

Ca²⁺-ЗАВИСИМАЯ АГРЕГАЦИЯ И ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ω -ГИДРОКСИПАЛЬМИТИНОВОЙ И α,ω -ГЕКСАДЕКАНДИОВОЙ КИСЛОТАМИ

© 2016 г. М.В. Дубинин, А.Е. Степанова, К.А. Щербаков,
В.Н. Самарцев, К.Н. Белослудцев

Марийский государственный университет, 424001, Йошкар-Ола, площадь Ленина, 1

E-mail: dubinin1989@gmail.com

Поступила в редакцию 03.06.16 г.

Представлены данные, описывающие Ca²⁺-зависимое влияние продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты – ω -гидроксиальпальмитиновой и α,ω -гексадекандиовой кислот на эритроциты крыс. Показано, что эти кислоты в присутствии Ca²⁺ индуцируют агрегацию эритроцитов, которая сопровождается снижением количества одиночных клеток в суспензии. При этом происходит выброс K⁺ из клеток, что говорит о пермеабиллизации плазматической мембраны. Однако ω -гидроксиальпальмитиновая и α,ω -гексадекандиовая кислоты существенно уступают пальмитиновой кислоте по способности индуцировать Ca²⁺-зависимую пермеабиллизацию эритроцитов. Бычий сывороточный альбумин и сыворотка крови ингибировали эффекты пальмитиновой кислоты. В то же время влияние этих агентов на эффекты ω -гидроксиальпальмитиновой и α,ω -гексадекандиовой кислот проявлялось гораздо слабее. Показано, что ω -гидроксиальпальмитиновая и α,ω -гексадекандиовая кислоты в присутствии Ca²⁺ индуцируют увеличение гидродинамического диаметра однослойных лецитиновых липосом, что свидетельствует об их слиянии и/или агрегации. Обсуждаются механизмы ω -гидроксиальпальмитиновой кислота/Ca²⁺- и α,ω -гексадекандиовая кислота/Ca²⁺-индуцированных эффектов на эритроциты крыс.

Ключевые слова: эритроциты, пальмитиновая кислота, α,ω -гексадекандиовая кислота, ω -гидроксиальпальмитиновая кислота, Ca²⁺, проницаемость мембран.

Известно, что свободные (неэтерифицированные) жирные кислоты при взаимодействии с биологическими и искусственными мембранами могут проявлять детергеноподобное [1], пертурбирующее [2] и протонофорное действие [3,4]. Кроме того, в присутствии Ca²⁺ насыщенные монокарбоновые жирные кислоты (среди них наиболее эффективна пальмитиновая кислота (ПК)) способны эффективно индуцировать неспецифическую проницаемость как искусственных [5], так и природных мембран, таких как внутренняя мембрана митохондрий [6] и плазматическая мембрана эритроцитов [7]. Предполагается, что в основе механизма индукции такой проницаемости лежит образование липидных пор при формировании комплексов жирных кислот и Ca²⁺ [5]. Обсуждается участие такого типа пор в физиологических и патологических процессах [8].

Известно, что одним из путей метаболизма монокарбоновых жирных кислот у млекопитающих и человека является их ω -окисление, происходящее главным образом в клетках печени и почек и приводящее к образованию соответствующих α,ω -дикарбоновых (диовых) кислот, имеющих две карбоксильные группы, локализованные на концах ацильной цепи [9,10]. В нормальных физиологических условиях только 5–10% свободных жирных кислот метаболизируется по пути ω -окисления. Однако этот путь значительно усиливается под влиянием различных ксенобиотиков [10], а также при потреблении этанола [11]. ω -Окисление также усиливается при различных нарушениях метаболизма монокарбоновых жирных кислот и при ряде патологий (ожирение, голодание, сахарный диабет, неалкогольная жировая болезнь печени и др.) [10]. В свою очередь, усиление ω -окисления сопровождается накоплением в крови и клетках как конечных продуктов этого процесса, α,ω -диовых кислот, так и промежу-

Сокращения: ПК – пальмитиновая кислота, ГПК – ω -гидроксиальпальмитиновая кислота, ГДК – α,ω -гексадекандиовая кислота.

