

УДК 577.352.4:612.111

ВЛИЯНИЕ N-БУТАНОЛА И N-ГЕКСАНОЛА НА АНИОННЫЙ ТРАНСПОРТ В ЭРИТРОЦИТАХ

Е.Е. НИПОТ¹, С.В. МЕЛИХОВА¹, И. АЛИ-САЛАМЕХ АЛЬ САЛАЙМЕХ²,
В.А. БОНДАРЕНКО²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина

Поступила в редакцию 30 ноября 2005 г.

В работе исследовалось влияние n-бутанола и n-гексанола на анионный транспорт в эритроцитах человека, барана и курицы. Анионный транспорт измерялся опосредованно путем регистрации изменения pH внеклеточной среды. Известно, что изменение pH происходит в результате $\text{Cl}^-/\text{HSO}_4^-$ обмена при помощи анионного обменника – белка полосы 3. В работе вычисляется константа скорости входа ионов водорода K_2 . Как n-бутанол так и n-гексанол уменьшают константу скорости входа ионов водорода в эритроцитах всех исследуемых видов, что свидетельствует о замедлении HSO_4^- транспорта в клетку в присутствии n-алканолов. Таким образом, можно предположить, что как n-бутанол так и n-гексанол взаимодействуют с белком полосы 3 в эритроцитах, изменяя его функциональное состояние.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроцит, n-бутанол, n-гексанол, анионный транспорт, цикл Якобса-Стьюарта.

Согласно современным представлениям, однонаправленный поток анионов, а также их обменный транспорт обеспечивается белком полосы 3, имеющим каналоподобную структуру [5, 6, 14]. Одна из функций белка полосы 3 заключается в осуществлении $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обмена, который играет важную роль в процессе транспорта CO_2 эритроцитами [13]. Помимо этого белок полосы 3 обеспечивает другие виды транспорта, такие как H^+/Cl^- котранспорт и $\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}$ котранспорт [13]. Параллельно с обменным процессом белок полосы 3 обеспечивает проводимость для однонаправленных потоков анионов Cl^- , которые могут индуцироваться как вследствие снижения их концентрации во внеклеточной среде, так и вследствие осмотического воздействия, а также в результате увеличения проницаемости мембраны для катионов [5, 6].

При изучении воздействия различных веществ на мембрану, включая те из них, которые способны оказать влияние на транспорт анионов, важное значение для выяснения механизма их действия может иметь исследование влияния модификаторов, функциональное состояние переносчика и его транспортные сайты. n-Алканолы, в частности, n-бутанол и n-гексанол относятся к классу общих анестетиков, механизм действия которых на клетки активно изучается. Классические представления о действии анестетиков на мембрану, связанные с встраиванием молекул в липидную фазу мембраны, в последнее время дополняются новыми данными о влиянии n-алканолов на трансмембранный транспорт [7, 8, 10, 15], связывание с рецепторами [7, 9], ингибирование или активирование мембраносвязанных ферментов [7]. С этой точки зрения представляло интерес изучение влияния спиртов на состояние белка полосы 3 эритроцитов, играющего важную роль в процессах анионного обмена и выступающего в качестве фактора, контролирующего стабильность мембраны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах были использованы эритроциты крови человека, барана и курицы, заготовленной на консерванте "Глюгицир". Клетки трижды отмывали по стандартной методике. Упакованный осадок эритроцитов хранили при 4°C и использовали в течении 3-4 часов.

Полученные эритроциты использовали в экспериментах на pH метре, сопряженном с самописцем и термостатируемой ячейкой. В термостатируемую ячейку помещали по 2 мл раствора 0,1 мМоль/л сульфата натрия (37 °С), содержащего различные концентрации n-алканолов (n-бутанол: 0-342 ммоль/л или n-гексанол: 0-15 ммоль/л), доводили pH раствором гидроокиси натрия до уровня внутриклеточного pH (6,9-7,1), после чего в ячейку вносили по 50 мкл эритроцитной массы с конечным 2% гематокритом и производили измерение изменения pH. Запись изменений pH суспензии эритроцитов производили с помощью pH-электрода на самописце «Эндим» (ГДР).

