

Н. М. Шпакова, Е. Е. Нипот, Н. В. Орлова, Д. И. Александрова,
О. А. Шапкина

Осмотическая чувствительность эритроцитов млекопитающих после их истощения по АТФ

(Представлено академиком НАН Украины А. Н. Гольцевым)

Показано, что истощение эритроцитов человека и животных по АТФ приводит к изменению их чувствительности к гипертоническому и гипотоническому шоку, при этом реакция клеток не зависит от вида стрессового воздействия. В условиях гипотонического и гипертонического шока уровень гемолитического повреждения эритроцитов человека снижается, а животных — повышается.

АТФ является основным энергетическим источником в эритроцитах млекопитающих. Содержание АТФ определяет степень фосфорилирования мембранных белков и липидов [1]. Снижение концентрации АТФ в эритроцитах сопровождается изменением их вязко-эластичных свойств, что, в свою очередь, приводит к нарушению микроциркуляции и уменьшению времени жизни эритроцита в кровеносном русле [2, 3]. Динамическое состояние липидного бислоя, цитозольной белковой сети, функционирование ряда ферментных и транспортных систем зависят от энергетического статуса клетки [1, 4, 5].

Значение АТФ в обеспечении жизненно важных клеточных процессов хорошо известно, однако его роль в сохранении целостности эритроцитов остается не совсем ясной. Работы по исследованию устойчивости клеток с измененным энергетическим состоянием к действию стрессовых факторов немногочисленны и в основном выполнены на эритроцитах человека. Эритроциты животных, мембраны которых различаются по белково-липидному составу [6, 7], практически не изучены в этом отношении.

Цель исследования — изучить влияние истощения по АТФ эритроцитов человека, быка и лошади на их чувствительность к гипотоническому и гипертоническому шоку.

Материалы и методы. Эритроциты получали из донорской крови человека, быка и лошади, заготовленной на консерванте “Глюгицир” по методу [8]. Эритромассу в виде плотного осадка хранили не более 2 ч при 0 °С.

Истощение клеток по АТФ проводили по методу [5]. Эритроциты инкубировали с 2-дезоксиглюкозой (10 мМ) в течение 2 ч при 37 °С. Контролем служили клетки, проинкубированные в течение 2 ч при 37 °С без добавления 2-дезоксиглюкозы. Затем клетки отмывали физиологическим раствором.

Регистрацию динамики гипотонического гемолиза эритроцитов проводили на установке для измерения светорассеяния клеточных суспензий при комнатной температуре (22 °С). Уровень гемолиза эритроцитов определяли путем регистрации изменения оптической плотности суспензии эритроцитов (длина волны 720 нм). Концентрация суспензии эритроцитов в кювете составляла $(3 \div 3,5) \cdot 10^6$ кл./мл.

Гипертонический шок эритроцитов млекопитающих осуществляли перенесением клеток в раствор, содержащий 4,0 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4 при 22 °С

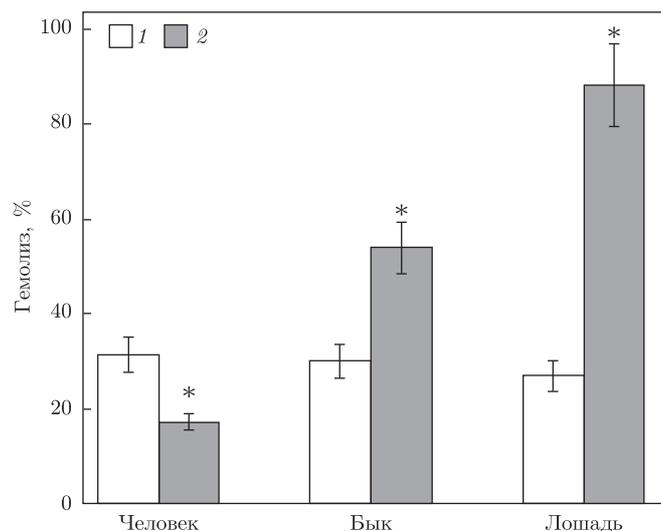


Рис. 1. Уровень гемолиза контрольных (1) и истощенных по АТФ (2) эритроцитов млекопитающих в гипотонической солевой среде (NaCl).

* — различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$

на 5 мин. Гематокрит 0,4%. Содержание гемоглобина, который вышел в супернатант, определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм.

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью компьютерной программы ANOVA и критерия Манна-Уитни (StatgraphWin). Каждый эксперимент повторяли не менее шести раз в двух параллельных пробах. Полученные результаты считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 приведены величины гипотонического гемолиза контрольных и истощенных по АТФ эритроцитов человека, быка и лошади. Концентрация NaCl в среде была подобрана таким образом, чтобы уровень гемолиза контрольных клеток млекопитающих составлял примерно 30%: для эритроцитов человека — 75–80 мМ, быка — 100–110 мМ, лошади — 80–85 мМ. Таким образом, наибольшей чувствительностью к гипотонической среде характеризуются эритроциты быка, наименьшей — клетки человека.

