

УДК: 612.111.014.43.462.1:547.36

ВЛИЯНИЕ N-БУТАНОЛА И N-ГЕКСАНОЛА НА ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧЕСКУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ**Іхсан Алі Саламех Аль-Салаймех², С.В.Меліхова¹, Е.Е.Ніпот¹, В.А.Бондаренко²**¹*Інститут проблем криобиології і криомедицини НАН України (Харьков, Україна)*²*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Україна)*

Изучалось влияние n-алканолов (n-бутанола и n-гексанола) на чувствительность эритроцитов разных видов (цыпленок, баран, человек) к гипотоническому шоку (60–80 ммоль/л сахароза), и гипертоническому криогемолизу (0,86 моль/л сахароза). Установлено, что n-алканолаы оказывают выраженный защитный эффект на эритроциты человека в условиях гипотонического шока (n-бутанол 200–324 ммоль/л, n-гексанол 5–20 ммоль/л) и гипертонического криогемолиза (n-бутанол 90–160 ммоль/л, n-гексанол 7,5–13 ммоль/л) и не влияют на чувствительность эритроцитов цыпленка к гипотоническому лизису. Предполагается, что разница в защитных особенностях n-алканолов зависит от их проникающей способности через плазматическую мембрану, а также от особенностей состава мембран, что влияет на способность n-алканолов встраиваться в мембрану.

Ключевые слова: *эритроциты животных и птиц, n-алканолаы, гипотонический шок, гипертонический криогемолиз, неэлектролитная среда.*

Введение

В настоящее время эритроцит является широко используемым объектом для исследования адаптивных реакций клеток на действие стрессовых факторов (Абу-Аль Асаль и др., 2003; Бондаренко, 1988; Гордиенко, Панина, 1998; Дунаевская и др., 1995; Pribush et al., 2002). Устойчивость эритроцитов к стрессовым воздействиям зависит от целого ряда факторов, среди которых важное значение имеют как факторы среды, такие как ее состав, температура и осмолярность, так и факторы, способные изменить структурное состояние плазматической мембраны и функционирование систем ионного транспорта. Установлено, что некоторые соединения (амфифилы различной природы, анестетики, криопротекторы, глюкоза и т.д.) способны изменять чувствительность клеток к стрессовым воздействиям, например, повышая их устойчивость к изменению осмотических и температурных условий среды (Абу-Аль Асаль и др., 2003; Бондаренко, 1988; Дунаевская и др., 1995), или, наоборот, сенсibiliзируя клетки к изменению температуры и осмолярности (Абу-Аль Асаль и др., 2003; Бондаренко, 1988; Дунаевская и др., 1995; Katsuki et al., 2003). В свою очередь, эффективность влияния химических модификаторов зависит как от условий среды, в которой находятся клетки, так и от направленности их влияния на соответствующие компоненты цитоскелет-мембранного комплекса. n-Алканолы также относятся к классу химических модификаторов амфифильной природы, способных оказывать преимущественное влияние на состояние плазматической мембраны. Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные, касающиеся влияния n-алканолов на проницаемость плазматической мембраны (Brahm, 1983; Toon, Solomon, 1990) и влияния на транспортные характеристики эритроцитов (Forman et al., 1985; Toon, Solomon, 1990; Schwichtenhovel et al., 1992), а также способности встраиваться в плазматическую мембрану клеток (Toon, Solomon, 1990; Schwichtenhovel et al., 1992) позволяют предположить, что указанные соединения могут оказывать значительный протектирующий эффект на клетки в стрессовых условиях, в частности в условиях температурного и осмотического стресса. В связи с этим целью данной работы было исследование влияния n-алканолов на чувствительность эритроцитов к гипотоническому лизису и гипертоническому криогемолизу в неэлектролитной среде (сахароза).

Методика

В экспериментах были использованы эритроциты консервированной крови человека, полученной на станции переливания крови, а также эритроциты барана и цыпленка, заготовленные на глюцицировом консерванте. Клетки трижды отмывали по стандартной методике. Упакованный осадок эритроцитов хранили при 4°C и использовали в течение 3–4 часов.

