

Н. М. Шпакова, Е. Е. Нипот, О. А. Шапкина,  
Е. А. Семионова, Н. В. Орлова

## Влияние глюкозы на устойчивость эритроцитов млекопитающих к механическому стрессу

(Представлено академиком НАН Украины А. Н. Гольцевым)

*Исследовано влияние глюкозы (5%) на чувствительность эритроцитов млекопитающих (человек, крыса, кролик) к механическому стрессу. Показано, что наиболее чувствительны к обработке глюкозой эритроциты человека, для которых характерно наличие повреждения после инкубации с глюкозой даже без воздействия механического стресса. В то же время предварительная обработка глюкозой эритроцитов кролика не оказывает влияния на чувствительность клеток к механическому стрессу. Предполагается, что различная чувствительность к обработке глюкозой эритроцитов исследуемых млекопитающих обусловлена особенностями транспортных характеристик их мембран по отношению к этому метаболиту.*

Эритроциты животных широко используются в доклинических экспериментах по изучению и коррекции различных патофизиологических состояний человека [1–3]. Одной из широко изучаемых проблем в настоящее время является диабет. Повышенное содержание глюкозы в крови приводит к изменению механических свойств эритроцитов, в результате чего снижается их способность проходить по капиллярам, уменьшается площадь контакта клетки с поверхностью сосудов и, как следствие, снижается кислородтранспортная функция [4, 5]. В качестве модели гипергликемического состояния при диабете, когда содержание глюкозы в крови превышает физиологическую норму, используют инкубацию эритроцитов в растворах глюкозы. Объектом в модельных экспериментах чаще всего служат эритроциты крысы и кролика, которые отличаются от эритроцитов человека по составу цитоплазмы, способности к деформации, активности транспортных путей, фосфолипидному и белковому составу мембраны [6–8].

Цель работы — в сравнительном аспекте исследовать влияние глюкозы на чувствительность эритроцитов человека и животных (крыса и кролик) к механическому стрессу (МС).

**Материалы и методы.** Для исследования использовали эритроциты, полученные из донорской крови человека, кролика и крысы, заготовленной на гемоконсерванте “Глюгидир”. Заготовку крови животных и все манипуляции проводили в соответствии с отечественными и международными биоэтическими нормами.

После удаления плазмы эритроциты трижды отмывали путем центрифугирования (центрифуга ОПН-ЗУ4.2, 3000 об/мин, 3 мин) в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. Эритроциты хранили в виде плотного осадка не более 4 ч при 0 °С.

Аликвоту эритроцитов (гематокрит 20%) помещали в физиологический раствор, содержащий глюкозу в концентрации 5%, и инкубировали при 37 °С 120 мин. Клетки отмывали

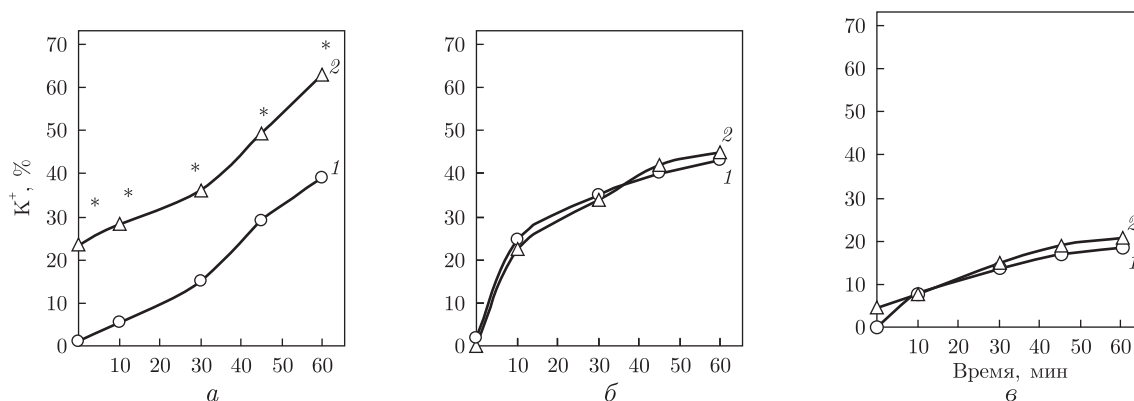


Рис. 1. Влияние механического стресса на выход катионов  $K^+$  из эритроцитов человека (а), крысы (б) и кролика (в): 1 — контрольные клетки, 2 — клетки, обработанные глюкозой (5%).  
\* — статистически значимые различия по сравнению с показателями контрольных клеток ( $p < 0,05$ ); количество наблюдений в каждой группе — 7

от среды инкубации путем мягкого осаждения при центрифугировании в течение 7 мин при 1500 об/мин (центрифуга ОПн-8).

