

ОСМОТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ МОДИФИКАЦИИ ИХ ИСХОДНОГО СОСТОЯНИЯ

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

starling_nataly@mail.ru

Работа выполнена соответственно научному направлению работы отдела криоцитологии ИПКиК НАН Украины по теме: «Исследование чувствительности эритроцитов млекопитающих к охлаждению, дегидратации и замораживанию при действии модифицирующих факторов и криопротекторов» (№ государственной регистрации –0114U0001318).

Вступление. Криоконсервирование клеточных суспензий является одной из ведущих технологий, позволяющих сохранять клетки длительное время. Однако в процессе замораживания клеток вследствие воздействия на них ряда негативных факторов (высокие концентрации солей, изменение ионной силы, температуры, рН среды) часть клеток могут повреждаться. Использование модельных экспериментов позволяет выделить эти факторы и проанализировать вклад каждого из них в общий процесс криоповреждения. Так, для моделирования действия гипертонических растворов, которые образуются при вымораживании воды, используется гипертонический шок – перенесение клеток в гипертоническую среду при постоянных положительных значениях температуры [6].

В настоящее время разработаны подходы, позволяющие влиять на процесс развития гипертонического повреждения эритроцитов. Одним из них является изменение состояния эритроцитов на этапе, предшествующем действию гипертонического шока. Показано, что предварительная инкубация эритроцитов человека в умеренно гипертонических растворах электролитной и неэлектролитной природы, способствует увеличению их устойчивости к гипертоническому шоку [1, 2, 5]. Защитное действие частичного обезвоживания эритроцитов человека связывают с состоянием цитоскелета, плотность взаимодействия белков которого увеличивается, что способствует стабилизации плазматической мембраны [5].

Исходя из того, что эритроциты разных видов млекопитающих имеют индивидуальные особенности [9, 11, 13] и характеризуются различной чувствительностью к гипертоническому шоку [4, 7], представляло интерес исследовать влияние исходного состояния эритроцитов млекопитающих, сформированного под действием частичного обезвоживания, на их чувствительность к данному стрессовому фактору. Кроме того, чтобы определить вклад повышения ионной силы раствора в развитие чув-

ствительности клеток к гипертоническому шоку, мы использовали в качестве сред предварительного обезвоживания растворы хлорида натрия и сахарозы.

Цель работы – исследовать чувствительность эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку после предварительной инкубации в средах хлорида натрия (0,2-2,0 моль/л) и сахарозы (0,2-1,2 моль/л).

Объект и методы исследования. Материалом исследования служили эритроциты человека, быка, лошади, кролика и крысы. После удаления плазмы эритроциты дважды отмывали путем центрифугирования при 3000 об/мин (центрифуга ОПн-ЗУ4.2) в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, рН 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли методом аспирации. Осадок эритроцитной массы хранили при 4°C и использовали в течение 3 часов. Все использованные в работе среды готовили на 0,01 моль/л фосфатном буфере, рН 7,4.

Гипертонический шок эритроцитов млекопитающих осуществляли перенесением суспензии клеток в раствор, содержащий 4,0 моль/л NaCl на 5 мин (конечный гематокрит 0,4%). Предварительную инкубацию эритроцитов млекопитающих осуществляли в растворах, содержащих 0,2 – 2,0 моль/л хлорида натрия или 0,2-1,2 моль/л сахарозы в течение 2 мин при температуре 37°C. Растворы сахарозы были приготовлены на физиологическом растворе (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, рН 7,4).

Каждый эксперимент проводили не менее 6 раз в двух параллельных пробах. Для всех образцов производили вычисление среднего арифметического значения и значения среднеквадратичной ошибки ($M \pm m$).

Результаты исследования и их обсуждение. На **рисунке 1** представлены зависимости уровня гемолиза эритроцитов человека, лошади, крысы, кролика, быка в 4,0 моль/л NaCl после предварительной инкубации в средах, содержащих сахарозу.

