

ВПЛИВ БУТАНОЛУ І ГЕКСАНОЛУ НА АНІОННИЙ ТРАНСПОРТ В ЕРИТРОЦИТАХ БАРАНА ТА КУРКИ

О. Ніпот

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

У роботі показано, що **n-гексанол і n-бутанол зменшують швидкість сполуче-**ного з транспортом сульфату і хлору переміщення іонів H^+ в еритроцитах барана та курки, а отже, інгібують аніонний транспорт, опосередкований білком смуги 3. Для гексанолу і бутанолу характерний однаковий ступінь інгібування вивільнення іонів H^+ у ході циклу Якобса-Стюарта для обох видів еритроцитів, що передбачає схожість механізмів їхнього впливу на аніонний переносник. При цьому швидкість транспорту іонів H^+ в еритроцити при дії n-алканолів є вищою у випадку еритроцитів курки, що відображає відмінність параметрів функціонування аніонного обмінника в еритроцитах курки і барана.

Ключові слова: еритроцит, n-бутанол, n-гексанол, аніонний транспорт, цикл Якобса-Стюарта.

Однією з найважливіших функцій, притаманних біологічній мембрані, є її здатність пропускати у клітину та з неї різні речовини. Це має певне значення для саморегуляції та підтримання постійного складу внутрішньоклітинного середовища. Молекули, що мають невелику молекулярну масу, вільно переміщуються крізь ліпідний бішар мембрани, тоді як переміщення іонів і більш крупних молекул здійснюється за допомогою білків-переносників. Одним із таких переносників є білок смуги 3, що виконує функцію обміну аніонів хлориду на аніони бікарбонату. Цей процес є невід'ємною частиною зв'язування та переміщення CO_2 еритроцитами [13]. Крім цього, білок смуги 3 забезпечує такі види транспорту, як H^+/Cl^- і H^+/SO_4^{2-} котранспорт [13].

Замінивши у середовищі іони хлору на іони сульфату, ми можемо оцінити особливості котранспорту $SO_4^{2-}-H^+/Cl^-$ і транспорту HCO_3^-/Cl^- при різних впливах на клітини [2, 3, 6, 11].

При суспендуванні Cl^- -вмісних еритроцитів в ізотонічному середовищі, в якому Cl^- замінений на SO_4^{2-} , відбувається обмін позаклітинних аніонів SO_4^{2-} на внутрішньоклітинні аніони Cl^- . При цьому аніони SO_4^{2-} надходять у клітину в котранспорті з іонами H^+ [4, 14]. Коли протягом усього періоду $Cl^-/SO_4^{2-}-H^+$ обміну в середовищі присутній CO_2 , рН позаклітинного середовища спочатку знижується, що є результатом підвищення концентрації іонів H^+ у зовнішньому середовищі, по мірі залучення в аніонний обмін циклу Якобса-Стюарта. Процес обміну аніонів Cl^- на іони HCO_3^- в циклі Якобса-Стюарта здійснюється в кілька стадій, що і пояснює зміну поведінки рН-кривої при поміщенні клітин у середовище, що містить аніони SO_4^{2-} . На першій стадії внутрішньоклітинний HCO_3^- взаємодіє з H^+ , який дисоціює від гемоглобіну, і за допомогою ферментативного каталізу, що здійснюється внутрішньоклітинним ферментом карбоангідразою, утворюються вуглекислий газ і вода. Далі вуглекислий газ транспортується через мембрану в позаклітинне середовище і гідрується там з утворенням HCO_3^- і H^+ . Іони H^+ залишаються в позаклітинному середовищі, а HCO_3^- транспортується у клітину в обмін на аніони Cl^- . Саме ці транспортні процеси пояснюють зниження рН у першій фазі Cl^-/SO_4^{2-} обміну в сульфатному середовищі.

На наступній стадії процесу аніони сульфату в котранспорті з іонами водню надходять у клітину в обмін на аніон хлору, що викликає залужування суспензії еритроцитів. Це відображається у збільшенні значення рН до встановлення стану рівноваги [4, 7, 14].

Виходячи зі змін рН і змін часу досягнення максимального рівня закислення, можна обчислити швидкість звільнення іонів H^+ у результаті функціонування циклу Якобса-Стюарта і швидкість транспорту іонів H^+ у клітину в котранспорті з іонами SO_4^{2-} в обмін на Cl^- і, таким чином, судити про функціональний стан аніонного обмінника.

