

ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ТА ПРИКЛАДНІ ПРОБЛЕМИ БІОФІЗИКИ І ФІЗІОЛОГІЇ
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОФИЗИКИ И ФИЗИОЛОГИИ
FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS OF BIOPHYSICS AND PHYSIOLOGY

УДК 57.03 : 57.044

© О. И. Доценко, Е. О. Драгущенко
ВЛИЯНИЕ АЛЛОКСАНА НА ГЕМОЛИТИЧЕСКУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ
И АТФ-АЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

Донецкий национальный университет; 83050, г. Донецк, ул. Щорса, 46
e-mail: dots_don@ukr.net

Доценко О. И., Драгущенко Е. О. Влияние аллоксана на гемолитическую устойчивость и АТФ-азную активность эритроцитов. – В работе анализируются зависимости "доза – эффект" для области концентраций аллоксана 10^{-4} – 10^{-9} М. В качестве измеряемых характеристик, отражающих действие аллоксана на клетку, использовали кинетические параметры кислотного гемолиза эритроцитов и активность трансмембранного фермента АТФ-азы.

Ключевые слова: аллоксан, эритроциты, кинетические параметры гемолиза, АТФ-азная активность.

Введение

Аллоксан в соответствующих дозах вызывает гибель инсулинпродуцирующих β -клеток в островках поджелудочной железы *in vivo*, что связывается с продуцированием во внеклеточной среде и непосредственно в β -клетках супероксидных радикалов ($O_2^{\cdot-}$) [1, 2]. Согласно свободнорадикальной теории диабетогенеза в островке β -клеток поджелудочной железы аллоксан восстанавливается до диалуриновой кислоты, и после его автоокисления образуются $O_2^{\cdot-}$ и перекись водорода (как продукт ферментативного дисмутирования $O_2^{\cdot-}$) [3]. Образующаяся H_2O_2 по реакциям Габера-Вейса ($Fe^{+3} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Fe^{+2} + O_2$) и Фентона ($H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow HO\cdot + HO^- + Fe^{+3}$) является источником высокотоксичных для различных биосистем гидроксильных радикалов ($HO\cdot$). В частности, $HO\cdot$ нарушает синтез инсулина, выброс инсулина [4], метаболизм глюкозы и потребление кислорода [5]. В 1967 г. Съе и Буарон, исследуя диабетогенное действие аллоксана, установили: если инъекции концентрированного аллоксана предшествует введение потенцированного аллоксана, то сахарный диабет у мышей не развивается. Если же вначале вводится концентрированный аллоксан и лишь потом потенцированный аллоксан, то диабет развивается в слабой форме.

Аллоксановый диабет позволяет моделировать поведение организма при инсулиновой недостаточности, что позволяет более глубоко изучить данный процесс.

В связи с вышесказанным *цель* работы состояла в изучении влияния различных доз аллоксана (10^{-4} – 10^{-9} М) на гемолитическую устойчивость и АТФ-азную активность эритроцитов.

Материал и методы исследования

Раствор аллоксана ($C=1 \cdot 10^{-3}$ М) готовили растворением точной навески в физиологическом растворе.

Для приготовления суспензии эритроцитов 0,02 мл крови вносили в 10 мл физиологического раствора.

Суспензию эритроцитов с добавками различных доз аллоксана инкубировали при $37^\circ C$ в течение 3-х часов. В ходе исследования были изучены серии растворов с концентрациями аллоксана в них 10^{-4} – 10^{-9} М. Каждые 20 мин проводили кислотный гемолиз и определяли АТФ-азную активность. В качестве контроля использовали пробу, содержащую вместо аллоксана 0,2 мл физиологического раствора (без инкубирования). Контрольную серию суспензий эритроцитов, не содержащую аллоксан, также инкубировали в течение 3-х часов и каждые 20 мин определяли исследуемые показатели.

Изучение *динамики кислотного гемолиза* проводили на длине волны 650 нм (длина волны, при которой оптическая плотность образцов зависит от светорассеяния эритроцитовой массы).