Для эритроцитов человека, лошади и крысы гемолитические зависимости имеют минимумы при определенных значениях концентрации сахарозы в среде прединкубации. Наиболее выраженный минимум наблюдается для эритроцитов человека

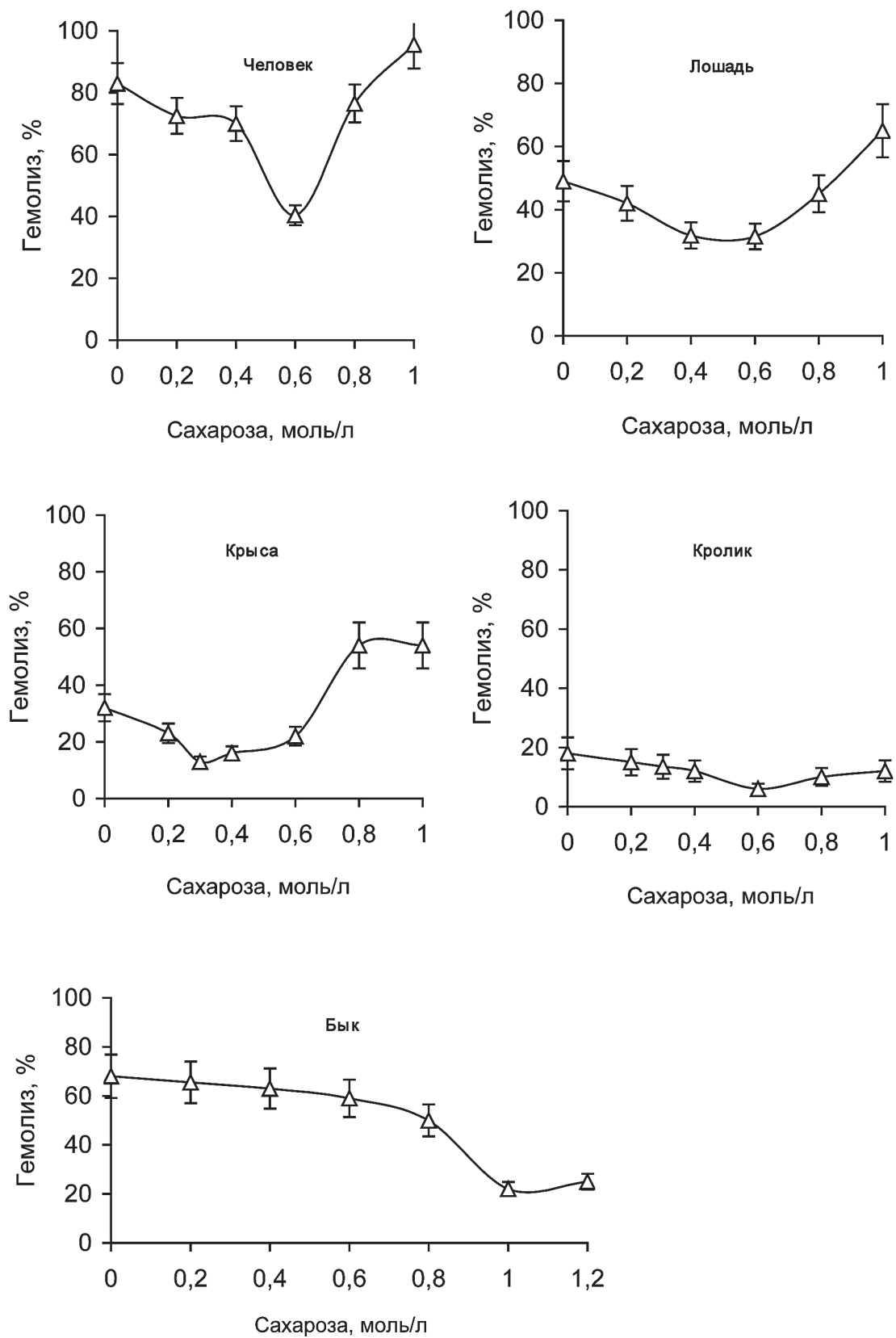


Рис. 1. Гемолиз эритроцитов млекопитающих в 4,0 моль/л NaCl после предварительной инкубации в средах, содержащих сахарозу при температуре 37°C. ($M \pm m$, $n=6$). Растворы сахарозы приготовлены на физиологическом растворе.