Клетки подвергали действию МС путем перемешивания клеточной суспензии (гематокрит 20%), помещенной в емкость, заполненную пластиковыми шариками диаметром 5 мм, при комнатной температуре (22 °С). Объем суспензии — 5 мл, количество пластиковых шариков — 31. Перемешивание осуществлялось с помощью магнитной мешалки ММ-5, скорость вращения — 1200 об/мин [9]. Через определенные временные интервалы (5–60 мин) производили отбор суспензии эритроцитов для определения выхода гемоглобина и ионов калия из клеток.

Уровень гемолиза эритроцитов определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм и выражали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон Х-100 в концентрации 0,1%.

Для определения выхода ионов калия из эритроцитов использовали ионометрический метод. Измерение проводили на ионометре универсальном ЭВ-74 с использованием ион-селективного электрода ЭЛИС-121 К и электрода сравнения ЭВЛ-1МЗ.1. Измерение концентрации ионов  $K^+$  проводили в супернатанте суспензии эритроцитов (гематокрит 20%). 100% выход ионов калия из эритроцитов получали путем разрушения клеток в результате 3-разового цикла замораживания–оттаивания.

Статистическую обработку полученных числовых данных проводили с помощью программы “Statistica” (версия 6.0). Для проверки статистической значимости различий исследуемых числовых показателей применяли критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

**Результаты и их обсуждение.** Эритроциты млекопитающих после продолжительного инкубирования с глюкозой в концентрации 5% (что выше нормального содержания глюкозы в плазме примерно в 50 раз [2, 3, 10]) подвергали действию МС, который использовали для оценки свойств мембран.

На рис. 1 и 2 представлены графики зависимости выхода катионов калия из клеток и уровня гемолиза от продолжительности действия МС. Видно, что с увеличением времени действия стресса возрастает степень повреждения эритроцитов млекопитающих. Анализ потери эритроцитами млекопитающих катионов  $K^+$  (см. рис. 1) показал, что наиболее

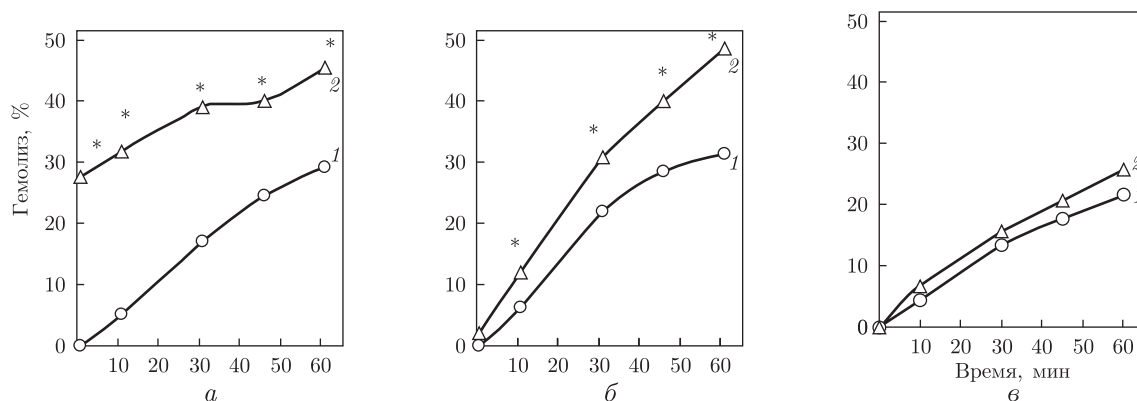


Рис. 2. Влияние механического стресса на уровень гемолиза эритроцитов человека (а), крысы (б) и кролика (в): 1 — контрольные клетки, 2 — клетки, обработанные глюкозой (5%).

\* — статистически значимые различия по сравнению с показателями контрольных клеток ( $p < 0,05$ ); количество наблюдений в каждой группе — 7

устойчивыми к МС по этому показателю являются эритроциты кролика. Чувствительность клеток человека и крысы примерно одинакова при продолжительном действии МС (до 60 мин), в то время как при кратковременном действии стрессового фактора (10–30 мин) потеря эритроцитами крысы катионов  $K^+$  более интенсивна по сравнению с клетками человека. Предварительная обработка эритроцитов млекопитающих глюкозой не оказывает влияние на выход катионов  $K^+$  из клеток крысы и кролика в условиях МС. В случае эритроцитов человека глюкоза стимулирует потерю катионов клетками, в то время как при действии самого МС различия между контрольными и обработанными глюкозой клетками не обнаружены.