Измерения оптической плотности взвеси эритроцитов после добавления равного количества гемолитика производили с временным интервалом 1 сек в автоматическом режиме. По спектрам поглощения гемолиза рассчитывали первые производные спектров (эритрограммы), которые использовали для анализа положения и интенсивности максимумов эритрограмм и определения константы гемолиза $(k_{t_{1/2}})$ -величины, обратной времени полураспада клеток. $k_{t_{1/2}} = 1/t_{1/2}$, $t_{1/2}$ – время, за которое распадается 50% клеточной фракции.

Однако величина $k_{t_{1/2}}$ дает усредненную характеристику гемолиза. На самом деле этот процесс многоступенчатый, и на кинетической кривой можно выделить ряд стадий.

Установлено, что скорость гемолиза эритроцитов хорошо описывается кинетическими уравнениями первого порядка с независимой от времени константой скорости k_2 . В этом случае для зависимости оптической плотности D от времени t справедливы соотношения:

$$\frac{dD}{dt} = -k_2 D \quad (1)$$

$$D_t = D_0 e^{-k_2 t} \quad (2)$$

$$\ln D_t = -k_2 t + \ln D_0 \quad (3)$$

Согласно уравнению 3 между логарифмом оптической плотности раствора и временем гемолиза должна наблюдаться линейная зависимость, и по тангенсу угла наклона касательной, проведенной к линейному участку зависимости $\ln D - t$, можно определить константу скорости выхода гемоглобина из клетки.

Абсцисса точки пересечения двух касательных, проведенных через точки лаг-фазы и наклонного линейного участка, соответствует времени (t_l) окончания подготовительных процессов в клетке и началу выхода гемоглобина [6]. t_l находили совместным решением двух уравнений. Первое уравнение – уравнение касательной, проведенной к горизонтальному участку зависимости $\ln D - t$, второе уравнение – уравнение касательной, проведенной к наклонному участку зависимости $\ln D - t$. Константа скорости лаг-фазы $k_1 = 1/t_l$.

Активность АТФ-азы эритроцитов определяли по количеству неорганического фосфора, образованного при ферментативном гидролизе АТФ [7]. Реакцию проводили добавлением к 0,5 мл гемолизата 1,5 мл инкубационной среды, содержащей АТФ. В эксперименте использовали инкубационные среды следующего состава (мМ): среда 1 – NaCl – 125, KCl – 25, MgCl₂ – 3, ЭДТА – 0,5, АТФ – 2, трис-НСl – 50, рН 7,4; среда 2 – KCl – 125, MgCl₂ – 3, ЭДТА – 0,5, АТФ – 2, трис-НСl – 50, рН 7,4. Пробу инкубировали 1 час при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл ТХУ 45%. После этого пробу центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. В надосадочной жидкости определяли количество фосфат-ионов, используя цветную реакцию с молибдатом аммония. Количество неорганического фосфора рассчитывали с использованием калибровочной зависимости, построенной для растворов калия фосфорнокислого однозамещенного (KH₂PO₄) точной концентрации.

Ферментативную активность выражали в мкМ фосфат-ионов, образуемых в процессе ферментативного гидролиза АТФ за 1 мин, в пересчете на 1 мг Hb в пробе.

Все эксперименты выполнялись в трех повторностях. При построении зависимостей, приводимых ниже, использовались усредненные данные. Статистический анализ полученных результатов проводили в программе Statistica. Достоверность различий между среднегрупповыми показателями оценивали с помощью непараметрического рангового критерия Уилкоксона и факторного анализа.

Результаты и обсуждение

Для определения кинетических параметров гемолиза использовали зависимости $\ln D - t$. Изменение времени завершения лаг-фазы гемолиза по отношению к контролю от двух факторов – концентрации введенного аллоксана и времени инкубирования – показано на рис. 1.

