Українська академія наук
Вищий державний навчальний заклад України
Українська медична стоматологічна академія



ВІСНИК проблем біології і медицини

Випуск 4

ДК 57.043:591.111.1

.М. Шпакова, С.С. Ершов, Н.В. Орлова

ЕАКЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, БЫКА И КРОЛЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ)СМОТИЧЕСКИХ И ТЕМПЕРАТУРНЫХ ПАРАМЕТРОВ СРЕДЫ

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

Вступление. В условиях низкотемературного хранения биологических ъектов основными повреждающими акторами являются высокая осмолярсть и низкая температура окружаюей среды [1]. Изучение чувствительсти клеток к действию указанных рессовых факторов в модельных спериментах (в условиях, когда отутствует, в частности, кристаллизация дной фазы) позволяет в какой-то мере енить их возможный вклад в общее вреждение клеток при замораживаии. Успешное долгосрочное хранение леток, и в частности эритроцитов, зависит от понимания процессов, протекающих в клетках в условиях действия на их стрессовых факторов. Несмотря на льшой экспериментальный материал, олученный при криоконсервировании итроцитов человека [1,2], ряд вопросов таются недостаточно изученными. С угой стороны, потребности ветеринарй практики в криоконсервированной рови стимулируют изучение особенстей чувствительности эритроцитов зных видов животных к изменению смотических и температурных факторов среды [3].

Цель исследования – сравнительное учение чувствительности эритроцитов ловека, быка и кроля к изменению смотических и температурных параметов среды.

Объект и методы исследования. итроциты получали из крови человека, быка и кроля (n=6), заготовленй на глюгицировом консерванте. Все пользуемые среды готовили на 0,01 фосфатном буфере, pH 7,4. Омолярсть растворов определяли на осмомее ОМКА 1Ц-01 (Одесса, Украина).

Чтобы вызвать гипертонический ресс, эритроциты переносили в створы, содержащие различные конентрации NaCl, при температуре 37°С на 10 мин. При сочетанном действии гипертонической среды и охлаждения эритроциты помещали в среды с соответствующей концентрацией NaCl и инкубировали при температуре 37°С в течение 10 мин, затем переносили аликвоту в раствор NaCl той же тоничности, охлажденный до температуры 0°С, на 10 мин. Конечный гематокрит – 0,4%. Количество гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически (λ=543 нм) и рассчиты вали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии детергента тритона X-100 (0,1%). Гематокрит определяли микрогематокритным методом на микроцентрифуге МГЦ-8.

В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации «хч» и «чда».

Статистическую обработку данных проводили методами Mann-Whitney и ANOVA. На рисунках полученные данные представлены в виде средних значений, а также указано максимальное отклонение в одной из точек кривой.

Результаты исследований и их обсуждение. В физиологических условиях осмотическое давление плазмы крови разных видов млекопитающих составляет 290-310 мОсм/кг. Как снижение, так и повышение внеклеточной концентрации соли приводит к повреждению эритроцитарной мембраны, что сначала проявляется (при небольших нагрузках) в нарушении ее барьерных свойств по отношению к ионам, а по мере повышения нагрузки – и к макромолекулам (гемоглобину).

На **рис.1** представлены зависимости уровня гемолиза эритроцитов человека, кроля и быка от концентрации соли в среде при 37°С. Видно, что начало лизиса (> 10 %) для эритроцитов человека наблюдается в среде, содержащей 2,8 М NaCl, клеток быка – в 2,5

М, а эритроцитов кроля – в 3,6 М NaCl. Дальнейшее увеличение концентрации соли в среде приводит к резкому возрастанию уровня гемолиза эритроцитов человека и быка, в то время как лизис клеток кроля в 4,0 М NaCl составляет всего 15 %. Таким образом, эритроциты кроля проявляют чрезвычайную устойчивость к осмотическому стрессу при 37°С.



Рис.1 *Зависимость уровня гемолиза эритроцитов млекопитающих от концентрации NaCl: 1 – человек, 2 – бык, 3 – кроль.*

Охлаждение эритроцитов, находящихся в гипертонических средах, позволяет проявить повреждающее действие высококонцентрированных солевых сред. На **рис.2** представлены кривые зависимостей гемолиза эритроцитов человека, быка и кроля от концентрации соли в среде при охлаждении от 37 до 0°С. Видно, что в физиологическом растворе охлаждение эритроцитов млекопитающих от 37 до 0°С не приводит к лизису клеток.