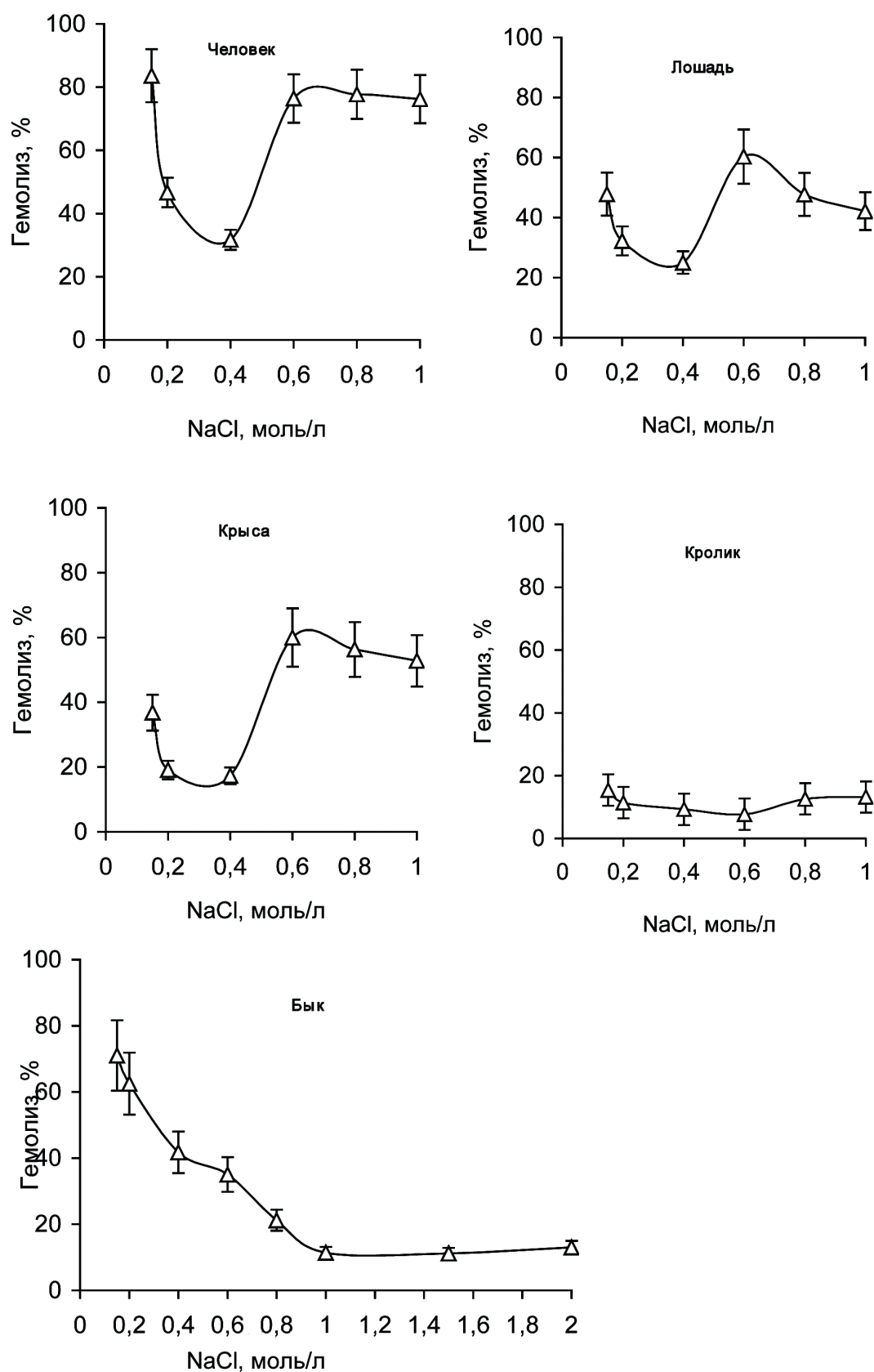


Рис. 2. Гемолиз эритроцитов млекопитающих в 4,0 моль/л NaCl после предварительной инкубации в средах, содержащих 0,15-1,0 NaCl моль/л при температуре 37°C. ($M \pm m$, $n=6$).

