

Гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих в средах с различным катионным составом

UDC 57.043:591.111.1

S.S. ERSHOV, N.V. ORLOVA, N.M. SHPAKOVA*

Hypertonic Cryohemolysis of Mammalian Erythrocytes in Media with Different Cation Compositions

Изучено влияние сред, содержащих одновалентные катионы Li^+ , Na^+ , K^+ либо смесь ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) (осмолярность 2400 мОсмоль/кг), на ход временной зависимости гипертонического криогемолиза высококалийных (человека и лошади) и высоконатриевых (собаки и быка) эритроцитов. Показано фактически во всех средах снижение уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов человека, собаки и лошади в условиях продолжительной инкубации при 37°C в отличие от эритроцитов быка, для которых характерна обратная временная зависимость. Установлено что чувствительность эритроцитов человека к гипертоническому криогемолизу снижается в ряду $\text{Na}^+ > \text{K}^+ + \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$, собаки - в обратном порядке. Временные зависимости гемолиза эритроцитов как лошади, так и быка в средах с разным катионным составом практически не имеют отличий. Полученные результаты обсуждаются с точки зрения особенностей ионтранспортных систем эритроцитов разных видов млекопитающих.

Ключевые слова: эритроциты человека, лошади, собаки, быка, гипертонический криогемолиз, Na^+ , K^+ , Li^+ и ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)–содержащие среды.

Вивчено вплив середовищ, що містять одновалентні катіони Li^+ , Na^+ , K^+ або їх суміш ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) (осмолярність 2400 мОсмоль/кг), на хід залежності гіпертонічного криогемолізу від часу інкубування висококалієвих еритроцитів (людини і коня) і високонатрієвих клітин (собаки і бика). Показано фактично у всіх середовищах зниження рівня гіпертонічного криогемолізу еритроцитів людини, собаки і коня в умовах тривалої інкубації при 37°C на відміну від еритроцитів бика, для яких характерна часова зворотня залежність. Встановлено що чутливість еритроцитів людини до гіпертонічного криогемолізу знижується у ряду $\text{Na}^+ > \text{K}^+ + \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$, собаки - у зворотньому порядку. Залежності гемолізу від часу інкубації еритроцитів як коня, так і бика у середовищах із різним катіонним складом фактично не мають відмінностей. Отримані результати обговорюються з точки зору особливостей іонтранспортних систем еритроцитів різних видів ссавців.

Ключові слова: еритроцити людини, коня, собаки, бика, гіпертонічний криогемолиз, середовища, що містять Na^+ , K^+ , Li^+ та ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$).

The effect of media, containing either Li^+ , Na^+ , K^+ monovalent cations or combination ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) (2,400 mOsm/kg osmolarity) on a time dependence proceeding of hypertonic cryohemolysis in high-potassium erythrocytes (human and equine) and high-sodium (canine and bovine) ones has been studied. A decrease in hypertonic cryohemolysis level of human, canine and equine erythrocytes under long-term incubation at 37°C in contrast to bovine ones with typical reversible time dependence has been demonstrated almost in all media. Sensitivity of human erythrocytes to hypertonic cryohemolysis has been established to reduce in the series of $\text{Na}^+ > \text{K}^+ + \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$ and in a reversible order for canine ones. Time dependencies of both equine and bovine erythrocyte hemolysis in media with different cation composition are practically similar. The results obtained are discussed from the point of view of peculiarities of erythrocyte ion transport systems of different mammalian species.

Key-words: human, equine, canine, bovine erythrocytes, hypertonic cryohemolysis, Na^+ , K^+ , Li^+ and ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-containing media.

Изучению чувствительности эритроцитов к изменению температурных и осмотических факторов окружающей среды уделяется большое внимание [1, 2]. Перенос эритроцитов человека и животных в гипертонические среды приводит к температурно-зависимому повреждению клеточной мембраны, вследствие которого гемоглобин может выходить из клетки [2, 4, 15]. Известно, что гипертонический криогемолиз эритроцитов – повреждение клеток, возникающее в результате их

A great attention is paid to studying the human erythrocyte sensitivity to change in temperature and osmotic environmental factors [1, 2]. Human and animal erythrocyte transfer into hypertonic media results in a temperature-dependent cell membrane damage, due to which the hemoglobin release out of cell may occur [2, 4, 15]. Erythrocyte hypertonic cryohemolysis is known as a cell damage, resulting from erythrocyte exposure into hypertonic solution at 20–45°C and following cooling down to the temperature

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

экспозиции в гипертоническом растворе при 20-45°C и последующего охлаждения до температуры ниже 13°C [8, 15]. Установлены особенности развития временной зависимости гипертонического криогемолиза эритроцитов человека в различных средах [3]. В результате продолжительной инкубации эритроцитов человека при 37°C в среде, содержащей 1,2 М NaCl, наблюдается снижение гемолиза клеток при их последующем охлаждении до 0°C. В неэлектролитных средах (0,86 М раствор сахарозы) гипертонический криогемолиз повышается по мере увеличения продолжительности инкубации клеток при 37°C, что объясняется перераспределением ионов Na⁺, K⁺ между внутренней и внешней средой клеток в электролитной среде и его отсутствием в неэлектролитной [13, 16].

