

УДК: 612.11:577.352.462

Гематокрит как критерий оценки реакции эритроцитов на изменение осмоляльности среды

Е.А.Семіонова¹, Е.Е.Ніпот², Н.В.Орлова², Н.М.Шпакова²

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)
semionovakate@gmail.com

Проведено сравнительное изучение изменения гематокрита млекопитающих (человек, лошадь, бык, кролик, крыса) в зависимости от концентрации NaCl в среде при 0 и 37°C. Показано нелинейное изменение показателей гематокрита с ростом концентрации NaCl. При этом минимумы гематокритных зависимостей наблюдаются в средах: 0,4 моль/л NaCl – для эритроцитов человека и лошади, 0,3–0,4 моль/л NaCl – крысы, 0,4–0,6 моль/л NaCl – кролика, как при 37°C, так и при 0°C. Клетки быка, в отличие от эритроцитов других исследуемых млекопитающих, демонстрируют минимальное значение гематокрита при более высокой концентрации NaCl – 1,0 моль/л только при 37°C.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, гематокрит, осмоляльность, объём клеток, форма клеток.

Гематокрит як критерій оцінювання реакції еритроцитів на зміну осмоляльності середовища

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

Проведено порівняльне вивчення зміни гематокриту ссавців (людина, кінь, бик, кролик, щур) залежно від концентрації NaCl в середовищі при 0 і 37°C. Показана нелінійна зміна показників гематокриту із зростанням концентрації NaCl. При цьому мінімуми гематокритних залежностей спостерігаються в середовищах: 0,4 моль/л NaCl – для еритроцитів людини і коня, 0,3–0,4 моль/л NaCl – щура, 0,4–0,6 моль/л NaCl – кролика, як при 37°C, так і при 0°C. Клітини бика, на відміну від еритроцитів інших досліджуваних ссавців, демонструють мінімальне значення гематокриту при більш високій концентрації NaCl – 1,0 моль/л тільки при 37°C.

Ключові слова: еритроцити ссавців, гематокрит, осмоляльність, об'єм клітин, форма клітин.

Hematocrit as assessment criterion of erythrocyte response to the change in the medium osmolality

E.A.Semionova, Ye.E.Nipot, N.V.Orlova, N.M.Shpakova

The change in hematocrit of mammals (human, horse, bull, rabbit, rat), depending on NaCl concentration in the medium at 0 and 37°C has been comparatively studied. Non-linear change in hematocrit with increasing concentrations of NaCl has been demonstrated. Herewith the minimums of hematocrit dependencies have been observed in the media: 0.4 mol/l NaCl – for human and horse erythrocytes, 0.3–0.4 mol/l NaCl – for rat's ones, 0.4–0.6 mol/l NaCl – for rabbit's both at 37 and at 0°C. Bovine cells unlike the erythrocytes of other mammals studied have shown a minimal hematocrit value at higher NaCl concentrations – 1.0 mol/l at 37°C only.

Key words: mammalian erythrocytes, hematocrit, osmolality, cell volume, cell shape.

Введение

Клетки на протяжении своего жизненного цикла подвергаются воздействию различных факторов, таких как изменение температуры, pH, осмоляльности окружающей среды. Изучение особенностей их реакции на действие стрессовых факторов *in vitro* позволяет понять естественные адаптационные механизмы, разработать подходы изменения устойчивости клеток с целью повышения их жизнеспособности в неблагоприятных условиях.

Одним из стрессовых факторов, действующих на клетку, является повышенная осмоляльность среды (Шпакова и др., 2015). В то время как почечная гиперосмолярность является хорошо изученным явлением, исследования последних лет свидетельствуют о том, что стресс, который испытывают многие непочечные ткани в условиях повышенной осмоляльности, может вносить

существенный вклад в инициацию и развитие патологических состояний организма (Brockner et al., 2012; McManus et al., 1995). Как предполагается в работах (Rybka, Mistrík, 2015; Tan et al., 2010), повышение осмолярности плазмы, наблюдаемое при развитии ряда заболеваний, таких как диабет и почечная недостаточность, препятствует нормальному функционированию клеток крови. В частности, в указанных условиях происходит изменение механических свойств мембран эритроцитов, что снижает их способность к деформации и, как следствие, к переносу кислорода к тканям.