После истощения эритроцитов человека по АТФ уровень их гипотонического гемолиза снижается. Для эритроцитов быка и лошади наблюдается противоположная реакция: уровень гипотонического гемолиза этих клеток после энергетического истощения выше, чем при физиологическом значении АТФ. Причем для эритроцитов быка гипотонический гемолиз увеличивается примерно в 2, а для эритроцитов лошади — в 3 раза.

При перенесении эритроцитов млекопитающих в среду, содержащую 4,0 М NaCl, клетки гемолизируют в разной степени. Максимальный гипертонический гемолиз наблюдается для эритроцитов человека (80%), в то время как гипертоническое повреждение эритроцитов быка и лошади ниже в 2 и 4 раза соответственно.

Сравнительный анализ гемолиза эритроцитов млекопитающих в условиях гипотонии и гипертонии показал, что в общем клетки, характеризующиеся высокой чувствительностью к гипертоническим условиям, менее чувствительны к гипотонической среде.

Процедура истощения эритроцитов млекопитающих по АТФ приводит к изменению их чувствительности к действию гипертонического раствора NaCl (рис. 2). Если метаболиче-

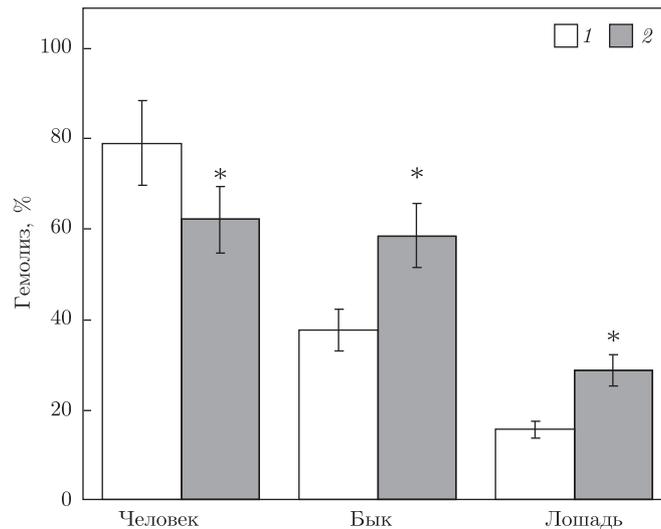


Рис. 2. Уровень гемолиза контрольных (1) и истощенных по АТФ (2) эритроцитов млекопитающих в гипертонической солевой среде (4,0 М NaCl).

* — различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$

ски истощенные эритроциты человека становятся менее чувствительными к стрессовому воздействию, то клетки животных повреждаются в большей степени.

Таким образом, реакция метаболически истощенных эритроцитов разных видов млекопитающих на резкое изменение осмотических условий среды не зависит от вида стрессового воздействия — гипотонического или гипертонического шока.

Известно, что в эритроцитах человека при физиологической концентрации АТФ липиды внешнего слоя менее подвижны, чем внутреннего, а при энергетическом истощении происходит усреднение текучести липидов в бислой и текучесть наружного слоя увеличивается [9].

Предполагается, что увеличение подвижности мембранных липидов в данном случае может быть связано с нарушением их естественной мембранной асимметрии вследствие недостаточного функционирования соответствующих переносчиков в условиях низкой концентрации АТФ. Можно предположить, что следствием подобных изменений является облегчение формирования и замыкания гемолитических пор, что будет приводить к снижению осмотической нагрузки на клетки и уменьшению уровня гипотонического гемолиза эритроцитов человека. Аналогичные процессы происходят и при увеличении температуры гипотонической среды, когда текучесть мембраны эритроцитов человека увеличивается [10]. В условиях гипертонического шока эритроцитов человека увеличение текучести мембраны в результате истощения клеток по АТФ будет облегчать ее реорганизацию в момент действия стрессового фактора и, таким образом, уменьшать повреждение клеток.

Для эритроцитов быка характерно снижение латеральной подвижности мембранных липидов при уменьшении уровня АТФ в клетке [11]. При этом процесс репарации пор, образованных при гипотоническом и гипертоническом лизисе эритроцитов, будет затруднен, что приведет к большему по сравнению с контролем повреждению клеток быка с низким содержанием АТФ.

В отличие от эритроцитов человека и быка, цитоскелет эритроцитов лошади лишен белка полосы 4.2, который отвечает за механическую прочность цитоскелет-мембранного комплекса [1]. Хотя другие компоненты цитоскелета берут на себя функцию этого бел-

ка, однако в условиях дополнительной “нагрузки” на клетки проявляется нестабильность эритроцитов лошади. Так, показано [6], что в условиях гипертонического стресса клетки лошади, обработанные фенилгидразином, повреждаются гораздо в большей степени, чем эритроциты человека и быка. Истощение эритроцитов лошади по АТФ также проявляет эту нестабильность, что отражается в повышении чувствительности клеток к гипотоническому и гипертоническому шоку (см. рис. 1, 2).

