

УДК: 591.111.1:577.352.462

Влияние 2-дезоксид-Д-глюкозы как ингибитора гликолиза на уровень гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих
Е.Е.Ніпот, Е.Э.Перский, Н.В.Орлова, О.А.Шапкина, Д.И.Александрова, В.В.Черепанов

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)
nipotel@mail.ru*

Показано, что инкубация эритроцитов человека с ингибитором гликолиза 2-дезоксид-Д-глюкозой приводит к уменьшению чувствительности клеток к действию 4,0 М NaCl. Энергетически истощенные эритроциты животных более чувствительны к гипертоническому шоку. Частичное обезвоживание эритроцитов снижает чувствительность клеток всех исследуемых млекопитающих к гипертоническому шоку (за исключением эритроцитов кролика), причем этот эффект более выражен в случае энергетически истощенных клеток животных.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, гипертонический шок, 2-дезоксид-Д-глюкоза, частичное обезвоживание клеток.

Вплив 2-дезоксид-Д-глюкози як інгібітора гліколізу на рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців
О.Є.Ніпот, Є.Е.Перський, Н.В.Орлова, О.О.Шапкина, Д.І.Александрова, В.В.Черепанов

Показано, що інкубація еритроцитів людини з інгібітором гліколізу 2-дезоксид-Д-глюкозою призводить до зменшення чутливості клітин до дії 4,0 М NaCl. Енергетично виснажені еритроцити тварин більш чутливі до гіпертонічного шоку. Часткове зневоднення еритроцитів знижує чутливість клітин всіх досліджуваних ссавців до гіпертонічного шоку (за винятком еритроцитів кролика), причому цей ефект більш виражений в разі енергетично виснажених клітин тварин.

Ключові слова: еритроцити ссавців, гіпертонічний шок, 2-дезоксид-Д-глюкоза, часткове зневоднення клітин.

Effect of 2-deoxy-D-glucose as an inhibitor of glycolysis on mammalian erythrocytes hypertonic haemolysis level
E.E.Nipot, Ye.E.Perskiy, N.V.Orlova, O.A.Shapkina, D.I.Alexandrova, V.V.Cherepanov

It has been shown that incubation of human erythrocytes with glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose reduces sensitivity of cells to 4,0 M NaCl. Energy-depleted erythrocytes of animals are more sensitive to hypertonic shock. Partial dehydration of erythrocytes decreases cells sensitivity of all mammals studied to hypertonic shock (with the exception of rabbit erythrocytes), and this effect is more pronounced in the case of energy-depleted cells of animals.

Key words: mammalian erythrocytes, hypertonic shock, 2-deoxy-D-glucose, partial cell dehydration.

Введение

Изучение реакции клеток на различные стрессовые воздействия является важной проблемой современной биологии. Одним из таких стрессовых факторов являются высококонцентрированные солевые растворы. В физиологических условиях эритроциты подвергаются действию гипертонических сред при прохождении через кровеносные сосуды мозгового вещества почек (Агаджанян, Смирнов, 2009). Гипертонические растворы используются в хирургической практике для коррекции водно-солевого обмена (Петриков и др., 2007). Во время процедуры замораживания клетки подвергаются действию высококонцентрированных солевых растворов, поэтому гипертонический шок, а именно перенесение клеток в 4,0 М NaCl при положительных температурах, используется как модель для изучения этого явления.

Реакция клеток на стрессовые воздействия во многом определяется их исходным состоянием, в частности содержанием в них воды и метаболически активных веществ. Известно, что предварительное обезвоживание эритроцитов млекопитающих в слабо гипертонических растворах

NaCl снижает их чувствительность к последующему действию гипертонического шока (Александрова, 2011). Для большинства видов млекопитающих наиболее эффективная защитная концентрация NaCl составляет 0,4 М NaCl. Энергетический статус клетки определяется, в основном, содержанием АТФ, основной путь образования которого в эритроцитах – гликолиз. Поскольку 2-дезоксид-D-глюкоза (2-ДГ) является ингибитором гликолиза, то её используют для энергетического истощения эритроцитов (Ralsera et al., 2008).

Целью нашей работы было изучить влияние 2-ДГ и частичного обезвоживания эритроцитов млекопитающих (человек, бык, лошадь и кролик) на их чувствительность к гипертоническому шоку (4,0 М NaCl).

Материалы и методы

Эритроциты получали из донорской крови человека, быка, лошади и кролика, заготовленной на консерванте «Глюцир». Эритромассу в виде плотного осадка хранили не более 2 часов при температуре 0°C.