при концентрации сахарозы в среде прединкубации 0,6 моль/л, при этом уровень гипертонического повреждения эритроцитов в 4,0 моль/л NaCl снижается в 2 раза. Для эритроцитов лошади и крысы наблюдается более «широкий» минимум и составляет 0,4 – 0,6 моль/л и 0,3 – 0,6 моль/л сахарозы в среде прединкубации соответственно. В указанных условиях уровень гипертонического повреждения эритроцитов лошади и крысы снижается в 1,7 и 2,1 раза. Для эритроцитов быка наблюдается снижение гипертонического гемолиза (4,0 моль/л NaCl) повреждения клеток, достигая минимального значения после прединкубации в среде, содержащей 1 моль/л сахарозы. Следует отметить, что прединкубация эритроцитов быка в растворах сахарозы приводит к максимальному защитному эффекту в условиях гипертонического шока по сравнению с клетками других млекопитающих: уровень повреждения в гипертонической среде снижается в 3,2 раза. Эритроциты кролика имеют изначально низкое повреждение в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, и предварительная инкубация в сахарозе 0,2-1,0 моль/л не оказывает статистически достоверного влияния на уровень их гипертонического гемолиза.

На **рисунке 2** представлены данные, отображающие уровень повреждения эритроцитов исследуемых млекопитающих в 4 моль/л NaCl при условии их прединкубации в умеренно гипертонических растворах NaCl. Для всех млекопитающих наблюдается картина, аналогичная данным, представленным на **рисунке 1**. Сохраняются основные закономерности – наличие минимумов для эритроцитов человека, лошади, крысы; более высокое значение концентраций растворов прединкубации, необходимое для максимальной защиты эритроцитов быка; отсутствие защитного эффекта по отношению к эритроцитам кролика. Сравнительный анализ результатов, полученных при использовании сахарозы и хлорида натрия на этапе прединкубации (**рис. 1, 2**) показал более выраженное снижение гипертонического гемолиза эритроцитов человека, лошади крысы и быка после использования среды, содержащей хлорид натрия.

При этом минимумы гемолитических зависимостей эритроцитов человека, лошади и крысы сдвинуты по оси абсцисс влево и составляют 0,35-0,4; 0,3-0,4; 0,2-0,4 моль/л NaCl соответственно.

Содержание воды в эритроцитах составляет около 60-65% от общего веса клетки [14]. Вода участвует в поддержании оптимальной концентрации внутриклеточных ионов, необходимой для работы транспортных и ферментных систем, стабилизирует пространственную структуру белков [8]. Частичное обезвоживание эритроцитов приводит, с одной стороны, к увеличению концентрации внутриклеточных катионов, с другой стороны – к формированию более плотной цитоскелетно-мембранной белковой сети. Оба фактора будут способствовать повыше-

нию устойчивости клетки к высоко гипертонической среде (4,0 моль/л NaCl). Как предполагается в работах [3, 12], одним из механизмов повреждения клетки при гипертоническом шоке является возникновение значительного механического напряжения на мембране вследствие различия в концентрации осмотически активных веществ между внутриклеточной и внеклеточной средой. Уменьшение градиента осмолярности на мембране приводит к снижению механической нагрузки и уменьшению повреждения клетки. С другой стороны, изменение чувствительности частично обезвоженных эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку может быть обусловлено, также изменением механических характеристик цитоскелет-мембранного комплекса, что позволяет клетке выдерживать большие механические нагрузки.

В нашей работе обезвоживание клеток проводили в умеренно гипертонических растворах сахарозы и хлорида натрия. Максимально устойчивое состояние эритроцитов крысы, человека и лошади к гипертоническому шоку формируется в условиях предварительного инкубирования клеток как в солевых, так и в сахарозных средах, осмолярность которых составляет – 400-800 мосм/кг, 700-800 мосм/кг и 600-800 мосм/кг, соответственно. Таким образом, определяющим в гипертонической устойчивости клеток является осмолярность среды прединкубации, а не её качественный состав. Формирование устойчивого состояния эритроцитов быка наблюдается в средах с более высокой осмолярностью сахарозы и NaCl 1300 и 1760 мосм/кг соответственно. Это может быть связано с тем, что, в отличие от других исследуемых млекопитающих, преобладающим катионом в эритроцитах быка является натрий [10]. Поэтому процессы обезвоживания в эритроцитах быка будут иметь свои особенности.

Выводы. Таким образом, чувствительность эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку определяется исходным состоянием клеток. Можно предположить, что определяющую роль в формировании устойчивого состояния эритроцитов человека, лошади и крысы к гипертоническому шоку играет степень обезвоживания клеток, которая зависит скорее от показателей осмолярности растворов этапа прединкубации, а не от их ионной силы. Особенности реакции эритроцитов быка, вероятно, связаны со значительными отличиями их внутриклеточного ионного состава.

