

*А.И. Гоженко¹, Л.М. Шафран¹, В.И. Колиев¹, Е.В. Третьякова¹,
Д.В. Большой¹*

ВЛИЯНИЕ ДИХЛОРИДА РТУТИ НА ОСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

A.I. Gozhenko, L.M. Shafran, V.I. Koliev, E.V. Tretyakova, D.V. Bolshoy

INFLUENCE DICHLORIDE OF MERCURY ON OSMOTIC RESISTANCE OF ERYTHROCYTES

¹Украинский Научно-исследовательский институт медицины транспорта, г.Одесса

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ настоящего исследования состояла в изучении влияния различных концентраций дихлорида ртути на осмотическую резистентность эритроцитов человека в опытах *in vitro* и вероятных механизмов гемолиза клеток. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Определение осмотической резистентности проводили на эритроцитах здорового человека по унифицированному методу в модификации Л.И. Идельсона. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Установлен дозозависимый характер действия $HgCl_2$ на осмотическую резистентность эритроцитов человека: малые концентрации (0,005–0,1 ммоль/л) обладают умеренным гемолитическим, средние (0,2–1,0 ммоль/л) – блокирующим, а большие ($> 1,0$ ммоль/л) – деструктивным действием на клетки. Существенное, статистически достоверное ($p < 0,001$) снижение интенсивности гемолиза эритроцитов в гипотонической среде сортуто обусловлено, вероятнее всего, блокадой аквапоринов, что согласуется с данными литературы. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Осмотическая резистентность эритроцитов – надежный и воспроизводимый показатель функционального состояния клетки, достаточно чутко реагирующий на химическое воздействие, что показано на примере экспозиции эритроцитов $HgCl_2$ в широком диапазоне концентраций, отличающихся на три порядка. В дальнейших исследованиях предстоит установить временные параметры наблюдаемых эффектов ртути на осмотическую резистентность эритроцитов, вероятное участие и вклад других биохимических механизмов, а также сопоставить имеющиеся данные с осмотической стойкостью различных типов клеток к ртути и другим тяжелым металлам, блокаторам аквапоринов.

Ключевые слова: дихлорид ртути, осмотическая резистентность, эритроциты, аквапорины.

ABSTRACT

THE AIM. The purpose of this study was to examine the influence of different concentrations of mercury dichloride on osmotic resistance of human erythrocytes in vitro investigations and possible mechanisms of hemolysis of cells. **MATERIALS AND METHODS.** Determination of osmotic resistance of erythrocytes was carried out on healthy people for a unified method to L.I. Idelson modification. **RESULTS.** Installed a dose-dependent nature of $HgCl_2$ on the osmotic resistance of human erythrocytes: small concentrations (0.05-0.1 mmol/L) have a moderate hemolytic, medium (0.2-1.0 mmol/L) - blocking, and large (> 1.0 mmol/L) – a destructive effect on the cells. Statistically significant ($p < 0.001$) reduction of the intensity of hemolysis of erythrocytes in hypotonic medium with mercury, most likely due to the blockade of aquaporins. **CONCLUSION.** Osmotic resistance of red blood cells is reliable and reproducible index of functional state of the cell, sensitive to the chemical effect. as shown by the example of exposure of erythrocytes $HgCl_2$ in a wide range of concentrations, differing by three orders of magnitude. In further studies to establish the time parameters of the observed effects of mercury on the osmotic fragility test, the likely participation and contribution of other biochemical mechanisms, as well as to compare the data with the osmotic resistance of various types of cells to mercury and other heavy metals, aquaporin blockers.

Key words: dichloride of mercury, osmotic resistance, erythrocytes, aquaporins.

