

ГІПЕРТОНІЧНИЙ КРІОГЕМОЛІЗ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ В ЕЛЕКТРОЛІТНОМУ ТА НЕЕЛЕКТРОЛІТНОМУ СЕРЕДОВИЩІ

Н. М. Шпакова, С. С. Єршов, О. Є. Ніном

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

Досліджували залежність рівня гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців від часу інкубації при 37 °С і складу гіпертонічного середовища. Показано, що характер часових залежностей гіпертонічного кріогемолізу цих клітин визначається як видовою приналежністю еритроцитів, так і складом гіпертонічного середовища. Встановлено, що динаміка виходу іонів K^+ відрізняється для еритроцитів різних видів ссавців в електролітному і неелектролітному гіпертонічному середовищі і не узгоджується зі ступенем пошкодження клітин при охолодженні. Передбачається, що вихід K^+ не є визначальним для пошкодження клітин в умовах кріогемолізу, а рівень пошкодження залежить від особливостей мембран досліджуваних клітин.

Ключові слова: ГІПЕРТОНІЧНИЙ КРІОГЕМОЛІЗ, ЕРИТРОЦИТИ ССАВЦІВ, ЕЛЕКТРОЛІТНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, НЕЕЛЕКТРОЛІТНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, ВИХІД ІОНІВ K^+

Пошкодження при швидкому охолодженні до 0 °С, яке носить назву холодового шоку, характерне для багатьох клітин [1]. Проте для прояву холодового шоку біологічних об'єктів, мембрана яких багата холестеринном (у тому числі і еритроцитів), необхідним є додатковий вплив на клітини, наприклад, їх інкубація в гіпертонічному середовищі перед охолодженням. Тому це явище називають гіпертонічними кріогемолізом [2].

До теперішнього часу достатньо багато робіт присвячено вивченню гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів людини [3, 4], тоді як еритроцити тварин вивчені недостатньо. Тому представляло інтерес вивчити особливості гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів різних видів ссавців, оскільки ці клітини відрізняються за ліпідним і білковим складом, набором іонтранспортних систем, інтенсивністю водного транспорту [5–7].

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були еритроцити зі свіжої або свіжоконсервованої донорської крові 5 видів ссавців: людини (*Homo sapiens*), коня (*Equus caballus*), бика (*Bos taurus*), кролика (*Oryctolagus cuniculus*). Кров дорослих чоловіків II групи була надана Харківською обласною станцією переливання крові, кров бика, коня та кролика — дослідним господарством Харківської державної зооветеринарної академії. Стать усіх експериментальних тварин — чоловіча. Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали шляхом центрифугування (центрифуга ОПН-3У4.2, 3000 об/хв, 3 хв, $R_{\text{ротора}}=90$ мм) у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, рН 7,4) і зберігали у вигляді щільного осаду не більше двох годин при 0 °С. Лейкоцитарну плівку видаляли аспірацією.

При дослідженні гіпертонічного кріогемолізу (ГК) еритроцитів ссавців 100 мкл суспензії еритроцитів перенесли в 1,0 мл 1,20 моль/л NaCl та інкубували при температурі 37 °С від 1 до 120 хв. Після чого охолоджували еритроцити до 0 °С 100 мкл перенесенням аліквоти в 1,0 мл 1,20 моль/л NaCl, що мав температуру 0 °С та інкубували 10 хв. Вміст гемоглобіну, що вийшов у супернатант, визначали спектрофотометричним методом на СФ-

4А з проточною кюветою при довжині хвилі 543 нм. За 100 % приймали поглинання проби, в яку додавали детергент тритон Х-100 у концентрації 0,1 %.

Вивільнення іонів K^+ з еритроцитів визначали за допомогою іонселективного калієвого електрода ЕЛІС-121К та порівняльного електрода ЕВЛ-1М3.1, який заповнений насиченим при 20 °С розчином КСl, із застосуванням електролітичного ключа, заповненого розчином 1 моль/л Li_2SO_4 , на універсальному іонометрі ЭВ-74. Вимірювання K^+ проводили в суспензії еритроцитів (гематокрит 8 %).

