ISSN 1681-0015

БІОЛОГІЯ ТВАРИН
THE ANIMAL BIOLOGY



2007 Том 9 №1-2

ISSN 1681-0015

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

БІОЛОГІЯ ТВАРИН

(науково-теоретичний журнал)

Том 9 1 – 2

Львів — 2007

УДК 57.043:591.111.1

КОРЕКЦІЯ ГІПЕРТОНІЧНОГО КРІОГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ І БИКА ЗА ДОПОМОГОЮ АНІОННИХ АМФІФІЛЬНИХ СПОЛУК

Н. М. Шпакова[1], *Н. А. Писаренко*[2], *Н. В. Орлова*[1], *В. М. Хмельков*[3]

[1]Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків
[2]Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна
[3]Інститут тваринництва УААН, Харків

Дослідження ефективності алкілсульфатів з різною довжиною алкільного ланцюга при гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів людини і бика показало вищу антигемолітичну активність коротколанцюгового гомолога децилсульфата натрію в порівнянні з довголанцюговим додецилсульфатом натрію. Як децил-, так і додецилсульфат натрію проявляють значний захисний ефект при гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів бика.

Ключові слова: ЕРИТРОЦИТИ ЛЮДИНИ І БИКА, ГІПЕРТОНІЧНИЙ КРІОГЕМОЛІЗ, ДЕЦИЛ- І ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТ НАТРІЮ.

Еритроцити ссавців пошкоджуються при охолоджуванні їх за температури від 37 до 0 °С у гіпертонічному середовищі [1], що дістало назву гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів. Наявні в літературі дані свідчать, що еритроцити різних видів ссавців значно відрізняються за чутливістю до гіпертонічного кріогемолізу. Наприклад, еритроцити бика стійкіші до охолоджування у гіпертонічному середовищі в порівнянні з еритроцитами людини [1]. Показано, що використання амфіфільних сполук дозволяє знизити рівень пошкодження клітин у стресових умовах [2]. При гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів людини катіонні і неіонні амфіфільні сполуки зменшують пошкодження клітин [3, 4], тоді як дія аніонних амфіфілів у цих умовах не вивчена.

Відомо, що еритроцити людини і бика відрізняються між собою не тільки чутливістю до гіпертонічного кріогемолізу, але і ліпідним складом їх плазматичних мембран [5, 6]. У зв'язку з цим науково-практичний інтерес становить порівняльне дослідження впливу аніонних амфіфільних сполук на еритроцити людини і бика в умовах гіпертонічного кріогемолізу. Метою даної роботи було дослідження впливу аніонних амфіфільних сполук (децил- і додецилсульфат натрію) на чутливість еритроцитів людини і бика до охолодження при температурі від 37 до 0 °С у гіпертонічному середовищі.

Матеріали і методи

Еритроцити одержували з крові бика і людини, до якої додавали глюгіцировий консервант. Усі використані середовища готували на 0,01 М фосфатному буфері, pH 7,4.

Концентрацію розчинів контролювали вимірюванням осмолярності на осмометрі ОМКА 1Ц–01. Гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів викликали шляхом перенесення їх у гіпертонічний розчин (1,2 або 2,1 М NaCl) та інкубували при температурі 37 °С протягом 10 хв, потім переносили аліквоту в розчин NaCl (без зміни тонічності середовища), охолоджений до температури 0 °С, на 10 хв. Алкілсульфати з різною довжиною алкільного ланцюга — децил-(С10) і додецилсульфат натрію (С12) — додавали до середовища, що мало температуру 0 °С, перед внесенням еритроцитів. Кінцевий гематокрит — 0,4 %.

Кількість гемоглобіну в супернатанті визначали спектрофотометрично ($\lambda = 543$ нм) і виражали у відсотках порівняно до 100 % гемолізу еритроцитів у присутності детергенту тритон Х–100 (0,1 %). На кожному рисунку подано значення максимального відхилення величини гемолізу еритроцитів із кількох серій (n = 6) одного експерименту у вигляді крапки з розкидом значень.