Для того, чтобы оценить осмотическую устойчивость эритроцитов, аликвоту клеток из сток раствора (гематокрит 1%) переносили в гипотоническую среду (60–80 ммоль/л сахароза, 10 ммоль/л трис-НСІ рН 7,4) при комнатной температуре (23°C). Из-за различий в устойчивости эритроцитов человека, барана и цыпленка, концентрация сахарозы в среде подбиралась таким образом, чтобы

гемолиз составлял приблизительно 50–70 %. Для изучения влияния n-алканолов на развитие гипотонического гемолиза эритроцитов в литическую среду добавляли спирты в конечных концентрациях 54–324 ммоль/л n-бутанола и 1–15 ммоль/л n-гексанола и перемешивали до полного растворения исследуемых веществ в среде, а затем добавляли клетки. Для регистрации динамики гемолиза эритроцитов в работе была использована установка для измерения светорассеяния клеточных суспензий, созданная на базе монохроматора СФ-4А. Степень гипотонического гемолиза рассчитывали по формуле: Гипотонический гемолиз = $(1 - A/A_0) \cdot 100\%$, где A – оптическая плотность исследуемого образца, A_0 – оптическая плотность контрольного образца, соответствующая 0% гемолиза.

Гипертонический криогемолиз моделировали следующим образом. Аликвоту суспензии эритроцитов (40% гематокрит) помещали в гипертонические растворы неэлектролита (0,86 моль/л сахарозы, 10 ммоль/л трис-НСI, рН 7,4), содержащие n-бутанол в концентрациях 0–250 ммоль/л или n-гексанол в концентрациях 0–15 ммоль/л. Эритроциты инкубировали 10 мин при 37°C, а затем переносили на 10 мин в 0°C. Клетки осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 3000 g. Содержание вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрическим способом на СФ-4А с проточной кюветой при длине волны 543 нм. За 100 % принимали поглощение пробы, в которую добавляли детергент тритон X-100 в концентрации 0,1%. Каждый эксперимент повторяли не менее 6 раз в двух параллельных пробах не менее, чем на 3-х донорах.

Результаты обрабатывали по методу Стьюдента–Фишера.

Результаты

На рис. 1 представлены данные о влиянии n-бутанола на чувствительность эритроцитов разных видов к переносу в гипотонические растворы сахарозы. Видно, что характер изменения чувствительности эритроцитов к гипотоническому шоку зависит от видовой принадлежности клеток. В случае эритроцитов цыпленка и барана (рис. 1, кривые 1, 2 соответственно) n-бутанол не снижает уровень гемолиза клеток в исследуемых условиях. В то же время n-бутанол оказывает выраженный эффект в случае эритроцитов человека (рис. 1, кривая 3). Из данных, представленных на рис. 2, видно, что n-гексанол оказывает протективный эффект на эритроциты барана и человека (кривая 2,3 соответственно) и не влияет на устойчивость эритроцитов цыпленка к действию гипотонии. При этом n-бутанол эффективен при концентрациях, вызывающих значительное увеличение текучести мембраны, а n-гексанол эффективен при концентрациях, не вызывающих подобные изменения (Kutchai et al., 1980; Toon, Solomon, 1990; Schwichtenhovel et al., 1992).

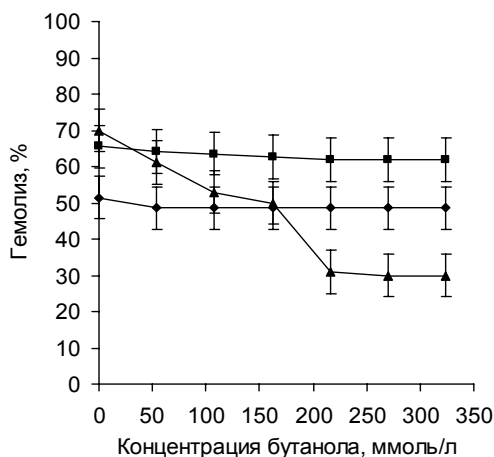


Рис. 1. Влияние n-бутанола на чувствительность эритроцитов разных видов (цыпленок – 1; баран – 2; человек – 3) к гипотоническому шоку: 60–80 ммоль/л сахара, 10 ммоль/л трис HCl, рН 7,4