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою тестів ANOVA та критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні. Кількість повторень у серії експерименту — не менше 6 у двох паралельних пробах. Експериментальні дані наведені на графіках як середнє арифметичне \pm стандартне відхилення.

Результати й обговорення

На рисунку 1 представлені дані про вплив тривалості інкубації в гіпертонічному середовищі (1,2 моль/л NaCl) при 37 °С на рівень гемолізу еритроцитів ссавців при охолодженні до 0 °С. Як видно з рисунку 1 а, чутливість еритроцитів людини до охолодження після інкубації в гіпертонічному середовищі розвивається дуже швидко і вже після першої хвилини інкубації гемоліз еритроцитів складає 95 %. Подальша інкубація еритроцитів людини при 37 °С призводить до істотного зниження рівня криогемолізу, що узгоджується з даними, представленими в роботі [8]. Чутливість еритроцитів коня до ГК росте до 20 хв інкубації, а потім злегка знижується. Еритроцити бика і кролика характеризуються початково низьким пошкодженням (~20 %) і його рівень росте впродовж 120 хв, не досягаючи максимуму. Виявлені особливості часових залежностей ГК еритроцитів ссавців можна пояснити фізико-хімічними характеристиками їх мембран, зокрема різною текучістю, яка визначається різним вмістом певних фосфоліпідів. Так, еритроцитарна мембрана людини характеризується найбільшою текучістю за рахунок високого вмісту фосфатидилхоліну, а бика і кролика — досить низькою за рахунок високого вмісту сфінгомієліну і холестерину, відповідно [9]. Відомо, що зменшення текучості мембрани призводить до зниження латеральної рухливості її компонентів, що в свою чергу знижує сенсibiliзуючий вплив гіпертонічних розчинів на еритроцити [3] внаслідок цього клітини стають менш чутливими до подальшого охолодження.

Зниження в часі рівня гіпертонічного криогемолізу еритроцитів людини автори роботи [3] пояснюють поглинанням позаклітинних катіонів натрію через короткоживучі дефекти бішару, що супроводжується послабленням гіпертонічного стресу на мембрані при тривалій інкубації еритроцитів. Аналогічне пояснення можна застосувати і до еритроцитів коня, характер часових залежностей, ГК яких в основних рисах схожий з особливостями ГК еритроцитів людини (рис. 1). Відсутність зниження рівня ГК у часі для еритроцитів кролика і бика може бути пов'язана з труднощами в зародженні таких Na-проникних дефектів мембрани, що обумовлене видовими особливостями ліпідного і білкового складу їх цитоскелет-мембранного комплексу [6, 10].

Аналогічні дослідження проведені в неелектролітному середовищі, а саме в розчині, що містить 0,86 моль/л сахарозу (рис. 1 б). Для еритроцитів всіх видів ссавців характерне зростання ГК при збільшенні тривалості інкубації клітин при 37 °С. Максимально швидке зростання спостерігається для еритроцитів людини, повільніше — для еритроцитів коня, найповільніше — для еритроцитів бика і кролика. Слід зазначити, що початковий рівень пошкодження еритроцитів всіх ссавців у сахарозному середовищі нижчий, ніж в електролітному (рис. 1).