При инкубации эритроцитов человека в среде, содержащей 1,2 М NaCl, происходит медленное освобождение K⁺ [3], вследствие которого уменьшается объем клеток [7]. Считают, что последнее приводит к изменению барьерной функции мембраны, увеличению ее проницаемости для ионов Na⁺. Поглощение ионов Na⁺ клеткой тормозит уменьшение объема, что влечет снижение чувствительности эритроцитов к последующему охлаждению. Транспорт ионов Cl⁻ является одним из важных механизмов изменения объема эритроцитов [13]. Это обусловлено связью транспорта ионов Cl⁻ с транспортом ионов K⁺, что, в свою очередь, влияет на выход воды из клетки и уменьшение ее объема. Активация выхода Cl⁻ и отсутствие входа Na⁺ определяют характерную временную зависимость гипертонического криогемолиза в сахарозной среде.

Эритроциты млекопитающих по внутриклеточному составу подразделяют на 2 типа: первый (классический) – эритроциты с высокой концентрацией ионов K⁺ и низкой ионов Na⁺, второй – эритроциты некоторых видов млекопитающих с высоким уровнем Na⁺ и низким K⁺ [10]. В связи с этим было исследовано влияние внеклеточной среды с разным катионным составом на эритроциты обоих типов. Известно, что в цитоплазме эритроцитов человека и лошади преобладает катион K⁺, а собаки и быка – катион Na⁺ [5, 10].

Цель данной работы – провести сравнительное изучение временной зависимости гипертонического криогемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих (человека, лошади, собаки, быка) в средах с осмолярностью 2400 мОсмоль/кг и разным катионным составом (Na⁺, K⁺, Li⁺ и (Na⁺ + K⁺)).

Материалы и методы

Эритроциты человека, быка, собаки и лошади получали из крови (n=6), заготовленной на консерванте “Глюгидир”. Все среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

lower than 13°C [8, 15]. There were established the peculiarities of time dependency development of human erythrocyte hypertonic cryohemolysis in different media [3]. As a result of human erythrocyte long-term incubation at 37°C in the 1.2 М NaCl-containing medium there was observed a decrease in cells hemolysis within their further cooling down to 0°C. In non-electrolyte media (0.86 М sucrose) a hypertonic cryohemolysis enhances with an increase in cell incubation time at 37°C, that is explained by Na⁺, K⁺ ion redistribution between internal and external cell media in electrolyte medium and its absence in non-electrolyte one [13, 16].

Under human erythrocyte incubation in 1.2 М NaCl-containing medium even under slight membrane damages [3] a slow K⁺ release occurs, resulting in cell volume reduction [7]. The latter is considered as resulting in a change of membrane barrier function, its permeability increase for Na⁺ ions. The absorption of Na⁺ ions by cell inhibits the volume reduction, that leads to a decrease in erythrocyte sensitivity to following cooling. Cl⁻ ion transport is one of the important mechanisms of erythrocyte volume change [13]. This is stipulated by the bond of Cl⁻ ion transport with K⁺ one, that in its turn affects water release out of cell and decrease in its volume. Activation of Cl⁻ release and no Na⁺ incoming determine a typical time dependence of hypertonic cryohemolysis in sucrose medium.

Mammalian erythrocytes by their intracellular composition are divided into 2 types: the first (classic) comprises erythrocytes with K⁺ ion high concentration and a low one for Na⁺ ions, the second one consists of erythrocytes of certain mammalian species with high Na⁺ level and low K⁺ one [10]. Due to this we have investigated the effect of extracellular medium with different cation composition on both type erythrocytes. K⁺ cation is known to predominate in human and equine erythrocytes but Na⁺ cation does in canine and bovine ones [5, 10].

This research was targeted to comparatively study a time dependence of erythrocyte hypertonic cryohemolysis of different mammalian species (human, horse, dog, bull) in media with 2400 mOsm/kg osmolarity with different cation composition (Na⁺, K⁺, Li⁺ and (Na⁺+K⁺)).

Materials and methods

Human, bovine, canine and equine erythrocytes were procured from blood (n=6) and prepared with “Glugicir” preservative. All media were prepared with 0.01 М phosphate buffer, pH 7.4.

Hypertonic solutions with 2,400 mOsm/kg osmolarity such as: 1.2 М NaCl; 1.2 М KCl; 1.2 М LiCl; 1.1875 М NaCl+0.0125 М KCl were used in the research. Na⁺, K⁺ and Li⁺ cations were selected by their presence in erythrocyte cytoplasm. Combined

В работе использовали гипертонические растворы с осмолярностью 2400 мОсмоль/кг: 1,2 М NaCl; 1,2 М KCl; 1,2 М LiCl; 1,1875 М NaCl + 0,0125 М KCl. Выбор катионов Na⁺; K⁺ и Li⁺ обусловлен их наличием в цитоплазме эритроцитов. Смешанную среду (1,1875 М NaCl + 0,0125 М KCl) использовали с целью получения во внеклеточной среде концентрации ионов K⁺, подобной концентрации этого катиона в плазме крови, но при этом учитывали, что объем клетки в гипертонической среде уменьшится примерно на 40 % [12]. Внеклеточная среда, содержащая смесь катионов Na⁺ и K⁺, должна соответствовать вышеуказанной осмолярности. Это достигается введением соответствующего количества ионов Na⁺.