точных метаболитов – ω-гидроксикарбоновых кислот [12–14].

Недавно нами было показано, что α,ω-диовые кислоты способны индуцировать Ca²⁺-зависимую неспецифическую проницаемость внутренней мембраны митохондрий печени и искусственной мембраны липосом [15,16], что позволяет предположить липидную природу этого феномена. В то же время выяснено, что механизм Ca²⁺-зависимой пермеабилитации, индуцированной α,ω-диовыми кислотами, отличается от механизма хемотропного фазового перехода, который, как отмечалось выше, лежит в основе индуцированной Ca²⁺ и монокарбоновыми жирными кислотами пермеабилитации искусственных и биологических мембран [7,17]. Предполагается, что механизм индукции α,ω-диовыми кислотами Ca²⁺-зависимой неспецифической проницаемости связан с нарушениями упаковки и структуры мембран при их слиянии и(или) агрегации [16]. В связи с тем, что при ряде патологических состояний происходит увеличение содержания различных жирных кислот и в сыворотке крови, можно предположить, что в первую очередь их влиянию будут подвергаться не митохондрии, а цитоплазматическая мембрана клеток, в частности, эритроцитов.

Целью настоящей работы было изучение влияния продуктов ω-окисления пальмитиновой кислоты – ω-гидроксипальмитиновой (ГПК) и α,ω-гексадекандиовой (ГДК) кислот – как индукторов Ca²⁺-зависимой неспецифической проницаемости мембраны эритроцитов. Полученные данные рассматриваются как свидетельство того, что эти кислоты способны индуцировать Ca²⁺-зависимую агрегацию цитоплазматической мембраны эритроцитов и тем самым оказывать влияние на их проницаемость.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали цельную кровь половозрелых беспородных крыс-самцов массой 210–250 г. Сразу после декапитации животного кровь собирали в пробирку, содержащую 3 мл раствора цитрата натрия (3,5%) и ЭДТА (1 мг/мл), и центрифугировали при 500 g (10 мин, 4°C). Плазму и лейкоциты отделяли, а эритроциты промывали три раза в пятикратном объеме фосфатного буфера (138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄ и 5 мМ глюкозы, рН 7,4) при 500 g (10 мин, 4°C), каждый раз удаляя слой лейкоцитов. Полученную суспензию эритроцитов разводили фосфатным буфе-

ром так, чтобы конечная концентрация клеток составляла ~ (5–9)·10⁹ кл./мл.

Подсчет эритроцитов проводили в двухсекционной камере Горяева. Камеру и покровное стекло несколько раз промывали дистиллированной водой и насухо вытирали, после чего покровное стекло притирали к камере до появления колец Ньютона. Одиночно стоящие клетки считали в пяти больших квадратах сетки, нанесенной на камеру. Количество клеток в 1 мл суспензии рассчитывали по формуле $C = \frac{a}{20} \cdot 10^6$, где C – концентрация клеток в 1 мл суспензии, a – сумма клеток в пяти больших квадратах сетки камеры Горяева, 20 – объем пяти больших квадратов (нл).

Проницаемость мембраны эритроцитов оценивали по выходу K⁺ с помощью K⁺-селективного электрода и оригинальной многоканальной электрометрической системы Record 4usb в ячейке объемом 1 мл при постоянном перемешивании и температуре 25°C. В этом случае среда инкубации содержала 250 мМ сахарозы и 10 мМ трис-HCl (рН 7,4).

Однослойные липосомы, изготовленные из лецитина, получали методом экструзии в соответствии с описанной ранее методикой [5]. Размер везикул в суспензии однослойных лецитиновых липосом был определен методом динамического светорассеяния с помощью лазерного анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Все измерения проводили при 25°C в буфере, содержащем 10 мМ трис-HCl (рН 8,5), 50 мкМ ЭГТА и 40 мМ KCl.