Для того чтобы оценить общее состояние эритроцитов после воздействия стресса, определяют наиболее важные их параметры: объем, форму, физико-химические характеристики мембраны. Часто при исследовании используют комплексные характеристики, отражающие изменение сразу нескольких показателей, например гематокрит. Понятие «гематокрит» изначально было введено в медицинской практике как часть объема крови, приходящаяся на долю форменных элементов крови. Затем было внесено уточнение, и гематокрит связывали с объемным содержанием эритроцитов в крови. В научно-исследовательских работах под гематокритом понимают объемное содержание эритроцитов, поэтому в качестве синонима используют термин «относительный объем» клеток (Методы..., 2004). На величину гематокрита могут влиять особенности морфологии и упаковки эритроцитов.

Целью работы было сравнительное изучение изменения гематокрита эритроцитов млекопитающих (человек, лошадь, бык, кролик, крыса) в зависимости от концентрации NaCl в среде при 0 и 37°C.

Объекты и методы исследования

Для исследования использовали эритроциты, полученные из донорской крови человека, быка, лошади, кролика и крысы, заготовленной на гемоконсерванте «Глюгицир» (Биофарма, Украина). Кровь человека была предоставлена Харьковским областным центром службы крови; кровь быка и лошади – Харьковской государственной зооветеринарной академией, кролика и крысы – виварием Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

После удаления плазмы эритроциты трижды отмывали путем центрифугирования (центрифуга ОПН-3У4.2 (Кыргызстан), 3000 об/мин, 3 мин) в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. Эритроциты хранили в виде плотного осадка не более 4 ч при температуре 0°C. Все среды, используемые в работе, готовили на 0,01 моль/л фосфатном буфере, pH 7,4. Осмоляльность растворов контролировали криоскопическим методом с использованием осмометра ОМКА-1Ц-01 (Украина).

Измерение величины гематокрита суспензии эритроцитов проводили по микрогематокритному методу (Методы..., 2004) с помощью гематокритных капилляров (Radiometer, Denmark) и счётной линейки Janetsky (Germany). Стандартный гематокритный капилляр заполняли суспензией исследуемых эритроцитов на 7/8 высоты капилляра. Исходная суспензия была приготовлена в результате смешивания осадка эритроцитов и солевого раствора в отношении 1:4. После этого капилляры центрифугировали в течение 5 мин (микрогематокритная центрифуга МГЦ-8) со скоростью 8000 об/мин. Относительный объем эритроцитов (гематокрит) вычисляли, исходя из общей высоты столба жидкости в капилляре и высоты столба осевших эритроцитов. Уровень гемолиза эритроцитов, определяемый спекрофотометрическим методом (длина волны 543 нм), не превышал 1%.

В работе были использованы реактивы отечественного производства квалификации «х.ч.» и «ч.д.а.».

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы «Statistica» (версия 6.0). Экспериментальные данные представлены как среднее арифметическое значение количественных показателей (M) \pm стандартная ошибка среднего арифметического (m). Количество повторений в серии эксперимента была не менее 8 в двух параллельных пробах. Для проверки совпадения распределения исследуемых количественных показателей в группах с нормальным распределением использовали критерий Шапиро-Уилки. При нормальном распределении

исследуемых числовых показателей статистическую значимость различий проверяли с помощью критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В плазме эритроциты находятся в условиях изотонии, т.е. внеклеточная концентрация растворенных веществ равна внутриклеточной. В том случае, когда внеклеточная концентрация веществ превышает внутриклеточную, эритроциты находятся в гипертонических условиях. В работах соответствующего профиля часто используют термины «осмолярность» и «осмоляльность». Осмолярность представляет собой сумму концентраций всех кинетически активных частиц в 1 л раствора, в то время как осмоляльность – концентрации тех же частиц, но растворенных в 1 кг воды. Эти величины очень близки, если молекулы растворены в чистой воде при тех концентрациях, которые встречаются в биологических жидкостях. Поскольку в нашей работе концентрации растворов контролировали методом осмометрии, который дает информацию о концентрации частиц в 1 кг растворителя, мы предпочитаем использовать термин «осмоляльность».

Эритроциты человека и животных инкубировали в гипертонических средах, содержащих разные концентрации хлорида натрия, при 37 и 0°C, после чего измеряли их гематокрит. Контролем являлся гематокрит клеток, находящихся в изотонических условиях (0,15 моль/л NaCl) при 37°C.

