

ВПЛИВ ГЛЮКОЗИ НА ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ ДО ДІЇ СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ

**О. Шапкіна, К. Семіонова, Н. Шпакова, Н. Орлова, Н. Єршова,
С. Єршов, О. Ніпот***

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
вул. Переяславська, 23, Харків 61015, Україна
e-mail: nipotel71@gmail.com*

Досліджено вплив глюкози (0,6%, 5%) на чутливість еритроцитів людини і тварин (щур, кролик) до гіпертонічного шоку та гіпертонічного криогемолізу. Інкубування з глюкозою приводить до підвищення чутливості еритроцитів людини до обох видів стресу, в той час як клітин щура – тільки до дії гіпертонічного криогемолізу. Обробка еритроцитів кроля глюкозою не супроводжується зміною рівня гемолітичного пошкодження клітин в умовах гіпертонічного шоку і гіпертонічного криогемолізу. Передбачається, що ступінь зміни чутливості еритроцитів ссавців, модифікованих глюкозою, до дії стресових чинників визначається транспортними та якісними характеристиками мембрани, а також видом стресу.

Ключові слова: еритроцити ссавців, глюкоза, гіпертонічний шок, гіпертонічний криогемоліз.

Моделювання патологічних процесів, що відбуваються в організмі ссавців, є важливим напрямом розвитку біологічної науки. Це дає дослідникам змогу детально вивчити патофізіологію хвороби на клітинному рівні й полегшує розробку методів, спрямованих на зменшення негативних наслідків захворювання і на запобігання його подальшому прогресуванню. Відомо, що висока концентрація глюкози *in vivo* є важливим чинником ушкодження тканин при діабеті і старінні організму [3, 4, 6, 17–19]. Зокрема, неферментативне глікозування (глікування) білків і ліпідів зумовлює зниження здатності еритроцитів до деформації. Це позбавляє їх можливості проникати у дрібні судини, що спричиняє такі ускладнення, як ниркова недостатність і ретинопатія [3, 18, 19]. Виходячи з вищевикладеного, експозиція клітин *in vitro* з високими концентраціями глюкози може використовуватись як модель для дослідження ефекту гіперглікемії [9, 16].

Стресові впливи різного роду використовуються як тест-системи з метою виявити зміни, які відбуваються в клітинах під дією ендо- та екзогенних чинників. Поряд із

поширеним методом дослідження осмотичної крихкості, в наукових роботах дедалі частіше використовуються такі методи, як гіпертонічний шок і гіпертонічний криогемоліз [8, 10, 13, 20, 21]. Ці методи нерідко виявляються ефективнішими і мають більший діагностичний потенціал, що обумовлено здатністю кожного з них виявляти певні зміни структурно-функціональних параметрів клітин.

У нашій роботі ми досліджували вплив експозиції еритроцитів людини і тварин (щур, кролик) при різних концентраціях глюкози (0,6%, 5%) на їх чутливість до дії стресових чинників (гіпертонічний шок і гіпертонічний криогемоліз).

Матеріали та методи

Еритроцити отримували з донорської крові людини, щура і кролика, що була заготовлена на консерванті «Глюгіцир». Після видалення плазми еритромасу двічі відмивали шляхом центрифугування при 1500 g протягом 3 хв у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатний буфер, рН 7,4) і зберігали у вигляді щільного осаду не більше двох годин при температурі 0°C. Усі середовища, що використовувалися в роботі готували на 0,01 М фосфатному буфері, рН 7,4.

Аліквоту еритроцитів (гематокрит 20%) поміщали у фізіологічний розчин, що містить глюкозу в концентрації 0 (контроль); 0,6; 5%, та інкубували при 37°C протягом 120 хв. Клітини відмивали від середовищ інкубації шляхом м'якого осадження при центрифугуванні упродовж 7 хв при 1500 об/хв. [18].

Гіпертонічний стрес здійснювали перенесенням 50 мкл суспензії еритроцитів в 1,0 мл розчину NaCl (4,0 М) при температурі 0°C; час інкубації 5 хв; кінцевий гематокрит 0,4%.

