

ТЕМПЕРАТУРА И ОСМОЛЯРНОСТЬ КАК ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ ШОКУ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

starling_nataly@mail.ru

Данная работа является фрагментом НИР «Исследование чувствительности эритроцитов млекопитающих к охлаждению, дегидратации и замораживанию при действии модифицирующих факторов и криопротекторов», № гос. регистрации 0114U0001318.

Вступление. Эритроциты млекопитающих чувствительны к одному из основных факторов криоповреждения – к действию гипертонического шока. Устойчивость эритроцитов к перенесению в 4,0 М NaCl зависит от видовых особенностей клеток, условий внеклеточной среды и исходного состояния эритроцитов. Так, уровень гипертонического гемолиза эритроцитов человека выше по сравнению с клетками кролика и лошади [3]. Гипертоническое повреждение эритроцитов млекопитающих зависит от качественного и количественного состава внеклеточной среды [1,3,6].

Уровень гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих можно модулировать, оказывая влияние на исходное состояние клеток. Так, в многочисленных работах [1,5] показано, что инкубирование эритроцитов человека и животных в солевых средах умеренной концентрации, сопровождающееся их обезвоживанием, приводит к изменению чувствительности клеток к последующему действию гипертонического шока. Причем на исходное состояние клеток влияет и температура среды [2]. Однако эти исследования единичны и разрознены.

Цель работы – исследовать влияние исходного состояния эритроцитов млекопитающих (человек, бык, лошадь, крыса), модифицированного температурой и осмолярностью среды, на чувствительность клеток к гипертоническому шоку (4,0 М NaCl).

Объект и методы исследования. В экспериментах использовали эритроциты донорской крови человека, быка, лошади и крысы, полученные по стандартной методике [8]. Все среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4. Концентрацию растворов контролировали измерением осмолярности на осмометре ОМКА 1Ц–01.

Клетки инкубировали в умеренно гипертонических растворах NaCl в течение 2 мин., после чего их подвергали действию гипертонического шока (ГШ) путем перенесения в раствор, содержащий 4,0 М NaCl (гематокрит 0,4%), на 5 мин при определенной температуре (0, 15, 25 или 37°C). Количество гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически ($\lambda=543$ нм) и выражали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Statistica» (версия 6.0). Для проверки статистической значимости

различий исследуемых числовых показателей использовали критерии Манна-Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. При перенесении эритроцитов млекопитающих в среду, содержащую 4,0 М NaCl, наблюдается гемолитическое повреждение клеток. Типичные зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов человека от концентрации хлорида натрия в среде предварительной инкубации представлены на **рис. 1**.

Видно, что с ростом концентрации соли в среде наблюдается снижение гемолиза клеток с последующим его повышением. Немонотонный характер зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов позволяет выделить три характерные зоны. При перенесении клеток из 0,15 в 4,0 М NaCl наблюдается повреждение на уровне 70-80%. Минимальный уровень гипертонического гемолиза отмечается после инкубирования клеток в 0,4 М NaCl, т.е. в указанных условиях клетки переходят в «стабильное» состояние. Последующее повышение концентрации соли в среде предварительного инкубирования сопровождается ростом гипертонического гемолиза, достигающим максимального значения при перенесении клеток в 4,0 М NaCl из среды, содержащей 0,8 М NaCl. В последнем случае можно говорить о формировании «метастабильного» состояния клеток.

Из данных **рис. 1** видно, что при обеих температурах (0 и 37°C) характер гемолитической зависимости сохраняется, и минимальное значение гемолиза наблюдается при перенесении клеток в 4,0 М NaCl из среды, содержащей 0,4 М NaCl.

Из характерологических концентрационных зависимостей были выбраны реперные точки, отражающие формирование различного исходного состояния эритроцитов человека по отношению к действию ГШ. Для клеток человека средами предварительной инкубации служили растворы, содержащие 0,4 и 0,8 М NaCl. В качестве контроля использовали эритроциты,

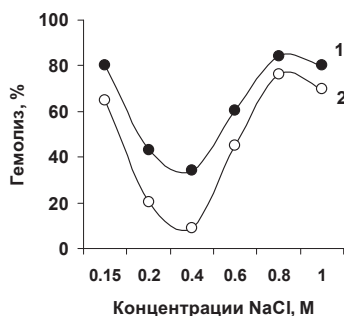


Рис. 1. Уровень гемолиза эритроцитов человека в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в средах, содержащих 0,15-1,0 М NaCl, при температуре 37 (1) и 0°C (2).

