DOI 10.29254/2077-4214-2018-3-145-389-392
УДК 57.086.13:577.352.462:611.018.51

Коба Л. В., **Шапкіна О. О., *Жуйкова А. Є., *, **Бондаренко В. А.

СТІЙКІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ДО ГІПЕРТОНІЧНИХ УМОВ СЕРЕДОВИЩА

***Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна (м. Харків)**
****Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків)**
oleinolsh@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота виконана відповідно науковому напрямку відділу кріоцитології ІПКіК НАН України за темою «Дослідження чутливості еритроцитів ссавців до охолодження, дегідратації та заморожування при дії модифікуючих факторів і кріопротекторів», № державної реєстрації 0114U0001318.

Вступ. Вікові зміни тваринного організму впливають на ефективність функціонування систем, що підтримають його гомеостаз [1]. Плазматична мембрана клітин має особливості складу, організації, природи взаємодій між компонентами, що дозволяє включати її в групу систем, для яких характерно наростання дестабілізації у часі – гомеоклаз [1]. Зміни стану цієї клітинної структури впливають на функціонування ферментних і транспортних систем клітин. Це визначає їх метаболізм, іонний гомеостаз, ефективність здійснення специфічних функцій, адаптаційні можливості. В той же час особливості стану мембранних структур клітин на різних етапах онтогенезу можуть мати латентний характер, проявляти себе при достатньо глибокій їх модифікації в певних експериментальних умовах.

Еритроцити ссавців є одним з найбільш адекватних об'єктів для вивчення змін, що розвиваються саме на рівні плазматичної мембрани клітин. Вікові зміни стану еритроцитів можуть виявляти себе в особливостях їх осмотичної стійкості [2]. Визначати її можна по збереженню бар'єрної функції мембрани при перенесенні клітин у нефізіологічні умови середовища стресуючого рівня, зокрема, в 4,0 М NaCl.

Багаточисленні дослідження показали, що клітинними структурами, які визначають стійкість еритроцитів людини та деяких ссавців до гіпертонічного впливу, є плазматична мембрана, цитоскелет, а також характер взаємозв'язків між їх компонентами [3-7]. Структурно-функціональний стан саме цих клітинних структур можна змінювати, експонуючи еритроцити в певних умовах на етапі початкової інкубації перед дією основного стресуючого фактору [5,6,8]. Враховуючи це, можна припустити, що початкова модифікація еритроцитів щурів в розчинах сахарози з різною тонічністю дозволить виявити вікові особливості їх плазматичної мембрани та цитоскелета в умовах гіпертонічного впливу на клітини в 4,0 М NaCl.

Мета дослідження – вивчити осмотичну стійкість еритроцитів 1- та 12-місячних щурів, попередньо проінкубованих в гіпертонічних розчинах сахарози, в умовах гіпертонічного шоку (4,0 М NaCl).

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводили на еритроцитах самців щурів лінії Wistar 1- і 12-місячного віку. Кров одержували під час декапітації тварин під легким ефірним наркозом (стабілізатор гепарин, 500 од/мл). Робота з тваринами проводилась відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах» (V Національний конгрес з біоетики, Київ, 2013), що були узгоджені з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Еритроцити відмивали тричі фізіологічним розчином у 10-кратному об'ємі (0,01 М фосфатний буфер, рН 7,4) шляхом центрифугування при 1500 об/хв протягом 10 хв (центрифуга «ОПн-3У4.2», Киргизстан*)*. Відмиті клітини зберігали при температурі 0°С не більше години. Нативні клітини спочатку витримували в розчинах сахарози з різною концентрацією (0,27-1,0 М) на протязі 2-60 хв при 37°С. Після цього клітини піддавали гіпертонічному шоку за допомогою перенесення суспензії еритроцитів у 4,0 М NaCl (0,01 М фосфатний буфер, рН 7,4) при 37°С на 5 хв. Рівень гемолізу еритроцитів вимірювали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 543 нм і розраховували у відсотках по відношенню до 100% гемолізу. Статистичну обробку результатів проводили загально прийнятими методами, використовуючи критерії Манна-Уітні.