Перспективы дальнейших исследований. Дальнейшие исследования предполагают изучение воздействия факторов как физической так и химической природы на изменение исходного состояния эритроцитов млекопитающих с целью повышения их устойчивости к действию факторов криоповреждения.

Литература

1. Александрова Д.И. Влияние прединкубации эритроцитов человека и быка в растворах сахарозы на устойчивость клеток к гипертоническому шоку / Д.И. Александрова, Н.М. Шпакова, Н.В. Орлова // Вестник Харьковского университета. Серия: биология. – 2007. – № 788. – С. 110-115.
2. Александрова Д.И. Вплив попереднього обезводнення еритроцитів людини та бика в сольовому середовищі на чутливість до гіпертонічного шоку / Д.И. Александрова, Н.М. Шпакова // Матеріали III міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів "Молодь та поступ біології". - Львів, 23–27 квітня, 2007. - С. 454.
3. Гордиенко Е.А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е.А. Гордиенко, Н.С. Пушкарь. – Киев: Наук. Думка. – 1994. – 141 с.
4. Ершов С.С. Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды / С.С. Ершов, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2004. – № 3. – С. 51-57.
5. Панталер Л.Р. Дослідження стійкості дегідратованих еритроцитів до дії осмотичного та механічного стресу: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. биол. наук: спец. 03.00.19 «Криобіологія» / Л.Р. Панталер. – Харьков, 1996. – 24 с.
6. Шпакова Н.М. Температурная и осмотическая устойчивость эритроцитов разных видов млекопитающих: дисс. на соискание ученой степени доктор биол. наук: спец. 03.00.19 «Криобіологія» / Н.М. Шпакова. — Харьков, 2014. — 392 с.
7. Betticher D.C. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu / D.C. Betticher, J. Geiser // Comp. Biochem. Physiol. – 1989. – 93, № 2. – P. 429-432.
8. Determinants of erythrocyte hydration / J. Rinehart, E.E. Gulcicek, C.H. Joiner [et al.] // Curr. Opin. Hematol. – 2010. – Vol. 17. – № 3. – P. 191-197.
9. Florin-Christenses J. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes / J. Florin-Christenses, C.E. Suarez, M. Florin-Christenses [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 2001. – Vol. 98, № 14. – P. 7736-7741.
10. Kaneko J.J. Clinical Biochemistry of Domestic Animals / J.J. Kaneko, J.W. Harvey, M.L. Bruss. – 6th ed. – Academic Press, 2008. – 916 p.
11. Matei H. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species / H. Matei, L. Frentescu, Gh. Benga // J. Cell. Mol. Med. – 2000. – Vol. 4, № 46. – P. 270-276.
12. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury / H.T. Meryman // Cryobiology. – 1971. – Vol. 8, № 5. – P. 439-500.
13. Phospholipid composition of plasma and erythrocyte membranes in animal species by ³¹P NMR / A.M. Ferlazzo, G. Bruschetta, P. Pietro [et al.] // Vet Res Commun. – 2011. – Vol. 35. – P. 521-530.
14. The maximum and minimum water content and cell volume of human erythrocytes in vitro / K. Kageyama, Y. Onoyama, H. Kogawa [et al.] // Biophysical Chemistry. — 1989. – № 34. – P. 79-83.

УДК 577.352.462: 612.111

ОСМОТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ ПРИ МОДИФІКАЦІЇ ЇХ ВИХІДНОГО СТАНУ

Шпакова Н. М., Орлова Н. В., Ніпот О. Е., Шапкина О. О.,
Мазур А. О.

Резюме. В роботі досліджували вплив вихідного стану еритроцитів ссавців, сформованого під дією часткового зневоднення, на їх чутливість до гіпертонічного шоку (4,0 моль / л NaCl). У роботі було показано, що максимально стійкий стан еритроцитів щура, людини і коня до гіпертонічного шоку формується в умовах попереднього інкубування клітин як в сольових, так і в сахарозних середовищах, осмолярність яких становить – 400-800 мосм/кг, 700-800 мосм/кг і 600-800 мосм/кг відповідно. Таким чином, визначальним у гіпертонічної стійкості клітин є осмолярність середовища передінкубації, а не його іонна сила.