ВВЕДЕНИЕ

Транспорт воды в клетку и из нее, лежащие в основе этого процесса механизмы, несмотря на кажущуюся простоту, представляют довольно многоплановую проблему биохимии и молекулярной биологии, различные аспекты которой в последние

20 лет приобретают все более важное значение для многих областей биологии и медицины [1, 2]. Именно проницаемость клеток для воды во многом определяет их осмотические свойства. Осмотическая резистентность (ОР) – важная интегральная физиологическая функция клеток, изменения которой широко используются в качестве маркера, отражающего состояние клеточных мембран, интенсивность транспорта химических веществ и клеточного метаболизма [3–5]. Ее определение

Гоженко А.И. 65039, Украина, г.Одесса, ул. Канатная, д. 92, Украинский Научно-исследовательский институт медицины транспорта; тел.: (048) 7281452, факс: (048) 7281452, E-mail: unii_mt@farlep.net, medtrans2@rambler.ru

чаще всего осуществляют на эритроцитарных клетках, так как она достаточно четко характеризует состояние их наружных мембран, от эластичности которых зависит способность клетки проходить через капилляры с просветом в 2 раза уже диаметра эритроцита (Эр). Этому также способствует двояковогнутая форма клетки. Если эластичность мембраны изменяется, ее разрыв и нарушение целостности клетки происходят при менее жестких параметрах окружающей среды (раствора), что может служить маркером для оценки степени (силы) вредного воздействия биологической, физической либо химической природы, а также свидетельствовать об осмотических процессах в почке и других органах. При достижении ОР критической величины происходит разрушение наружной мембраны клетки и выход содержимого в окружающую среду – гемолиз, интенсивность которого является маркером степени повреждения Эр. Изотоническим для эритроцитов является 0,85% раствор NaCl, при снижении концентрации которого до 0,55–0,46% начинается гемолиз ($C_{осм\ min}$), достигающий максимума при концентрации NaCl 0,34–0,28% ($C_{осм\ max}$) [6].

Так как осмотическая фрагментация Эр, как правило, обусловлена изменением соотношения поверхность/объем, эта модель особенно удобна для изучения работы водных каналов. ОР характеризует способность Эр накапливать и терять воду по осмотическому механизму без лизиса клеток, прежде всего, благодаря работе специфических водных каналов – аквапоринов, открытых в 80-х годах прошлого столетия работами Gh. Benga, P. Agre и других авторов [7,8]. Аквапорины – интегральные мембранные белки с величиной мономеров у млекопитающих порядка 26–34 кДа, формирующие поры в мембранах клеток и осуществляющие трансмембранный транспорт преимущественно молекулы воды [9]. У млекопитающих обнаружено 13 аквапоринов (AQP0 – AQP12), однако процесс их идентификации интенсивно продолжается. Аквапорины AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 высокоспецифичны для транспорта воды, тогда как AQP3, AQP7, AQP9 и AQP10, получившие название акваглицеропорины, транспортируют не только воду, но также глицерин и мочевины. Вероятно, это обстоятельство лежит в основе их различного органно-клеточного распределения [10,11]. По этим данным в эритроцитах функционируют AQP1 и AQP3.

Аминокислотный состав аквапоринов идентифицирован на 19–52%. Их строение также достаточно однотипно [12]. Они образуют в мембране тетрамеры, момеры которых представлены полипептидными цепочками, пронизывающими 6 раз

плазматическую мембрану, образуя три внеклеточные (A, C, E) и две внутриклеточные (B, D) петли, которые в толще мембраны перекрываются с образованием трансмембранных практически независимых водных каналов каждым мономером. Этим они принципиально отличаются от ионных каналов, у которых пора расположена в центре между образующими ее элементами [13]. С другой стороны – это явилось подтверждением гипотезы о кластерном принципе построения системы каналов-субъединиц, десинхронизация работы которых, а не флуктуация диаметра поры, лежит в основе изменений их функций под действием активаторов и блокаторов [14]. Каждый конец мономера аквапорина AQPx имеет воронкообразный вход, открывающийся соответственно во внутриклеточное или внеклеточное пространство. Преддверие переходит в узкий тоннель, который имеет вид песочных часов. Сильный диполь, образованный двумя укороченными витками канала в положении, где петли полуканала соединяются в центре поры AQPx, представляет еще один барьер для проницаемости протона, что делает транспорт протонов через канал энергетически не выгодным и затрудняет их проведение в обычных условиях. Аминокислотный остаток в месте сужения (Arg-195) является консервативной структурой практически всех представителей суперсемейства аквапоринов. На нем сосредоточен большой положительный заряд, который отталкивает протонированную воду (H_3O^+). Водородные связи водной цепочки в области, преобладающей к Arg-195, разрываются. Диаметр канала в узкой части составляет до 2,8 Ангстрема, т.е. соответствует среднему диаметру молекулы воды. Тоннель на большем своем протяжении гидрофобен. При этом ограниченное количество гидрофильных площадок, расположенных по его длине, способствует быстрому транспорту воды. Исследования показывают, что скорость прохождения воды через AQP1 составляет примерно 3×10^9 молекул/с, что значительно выше, чем активность других известных ионных каналов [15]. Транспорт воды через момеры одинаково легко осуществляется в обоих направлениях, при этом аквапорин не является энергозависимым каналом, а лишь формирует пору для быстрого перемещения воды. Направление водного потока определяется ориентацией осмотического или гидростатического градиента.