Значення максимальної антигемолітичної активності (АГ) амфіфільної сполуки розраховували за формулою:

$$АГ = \frac{к - а}{к} \times 100\%$$, де

к — величина гемолізу еритроцитів у відсутності амфіфільної речовини;

а — мінімальна величина гемолізу еритроцитів при наявності амфіфільної речовини.

У роботі використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «хч» і «чда».

Результати й обговорення

Проведене нами раніше порівняльне вивчення гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів людини і бика, дозволило виявити принципові відмінності між ними [1]. Тоді, як для еритроцитів людини характерна немонотонна залежність кріогемолізу від тонічності середовища з максимально вираженим пошкодженням у розчині, що містить 1,2 М NaCl, то кріогемоліз еритроцитів бика лінійно залежав від вмісту солі в середовищі. Тому для дослідження впливу алкілсульфатів на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів людини і бика були вибрані середовища, що містять 1,2 М і 2,1 М NaCl, в яких був відсутній лізис при 37 °С, але був достатньо високий рівень гемолізу при охолоджуванні до 0 °С.

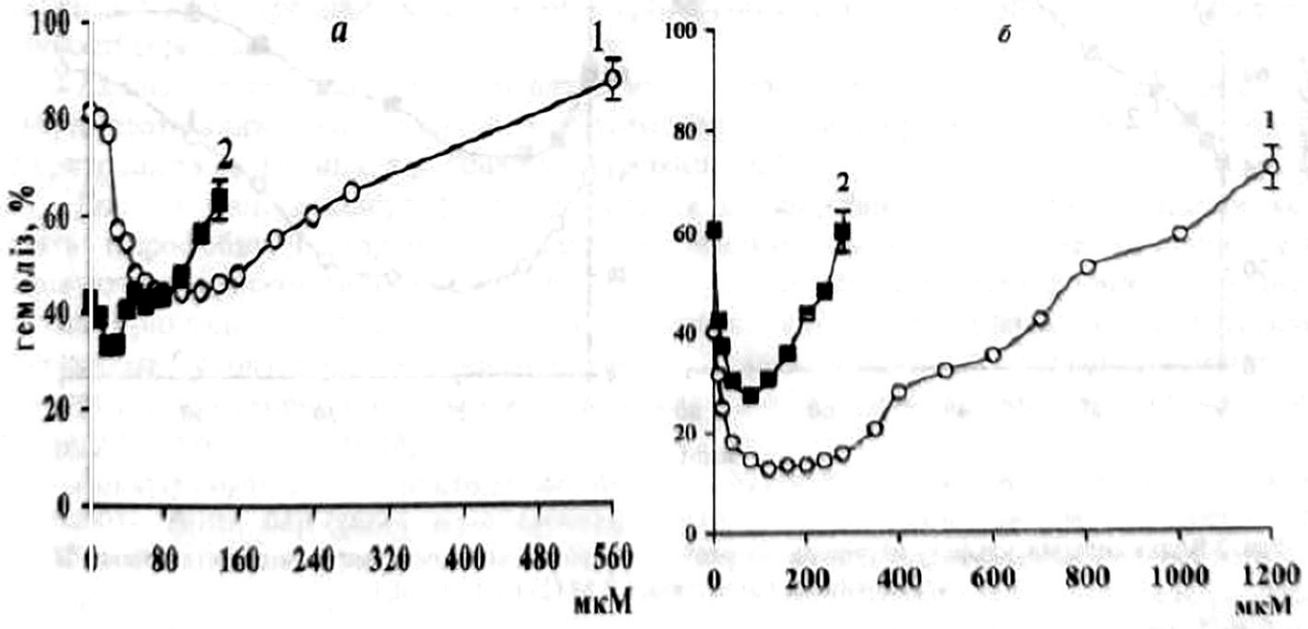


Рис. 1 Вплив децилсульфату натрію на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів людини (а) і бика (б) у середовищах, що містять 1,2 М (1) і 2,1 М NaCl (2)

На рис. 1 представлені криві залежності гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів людини і бика від концентрації С10. У середовищі, що містить 1,2 М NaCl (рис. 1а), початковий рівень пошкодження еритроцитів людини при охолоджуванні від 37 до 0 °С достатньо високий і складає приблизно 80 %, тоді як в середовищі, що містить 2,1 М NaCl, рівень кріогемолізу становить 40 %. Початковий рівень пошкодження еритроцитів бика (рис. 1б) в середовищах, що містять 1,2 М і 2,1 М NaCl, складає відповідно 40 і 60 %. Виходячи з того, що амфіфільні сполуки захищають клітини у момент дії стресового фактору [3], алкілсульфати додавали у гіпертонічне середовище, що мало температуру 0 °С, ще перед внесенням клітин.