Осмолярность растворов контролировали с помощью осмометра ОМКА 1Ц-01 (Украина).

Для гипертонического криогемолиза эритроцитов клетки переносили на 1-120 мин в раствор с соответствующим катионным составом при температуре 37°C, после чего аликвоту помещали на 10 мин в аналогичный раствор, охлажденный до 0°C (конечный гематокрит – 0,4%). Уровень гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически ($\lambda=543$ нм) и рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии детергента тритона X-100 (0,1 %).

В работе для каждого графика из серии повторов одного эксперимента представлено максимальное отклонение величины гемолиза эритроцитов в виде точки с разбросом значений, имеющих соответствующую маркировку.

В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации “х.ч” и “ч.д.а”. Экспериментальные данные приведены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего и представлены на графиках как точки с максимальным разбросом, имеющие соответствующую маркировку.

Результаты и обсуждение

Эритроциты млекопитающих после инкубирования при 37°C в гипертонических средах с разным катионным составом переносили на 10 мин в соответствующие среды с температурой 0°C. Для описания полученных временных зависимостей гипертонического криогемолиза эритроцитов использовали два параметра: уровень гипертонического криогемолиза эритроцитов и характер его изменения в результате продолжительной инкубации клеток при 37°C (рис. 1, а). Эритроциты человека, проинкубированные в гипертонических средах с разным катионным составом, характеризуются достаточно высоким исходным уровнем повреждения клеток 90-100% (после минутной

medium (1.1875 М NaCl+0.0125 М KCl) was used with the aim to obtain in an extracellular medium the K⁺ ion concentration similar to that in blood plasma, but thereby taking into account the fact that cell volume in hypertonic medium would nearly reduce by 40% [12]. An extracellular medium, containing Na⁺ and K⁺ cation combination should correspond to the mentioned above osmolarity. This is achieved by introducing the corresponding amount of Na⁺ ions.

The solution osmolarity was controlled with ОМКА 1С-01 osmometer (Ukraine).

For erythrocyte hypertonic cryohemolysis the cells were transferred for 1-120 min into the solution with corresponding cation composition at 37°C, afterwards an aliquot was placed for 10 min into similar solution cooled down to 0°C (final hematocrit was 0.4%). Hemoglobin level in supernatant was spectrophotometrically determined ($\lambda=543$ nm) and calculated in percentage in respect to 100% erythrocyte hemolysis at the presence of X-100 triton (0.1%).

In the work for each plot from the repeat series of one experiment the maximum deviation of erythrocyte hemolysis value is shown as a point with value spread with corresponding labeling.

Nationally produced reagents with “chemically pure” and “pure for analysis” grades have been used in the research. Experimental data are presented as arithmetic mean \pm standard error of mean and presented in plots as points with maximum spread with corresponding symbols.

Results and discussion

Mammalian erythrocytes after incubation at 37°C under hypertonic media with different cation composition were transferred for 10 min into the corresponding media with 0°C temperature. To describe the obtained time dependencies of erythrocyte hypertonic cryohemolysis we used two parameters: the level of erythrocyte hypertonic cryohemolysis and the character of its change resulting from a long-term cell incubation at 37°C (Fig. 1, a). Human erythrocytes, incubated in hypertonic media with different cation composition are characterized with quite a high initial level of cell damages of 90-100% (after 1 min incubation at 37°C and following cooling down to 0°C), that decreases with augmentation of cell incubation duration at 37°C (Fig. 1, a).

Human erythrocytes manifest different sensitivity to cooling in studied electrolyte media. The data reported in the paper [14], testifying to an equal level of cell damage under cooling in hypertonic media with different cation composition are not contrary to our results. According to the experimental conditions of the research [14] after a short-term erythrocyte incubation (5 min) no differences were found-out, but after more prolonged cell exposure into hypertonic

