може визначати більший показник збереження еритроцитів людини в умовах гіпертонічного шоку при температурі 37 °С в порівнянні з еритроцитами барана, оскільки швидший відтік води з клітини в гіпертонічному середовищі зменшує осмотичне навантаження на мембрану, а отже і вірогідність її пошкодження.

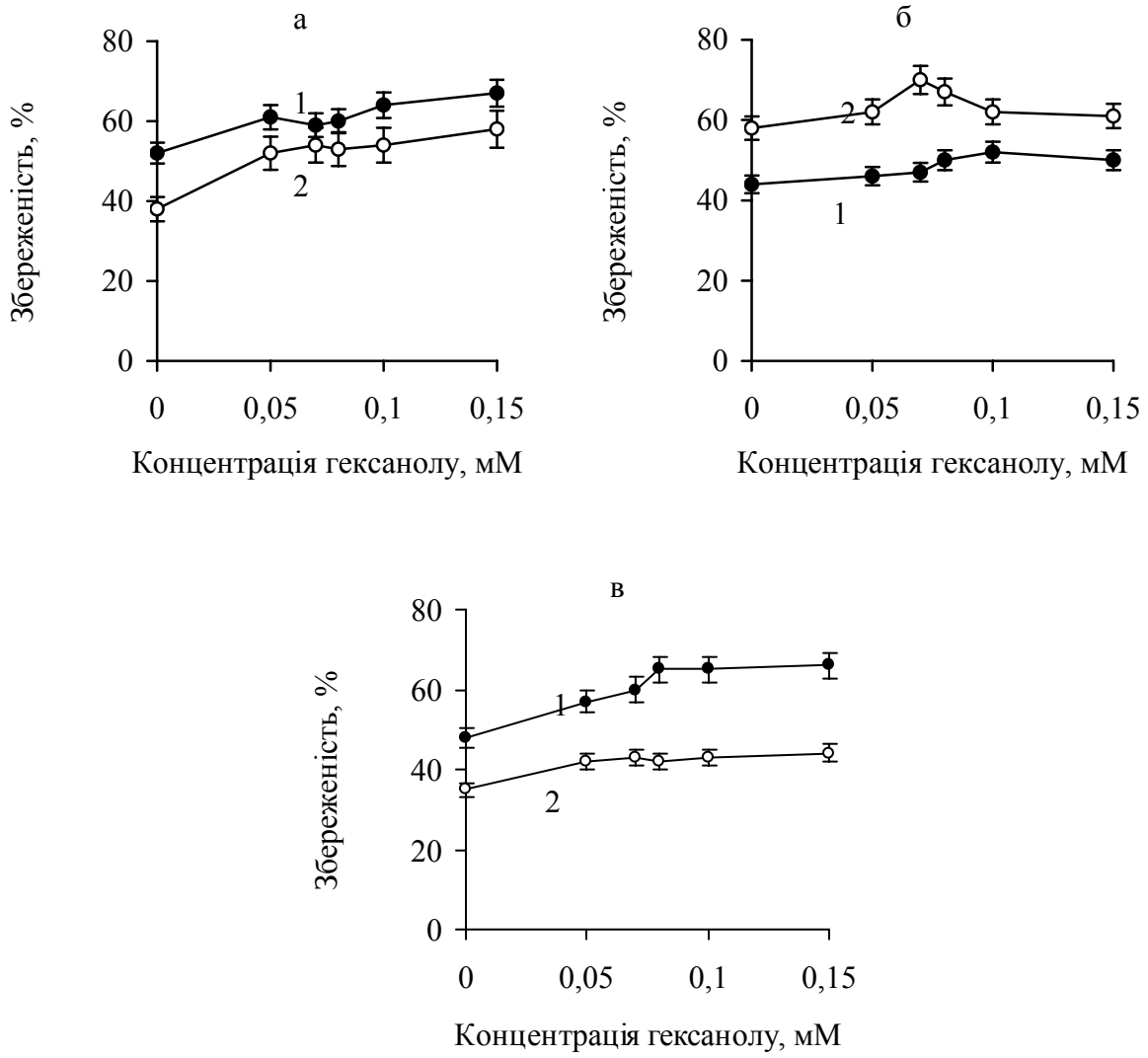

Рис.2. Збереженість еритроцитів людини і барана від концентрації бутанолу в гіпертонічному середовищі (4 М NaCl) при різних значеннях pH (а — pH 5,5; б — pH 7,4; в — pH 9,0). 1 — еритроцити барана; 2 — еритроцити людини