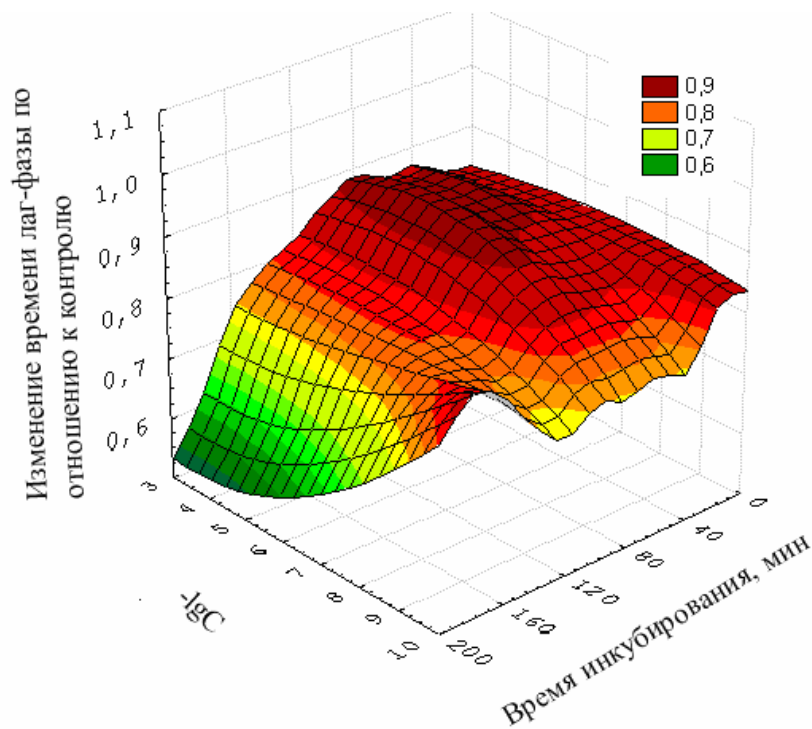


Рис. 1. Изменение времени лаг-фазы гемолиза по отношению к контролю от двух факторов – концентрации введенного аллоксана и времени инкубирования.

Для эритроцитов, инкубируемых с аллоксаном в концентрациях 10^{-4} и 10^{-5} М, время завершения лаг-фазы ниже контроля и сокращается с увеличением времени инкубирования. Для эритроцитов, инкубируемых с аллоксаном в концентрациях 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} М, время протекания лаг-фазы в течение первых 20-ти минут эксперимента ниже контроля, а затем наблюдается рост лаг-фазы. Через 100 мин от начала эксперимента время протекания лаг-фазы приближается к уровню контроля для суспензий, содержащих аллоксан в концентрациях 10^{-6} , 10^{-7} М, и, через 80 мин – 10^{-8} М. Для эритроцитов, инкубируемых с аллоксаном в концентрации 10^{-9} М, время протекания лаг-фазы вначале эксперимента находится на уровне контроля и затем, с увеличением времени инкубирования, снижается.

Зависимость среднего времени завершения лаг-фазы по отношению к контролю от концентрации введенного аллоксана показана на рис. 2, А. Точке 0 соответствует изменение среднего времени завершения лаг-фазы по отношению к контролю серии суспензий эритроцитов, инкубируемых без аллоксана при 37°C . Видно, что снижение концентрации аллоксана в среде инкубирования приводит к росту среднего времени лаг-фазы гемолиза. Среднее время протекания лаг-фазы максимально для концентраций аллоксана 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} М. Обращает на себя внимание тот факт, среднее время протекания лаг-фазы сильно снижается при концентрации аллоксана 10^{-9} М (рис. 2, А).

На рис. 2, Б показана полученная нами зависимость "доза – эффект" для параметра $k_{t_{1/2}}$. Этот параметр находится в противофазе ко времени завершения лаг-фазы гемолиза. При концентрациях аллоксана 10^{-6} , 10^{-7} М $k_{t_{1/2}}$ практически находится на уровне контроля, выше и ниже указанных концентраций средние значения $k_{t_{1/2}}$ достоверно превышают $k_{t_{1/2}}$ (среднее), полученное для контрольной серии (эритроциты инкубировали в среде без аллоксана в течение 3-х часов).