Результати дослідження та їх обговорення. Одним із важливих факторів у розвитку чутливості еритроцитів до гіпертонічного шоку (4,0 М NaCl) є осмолярність розчинів етапу преінкубування. Еритроцити людини та тварин набувають різної чутливості до дії високотонічних середовищ, зокрема, до переносу в 4,0 М NaCl, в залежності від ступеню їх дегідратації на етапі початкової інкубації [3,4,6,9]. Вона може зумовлювати як зростання осмотичної стійкості еритроцитів, так і різке зниження їх здатності зберігати свою цілісність в високо гіпертонічних розчинах NaCl [3,4,9].

На **рис. 1** представлені дані щодо часової залежності гіпертонічного гемолізу еритроцитів щурів різних вікових груп у розчинах сахарози. За перші 2 хв. інкубації в цих умовах зазнає гемолізу доволі незначна кількість еритроцитів (рівень гемолізу до 10%) тварин обох вікових груп **(рис. 1).** Подовження терміну перебування клітин викликає зниження їх осмотичної стійкості. Слід зазначити, що еритроцити щурів молодшої вікової групи менш стійкі порівняно з клітинами 12-місячних тварин за тих же умов тонічності та часу інкубації. Так, максимальний рівень гемолізу клітин 1-місячних тварин в гіпертонічних розчинах сахарози досягає 44% на 30-ту хвилину та 60% – на 60-у хвилину, а 12-місячних тварин відповідно 28% та 42% за тих же умов інкубування.

Еритроцити після попередньої інкубації в розчинах неелектроліта переносили в 4,0 М NaCl. Дані про