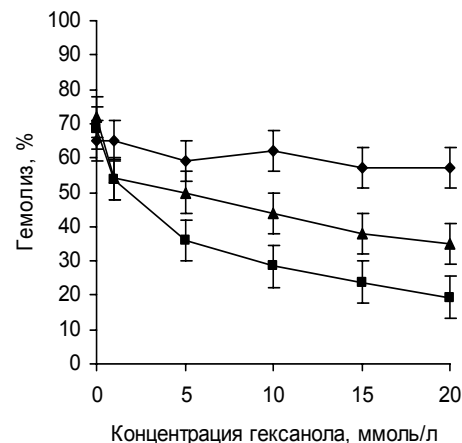


Рис. 2. Влияние n-гексанола на чувствительность эритроцитов разных видов (цыпленок – 1; баран – 2; человек – 3) к гипотоническому шоку: 60–80 ммоль/л сахара, 10 ммоль/л трис HCl, рН 7,4

Для исследования влияния n-алканолов на чувствительность эритроцитов к гипертоническому криогемолизу использовались только эритроциты человека (рис. 3, 4), т. к. эритроциты барана обладают низкой чувствительностью к температурному сдвигу в гипертонических средах (данные не приведены), а эритроциты цыпленка лизируют на этапе первичной гипертонической инкубации (данные не приведены). Из данных, представленных на рис. 3, 4, видно, что исследуемые n-алканолы характеризуются разнонаправленным влиянием на эритроциты человека в условиях охлаждения в

гипертонической неэлектролитной среде. Как *n*-бутанол, так и *n*-гексанол протектируют эритроциты от лизиса при определенных концентрациях и оказывают прогемолитический эффект при дальнейшем увеличении концентраций *n*-алканолов в среде. Видно (рис. 3), что *n*-бутанол эффективен в более узком диапазоне концентраций, чем *n*-гексанол (рис. 4). В свою очередь, *n*-гексанол даже при максимальной растворимости в гипертонической сахарозной среде не оказывает значительного прогемолитического влияния на эритроциты человека.

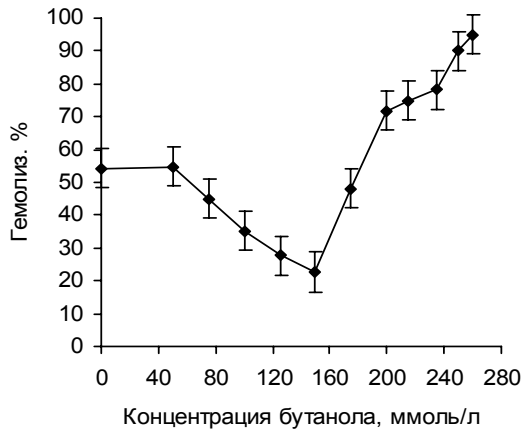


Рис. 3. Влияние *n*-бутанола на чувствительность эритроцитов человека к гипертоническому криогемолизу в 0,86 моль/л сахараза, 10 ммоль/л трис HCl, pH 7,4

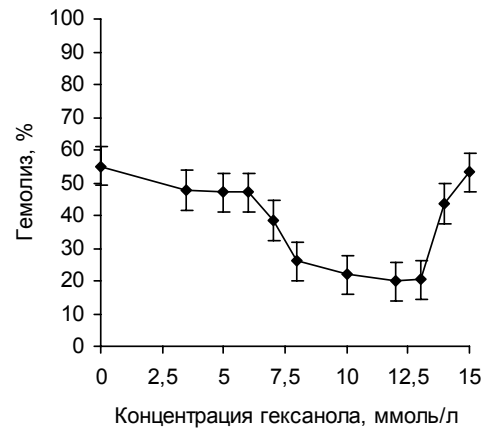


Рис. 4. Влияние *n*-гексанола на чувствительность эритроцитов человека к гипертоническому криогемолизу в 0,86 моль/л сахараза, 10 ммоль/л трис HCl, pH 7,4

Следует отметить, что как в случае гипотонического лизиса, так и в случае гипертонического криогемолиза эффективные концентрации *n*-гексанола более чем на порядок меньше по сравнению с таковыми в случае *n*-бутанола. Однако, если принять во внимание тот факт, что коэффициент распределения в системе мембрана/вода для *n*-гексанола на порядок выше по сравнению с *n*-бутанолом, то эффективные мембранные концентрации будут отличаться незначительно (Kutchai et al., 1980; Malheiros et al., 2004; Schwichtenhovel et al., 1992).