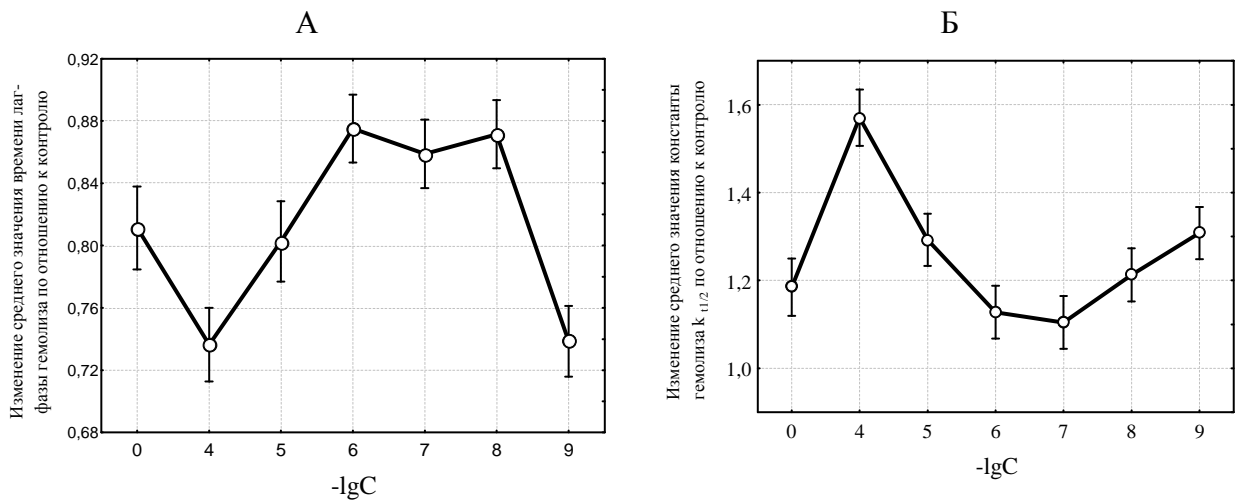


Рис. 2. Изменение среднего времени завершения лаг-фазы гемолиза (А) и усредненных значений $k_{t_{1/2}}$ (Б) по отношению к контролю в зависимости от концентрации введенного аллоксана.

На рис. 3, А показано изменение константы гемолиза (константы скорости выхода гемоглобина из клетки) в зависимости от двух факторов: концентрации введенного аллоксана и времени инкубирования. Самые высокие константы гемолиза фиксируются для систем с концентрацией аллоксана 10^{-4} М. В конце эксперимента константы гемолиза для суспензий эритроцитов с данной концентрацией аллоксана в 1,85-2 раза превышают уровень контроля. Уменьшение концентрации аллоксана приводит к снижению констант гемолиза. Тенденция изменения средних значений констант скоростей выхода гемоглобина относительно уровня контроля показана на рис. 3, Б. Видно, что самые высокие значения констант гемолиза наблюдаются в сериях с аллоксаном, присутствующем в концентрациях 10^{-4} и 10^{-5} М. Снижение концентраций аллоксана приводит к снижению константы гемолиза k_2 .