Для статистической обработки данных использовали программы Статистика 6.0 и Microsoft Excel. Результаты представляли как среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистический анализ выполняли с использованием t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах была использована пальмитиновая кислота как одна из наиболее распространенных природных жирных кислот [18], а также промежуточный и конечный продукты ее ω-окисления – ω-гидроксипальмитиновая и α,ω-гексадекандиовая кислоты соответственно [19]. Как показано ранее [7] и подтверждено в настоящей работе, ПК в присутствии Ca²⁺ вызывает значительное уменьшение количества эритроцитов в суспензии (таблица и рис. 16). Уменьшение количества клеток сопровождается значительным увеличением концентрации K⁺ в

Изменение относительного количества эритроцитов (в %) при добавлении жирных кислот и Ca^{2+} в присутствии и в отсутствие альбумина, а также при их инкубации в сыворотке крови

Добавки	Относительное количество одиночных клеток (в %)		
	Среда инкубации	Среда инкубации + альбумин	Сыворотка
Контроль (без добавок)	100,0 ± 2,2	100,0 ± 2,2	100,0 ± 1,2
+ ПК	73,9 ± 2,2*	91,4 ± 1,1 [#]	92,8 ± 1,2*
+ Ca^{2+}	90,2 ± 1,1*	90,3 ± 1,1 [#]	95,2 ± 1,2
+ ПК + Ca^{2+}	22,8 ± 2,2*	78,5 ± 2,2 [#]	88 ± 2,4*
+ ГДК	89,1 ± 1,1*	101,1 ± 1,1 [#]	80,7 ± 1,2*
+ ГДК + Ca^{2+}	71,7 ± 2,2*	76,3 ± 1,1	75,9 ± 1,2*
+ ГПК	84,8 ± 2,2*	102,2 ± 1,1 [#]	84,3 ± 2,4*
+ ГПК + Ca^{2+}	75,0 ± 2,2*	95,7 ± 1,1 [#]	78,3 ± 2,4*

Примечание. Состав среды инкубации: 138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 5 мМ глюкозы (рН 7,4). Добавки: эритроциты $((8-10) \cdot 10^6$ кл./мл); по 30 мкМ ПК, ГДК и ГПК; 100 мкМ CaCl_2 , 10 мг/мл альбумина. За 100% принято количество одиночных клеток/мл в отсутствие добавок. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 6-7$); * – различия между опытом (в присутствии добавок) и контролем, $p < 0,05$ (критерий Стьюдента); # – различия между опытом (в присутствии альбумина) и контролем (в отсутствие альбумина), $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

инкубационной среде (рис. 2). Все это говорит о том, что происходит гемолиз эритроцитов. В основе гемолиза лежит, как показано ранее, образование липидных пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированных пор в плазматической мембране эритроцитов [7].

В то же время продукты ω -окисления ПК – ГПК и ГДК – в присутствии Ca^{2+} иначе взаимодействуют с эритроцитами. Как видно из рис. 1в и 1г, добавление этих кислот вызывает массивную Ca^{2+} -зависимую агрегацию эритроцитов в суспензии. Очевидно, что агрегация будет сопровождаться уменьшением количества одиночных клеток (таблица). С другой стороны, небольшое снижение количества клеток может происходить и вследствие гемолиза эритроцитов. Как видно из рис. 2, добавление ГДК (ГПК) и Ca^{2+} к суспензии эритроцитов, как и в случае с ПК, также приводит к выходу ионов K^+ из клеток. Однако ГДК и ГПК существенно уступают ПК по способности индуцировать Ca^{2+} -зависимую проницаемость эритроцитов (рис. 2). В основе ГДК(ГПК)/ Ca^{2+} -индуцированного выброса K^+ из клеток (и соответственно их лизиса) могут лежать несколько процессов. Во время агрегации эритроцитов плазматические мембраны соседних клеток будут взаимодействовать друг с другом, что может приводить к их слиянию. Процесс слияния сопровождается массивными перестройками мембран, появлением небислоиных фаз, что будет приводить к появлению различных мембранных дефектов и ее пермеабилзации для различных соединений и ионов (в том числе и для K^+)

[20]. В результате такого типа пермеабилзации может происходить лизис части эритроцитов. С другой стороны, нельзя исключать и то, что выброс ионов калия, индуцированный ГПК или ГДК в присутствии Ca^{2+} , происходит вследствие активации калиевых каналов цитоплазматической мембраны эритроцитов [21].