Ключові слова: еритроцити ссавців, гіпертонічний шок, зневоднення, осмолярність, іонна сила.

УДК 577.352.462:612.111

ОСМОТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ МОДИФИКАЦИИ ИХ ИСХОДНОГО СОСТОЯНИЯ

Шпакова Н. М., Орлова Н. В., Ніпот Е. Е., Шапкина О. А.,
Мазур А. А.

Резюме. В работе исследовали влияние исходного состояния эритроцитов млекопитающих, сформированного под действием частичного обезвоживания, на их чувствительность к гипертоническому шоку (4,0 моль/л NaCl). В работе было показано, что максимально устойчивое состояние эритроцитов крысы, человека и лошади к гипертоническому шоку формируется в условиях предварительного инкубирования клеток как в солевых, так и в сахарозных средах, осмолярность которых составляет – 400-800 мосм/кг, 700-800 мосм/кг и 600-800 мосм/кг, соответственно. Таким образом, определяющим в гипертонической устойчивости клеток является осмолярность среды прединкубации, а не её ионная сила.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, гипертонический шок, обезвоживание, осмолярность, ионная сила.

UDC 577.352.462:612.111

OSMOTIC SENSITIVITY OF MAMMALIAN ERYTHROCYTES UNDER THEIR INITIAL STATE MODIFICATION

Shpakova N. M., Orlova N. V., Nipote E. E., Shapkina O. A.,
Mazur A. A.

Abstract. We studied here the effect of initial state of mammalian erythrocytes, formed under the effect of a partial dehydration on their sensitivity to hypertonic shock (4.0 mol/l NaCl). To determine the contribution of an increased ionic strength of the solution into the development of cell sensitivity to hypertonic shock, we used

the moderate hypertonic sodium chloride (0.2-1.0 mol/l) and sucrose (0.2-1.2 mol/l) solutions as the preliminary dehydration media.

For human, equine, rat and bovine erythrocytes the hemolytic dependences (4.0 mol/l NaCl) were revealed to have the minimum values under the certain values of sucrose and sodium chloride concentrations in the preincubation media. Moreover in case of bovine erythrocytes the maximum protection was observed under higher values of sodium chloride and sucrose concentrations.

The minimum hypertonic damage in human, equine and rat erythrocytes was observed during preincubation in the solutions, containing sucrose in the following concentrations: 0.6 mol/l, 0.4 - 0.6 mol/l and 0.3 - 0.6 mol/l, respectively. When used the sodium chloride in the preincubation medium the minima of hemolytic dependencies of human, equine and rat erythrocytes were shifted to the left by X axis and made 0.35-0.4 mol/l, 0.3-0.4 mol/l, 0.2-0.4 mol/l, respectively. The damage in bovine erythrocytes reached the minimum value after preincubating in the medium containing either sucrose or NaCl in 1.0 mol/l concentration. Rabbit erythrocytes had initially low damage in the medium with 4.0 mol/l NaCl and the preincubation in moderate hypertonic solutions caused no statistically significant effect on the level of their hypertonic hemolysis.

The erythrocyte incubation in moderate hypertonic sodium chloride and sucrose solutions results in a partial dehydration, accompanied by an increased concentration of intracellular cations and the formation of more dense packed cytoskeletal proteins. We may assume both factors as contributing to an increased cell resistance to the effect of high hypertonic medium (4.0 mol/l NaCl).

The maximum resistant state of rat, human and equine erythrocytes to hypertonic shock was demonstrated here as formed under conditions of cell preincubation in both saline and sucrose media, which osmolality made 400-800 mOsm/kg, 700-800 mosm/kg and 600-800 mOsm/kg, respectively. Thus, the preincubation medium osmolality, but not its ionic strength, is the determining factor in hypertonic resistance of cells. The formation of a steady state in bovine erythrocytes is observed in the media with higher sucrose and NaCl osmolality: 1300 and 1760 mOsm/kg, respectively. This may be due to the fact that in contrast to the other studied mammals, in bovine erythrocytes a predominant cation is the sodium, so the dehydration processes in bovine erythrocytes will have their own peculiarities.

Keywords: mammalian erythrocytes, hypertonic shock, dehydration, osmolality, ionic strength.

Рецензент – проф. Міщенко І. В.
Стаття надійшла 18.04.2016 року