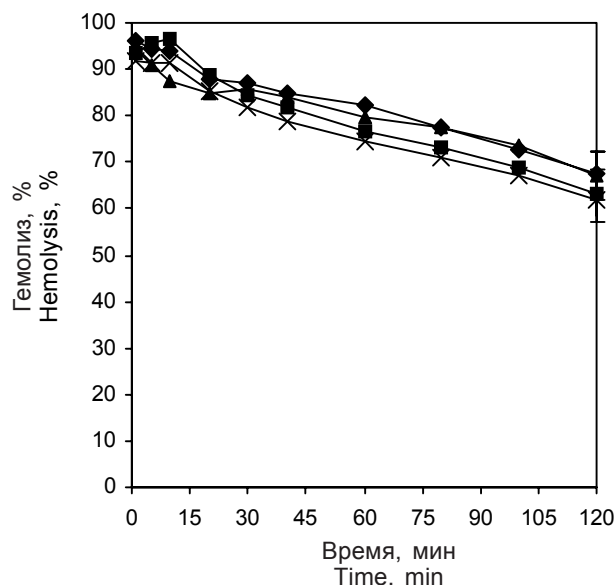
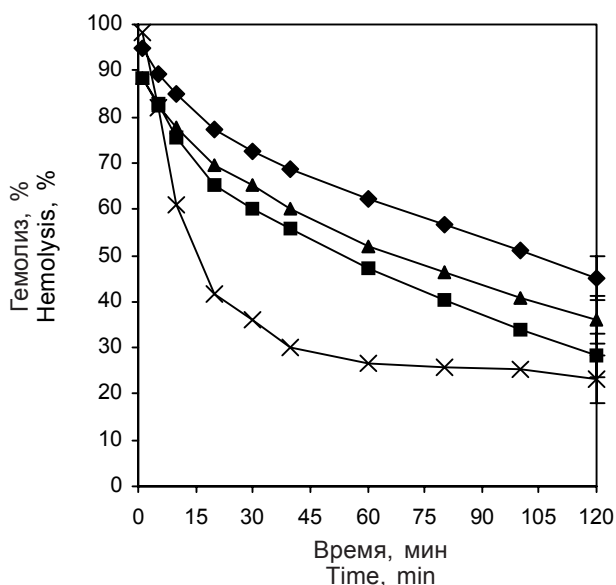


Рис.1. Зависимость уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов человека (а) и лошади (б) от времени инкубации при 37°C в средах: \blacklozenge – 1,2 М NaCl; \blacksquare – 1,2 М KCl; \blacktriangle – 1,1875 М NaCl + 0,0125 М KCl; \times – 1,2 М LiCl.
Fig. 1. Dependency of hypertonic cryohemolysis level in human (a) and equine (b) erythrocytes on incubation time at 37°C in the media: \blacklozenge – 1.2 M NaCl; \blacksquare – 1.2 M KCl; \blacktriangle – 1.1875 M NaCl + 0.0125 M KCl; \times – 1.2 M LiCl.

инкубации при 37°C и последующего охлаждения до 0°C), который снижается по мере увеличения продолжительности инкубации клеток при 37°C (рис 1, а).

Эритроциты человека проявляют различную чувствительность к охлаждению в изучаемых электролитных средах. Данные работы [14], свидетельствующие об одинаковом уровне повреждения клеток при охлаждении в гипертонических средах с разным катионным составом, не противоречат нашим результатам. По экспериментальным условиям работы [14] после непродолжительного инкубирования эритроцитов (5 мин) различия не выявлены, а после более длительного выдерживания клеток в гипертонической среде при 37°C установлены различия уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов, помещенных в среды с различным катионным составом. Максимальное повреждение клеток человека наблюдается в Na⁺-содержащей среде, менее выраженное – в Na⁺ + K⁺- и K⁺-содержащих средах и минимальное – в растворе LiCl. Если в отношении первых трех сред можно говорить о примерно одинаковой скорости снижения уровня гипертонического криогемолиза на протяжении инкубации до 120 мин, то в последней среде в течение 40 мин наблюдаются стремительное снижение уровня гемолиза (с 100 до 25%) и выход кривой на плато.

Снижение во времени уровня гипертонического гемолиза эритроцитов лошади, которые как и эритроциты человека относятся к высококалиевым

medium at 37°C the differences in hypertonic cryohemolysis level of erythrocytes, placed into the media with various cation composition, were established. The maximum damage in human cells is observed in Na⁺-containing medium, a less manifested one in Na⁺ + K⁺- and K⁺-containing media and the minimum one in LiCl solution. If in respect of the first three media we can suggest about an approximately equal decrease rate of hypertonic cryohemolysis level within incubation down to 120 min, in the latter medium during 40 min an impetuous decrease in hemolysis level (from 100 down to 25%) and curve approaching to the plateau were observed.

Decrease in time of hypertonic cryohemolysis level of equine erythrocytes, which are referred together with human ones to high-potassium cells, is slightly manifested (Fig. 1. b) In addition, in the media with different cation compositions there were established the insignificant differences (to 10%) in the level of erythrocyte hypertonic cryohemolysis within the whole time range (1-120 min).

When transferring human erythrocytes, referred to a high-potassium type into a hypertonic Na⁺-containing medium, the two processes in time are observed. From one side, the intracellular K⁺ ions release out of erythrocytes via transmembrane defects by a concentration gradient [3], from another one the extracellular Na⁺ ions, which concentration significantly exceeds their intracellular one, enter into erythrocytes, in spite of potassium pump and other transport system functioning [10]. Due to the fact that gradient by Na⁺ is much higher than that by K⁺, an intracellular Na⁺

клеткам, слабо выражено (рис. 1, б). Кроме того, в средах с разным катионным составом выявлены несущественные различия (до 10%) в уровне гипертонического криогемолиза эритроцитов во всем временном диапазоне (1-120 мин).