Для проверки нашего предположения о механизме действия ГДК и ГПК как индукторов Ca^{2+} -зависимой агрегации мембран нами проведены эксперименты на липосомах с использованием метода динамического рассеяния света. Как видно на рис. 3, средний гидродинамический диаметр однослойных лецитиновых липосом при данных условиях составляет порядка 140 нм (рис. 3, кривая 1). Пальмитиновая кислота, будучи добавленной к липосомам, не приводит к изменению среднего размера везикул как в отсутствие (не показано), так и при добавлении 1 мМ Ca^{2+} (рис. 3, кривая 2). Следовательно, при добавлении ПК и Ca^{2+} разрушения липосом не происходит. В случае ГДК и ГПК наблюдаются процессы, схожие с теми, которые мы наблюдали на эритроцитах. В отсутствие Ca^{2+} эти кислоты, подобно ПК, не влияли на размер липосом (не показано). Однако добавление Ca^{2+} к липосомам, содержащим эти кислоты, приводит к существенному (до 520 нм в случае ГДК и до 1990 нм в случае ГПК) увеличению гидродинамического диаметра липосом (рис. 3, кривые 3 и 4). Это говорит о том, что в присутствии ГПК (ГДК) и Ca^{2+} происходят динамические процессы, в результате которых изменяется размер липосом, что