Анализ временных зависимостей механического гемолиза эритроцитов млекопитающих свидетельствует о возрастании степени повреждения эритроцитов с увеличением времени действия стресса (см. рис. 2). При непродолжительном действии МС наиболее интенсивный рост степени повреждения наблюдается для клеток крысы (30 мин), хотя при 60-мин действии МС величины гемолиза эритроцитов человека и крысы становятся соизмеримыми. Меньше всего действию МС подвержены эритроциты кролика, при этом клетки, предварительно инкубированные с глюкозой, повреждаются в той же степени, что и контрольные. Эритроциты крысы, предварительно проинкубированные в среде, содержащей глюкозу, повреждаются сильнее, чем контрольные клетки. Характерной особенностью эритроцитов человека является наличие повреждения после инкубации с глюкозой даже без воздействия МС, что согласуется с данными работы [5].

Следует отметить, что различия между эритроцитами млекопитающих, проинкубированными с глюкозой, в условиях МС более выражены при оценке состояния клеток по гемолитическому показателю, чем при измерении потери катионов  $K^+$  клетками.

Сравнивая данные по выходу калия (см. рис. 1, а) и соответствующие гемолитические кривые (см. рис. 2, а), можно отметить, что уровень выхода катионов калия для эритроцитов человека превышает уровень гемолиза при одинаковом воздействии стресса как для контрольных клеток, так и для эритроцитов, проинкубированных с глюкозой. На основании представленного материала можно сделать вывод о гетерогенности популяции эритроцитов человека в условиях действия МС: часть эритроцитов разрушается полностью (из них выходят микро- и макромолекулы), а для иной части клеток характерно нарушение только

барьерной функции мембраны по отношению к катионам  $K^+$ . Для эритроцитов крысы показатели уровня выхода калия (см. рис. 1, б) и гемолиза (см. рис. 2, б) отличаются только для контрольных клеток, т. е. инкубация с глюкозой меняет популяционные характеристики клеток крысы. Для контрольных и модифицированных глюкозой эритроцитов кролика показатели уровня выхода калия (см. рис. 1, в) и гемолиза (см. рис. 2, в) совпадают, т. е. клетки в пределах популяции обладают одинаковой чувствительностью к механическому воздействию.

Глюкоза является основным энергетическим субстратом эритроцита. Ее транспорт в клетку осуществляется с помощью специальных переносчиков [11, 12]. Однако, как свидетельствуют последние исследования, вид переносчика и скорость транспорта глюкозы через мембрану эритроцитов разных видов млекопитающих могут значительно различаться [1, 12]. По скорости транспорта глюкозы в клетку исследуемые виды млекопитающих можно расположить следующим образом: человек > крыса > кролик [1, 12]. Высокая скорость проникновения глюкозы в эритроциты человека определяет их роль в транспорте глюкозы к органам и тканям и в поддержании ее концентрации в плазме [10]. В работе [10] утверждается, что транспортная емкость мембран эритроцитов человека в 12 тыс. раз превышает скорость утилизации глюкозы этими клетками. Полагают [11], что эритроциты животных, не относящихся к приматам, обладают свойством накапливать глюкозу только на начальных этапах развития организма, для эритроцитов взрослых особей эта особенность не характерна. Хотя в работе [13] показана способность эритроцитов крысы накапливать глюкозу, однако уровень ее накопления существенно уступает клеткам человека [10]. Из вышеприведенных литературных данных следует, что при одинаковых условиях инкубации клетки человека будут наиболее интенсивно накапливать глюкозу. Значительное увеличение внутриклеточной концентрации глюкозы приводит к гликозилированию белков цитоскелета, гемоглобина и аминофосфолипидов внутреннего монослоя мембраны [14, 15], что может сопровождаться изменением липид-белковых взаимодействий, нарушением взаимодействия белков цитоскелета и, как следствие, нарушением целостности мембран эритроцитов. Возможно, именно этим обусловлено наблюдаемое повреждение эритроцитов человека при инкубации с глюкозой (см. рис. 1, а, 2, а). Обладающие меньшей способностью накапливать глюкозу эритроциты крысы при том же времени инкубации не демонстрируют явного повреждения, однако накапливают некие “скрытые повреждения”, которые проявляются при воздействии на них МС (см. рис. 1, б, 2, б). Эритроциты кролика, как видно из рис. 1, в и 2, в, практически не подвергаются негативному влиянию избыточных концентраций глюкозы, проявляя одинаковую чувствительность к МС контрольных и проинкубированных с глюкозой клеток.