Криві гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів обох видів (рис. 1) показують, що додавання у середовище інкубації С10 дозволяє знизити рівень пошкодження еритроцитів. Слід зазначити, що залежності, які представлені, мають характерні особливості: із збільшенням концентрації амфіфільної речовини відбувається поступове зниження рівня пошкодження клітин, потім значення гемолізу суттєво не змінюються (криві виходять на плато), і далі спостерігається зростання гемолізу клітин до значень, що перевищують початкове пошкодження еритроцитів у відсутності амфіфільної речовини.

При порівнянні кривих 1 і 2 (рис. 1) видно, що С10 більше знижує рівень гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів обох видів у середовищі, що містить 1,2 М NaCl, ніж у середовищі 2,1 М NaCl. Крім того, діапазон ефективних концентрацій речовини є ширшим (протяжність плато більша) у середовищах з меншою тонічністю. У середовищі, що містить 2,1 М NaCl, діапазон ефективних концентрацій С10 вузький і зміщений у бік менших значень і, отже, невеликі концентрації амфіфільної речовини потрібні для прояву її літичної дії (рис. 1).

При порівнянні еритроцитів людини і бика встановлено, що С 10 є ефективнішим щодо клітин бика; це виявляється у вираженому зниженні рівня гіпертонічного кріогемолізу і ширшому плато.