Для исследования механизмов, лежащих в основе работы водных каналов, широко используются их блокаторы, среди которых, наряду с тэтразиламмонием (ТЭА), ацетазоламидом (АЦЗА), одно из ведущих мест принадлежит соединениям

Hg^{++} , чаще всего р-хлормеркурфенилсульфоновой кислоте [16].

Еще до открытия аквапоринов было известно, что соединения ртути тормозят транспорт воды через эритроцитарную мембрану [17,18]. Однако клеточные механизмы этого процесса оставались недостаточно изученными. В дальнейшем было показано, что большинство аквапоринов млекопитающих, за исключением AQP4, чувствительны к действию соединений ртути [19]. Причем, в разных органах и системах, клетках разных видов и различных компартментах эффекты могут существенно отличаться [20–22]. Токсикологи относили такого рода эффекты к способности ртути связываться с тиоловыми группами [23]. Вместе с тем, в последние годы стало известно, что одним из видов токсического действия ртути является блокада водных каналов. Именно ингибирование водных каналов рассматривается как наиболее вероятный механизм, по которому соединения ртути, включая ртутные диуретики (меркузал, новурит, промерен), вызывают полиурию. В связи с этим можно предположить, что ртуть способна существенно менять трансмембранные потоки воды в клетке посредством воздействия на аквапорины. Осмотическая резистентность клеток является не только чувствительным маркером для изучения механизмов, лежащих в основе модулирующего действия ртути, но и позволяет раскрыть лежащие в основе работы аквапоринов физиологические механизмы.

Поэтому цель настоящего исследования состояла в изучении влияния различных концентраций дихлорида ртути на осмотическую резистентность эритроцитов человека в опытах *in vitro* и вероятных механизмов гемолиза клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение осмотической резистентности проводили на эритроцитах здорового человека по уни-

фицированному методу в модификации Л.И. Идельсона [24]. Кровь для исследования (3–4 мл) брали из кубитальной вены в стерильную пробирку с гепарином. В ряд центрифужных пробирок разливали по 5 мл смеси рабочих растворов NaCl в концентрации от 0,9 до 0,1% и дихлорида ртути в концентрации от 0,005 до 5 ммоль/л. В каждую пробирку добавляли по 0,02 мл гепаринизированной крови и оставляли при комнатной температуре для экспозиции на 30 мин. Центрифугировали смесь крови с раствором NaCl и дихлорида ртути при 1500 об/мин в течение 10 мин. Сливали надосадочную жидкость и измеряли оптическую плотность растворов (степень гемолиза Эр) на спектрофотометре PD 303 UV (Япония) при длине волны 530 нм в кювете 10 мм против холостой пробы (надосадочная жидкость в пробирке, содержащая 1% раствор NaCl). Первый ряд пробирок не содержал дихлорид ртути и был контрольным, в последующих рядах концентрацию дихлорида ртути пропорционально увеличивали, начиная с 0,005 ммоль/л. По полученным величинам строили графики кинетики гемолиза в зависимости от концентрации растворов.