Истощение клеток по АТФ проводили по методу (Marjanovic, Willis, 1992). Эритроциты инкубировали с 2-ДГ (10 мМ) в течение 2 ч при 37°C, после чего отмывали физиологическим раствором. Контролем служили клетки, проинкубированные в вышеуказанных условиях без добавления 2-ДГ.

Гипертонический шок эритроцитов млекопитающих осуществляли перенесением клеток в раствор, содержащий 4,0 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, рН 7,4 при 22°C на 5 мин (гематокрит 0,4%). Содержание вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. Предварительное обезвоживание эритроцитов млекопитающих осуществляли в 0,4 М NaCl в течение 2 мин при температуре 22°C.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы ANOVA и критерия Манн–Уитни (StatgraphWin). Каждый эксперимент повторяли не менее 6 раз в двух параллельных пробах. Полученные результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Изучение чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку проводили в двух постановках. В первом случае клетки истощали по АТФ путем инкубирования в течение разного времени с 2-ДГ и переносили в 4,0 М NaCl. Во втором случае клетки, истощенные по АТФ, подвергали частичному обезвоживанию (0,4 М NaCl) и лишь потом переносили в 4,0 М NaCl. Полученные данные для эритроцитов человека представлены на рис. 1.

Видно, что уровень гипертонического гемолиза эритроцитов человека уменьшается по мере увеличения продолжительности инкубирования клеток с 2-ДГ. В отдельных экспериментах было показано, что продолжительное инкубирование клеток (до 2 часов) без добавления 2-ДГ не изменяет их чувствительность к гипертоническому шоку. Обезвоживание клеток в 0,4 М NaCl приводит к снижению чувствительности эритроцитов человека к гипертоническому шоку, что хорошо согласуется с результатами работы (Александрова, 2011). Следует отметить, что снижение уровня гипертонического гемолиза после частичного обезвоживания эритроцитов происходит практически в равной степени для неистощенных и энергетически истощенных клеток (в 2,2 и в 2,3 раза соответственно).

Аналогичные эксперименты были проведены с использованием эритроцитов быка и лошади (рис. 2 и 3 соответственно).

В отличие от эритроцитов человека, клетки быка и лошади, проинкубированные с 2-ДГ, демонстрируют время-зависимое увеличение чувствительности к гипертоническому шоку. Частичное обезвоживание энергетически неистощенных эритроцитов быка и лошади в 0,4 М NaCl приводит к снижению их гипертонического гемолиза в 2 и 1,2 раза соответственно. В том случае, когда частичному обезвоживанию клеток предшествовало инкубирование эритроцитов с 2-ДГ (2 часа), то снижение уровня гипертонического гемолиза эритроцитов быка и лошади было более выражено (в 9,6 и 3,3 раза соответственно).

Эритроциты кролика (рис. 4) демонстрируют повышение чувствительности к гипертоническому шоку по мере увеличения продолжительности инкубирования с 2-ДГ. Частичное обезвоживание как

енергетически истощенных, так и неистощенных клеток практически не изменяет уровень их гемолиза в 4,0 М NaCl.

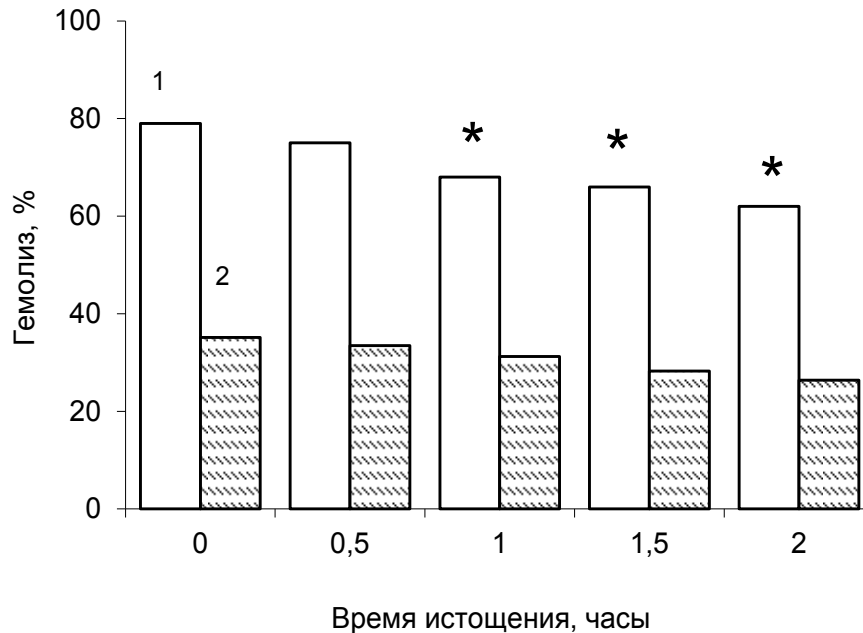


Рис. 1. Зависимость уровня гемолиза эритроцитов человека в 4,0 М NaCl от продолжительности инкубирования клеток с 2-дезоксид-Д-глюкозой: 1 – необезвоженные клетки, 2 – клетки, обезвоженные в 0,4 М NaCl