При переносе эритроцитов человека, относящихся к высококалиевому типу, в гипертоническую Na^+ -содержащую среду в клетках происходят два процесса. С одной стороны, внутриклеточные ионы K^+ выходят из эритроцитов через трансмембранные дефекты по концентрационному градиенту [3], а с другой – внеклеточные ионы Na^+ , концентрация которых значительно превосходит их внутриклеточную концентрацию, входят в эритроциты, несмотря на работу натриевого насоса и других транспортных систем [10]. В силу того, что градиент по Na^+ гораздо выше, чем градиент по K^+ , со временем будет существенно повышаться внутриклеточная концентрация Na^+ , вследствие чего выравняется осмотический градиент на мембране.

В том случае, когда эритроциты находятся в 1,2 М KCl , катионы Na^+ будут выходить из клетки, а катионы K^+ входить. Поскольку исходный градиент на мембране для K^+ будет несколько ниже, чем градиент по Na^+ в среде, содержащей 1,2 М NaCl , то условное равновесие на мембране будет достигаться быстрее, что проявится в более существенном снижении уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов со временем (рис.1, а). Промежуточное положение занимает повреждаемость клеток в среде, содержащей смесь ионов Na^+ и K^+ .

Быстрое снижение во времени криогемолиза эритроцитов человека в Li^+ -содержащей среде, вероятно, связано со способностью Li^+ , который является небольшим катионом, быстро распределяться между внешней и внутренней средой клетки. Возможно, внеклеточный Li^+ как меньший по размеру ион [11] быстрее входит в клетку, замещая ионы Na^+ и K^+ , вышедшие из клетки по градиенту. Движение ионов Li^+ через эритроцитарную мембрану осуществляется различными транспортными системами (Na^+/K^+ - насос; Na^+/Li^+ -противотранспорт; бикарбонат зависимый путь и пассивный транспорт), однако пассивная диффузия обеспечивает основную часть транспорта этого катиона (до 70%) [9].

Слабо выраженные различия гипертонического криогемолиза эритроцитов лошади в средах, содержащих различные катионы, остаются не исследованными. Эритроциты лошади и человека имеют подобный градиент Na^+ и K^+ на мембране, однако анализ особенностей катионного транспорта в эритроцитах лошади и человека [6] свидетельствует о существенном различии Na^+ - и K^+ -транспортных

концентрация будет значительно увеличиваться со временем, что приведет к выравниванию осмотического градиента на мембране.

В случае, когда эритроциты находятся в 1,2 М KCl , Na^+ катионы будут выходить из клеток, а K^+ катионы будут входить. Поскольку исходный градиент на мембране для K^+ будет несколько ниже, чем градиент по Na^+ в среде, содержащей 1,2 М NaCl , то условное равновесие на мембране будет достигаться быстрее, что проявится в более существенном снижении уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов со временем (рис.1, а). Промежуточное положение занимает повреждаемость клеток в среде, содержащей смесь ионов Na^+ и K^+ .

Быстрое снижение во времени криогемолиза эритроцитов человека в Li^+ -содержащей среде, вероятно, связано со способностью Li^+ , который является небольшим катионом, быстро распределяться между внешней и внутренней средой клетки. Возможно, внеклеточный Li^+ как меньший по размеру ион [11] быстрее входит в клетку, замещая ионы Na^+ и K^+ , вышедшие из клетки по градиенту. Движение ионов Li^+ через эритроцитарную мембрану осуществляется различными транспортными системами (Na^+/K^+ -насос; Na^+/Li^+ -обменный транспорт; бикарбонат-зависимый путь и пассивный транспорт), но пассивная диффузия обеспечивает основную часть транспорта этого катиона (до 70%) [9].

Слегка проявившиеся различия гипертонического криогемолиза эритроцитов лошади в средах, содержащих различные катионы, остаются не исследованными. Эритроциты лошади и человека имеют подобный градиент Na^+ и K^+ на мембране, однако анализ особенностей катионного транспорта в эритроцитах лошади и человека [6] свидетельствует о существенном различии Na^+ - и K^+ -транспортных систем в этих клетках. В эритроцитах лошади по сравнению с человеческими наблюдается односторонний поток K^+ ионов через Na^+ -насос, который осуществляется в 3-4 раза медленнее, но Na^+/Li^+ -обменный транспорт осуществляется в 6 раз быстрее. Кроме того, для эритроцитов лошади Na^+/K^+ -обменный транспорт не является типичным. Таблица показывает различия эритроцитов лошади и человека по уровню K^+ и Na^+ ионов или по их общей концентрации и K^+/Na^+ соотношению [4]. Особенности эритроцитов лошади, очевидно, предполагают различия во времени развития гипертонического криогемолиза по сравнению с человеческими эритроцитами.

Проявившиеся различия во времени развития гипертонического криогемолиза эритроцитов лошади и человека в Li^+ -содержащих средах (рис. 1, а, б) являются, очевидно, обусловленными способностью лошади накапливать Li^+ катионы более интенсивно (в 2 раза) по сравнению с человеком [10]. Примечательно, что в эритроцитах лошади наблюдается меньшее накопление Li^+ , к которому более высокая Na^+/Li^+ -обменная транспортная активность (в 6 раз) является характерной. Из-за упомянутого факта предполагалось участие Li^+ -транспортных систем, отличающихся от Na^+/Li^+ -ко-транспорта в передаче [6].