Истощение эритроцитов разных видов млекопитающих может характеризоваться разной скоростью уменьшения содержания АТФ в клетке. При одинаковых экспериментальных условиях метаболический статус эритроцитов разных видов млекопитающих может быть различным, что и определяет характер ответа эритроцитов на стрессовое воздействие.

В работе [12] рассмотрено влияние метаболического состояния эритроцитов человека на их вязкость и средний объем при продолжительном инкубировании клеток. Изменение указанных физико-химических характеристик эритроцитов человека в процессе уменьшения концентрации АТФ в клетке носит нелинейный характер. По мере снижения содержания АТФ в эритроците наблюдается первоначальное увеличение объема клетки с последующим его уменьшением ниже контрольного значения. Кроме того, показано снижение вязкости эритроцитов при частичном истощении по АТФ и последующее резкое увеличение этого параметра.

Возможно, эти и некоторые другие физико-химические параметры, характер изменений которых является нелинейным при истощении эритроцитов млекопитающих по АТФ, могут определять различную чувствительность клеток человека и животных к резкому изменению осмотических условий среды.

1. Yawata Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model. – Weinheim: Wiley-VCH, 2003. – 448 p.
2. Park Y. K., Best-Popescu C. A., Dasari R. R., Popescu G. Light scattering of human red blood cells during metabolic remodeling of the membrane // J. Biomed. Optics. – 2011. – **16**, No 1. – P. 011013-1–011013-5.
3. Betz T., Lenz M., Joanny J.-F., Sykes C. ATP-dependent mechanics of red blood cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – **106**, No 36. – P. 15320–15325.
4. Tilley L., Cribier S., Roelofsen B. et al. ATP-dependent translocation of amino phospholipids across the human erythrocyte membrane // FEBS. Lett. – 1986. – **194**, No 1. – P. 21–27.
5. Marjanovic M., Willis J. S. ATP dependence of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pump of cold sensitive and cold tolerant mammalian red blood cells // J. Physiology. – 1992. – **456**, No 1. – P. 575–590.
6. Ferlazzo A. M., Bruschetta G., Di Pietro P. et al. Phospholipid composition of plasma and erythrocyte membranes in animal species by ^{31}P NMR // Vet. Res. Commun. – 2011. – No 35. – P. 521–530.
7. Guerra-Shinohara E. M., de Barretto O. C. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species // Braz. J. Med. and Biol. Res. – 1999. – **32**, No 6. – P. 683–687.
8. Шпакова Н. М., Нупот Е. Е., Олейник О. А., Александрова Д. И. Влияние фенилгидразина на чувствительность эритроцитов млекопитающих к гипотоническому и гипертоническому шоку // Пробл. зооінженерії та ветеринарної медицини. Ч. 2: Зб. наук. праць. – 2009. – **2**, вип. 19. – С. 160–165.
9. Kamada T., Setoyama S., Chuman Y., Otsuji S. Metabolic dependence of the fluidity of intact erythrocyte membrane // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1983. – **116**, No 2. – P. 547–554.
10. Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A. M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // J. Cell. Biochem. – 1984. – **25**, No 2. – P. 61–72.
11. Mosior M., Mikolajczak A., Gomulkiewicz J. The effect of ATP on the order and the mobility of lipids in the bovine erythrocyte membrane // Biochim. et Biophys. Acta. – 1990. – No 1022. – P. 361–364.
12. Weed R. I., LaCelle P. L., Merrill E. W. Metabolic Dependence of Red Cell Deformability // J. Clin. Invest. – 1969. – No 48. – P. 795–809.

Н. М. Шпакова, О. Є. Ніпот, Н. В. Орлова, Д. І. Александрова,
О. О. Шапкіна

Осмотична чутливість еритроцитів ссавців після їх виснаження за АТФ

Показано, що виснаження еритроцитів людини і тварин за АТФ призводить до зміни їх чутливості до гіпертонічного та гіпотонічного шоку, при цьому реакція клітин не залежить від виду стресового впливу. В умовах гіпотонічного і гіпертонічного шоку рівень гемолітичного пошкодження еритроцитів людини знижується, а тварин — підвищується.

N. M. Shpakova, E. Ye. Nipot, N. V. Orlova, D. I. Aleksandrova,
O. A. Shapkina

Osmotic sensitivity of mammalian erythrocytes after their ATP depletion

It is demonstrated that the ATP depletion of human and mammalian erythrocytes leads to a change in their sensitivity to hypertonic and hypotonic stresses, herewith the cell reaction does not depend on the stress type. Under conditions of hypotonic and hypertonic stresses, the level of the hemolytic injury of human erythrocytes decreases, and that of mammalian ones increases.