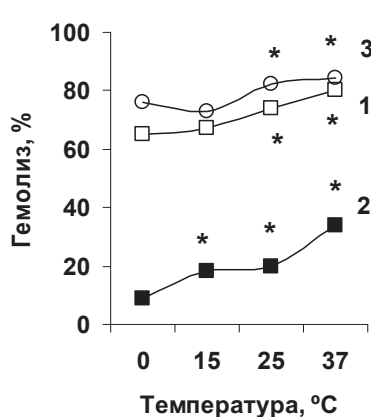


Рис. 2. Температурная зависимость гемолиза эритроцитов человека, перенесенных в 4,0 М NaCl из сред предварительной инкубации, содержащих NaCl в концентрации 0,15 (1), 0,4 (2), 0,8 М (3).

Примечание: * – достоверные различия по сравнению с контролем (0eC), $p < 0,05$.

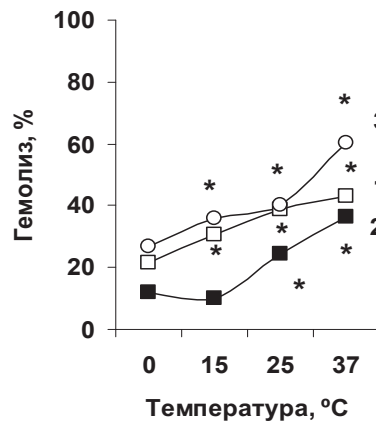


Рис. 3. Температурная зависимость гемолиза эритроцитов лошади, перенесенных в 4,0 М NaCl из сред предварительной инкубации, содержащих NaCl в концентрации 0,15 (1), 0,4 (2), 0,6 М (3).

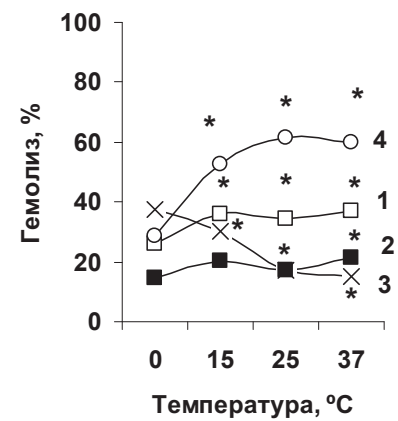


Рис. 4. Температурная зависимость гемолиза эритроцитов крысы, перенесенных в 4,0 М NaCl из сред предварительной инкубации, содержащих NaCl в концентрации 0,15 (1), 0,3 (2), 0,4 (3), 0,6 М (4).

изначально проинкубированные в 0,15 М NaCl и перенесенные в 4,0 М NaCl. Эритроциты человека предварительно инкубировали в указанных средах и подвергали действию 4,0 М NaCl при разных температурах (рис. 2).

Видно, что при повышении температуры от 0 до 37eC наблюдается увеличение гипертонического гемолиза как контрольных эритроцитов, так и клеток, проинкубированных в средах обезвоживания. Температурная зависимость гипертонического гемолиза более выражена для «стабильных» клеток, которые инкубировали в 0,4 М NaCl, и при всех значениях температуры уровень гемолиза этих эритроцитов гораздо ниже по сравнению с контрольными клетками.

Для эритроцитов животных также были сняты зависимости гипертонического гемолиза от концентрации хлорида натрия в среде предварительной инкубации клеток при 37 и 0eC, из которых определены реперные точки, используемые в представленных исследованиях. Для «стабильных» и «метастабильных» эритроцитов лошади средами обезвоживания служили растворы, содержащие 0,4 и 0,6 М NaCl, соответственно (рис. 3).

Для контрольных и «метастабильных» эритроцитов лошади наблюдаются монотонные температурные зависимости гипертонического гемолиза, т.е. увеличение гемолиза по мере роста температуры среды. Температурная зависимость клеток, обезвоженных в 0,4 М NaCl, характеризуется немонотонностью, поскольку в диапазоне температур 0-15°C не выявлено изменения гемолиза эритроцитов, а рост гемолитического повреждения отмечается при температурах выше 15°C.

На рис. 4 представлены температурные зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов крысы. Поскольку для клеток крысы минимальное значение гипертонического гемолиза при 37 и 0°C наблюдается для клеток, обезвоженных в разных средах (при 0°C минимальное значение в среде 0,3 М, а при 37°C – в среде 0,4 М NaCl), на рисунке представлены 4 кривые.