На рис.1 представлены данные, отражающие изменение гематокрита эритроцитов млекопитающих при варьировании концентрации NaCl. Эритроциты человека демонстрируют нелинейную зависимость гематокрита от концентрации соли в среде предварительной инкубации. Повышение концентрации NaCl до 0,4 моль/л приводит к снижению величины гематокрита при 37 и 0°C, которое более выражено в последнем случае (при низкой температуре). При последующем повышении концентрации соли в среде наблюдается увеличение уровня гематокрита при обоих температурных режимах.

Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что характер изменения гематокрита эритроцитов лошади, крысы и кролика в общих чертах напоминает особенности изменения гематокрита эритроцитов человека. При 37 и 0°C с ростом осмоляльности среды наблюдается снижение величины гематокрита эритроцитов животных, а затем его повышение. Минимальное значение гематокрита эритроцитов крысы, лошади и кролика регистрируется в средах, содержащих 0,3–0,4 моль/л, 0,4 моль/л и 0,4–0,6 моль/л NaCl, соответственно, при обоих температурных режимах.

Сравнительный анализ влияния температуры на минимальную величину гематокрита эритроцитов млекопитающих показал, что для эритроцитов человека и кролика значения гематокрита при 0°C ниже, чем при 37°C, в то время как для клеток лошади наблюдается обратная зависимость. Для эритроцитов крысы влияние температуры на уровень минимального гематокрита не выявлено. Можно предположить, что видовые особенности строения и состава мембран, функционирования транспортных систем (Benga, 2013; Vogner et al., 2002; Liu et al., 2011; Matei et al., 2000; Wessels, Veerkamp, 1973) будут определять способность клеток к изменению объема и степени деформации при варьировании температуры окружающей среды.

Для эритроцитов быка характер изменения гематокрита в слабо и умеренно гипертонических средах при 37°C подчиняется ранее выявленной закономерности для клеток человека, лошади, крысы и кролика: наблюдается снижение величины гематокрита с последующим его повышением. Однако имеется несколько отличий. Во-первых, минимальное значение гематокрита эритроцитов быка наблюдается в среде с более высокой концентрацией соли (1,0 моль/л NaCl, осмоляльность 1760 мосмоль/кг), во-вторых, последующее повышение гематокрита в средах с более высоким значением осмоляльности выражено в меньшей степени по сравнению с клетками других млекопитающих. Следует отметить, что изменение гематокрита эритроцитов быка в среде, содержащей 2,0 моль/л NaCl, статистически значимо по сравнению с величиной гематокрита в 1,0 моль/л NaCl ($p < 0,05$). При 0°C с увеличением концентрации NaCl в среде до 0,4 моль/л и выше 1,0 моль/л наблюдается снижение значений гематокрита эритроцитов быка, т.е. динамика гематокрита эритроцитов в гипертонических средах при низкой температуре несколько отличается от таковой при 37°C. Следует отметить, что при низкой температуре (0°C) в среде, содержащей 1,0 моль/л NaCl, значение гематокрита эритроцитов быка статистически выше, чем при 37°C, что напоминает особенности температурной зависимости гематокрита клеток лошади.