систем в этих клетках. В эритроцитах лошади, по сравнению с эритроцитами человека, односторонний поток ионов K^+ через Na^+ -насос осуществляется в 3-4 раза медленнее, а Na^+/Li^+ -противотранспорт, напротив, – быстрее примерно в 6 раз. Кроме того, для эритроцитов лошади Na^+/K^+ -котранспорт не характерен. Из данных таблицы следует, что эритроциты лошади и человека различаются как по внутриклеточному уровню ионов K^+ и Na^+ , так и по их суммарной концентрации и соотношению K^+/Na^+ [4]. По-видимому, видовые особенности эритроцитов лошади обуславливают их отличие во временном развитии гипертонического криогемолиза по сравнению с эритроцитами человека.

Выраженные различия во временном развитии гипертонического криогемолиза эритроцитов человека и лошади в Li^+ -содержащих средах (рис. 1, а, б), по-видимому, обусловлены способностью первых более интенсивно (в 2 раза) накапливать катионы Li^+ [10]. Отметим, что меньшее накопление Li^+ наблюдается в клетках лошади, для которых характерна более высокая Na^+/Li^+ -противотранспортная активность (в 6 раз). На основании указанного факта сделано предположение об участии в переносе Li^+ -транспортных систем, отличных от Na^+/Li^+ -котранспорта [6].

Для эритроцитов собаки (рис. 2, а) характерно времязависимое снижение уровня гипертонического гемолиза в Na^+ -, K^+ - и (Na^++K^+) - средах в отличие от Li^+ -содержащей среды. По уровню гипертонического повреждения этих клеток среды можно расположить следующим образом: $Li^+ > K^+ > K^++Na^+ > Na^+$, т.е. в порядке, противоположном для эритроцитов человека ($Na^+ > K^++Na^+ > K^+ > Li^+$).

Для гипертонического криогемолиза клеток быка (рис. 2, б) в отличие от результатов, полученных для эритроцитов человека, лошади и собаки, характерны низкое исходное повреждение (10-30%) и обратная временная зависимость гипертонического криогемолиза эритроцитов во всех используемых средах, т.е. повышение гипертонического криогемолиза по мере увеличения продолжительности инкубирования клеток при 37°C.

Для эритроцитов быка в исследованных средах развитие гипертонического криогемолиза во времени (рис. 2, б) можно охарактеризовать следующим образом: низкая повреждаемость в смешанной Na^++K^+ - среде, более высокая – в Li^+ - и наивысшая – в Na^+ - и K^+ -средах. В Na^+ - и K^+ -

Содержание одновалентных ионов и воды в эритроцитах млекопитающих [4]
Content of monovalent ions and water in mammalian erythrocytes [4]

Виды млекопитающих Mammalian species	Количество повторов Number of repeats	K^+ , мМ ($M \pm m$)	Na^+ , мМ ($M \pm m$)	$K^+ + Na^+$, мМ	K^+/Na^+	H_2O ($M \pm m$)
Собака Dog	3	10,8±1,23	180,4±4,5	191,2	0,06	1,98±0,03
Лошадь Horse	6	139,8±4,7	31,7±2,5	171,5	4,40	1,83±0,05
Человек Human	14	142,5±3,9	23,4±2,8	165,4	6,08	2,09±0,05
Бык Bull	5	41,6±2,8	112,2±5,3	153,8	0,36	1,86±0,07

For canine erythrocytes (Fig. 2, a) a time-dependent decrease in hypertonic hemolysis level in Na^+ -, K^+ - and (Na^++K^+) -media in contrast to Li^+ -containing medium is typical. By the level of hypertonic damage of these cells the media may be placed as follows: $Li^+ > K^+ > K^++Na^+ > Na^+$, i.e. in an opposite order for human erythrocytes ($Na^+ > K^++Na^+ > K^+ > Li^+$).

For bovine cell hypertonic cryohemolysis (Fig. 2, b) in contrast to the results, obtained for human, equine and canine erythrocytes the typical features are low initial damage (10-30%) and a reversible time dependency of erythrocyte hypertonic cryohemolysis in all used media, i.e. an increase in hypertonic cryohemolysis with augmentation of cell incubation duration at 37°C.

For bovine erythrocytes in the studied media the development of hypertonic cryohemolysis in time (Fig. 2, b) may be characterised as follows: low damage rate in a combined Na^++K^+ -medium, higher one in Li^+ - and the highest in Na^+ - and K^+ -media. In Na^+ - and K^+ -media the differences between curves of bovine erythrocyte hypertonic cryohemolysis are insignificant, but the highest cell damage rate is observed in K^+ -medium.