Гіпертонічний криогемоліз еритроцитів здійснювали таким чином. 50 мкл суспензії еритроцитів переносили в 1,0 мл розчину NaCl (1,2 М) та інкубували 10 хв при температурі 37°C. Потім аліквоту еритроцитів (50 мкл) переносили в 1,0 мл 1,2 М розчину NaCl, охолодженого до 0°C, й інкубували 10 хв.

Рівень гемолізу визначали спектрофотометричним методом (довжина хвилі 543 нм). Експериментальні результати представлені у вигляді середнього арифметичного \pm стандартна помилка середнього. Статистичну оцінку даних проводили за критеріями Mann-Whitney і ANOVA. Відмінності між групами вважали статистично достовірними при $p < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

На рис. 1 представлені значення гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців після їх інкубації в розчинах глюкози різної концентрації. Видно, що попередня інкубація еритроцитів людини, щура і кролика в 0,6% розчині глюкози не змінює їхню чутливість до гіпертонічного стресу, збільшення концентрації глюкози до 5% призводить до зростання рівня гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, при цьому чутливість еритроцитів тварин не змінюється.

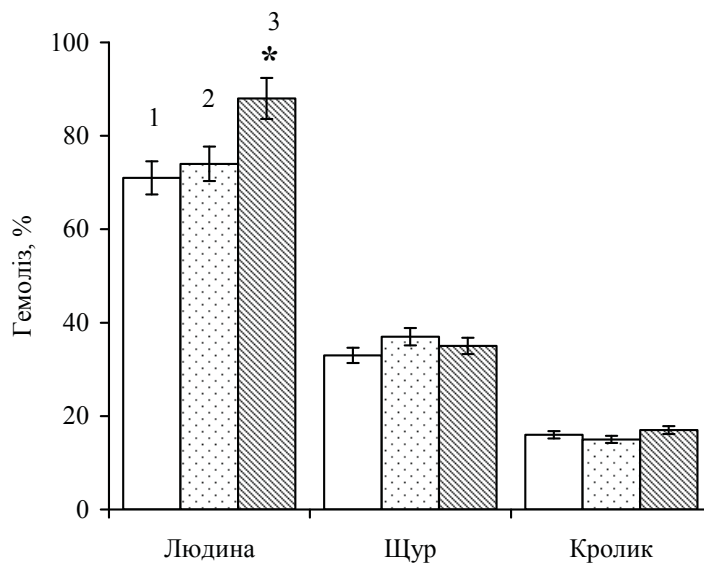


Рис. 1. Залежність рівня гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців при 0°C від концентрації глюкози в середовищі предінкубації: 1 – контроль, 2 – 0,6%, 3 – 5%.

Примітка. * – відмінності статистично значущі в порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

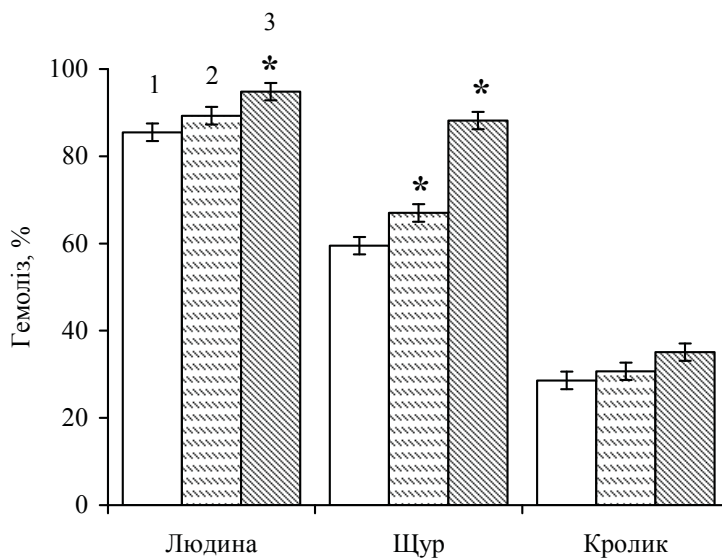


Рис. 2. Залежність рівня гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців від концентрації глюкози в середовищі предінкубації: 1 – контроль, 2 – 0,6%, 3 – 5%.