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

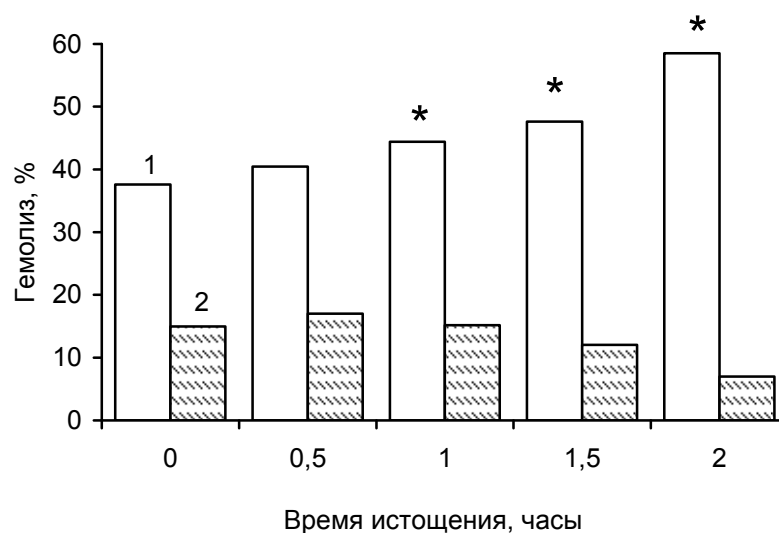


Рис. 2. Зависимость уровня гемолиза эритроцитов быка в 4,0 М NaCl от продолжительности инкубирования клеток с 2-дезоксид-Д-глюкозой: 1 – необезвоженные клетки, 2 – клетки, обезвоженные в 0,4 М NaCl

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

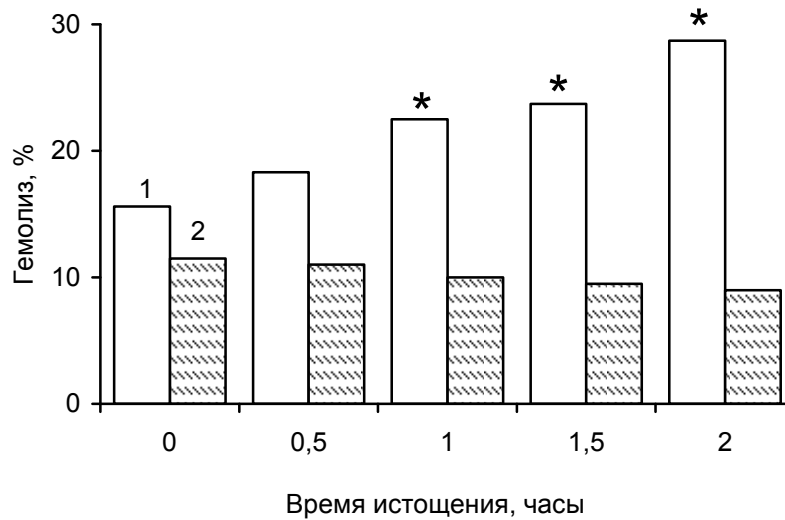


Рис. 3. Зависимость уровня гемолиза эритроцитов лошади в 4,0 М NaCl от продолжительности инкубирования клеток с 2-дезоксид-D-глюкозой: 1 – необезвоженные клетки, 2 – клетки, обезвоженные в 0,4 М NaCl