Canine and bovine cells in contrast to human and equine erythrocytes are referred to low-potassium type, i.e. their cells contain Na^+ as dominating cation. The results obtained for canine erythrocytes by a decrease in the level of hypertonic cryohemolysis at a long-term incubation in the media with different cations (Fig. 2, a) also correlate with the described above hypothesis of Na^+ and K^+ redistribution in hypertonic media with time. In the medium, containing Na^+ cation dominating in cells, the rate of hemolysis level reduction is higher and cell damage rate is the lowest. This is apparently related to a low content of K^+ ions in a cell, therefore their leakage and substitution for Na^+ ions occur quite rapidly. In the K^+ ions-containing medium a decrease with time is the lowest, the cell behaviour in a combined (Na^++K^+) -medium is intermediate. The fact of a complete absence of a decrease of hypertonic cryohemolysis level in $LiCl$ -containing medium remains

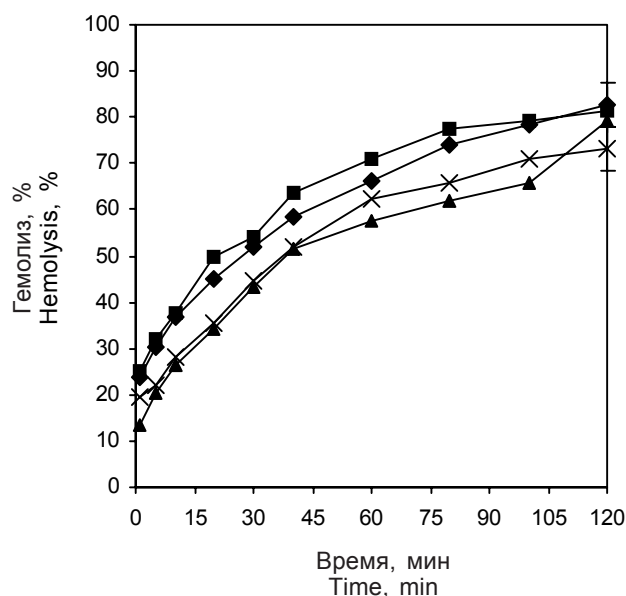
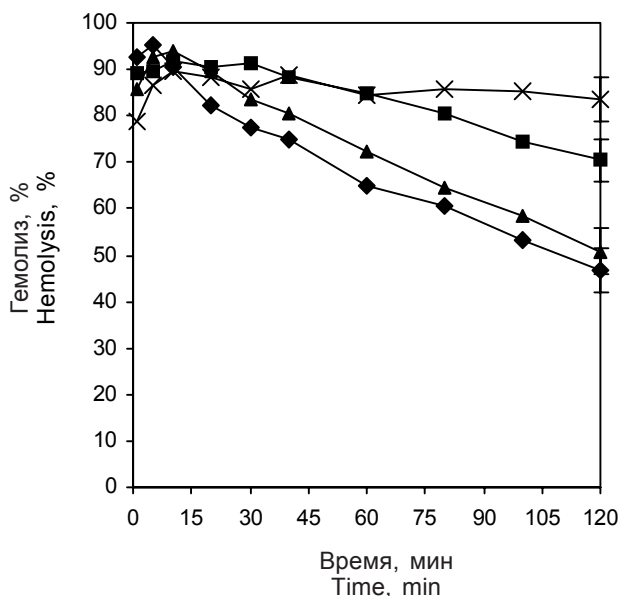


Рис.2. Зависимость уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов собаки (а) и быка (б) от времени инкубации при 37°C в средах: \blacklozenge – 1,2 М NaCl; \blacksquare – 1,2 М KCl; \blacktriangle – 1,1875 М NaCl + 0,0125 М KCl; \times – 1,2 М LiCl.

Fig. 2. Dependency of hypertonic cryohemolysis level in canine (a) and bovine (b) erythrocytes on incubation time at 37°C in the media: \blacklozenge – 1.2 M NaCl; \blacksquare – 1.2 M KCl; \blacktriangle – 1.1875 M NaCl + 0.0125 M KCl; \times – 1.2 M LiCl

средах различия между кривыми гипертонического криогемолиза эритроцитов быка незначительны, однако наибольшая повреждаемость клеток наблюдается в K^+ -среде.

Эритроциты собаки и быка, в отличие от клеток человека и лошади, относятся к низкокалийевому типу, т.е. их клетки в качестве доминирующего катиона содержат Na^+ . Результаты, полученные для эритроцитов собаки, по снижению уровня гипертонического криогемолиза при длительной инкубации в средах с разными катионами (рис.2, а) также согласуются с вышеописанной гипотезой перераспределения Na^+ и K^+ в гипертонических средах со временем. В среде, содержащей доминирующий в клетках катион Na^+ , скорость снижения уровня гемолиза больше, а повреждаемость клеток самая низкая. По-видимому, это связано с низким содержанием ионов K^+ в клетке, поэтому их утечка и замещение на ионы Na^+ происходят довольно быстро. В среде, содержащей ионы K^+ , снижение уровня гемолиза со временем наименьшее, промежуточным является поведение клеток в смешанной (Na^+K^+)-среде. Факт полного отсутствия снижения уровня гипертонического криогемолиза в среде, содержащей LiCl, остается не ясным. Однако можно предположить, что он обусловлен особенностями транспорта Li^+ в мембране эритроцитов собаки.

