

ФІЗІОЛОГІЯ

© Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, Е. Е. Нипот, О. А. Шапкина, Е. А. Семионова

УДК 547. 426. 1:612. 111

Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, Е. Е. Нипот, О. А. Шапкина, Е. А. Семионова

ВЛИЯНИЕ ГЛИЦЕРИНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ И МЕХАНИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

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

Работа выполнена соответственно научному направлению работы отдела криофизиологии клетки ИПКиК НАН Украины по теме «Исследование устойчивости эритроцитов к действию осмотического и температурного шока и замораживания», № гос. регистрации 0109U000276.

Вступление. Изучение влияния различных видов стресса на биологические объекты является одним из основных направлений современной науки. Одним из наиболее изучаемых объектов является эритроцит, что обусловлено доступностью этих клеток, наличием достаточно обширной теоретической базы для проведения исследований, а также важностью функциональной нагрузки, которую эритроцит выполняет в организме.

В условиях циркуляции в кровяном русле эритроциты постоянно подвергаются различного рода воздействиям. В частности, при прохождении мелких кровеносных сосудов эритроцит испытывает значительные механические нагрузки [6], а, находясь в капиллярах почечных канальцев, клетки подвергаются гипертоническому стрессу [1]. Поэтому изучение реакции эритроцитов на различные виды стресса является актуальной проблемой.

Следует отметить, что определенные вещества могут оказывать защитное действие на эритроциты в стрессовых условиях. В нашей работе мы исследовали влияние глицерина на эритроциты человека при действии стрессовых факторов. Глицерин широко используют для криоконсервирования биологического материала, в частности, эритроцитов человека [8].

Цель исследования. Изучить влияние глицерина на развитие гипертонического и механического гемолиза эритроцитов человека.

Объект и методы исследования. Эритроциты выделяли из крови А (II)⁺ группы, предоставленной областным центром переливания крови г. Харькова, по стандартной методике [4]. Клетки хранили в виде плотного осадка не более четырех часов при температуре 0 °С. Все исследования проводили при комнатной температуре (20 – 22°С). Гипертонический гемолиз эритроцитов осуществляли перенесением аликвоты эритроцитарной суспензии в 4,0 М раствор NaCl (гематокрит 0,04%). При использовании глицерина клетки инкубировали с веществом

(0,1 – 1,0 М) в течении 2-10 мин, после чего подвергали действию гипертонического шока. Уровень гемолиза как функцию времени определяли путем регистрации изменения оптической плотности суспензии эритроцитов (длина волны 720 нм).

Клетки в присутствии глицерина (1-3 М) подвергали действию механического шока путем перемешивания клеточной суспензии, помещенной в емкость, заполненную пластиковыми шариками диаметром 5 мм, при 22°С. Перемешивание осуществлялось с помощью магнитной мешалки MM-5, скорость вращения – 1200 об/мин. Гематокрит составлял 20%. Через различные временные интервалы (1-2 часа) производили отбор суспензии эритроцитов для определения выхода гемоглобина и ионов калия из клеток.

Количество ионов калия в надосадке исследуемой пробы определяли с помощью ионометра ЭВ-74 с использованием ионоселективного электрода ЭЛИС-121К и электрода сравнения ЭВЛ-1МЗ. 1.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью ANOVA тестов и критерия Манна-Уитни [3]. Отличие между группами считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

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

Результаты исследований и их обсуждение. На **рис. 1** представлены результаты влияния предварительной инкубации эритроцитов человека в растворах глицерина (0,1-1,0 М) в течение 2 мин на уровень гипертонического гемолиза (4,0 М NaCl) этих клеток. Видно, что уровень гипертонического гемолиза значительно снижается при увеличении концентрации глицерина в среде прединкубации до 1,0 М (на порядок по сравнению с контролем).

На **рис. 2** представлена зависимость уровня гипертонического гемолиза эритроцитов человека (4,0 М NaCl) от продолжительности предварительной инкубации клеток в растворах глицерина с концентрацией 0,3 М (1) и 1,0 М (2).