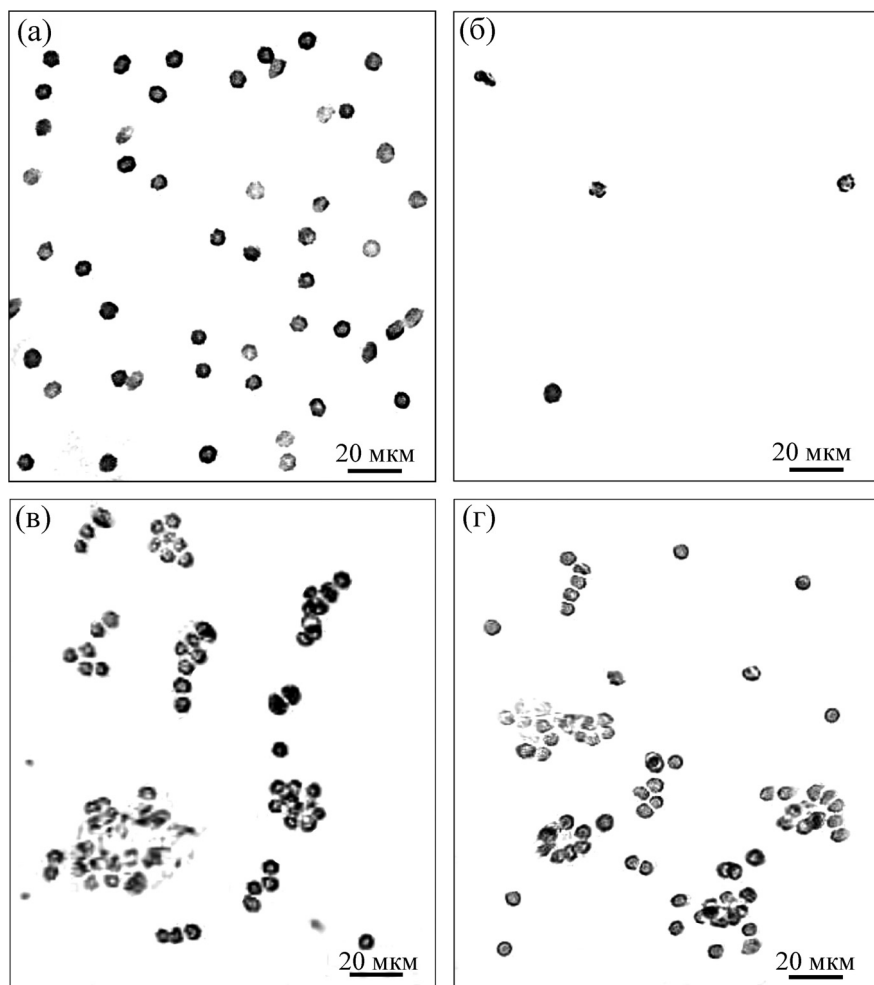


Рис. 1. Эритроциты крысы в отсутствие добавок (а), в присутствии ПК и Ca²⁺ (б), ГДК и Ca²⁺ (в), ГПК и Ca²⁺ (г). Состав среды инкубации и добавки, как в подписи к таблице.

может быть обусловлено в том числе и агрегацией везикул. Необходимо отметить, что Ca²⁺ в использованной нами концентрации (1 мМ), добавленный к липосомам без жирных кислот, не индуцировал изменение их размера (не показано), что соответствует литературным данным по влиянию Ca²⁺ на слияние и агрегацию липидных везикул [22]. Таким образом, данные, полученные на липосомах, согласуются с результатами экспериментов с эритроцитами и позволяют полагать, что при аккумуляции продуктов ω-окисления жирных кислот в сыворотке крови, которое имеет место при ряде указанных выше патологий, могут наблюдаться процессы агрегации эритроцитов вследствие изменения их поверхностных свойств. Агрегация эритроцитов, в свою очередь, будет приводить к нарушению проницаемости цитоплазматической мембраны клеток и в конечном счете к их гибели. Кроме того, хорошо известно, что образование эритроцитарных агрегатов может

приводить к нарушению процессов микроциркуляции [23].

Одним из механизмов, препятствующих индукции жирными кислотами проницаемости биологических мембран, является связывание их специальными белками, в частности альбумином [24], который, как известно, содержится в сыворотке крови. В настоящей работе нами был использован бычий сывороточный альбумин (БСА, фракция V). Как показано ранее [7] и подтверждено в настоящей работе (таблица), в присутствии альбумина пальмитиновая кислота гораздо слабее индуцирует Ca²⁺-зависимый лизис эритроцитов (снижение числа эритроцитов в отсутствие альбумина на ~ 77%, в присутствии альбумина на ~ 22%). В то же время альбумин полностью предотвращает ГПК/Ca²⁺-индуцированное снижение количества одиночных эритроцитов, но не влияет на эффект ГДК/Ca²⁺ (таблица). Схожие результаты были получены нами ранее при исследовании

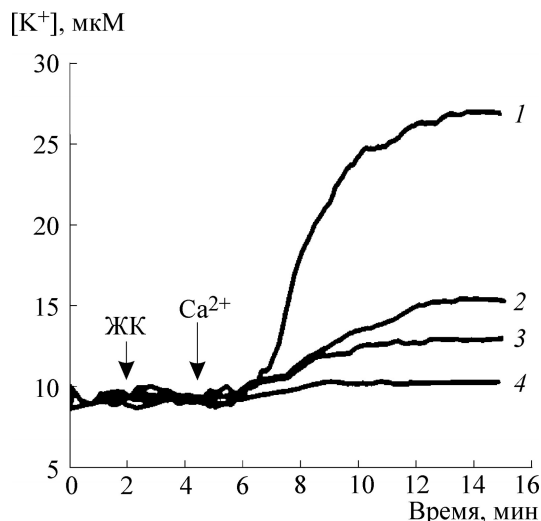


Рис. 2. Выход K^+ из эритроцитов, индуцированный жирными кислотами (ЖК) и Ca^{2+} . Состав среды инкубации: 250 мМ сахарозы, 10 мМ трис-НСI (рН 7,4), концентрация эритроцитов $(8-10) \cdot 10^6$ кл./мл. Добавки: (1) – 30 мкМ ПК + 100 мкМ $CaCl_2$; (2) – 30 мкМ ГДК + 100 мкМ $CaCl_2$; (3) – 30 мкМ ГПК + 100 мкМ $CaCl_2$; (4) – 100 мкМ $CaCl_2$. Представлены данные типичного эксперимента, полученные в одно и то же время на одном препарате эритроцитов. Аналогичные результаты были получены в трех независимых экспериментах.