Обмен внутриклеточного хлорида на внеклеточный сульфат в незабуференной среде сопровождается последовательно фазой закисления и фазой защелачивания суспензии эритроцитов [13]. Транспорт протонов из клетки и в клетку можно представить реакциями первого порядка:



В данном случае кинетика процесса описывается системой уравнений:

$$\begin{aligned} -\frac{d[H_i]}{dt} &= k_1[H_i] \\ -\frac{d[H_o]}{dt} &= k_2[H_o] \end{aligned} \quad (2)$$

Разделение переменных и интегрирование уравнений (2) при начальных условиях: $t=0$, $[H_i] = [H_i]^0$, $[H_o] = [H_o]^0$ даёт:

$$[H_i] = [H_i]^0 \exp(-k_1 t) \quad (3)$$

$$[H_o] = [H_o]^0 \exp(-k_2 t)$$

Подстановка уравнений (2) в (3) приводит систему (3) к виду:

$$\begin{aligned} -\frac{d[H_i]}{dt} &= k_1[H_i]^0 \exp(-k_1 t) \\ -\frac{d[H_o]}{dt} &= k_2[H_o]^0 \exp(-k_2 t) \end{aligned} \quad (4)$$

В данных экспериментальных условиях, поскольку значения рН равны в начале и в конце эксперимента, количество протонов, транспортируемое из клетки, равно количеству протонов, поступивших в клетку. Следовательно, $[H_i]^0 = [H_o]^0 = [H]^0$. С учётом этого, комбинирование системы уравнений (4):

$$-\frac{d[H]}{dt} = [H]^0 [k_1 \exp(-k_1 t) - k_2 \exp(-k_2 t)] \quad (5)$$

Интегрирование приводит уравнение (5) к виду:

$$[H] = [H]^0 [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)] \quad (6)$$

Экспериментальная двухфазная рН кривая имеет максимум в момент времени $t_{\text{макс}}$, определяемый уравнением (6):

$$-\left(\frac{d[H]}{dt}\right)_{t=t_{\text{макс}}} = [H]^0 [k_1 \exp(-k_1 t_{\text{макс}}) - k_2 \exp(-k_2 t_{\text{макс}})] = 0 \quad (7)$$

откуда

$$t_{\text{макс}} = \ln \left(\frac{k_2 / k_1}{k_2 - k_1} \right) \quad (8)$$

Соответственно, максимальная концентрация протонов

$$[H]_{\text{макс}} = [H]^0 \left[\left(\frac{k_2}{k_1} \right)^{-1/(k_2/k_1-1)} - \left(\frac{k_2}{k_1} \right)^{-(k_2/k_1)/(k_2/k_1-1)} \right] \quad (9)$$

С помощью численного решения системы уравнений (8) и (9) и используя экспериментальные параметры $t_{\text{макс}}$, $[H]_{\text{макс}}$, $[H]^0$, можно рассчитать константы k_1 и k_2 . Перенос протонов через мембрану эритроцитов определяется по сдвигу значения рН во внеклеточной среде, поэтому $[H]^0 = [H]_o - [H]_e$; $[H]_{\text{макс}} = [H]_{\text{макс}} - [H]_o$, где $[H]_o$, $[H]_{\text{макс}}$, $[H]_e$ - концентрации протонов в среде в начале эксперимента, в момент $t_{\text{макс}}$ и при максимальном закислении в отсутствие анионов в изотонической сахарозе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе оценка функционального состояния белка полосы 3 эритроцитов производилась на основе экспериментального анализа процесса транспорта ионов H^+ , сопряженного с транспортом

Влияние n-бутанола и n-гексанола на анионный транспорт в эритроцитах

анионов в среде, в которой анионы Cl^- замещены на анионы SO_4^{2-} . При суспендировании Cl^- -содержащих эритроцитов в изотонической среде, в которой Cl^- замещен на SO_4^{2-} , происходит обмен внеклеточных анионов SO_4^{2-} на внутриклеточные анионы Cl^- . При этом анионы SO_4^{2-} поступают в клетку в котранспорте с ионами H^+ [13, 14]. В отсутствие CO_2 во внеклеточной среде pH раствора повышается в течение нескольких секунд, а затем выходит на плато. Напротив, когда на протяжении всего периода $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-} - \text{H}^+$ обмена в среде присутствует CO_2 , pH внеклеточной среды понижается, что является результатом повышения концентрации ионов H^+ в наружной среде по мере вовлечения в анионный обмен цикла Якобса-Стойарта.