Для контрольных клеток и эритроцитов, перенесенных из 0,3 в 4,0 М NaCl, зависимости гемолиза от

температуры слабо выражены, в то время как для «метастабильных» клеток (перенесенных из 0,6 в 4,0 М NaCl) наблюдается значительный рост повреждения в диапазоне температур 0-25°C. Температурная зависимость гипертонического гемолиза эритроцитов крысы, обезвоженных в 0,4 М NaCl, имеет ряд особенностей.

Во-первых, с увеличением температуры значения гипертонического гемолиза эритроцитов крысы снижаются. Во-вторых, уровень гемолиза этих клеток при 0°C превосходит значения повреждения контрольных и «метастабильных» эритроцитов. Это позволяет говорить о том, что термин «стабильные» эритроциты в 0,4 М NaCl нельзя использовать во всем температурном диапазоне, в отличие от клеток, проинкубированных в 0,3 М NaCl.

Гипертонический гемолиз контрольных эритроцитов быка существенно зависит от температуры. Если при 0eC уровень гемолиза составляет порядка 10%, то при 37eC – около 80%. Кроме того, клетки этого вида животных приобретают устойчивое состояние к действию ГШ в средах с существенно более высокой концентрацией соли (1,0 М NaCl) по сравнению с другими млекопитающими [7]. Для клеток быка невозможно достигнуть четко выраженной зоны «метастабильности». В средах, содержащих 2,0 М NaCl, наблюдается тенденция к повышению гемолиза по сравнению со средой 1,0 М NaCl при температуре 37°C.

Анализ полученных температурных зависимостей ГШ эритроцитов, предварительно проинкубированных в изотонических условиях, показал, что увеличение уровня гемолиза клеток при повышении температуры характерно для эритроцитов всех исследованных видов млекопитающих. При этом для эритроцитов быка характерно увеличение уровня ГШ с ростом температуры (от 0 до 37°C) примерно в 4 раза, в то время как для клеток человека, лошади и крысы – в пределах 1,2-2,0 раза.

В основе лизиса эритроцитов под действием различных стрессовых факторов лежат процессы формирования и стабилизации мембранных дефектов [4]. Осмолярность среды контролирует процессы, связанные с формированием трансмембранных дефектов [7].

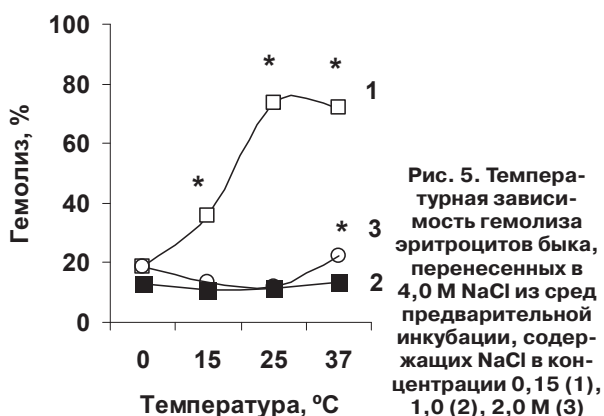


Рис. 5. Температурна залежність гемоліза еритроцитів быка, перенесених в 4,0 М NaCl із середньої інкубації, що містить NaCl в концентрації 0, 15 (1), 1,0 (2), 2,0 М (3)

Под действием гипертонии в мембране происходит зарождение микродефектов. Дальнейшая их эволюция, приводящая к формированию стабильной поры, зависит от температуры инкубации [9]. При околонулевых температурах развитие дефекта до размера гемолитической поры затруднено (из-за усиления липид-липидных и липид-белковых взаимодействий) по сравнению с процессами, развивающимися при более высоких значениях температуры. Вышесказанное может лежать в основе наблюдаемого в работе уменьшения уровня гипертонического гемоліза эритроцитов всех исследованных млекопитающих при снижении температуры. Этот эффект наиболее выражен для клеток быка, мембраны которых характеризуются высоким уровнем холин-содержащих фосфолипидов и фосфатидилэтаноламина [10, 11]. Обращает на себя внимание тот

факт, что эритроциты быка, характеризующиеся хорошо выраженной температурной зависимостью гипертонического гемоліза, лишены ее в том случае, когда клетки предварительно инкубировали в среде, содержащей 1,0 М NaCl (рис. 5). По-видимому, в этом случае развивается значительная дегидратация компонентов эритроцитарной мембраны, что приводит к существенному изменению характера взаимодействия фосфатидилэтаноламина с другими компонентами мембраны.