Примітка. * – відмінності статистично значущі в порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Результати рис. 2 відображають зміну чутливості еритроцитів ссавців після їх інкубації в розчинах глюкози до такого стресового впливу як гіпертонічний криогемоліз. Для еритроцитів щура спостерігається зростання рівня пошкодження при обох використовуваних концентраціях глюкози, для еритроцитів людини – тільки при використанні більшої з концентрацій (5%), рівень пошкодження еритроцитів кролика достовірно не змінюється.

Відомо, що інкубація еритроцитів із глюкозою в концентрації, що перевищує фізіологічну норму, приводить до неферментативного глікозування молекул білків і ліпідів [2, 9, 11, 14, 15].

У нормальних умовах фосфоліпиди, що оточують білкові молекули в бішарі, стабілізують конформаційний стан білків, який є оптимальним для їх функціонування. В результаті глікування фосфоліпідів значно знижується ступінь ліпід-білкової взаємодії, що супроводжується підвищенням чутливості білків до зовнішнього впливу [4]. Безпосередня взаємодія білків із глюкозою змінює їх конформаційний стан і, як наслідок, функціональну активність [6, 7]. У роботі [6] показано зниження активності білків-переносників, зокрема Ca^{2+} -АТФ-ази, при інкубації нативних еритроцитів з глюкозою. Одним із важливих наслідків гіперглікемії також є глікування гемоглобіну, внаслідок чого збільшується внутрішня в'язкість еритроцита і значно зменшується його здатність до деформації [11]. Крім того, в результаті інкубації еритроцитів з глюкозою змінюється динамічна взаємодія білкових компонент цитоскелета, таких як актин, спектрин і білок смуги 4.1 [14], що, у свою чергу, може знижувати здатність еритроцита до деформації та, як наслідок, адаптивні можливості клітини до мінливих умов зовнішнього середовища. Виходячи з вищесказаного, можна припустити, що зміна механічних властивостей мембран еритроцитів ссавців унаслідок глікування білків і фосфоліпідів буде зумовлювати збільшення чутливості клітин до зміни температурно-осмотичних умов середовища.

Ступінь глікування білкових компонентів цитоскелета і гемоглобіну в еритроцитах ссавців буде визначатися внутрішньоклітинною концентрацією глюкози. Як відомо, параметри, що визначають активність транспорту глюкози в еритроцитах ссавців, характеризуються видоспецифічністю. Так, мембрани еритроцитів щура і кролика мають набагато меншу транспортну активність для глюкози порівняно з еритроцитарними мембранами людини [1, 5, 22]. Ґрунтуючись на вищенаведених даних, можна припустити, що в експериментальних умовах, які використовуються в нашій роботі, найбільш інтенсивне накопичення глюкози відбувається в еритроцитах людини, в той час як внутрішньоклітинний вміст глюкози в еритроцитах щура і кролика змінюється меншою мірою. Після обробки еритроцитів ссавців глюкозою підвищення чутливості до гіпертонічного шоку виявлено тільки для еритроцитів людини (рис. 1). Виходячи з цього, можна припустити, що провідним

чинником у зміні чутливості еритроцитів до гіпертонічного шоку будуть зміни, що викликані модифікацією внутрішньоклітинних компонентів мембрани (глікування гемоглобіну і білкових компонентів цитоскелета).

У низці робіт продемонстрована позитивна кореляція між підвищеною концентрацією глюкози в середовищі інкубації еритроцитів людини і рівнем перекисного окислення мембранних ліпідів [4, 9]. Окислення ліпідів приводить до порушення нормальної упаковки бішару, що може викликати порушення функціонування мембранозв'язаних білків. Продукти окислення утворюють міжмолекулярні зшивки, що супроводжується збільшенням ригідності й осмотичної крихкості мембрани еритроцита [9]. Як відомо, перекисному окисленню піддаються ліпіди, що мають у своєму складі поліненасичені жирні кислоти [4]. Еритроцити ссавців відрізняються за фосфоліпідним складом і за вмістом ненасичених жирних кислот. Порівняльний аналіз поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) в еритроцитах ссавців показав нижчий їх вміст у еритроцитах кролика порівняно з еритроцитами людини і щура (в 2–3 рази) [12]. Ці дані дають підстави припустити, що виявлене нами зростання рівня гіпертонічного криогемолізу еритроцитів людини і щура після їх інкубації з глюкозою (рис. 2) пов'язане з високим вмістом ПНЖК у мембранах цих клітин.