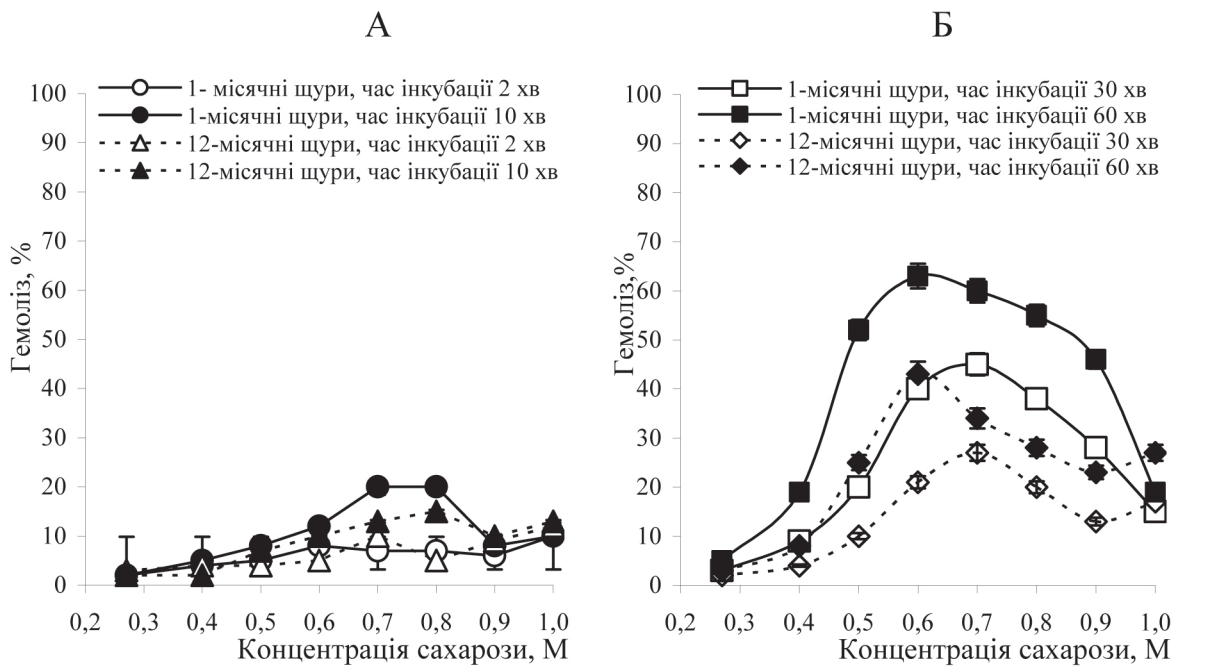

Рис. 1. Залежність рівня гемолізу еритроцитів 1- та 12-місячних щурів в розчинах сахарози від часу інкубації: 2 та 10 хв (А); 30 та 60 хв (Б).

вплив умов початкової інкубації в розчинах сахарози на стійкість еритроцитів щурів до подальшого переносу в 4,0 М NaCl представлені на **рис. 2.**

Звертає на себе увагу той факт, що захисний ефект попереднього зневоднених клітин спостерігається тільки при нетривалому інкубуванні (2 хв) еритроцитів 1-місячних щурів. У цьому випадку середовище дегідратації містило 0,5 М сахарозу. Отримані нами дані взагалі узгоджуються з результатами, представленими в роботі [4], і свідчать, що корекція гіпертонічної чутливості еритроцитів щура можлива в результаті модифікації вихідного стану клітин на етапах, які передують гіпертонічному впливу. Крім того, показано [6,8], що формування стійкого стану еритроцитів щура, людини і коня до гіпертонічного шоку (4,0 моль/л NaCl, 37°С) визначається осмоляльністю середовища, а не іонною силою розчину, оскільки він формується в умовах попередньої інкубації клітин як у сольових, так і в сахарозних середовищах, осмоляльність яких складає 550-700 і 550-800 мОсм/кг відповідно.

З **рис. 2А** видно, що рівень гемолізу еритроцитів тварин обох вікових груп в 4,0 М NaCl зростає при попередньому нетривалому інкубуванні (2 і 10 хв) у сахарозних середовищах із концентрацією 0,7 М і вище. Максимальний рівень гемолізу еритроцитів 1-місячних тварин в гіпертонічному розчині NaCl дорівнює ~70%, а 12-місячних щурів – ~50%.

При збільшенні часу експонування (30 і 60 хв) в гіпертонічних розчинах сахарози також спостерігається сенсибілізація еритроцитів тварин обох вікових груп до переносу в 4,0 М NaCl **(рис. 2Б).** При цьому відзначається зростання гемолітичного пошкодження у гіпертонічному сольовому розчині еритроцитів, які були попередньо проінкубовані у середовищах, що містили 0,5 – 1,0 М сахарозу. Здається, що більш стійкими до дії 4,0 М NaCl є еритроцити 1-місячних щурів **(рис. 2Б).** Але саме клітини тварин цієї вікової групи значно пошкоджуються в неелектролітному середовищі **(рис. 1Б).** Тому «стійкість» еритроцитів, що спостерігається **(рис. 2Б),** обумовлена, в першу чергу, незначною кількістю клітин, що зберегли свою цілісність в неелектролітних середовищах та гемолізують у 4,0 М NaCl.

Таким чином, представлені на **рис. 1Б** дані свідчать про те, що еритроцити 1-місячних щурів зазнають значного гемолізу в розчинах сахарози на етапі початкової інкубації при подовженні її терміну до 30-60 хв. Еритроцити 12-місячних щурів мають більшу осмотичну стійкість до гіпертонічних умов в неелектролітних середовищах, але суттєво сенсибілізуються до подальшого переносу в 4,0 М NaCl при подовженні терміну їх початкової експозиції в них.