Из полученных результатов следует, что поведение эритроцитов млекопитающих в средах с разным катионным составом определяется не только качественно-количественным катионным составом цитоплазмы, но и особенностями транспорта ионов через эритроцитарную мембрану.

unclear. However it may be assumed as stipulated by the peculiarities of Li^+ transport in canine erythrocyte membrane.

As proceeded from the results obtained, the behaviour of mammalian erythrocytes in media with different cation compositions is determined not only by quality-quantity cation cytoplasm composition, but the peculiarities of ion transport through erythrocyte membrane as well.

Conclusions

Decrease in hypertonic cryohemolysis level of human, canine and equine erythrocytes under conditions of a long-term incubation at 37°C is observed in Na^+ , K^+ - and (Na^+K^+)-containing media (2,400 mOsm/kg osmolarity). In LiCl-containing medium the same time dependency of hypertonic cryohemolysis is typical only for human and equine erythrocytes. The sensitivity of human erythrocytes, referred to a high-potassium cells, to hypertonic cryohemolysis reduces in a following way: $Na^+ > K^+ > Na^+ > K^+ > Li^+$, and for canine high-potassium erythrocytes: $Li^+ > K^+ > K^+ > Na^+ > Na^+$.

References

1. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology.– Kiev: Nauk. dumka, 1994.– 432 p.
2. Gordienko E.A., Kovalenko S.E. Basic rules of the event of posthypertonic cryohemolysis // Problems of Cryobiology.– 1997.– N3.– P. 3-7
3. Shpakova N.M., Bondarenko V.A. The sensitivity of erythrocytes to cold shock in media containing salts and nonelectrolytes // Problems of Cryobiology.– 1992.– N3.– P.15-20.

Выводы

Снижение уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов человека, собаки и лошади в условиях продолжительной инкубации при 37°C наблюдается в Na⁺-, K⁺- и (Na⁺+ K⁺)- содержащих средах (осмолярность 2400 мОсмоль/кг). В среде, содержащей LiCl, подобная временная зависимость гипертонического криогемолиза характерна только для эритроцитов человека и лошади. Чувствительность эритроцитов человека, относящихся к высококалиевым клеткам, к гипертоническому криогемолизу снижается таким образом: Na⁺>K⁺+Na⁺>K⁺>Li⁺, а высоконатриевых эритроцитов собаки: Li⁺>K⁺>K⁺+Na⁺>Na⁺.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 432 с.
2. Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е. Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза// Пробл. криобиологии. – 1997. – №3.– С. 3-7.
3. Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Чувствительность эритроцитов к холодовому шоку в средах, содержащих соли и неэлектролиты // Пробл. криобиологии.– 1992.– №3.– С. 15-20.
4. Шпакова Н.М., Ершов С.С. Гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих// Пробл. криобиологии.– 2006.– Т. 16, №3. – С. 286-291.
5. Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al. A. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // Eur. Biophys. J.– 2002. – Vol. 31, N2.– P.145-152.
6. Contreras A., Martinez R., Deves R., Marusic E. T. An unusual pattern of Na⁺ and K⁺ movements across the horse erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.–Vol. 856, N2.– P. 388-391.
7. Dalmark M. Chloride and water distribution in human red cell // J.Physiol.– 1975.– Vol. 250, N1.– P. 65-84.
8. Dubbelman T.V.A.R., Bruijne A.W., Christianse K., Steveninck J. Hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // J. Memb. Biol.– 1979.– Vol. 50, N3-4.– P. 225-240.
9. Ehrlich B.E., Jared M.D. Lithium fluxes in human erythrocytes // Am. J. Physiol.– 1979.– Vol. 23, N1.– P. 102-110.
10. Ellory J.C., Tucker E.M. Cation transport in red blood cells (1983) In: Agar N.S., Board P.G. (eds) Red blood cells of domestic mammals. Elsevier, Amsterdam.– P. 291-314.
11. Kiriukhin M.Y., Collins K.D. Dynamic hydration numbers for biologically important ions // Biophys. Chem.– 2002.– Vol. 99, N2.– P. 155-168.
12. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology.– 1971.– Vol. 8, N5.– P. 489-500.
13. Meryman H.T., Williams R.J., Douglas M.St.J. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection // Cryobiology. – 1977. – Vol. 14, N3.– P. 287-302.
14. Morris G.J. Lipid loss and haemolysis by thermal shock: lack of correlation // Cryobiology.– 1975.– Vol. 12, N3.– P.192-201.
15. Takahashi T., Williams R.J. Thermal shock hemolysis in human red cells. I. The effects of temperature, time, and osmotic stress // Cryobiology.– 1983. – Vol. 20, N5.– P.507-520.
16. Woolgar A.E. Hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing in solutions containing sucrose: relationship with posthypertonic hemolysis and solute movement // Cryobiology. – 1974.– Vol.11, N1.– P. 44-51.

Accepted in 20.03.2007

Поступила 20.03.2007