



УДК 591.111.1:577.352.462

© 2012

Н. А. Ершова, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова

**Влияние фенилгидразина и алкилсульфатов
на осмотическую чувствительность эритроцитов
млекопитающих**

(Представлено академиком НАН Украины А. Н. Гольцевым)

Показано, что чувствительность эритроцитов млекопитающих к гипертоническому стрессу при 37 °С после обработки фенилгидразином зависит от видовой принадлежности клеток. Установлено, что модификация фенилгидразином эритроцитов млекопитающих приводит к снижению антигемолитической активности алкилсульфатов в условиях гипертонического стресса.

При замораживании биологических объектов одним из основных факторов повреждения клеток является образование высококонцентрированных солевых растворов в результате вымораживания воды [1]. В качестве экспериментальной модели для изучения влияния данного фактора на эритроциты используют гипертонический стресс, который представляет собой повреждение клеток, перенесенных в гипертоническую среду при положительных значениях температуры [1].

Характер ответа клетки на осмотическое воздействие во многом зависит от состояния ее цитоскелет-мембранного комплекса [1, 2]. Поэтому мы модифицировали цитоскелет-мембранный комплекс эритроцитов млекопитающих с помощью фенилгидразина, который вызывает деградацию цитоскелетных белков, в частности спектрина [3]. Существуют подходы, позволяющие снизить чувствительность клеток к осмотическому стрессу, в частности амфифильные соединения уменьшают уровень гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих [2]. Представляло интерес исследовать эффективность анионных амфифильных веществ алкилсульфатов в условиях гипертонического стресса эритроцитов млекопитающих, модифицированных фенилгидразином.

Цель работы — исследовать влияние фенилгидразина на чувствительность эритроцитов человека, лошади, быка и кролика к гипертоническому стрессу и изучить антигемолитическую активность децилсульфата натрия и додецилсульфата натрия.

Материалы и методы. Для исследования использовали эритроциты, полученные из крови млекопитающих, заготовленной на консерванте “Глюгицир”. Эритроциты выделяли по стандартной методике [2].

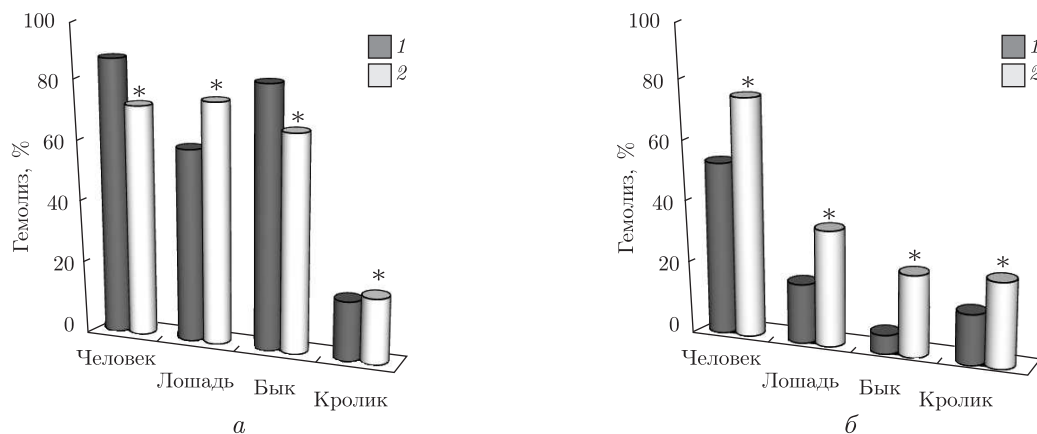


Рис. 1. Уровень гемолиза контрольных (1) и модифицированных фенилгидразином (2) эритроцитов млекопитающих в условиях гипертонического стресса (4,0 М NaCl) при температуре 37 °С (а) и 0 °С (б). * — достоверно отличается по сравнению с контролем, $P_U < 0,05$

Гипертонический стресс эритроцитов осуществляли путем переноса аликвоты суспензии эритроцитов в 1 мл раствора, содержащего 4,0 моль/л NaCl, на 5 мин при 37 или 0 °С. Конечный гематокрит 0,4%. Амфифильные соединения добавляли в гипертоническую среду перед внесением в нее клеток [2]. Содержание гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм.

В работе были использованы децилсульфат натрия (C10) и додецилсульфат натрия (C12) в эффективных концентрациях, при которых наблюдается максимальное снижение гипертонического гемолиза эритроцитов по сравнению с контролем. Значение антигемолитической активности алкилсульфата рассчитывали как процент снижения гемолиза клеток в присутствии эффективной концентрации вещества по отношению к гемолизу в пробе, не содержащей алкилсульфат.

Модификацию цитоскелета эритроцитов фенилгидразином (1 мМ) осуществляли по методу [3].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью ANOVA тестов и критерия Манна–Уитни [StatgraphWin].