Відомо, що в гіпертонічних розчинах як електролітів, так і неелектролітів еритроцити зазнають дегідратації. Її ступінь задається як тонічністю середовища, так і часом експонування клітин в таких умовах [10]. Експонування еритроцитів в розчинах сахарози супроводжується втратою не тільки води, а й електролітів. Втрата електролітів пов'язана з виходом аніонів Cl^-, для яких проникність мембрани даного типу клітин є достатньо високою, компенсаторно залишають еритроцити катіони калію [11]. Вихід Cl^- здійснюється шляхом його обміну на позаклітинний OH^- або котранспортом з протоном [11]. Внаслідок таких змін іонного складу клітин підвищується внутрішньоклітинне pH, що викликає суттєві зміни стану цитоскелета та його здатності зв'язуватись з компонентами мембрани. Крім того, вихід із клітини електролітів викликає додаткову іон-залежну дегідратацію [10]. В таких умовах клітини втрачають не тільки фракцію вільної об'ємної води, але й певну частину структурованої. Внаслідок цього змінюється стан білків клітини різної локалізації, у тому числі цитоскелета та мембрани, і, як наслідок, стан комплексу цитоскелет-мембрани в цілому.

Таким чином, у визначенні чутливості еритроцитів до зміни осмотичних умов важливим є вихідні параметри позаклітинного середовища, що визначають стан клітин. Підвищення концентрації зовнішнього серед-

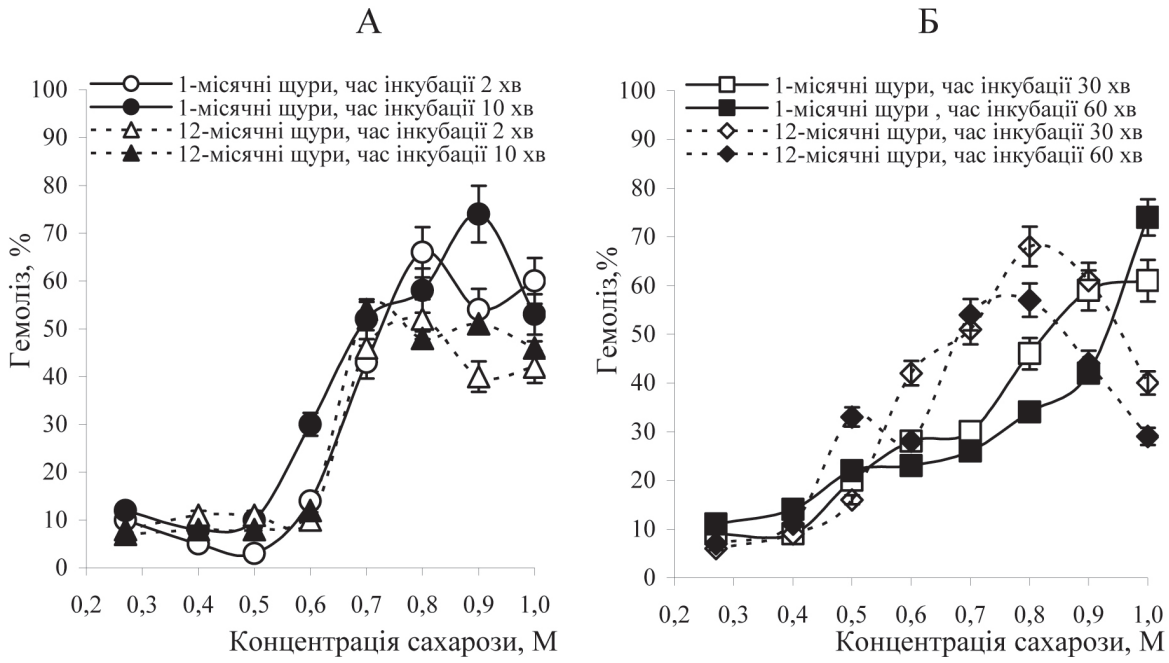

Рис. 2. Залежність гемолізу еритроцитів 1- та 12-місячних щурів в 4,0 М NaCl (37 С) від часу інкубації в розчинах сахарози: 2 та 10 хв (А); 30 та 60 хв (Б).