По мере увеличения концентрации соли в среде наблюдается постепенное повышение уровня повреждения эритроцитов человека, достигающего максимального значения в среде, содержащей 1,2 М NaCl. Для клеток быка и кроля характерен рост гемолитического повреждения во всем исследуемом концентрационном диапазоне соли.

При исследовании влияния продо-

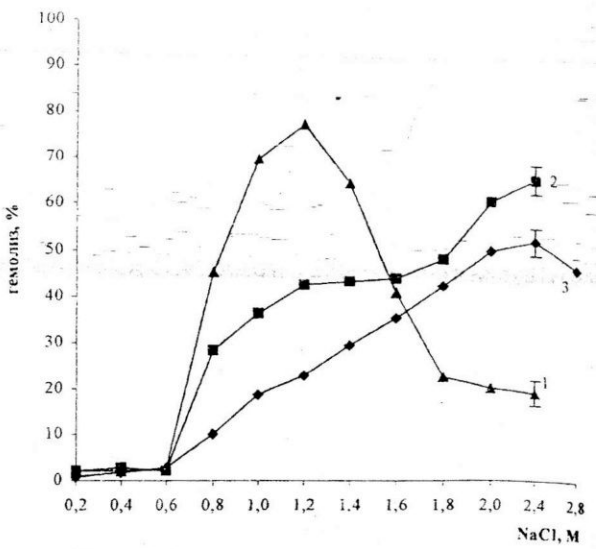

Рис.2 *Зависимость уровня гемолиза эритроцитов млекопитающих от концентрации NaCl при охлаждении клеток от 37° до 0°С: 1 – человек, 2 – бык, 3 – кроль.*

лжительности инкубации (от 1 до 12 мин) эритроцитов в среде, содержащей 1,2 М NaCl, при 37°С на гемолиз клеток при последующем их охлаждении до 0°С наблюдается снижение уровня повреждения эритроцитов человека и рост повреждения клеток животных, выраженный в разной степени (**рис.3**). Тот факт, что с увеличением продолжительности инкубирования эритроцитов человека в электролитной среде при 37°С наблюдается снижение гемолиза после



Рис.3 *Влияние продолжительности инкубации эритроцитов млекопитающих при 37°С в среде, содержащей 1,2 М NaCl, на гемолиз клеток при охлаждении до 0°С: 1 – человек, 2 – бык, 3 – кроль.*

ждения, позволяет допустить, что ом случае внеклеточные катионы входят в клетки, в результате чего ьшается концентрационный гради- на мембране к моменту охлаждения роцитов. Для эритроцитов быка роля зависимость гемолиза (при ждении от 37 до 0°С) от продолжи- ности инкубации клеток при 37°С еде, содержащей 1,2 М NaCl, имеет ем иной характер: наблюдается рез- увеличение степени повреждения со енем от 20 до 80 % (**рис.3**).

ри перенесении эритроцитов в ги- онические растворы наблюдает- массовый выход воды из клеток, приводит к уменьшению объема роцитов. На **рис.4** представлены льтаты по исследованию времен- зависимости изменения клеточ- объема в среде, содержащей 1,2 aCl, при 37°С. Следует отметить, эритроциты млекопитающих в анных условиях (1,2 М NaCl, 37°С) изируют (**рис.1**). Видно, что при 3 инкубации в гипертонической сре- ритроциты человека подвергаются ию в большей степени, чем клет- ыка и кроля (примерно на 15 %).

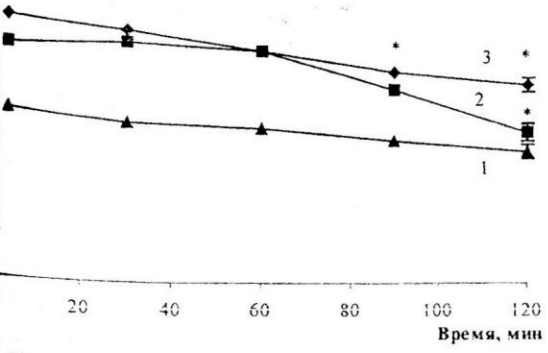

Рис.4 *Зависимость гематокрита от олжительности инкубации эритроцитов опитающих в среде, содержащей 1,2 М aCl, при 37°С: 1 – человек, 2 – бык, 3 – кроль.*

имечание: * – отличия достоверны ительно значений, полученных 3 мин инкубации эритроцитов 05).