Видно, что предварительная инкубация эритроцитов человека с глицерином в обеих концентрациях приводит к снижению уровня гипертонического гемолиза. Если при использовании глицерина в концентрации 0,3 М наблюдается постепенное

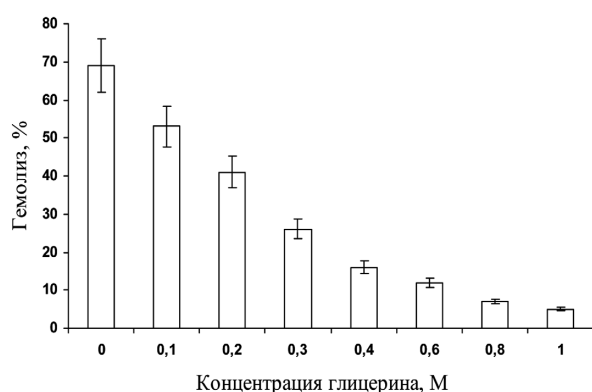


Рис. 1. Зависимость уровня гипертонического гемолиза от концентрации глицерина в среде предварительной инкубации (время инкубации 2 мин).

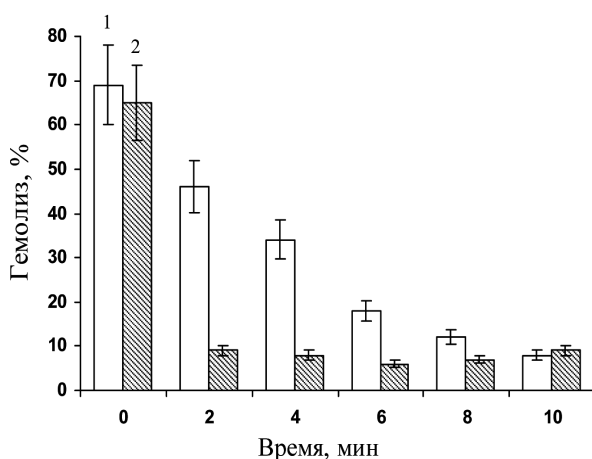


Рис. 2. Зависимость уровня гипертонического гемолиза от продолжительности инкубации эритроцитов человека с глицерином: 1 – 0,3 М, 2 – 1,0 М.

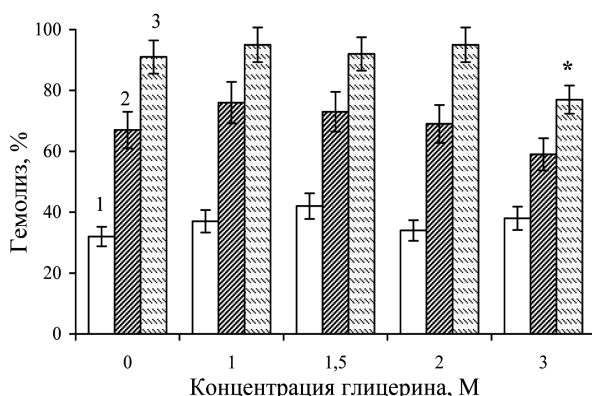


Рис. 3. Влияние глицерина и продолжительности инкубации на уровень механического гемолиза эритроцитов человека: 1 – 1,0 час, 2 – 1,5 часа, 3 – 2 часа.

Примечание: * – статистически значимо по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

снижение уровня гемолиза эритроцитов во всем временном диапазоне, то в случае использования 1,0 М глицерина временная зависимость отсутствует, и минимальный уровень гипертонического повреждения наблюдается уже после 2 мин прединкубации.

Известно, что при гипертоническом стрессе эритроцитов основными факторами повреждения являются избыточная дегидратация клетки и, как следствие, резкое изменение её объёма [4]. Глицерин легко проникает в эритроциты человека и, связывая воду, предотвращает концентрирование внутриклеточной среды [2, 8] в момент действия гипертонического шока, сохраняя естественное окружение структур цитоскелет-мембранного комплекса. Кроме того, внутриклеточный глицерин способствует уменьшению величины объёмного сдвига клеток при их помещении в гипертоническую среду. Все это ведет к увеличению устойчивости эритроцитов к резко изменяющимся осмотическим условиям среды.

Поскольку глицерин проявляет выраженный защитный эффект в условиях гипертонического шока эритроцитов человека, представляло интерес исследовать, будет ли сохраняться протектирующее действие данного вещества по отношению к этим клеткам в условиях стрессового воздействия другого рода.

На **рис. 3** представлена зависимость уровня гемолиза эритроцитов в условиях механического шока от концентрации глицерина. Клетки подвергались механическому воздействию в течение разного времени. Видно, что при увеличении продолжительности механического воздействия наблюдается рост уровня повреждения клеток. Аналогичная временная зависимость гемолитического повреждения клеток наблюдается и в присутствии глицерина. Только в том случае, когда продолжительность инкубации клеток составляла 2 часа, а концентрация глицерина 3 М, наблюдалось статистически значимое повышение устойчивости эритроцитов к механическому стрессу.