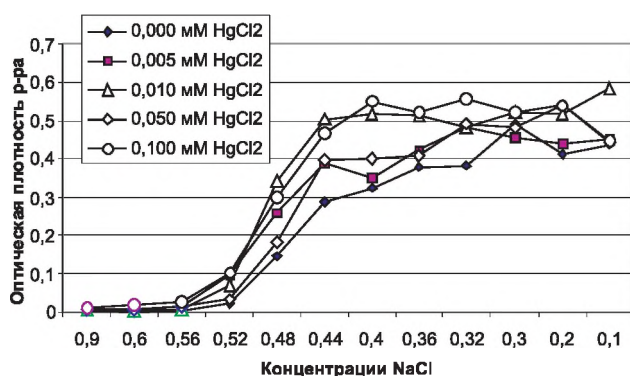
РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования показали, что в контрольной серии разведений $C_{\text{осм min}}$ составила 0,50, а $C_{\text{осм max}}$ – 0,30% NaCl, что соответствует приведенным выше литературным данным [6]. Это обеспечило возможность сопоставления полученной информации, как с собственным контролем, так и материалами других авторов. Введение ртути в среду инкубации влияет на ОРЭ, однако это воздействие носит сложный характер и не поддается одномерному описанию. Это отчетливо прослеживается при анализе данных, приведенных в таблице.

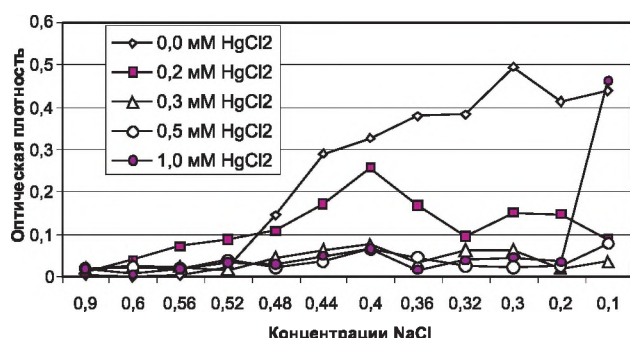
После того как для каждой концентрации HgCl_2 были установлены граничные значения полного

Изменение осмотической резистентности эритроцитов человека при действии различных концентраций HgCl_2

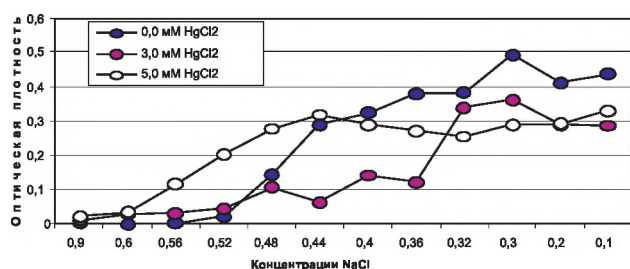
	, ммоль/л, оптическая плотность раствора										
	0	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5	1,0	3,0	5,0
0,1	0,439	0,453	0,585	0,445	0,448	0,089	0,035	0,08	0,463	0,287	0,331
0,2	0,411	0,441	0,517	0,541	0,538	0,149	0,021	0,025	0,036	0,289	0,292
0,3	0,493	0,454	0,520	0,483	0,52	0,151	0,064	0,022	0,046	0,363	0,291
0,32	0,384	0,480	0,480	0,494	0,558	0,097	0,064	0,025	0,041	0,339	0,256
0,36	0,379	0,423	0,514	0,409	0,523	0,169	0,033	0,046	0,018	0,122	0,272
0,4	0,325	0,351	0,516	0,401	0,551	0,256	0,075	0,067	0,066	0,141	0,290
0,44	0,289	0,389	0,503	0,397	0,468	0,172	0,061	0,035	0,048	0,063	0,319
0,48	0,145	0,260	0,342	0,183	0,298	0,108	0,045	0,024	0,029	0,107	0,279
0,52	0,023	0,095	0,068	0,034	0,103	0,089	0,018	0,038	0,033	0,047	0,203
0,56	0,003	0,013	0,007	0,014	0,024	0,072	0,024	0,019	0,019	0,032	0,116
0,60	0,001	0,006	0,002	0,007	0,018	0,041	0,028	0,023	0,008	0,029	0,034
0,90	0,004	0,002	0,008	0,009	0,01	0,011	0,021	0,02	0,02	0,011	0,022



в концентрациях 0,005–0,1 ммоль/л.



в концентрациях 0,2–1,0 ммоль/л.