При продолжительном инкубировании эритроцитов в указанных условиях до 120 мин не выявлено достоверных отличий в значениях гематокрита эритроцитов человека, в то время как для эритроцитов животных наблюдается снижение клеточного объема со временем примерно на 10 %. Таким образом, на этапе гипертонической инкубации, предшествующему охлаждению клеток быка и кроля до 0°С, снижение клеточного объема со временем сопровождается время-зависимым увеличением гемолитического повреждения эритроцитов этих видов животных при сдвиге температуры до 0°С.

В среде с большей концентрацией соли (2,2 М NaCl) (**рис.5**) увеличивается уровень начального повреждения эритроцитов быка и кроля. Если в данном случае наблюдается некоторое снижение уровня гемолиза при охлаждении эритроцитов быка со временем, то для эритроцитов кроля характер ранее наблюдаемых зависимостей (повышение уровня гемолиза со временем) (**рис.3**) в общих чертах сохраняется, но уровень повреждения выражен в большей степени.

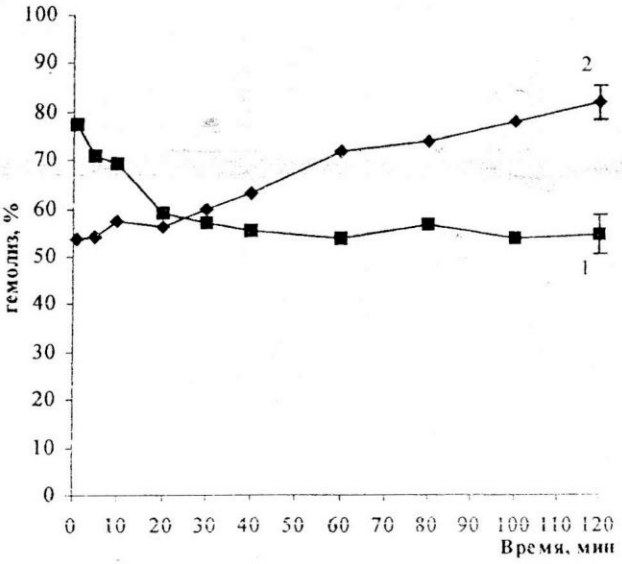

Рис.5 *Влияние продолжительности инкубации эритроцитов млекопитающих при 37°С в среде, содержащей 2,2 М NaCl, на гемолиз клеток при охлаждении до 0°С: 1 – бык, 2 – кроль.*

Эритроциты млекопитающих при охлаждении в изотонических средах (в

отличие от других клеток [1,6]) не лизируют [4]. Охлаждение же эритроцитов до 0°С в гипертонических средах сопровождается повреждением клеточных мембран и выходом молекул гемоглобина из клеток [4]. Некоторые авторы полагают [1], что развитие гемолиза эритроцитов при охлаждении связано с формированием в мембране микродефектов в областях, обедненных по холестерину (на этапе гипертонической инкубации при 37°С). Последующее охлаждение клеток будет приводить к эволюции этих дефектов до размера гемолитических пор. Исходя из того, что эритроцитарные мембраны быка содержат много холестерина и сфингомиелина [5,10], можно полагать, что выявленная устойчивость этих клеток к сочетанному действию охлаждения и гипертонии (**рис.2, 3**) может быть обусловлена способностью холестерина и сфингомиелина подавлять формирование структурных дефектов в эритроцитарных мембранах [8, 9].

В работе [7] было высказано предположение о том, что взаимодействия гемоглобина с эритроцитарной мембраной могут обусловливать функциональные свойства, в частности приводить к селективному увеличению проницаемости мембраны для ионов K^+. Для эритроцитов же кролля характерен гораздо более низкий уровень связывания гемоглобина с мембраной (на 65 % меньшее, чем для эритроцитов человека), что может лежать в основе функциональных особенностей эритроцитов кролля и обусловливать наблюдаемую устойчивость этих клеток к действию стрессовых факторов (гипертонические среды и гипертонические среды совместно с охлаждением клеток до 0°С).