На рис. 2 показана залежність збереження еритроцитів барана і людини в умовах гіпертонічного шоку від концентрації бутанолу в гіпертонічному середовищі при різних значеннях pH. З наведених даних видно, що при підвищенні концентрації бутанолу збереження клітин спочатку збільшується, а після досягнення певної концентрації спирту різко знижується, що зумовлено гемолізом частини клітин під впливом великих концентрацій алканолу. Слід зазначити, що літична концентрація бутанолу для еритроцитів барана не залежить від pH середовища (рис. 2 (а, б, в), криві 1) і складає приблизно 60 мМ, тоді як літична концентрація бутанолу для еритроцитів людини при pH 9 складає 75 мМ і збільшується при зміні pH в кислу сторону. Нижче значення літичної концентрації бутанолу для еритроцитів барана можна пояснити, як вже згадувалося раніше, існуванням у мембранах жуйних тварин впорядкованих доменів, що складаються з насичених фосфоліпідів і пов'язаних з ними білків. Відомо, що ділянки мембрани, які містять ці домени, менш доступні для вбудовування детергентів [7, 8], а отже, можливо, і спиртів. Як наслідок, частина мембрани, доступна для зв'язування бутанолу, в еритроцитах барана менша, локальна концентрація спирту збільшується, що полегшує формування порушення і веде до зменшення літичної концентрації. В еритроцитах людини переважають ненасичені фосфоліпіди, які не формують впорядковані домени, і молекули спирту розподіляються в мембрані рівномірно. Відомо, що зв'язування спирту з мембраною еритроцитів людини

залежить від pH середовища [10]. Зростання pH полегшує вбудовування спиртів у мембрану еритроцитів людини. Вірогідно, цим можна пояснити зниження літичної концентрації бутанолу при збільшенні значення pH. Оскільки, у випадку еритроцитів барана, не спостерігається залежність літичної концентрації від цього фактора, то можна допустити, що pH середовища не впливає на зв'язування бутанолу з мембраною еритроцитів барана.

Як видно з рис. 2 (а, б, в), криві 1) захисний ефект бутанолу у відношенні до еритроцитів барана виражений однаково при будь-якому досліджуваному значенні pH середовища. При цьому збереженість еритроцитів збільшується вдвоє. Для еритроцитів людини захисний ефект бутанола знаходиться на тому ж рівні, що й для еритроцитів барана і вираженіший при нефізіологічних значеннях pH (рис. 2 (а, б, в), криві 2), що пов'язано, з початково більшою збереженністю еритроцитів при фізіологічному значенні pH 7,4, а також, можливо, з додатковим захисним ефектом бутанолу при нефізіологічних значеннях pH у відношенні до мембрани і цитоскелета. Відомо, що бутанол має високу проникну здатність у мембрани еритроцитів [11, 2, 13] і, таким чином, може стабілізувати гідратні оболонки білків цитозолю шляхом утворення з ними водневих зв'язків. Виходячи з цього, можна припустити, що захисний ефект бутанолу в умовах гіпертонічного шоку проявляється за рахунок стабілізуючого впливу на внутрішні структури клітини.