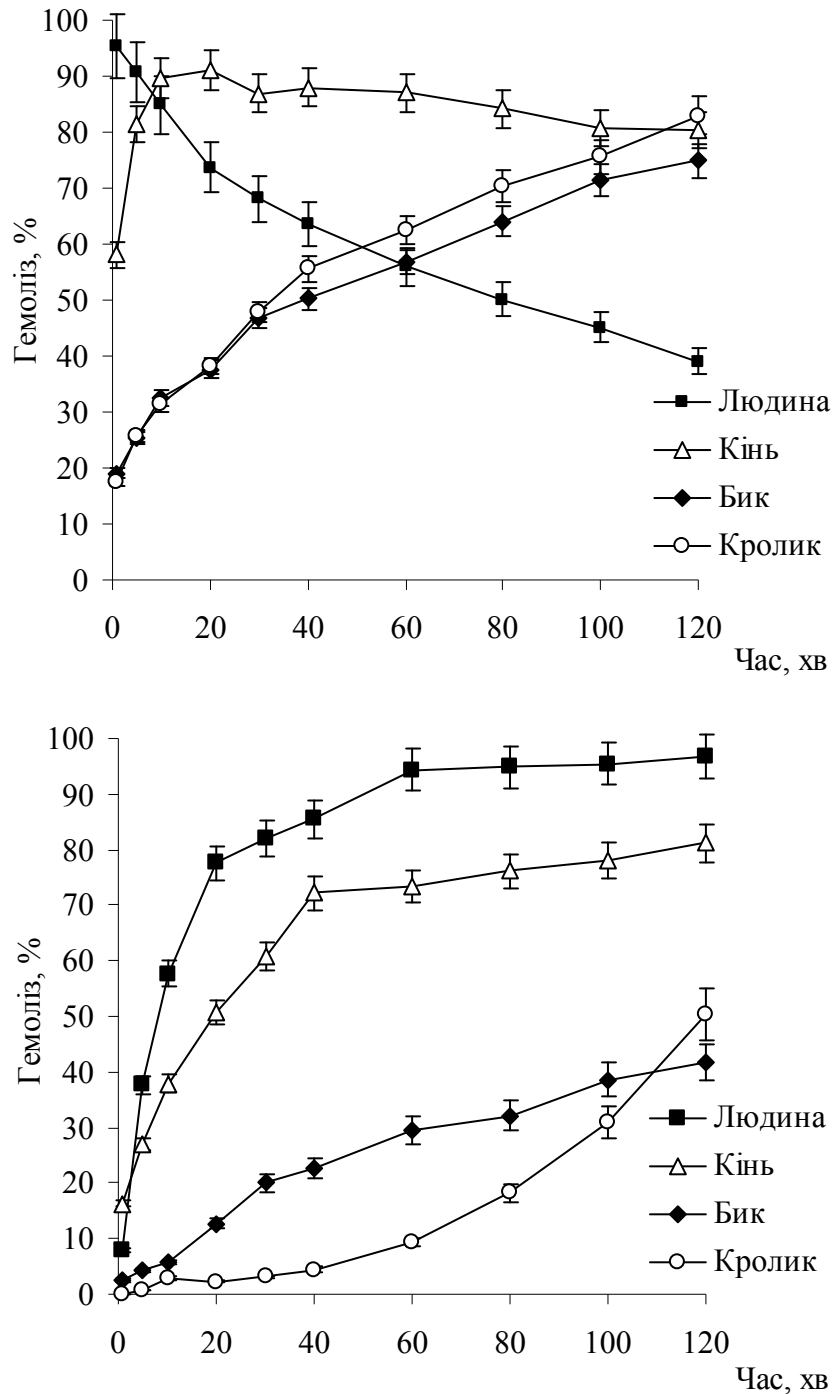


Рис. 1. Вплив часу інкубації при 37 °С на рівень гемолізу еритроцитів ссавців при охолодженні до 0 °С у різних середовищах: А — 1,2 моль/л NaCl, Б. — 0,86 моль/л сахароза

Відмінності в характері часових залежностей ГК еритроцитів тварин в електролітному і неелектролітному середовищах можуть також пояснюватися відмінністю в їх осмолярності. Так, наприклад, для еритроцитів коня показано, що залежності рівня криогемолізу від часу в 0,6 моль/л NaCl (що відповідає 0,86 моль/л сахарозі за осмолярністю) і в 0,86 моль/л сахарозі схожі [12]. Для еритроцитів людини рівень ГК швидше за все визначається складом, а не осмолярністю середовища, оскільки в роботі [8] показано, що розвиток ГК в електролітному і неелектролітному середовищі однакової осмолярності різний. Це може бути пов'язано з меншою тоничністю неелектролітного середовища (~ у 2 рази) і з тим, що

сахароза є осмотичним буфером, здатним обмежувати порушення бар'єрних властивостей мембрани [11].