Можна зробити висновок, що інкубація еритроцитів людини і щура в розчинах глюкози зумовлює збільшення їх чутливості до дії зовнішніх стресових чинників. Треба відмітити, що чутливість еритроцитів людини підвищується до обох видів стресу при концентрації глюкози 5%, а еритроцитів щура – тільки до дії гіпертонічного криогемолізу при концентраціях глюкози 0,6 та 5%. Таким чином, концентрація глюкози 5% є достатньою для змін у клітинах досліджуваних ссавців, що провокують зростання їх чутливості до стресу. Винятком є еритроцити кроля, обробка яких глюкозою не супроводжується зміною рівня гемолітичного пошкодження клітин в умовах гіпертонічного шоку і гіпертонічного криогемолізу. Ступінь зміни чутливості клітин залежить як від характеристик самих еритроцитів, таких як швидкість транспорту глюкози, фосфоліпідний склад мембрани, так і від виду стресового впливу, місцем прикладання якого можуть слугувати різні компоненти мембрани еритроцитів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Albert S. G.* Cytochalasin B does not serve as a marker of glucose transport in rabbit erythrocytes // *Biochem. Int.* 1984. Vol. 9. N 1. P. 93–103.
2. *Babu N., Singh M.* Influence of hyperglycemia on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2004. Vol. 31. N 4. P. 273–280.

3. *Brown C., Ghali H., Zhao Z.* et al. Association of reduced red blood cell deformability and diabetic nephropathy // *Kidney Int.* 2005. Vol. 67. N 1. P. 295–300.
4. *Bucala R., Makita Z., Koschinsky T.* et al. Lipid advanced glycosylation: Pathway for lipid oxidation in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993. Vol. 90. P. 6434–6438.
5. *Cornford E. M., Hyman S., Swartz B. E.* The human brain GLUT 1 glucose transporter: ultrastructural localization to the blood-brain barrier endothelia // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994. N 14. P. 106–112.
6. *Flecha F. L. G., Bermudez M. C., Cedola N. V.* et al. Decreased Ca^{2+} -ATPase activity after glycosylation of erythrocyte membranes in vivo and in vitro // *Diabetes.* 1990. Vol. 39. P. 707–711.
7. *Flecha F. L. G., Castello P. R., Caride A. J.* et al. The erythrocyte calcium pump is inhibited by non-enzymic glycation: studies in situ and with the purified enzyme // *Biochem. J.* 1993. N 293. P. 369–375.
8. *Hoeksema T., Goekoop J. G., Van Kempen G. M. J.* Hypertonic hemolysis in patients disorder with a mood // *Biol. Psychiatry.* 1996. N 39. P. 11–15.
9. *Jain S. K.* Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. N 35. P. 21340–21345.
10. *King M. J., Zanella A.* Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing // *Int. J. Lab. Hematol.* 2013. Vol. 35. N 3. P. 237–243.
11. *Manno S., Mohandas N., Takakuwa Y.* ATP-dependent mechanism protects spectrin against glycation in human erythrocytes // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. N 44. P. 33923–33929.
12. *Pekiner B., Pennock G. F.* Fatty acids in plasma in red blood cells membranes in humans, rats, rabbits and dogs // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995. Vol. 37. N 2. P. 221–229.
13. *Piagnerelli M., Cotton F., Van Nuffelen M.* et al. Modifications in erythrocyte membrane protein content are not responsible for the alterations in rheology seen in sepsis // *Shock.* 2012. Vol. 37. N 1. P. 17–21.
14. *Resmi H., Akhunlar H., Temiz A. A., Güner G.* *In vitro* effects of high glucose concentrations on membrane protein oxidation, G-actin and deformability of human erythrocytes // *Cell Biochem. Funct.* 2005. Vol. 23. N 3. P. 163–168.
15. *Resmi H., Pekçetin C., Güner G.* Erythrocyte membrane and cytoskeletal protein glycation and oxidation in short-term diabetic rabbits // *Clin. Exp. Med.* 2001. Vol. 1. N 4. P. 187–93.
16. *Riquelmea B., Forestoa P., D'Arrigoa M.* et al. A dynamic and stationary rheological study of erythrocytes incubated in a glucose medium // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2005. N 62. P. 131–141.