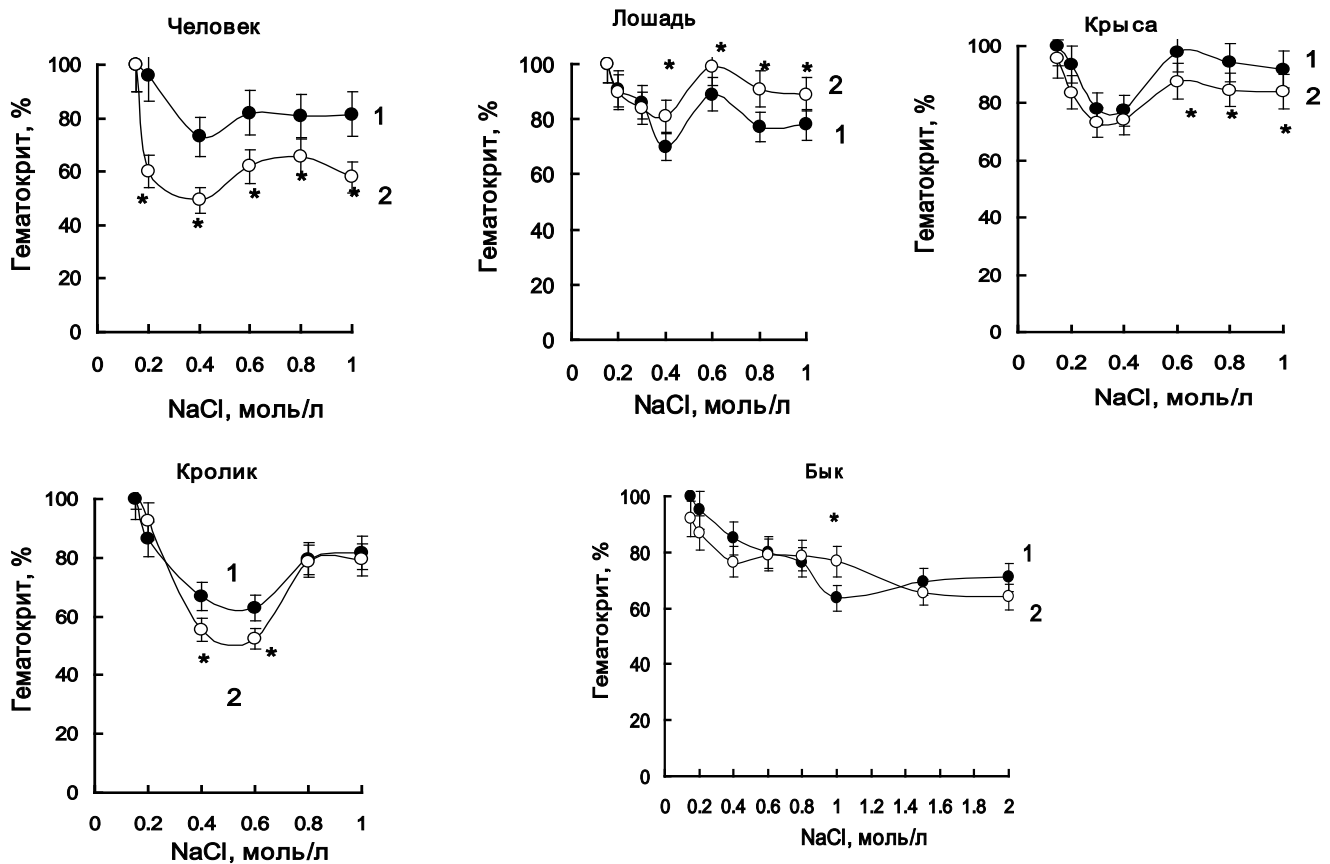


Рис. 1. Зависимость гематокрита эритроцитов млекопитающих от концентрации NaCl в среде при температуре 37 (1) и 0°C (2). За 100% принимали гематокрит клеток в 0,15 моль/л NaCl при 37°C

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с показателями гематокрита клеток при 37°C ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 8.

Обсуждение

При увеличении концентрации NaCl в окружающей среде выше изотонической происходит отток воды из клетки и изменение её объёма. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению значений гематокрита, что мы и наблюдаем для эритроцитов всех исследуемых видов млекопитающих (рис. 1). Если для эритроцитов человека отмечается наиболее резкое снижение гематокрита при повышении концентрации соли в среде, то для клеток быка оно наименее выражено. Можно предположить, что степень и скорость снижения этого показателя будут определяться способностью клеток к изменению объёма. Одним из важных параметров, оказывающих влияние на объёмный ответ клетки, является соотношение количества связанной и свободной воды (Cameron et al., 1997). При помещении эритроцитов в гипертоническую среду, в первую очередь, будет удаляться свободная вода, а затем – связанная (Cameron et al., 1997). Сравнительный анализ эритроцитов человека и быка показал, что клетки быка содержат меньше свободной воды и больше связанной воды по сравнению с эритроцитами человека (Vogner et al., 1998), что может обуславливать выявленные особенности изменения гематокрита эритроцитов быка и человека в условиях гипертонии.

Гематокрит является интегральным показателем эритроцитов, значение которого зависит как от объёма отдельно взятых клеток, их морфологических характеристик, так и особенностей упаковки этих клеток, т.е. их взаимного расположения.