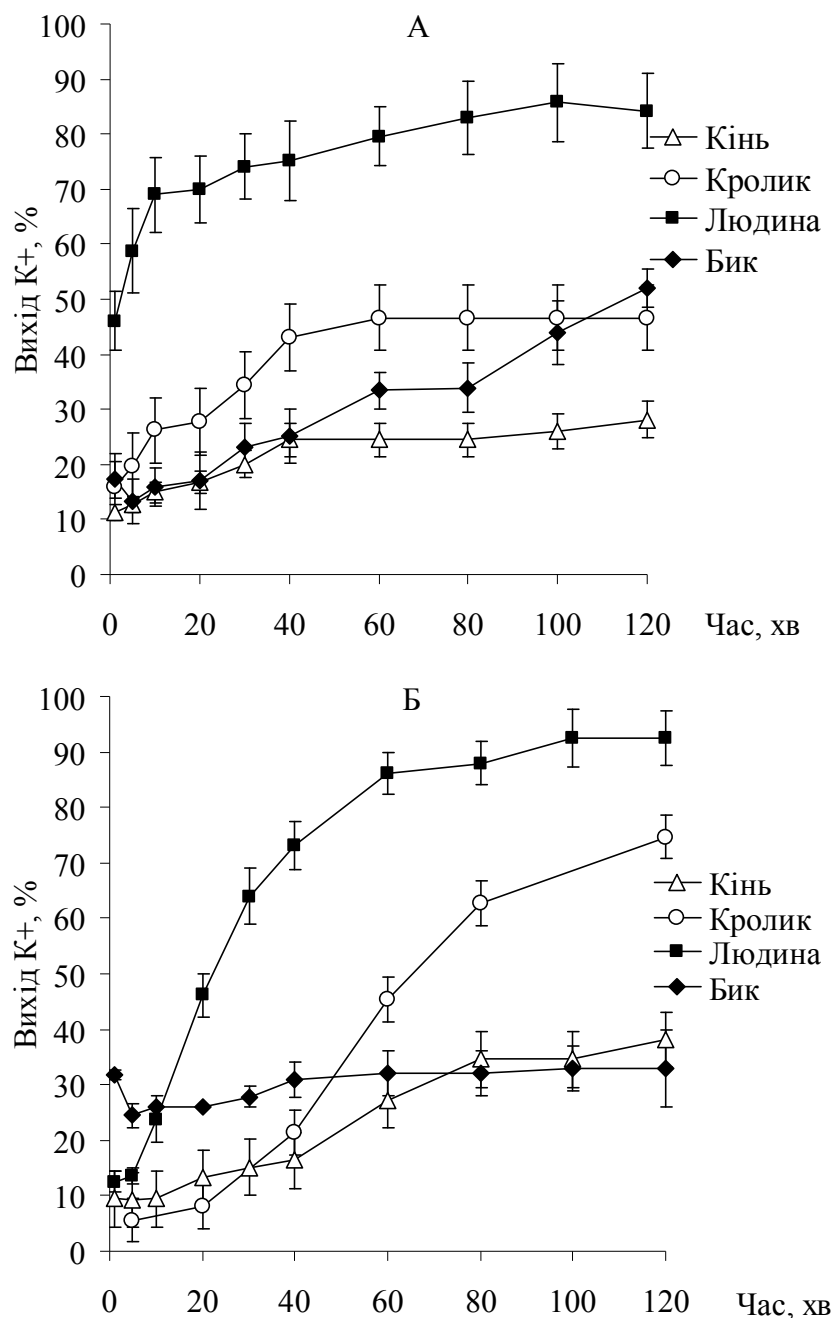


Рис. 2. Часові залежності виходу катіонів K^+ з еритроцитів ссавців в середовищі, що містить: А — 1,20 моль/л NaCl і Б — 0,86 моль/л сахарозу, при 37 °С

Причина різного впливу електролітів і неелектролітів на лізис клітин при охолодженні залишається неясною. У середовищі, що містить високі концентрації неелектролітів (сахароза, манітол та ін.), порушення іонної рівноваги на мембрані приводить до одночасної зміни таких важливих параметрів, як внутрішньоклітинне рН, мембранний потенціал та ін. [13]. Всі ці параметри можуть впливати на чутливість клітин до охолодження.