Результаты и их обсуждение. В среде, содержащей 4,0 М NaCl, исходный уровень повреждения эритроцитов млекопитающих в значительной степени различается (рис. 1). При 0 °С устойчивость эритроцитов разных видов к гипертоническому воздействию выше, чем при 37 °С. Это может быть связано с тем, что при температуре 0 °С в мембране, характеризующейся более плотной упаковкой липидов [1], процессы развития трансмембранных дефектов затруднены.

Эритроциты кролика в отличие от клеток других млекопитающих проявляют высокую устойчивость к гипертоническому стрессу как при 0 °С, так и при 37 °С. Возможно, это связано с высоким коэффициентом осмотической проницаемости эритроцитарных мембран кролика для воды [4]. По-видимому, быстрый отток воды из эритроцитов кролика при помещении их в гипертоническую среду позволяет уменьшить осмотическую нагрузку на клетки и, как следствие, снизить повреждающее действие гипертонического раствора [1].

Как видно из рис. 1, а, модификация эритроцитов фенилгидразином приводит к снижению уровня гипертонического гемолиза клеток человека и быка и повышению уровня

повреждения клеток лошади (37 °С). Фенилгидразин не изменяет реакцию эритроцитов кролика на гипертонический стресс.

Выявленные разнонаправленные изменения устойчивости эритроцитов млекопитающих к гипертоническому стрессу после обработки клеток фенилгидразином, по-видимому, связаны с видовыми особенностями эритроцитарных мембран млекопитающих. В отличие от клеток человека, быка и кролика, эритроциты лошади лишены белка полосы 4.2 [5]. Данный белок играет важную роль в обеспечении стабильности и гибкости клеточной мембраны [6]. Следовательно, отсутствие белка полосы 4.2 и модификация эритроцитов лошади фенилгидразином может приводить к существенным изменениям взаимодействия белков цитоскелета с эритроцитарной мембраной, что и проявляется в наблюдаемом повышении уровня гипертонического гемолиза этих клеток.

При 0 °С для всех исследуемых эритроцитов, обработанных фенилгидразином, выявлено повышение гипертонической чувствительности по сравнению с контрольными клетками (см. рис. 1, б). Это может быть связано с тем, что низкая температура и фенилгидразин оказывают однонаправленное действие на клетку, а именно значительно уменьшают текучесть мембранных липидов [1, 7]. Вероятно, при комбинированном действии этих двух факторов в клетке происходят настолько сильные изменения, что она теряет способность противостоять повреждающему действию гипертонического стресса.

При изучении влияния алкилсульфатов на гипертонический гемолиз эритроцитов разных видов млекопитающих были определены эффективные концентрации С10 и С12, при которых наблюдался их максимальный антигемолитический эффект (табл. 1). Для исследования антигемолитической активности С10 и С12 в условиях гипертонического стресса эритроцитов млекопитающих, обработанных фенилгидразином, амфифильные вещества использовались в указанных концентрациях.

Как видно из рис. 2, при 37 °С алкилсульфаты с длиной алкильной цепи 10 и 12 углеродных атомов проявляют высокую антигемолитическую активность в условиях гипертонического стресса эритроцитов человека, лошади и быка. Для клеток кролика данные не приведены, поскольку исследуемые алкилсульфаты были неэффективны. Модификация фенилгидразином клеток человека, лошади и быка приводит к снижению антигемолитической активности С10 и С12 в условиях гипертонического стресса при 37 °С, причем для клеток быка указанный эффект максимально выражен. Следует отметить, что независимо от того, как проявляется эффект обработки эритроцитов фенилгидразином в условиях гипертонического стресса — повышается или понижается гипертоническая чувствительность клеток (см. рис. 1), антигемолитическая активность алкилсульфатов снижается (см. рис. 2).

При низкой температуре гипертонической среды антигемолитическая активность алкилсульфатов выявлена только для эритроцитов человека (рис. 3). Значения антигемоли-

Таблица 1. Эффективные концентрации алкилсульфатов при гипертоническом стрессе (4,0 М NaCl) эритроцитов млекопитающих, мкМ

Эритроциты млекопитающих	Децилсульфат натрия		Додецилсульфат натрия	
	37 °С	0 °С	37 °С	0 °С
Человек	45 ± 4	10 ± 1	25 ± 3	15 ± 8
Лошадь	40 ± 2	—	20 ± 2	—
Бык	65 ± 7	—	50 ± 7	—

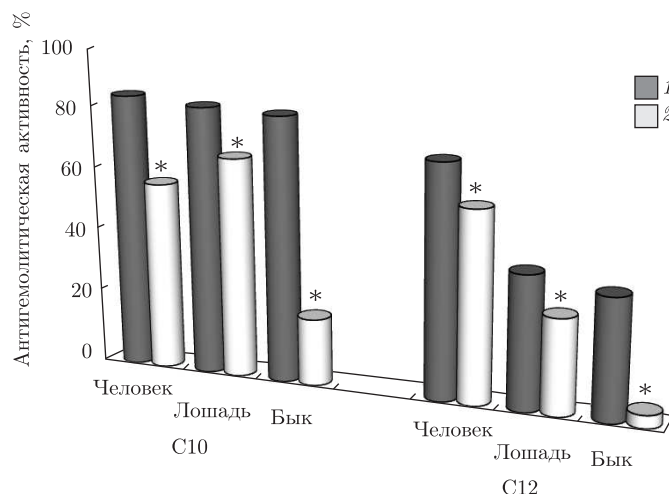


Рис. 2. Антигемолитическая активность алкилсульфатов в условиях гипертонического стресса контрольных (1) и модифицированных фенилгидразином (2) эритроцитов млекопитающих при температуре 37 °С.
* — достоверно отличается по сравнению с контролем, $P_U < 0,05$