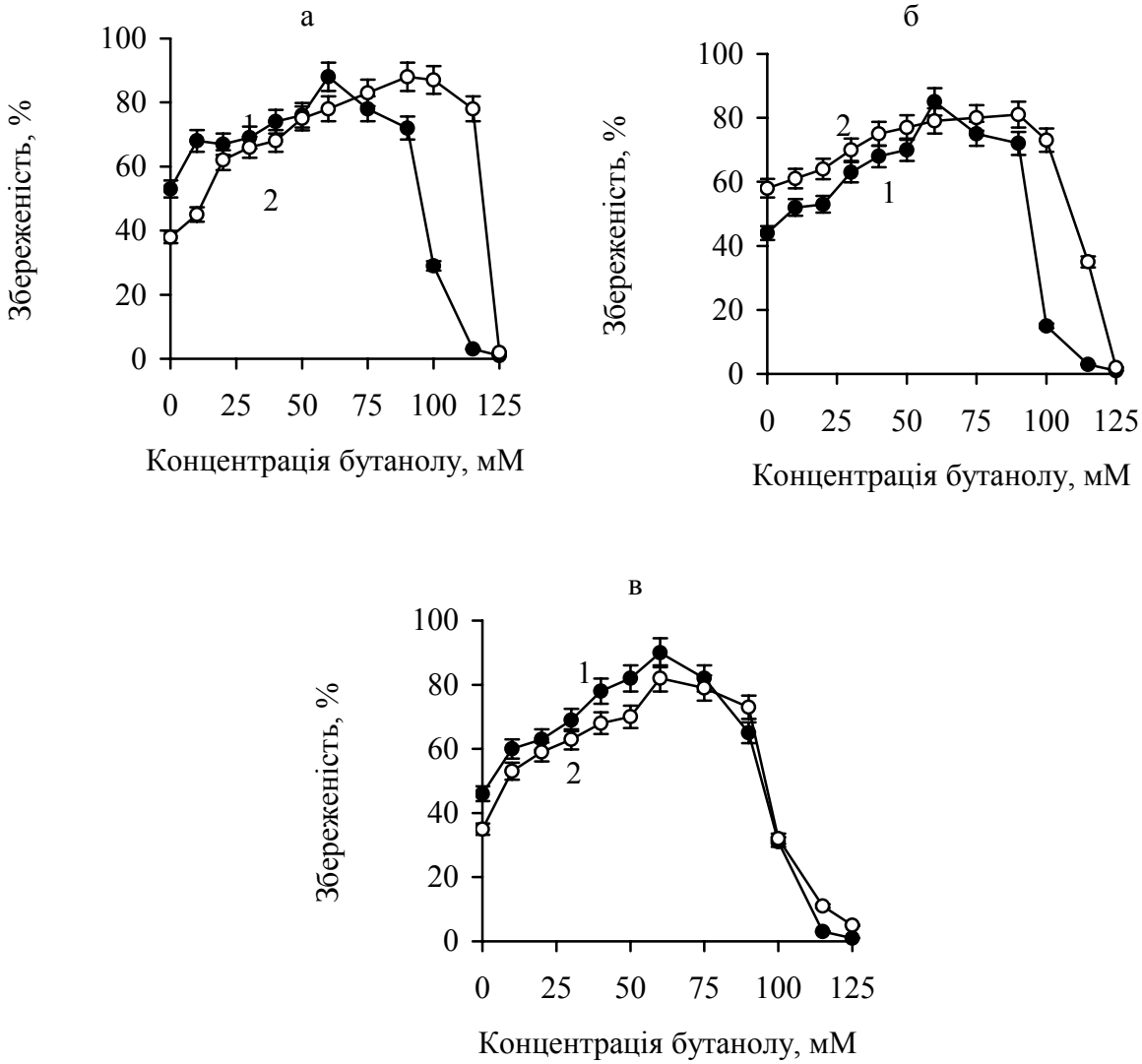

Рис.3. Збереженість еритроцитів людини і барана від концентрації гексанолу в гіпертонічному середовищі (4 M NaCl) при різних значеннях pH (а — pH 5,5; б — pH 7,4; в — pH 9,0). 1 — еритроцити барана; 2 — еритроцити людини.

Висновки

1. Збереженість еритроцитів барана в умовах гіпертонічного шоку вища ніж еритроцитів людини при температурі 0 °С, і нижче — при температурі 37 °С. Загалом, еритроцити барана чутливіші до зміни температурних умов при дії стресових чинників середовища, ніж еритроцити людини.

2. Захисний ефект бутанола в умовах гіпертонічного шоку у відношенні до еритроцитів барана виражений однаково при різних значеннях pH середовища, по відношенню до еритроцитів людини захисний ефект бутанола виявлений при нефізіологічних значеннях pH.

3. Гексанол не має захисного ефекту у відношенні до еритроцитів барана і людини в умовах гіпертонічного шоку.

4. Збереженість еритроцитів барана в умовах гіпертонічного шоку суттєво не змінюється при різних значеннях pH, тоді як збереження еритроцитів людини, при нефізіологічних значеннях pH зменшується.