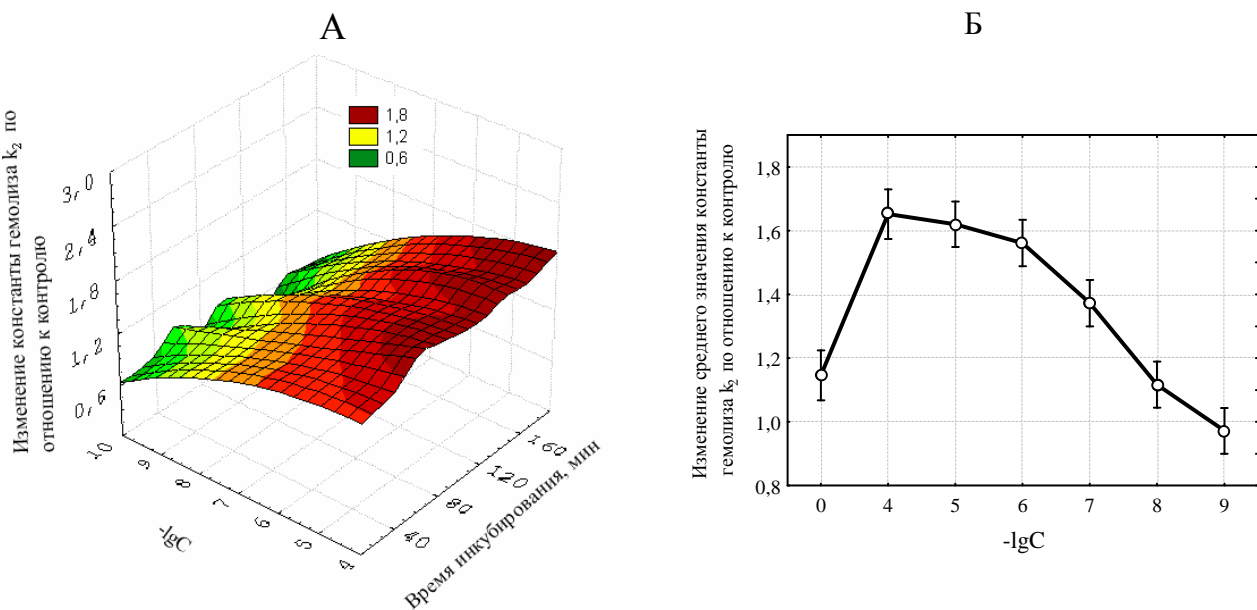


Рис. 3. А – изменение константы гемолиза k_2 по отношению к контролю от двух факторов – концентрации введенного аллоксана и времени инкубирования; Б – изменение среднего значения константы гемолиза k_2 по отношению к контролю в зависимости от концентрации введенного аллоксана.

Одним из наиболее чувствительных показателей влияния физических факторов на состояние плазматической мембраны является изменение активности мембраносвязанных ферментов. Одним из важнейших мембраносвязанных ферментов эритроцитов является АТФ-аза. Как известно, этот фермент, кроме активного центра, имеет два типа кардинальных центров связывания для ионов K^+ и Na^+ , оказывающих влияние друг на друга. В связи с этим активность АТФ-азы в значительной степени зависит от концентраций этих ионов во внутриклеточной и внеклеточной среде [8]. Среда 1, с высоким содержанием ионов Na^+ (125 мМ) и низким K^+ , обеспечивает оптимальную активность АТФ-азы. Высокое содержание ионов K^+ в среде (состав среды 2) инактивирует фермент, поскольку эти ионы обладают высоким сродством не только к собственным центрам, но и к Na^+ -центрам.

На рис. 4. показано изменение активности АТФ-азы по отношению к контролю от двух факторов – концентрации введенного аллоксана и времени инкубирования.