В **табл.** представлены в сравнительном аспекте данные об уровне гемолитического повреждения и выходе ионов калия из клеток, подвергшихся механическому шоку в присутствии глицерина (1,5 М).

Видно, что нарастание уровня гемолиза эритроцитов человека происходит постепенно при увеличении продолжительности действия механического стресса. В то же время практически полный выход ионов калия наблюдается уже после 1-часового инкубирования и дальнейшие изменения незначительны. Этот факт, скорее всего, объясняется тем, что стрессовое воздействие на клетки вначале вызывает микроповреждения мембраны, которые приводят к потере клетками катионов калия, а образование макроскопических пор и выход гемоглобина происходит позже при более продолжительном стрессовом воздействии. Следует также отметить, что присутствие глицерина

Таблица

Выход катионов калия и уровень гемолитического повреждения эритроцитов человека в условиях механического стресса в присутствии глицерина

Время, ч	Гемолиз, %		Выход ионов калия, %	
	Концентрация глицерина, М		Концентрация глицерина, М	
	0	1,5	0	1,5
1	32±6	43±7	93±6	95±5
1,5	60±7	73±6	96±7	97±6
2	91±8	92±7	97±3	96±4

не оказывает влияния на проницаемость мембран эритроцитов человека для катионов калия в условиях механического стресса.

Согласно литературным данным, устойчивость клеток к механическим напряжениям, в том числе деформирующего характера, определяется, прежде всего, состоянием цитоскелета и его взаимодействиями с мембраной [5, 7]. Поскольку глицерин является легко проникающим в клетку и связывающим воду веществом [2,8], то при инкубации

эритроцитов в растворах глицерина прежде всего изменяется такой параметр, как содержание воды в клетках, что является значимым в условиях гипертонического стресса. По-видимому, вязко-эластичные свойства мембраны практически не изменяются в присутствии глицерина, поэтому стрессовое воздействие, связанное с механическим повреждением клетки, не может быть значительно снижено при помощи исследуемого вещества. При больших концентрациях глицерина происходят значимые изменения вязкости раствора инкубации эритроцитов, что, вероятно, оказывает небольшое защитное влияние при механическом стрессе.

Выводы. Таким образом, можно сделать вывод, что защитное действие исследуемого вещества на эритроциты человека при разных видах стресса определяется механизмом его действия и разнотипностью структуры биологической системы, которая является «точкой приложения» стрессовых факторов.

Перспективы дальнейших исследований. Дальнейшее развитие данной проблемы предполагает исследование влияния на эритроциты человека других видов стресса, а также привлечения к исследованию эритроцитов других видов млекопитающих.

Литература

1. Агаджанян Н. А. Нормальная физиология / Н. А. Агаджанян, В. М. Смирнов. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2009. – 520 с.
2. Гордієнко О. І. Механізми проникання глицерину крізь мембрани еритроцитів людини / О. І. Гордієнко, С. Є. Коваленко, І. Ф. Коваленко // Проблеми криобиології. – 2012. – Т. 22, №4. – С. 389-397.
3. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : Медиа Сфера, 2002. – 312 с.
4. Шпакова Н. М. Осмотичний і температурний стрес еритроцитів різних видів ссавців / Н. М. Шпакова // Біологія тварин. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 382–391.
5. Chen Y. A strain-based flow-induced hemolysis prediction model calibrated by in vitro erythrocyte deformation measurements / Y. Chen, M. K. Sharp // Artif. Organs. – 2011. – Vol. 35, №2. – P. 145-56.
6. Gong X. The deformation behavior of multiple red blood cells in a capillary vessel / X. Gong, K. Sugiyama, S. Takagi, Y. Matsumoto // J. Biomech. Eng. – 2009. – Vol. 131, №7 (5 p.) – Режим доступа к журналу: <http://biomechanical.asmedigitalcollection.asme.org>
7. Omori T. Tension of red blood cell membrane in simple shear flow / T. Omori, T. Ishikawa, D. Barthis-Biesel [et al.] // Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. – 2012. – Vol. 86, №5 (9 p.) – Режим доступа к журналу : <http://pre.aps.org/toc/PRE/v86/i5>
8. Pegg D. E. Principles of cryopreservation / D. E. Pegg // Methods Mol. Biol. – 2007. – Vol. 368 – P. 39–57.