Таким образом, инкубация эритроцитов с избыточной концентрацией глюкозы приводит к изменениям, которые являются характерными для эритроцитов определенного вида млекопитающего. Так, эритроциты человека оказались наиболее чувствительными к повышенной концентрации глюкозы среди исследуемых млекопитающих, в то время как эритроциты кролика, проинкубированные с глюкозой, практически не отличались от контрольных клеток по чувствительности к МС. Можно сделать вывод, что при использовании эритроцитов животных в модельных экспериментах с целью переноса полученных результатов на эритроциты человека следует учитывать особенности клеток изучаемого вида животных.

1. Albert S. G. Cytochalasin B does not serve as a marker of glucose transport in rabbit erythrocytes // *Biochem. Int.* – 1984. – 9, No 1. – P. 93–103.

2. Resmi H., Pekçetin C., Güner G. Erythrocyte membrane and cytoskeletal protein glycation and oxidation in short-term diabetic rabbits // Clin. Exp. Med. – 2001. – **1**, No 4. – P. 187–193.
3. Yapislar H., Aydogan S. Effect of carnitine on erythrocyte deformability in diabetic rats // Arch. Physiol Biochem. – 2012. – **118**, No 5. – P. 265–272.
4. 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. – **62**. – P. 131–141.
5. Shin S., Ku Y.-H., Suh J.-S., Singh M. Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose media // Clin. Hemorheol. Microcirc. – 2008. – **38**, No 3. – P. 153–161.
6. Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // Eur. Biophys. J. – 2002. – **31**, No 2. – P. 145–152.
7. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel // Eur. Biophys. J. – 2013. – **42**, No 1. – P. 33–46.
8. 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. – **4**, No 4. – P. 270–276.
9. Пат. 52701 Україна, МПК <sup>8</sup> G 01 No 33/48. Спосіб деструкції еритроцитів / Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, Д. І. Александро́ва; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № у 201000983; Заявл. 01.02.2010. – Опубл. 10.09.2010, Бюл. № 17.
10. Jacques J. A. Red blood cell as glucose carrier significance for placental and cerebral glucose transfer // Am. J. Physiol. – 1984. – **246**, No 3, pt. 2. – P. R289–298.
11. Montel-Hagen A., Blanc L., Boyer-Clavel M. et al. The Glut1 and Glut4 glucose transporters are differentially expressed during perinatal and postnatal erythropoiesis // Blood. – 2008. – **112**, No 12. – P. 4729–4738.
12. Wagner R., Zimmer G., Lacko L. An interspecies approach to the investigation of the red cell membrane glucose transporter // Biochim. Biophys. Acta. – 1984. – **771**, No 1. – P. 99–102.
13. Guarner V., Alvarez-Buylla R. Erythrocytes and glucose homeostasis in rats // Diabetes. – 1989. – **38**, No 4. – P. 410–415.
14. Bucala R., Makita Z., Koschinsky T. et al. Lipid advanced glycosylation: Pathway for lipid oxidation in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1993. – **90**, No 14. – P. 6434–6438.
15. 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. – **23**, No 3. – P. 163–168.

Институт проблем кріобіології і кріомедицини  
НАН України, Харків

Поступило в редакцію 06.10.2014

Н. М. Шпакова, О. Є. Ніпот, О. О. Шапкіна, К. А. Семіонова, Н. В. Орлова

## Вплив глюкози на стійкість еритроцитів ссавців до механічного стресу

Досліджено вплив глюкози (5%) на чутливість еритроцитів ссавців (людина, щур, кролик) до механічного стресу. Показано, що найбільш чутливі до обробки глюкозою еритроцити людини, для яких характерна наявність пошкодження після інкубації з глюкозою навіть без впливу механічного стресу. У той же час попередня обробка глюкозою еритроцитів кролика не впливає на чутливість клітин до механічного стресу. Передбачається, що різна чутливість до обробки глюкозою еритроцитів досліджуваних ссавців обумовлена особливостями транспортних характеристик їх мембран по відношенню до цього метаболіту.

N. M. Shpakova, E. E. Nipot, O. A. Shapkina, E. A. Semionova, N. V. Orlova

### Glucose effect on the resistance of mammal erythrocytes to mechanical stress

*We have studied the glucose (5%) effect on the resistance of mammal (human, rat, rabbit) erythrocytes to a mechanical stress. Human erythrocytes are shown to be the most sensitive to the glucose treatment, they are characterized by a damage after the incubation with glucose even without exposure to a mechanical stress. However, the pretreatment of rabbit erythrocytes with glucose does not affect the cell sensitivity to a mechanical stress. It is assumed that the different sensitivities to the glucose treatment of erythrocytes of the studied animals are stipulated by the peculiarities of transport characteristics of their membranes in relation to this metabolite.*