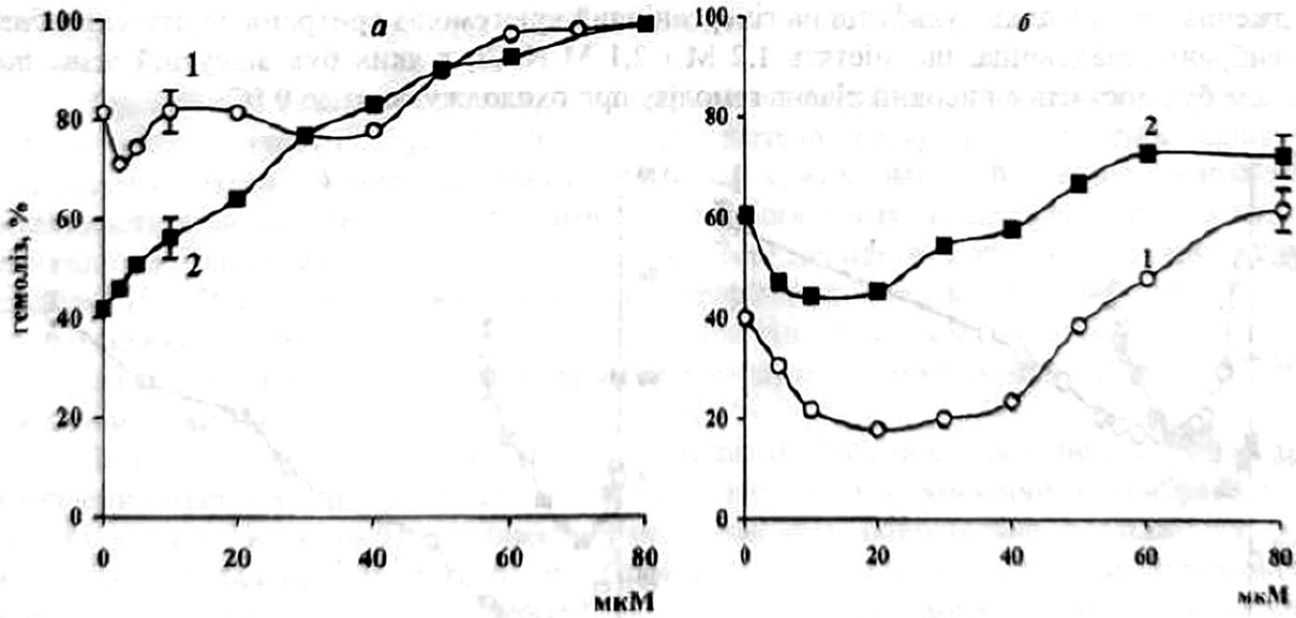


Рис. 2 Вплив додецилсульфату натрію на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів людини (а) і бика (б) у середовищах, що містять 1,2 М (1) і 2,1 М NaCl

На рис. 2 представлені залежності гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів людини і бика від концентрації С12 у гіпертонічних середовищах. По відношенню до еритроцитів людини (рис. 2а) С12 проявляє захисний ефект тільки при гіпертонічному кріогемолізі

клітин, проінкубованих в 1,2 М NaCl, причому як ступінь протекції, так і діапазон ефективних концентрацій є невеликими. При гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів бика (рис. 2б) С12 знижує рівень пошкодження в обох сольових середовищах. Профілі кривих 1 і 2 в даному випадку досить подібні, тільки дещо зміщені відносно один одного. Захисний ефект С 12 більше виражений у середовищі, що містить 1,2 М NaCl.

Для того, щоб оцінити і порівняти ефективність дії досліджуваних амфіфільних сполук, ми використали одержані залежності концентрацій (рис. 1 і 2) і розрахували значення максимальної антигемолітичної активності (табл. 1). З наведених у таблиці даних видно, що алкілсульфати, які використані у роботі, ефективніші при гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів бика, причому в обох середовищах.

Таблиця 1

Значення максимальної антигемолітичної активності аніонних амфіфільних сполук при гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів людини і бика (M±m, n = 6)

Еритроцити	Максимальна антигемолітична активність, %			
	C10		C12	
	NaCl, M		NaCl, M	
	1,2	2,1	1,2	2,1
Людини	46 ± 3	21 ± 6	12 ± 7	-
Бика	68 ± 8	54 ± 4	55 ± 8	27 ± 8

Максимальна антигемолітична активність С10 вища у середовищі, що містить 1,2 М NaCl, в порівнянні з 2,1 М NaCl для еритроцитів обох видів. При підвищенні тонічності середовища антигемолітична активність С10 для еритроцитів людини знижується приблизно в 2 рази, а для клітин бика — на 15 %.

С12 також проявляє значну антигемолітичну активність при гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів бика. При цьому ефективність впливу речовини також знижується із збільшенням тонічності середовища. Щодо еритроцитів людини, то антигемолітична активність С12 у середовищі, що містить 1,2 М NaCl, є низькою і зникає при підвищенні тонічності середовища.

Аналіз значень максимальної антигемолітичної активності досліджуваних речовин і розмірів плато кривих гіпертонічного кріогемолізу свідчить про те, що С10 є ефективніша для еритроцитів як людини, так і бика в порівнянні з С12.

Досліджувані алкілсульфати відносяться до амфіфільних сполук, молекули яких містять гідрофобну і гідрофільну частини. Завдяки цьому, молекули речовин легко вбудовуються в плазматичну мембрану, що супроводжується зміною форми еритроцитів. Так, на прикладі еритроцитів людини, показано, що алкілсульфати, які є негативно зарядженими сполуками, викликають зміну форми клітин за типом дискоцит — ехиноцит [7], що свідчить про переважну локалізацію їх молекул у зовнішньому моношарі ліпідного біпару мембрани [8].

Алкілсульфати, що досліджували, при використанні в ефективних концентраціях, не викликають зміни бар'єрних властивостей еритроцитарних мембран по відношенню до іонів K^+ у фізіологічних умовах [9]. В умовах гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів при температурі 37 °С спостерігається вихід внутрішньоклітинних іонів K^+, який супроводжується гемолізом клітин при подальшому їх охолоджуванні до 0 °С [10]. Той факт, що алкілсульфати проявляють антигемолітичну активність при гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів, дозволяє говорити про здатність цих речовин запобігати розвитку мембранних

мікродефектів, що виникли при температурі 37 °С, до розміру гемолітичних пор на етапі охолоджування клітин.