В работе, в которой измерение объёма клетки проводили с помощью электронного счетчика частиц (Zhao et al., 2004), показано значительное изменение объёма клетки в более широком концентрационном диапазоне по сравнению с нашими данными. Если в нашей работе минимальное

значение гематокрита регистрируется в средах, содержащих фактически 0,3–0,4 моль/л NaCl, что соответствует осмоляльности 550–700 мосмоль/кг (рис. 1), то Zhao и соавт. (Zhao et al., 2004) показали резкое уменьшение объема клетки человека в более широком диапазоне вплоть до 1350 мосмоль/кг. Таким образом, выявленные изменения гематокрита эритроцитов млекопитающих не являются отражением только объемных изменений клеток.

Одной из важных составляющих показателя гематокрита являются морфологические характеристики клетки. Выявленное минимальное значение гематокрита эритроцитов млекопитающих в средах с концентрацией NaCl порядка 0,4 моль/л может быть обусловлено преобладанием эхиноцитарных форм эритроцитов. В пользу этого свидетельствуют данные работы (Hayashi et al., 2009), в которой установлено, что эхиноцитарные формы эритроцитов кролика демонстрируют меньшие значения гематокрита после центрифугирования по сравнению с дискоцитами.

Из анализа зависимостей гематокрита от концентрации соли в среде видно, что после достижения минимальных значений гематокрита наблюдается повышение величины этого показателя для эритроцитов человека, лошади и крысы в среде, содержащей 0,6 моль/л NaCl, а для клеток кролика – в 0,8 моль/л NaCl. Наблюдаемое увеличение гематокрита не обусловлено ростом объема отдельно взятых эритроцитов, поскольку в указанных средах, наоборот, отмечается снижение объема клеток (Zhao et al., 2004). Возможно, морфологические особенности эритроцитов млекопитающих вносят вклад в указанный эффект. Ранее методом световой микроскопии (Александрова, 2011) были исследованы морфологические особенности эритроцитов млекопитающих (человек, лошадь, крыса, кролик и бык) в гипертонических средах (0,4 моль/л и 0,6 моль/л NaCl). Автором было показано практически одинаковое изменение формы клеток быка, с одной стороны, и эритроцитов остальных млекопитающих, с другой, хотя минимальное значение гематокрита эритроцитов указанных млекопитающих и последующее его повышение регистрируется при различных значениях осмоляльности среды (рис. 1). Таким образом, морфологические особенности клеток млекопитающих не вносят определяющий вклад в величину гематокрита. Исходя из вышеизложенного, особенности упаковки эритроцитов, которые не зависят от морфологических характеристик клеток, а определяются модификацией физико-химических свойств эритроцитов, влияют на величину гематокрита. Так, увеличение жесткости мембраны с ростом осмоляльности среды (Tan et al., 2010) может оказывать влияние на характер упаковки клеток. Кроме того, в гипертонических солевых средах внеклеточные катионы Na⁺ могут входить в клетки по концентрационному градиенту (Єршова та ін., 2014), а внутриклеточные катионы K⁺ покидают их (Шпакова та ін., 2008), что свидетельствует об изменении барьерных свойств эритроцитарной мембраны и ее модификации.

В заключение следует отметить, что в работе выявлены общие закономерности и установлены видовые особенности реакции эритроцитов разных видов млекопитающих (оцениваемой по изменению гематокрита) на повышение осмоляльности среды. Общим для всех исследуемых эритроцитов млекопитающих является характер зависимости гематокрита от концентрации соли в среде. Видовые особенности эритроцитов млекопитающих проявляются в зависимости минимального гематокрита клеток от температуры и концентрации хлорида натрия в среде.