в концентрациях 3,0 и 5,0 ммоль/л.

гемолиза (экстинция 0,389–0,515), стало возможным более детально проследить изменения значений ОРЭ в зависимости от концентрации ртути в растворе. Однако характер и степень изменений различны в разных диапазонах исследованных концентраций, с учетом которых было выделено три блока: низких, средних и высоких концентраций. В диапазоне низких концентраций (0,005–0,1 ммоль/л) максимальные показатели нарушения ОРЭ не существенно отличаются от контрольных и лежат в пределах 0,50–0,52% раствора NaCl. В то же время минимальные значения ОРЭ имеют выраженную тенденцию к повышению и смещаются в зону 0,32–0,40% NaCl в зависимости от концентрации ртути. В целом же, характер динамики нарастания величины гемолиза под действием HgCl₂ в данном диапазоне концентраций опережает таковой в отсутствие блокатора (рис. 1). При этом следует

также обратить внимание на тот факт, что практически все значения для экспонированных ртутью Эр лежат выше данных контроля, т.е. свидетельствуют о снижении осмотической резистентности клеток.

Картина существенно изменяется при экспозиции Эр двухлористой ртутью в концентрациях 0,2–1,0 ммоль/л. Начальные признаки гемолиза появляются при уровнях NaCl порядка 0,52–0,56%, однако полного гемолиза ($C_{осм\ max}$) достигнуть не удастся даже в выраженных гипотонических условиях среды (0,2–0,1% NaCl). Это наглядно демонстрируют графики на рис. 2.

Следует подчеркнуть, что при действии ртути в диапазоне концентраций 0,3–1,0 ммоль/л гемолиз блокируется практически полностью, а концентрация 0,2 ммоль/л является как бы пороговой между двумя группами концентраций. Максимальное значение оптической плотности раствора превышает исходное в среднем 25 раз, тогда как в контроле – в 125 раз, т.е. в 5 раз выше. Примерно такие же соотношения прослеживаются в динамике изменения показателя оптической плотности, градиент которого ($\Delta C_{нв}$) в опыте не превышал 3–4, а в контроле – достигал 6–7.

Полный гемолиз имел место лишь при концентрации 1,0 ммоль/л в максимальном разведении (0,1% NaCl). Ее дальнейшее увеличение существенно изменяет характер хода кривой гемолиза, как это наглядно демонстрируют графики для высоких концентраций HgCl₂, представленные на рис. 3.

Необходимо обратить внимание на торможение гемолиза, вплоть до концентрации NaCl 0,36% (при экспозиции HgCl₂ на уровне 3,0 ммоль/л), которое сменялось подъемом интенсивности гемолиза, хотя и довольно резким, но все же не достигающим контрольных значений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные можно трактовать как доказательство того, что ртуть действительно блокирует аквапорины, нарушает трансмембранный перенос воды и существенно влияет на ОР эритроцитов. Наличие такого рода эффектов можно констатировать по результатам сравнения трех диапазонов концентраций, причем, блокирование аквапоринов наиболее четко проявляется HgCl₂ в концентрациях 0,2–1,0 ммоль/л. Более высокие концентрации ртути снижают ОРЭ, что проявляется в прогрессивном нарастании гемолиза при более близких к изотоническим концентрациях NaCl.

Анализируя вероятные механизмы действия ртути, следует рассмотреть, как минимум, четыре возможности, определяемые спецификой ртути

как тиолового яда, блокатора AQRx, ингибитора, участвующих в транспорте воды ионных каналов и соответствующих ферментов (что частично возвращает нас к первой позиции) [25].

Количество рецепторов Hg^{2+} на клеточной мембране и вероятных лигандов с активными SH группами таково, что тиоловый механизм нарушения клеточных функций может проявляться при достаточно больших концентрациях металла, а токсикодинамика возрастающих уровней воздействия описывается монотонной логарифмической зависимостью – уравнением первого порядка [23,26]. Эта модель применительно ко всему диапазону исследованных концентраций $HgCl_2$ не пригодна. Только повышение проницаемости эритроцитов под действием высоких концентраций ртути можно рассматривать как результат связывания ее не с аквапоринами, а с SH-группами других мембранных белков и появлением проницаемых для воды неспецифических участков клеточной мембраны.