Відомо, що **n-алканоли, зокрема, n-бутанол і n-гексанол, які належать до класу загальних анестетиків, здатні модифікувати стан аніонного переносника в еритроцитах людини. Тому було доцільним вивчити їхній вплив на стан аніон-транспортувальної системи еритроцитів тварин і птахів [8–11, 15].**

Матеріали та методи

Кров у птахів (кури) забирали з підкрильцевої вени шприцом. Місце забору попередньо дезінфікували 70% етанолом. Кров забирали у стерильну пробірку (зазвичай в об'ємі 2,0–3,0 мл) на консерванті «Глюгіцир». Зразки зберігали в холодильнику і використовували в день забору. Кров баранів отримували з яремної вени. Ділянку забору вистригали і дезінфікували 70% етанолом. Кров забирали на консерванті «Глюгіцир» у стерильні флакони в об'ємі 250–350 мл і зберігали в холодильнику при $+4^\circ C$. Після видалення плазми еритромасу тричі промивали шляхом центрифугування при 1500 g протягом 3 хв в 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л хлориду натрію, 5 мМ фосфатний буфер). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли методом аспірації. Еритроцити у вигляді щільного осаду зберігали при $+4^\circ C$ і використовували протягом 4 год.

При аналізі еритроцитів методом рН-метрії у кювету, де підтримується постійна температура $37^\circ C$, помішали 2 мл розчину 0,12 ммоль/л сульфату натрію, доводили рН розчином гідроокису натрію до рівня внутрішньоклітинного рН (6,9–7,6), після чого у кювету вносили 50 мкл еритромаси з кінцевим 2% гематокритом і вимірювали зміну рН. Для вивчення впливу спиртів у комірку перед еритроцитами вносили алканоли в різних концентраціях (n-бутанол: 0–342 ммоль/л або n-гексанол: 0–15 ммоль/л) і також проводили вимірювання зміни рН. Запис змін рН суспензії еритроцитів проводили за допомогою рН-електрода на самописці ENDIM (НДР).

Для відносного кількісного порівняння процесів інгібування швидкості звільнення іонів H^+ у результаті функціонування циклу Якобса-Стюарта й інгібування швидкості транспорту іонів H^+ в еритроцити барана та курки були обчислені коефіцієнти інгібування цих процесів у присутності й відсутності алканолів.

Коефіцієнти інгібування алканами (I_{k1} та I_{k2}) обчислювали, відповідно, за формулами:

$$I_k = (1 - K_{\text{алк}} / K_{\text{конт}}) * 100\%,$$

де $K_{\text{алк}}$ і $K_{\text{конт}}$ константи швидкості входу іонів H^+ (для обчислювання I_{k1}) чи вивільнення протонів у циклі Якобса-Стюарта (для обчислювання I_{k2}) у присутності й відсутності алканолів, відповідно. Константу швидкості обчислювали за формулою:

$$K = \ln 10 * (\Delta \text{pH} / \Delta t),$$

де $\Delta \text{pH} = H_{\text{макс}} - H_0$, $\Delta t = t_{\text{макс}} - t_0$,

H_0 , t_0 і $H_{\text{макс}}$, $t_{\text{макс}}$ – параметри, що обчислюються з експериментальних кривих на початку експерименту та в момент максимального закислення $t_{\text{макс}}$, відповідно.

Статистичну обробку проводили з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати і їхнє обговорення

Рис. 1 відображає інгібування обміну іонів H^+ в еритроцитах барана. По мірі збільшення концентрації бутанолу спостерігається поступове зростання коефіцієнта інгібуван-

ня швидкості звільнення іонів H^+ у результаті функціонування циклу Якобса-Стюарта й інгібування швидкості транспорту іонів H^+ в еритроцити барана. Зокрема нами показано, що в присутності бутанолу відбувається блокування котранспорту $SO_4^{2-} - H^+$ на $44 \pm 4\%$ ($n=6$, $p<0,05$), а транспорту HCO_3^-/Cl^- – на $67 \pm 3\%$ ($n=6$, $p<0,05$). **Характер кривих інгібування** дзеркально відображає динаміку зміни кривих швидкості. При концентраціях бутанолу вище 200 мМ спостерігається зменшення інгібування обміну іонів H^+ , особливо для другої фази обміну, тобто котранспорту $SO_4^{2-} - H^+$. Це може бути пов'язане з порушенням бар'єрної функції мембрани при таких високих концентраціях бутанолу. Крім того, нами показано, що при додаванні гексанолу характер інгібування відрізняється від такого, викликаного бутанолом (рис. 2). Зокрема, це проявляється в тому, що при збільшенні концентрації гексанолу спостерігається зростання коефіцієнта інгібування в усьому досліджуваному діапазоні концентрацій. Також слід відзначити, що ступінь інгібування другої фази процесу обміну протонів, а саме, котранспорту $SO_4^{2-} - H^+$ більший порівняно з бутанолом і становить приблизно $58 \pm 3\%$ ($n=6$, $p<0,05$) з $44 \pm 4\%$ ($n=6$, $p<0,05$) відповідно. Останнє може вказувати на більш сильний вплив гексанолу, ніж бутанолу, на ту ділянку білка смуги 3, яка відповідає за котранспорт сульфату і протонів. Можна припустити, що гексанол має більшу спорідненість до цієї ділянки та/або викликає більш виражені конформаційні зміни білка при взаємодії з мембраною. Відмінність динаміки інгібування може також вказувати на різну швидкість зв'язування спиртів з цією ділянкою. Оскільки ступінь інгібування першої фази, а саме HCO_3^-/Cl^- транспорту для обох спиртів збігається, а відрізняється тільки динаміка, можна сказати, що вплив обох спиртів на цю ділянку білка смуги 3 приблизно однаковий і може відрізнятися тільки швидкість зв'язування.