влияния альбумина на Ca^{2+} -зависимую проницаемость митохондрий печени крыс, индуцированную ГДК [25]. Методом молекулярного докинга было установлено, что альбумин взаимодействует со всеми кислотами по одним и тем же сайтам связывания (данные не приведены). Однако, как известно, альбумин на порядок хуже связывает α, ω -диовые кислоты, чем их монокарбоновые аналоги [26]. Следовательно, наблюдаемое нами различие в ингибирующем действии альбумина может быть связано с тем, что альбумин имеет более низкое сродство к ГДК, чем к ПК. Интересно отметить, что при условии замены среды инкубации эритроцитов на сыворотку крови ПК практически не влияет на количество эритроцитов как в отсутствие так и в присутствии Ca^{2+} (таблица). В то же время эффективность ГДК и ГПК как индукторов Ca^{2+} -зависимого снижения количества одиночных эритроцитов не изменяется относительно контроля (таблица). Отсюда можно полагать, что белки и липопротеины сыворотки крови, эффективно связывающие ПК, в то же время будут менее эффективно связывать продукты ее окисления – ГДК и ГПК – и, тем самым, не будут препятствовать агрегации и пермеабиллизации эритроцитов в случае их накопления в сыворотке.

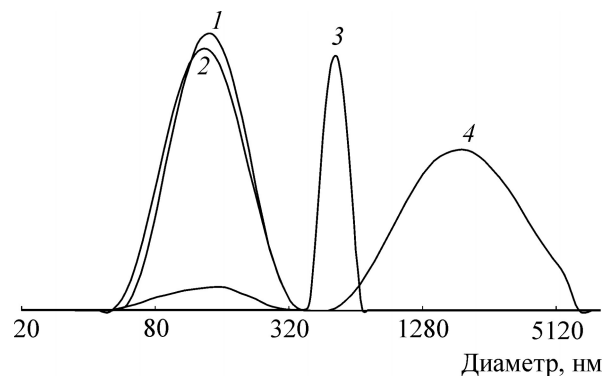


Рис. 3. Изменение размера лецитиновых липосом при добавлении к ним жирных кислот и Ca^{2+} : (1) – липосомы (50 мкМ лецитина); (2) – липосомы (50 мкМ лецитина) + 30 мкМ ПК и 1 мМ Ca^{2+} ; (3) – липосомы (50 мкМ лецитина) + 75 мкМ ГДК + 1 мМ Ca^{2+} ; (4) – липосомы (50 мкМ лецитина) + 100 мкМ ГПК + 1 мМ Ca^{2+} . Состав среды: 10 мМ трис-НСI (рН 8,5), 50 мкМ ЭГТА и 40 мМ КСI.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 14-04-00688-а, 15-04-03081-а), Министерства образования и науки РФ (в рамках государственного задания № 1365) и Марийского государственного университета (грант №2015-0066).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Mukerjee and K. J. Musels, *Critical micelle concentration of aqueous surfactant systems* (NSDS-Nat. Bur. Stand., 1971).
2. A. Arouri and O. G. Mouritsen, *Prog. Lipid Res.* **52** (1), 130 (2013).
3. F. Kamp and J. A. Hamilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11367 (1992).
4. F. F. Severin, I. I. Severina, Y. N. Antonenko, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** (2), 663 (2010).
5. A. Agafonov, E. Gritsenko, K. Belosludtsev, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1609**, 163 (2003).
6. К. Н. Белослудцев, Н. В. Белослудцева и Г. Д. Миронова, *Биохимия* **70** (7), 987 (2005).
7. К. Н. Belosludtsev, A. S. Trudovishnikov, N. V. Belosludtseva, et al., *J. Membr. Biol.* **237** (1), 9 (2010).
8. К. Н. Белослудцев и Г. Д. Миронова, *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, № 3, 20 (2012).
9. R. J. Sanders, R. Ofman, F. Valianpour, et al., *J. Lipid. Res.* **46**, 1001 (2005).
10. R. J. Wanders, J. Komen, and S. Kemp, *FEBS J.* **278**, 182 (2011).
11. M. Orellana, R. Rodrigo, and E. Valdes, *Gen. Pharmacol.* **31**, 817 (1998).
12. J. H. Tonsgard and G. S. Getz, *J. Clin. Invest.* **76**, 816 (1985).