овища вище певних (порогових) значень може значно підвищити чутливість клітин до подальших змін умов середовища і стресових впливів [4,12]. Можливо, стан підвищеної чутливості зневоднених клітин пов'язаний з нестабільністю клітинної мембрани, що виникає через порушення щільності упаковки як компонентів ліпідного бішару, так і білків цитоскелета.

Стан функціонального комплексу цитоскелет–плазматична мембрана, досягнутий в умовах дегідратації в гіпертонічних розчинах сахарози, визначає здатність еритроцитів не тільки зберігати структурну цілісність за таких умов, але й характер осмотичної чутливості до подальшого переносу в 4,0 М NaCl.

Виявлені особливості осмотичної стійкості еритроцитів щурів 1- і 12-місячного віку можуть бути наслідком змін кількісного складу певних білків плазматичної мембрани та цитоскелета. Показано, що в процесі циркуляції в цих клітинах знижується вміст основних білків, що формують цитоскелет, інтегрального білка смуги 3, білків, які забезпечують зв'язування між цитоскелетом і плазматичною мембраною з формуванням єдиного функціонального комплексу з цих структур [2,13]. Зокрема ці зміни розвиваються при внутрісудинному старінні функціонально зрілих клітин. Крім того встановлено, що стан ліпідного бішару мембрани, вміст спектринів, актину, гліцеральдегід-дегідрогенази, глютатіон S трансферази в еритроцитах щурів змінюється на певних етапах онтогенезу [2]. Такі вікові особливості кількісного складу білків еритроцитів, зокрема, плазматичної мембрани та цитоскелета, будуть впливати не тільки на підтримання форми еритроцитів, пластичності їх мембрани, але й на стійкість клітин в дегідратуючих умовах, при зміні внутріклітинного pH та іонного гомеостазу цих клітин.

Висновки. Показано, що стійкість еритроцитів щурів до гіпертонічних розчинів сахарози залежить від їх тонічності, часу інкубації та віку тварин. Інкубація в гіпертонічних розчинах сахарози сенсибілізує еритроцити щурів до гіпертонічного шоку.

Перспективи подальших досліджень. В подальших дослідженнях планується вивчити вплив модифікації взаємодії цитоскелета та мембрани еритроцитів 1- та 12-місячних щурів на осмотичну стійкість цих клітин до гіпертонічних умов.

Література

1. Voytenko VP. Eritrotsit: Stareniye kletki i stareniye organizma. Tsitologiya i genetika. 1984;6:442-7. [in Russian].
2. Snegireva LV. Reologicheskiye svoystva eritrotsitov v ikh ontogeneze [avtoreferat]. Kursk: Kurskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet; 2004. 22 s. [in Russian].
3. Bondarenko VA, Bondarenko TP, Rudenko SV. Effekty degidratatsii v kontrole kholodovoy i osmoticheskoy chuvstvitel'nosti kletok. Problemy kriobiologii. 1992;4:14-26. [in Russian].
4. Shpakova NM. Temperaturna ta osmotychna stiykist' erytrotsytiv riznykh vydiv ssavtsiv [avtoreferat]. Kharkiv: Instytut problem kriobiolohiyi i kriomedytsyny; 2014. 44 s. [in Ukrainian].
5. Shpakova NM, Orlova NV, Nipot YeYe, Shapkina OA. Vliyaniye glitserina na ustoychivost' eritrotsitov cheloveka k gipertonicheskomu i mekhanicheskomu stressu. Visnyk problem biolohiyi i medytsyny. 2015;3(2):352-5. [in Russian].
6. Shpakova NM, Orlova NV, Nipot YeYe, Shapkina OA, Mazur AA. Osmoticheskaya chuvstvitel'nost' eritrotsitov mlekopitayushchikh pri modifikatsii ikh iskhodnogo sostoyaniya. Visnyk problem biolohiyi i medytsyny. 2016;2(3):356-61. [in Russian].
7. Saito M, Watanabe-Nakayama T, Machida S, Osada T, Afrin R, Ikai A. Spectrin–ankyrin interaction mechanics: A key force balance factor in the red blood cell membrane skeleton. Biophysical Chemistry. 2015;(200-201):1-8.
8. Yershova NA, Shpakova NM, Orlova NV. Vliyaniye fenilgidrazina i alkilsul'fatov na osmoticheskuyu chuvstvitel'nost' eritrotsitov mlekopitayushchikh. Dopovidi NAN Ukrayiny. 2012;6:129-33. [in Russian].
9. Pozdnyakov VV. Vliyaniye sostav i osmolyarnosti sredy na ustoychivost' eritrotsitov k osmoticheskomu i temperaturnomu shoku [avtoreferat]. Khar'kov: Institut problem kriobiologii i kriomeditsiny; 1989. 16 s. [in Russian].