Выводы. Эритроциты кролля более устойчивы к повреждающему действию гипертонических сред по сравнен с эритроцитами человека и быка. П охлаждении в гипертонических сред эритроциты животных (быка и кро проявляют большую устойчивость, ч клетки человека.

Перспективы дальнейших иссле ваний. Планируется исследовать менение внутриклеточного катионно состава эритроцитов разных видов м копитающих в условиях продолжите ного инкубирования клеток в гипер нических средах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРИ

1. Биохимия мембран / Под ред. Болдырева А.А.. З. / Белоус А. М., Гордиенко Е. А., Розанов Л. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. 1987.- 80 с.
2. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические осн низкотемпературного консервирования клеточ суспензий.- Киев: Наук. думка, 1994.- 141 с.
3. Денисова О Н. Криочувствительность эритроци различных видов млекопитающих: Автореф. ка дис. Харьков, 2006. 20 с.
4. Шпакова Н.М., Ершов С.С. Гипертоничес криогемолиз эритроцитов млекопитающих // Про криобиолсгии.- 2006.-Т.16, № 3.-С. 286-291.
5. Florin-Christensen J., Suarez C. E.., Florin-Christens M., Wainszelbaum M., Brown W., McElwain T. F., Pa er G. H. A unique phospholipids organization in bov erythrocyte membranes // Proc. Natl. Acad. Sci.- 200 V. 98.- P. 7736-7741.
6. Morris G. J., Watson P. F. Cold shock injury - a co prehensive bibliography // CryoLetters.- 1984.- V. 5.- 352-372.
7. Parker J.C., Orringer E.P., McManus, T.J. // Physiol of Membrane Disorders /Ed. by Andreoli T.E., Hoffma J.F., Fanestil D.D.. New York: Plenum Medical Boo 1978 P. 773-800.
8. Parrinello N., Cammarata M., Lipari L., Arizza V. Sph gomyelin inhibition of Ciona intestinalis (Tunicata) cy toxic hemocytes assayed against sheep erythrocytes Dev. Comp. Immunol.- 1995.- V. 19.- P. 31-41.
9. Shinozawa S, Araki Y, Utsumi K, Oda T. Stabilizing fects of cholesterol on changes in membrane permeab ity and potential induced in red blood cells by lysolecith // Physiol. Chem. Phys.- 1979.- V. 11.- P. 161-167.
10. Wessels J. M., Veerkamp J. H. Some aspects of t osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glyce ol permeability and lipid composition of red blood c membranes from eight mammalian species // Biochi Biophys. Acta.- 1973.- V. 291.- P. 190-196.

УДК 57.043:591.111.1

РЕАКЦІЯ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ, БИКА І КРОЛЯ НА ЗМІНУ ОСМОТИЧНИХ І ТЕМПЕРАТУРНИХ ПАРАМЕТРІВ СЕРЕДОВИЩА

Шпакова Н.М., Єршов С.С., Орлова Н.В.

Резюме. Проведено порівняльне вивчення чутливості еритроцитів кроля, бика та людини до змін осмотичного та температурного факторів середовища. Встановлено, що до дії висококонцентрованих сольових середовищ (2,4 – 4,0 М NaCl) найбільшу стійкість мають еритроцити кроля. В умовах спільної дії охолодження (від 37 до 0°С) і гіпертонічних середовищ еритроцити тварин пошкоджуються менше, ніж еритроцити людини.

Ключові слова: гіпертонічні середовища, охолодження, еритроцити людини, кроля й бика, об'єм еритроцитів.

UDC 57.043:591.111.1

REACTION OF HUMAN, BOVINE AND RABBIT ERYTHROCYTES ON CHANGE IN OSMOTIC AND TEMPERATURE PARAMETERS OF MEDIUM

Shpakova N.M., Ershov S.S., Orlova N.V.

Summary. Sensitivity of rabbit, bovine and human erythrocytes to the change of environmental osmotic and temperature factors was comparatively studied. It has been established that the highest resistance to the effect of highly concentrated salt media (2,4-4,0 M NaCl) was manifested by rabbit erythrocytes. Under conditions of combined effect of cooling (from 37 down to 0°C) and hypertonic media the animal erythrocytes are less damaged if compared with human ones.

Key words: hypertonic media, cooling, human, rabbit and bovine erythrocytes, erythrocyte volume.

Стаття надійшла 12.11.2007 р.