17. *Shin S., Ku Y., Babu N., Singh M.* Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. // *Indian. J. Exp. Biol.* 2007. Vol. 45. N 1. P. 121–128.
18. *Shina S., Kub Y.-H., Suhc J.-S., Singh M.* Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose media // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2008. N 38. P. 153–161.
19. *Singh M., Shin S.* Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: a brief review // *Indian. J. Exp. Biol.* 2009. Vol. 47. N 1. P. 7–15.
20. *Streichman S., Kahana E., Tatarsky I.* Hypertonic cryohemolysis of pathologic red blood cells // *Am. J. Hematol.* 1985. Vol. 20. N 4. P. 373–381.
21. *Streichman S., Gescheidt Y.* Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis // *Am. J. Hematol.* 1998. N 58. P. 206–212.
22. *Wagner R., Zimmer G., Lacko L.* An interspecies approach to the investigation of the red cell membrane glucose transporter // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. N 771. P. 99–102.

Стаття: надійшла до редакції 12.05.14

доопрацьована 20.09.14

прийнята до друку 22.09.14

GLUCOSE EFFECT ON SENSITIVITY OF MAMMALIAN ERYTHROCYTES TO STRESS FACTORS

O. Shapkina, E. Semionova, N. Shpakova, N. Orlova, N. Ershova, S. Ershov, E. Nipot

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine

23, Pereyaslavskaya St., Kharkiv 61015, Ukraine

e-mail: nipotel71@gmail.com

The effect of glucose (0.6%, 5%) on sensitivity of human and animal (rat, rabbit) erythrocytes to hypertonic shock and hypertonic cryohemolysis was studied. Incubation with glucose leads to a rise in sensitivity of human erythrocytes to both stress types, meanwhile for rat's cells it does only to the effect of hypertonic cryohemolysis. Treatment of rabbit's erythrocytes with glucose is not accompanied with the changed level of hemolytic damage of cells under conditions of hypertonic shock and hypertonic cryohemolysis. It is supposed that the rate of changes in mammalian erythrocyte sensitivity modified by glucose to the effect of stress factors is determined by transport and qualitative characteristics of membrane, as well as stress effect type.

Keywords: mammalian erythrocytes, glucose, hypertonic shock, hypertonic cryohemolysis.

**ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ К ДЕЙСТВИЮ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ**

**О. Шапкина, Е. Семионова, Н. Шпакова, Н. Орлова, Н. Ершова,
С. Ершов, Е. Нипот**

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

ул. Переяславская, 23, Харьков 61015, Украина

e-mail: nipotel71@gmail.com

Исследовано влияние глюкозы (0,6%, 5%) на чувствительность эритроцитов человека и животных (крыса, кролик) к гипертоническому шоку и гипертоническому криогемолизу. Инкубирование с глюкозой приводит к повышению чувствительности эритроцитов человека к обоим видам стресса, в то время как клеток крысы – только к действию гипертонического криогемолиза. Обработка эритроцитов кролика глюкозой не сопровождается изменением уровня гемолитического повреждения клеток в условиях гипертонического шока и гипертонического криогемолиза. Предполагается, что степень изменения чувствительности эритроцитов млекопитающих, модифицированных глюкозой, к действию стрессовых факторов определяется транспортными и качественными характеристиками мембраны, а также видом стресса.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, глюкоза, гипертонический шок, гипертонический криогемолиз.