Непосредственным блокированием аквапоринов $HgCl_2$ можно удовлетворительно объяснить результаты проведенных исследований в диапазоне средних концентраций (0,2–1,0 ммоль/л). Снижение поступления воды в клетку и повышение резистентности клеточной мембраны Эр вследствие роста жесткости лежат в основе блокирования AQRx ртутью в действующих концентрациях в условиях осмотического стресса [5]. Эффект в этом диапазоне экспозиции носит дозозависимый характер, хотя его граничные параметры еще предстоит установить.

Особенно интересными являются данные о том, что самые малые концентрации ртути снижают осмотическую резистентность эритроцитов, а следовательно, увеличивают трансмембранные токи воды. Возможно, что малые дозы ртути активируют действующие либо способствуют экспрессии аквапоринов *de novo*, что согласуется с концепцией стимулирующего действия блокаторов в малых концентрациях [27]. С учетом времени и условий экспозиции, второй вариант маловероятен. Однако эти предположения нуждаются в дальнейших исследованиях.

Не менее интересным является вопрос о том, является ли действие ртути на трансмембранный транспорт воды специфическим для эритроцитов либо и другие клетки могут подвергаться таким же изменениям. Это имеет практическое значение, в частности, для эпителия кишечника и почечных канальцев, где возможно снижение осмотичности биологических жидкостей, что может привести к явлениям клеточного отека и гибели клеток при действии на них ртути. Кроме того, полученные

результаты подтверждают роль ртути, блокирующей аквапорины как в механизмах полиурии при использовании ртутных диуретиков, так и, возможно, при ртуть индуцированной токсической нефропатии. При этом развитие полиурии после периода анурии может быть прямым следствием блокады аквапоринов ртутью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Осмотическая резистентность эритроцитов – надежный и воспроизводимый показатель функционального состояния клетки, достаточно чутко реагирующий на химическое воздействие, что показано на примере экспозиции эритроцитов $HgCl_2$ в широком диапазоне концентраций, отличающихся на три порядка.

2. Установлен дозозависимый характер действия $HgCl_2$ на осмотическую резистентность эритроцитов человека: малые концентрации (0,005–0,1 ммоль/л) обладают умеренным гемолитическим, средние (0,2–1,0 ммоль/л) – блокирующим, а большие ($> 1,0$ ммоль/л) – деструктивным действием на клетки.

3. Существенное, статистически достоверное ($p < 0,001$) снижение интенсивности гемолиза эритроцитов в гипотонической среде ртутью обусловлено, вероятнее всего, блокадой аквапоринов, что согласуется с данными литературы.

4. В дальнейших исследованиях предстоит установить временные параметры наблюдаемых эффектов ртути на осмотическую резистентность эритроцитов, вероятное участие и вклад других биохимических механизмов, а также сопоставить имеющиеся данные с осмотической стойкостью различных типов клеток к ртути и другим тяжелым металлам, блокаторам аквапоринов.

Pflugers

Arch

IUBMB Life

Rinsho Byori

Transfus Med Rev

Blood Cells Mol Dis

Механизмы развития болезней и синдромов. Книга 1-я (Учебник для студентов медицинских вузов), Изд. 2-е.

Cell Biol Int

Handb Exp Pharmacol

Science

	Энергетическое обеспечение основных почечных функций и процессов в норме и при повреждении почек.	
Am J Physiol		
Am J Physiol	Pharmacol	Toxicol Appl
. Am J Physiol Renal Physiol		
		J Cell Physiol
Am J Physiol Cell Physiol		
		Общая токсикология.
J Vet Sci	методам исследования.	Справочник по лабораторным
Аквапорины человека и животных: фундаментальные и клинические аспекты.		Ann Univ Mariae
	Curie Sklodowska	
	Гігієнічне значення особливостей токсикокінетики, токсикодинаміки і біотрансформації малих доз ртуті.	
	Eur Biophys J	
Хроническое воздействие ртути на организм.		J Biol Chem
Цитология		
Neuroscientist		Поступила в редакцию 22.10.2009 г. Принята в печать 23.11.2009 г.