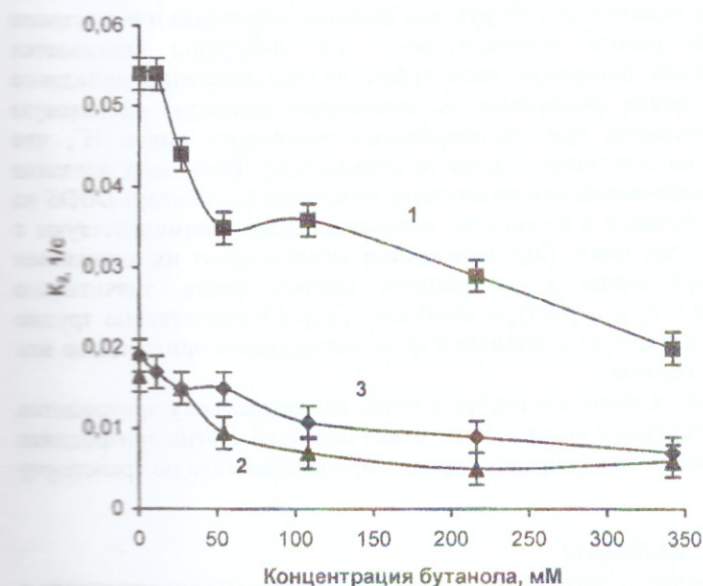


Рис. 1. Влияние n-бутанола на скорость транспорта ионов H^+ в эритроциты: 1 - человека, 2 - барана, 3 - курицы.

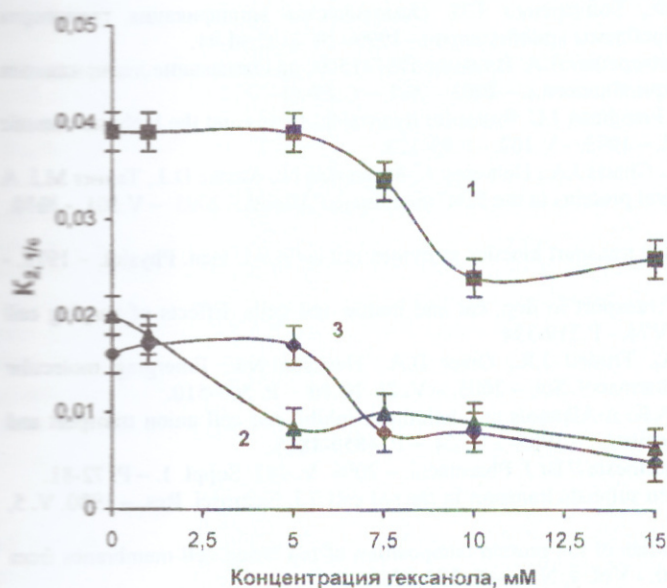


Рис. 2. Влияние n-гексанола на скорость входа ионов H^+ в эритроциты: 1 - человека, 2 - барана, 3 - курицы.

Под влиянием карбоангидразы, связанной с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 [5], из CO_2 образуется HCO_3^- , который быстро обменивается на внутриклеточный Cl^- до тех пор, пока не установится равновесие $[\text{HCO}_3^-]_i/[\text{HCO}_3^-]_o = [\text{Cl}^-]_i/[\text{Cl}^-]_o$. Это равновесие не достигается до тех пор, пока не установится Доннановское равновесие по SO_4^{2-} в процессе $\text{Cl}^-/\text{HSO}_4^-$ обмена [6]. Согласно с литературными данными [1, 2, 13], инкубирование эритроцитов в среде, содержащей 0,11 Моль/л Na_2SO_4 , приводит сначала к закислению, а затем к сдвигу pH в щелочную сторону. Соответственно можно говорить о том, что изменение pH представляет собой двухфазный процесс, включающий фазу закисления и фазу защелачивания. Исходя из изменений pH и времени достижения максимального уровня закисления, можно вычислить скорость поступления в клетку ионов H^+ , поступающих в котранспорте с ионами SO_4^{2-} в обмен на Cl^- и таким образом судить о функциональном состоянии анионного обменника.

На рис. 1 изображена зависимость скорости транспорта ионов H^+ в эритроциты разных видов от концентрации n-бутанола. Видно, что по мере увеличения концентрации n-бутанола скорость транспорта ионов H^+ уменьшается у всех видов эритроцитов примерно в 3 раза. Наряду с этим следует отметить, что начальная скорость транспорта в случае эритроцитов человека примерно в 3 раза больше по сравнению с эритроцитами барана и курицы.

Аналогичные результаты при действии на эритроциты n-гексанола представлены на рис. 2. Видно, что как и при действии n-бутанола, по мере увеличения концентрации n-гексанола в среде инкубации скорость транспорта ионов H^+ уменьшается у всех видов

эритроцитов примерно в 3 раза. Полученные данные указывают на то, что как п-гексанол, так и п-бутанол замедляют котранспорт $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}^+$ в эритроциты, а следовательно и анионов Cl^- из клеток и, таким образом, ингибируют анионный транспорт, опосредуемый белком полосы 3.