У випадку еритроцитів курки спостерігаються результати, аналогічні отриманим для еритроцитів барана, як для бутанолу (рис. 3), так і для гексанолу (рис. 4). Слід зазначити, що особливістю еритроцитів курки є менший коефіцієнт інгібування другої фази процесу, а саме транспорту іонів водню у клітину, що спостерігається у присутності обох досліджуваних спиртів $28 \pm 4\%$ ($n=6$, $p<0,05$) для бутанолу порівняно з $44 \pm 4\%$ ($n=6$, $p<0,05$) у випадку еритроцитів барана і $45 \pm 3\%$ ($n=6$, $p<0,05$) для гексанолу порівняно з $58 \pm 3\%$ ($n=6$, $p<0,05$) у випадку еритроцитів барана. Це може вказувати на особливості функціонування обмінника, відмінності в його конформації в еритроцитах різних видів, а також у взаємодії з ним алканолів.

Отримані в даній роботі результати узгоджуються з даними, наведеними в попередніх роботах [1, 9], де вивчався вплив n-алканолів на кінетику зв'язування інгібітора аніонного транспорту DBDS і визначалися константи швидкості входу іонів водню для еритроцитів людини, а також показано інгібуючий вплив n-бутанолу та n-гексанолу на транспорт аніонів. Цей факт передбачає схожість у функціонуванні аніонного переносника в еритроцитах людини, барана та курки. У роботі [9] припускається, що n-бутанол зв'язується безпосередньо з білком смуги 3, а n-гексанол опосередковує свій ефект за рахунок зміни ліпідного мікрооточення. Результати наших експериментів показують однакову ефективність як n-бутанолу, так і n-гексанолу при інгібуванні швидкості вивільнення іонів H^+ для еритроцитів барана та курки, що передбачає схожість механізмів їхнього впливу на аніонний переносник. Оскільки доведено пряму взаємодію n-бутанолу зі сайтом зв'язування нековалентного аніонного інгібітора DBDS з білком смуги 3 [9], можна припустити, що n-бутанол і n-гексанол безпосередньо взаємодіють з білком смуги 3, проте з різними його ділянками. На користь цього слугує їхня однакова ефективність при інгібуванні швидкості вивільнення іонів H^+ у результаті функціонування циклу Якобса-Стюарта в еритроцитах різних видів, що значно розрізняються за фосфоліпідним складом [13]

і структурою мембрани [12]. Відповідно важко припустити однаковий ступінь спорідненості алканолів до ліпідної фази досліджуваних еритроцитів як фактора, що визначає їхній вплив на білок смуги 3. Відмінності в початковій швидкості транспорту протонів усередину клітини, які спостерігаються у еритроцитів різних видів (дані не наведені), можливо, можна пояснити різним вмістом білка смуги 3 в цих еритроцитах [12], і, відповідно, різною інтенсивністю транспортного процесу, що оцінюється шляхом визначення транспорту іонів саме через білок смуги 3.

n-Гексанол і n-бутанол зменшують швидкість транспорту іонів H^+ в еритроцитах курки і барана, сполученого з транспортом Cl^- і SO_4^{2-} , що вказує на інгібування транспорту аніонів, опосередкованого білком смуги 3. При цьому швидкість транспорту іонів H^+ при дії n-алканолів є вищою у випадку еритроцитів курки, що відображає відмінність параметрів функціонування обмінників Cl^-/HCO_3^- і Cl^-/SO_4^{2-} - H^+ в еритроцитах курки і барана.