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

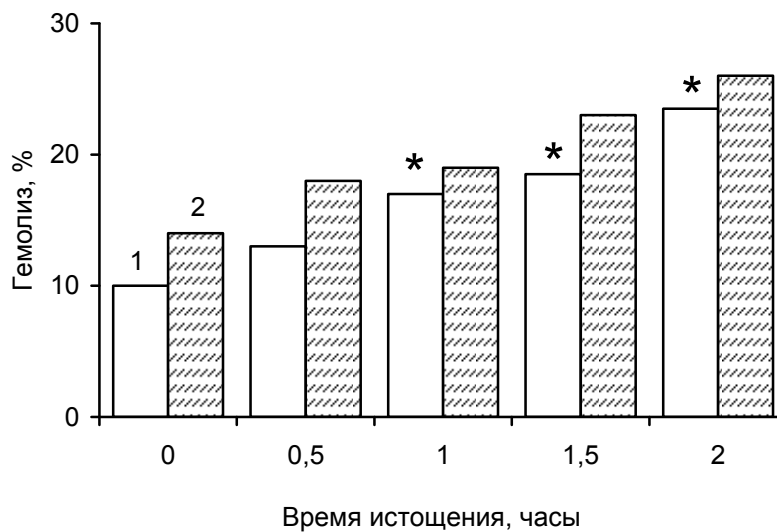


Рис. 4. Зависимость уровня гемолиза эритроцитов кролика в 4,0 М NaCl от продолжительности инкубирования клеток с 2-дезоксид-D-глюкозой: 1 – необезвоженные клетки, 2 – клетки, обезвоженные в 0,4 М NaCl

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Таким образом, инкубация эритроцитов человека с ингибитором гликолиза 2-ДГ приводит к уменьшению их чувствительности к 4,0 М NaCl, в то время как энергетически истощенные эритроциты животных более чувствительны к действию гипертонического шока. Частичное обезвоживание снижает чувствительность к гипертоническому шоку эритроцитов всех исследуемых млекопитающих (за исключением эритроцитов кролика), причем этот эффект выше в случае энергетически

истощенных клеток животных. В отличие от клеток животных, для эритроцитов человека эффект частичного обезвоживания, направленный на снижение чувствительности клеток к гипертоническому шоку, не зависит от энергетического статуса клетки.

Обсуждение

2-Дезокси-D-глюкоза является аналогом основного субстрата гликолитического процесса – глюкозы, однако не может полностью метаболизироваться. 2-ДГ-6-фосфат, накапливаясь в клетке, ингибирует гликолитические ферменты фосфоглюкозоизомеразу и гексокиназу (Ralsera et al., 2008). Нарушение процесса гликолиза приводит к энергетическому истощению клеток, в результате чего происходит замедление функционирования всех энергозависимых систем в клетке и, в первую очередь, белков-переносчиков. Так, следствием нарушения функционирования Na^+, K^+ -АТФазы является накопление катионов натрия в клетках, что приводит к увеличению их объема (Sakota et al., 2009). Однако при более длительном истощении наблюдается уменьшение объема клеток ниже контрольного значения за счет выхода ионов калия из клетки (Nagy et al., 1998). Падение уровня АТФ ниже 10% от исходного значения вызывает повреждение эритроцитарной мембраны, что проявляется в нарушении ее проницаемости и выходе гемоглобина из клетки (Nagy et al., 1998). Таким образом, можно сказать, что физико-химические характеристики клетки на данный момент времени в существенной степени определяются ее энергетическим статусом, который в значительной степени зависит от продолжительности инкубирования с 2-ДГ как ингибитора гликолиза.

Снижение чувствительности эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку после предварительного обезвоживания связывают с уменьшением их объема и, как следствие, объемного сдвига при последующем перенесении в 4,0 М NaCl. Можно предположить, что содержание внутриклеточной воды будет определять величину и время существования осмотического градиента на мембране в условиях гипертонического шока. Таким образом, частично обезвоженные эритроциты, содержащие меньшее количество воды, будут менее чувствительны к гипертоническому шоку.

Низкий уровень повреждения эритроцитов кролика в 4,0 М NaCl и отсутствие влияния частичного обезвоживания на уровень их гипертонического гемолиза (рис. 4) может быть связан с высокой скоростью мембранного водного транспорта. Эритроциты кролика характеризуются наличием большего количества водных каналов (в отличие от эритроцитов других изученных нами млекопитающих) и, как следствие, более высокой скоростью выхода воды из клетки (Liu et al., 2011). В условиях гипертонического шока более быстрый выход воды из клетки обеспечивает быстрое падение осмотического градиента и, соответственно, меньшую нагрузку на эритроцитарную мембрану.