Список литературы

- Александрова Д.І. Вплив початкових осмотичних та температурних умов на стійкість еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку. Автореф. дис. ... канд. біол. наук / 03.00.19 – кріобіологія. – Харків, 2011. – 20с. /Aleksandrova D.I. Vplyv pochatkovykh osmotychnykh ta temperaturnykh umov na stiykist' erytrotsytiv ssavtsiv do gipertonichnogo shoku. Avtoref. dys. ... kand. biol. nauk / 03.00.19 – kriobiologiya. – Kharkiv, 2011. – 20s./
- Єршова Н.А., Шпакова Н.М., Орлова Н.В., Єршов С.С. Амфіфілі як інструмент для вивчення гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців // Біологія тварин. – 2014. – Т.16, №2. – С. 26–34. /Yershova N.A., Shpakova N.M., Orlova N.V., Yershov S.S. Amfifily yak instrument dlya vyvchennya gipertonichnogo kriogemolizu eritrotsyiv ssavtsiv // Biologiya tvaryn. – 2014. – T.16, №2. – S. 26–34./
- Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник / Ред. И.П.Кондрахин– М.: КолосС, 2004. – 520с. /Metody veterinarnoy klinicheskoy laboratornoy diagnostiki: spravochnik / Red. I.P.Kondrakhin– M.: KolosS, 2004. – 520s./
- Шпакова Н.М., Орлова Н.В., Ершов С.С. и др. Температура и осмолярность как факторы, определяющие устойчивость эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.3, т.1, №122. – С. 242–245. /Shpakova N.M., Orlova N.V., Yershov S.S. i dr. Temperatura i osmolyarnost' kak faktory, opredelyayushchiye ustoychivost' eritrotsitov mlekopitayushchikh k gipertonicheskomu shoku // Visnyk problem biologiyi i medytsyny. – 2015. – Vyp.3, t.1, №122. – S. 242–245./

- Шпакова Н.М., Єршов С.С., Ніпот О.Є. До питання про можливу кореляцію між виходом іонів K^+ і розвитком гемолітичного пошкодження еритроцитів ссавців в умовах гіпертонічного криогемолізу // *Біологія тварин.* – 2008. – Т.10, № 1–2. – С. 164–170. /Shpakova N.M., Yershov S.S., Nipot O.Ye. Do pytannya pro mozhyvu korelyatsiyu mizh vykhodom ioniv K^+ i rozvytkom gemolitychnogo poskodzhennya erytrotsytyv ssavtsiv v umovakh gipertonichnogo kriogemolizu // *Biologiya tvaryn.* – 2008. – Т.10, № 1–2. – С. 164–170./
- Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel // *Eur. Biophys. J.* – 2013. – Vol.42, no 1. – P. 33–46.
- Bogner P., Csutora P., Cameron I.L. et al. Augmented water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camelids // *Biophys. J.* – 1998. – Vol.75, no 6. – P. 3085–3091.
- Bogner P., Sipos K., Ludány A. et al. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes. // *Eur. Biophys. J.* – 2002. – Vol.31, no 2. – P. 145–152.
- Brocker C., Thompson D.C., Vasiliou V. The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease // *Biomol. Concepts.* – 2012. – Vol.3, no 4. – P. 345–364.
- Cameron I.L., Kanal K.M., Keener C.R., Fullerton G.D. A mechanistic view on the non-ideal osmotic and motional behavior of intra cellular water // *Cell Biol. Int.* – 1997. – Vol.21, no 2. – P. 99–113.
- Hayashi Y., Katsumoto Y., Oshige I. et al. The effects of erythrocyte deformability upon hematocrit assessed by the conductance method // *Phys. Med. Biol.* – 2009. – Vol.54, no 8. – P. 2395–2405.
- Liu L., Lei T., Bankir L. et al. Erythrocyte permeability to urea and water: comparative study in rodents, ruminants, carnivores, humans, and birds // *J. Comp. Physiol. B.* – 2011. – Vol. 181, №1. – P. 65–72.
- Matei H., Frentescu L., Benga G. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *J. Cell. Mol. Med.* – 2000. – Vol.4, no 4. – P. 270–276.
- McManus M., Churchwell K., Strange K. Regulation of cell volume health and disease // *N. Engl. J. Med.* – 1995. – Vol.333, no 19. – P. 1260–1266.
- Rybka J., Mistrík J. Hyperosmolar hyperglycemic state // *Vnitr. Lek.* – 2015. – Vol.61, no 5. – P. 451–457.
- Tan Y., Sun D., Wang J., Huang W. Mechanical characterization of human red blood cells under different osmotic conditions by robotic manipulation with optical tweezers // *IEEE Trans Biomed Eng.* – 2010. – Vol.57, no 7. – P. 1816–1825.
- Zhao G., He L., Zhang H. et al. Trapped water of human erythrocytes and its application in cryopreservation // *Biophys. Chem.* – 2004. – Vol.107, no 2. – P. 189–195.
- Wessels J.M.C., Veerkamp J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – Vol.291, no 1. – P. 190–196.

Представлено: О.В.Шаповалова / Presented by: O.V.Shapovalova

Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko

Подано до редакції / Received: 17.11.2015