[1]S. V. Melichova, [1]E. E. Nipot, [2]D. I. Aleksandrova, [1]V. V. Cherepanov

SENSITIVITY OF ERYTHROCYTES OF MAN AND SHEEP IN THE CONDITIONS OF HYPERTONIC SHOCK AT THE DIFFERENT VALUES OF TEMPERATURE, PH AND AT PRESENCE ALCANOLS

S u m m a r y

It is set that safety of erythrocytes of sheep in the conditions of hypertonic shock higher than safety of red erythrocytes of man at 0 °C, and below — at 37 °C. Thus the erythrocytes of sheep are more sensible to temperature to the terms during such stressing influence as hypertonic shock, by what erythrocytes of man. It can be related to different phospholipid composition of membranes of sheep and man.. It is show that the protective effect of butanol in relation to the erythrocytes of sheep is expressed identically at any explored value of pH environment; here safety of erythrocytes is increased from 40 % to 90 %. For the erythrocytes of man the protective effect of butanol is at that level and more expressed at the unphysiological values of pH. It is assumed that for both types of erythrocytes the protective effect of butanol at hypertonic shock probably can be related to protective influence on the proteins of cytoskeleton. In presence hexanol safety of erythrocytes of both kinds either is insignificantly increased or does not change. Absence of protective effect at hexanol in the conditions of hypertonic shock it is possible caused penetrating into a cell far slower, than butanol. Its co-operation with a cell is localized in the beginning at the level of membrane, that at hypertonic shock can not sufficient protective for a cell. At comparison of level of safety of cells in the conditions of hypertonic shock at the different values of pH it in absence of alconols, that safety of erythrocytes of sheep differs insignificantly at the different values of pH, while safety of red erythrocytes of man changes more considerably, diminishing at the unphysiological values of pH. It is explained by different proteins composition of membranes of man and sheep, and also possibly, by greater protected of proteins in the membrane of red erythrocytes of sheep, caused by the presence of ordered phospholipid structures.

[1]Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

[2]Kharkov National University named byV. N. Karazin, Kharkov

1. *Дунаевская О. Н., Панталер Е. Р., Шпакова Н. М., Бондаренко В. А.* Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовому и гиперосмотическому воздействию при использовании катионных амфипатов // Проблемы криобиологии. — 1995. — № 1. — С. 21–27.

2. *Абу-Аль Асаль Ф., Мелихова С. В., Бондаренко В. А.* Модифицирующее влияние амфипатических соединений на чувствительность эритроцитов к изменению осмотических и температурных условий среды. // Проблемы криобиологии. — 2003. — № 1 — С. 52–61.

3. *Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бабийчук Л. А., Бондаренко Т. П.* Единый механизм повреждения клеток при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология. — 1985. — № 2. — С.25–32.

4. *Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Руденко С. В.* Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток // Проблемы криобиологии. — 1992. — № 4. — С.14–26.

5. *Matei H., Frentescu L., Benga Gh.* Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. // J. Cell. Mol. Med. — 2000. — V. 4, № 4. — P. 270–276.

6. Phospholipid composition of erythrocyte membranes and plasma of mammalian blood including Australian marsupials; quantitative ^{31}P NMR analysis using detergent / Nouri-Sorkhabi M. H., Agar N. S., Sullivan D. R., et all. // Comp. Biochem. Physiol. — 1996. — V. 113B, № 2. — P.221 – 227.

7. *Simons K., Ikonen E.* Functional rafts in cell membranes // Nature. — 1997. — V. 387, № 6. — P. 569–572.

8. *Simons K., Vaz L. C.* Model sistems,lipid rafts, and cell membranes // Annu. Rev. Biophys. Struct. — 2004. — № 33 — P. 269–295.

9. *Benga G., Borza T.* Diffusional water permeability of mammalian red blood cells // Comp.Biochem.Physiol. — 1995. — V. 112B, № 4 — P. 653–659.

10. *Brahm J.* Permeability of human red cells to a homologous series of aliphatic alcohols. // J. Gen. Physiol. — 1983. — № 81. — P. 283–304.

11. *Schwichtenhovel C., Deuticke B., Haest C. W.* Alcohols produce reversible and irreversible acceleration of phospholipid flip-flop in the human erythrocyte membrane. // Biochim Biophys Acta. — 1992. — V.1111, № 1. — P. 3–-44.

12. *Forman S. A., Verkman A. S., Dix J. A., Solomon A. K.* n-Alkanols and halothane inhibit red cell anion transport and increase band 3 conformational change rate. // Biochemistry. — 1985. — № 24. — P. 4859–4866.

13. *Toon M. R., Solomon A. K.* Transport parameters in the human red cell membrane: solute-membrane interactions of hydrophilic alcohols and their effect on permeation. // Biochim Biophys Acta. — 1990. — V.1022, № 1. — P. 57–71.

14. *Vamaguchi T., Koga M., Pujita V., Kimoto E.* Effects of pH on membrane fluidity of human erythrocytes// J. Biochem. — 1982. — V. 91, № 4. — P. 513–518.