УДК 547.426.1:612.111

ВЛИЯНИЕ ГЛИЦЕРИНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ И МЕХАНИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

Шпакова Н. М., Орлова Н. В., Нипот Е. Е., Шапкина О. А., Семионова Е. А.

Резюме. В работе показано, что глицерин значительно снижает уровень гипертонического шока эритроцитов человека и в то же время не оказывает влияния на уровень гемолитического повреждения этих клеток и проницаемость их мембран для катионов калия в условиях механического стресса. Предполагается, что влияние глицерина на клетки при разных видах стресса определяется его способностью изменять физико-химические характеристики клетки, которые непосредственно определяют их чувствительность к действию стрессовых факторов.

Ключевые слова: эритроциты человека, глицерин, механический стресс, гипертонический стресс.

УДК 547.426.1:612.111

ВПЛИВ ГЛІЦЕРИНУ НА СТІЙКІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ДО ГІПЕРТОНІЧНОГО І МЕХАНІЧНОМУ СТРЕСУ

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

Резюме. У роботі показано, що гліцерин значно знижує рівень гіпертонічного стресу еритроцитів людини і в той же час не впливає на рівень гемолітичного пошкодження цих клітин і проникність їх мембран для катіонів калію в умовах механічного стресу. Передбачається, що вплив гліцерину на клітини при різних видах стресу визначається його здатністю змінювати фізико-хімічні характеристики клітини, які безпосередньо визначають їх чутливість до дії стресових факторів.

Ключові слова: еритроцити людини, гліцерин, механічний стрес, гіпертонічний стрес.

UDC 547.426.1:612.111

Glycerol Effect on Human Erythrocytes Resistance to Hypertonic and Mechanical Stresses

Shpakova N. M., Orlova N. V., Nipot E. E., Shapkina O. A., Semionova E. A.

Summary. In this research there was studied the glycerol effect on human erythrocyte sensitivity to hypertonic and mechanical stresses.

Hypertonic stress of erythrocytes was performed by transferring an aliquot of erythrocyte suspension into 4.0 M NaCl solution (0.04% hematocrit). The hemolysis level as function of time was determined by recording a change in optical density of erythrocyte suspension (720 nm wavelength). Mechanical stress was done by mixing cell suspension (20% hematocrit) with plastic balls on a magnetic stirrer (rotation rate was 1,200 rot/min) at 22°C. In different time intervals there was determined the release of hemoglobin and potassium ions out of cells. When using glycerol the cells were incubated with the substance, after that they were subjected to stress effect.

The study of glycerol effect on hypertonic stress of human erythrocytes allowed establishing the fact that an increase in substance concentration up to 1.0 M resulted in a significant (about an order of magnitude) reduction of erythrocyte hemolysis level during their following transfer into 4.0 M NaCl-contained medium. The influence of incubation duration of cells (2-10 min) with 0.3 and 1.0 M glycerol on their sensitivity to hypertonic stress was studied. When using glycerol in 0.3 M concentration, a gradual reduction in hypertonic hemolysis level of erythrocytes within the whole studied time range was observed. In the case of using 1.0 M glycerol no time dependence of hypertonic hemolysis of erythrocytes on incubation duration of cells with the substance was revealed since the minimum level of hypertonic damage was seen after 2 min cell incubation with glycerol.

When studying the glycerol effect on erythrocyte resistance to mechanical stress the cells after 10 min incubation with cryoprotectant were subjected to mechanical action within different times (1.0, 1.5 and 2.0 hours). With an increase in mechanical stress duration higher level of hemolytic cell damage is observed. A similar time dependence of cell damage is also seen in glycerol presence in 1-3 M concentration. Increased erythrocyte resistance to mechanical stress is noted only if using 3 M glycerol under maximum duration of mechanical stress (2 hours). Quite a complete yield of potassium ions out of cells 1 hour later is observed under mechanical stress of erythrocytes in glycerol presence, whereas a hemolytic damage of erythrocytes is characterized by a pronounced time dependence within the whole range (1-2 hours).

In this way glycerol significantly reduces the haemolysis level of human erythrocytes under hypertonic stress and does not practically affect the level of haemolytic cell damage and permeability of their membranes for potassium cations under mechanical stress. Glycerol effect on cells under various stresses is assumed to be determined by its ability to change physical and chemical characteristics of a cell that directly determine their sensitivity to stress factors.

Key words: human erythrocytes, glycerol, mechanical stress, hypertonic stress.

Рецензент – проф. Міщенко І. В.

Стаття надійшла 10. 09. 2013 р.