Выводы. Показано, что при повышении температуры наблюдается увеличение уровня гипертонического гемоліза эритроцитов человека, быка и лошади, предварительно проинкубированных в изотонических условиях. При использовании предварительно обезвоженных эритроцитов млекопитающих с различным исходным состоянием («стабильное» или «метастабильное») выявлено, что уровень гемоліза в 4,0 М NaCl «стабильных» эритроцитов млекопитающих ниже по сравнению с контрольными и «метастабильными» клетками при всех значениях температуры. Таким образом, устойчивость эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку определяется исходным состоянием клеток, которое формируется в результате комбинированного действия температуры и осмолярности среды.

Результаты дальнейших исследований. Выявленные отличия в развитии гипертонического повреждения эритроцитов человека, быка, лошади и крысы при варьировании температуры и осмолярности среды представляют интерес для дальнейших исследований реакции эритроцитов других видов млекопитающих.

Литература

1. Александрова Д. І. Влияние прединкубации эритроцитов человека и быка в растворах сахарозы на устойчивость клеток к гипертоническому шоку / Д. І. Александрова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Вісник Харківського університету. Серія: Біологія. – 2007. – Вип. 6, № 788. – С. 110–115.
2. Александрова Д. І. Влияние предварительного обезвоживания эритроцитов человека и быка на устойчивость к гипертоническому шоку при разных температурах / Д. І. Александрова, Н. М. Шпакова // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – № 1. – С. 73–77.
3. Влияние трифторперазина и додецил β,D-мальтозида на гипертонический стресс эритроцитов млекопитающих / Н.А. Ершова, Е.Е. Нипот, Н.М. Шпакова [и др.] // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т.24, № 3. – С. 231–237.
4. Гордієнко Є. О. Фізика біомембран : підручник / Є. О. Гордієнко, В.В. Товстяк – К. : Наук. думка, 2009. – 272 с.
5. Шпакова Н. М. Роль глицерина в коррекции гипертонической чувствительности эритроцитов человека / Н. М. Шпакова // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – № 1. – С. 43–47.
6. Шпакова Н. М. Осмотичний і температурний стрес еритроцитів різних видів ссавців / Н. М. Шпакова // Біологія тварин – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 382–391.
7. Шпакова Н.М. Температурна та осмотична стійкість еритроцитів різних видів ссавців: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня доктора біол. наук : спец. 03.00.19 «Криобиологія» / Н.М. Шпакова. – Харків, 2014. – 44 с.
8. Шпакова Н.М. Обезвоживание эритроцитов млекопитающих влияет на их чувствительность к механическому стрессу / Н.М. Шпакова, Н.В. Орлова, Е.Е. Нипот // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, № 1. – С. 24–32.
9. Lieber M. R. Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts / M. R. Lieber, T. D. Steck // J. Biol. Chem. – 1982 – Vol. 257, № 19. – P. 11660–11666.
10. Phospholipid composition of plasma and erythrocyte membranes in animal species by ³¹P NMR / A.M. Ferlazzo, G. Bruschetta, P. Di Pietro [et al.] // Vet. Res. Commun. – 2011. – Vol. 35. – P. 521–530.
11. Wessels J.M.C. 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 / J.M.C. Wessels, J.H. Veerkamp // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – Vol. 291, № 1. – P. 190–196.

УДК 536.4+577.352.462]612.111

ТЕМПЕРАТУРА ТА ОСМОЛЯРНІСТЬ ЯК ФАКТОРИ, ЩО ВИЗНАЧАЮТЬ СТІЙКІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ ДО ГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ

Шпакова Н.М., Орлова Н.В., Ершов С.С., Ершова Н.А., Александрова Д.І.

Резюме. Досліджено вплив вихідного стану еритроцитів ссавців (людина, бик, кінь, щур), що був модифікований температурою та осмолярністю середовища, на чутливість клітин до гіпертонічного шоку.

Показано, що при підвищенні температури (від 0 до 37°C) рівень гемолізу еритроцитів ссавців, перенесених із 0,15 в 4,0 М NaCl, збільшується для клітин бика – приблизно в 4 рази, людини, коня та щура – в 1,2-2,0 рази. Для попередньо зневоднених еритроцитів ссавців із різним вихідним станом («стабільне» або «метастабільне») показано, що рівень гемолізу в 4,0 М NaCl «стабільних» еритроцитів ссавців нижчий у порівнянні з контрольними і «метастабільними» клітинами при всіх значеннях температури. Таким чином, стійкість еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку визначається вихідним станом клітин, який формується в результаті комбінованої дії температури та осмолярності середовища.

Ключові слова: еритроцити ссавців, гіпертонічний шок, осмолярність і температура середовища.