Представлені у статті дані свідчать про те, що при збільшенні концентрації солі у середовищі інкубації (хоча початковий рівень гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів бика зростає, а клітин людини навпаки — знижується) спостерігається зменшення ефективності алкілсульфатів по відношенню до клітин як людини, так і бика.

Односпрямованість виявлених закономірностей (зниження антигемолітичної активності речовин з підвищенням тонічності середовища) при гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів як людини, так і бика, дозволяє говорити про приховані пошкодження, що накопичуються у мембрані при збільшенні сили стресового чинника. Підвищення рівня гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів, що виявляється у відсутності амфіфільних сполук, не відображає ультраструктурних змін, які зазнає мембрана при дії гіпертонічного середовища під час охолоджування.

Висновки

1. Аніонні алкілсульфати знижують рівень гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів як людини, так і бика.

2. Антигемолітична активність цих речовин вища у середовищі, що містить 1,2 M NaCl, ніж 2,1 M NaCl.

3. На відміну від додецилсульфату натрію, децилсульфат натрію є більш ефективним антигемолітичним чинником при гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів людини і бика.

4. Алкілсульфати значно більше запобігають розвитку гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів бика, ніж людини.

N. M. Shpakova, N. A. Pisarenko, N. V. Orlova, V. N. Khmelkov

CORRECTION OF HYPERTONIC CRYOHEMOLYSIS OF HUMAN AND BOVINE ERYTHROCYTES USING ANION AMPHIPHILIC COMPOUNDS

Summary

Studying of the efficiency of alkylsulphates with different length of alkyl chain under hypertonic cryohemolysis of human and bovine erythrocytes has shown higher anti-hemolytic activity of short-chain homologue sodium decylsulphate in comparison with long-chain sodium dodecylsulphate.

Both sodium decyl- and dodecylsulphates demonstrate more protective effect during hypertonic cryohemolysis of bovine erythrocytes.

Obtained research data testify to the fact that with a rise in salt concentration in incubation medium (though initial level of hypertonic cryohemolysis of bovine erythrocytes increases and for human cells it reduces), a decrease in efficiency of alkylsulphates for erythrocytes of both types is observed.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

V. N. Karazin's Kharkov National University

Institute of Animal Breeding of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov

1. *Єршов С. С., Орлова Н. В., Шпакова Н. М.* Порівняльний аналіз гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів різних видів тварин при зміні осмотичних і температурних умов середовища // Біологія тварин. — 2006. — Т.8, № 1–2. — С. 123–129.

2. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem. — Biol. Inter. — 1991. — V.79. — P. 335–347.

3. *Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А.* Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия. — 1995. — Т. 60, № 10. — С. 1624–1631

4. *Шпакова Н. М. Панталер Е. Р., Орлова Н. В.* Влияние додецил-β,D-мальтозида на устойчивость предварительно дегидратированных эритроцитов к гиперосмотическому и холодовому шоку // Пробл. криобиологии. — 1999. — № 3. — С. 10–15.

5. *Wessels J. M., Veerkamp J. H.* 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 // Biochim. Biophys. Acta. — 1973. — V. 291. — P. 190–196.

6. A unique phospholipids organization in bovine erythrocyte membranes / Florin-Christensen J., Suarez C. E. et all // Proc. Natl. Acad. Oci. — 2001. — V. 98. — P. 7736–7741.

7. *Hagerstrand H., Agli A., Kralj-Igli V.* Amphiphile induced echinocyte-spheroechinocyte transformation of red blood cell shape // Eur. Biophys. J .— 1998. — V. 27, № 4. — P. 335–339.

8. *Sheetz M. P., Singer S. J.* Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions // Proc. Nat. Acad. Sci. — 1974. — V. 71. — P. 4457–4461.

9. *Орлова Н. В Шпакова Н. М.* Влияние температуры на проявление антигемолитической активности амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов // Сб.: Актуальные проблемы медицины и биологии. — 2004. — № 1. — С.181–184.

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