Відомо, що [3] рівень ГК еритроцитів людини корелює зі змінами проникності мембрани для іонів K^+ на попередньому етапі перед охолодженням. У зв'язку з цим було доцільним вивчити зміну в часі катіонної проникності мембрани еритроцитів різних видів ссавців при їх інкубації в 1,20 моль/л NaCl і 0,86 моль/л сахарозі при 37 °С для того, щоб порівняти з розвитком гемолітичного процесу при подальшому охолодженні клітин до 0 °С.

На рисунку 2 представлені залежності виходу катіонів калію з еритроцитів ссавців від тривалості інкубації в гіпертонічному середовищі. Видно, що динаміка виходу K^+ з еритроцитів різних видів тварин відрізняється в електролітному і в неелектролітному середовищах. Рівень виходу K^+ з еритроцитів всіх видів ссавців у неелектролітному середовищі вищий, ніж електролітному, за винятком еритроцитів бика. Особливості виходу K^+ з клітин бика можуть бути пов'язані з тим, що для цих еритроцитів превалюючим внутрішньоклітинним катіоном є K^+ , а не Na^+ , як для еритроцитів інших ссавців [14].

Слід зазначити, що динаміка виходу K^+ на етапі гіпертонічної інкубації при 37 °С не узгоджується зі ступенем пошкодження клітин при їх охолодженні. Так, в електролітному середовищі мінімальний рівень виходу калію характерний для еритроцитів коня, в той же час рівень ГК цих клітин максимальний серед досліджуваних тварин. Для еритроцитів кролика збільшення виходу K^+ спостерігається до 40 хв інкубації, тоді як ГК росте впродовж 120 хв. Тільки для еритроцитів бика на протязі всіх 120 хв інкубації при 37 °С спостерігається як збільшення виходу іонів K^+ , так і зростання ГК. Для еритроцитів людини зниження ГК відбувається на тлі збільшення виходу K^+ . У неелектролітному середовищі високому рівню ГК еритроцитів коня передують досить низький рівень виходу K^+ . А значний витік іонів K^+ з еритроцитів кролика супроводжується нижчим рівнем гемолізу при подальшому охолодженні клітин. Для еритроцитів бика ГК росте у всьому часовому діапазоні, а вихід K^+ відбувається в перші секунди інкубації і далі не міняється. Тільки для еритроцитів людини динаміка виходу K^+ при 37 °С і зміна рівня ГК збігаються у всьому часовому діапазоні.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що вихід калію на етапі гіпертонічної інкубації при 37 °С не має визначального значення для подальшого пошкодження клітин при охолодженні. Рівень гемолітичного пошкодження швидше визначається характеристиками мембран досліджуваних клітин. Можна припустити, що при інкубації еритроцитів у гіпертонічному середовищі формуються мікродефекти мембрани, проникні для іонів K^+ , а на етапі охолодження відбувається зростання мікродефекту до розміру гемолітичної пори. Як процес формування дефекту, так і його подальше зростання визначається характеристиками мембрани і тому залежить від видової приналежності еритроцитів.

Висновки

1. Рівень ГК еритроцитів ссавців визначається часом інкубації клітин на етапі гіпертонічної інкубації, видовою приналежністю еритроцитів і складом середовища інкубації.
2. Вихід іонів K^+ з еритроцитів ссавців на етапі гіпертонічної інкубації не визначає ступінь пошкодження клітин при наступному охолодженні.

Перспективи подальших досліджень. Дослідити динаміку виходу іонів інших елементів для еритроцитів різних видів ссавців в електролітному і неелектролітному гіпертонічному середовищі при охолодженні.

N. M. Shpakova, S. S. Ershov, E. Ye. Nipot

HYPERTONIC CRYOHEMOLYSIS OF MAMMALIAN ERYTHROCYTES IN ELECTROLYTE AND NON-ELECTROLYTE MEDIA

S u m m a r y

There was studied the dependence of hypertonic cryohemolysis rate for mammalian erythrocytes on incubation time at 37 °C and composition of hypertonic medium. The character of time dependences of hypertonic cryohemolysis for these cells has been shown to be determined by both erythrocyte's type and composition of hypertonic medium. It has been established that the dynamics of K⁺ ion release differs for the erythrocytes of different mammalian species in electrolyte and non-electrolyte hypertonic media and is not in the accordance with the rate of cell damage during cooling. It is supposed that K⁺ ion yield is not determining one for cell damage during cryohemolysis and the damage rate depends on membrane parameters of the cells under study.