УДК 536.4+577.352.462]612.111

ТЕМПЕРАТУРА И ОСМОЛЯРНОСТЬ КАК ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ ШОКУ

Орлова Н.В., Шпакова Н.М., Ершов С.С., Ершова Н.А., Александрова Д.И.

Резюме. Исследовано влияние исходного состояния эритроцитов млекопитающих (человек, бык, лошадь, крыса), модифицированного температурой и осмолярностью среды, на чувствительность клеток к гипертоническому шоку. Показано, что при повышении температуры (от 0 до 37°C) уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих, перенесенных из 0,15 в 4,0 М NaCl, увеличивается для клеток быка – примерно в 4 раза, человека, лошади и крысы – в 1,2-2,0 раза. Для предварительно обезвоженных эритроцитов млекопитающих с различным исходным состоянием («стабильное» или «метастабильное») показано, что уровень гемолиза в 4,0 М NaCl «стабильных» эритроцитов млекопитающих ниже по сравнению с контрольными и «метастабильными» клетками при всех значениях температуры. Таким образом, устойчивость эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку определяется исходным состоянием клеток, которое формируется в результате комбинированного действия температуры и осмолярности среды.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, гипертонический шок, осмолярность и температура среды.

UDC 536.4+577.352.462]612.111

Temperature and Osmolarity as Factors Determining Resistance of Mammalian Erythrocytes to Hypertonic Shock

Shpakova N.M., Orlova N.V., Iershova N.A., Aleksandrova D.I.

Abstract. The effect of initial state of mammalian erythrocytes modified with temperature and medium osmolarity on the sensitivity of cells to hypertonic shock (4.0 M NaCl) was studied. Human, bovine, equine, rat's erythrocytes were pre-dehydrated to form various initial states of cells in respect of the following effect of hypertonic shock.

With increasing salt concentration in the preincubation medium the reduction of hypertonic hemolysis of the cells with a following increase occurs. The states of erythrocytes, for which the minimal and maximal rates of hemolysis are characteristic in 4.0 M NaCl, were called as «stable» and «metastable», respectively.

It has been revealed that when increasing the temperature within the range from 0 to 37°C there is observed a rise in hypertonic hemolysis rate of erythrocytes of all the investigated mammals (human, bull, horse, rat) transferred from 0.15 to 4.0 M NaCl. Herewith for bovine erythrocytes an increased in hypertonic hemolysis rate is characteristic with a temperature rise (from 0 to 37°C) of about 4 times, while for human cells, those of horse and rat this makes in 1.2-2.0 times.

Temperature dependence of hypertonic hemolysis of stable human erythrocytes (0.4 → 4.0 M NaCl) was more manifested if compared with the control and metastable cells (0.8 → 4.0 M NaCl). For stable equine erythrocytes (0.4 → 4.0 M NaCl) the severity of hemolytic damage is observed only at the temperatures higher than 15°C. For bovine erythrocytes the temperature dependence of hypertonic hemolysis is absent in the case when the cells form a stable state (1.0 @ 4.0 M NaCl). Moreover, for these cells no distinct zone of «metastability» was found. In the media containing 2.0 M NaCl, there is observed just the tendency of the hemolysis rise if compared to the medium of 1.0 M NaCl at 37°C.

It should be noted that for the rat cells the minimal value of hypertonic hemolysis at 37 and 0°C is observed when erythrocytes are dehydrated in different media (0.3 M and 0.4 M NaCl). Erythrocytes are considered as stable, when dehydrated in 0.3 M NaCl, because their damage rate in 4.0 M NaCl is lower than the hemolysis values of the control and «metastable» cells within the whole range of the temperatures studied. Temperature dependencies of hypertonic hemolysis of the control and stable rat's erythrocytes (0.3 @ 4.0 M NaCl) were slightly manifested while the injury of metastable cells (0.6 @ 4.0 M NaCl) significantly enhanced within the temperature range of 0-25°C.

It has been established that the hemolysis rate in 4.0 M NaCl of stable erythrocytes of all the investigated mammals is lower if compared with the same indices of the control and metastable cells at all the values of temperatures (0, 15, 25 и 37°C). Thus the resistance of mammalian erythrocytes to hypertonic shock is determined by initial state of cells which is formed as a result of combined effect of temperature and medium osmolarity.

The findings are discussed from the point of view of forming the hemolytic pore in erythrocyte membrane when altering the medium osmolarity and temperature.

Keywords: mammalian erythrocytes, hypertonic shock, osmolarity and medium temperature.

Рецензент – проф. Розанов Л.Ф.

Стаття надійшла 08.06.2015 р.