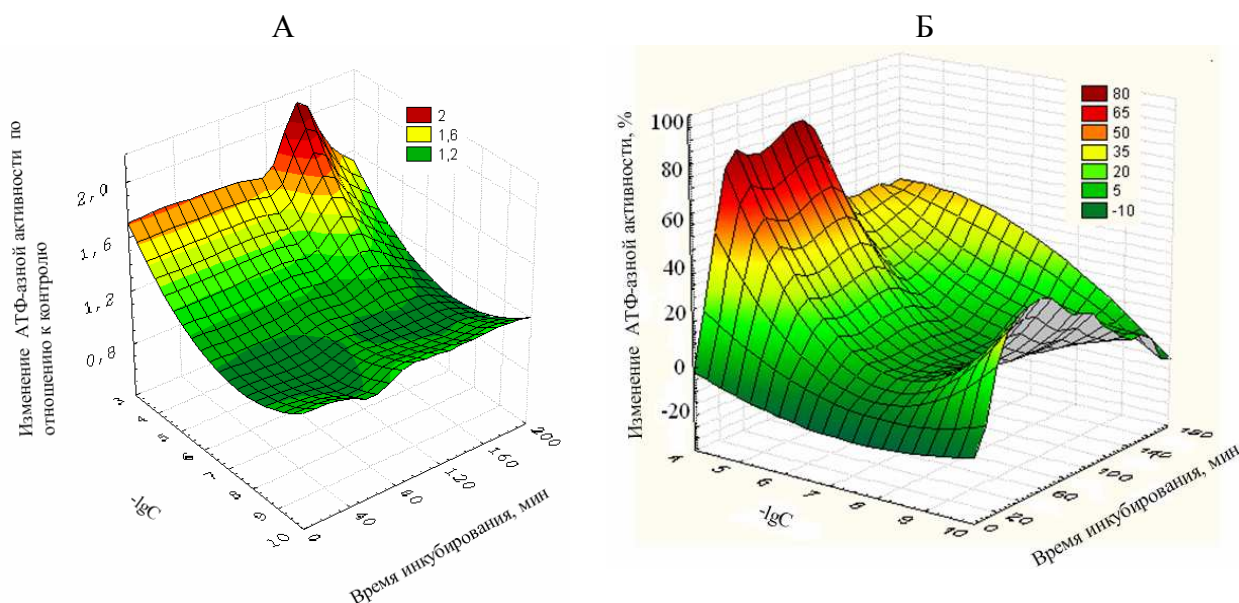


Рис. 4. А – изменение активности АТФ-азы по отношению к контролю от двух факторов – концентрации введенного аллоксана и времени инкубирования, определенной в среде 1; Б – изменение активности АТФ-азы (в %), определенной в среде 2, относительно активности, определенной в среде 1.

Отмечено увеличение активности мембраносвязанной АТФ-азы эритроцитов от концентрации аллоксана в среде инкубирования. Видно (рис. 4, А), что концентрации аллоксана 10^{-6} , 10^{-7} М достоверно не изменяют активности АТФ-азы по сравнению с контролем. Снижение концентрации аллоксана до 10^{-9} М приводит к росту (незначительному, в 1,2 раза относительно контроля) активности АТФ-азы.

В среде 2 (не содержащей ионов Na^+ , с высокой концентрацией K^+) активность АТФ-азы эритроцитов, не подвергавшихся действию аллоксана, снижается в среднем на $8,87 \pm 1,87\%$ (рис. 4, Б, точка "0" на временной шкале). Однако АТФ-азная активность эритроцитов, инкубированных предварительно с аллоксаном в концентрациях 10^{-4} , 10^{-5} М, существенно возрастает (инкубирование в течение 90 мин приводит к росту активности на 60-80%). Полученные результаты свидетельствуют о том, что аллоксан связывается с белками эритроцитов, занимая места в центрах связывания калия. Увеличение концентрации K^+ в среде может снижать действие аллоксана (как это описано для уабаина [9]). Кроме того, рост АТФ-азной активности в среде 2 свидетельствует также о накоплении ионов Na^+ внутри клетки. При действии аллоксана в течение 90 мин в концентрации 10^{-6} М активность фермента в среде 2 снижается на 2-6%, а в концентрации 10^{-7} М активность остается ниже (на 3-7%), по сравнению со средой 1, в течение всего эксперимента. Таким образом, аллоксан в концентрациях 10^{-6} и 10^{-7} М не оказывает значимого влияния на структуру и свойства

связанной воды, поэтому увеличение концентрации K^+ в среде практически полностью снимает его действие. Аллоксан в концентрациях 10^{-8} и 10^{-9} М оказывает более выраженное действие на клетку, что находит свое отражение в росте АТФ-азной активности в среде, не содержащей Na^+ .

Полученные результаты по активности АТФ-азы хорошо согласуются с приводимыми выше данными по изменению времени протекания лаг-фазы гемолиза и $k_{t_{1/2}}$.

Эффекторное действие вещества может быть обусловлено его неспецифическим связыванием с мембранами, с определенными участками белка, а также с изменением подвижности и структуры приповерхностной воды, влияющей на конформацию белка. Кроме того [9], вода может связываться, поляризоваться и ориентироваться самой Na,К-зависимой АТФ-азой.

Увеличение активности Na,К-зависимой АТФ-азы может быть связано с изменением взаимодействий цитоскелет мембрана, возникающих при изменении подвижности и структуры приповерхностной воды, влияющей на конформацию белка. Это предположение кажется более вероятным, о чем свидетельствует эффект низких концентраций аллоксана (10^{-9} М).

В настоящее время показано [10], что при действии малых и сверхмалых доз на биологические объекты могут наблюдаться достоверные эффекты как отличающиеся от обнаруженных при действии больших доз, так и совпадающие с ними. Отсутствие эффекта при достижении "достаточно больших" (или "достаточно низких") концентраций не означает его отсутствия при действии более высоких (более низких) концентраций. Так, например, мы наблюдали отсутствие эффекта аллоксана в области концентраций 10^{-6} – 10^{-7} М. Факт отсутствия биологического ответа в этой области является одной из необъясненных закономерностей эффектов действия малых доз, наблюдаемых практически во всех экспериментальных работах.