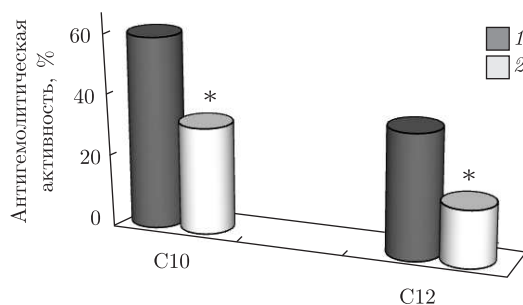


Рис. 3. Антигемолитическая активность алкилсульфатов в условиях гипертонического стресса контрольных (1) и модифицированных фенилгидразином (2) эритроцитов человека при температуре 0 °С.
* — достоверно отличается по сравнению с контролем, $P_U < 0,05$

тической активности C10 и C12 в условиях гипертонического стресса модифицированных фенилгидразином эритроцитов человека снижается примерно в 2 раза.

Антигемолитическую активность амфифильных соединений связывают со способностью этих веществ встраиваться в эритроцитарную мембрану и пертурбировать ее [8, 9]. Обработка эритроцитов фенилгидразином вызывает деградацию спектрина [3], способствует ассоциации цитозольных белков с мембраной и цитоскелетом [10, 11], а также уменьшает текучесть мембранных липидов [7]. Таким образом, в более жесткой мембране (в результате обработки клеток фенилгидразином) процессы встраивания алкилсульфатов и ее реорганизации под влиянием C10 и C12 затруднены, поэтому и наблюдается снижение эффективности амфифильных соединений. Добавление к экспериментальным условиям еще одного фактора (0 °С), действие которого направлено на ужесточение эритроцитарной мембраны [1], проявляется в еще более выраженном падении эффективности алкилсульфатов в условиях гипертонического стресса эритроцитов млекопитающих. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу предполагаемого механизма антигемолитического действия амфифильных соединений [8, 9].

1. Белоус А. М., Грищенко В. И. Кробиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 432 с.

2. Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гипертоническом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия. – 1995. – **60**, № 10. – С. 1624–1631.
3. Arduini A., Storto S., Belfigilo M. et al. Mechanism of spectrin degradation induced by phenylhydrazine in intact human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – **979**, No 1. – P. 1–6.
4. 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. B. – 2011. – **181**, No 1. – P. 65–72.
5. Baskurt O. K., Farley R. A., Meiselman H. J. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study // Amer. J. Physiol. – 1997. – **273**. – P. H2604–H2612.
6. Yawata Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model. – Weinheim: Wiley-VCH, 2003. – 448 p.
7. Fukushima Y., Kon H. On the mechanism of loss of deformability in human erythrocytes due to Heinz body formation: a flow EPR study // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1990. – **102**, No 2. – P. 205–218.
8. Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Inter. – 1991. – **79**. – P. 335–347.
9. Цымбал Л. В., Орлова Н. В., Шпакова Н. М. Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов // Биол. мембраны. – 2005. – **22**, № 4. – С. 327–335.
10. McMillan D. C., Powell C. L., Bowman Z. S. et al. Lipids versus proteins as major targets of pro-oxidant, direct-acting hemolytic agents // Toxicol. Sci. – 2005. – **88**, No 1. – P. 274–283.
11. Ramot Y., Koshkaryev A., Goldfarb A. et al. Phenylhydrazine as a partial model for beta-thalassaemia red blood cell hemodynamic properties // Brit. J. Haematol. – 2008. – **140**, No 6. – P. 692–700.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков

Поступило в редакцию 25.10.2011

Н. А. Ершова, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова

Вплив фенілгідразину і алкілсульфатів на осмотичну чутливість еритроцитів ссавців

Показано, що чутливість еритроцитів ссавців до гіпертонічного стресу при 37 °C після обробки фенілгідразиним залежить від видової приналежності клітин. Встановлено, що модифікація фенілгідразиним еритроцитів ссавців призводить до зниження антигемолітичної активності алкілсульфатів в умовах гіпертонічного стресу.

N. A. Ershova, N. M. Shpakova, N. V. Orlova

Effect of phenylhydrazine and alkylsulfates on osmotic sensitivity of mammalian erythrocytes

It is shown that the sensitivity of mammalian erythrocytes to hypertonic stress at 37 °C after the treatment with phenylhydrazine depends on the species of a cell. We have established that the modification with phenylhydrazine of mammalian erythrocytes leads to a decrease of the alkyl sulfates antihemolytic activity under hypertonic stress.