10. Pesina NI. Issledovaniye bar'yernoy ustoychivosti plazmaticheskoy membrany eritrotsitov v usloviyakh osmoticheskogo i temperaturnogo shoka: [avtoreferat]. Khar'kov: Institut problem kriobiologii i kriomeditsiny; 1993. 16 s. [in Russian].
11. Wessel JMC, Veerkap JH. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes. Differenses in osmotic behaviour of erythrocytes after treatment with electrolyte and nonelectrolyte solutions. Biochim. Biophys. Acta. 1973;291(1):57-71.
12. Shpakova NM, Orlova NM, Nipot YeYe. Obezvozhivaniye eritrotsitov mlekopitayushchikh vliyayet na ikh chuvstvitel'nost' k mekhanicheskomu stressu. Problemy kriobiologii i kriomeditsiny. 2015;25(1):24-32. [in Russian].
13. Snegireva LV, Ivanov VP, Shevereva YuV. Sravnitel'nyy analiz kolichestvennogo predstavitel'stva belkov kletochnykh membran eritrotsitov raznogo vozrasta. V Materialy konf Aktual'ne problemy biologii, meditsiny i ekologii; Tomsk: Tomskiy gosudarstvennyy universitet. 2004;3(1):158-9. [in Russian].

СТІЙКІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ДО ГІПЕРТОНІЧНИХ УМОВ СЕРЕДОВИЩА

Коба Л. В., Шапкіна О. О., Жуйкова А. Є., Бондаренко В. А.

Резюме. Еритроцити 1- і 12-місячних щурів піддавали гіпертонічному шоку (4,0 М NaCl) після початкової інкубації в розчинах сахарози (0,27 – 1,0 М) на протязі 2, 10, 30, 60 хв. В гіпертонічних неелектролітних середовищах частина клітин тварин обох вікових груп зазнає гемолізу. Рівень їх пошкодження залежить від тонічності розчину, часу експонування, віку тварин. Початкова інкубація еритроцитів 1- і 12-місячних щурів в розчинах сахарози підвищує їх чутливість до подальшого переносу в 4,0 М NaCl.

Ключові слова: осмотична стійкість, еритроцити щурів, гіпертонічні розчини сахарози, гіпертонічний шок.

УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА К ГИПЕРТОНИЧЕСКИМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ

Коба Л. В., Шапкина О. А., Жуйкова А. Е., Бондаренко В. А.

Резюме. Эритроциты 1- и 12-месячных белых крыс подвергали гипертоническому шоку (4,0 М NaCl) после их предварительной модификации в растворах сахарозы (0,27 – 1,0 М) в течение 2, 10, 30, 60 мин. В гипертонических неэлектролитных средах часть клеток животных обеих возрастных групп подвергается повреждению. Уровень их гемолиза зависит от тоничности среды, времени экспозиции и возраста животных. Исходная инкубация эритроцитов 1- и 12-месячных крыс в растворах сахарозы повышает их чувствительность к дальнейшему переносу в 4,0 М NaCl.