Наблюдаемая в работе различная реакция метаболически истощенных эритроцитов человека и животных на гипертонический шок может быть обусловлена разным конечным метаболическим статусом клеток. Известно, что гликолиз является основным путем образования АТФ в эритроцитах как животных, так и человека, однако активность гликолитических ферментов, соотношение метаболически активных веществ в клетке различно в эритроцитах разных видов млекопитающих (Kaneko et al., 2008). Следовательно, метаболические процессы в эритроцитах человека и животных могут протекать по-разному, и при одном и том же времени истощения (продолжительности инкубации с 2-ДГ) конечный метаболический статус клеток будет различным. Известно, что одним из параметров, определяющих гипертоническую чувствительность эритроцитов, является их объем. Как уже упоминалось выше, объем эритроцитов человека изменяется при энергетическом истощении нелинейно и при значительном снижении концентрации АТФ в клетке (более чем на 80%) уменьшается (Nagy et al., 1998). Это объясняет наблюдаемое в работе снижение чувствительности эритроцитов человека к гипертоническому шоку. Что касается эритроцитов животных, литературные данные об объемных характеристиках их клеток в условиях низкой концентрации АТФ немногочисленны и подчас противоречивы (Mosior, Gomulkiewicz, 1988; Mosior et al., 1990). Однако, исходя из результатов нашей работы, можно предположить, что после 2 часов инкубации с 2-ДГ, объем эритроцитов животных будет выше контрольного значения, поскольку мы наблюдаем рост их гипертонической чувствительности после истощения. Это указывает на различие в скорости метаболических процессов, происходящих в клетках человека и животных, что отражается на их физико-химических характеристиках и устойчивости к стрессовому воздействию.

Список литературы

- Агаджанян Н.А., Смирнов В.М. Нормальная физиология. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2009. – 520с. /Agadzhanyan N.A., Smirnov V.M. Normal'naya fiziologiya. – Moskva: Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo, 2009. – 520s./
- Александрова Д.І. Вплив початкових осмотичних та температурних умов на стійкість еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку. Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 030019/кріобіологія. – Харків, 2011. – 20с. /Aleksandrova D.I. Vplyv pochatkovykh osmotychnykh ta temperaturnykh umov na stiykist' erytrotsytiv ssavtsiv do gipertonichnogo shoku. Avtoref. dys. ... kand. biol. nauk: 030019/kriobiologiya. – Kharkiv, 2011. – 20s./
- Петриков С.С., Крылов В.З., Солодов А.А. Влияние гиперосмолярных растворов на внутричерепное давление, церебральную оксигенацию и центральную гемодинамику у больных с внутричерепными кровоизлияниями // Вестник интенсивной терапии. – 2007. – №2. – С. 61–65. /Petrikov S.S., Krylov V.Z., Solodov A.A. Vliyaniye giperosmolyarnykh rastvorov na vnutricherepnoye davleniye, tserebral'nuyu oksigenatsiyu i tsentral'nuyu gemodinamiku u bol'nykh s vnutricherepnymi krovoizliyaniyami // Vestnik intensivnoy terapii. – 2007. – №2. – S. 61–65./
- Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. The erythrocyte: physiology, metabolism, and biochemical disorders. – London., Elsevier Inc. ACADEMIC PRESS, 2008. – 928p.
- Liu L., Lei T., Bankir L. et al. Erythrocyte permeability to urea and water: comparative study in rodents, ruminants, carnivores, humans, and birds // J. Comp. Physiol. – 2011. – Vol.181, № 1. – P. 65–72.
- Marjanovic M., Willis J.S. ATP dependence of Na⁺-K⁺ pump of cold sensitive and cold tolerant mammalian red blood cells // Journal of Physiology. – 1992. – Vol.456, №1. – P. 575–590.
- Mosior M., Bobrowska M., Gomulkiewicz J. Effect of the level ATP and of the state of spectrin on osmotic properties of bovine erythrocytes // Biochimica et Biophysica Acta. – 1990. – №1022. – P. 355–360.
- Mosior M., Gomulkiewicz J. Osmotic properties of bovine erythrocytes aged in vivo // Gen. Physiol. Biophys. – 1988. – №7. – P. 73–79.
- Nagy S., Paál M., Kőszegi T. et al. ATP and integrity of human red blood cells // Physiol. Chem. Phys. Med. NMR. – 1998. – Vol.30, №2. – P. 141–148.
- Ralsera M., Wamelinkb M.M., Struysb E.A. et al. A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth // PNAS. – 2008. – Vol.105, №46. – P. 17807–17811.
- Sakota D., Sakamoto R., Yokoyama N. et al. Glucose depletion enhances sensitivity to shear stress-induced mechanical damage in red blood cells by rotary blood pumps // Artif. Organs. – 2009. – Vol.33, №9. – P. 733–739.

Представлено: О.В.Шаповалова / Presented by: O.V.Shapovalova

Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 4.10.2012