13. J. H. Tonsgard, *J. Pediatr.* **109**, 440 (1986).
14. C. Hu, S. Lin, and Z. Cai, *Anal. Methods* **6**, 8207 (2014).
15. М. В. Дубинин, С. И. Адакеева, и В. Н. Самарцев, *Биохимия* **78** (4), 533 (2013).
16. M. V. Dubinin, V. N. Samartsev, M. E. Astashev, et al., *Eur. Biophys. J.* **43** (10–11), 565 (2014).
17. A. V. Agafonov, E. N. Gritsenko, E. A. Shlyapnikova, et al., *J. Membr. Biol.* **215** (1), 57 (2007).
18. L. Wojtczak and P. Schönfeld, *Biochim. Biophys. Acta* **1183**, 41 (1993).
19. S. Ferdinandusse, S. Denis, C. Van Roermund, et al., *J. Lipid. Res.* **45**, 1104 (2004).
20. L. V. Chernomordik and M. M. Kozlov, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 675 (2008).
21. J. A. Browning, J. C. Ellory, and J. S. Gibson, *Contrib. Nephrol.* **152**, 241 (2006).
22. D. Papahadjopoulos, S. Nir, and N. Düzgünes, *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 157 (1990).
23. O. Baskurt, B. Neu, and H. J. Meiselman, *Red Blood Cell Aggregation* (CRC Press, Boca Raton, FL, 2011).
24. M. Zoratti and I. Szabo, *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 139 (1995).
25. М. В. Дубинин, А. А. Ведерников, С. И. Адакеева и др., *Биол. мембраны* **30** (5–6), 364 (2013).
26. J. H. Tonsgard and S. C. Meredith, *Biochem. J.* **276**, 569 (1991).

Ca²⁺-Dependent Aggregation and Permeabilization of Erythrocytes by ω -Hydroxypalmitic and α,ω -Hexadecandioic Acids

M.V. Dubinin, A.E. Stepanova, K.A. Scherbakov, V.N. Samartsev, and K.N. Belosludtsev

Mari State University, pl. Lenina 1, Yoshkar-Ola, 424001 Russia

The paper presents data and describes the Ca²⁺-dependent effect of the products of ω -oxidation of palmitic acid – ω -hydroxypalmitic and α,ω -hexadecandioic acids on rat erythrocytes. It is shown that these acids in the presence of Ca²⁺ induce aggregation of erythrocytes, which is accompanied by reduction in the number of single cells in suspension, release of K⁺ from the cells takes place, indicating permeabilization of the plasma membrane. However, ω -hydroxypalmitic and α,ω -hexadecandioic acids are inferior to palmitic acid in their ability to induce the Ca²⁺-dependent erythrocyte permeabilization. Bovine serum albumin and blood serum inhibit the effects of palmitic acid. At the same time, the influence of these agents on the effects of ω -hydroxypalmitic and α,ω -hexadecandioic acids appears much weaker. It is shown that ω -hydroxypalmitic and α,ω -hexadecandioic acids in the presence of Ca²⁺ induce an increase in the hydrodynamic diameter of single-walled lecithin liposomes, which indicates their fusion and (or) aggregation. The mechanisms of ω -hydroxypalmitic acid/Ca²⁺- and α,ω -hexadecandioic acid/Ca²⁺-induced effects on rat erythrocytes are discussed.

Key words: erythrocytes, palmitic acid, α,ω -hexadecandioic acid, ω -hydroxypalmitic acid, Ca²⁺, membrane permeability