Обсуждение

При помещении клеток в гипотонические растворы происходит поступление воды в клетку и их набухание. При этом эритроциты достигают критического гемолитического объема и при растяжении мембраны в ней формируются поры, проницаемые не только для электролитов, но и для гемоглобина. В указанных условиях эритроциты теряют часть внутриклеточного содержимого, при этом снижается внутренняя осмотическая нагрузка и пора замыкается. Этот процесс повторяется циклически до полного лизиса клеток (Гордиенко, Панина, 1998; Козлов, Маркин, 1984; Pribush et al., 2002). Клетки, обладающие механизмами активной адаптации к изменению осмотических условий среды, способны восстанавливать свой исходный объем за счет активации транспортных процессов, вовлеченных в системы регуляторного уменьшения объема (RVD) (Lang et al., 1998). При этом при помещении эритроцитов в гипотонические растворы электролитов и неэлектролитов активируются разные транспортные механизмы. В гипотонических средах с низкой ионной силой, например, в гипотонических растворах сахаразы, в результате активации RVD в эритроцитах активируются системы, ответственные за транспорт органических осмолитов (Tomassen et al., 2004; Culliford et al., 1995). Помимо этого происходит потеря клетками части внутриклеточных электролитов, в частности K^+ , и Cl^- (O'Neill, 1989; Tomassen et al., 2004). В зрелых эритроцитах человека транспортные системы, ответственные за K^+ , Cl^- котранспорт, не активируются (O'Neill, 1989), а также отсутствует RVD (Орлов, Новиков, 1996). В работе (Pribush et al., 2002) было установлено, что набухание эритроцитов в гипотонической среде контролируется водными каналами, которые отсутствуют в эритроцитах цыпленка (Масеу, 1984). Возможно поэтому эритроциты цыпленка обладают наибольшей устойчивостью к гипотонии (данные не приведены). Известно (Kutchai et al., 1980; Toon, Solomon, 1990), что *n*-алканолы замедляют транспорт воды в клетку, вероятно, именно этим фактом можно объяснить их защитное действие на эритроциты человека (рис. 1, 2, кривая 3) и отсутствие видимого эффекта в случае эритроцитов цыпленка (рис. 1, 2, кривая 1). Как *n*-бутанол, так и *n*-гексанол способны активировать выход органических осмолитов из клеток (Schwichtenhovel et al., 1992), тем самым предотвращая лизис эритроцитов по коллоидно-осмотическому механизму. Т. к. *n*-бутанол не

оказывает влияния на эритроциты барана, обладающие системой регуляции объема и параметрами водной проницаемости, сходными с таковыми в случае эритроцитов человека, то вероятнее всего он опосредует свой защитный эффект в основном за счет встраивания в плазматическую мембрану, что приводит к увеличению критического гемолитического объема, а также вследствие модификации барьерных свойств мембраны. n-Бутанол обладает большей проникающей способностью через мембрану эритроцита, по сравнению с n-гексанолом (Forman et al., 1985), и в эффективных концентрациях вызывает значительное увеличение текучести мембраны. n-Гексанол, в свою очередь, протектирует эритроциты от гипотонического лизиса, скорее всего за счет ингибирования водных потоков в клетку (Kutchai et al., 1980). Именно этим фактом можно объяснить его значительную эффективность в случае эритроцитов млекопитающих, у которых в структуру плазматической мембраны включены системы активного водного транспорта, и отсутствие видимого эффекта в случае эритроцитов цыпленка, у которого подобные системы отсутствуют (Masey, 1984).