При вивільненні іонів H^+ у ході циклу Якобса-Стюарта n-гексанол і n-бутанол проявляють однакову ефективність щодо обох видів еритроцитів, а це передбачає схожість механізмів їхнього впливу на аніонний переносник.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Hinom E. E., Melikova S. B., Ali Salamkh Al-Salaymeh I., Bondarenko V. A. Влияние бутанола и гексанола на анионный транспорт в эритроцитах // Вісн. Харків. ун-ту. 2006. Вип. 2(16). № 716. С. 25–29.
2. Рамазанов В. В., Лупилова Н. А., Тодрин А. Ф., Бондаренко Т. П. Осмотическая модификация транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде // Проблемы криобиологии. 1999. № 4. С. 34–41.
3. Рамазанов В. В., Нардид Я. О., Олейник О. А., Бондаренко В. А. Влияние ПЭГ-1500 на связывание дипиридамола с анионным каналом эритроцитов // Проблемы криобиологии. 2003. № 4. С. 25–33.
4. Bisognano J. D., Dix J. A., Pratar P. R. et al. Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic response of human red blood cells // J. Gen. Physiol. 1993. Vol. 102. P. 99–123
5. Bruce L. J., Beckmann R., Ribeiro M. L. et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane // Blood. 2003. Vol.101. N 10. P. 4180–4188.
6. Brahm J. Temperature-dependent changes of chloride transport kinetics in human red cells // J. Gen. Physiol. 1977. Vol. 70. P. 283–306.
7. Castranova V., Weise M. J., Hoffman J. F. Anion Transport in dog, cat and human red cells. Effects of varying cell volume and Donnan ratio // J. Gen. Physiol. 1979. Vol. 74. P. 319–334.
8. Hemmings H. C. Jr., Akabas M. H., Goldstein P. A. et al. Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action // Trends Pharmacol. Sci. 2005. Vol. 10. P. 503–510.
9. 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 // Biochem. 1985. N 24. P. 4859–4866.
10. Franks N. P. Molecular targets underlying general anaesthesia // Br. J. Pharmacol. 2006. Vol. 147. N 1 P. 72–81.
11. Makriyannis A., Fesik S. W. Effects of anesthetics on sulfate transport in the red cell // J. Neurosci. Res. 1980. Vol. 5 N 1. P. 25–33.
12. Matei H., Frentescu L., Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // J. Cell. Mol. Med. 2000. Vol. 4. N 4. P. 270–276.
13. Nouri-Sorkhabi M. H., Agar N.S., Sullivan D. R. et al. Phospholipid composition of erythrocyte membranes and plasma of mammalian blood including Australian marsupials; quantitative ^{31}P NMR analysis using detergent // Comp. Biochem. Physiol. 1996. Vol. 113B. N 2. P. 221–227.

14. Romano L., Passow H. Characterization of anion transport system in trout red blood cell // Am. J. Physiol. 1984. Vol. 246. P. 330–327.
15. Red cell membranes – a methodological approach / Eds. Ellory J.C., Young J.D. Ltd. etc.: Acad. Press. 1982. 369 p.
16. Tas P. W., Kress H. G., Koschel K. General anesthetics can competitively interfere with sensitive membrane proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. N 16. P. 5972–5975.

Стаття: надійшла до редакції 28.11.11

доопрацьована 13.02.12

прийнята до друку 14.02.12

EFFECT OF BUTANOL AND HEXANOL ON THE ANION TRANSPORT IN RAM AND HEN RED BLOOD CELLS

E. Nipot

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine
23, Pereyaslavskaya St., Kharkov 61015, Ukraine
e-mail: nipotel@mail.ru*

It is shown that n-hexanol and n-butanol decrease the rate of transport of H⁺ ions in red blood cells associated with sulfate and chloride transport, and thus inhibit the anion transport mediated by a protein band 3. The results of our experiments show identical degree of inhibition of transport of H⁺ ions during Jakobs-Stewart's cycle for both kinds red blood cells that assumes similarity of mechanisms of their influence on the anion transporter. At the same time rate of transport of ions H⁺ into red blood cells with n-alkanols is higher for hens erythrocytes than ram erythrocytes that evidence of difference of parameters of anion transporter in ram and a hen erythrocytes.

Keywords: red blood cell, n-butanol, n-hexanol, anionic transport, cycle Jacobs-Stewart.

ВЛИЯНИЕ БУТАНОЛА И ГЕКСАНОЛА НА АНИОННЫЙ ТРАНСПОРТ В ЭРИТРОЦИТАХ БАРАНА И КУРИЦЫ

Е. Нипот

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23, Харьков 61015, Украина
e-mail: nipotel@mail.ru*

В работе показано, что п-гексанол и п-бутанол уменьшают скорость сопряженного с транспортом сульфата и хлора транспорта ионов H⁺ в эритроцитах барана и курицы, а, следовательно, ингибируют анионный транспорт, опосредованный белком полосы 3. Для бутанола и гексанола характерна одинаковая степень ингибирования освобождения ионов H⁺ в ходе цикла Якобса-Стюарта для обоих видов эритроцитов, что предполагает схожесть механизмов их влияния на анионный переносчик. При этом скорость транспорта ионов H⁺ в эритроциты при действии п-алканолов выше в случае эритроцитов курицы, что указывает на отличие параметров функционирования анионного переносчика в эритроцитах барана и курицы.

Ключевые слова: эритроцит, п-бутанол, п-гексанол, анионный транспорт, цикл Якобса-Стюарта.