H. M. Шпакова, С. С. Ершов, Е. Е. Нипот

ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ КРИОГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ЭЛЕКТРОЛИТНОЙ И НЕЭЛЕКТРОЛИТНОЙ СРЕДЕ

А н н о т а ц и я

Исследовали зависимость уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих от времени инкубации при 37 °C и состава гипертонической среды. Показано, что характер временных зависимостей гипертонического криогемолиза этих клеток определяется как видовой принадлежностью эритроцитов, так и составом гипертонической среды. Установлено, что динамика выхода ионов K⁺ отличается для эритроцитов разных видов млекопитающих в электролитной и неэлектролитной гипертонической среде и не согласуется со степенью повреждения клеток при охлаждении. Предполагается, что выход K⁺ не является определяющим для повреждения клеток при криогемолизе, а уровень повреждения зависит от особенностей мембран исследуемых клеток.

1. *Morris G. J.* Cold shock injury — a comprehensive bibliography / G. J. Morris, P. F. Watson // *Cryoletters*. — 1984. — Vol. 5. — P. 352–372.

2. *Гордиенко Е. А.* Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза / Е. А. Гордиенко, С. Е. Коваленко // *Проблемы криобиологии*. — 1997. — № 3. — С. 3–7.

3. *Шпакова Н. М.* Чувствительность эритроцитов к холодовому шоку в средах, содержащих соли и неэлектролиты / Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // *Проблемы криобиологии*. — 1992. — № 3. — С. 15–20.

4. *Minetti M.* Role of membrane thermotropic properties on hypertonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells / M. Minetti, M. Ceccarini, A. M. Di Stasi // *J. Cell. Biochem*. — 1984. — Vol. 25, № 2. — P. 61–72.

5. *Oyewale J. O.* Changes in osmotic resistance of erythrocytes of cattle, pigs, rats and rabbits during variation in temperature and pH / J. O. Oyewale // *Zentralbl Veterinarmed A*. — 1992. — Vol. 39, № 2. — P. 98–104.

6. *Engen R. L.* High-performance liquid chromatography determination of erythrocyte membrane phospholipid composition in several animal species / R. L. Engen, C. L. Clark // *Am. J. Vet. Res*. — 1990. — Vol. 51, № 4. — P. 577–580.

7. *Guerra-Shinohara E. M.* The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species / E. M. Guerra-Shinohara, O. C. Barretto // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 1999. — Vol. 32, № 6. — P. 683–687.
8. *Takahashi T.* Thermal shock hemolysis in human red cells. 1. The effects of temperature, time, and osmotic stress / T. Takahashi, R. J. Williams // *Criobiology.* — 1983. — Vol. 20, № 5. — P. 507–520.
9. *Nelson G. J.* Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals / G. J. Nelson // *J. Lipid Research.* — 1967. — Vol. 8. — P. 374–379.
10. *Whitfield C. F.* Species-dependent variations in erythrocyte membrane skeletal proteins / C. F. Whitfield, L. M. Mylin, S. R. Goodman // *Blood.* — 1983. — Vol. 61, № 3. — P. 500–506.
11. *Белоус А. М.* Криоконсерванты / А. М. Белоус, М. И. Шраго, Н. С. Пушкарь. — Киев : Наук. думка, 1977. — 200 с.
12. *Ершов С. С.* Осмотическая и температурная чувствительность эритроцитов млекопитающих : дисс. канд. биол. наук. : 03.00.19 / С. С. Ершов. — Харьков, 2009. — 187 с.
13. *Dubbelman T. M.* Hypertonic cryohemolysis of human red blood cells / T. M. Dubbelman, A. W. Bruijne, K. De Crisainse, J. Stevenirm // *J. Memor. Biol.* — 1979. — Vol. 50. — P. 225–240.
14. *Bogner P.* Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes / P. Bogner, K. Sipos, A. Ludany [et al.] // *Eur. Biophys. J.* — 2002. — V. 31. — P. 145–152.

Рецензент: кандидат фізико-математичних наук, завідувач відділу кріобіофізики Нардід О. А.