Выводы

1. Аллоксан, связываясь с группами белков эритроцитов, оказывает дестабилизирующее действие на клетку, что находит свое отражение в увеличении лаг-фазы гемолиза эритроцитов, параметра $k_{t_{1/2}}$, увеличении активности Na,К-зависимой АТФ-азы в среде с высоким содержанием K^+ , не содержащей Na^+ . Полученные экспериментальные данные указывают на дестабилизацию внутриклеточной воды эритроцитов и накопление Na^+ внутри клетки.

2. Аллоксан в концентрациях 10^{-6} и 10^{-7} М не оказывает значимого влияния на структуру и свойства связанной воды, в связи с чем увеличение концентрации K^+ в среде практически полностью снимает его действие.

Список литературы

1. *Grankvist K.* Influence of trace metals on alloxan cytotoxicity in pancreatic islets / K. Grankvist, S. Marklund, I. B. Täljedal // FEBS Lett. – 1979. – V. 105. – P. 15–18.
2. *Fischer L. J.* Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator / L. J. Fischer, S. A. Hamburger // Diabetes. – 1980. – V. 29 (3). – P. 213–216.
3. *Szkudelski T.* The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas / T. Szkudelski // Physiol. Res. – 2001. – V. 50. – P. 536–546.
4. *Idahl L. A.* Alloxan cytotoxicity in vitro. Inhibition of rubidium ion pumping in pancreatic beta-cells / L. A. Idahl, A. Lernmark, J. Sehlin, I. B. Täljedal // Biochem. J. – 1977. – V. 162. – P. 9–18.
5. *Borg H.* Effects in vitro of alloxan on the glucose metabolism of mouse pancreatic B-cells / H. Borg, S. J. Eide, A. Anderson, C. Hellerström // Biochem. J. – 1979. – V. 182. – P. 797–802.

6. Черницкий Е. А. Термогемолиз эритроцитов / Е. А. Черницкий, И. В. Ямайкина // Биофизика. – 1988. – Т. 33, вып. 2. – С. 319–322.
7. Рязанцев Н. В. Структурные нарушения и изменения активности $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ в мембранах эритроцитов у пациентов с неврологическими расстройствами / Н. В. Рязанцев, В. В. Новицкий // Бюлл. эксп. биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 7. – С. 85–88.
8. Blostein R. Side-specific Effects of Sodium on $(\text{Na,K})\text{-ATPase}$. Studies with inside-out red cell membrane vesicles / R. Blostein // J. Biol. Chem. – 1979. – V. 254. – P. 6673–6677.
9. Линг Г. Физическая теория живой клетки: незамеченная революция / Г. Линг. – СПб.: Наука, 2008. – 376 с.
10. Гуревич К. Г. Закономерности и возможные механизмы действия сверхмалых доз биологически активных веществ / К. Г. Гуревич // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2, химия. – 2002. – Т. 42, № 2. – С. 131–134.

Доценко О. І., Драгущенко Е. О. Вплив аллоксану на гемолітичну стійкість та АТФ-азну активність еритроцитів. – У роботі аналізуються залежності "доза – ефект" для області концентрацій аллоксану $10^{-4}\div 10^{-9}$ М. У якості вимірюваних характеристик, що відбивають дію аллоксану на клітину, використовували кінетичні параметри кислотного гемолізу еритроцитів та активність трансмембранного ферменту АТФ-ази.

Ключові слова: аллоксан, еритроцити, кінетичні параметри гемолізу, АТФ-азна активність.

Dotsenko O. I., Dragushchenko E. O. Influence alloxan on haemolytic stability and ATP-ase activity erythrocytes. – In this work were analyzed the dependences "dose – effect" for range of alloxan's concentration $10^{-4}\div 10^{-9}$ mol/l. As the measured characteristics reflecting action of alloxan on a cell used kinetic parameters erythrocytes of the acid haemolysis and transmembrane enzyme ATP-ase activity.

Key words: alloxan, erythrocytes, kinetic parameters haemolysis, ATP-ase activity.