Ключевые слова: осмотическая устойчивость, эритроциты крыс, гипертонические растворы сахарозы, гипертонический шок.

STABILITY OF DIFFERENT AGE RAT ERYTHROCYTES TO HYPERTONIC MEDIUM

Koba L. V., Shapkina O. A., Zhuikova A. E., Bondarenko V. A.

Abstract. Age-related changes in the animal organism develop at the level of cells, organs, and physiological systems. Changes in the membrane structures of cells at different stages of ontogeny can have a latent character, manifest themselves in certain experimental conditions beyond the physiological norm. Stability of mammalian erythrocytes to hypertonic influence is determined by the cytoskeleton-plasma membrane complex. Its condition can be changed by exposing erythrocytes under certain conditions at the stage of pre-incubation before the action of the main stress factor.

The aim of the study was to investigate the osmotic resistance of erythrocytes of 1- and 12-month-old white rats to hypertonic shock (4.0 M NaCl) after preliminary incubation in sucrose solutions (0.27-1.0 M).

Object and methods of research. The experiments were performed on red blood cells of male Wistar rats of 1 and 12 months. The washed red blood cells were preincubated in sucrose solutions for 2, 10, 30, 60 minutes at 37°C and then transferred to 4.0 M NaCl at the same temperature. The cells were precipitated by centrifugation. The hemoglobin content in the supernantant was measured spectrophotometrically. The level of hemolysis in the sample was expressed as a percentage of the sample with 100% hemolysis. Statistical processing of the results was carried out by conventional methods using Mann-Whitney criteria.

Result and discussion. It was found that the rat erythrocytes are hemolysed in sucrose solutions during the pre-incubation stage. During the first 2 minutes under these conditions not more than 10% of the cells of animals of both age groups are damaged. Longer incubation of erythrocytes in non-electrolyte media is responsible for a decrease in their osmotic stability. Rat erythrocytes of the younger age group are less stable compared to the cells of 12-month-old animals under the same conditions of tonicity and incubation time. So the level of hemolysis of cells of 1-month-old animals in hypertonic sucrose solutions reaches 44% by the 30^{th} minute and 60% by the 60^{th} minute, and 12-month animals, respectively, 28% and 42% under the same incubation conditions.

The character of the effect of pre-incubation conditions on the osmotic resistance of erythrocytes to further transfer to 4.0 M NaCl depends on the conditions at this stage and the age of the animals. A decrease in the level of hemolysis in 4.0 M NaCl is observed only after a 2-minute incubation of cells of 1-month-old rats in solution with 0.5 M sucrose. With an increase in the pre-exposure time (30 and 60 min), the erythrocytes of both age groups become sensitive to a transfer in 4.0 M NaCl. In this case, hemolytic damage in hypertonic saline solution of erythrocytes increases after preliminary incubation in media with 0.5-1.0 M sucrose. Thus, erythrocytes of 1-month-old rats undergo hemolysis in sucrose solutions during the pre-incubation stage with an increase in its duration to 30-60 min. The erythrocytes of 12-month-old rats have a large osmotic resistance to hypertonic conditions in non-electrolyte media, but are substantially sensitized to further transfer to 4.0 M NaCl with increasing time of their initial exposure in them.

Conclusions. It is shown that the resistance of rat erythrocytes to hypertonic solutions of sucrose depends on the tonicity of the medium, the incubation time and the age of the animals. Incubation in hypertonic sucrose solutions, mainly, sensitizes the erythrocytes of rats to hypertonic shock (4.0 M NaCl).

Key words: osmotic stability, rat erythrocytes, hypertensive sucrose solutions, hypertonic shock.

Рецензент – проф. Міщенко І. В.

Стаття надійшла 21.08.2018 року