Полученные в данной работе результаты согласуются с данными, приведенными в более ранней работе [8], в которой изучалось влияние п-алканолов на кинетику связывания ингибитора анионного транспорта DBDS с белком полосы 3 и также показано ингибирующее влияние п-бутанола и п-гексанола на транспорт анионов. Однако, в этой работе предполагалось, что п-бутанол связывается непосредственно с белком полосы 3, а п-гексанол опосредует свой эффект за счет изменения липидного микроокружения транспортера. Результаты наших экспериментов показывают примерно одинаковую эффективность как п-бутанола так и п-гексанола при ингибировании транспорта ионов H^+ , что предполагает схожесть механизмов влияния на состояние анионного переносчика. Поскольку доказано прямое взаимодействие п-бутанола с сайтом связывания нековалентного анионного ингибитора DBDS на белке полосы 3 можно предположить, что п-бутанол и п-гексанол непосредственно взаимодействуют с белком полосы 3, однако с различными его участками. Подтверждением этому служит их одинаковая эффективность при действии на транспорт ионов у эритроцитов разных видов, значительно различающихся по фосфолипидному составу [12] и структуре мембраны [11]. Соответственно трудно предположить одинаковую степень сродства алканолов к липидной фазе исследуемых эритроцитов как фактора, определяющего их влияние на белок полосы 3.

Различия в начальной скорости транспорта протонов внутрь клетки, наблюдаемые у эритроцитов разных видов, возможно можно объяснить различным содержанием белка полосы 3 в этих эритроцитах [11], и, соответственно различной выраженностью транспортногo процесса, оцениваемого по транспорту ионов через белок полосы 3.

ВЫВОДЫ

1. п-Гексанол и п-бутанол уменьшают скорость транспорта ионов H^+ в эритроциты сопряженного с транспортом сульфата и хлора, а следовательно ингибируют анионный транспорт, опосредованный белком полосы 3.
2. Эффективность п-бутанола и п-гексанола при ингибировании транспорта анионов одинакова для эритроцитов человека барана и курицы, что может указывать на взаимодействие спиртов именно с белковой фазой мембраны.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. 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.
3. Bisognano J.D., Dix J.A., Pratar P.R., Novak T.S., Freedman J.C. Proton(or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic response of human red blood cells // J. Gen. Physiol. - 1993. - V 102. - P.99-123.
4. Bruce L.J., Beckmann R., Ribeiro M.L., Peters L.L., Chasis J.A., Delaunay J., Mohandas N., Anstee D.J., Tanner M.J. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane // Blood. - 2003. - V.101. - №10. - P.4180-4188.
5. Brahm J. Temperature-dependent changes of chloride transport kinetics in human red cells // J. Gen. Physiol. - 1977. - V.70. - P. 283-306.
6. 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. -V74. - P.319-334
7. Hemmings H.C.Jr., Akabas M.H., Goldstein P.A., Trudell J.R., Orser B.A., Harrison N.L. Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action // Trends Pharmacol. Sci. - 2005. - V. 26, N. 10. - P. 503-510.
8. 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. - V. 24. - P. 4859-4866.
9. Franks N.P. Molecular targets underlying general anesthesia // Br J. Pharmacol. - 2006. V. 147, Suppl. 1. - P. 72-81.
10. Makriyannis A., Fesik S.W. Effects of anaesthetics on sulphate transport in the red cell // J. Neurosci. Res. - 1980. V. 5, N. 1. - P. 25-33.
11. 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.
12. Nouri-Sorkhabi M.H., Agar N.S., Sullivan D.R., Gallagher C., Kuchel P.W. Phospholipid composition of erythrocyte membranes and plasma of mammalian blood including Australian marsupials; quantitative ^{31}P NMR analysis using detergent // Comp. Biochem. Physiol. - 1996. - V. 113B, N. 2. - P. 221-227.
13. Romano L., Passow H. Characterization of anion transport system in trout red blood cell //Am. J. Physiol. - 1984. - V. 246. - P. 330-327.
14. Red cell membranes - a methodological approach / Edited by J.C. Ellory, J.D. Young et al.: Academic Press. - 1982. - 369 p.

Влияние n-бутанола и n-гексанола на анионный транспорт в эритроцитах

15. Tas P.W., Kress H.G., Koschel K. General anesthetics can competitively interfere with sensitive membrane proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1987. - V. 84, N. 16. - P. 5972-5975.