Известно, что одним из факторов повреждения эритроцитов в условиях гипертонического криогемолиза является латеральное разделение липидов в плоскости бислоя с формированием доменов, отличающихся по их фазовому состоянию. В частности, охлаждение эритроцитов в гипертонической среде приводит к формированию дефектов на границах доменов в разном фазовом состоянии и лизису клеток. Соответственно, вещества амфифильной природы, увеличивающие смешиваемость липидов, к которым относятся и n-алканола, способны повышать устойчивость эритроцитов к гипертоническому криогемолизу (Абу-Аль Асаль и др., 2003; Дунаевская и др., 1995). Влияние амфифилов на температурно-осмотическую устойчивость эритроцитов носит разнонаправленный характер, в частности, при переходе через критическую границу концентраций данные вещества начинают проявлять прогемолитическую активность (Абу-Аль Асаль и др., 2003). Такая же зависимость наблюдается и в случае n-алканола. Принимая во внимание высокую проникающую способность n-бутанола, по сравнению с n-гексанолом, можно предположить, что защитный эффект этих двух веществ осуществляется по разным механизмам. Возможно, что при более низких концентрациях n-бутанол опосредует свой защитный эффект, стабилизируя гидратные оболочки белков, включая белки цитоскелета эритроцитов человека, что препятствует их структурной дегидратации и повышает устойчивость клеток к температурно-осмотическому стрессу. Дальнейшее увеличение концентрации n-бутанола в среде приводит к встраиванию n-бутанола в мембрану, увеличивая ее текучесть, что способствует замыканию дефектов, формирующихся при фазовых переходах липидов в условиях охлаждения (Абу-Аль Асаль и др., 2003). При высоких концентрациях n-алканола возникает вероятность формирования дефектов мембраны, за счет встраивания n-бутанола в участки с повышенной текучестью. В свою очередь, n-гексанол, очевидно, опосредует свой защитный эффект преимущественно на уровне мембраны и его действие сходно с действием таких амфифильных соединений как хлорпромазин (Дунаевская и др., 1995).

Различия в эффективных концентрациях n-алканола при гипотоническом шоке и гипертоническом криогемолизу, скорее всего, обусловлены неодинаковым влиянием n-алканола на такой параметр мембраны как поверхностно-объемное отношение, что, в свою очередь, связано с различиями в характере встраивания молекул n-алканола в мембрану дегидратированных клеток и клеток, которые подвергаются набуханию. Это означает, что и в том и другом случае главным фактором, контролирующим чувствительность клеток к стрессовому воздействию, является их объем.

Выводы

n-Бутанол оказывает менее выраженный защитный эффект на эритроциты в условиях гипотонического шока по сравнению с n-гексанолом. Это может быть связано с различиями в способности n-бутанола и n-гексанола влиять на критический гемолитический объем клеток.

n-Алканола оказывают разнонаправленное влияние на чувствительность эритроцитов человека в условиях гипертонического криогемолиза. При одинаковых мембранных концентрациях оба алканола протектируют эритроциты от лизиса, а при дальнейшем увеличении их концентрации в гипертонической среде – индуцируют развитие гемолиза.

В случае гипертонического криогемолиза область эффективных концентраций n-алканола лежит в области меньших значений по сравнению с гипотоническим лизисом. Это может быть связано с различными механизмами, вызывающими лизис эритроцитов в условиях гипотонического шока и гипертонического криогемолиза.

Список литературы

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. – №3. – С. 43–49.

- Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов. Дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1988. – 446с.
- Гордиенко Е.А., Панина Ю.Е. Физико-химическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека. II этап гемолиза // *Біофізичний вісник*. – 1998. – №422, вып.2. – С. 54–58.
- 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.
- Козлов М.М., Маркин В.С. Теория осмотического лизиса липидных везикул // *Биологические мембраны*. – 1984. – Т.1, №1. – С. 74–90.
- Орлов С.Н., Новиков К.Н. Регуляция объема клеток: механизмы, сопряженные клеточные реакции и патофизиологическое значение // *Физиологический журнал им. И.М.Сеченова*. – 1996. – № 8–9. – С. 1–15.
- Brahm J. Permeability of human red cells to a homologous series of aliphatic alcohols // *J. Gen. Physiol.* – 1983. – Vol.81. – P. 283–304.
- Culliford S.J., Bernhardt I., Ellory J.C. Activation of a novel organic solute transporter in mammalian red blood cells // *J. Physiol.* – 1995. – Vol.489 (Pt 3). – P. 755–765.
- 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. – Vol.24, №18. – P. 4859–4866.
- Katsuki H., Tateyama S., Hidaka N., Takasaki M. Ionic strength influences hemolytic action of dibucaine hydrochloride // *Masui*. – 2003. – Vol.52, №11. – P. 1174–1180.
- Kutchai H., Chandler L.H., Geddis L.M. Effects of anesthetic alcohols on membrane transport processes in human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – Vol.600, №3. – P. 870–881.
- Lang F., Busch G.L., Ritter M. et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // *Physiological Reviews*. – 1998. – Vol. 78. – P. 247–306.
- Macey R.I. Transport of water and urea in red blood cell // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol.246. – P. 195–203.
- Malheiros S.V., Pinto L.M., Gottardo L. et al. A new look at the hemolytic effect of local anesthetics, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4 // *Biophys. Chem.* – 2004. – Vol.110, №3. – P. 213–221.
- O'Neill W.C. Cl-dependent K transport in a pure population of volume-regulating human erythrocytes // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1989. – Vol.256. – P. 858–864.
- Pribush A., Meyerstein D., Meyerstein N. Kinetics of erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – Vol.1558, №2. – P. 119–132.
- Schwichtenhovel C., Deuticke B., Haest C. W.M. Alcohols produce reversible and irreversible acceleration of phospholipid flip-flop in the human erythrocyte membrane // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – Vol.1111. – P. 35–44.
- Tomassen S.F., Fekkes D., de Jonge H.R., Tilly B.C. Osmotic swelling-provoked release of organic osmolytes in human intestinal epithelial cells // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – Vol.286, №6. – P. 1417–1422.
- 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. – Vol.1022, №1. – P. 57–71.

ВПЛИВ N-БУТАНОЛУ ТА N-ГЕКСАНОЛУ НА ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧНУ ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ РІЗНИХ ВИДІВ

Іхсан Алі Саламех Аль-Салаймех, С.В.Меліхова, О.Є.Ніпот, В.А.Бондаренко

Вивчався вплив n-алканолів (n-бутанолу і n-гексанолу) на чутливість еритроцитів різних видів (курча, баран, людина) до гіпотонічного лізису (60–80 ммоль/л цукроза) та гіпертонічного криогемолізу (0,86 моль/л цукроза). Встановлено, що n-алканолі мають виражену захисну дію на еритроцити людини в умовах гіпотонічного лізису (n-бутанол 200–324 ммоль/л, n-гексанол 5–20 ммоль/л) та гіпертонічного криогемолізу (n-бутанол 90–160 ммоль/л, n-гексанол 7,5–13 ммоль/л). n-Алканолі не впливають на чутливість еритроцитів курчат до гіпотонічного шоку. n-Гексанол, на відміну від n-бутанолу, має значну захисну дію на еритроцити барана в умовах гіпотонічного лізису. Припускається, що різниця у захисних властивостях n-алканолів залежить від їх проникної здатності по відношенню до плазматичної мембрани клітин, а також від особливостей складу плазматичних мембран, що впливає на здатність n-алканолів вбудовуватися у мембранний моношар. Повільніше проникаючий n-гексанол може проявляти свій вплив на рівні плазматичної мембрани, вочевидь впливаючи на транспортну активність інтегральних білків.

Ключові слова: *еритроцити різних видів, n-алканоли, гіпотонічний шок, гіпертонічний криогемоліз, неелектролітне середовище.*

EFFECTS OF N-BUTANOL AND N-HEXANOL ON RED BLOOD CELLS SENSITIVITY TO CHANGE OF OSMOTIC AND TEMPERATURE CONDITIONS OF MILIEU

Ihsan Ali Salameh Al-Salaymeh, S.V.Melihova, E.E.Nipot, V.A.Bondarenko

n-Alkanols protect human erythrocytes from hypotonic shock (n-butanol 200–324 mmol/l, n-hexanol 5–20 mmol/l) and hypertonic cryohemolysis (n-butanol 120–180 mmol/l, n-hexanol 7,5–13 mmol/l). n-Alkanols do not influence sensitivity of avian erythrocytes to hypotonic shock. Under hypotonic lysis n-hexanol protects sheep erythrocytes at the same concentrations as human red blood cells. It is supposed, that the differences in protective efficiency of n-alkanols depend on their membrane permeability.

Key words: *red blood cells, n-alkanols, hypotonic shock, hypertonic cryohemolysis, non-electrolyte medium.*

Представлено Л.Ф.Розановим

Рекомендовано до друку Н.О.Бабенко