ISSN 1681-0015

БІОЛОГІЯ ТВАРИН
THE ANIMAL BIOLOGY



2008 Том 10 №1-2

ISSN 1681-0015

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

БІОЛОГІЯ ТВАРИН

(науково-теоретичний журнал)

Том 10 1 – 2

Львів — 2008

УДК: 591.111.3:547.556.8

ВПЛИВ ФЕНІЛГІДРАЗИНУ НА ГІПЕРТОНІЧНУ ЧУТЛИВІСТЬ ПОПЕРЕДНЬО ЗНЕВОДНЕНИХ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ

Н. М. Шпакова, Д. І. Александрова, О. О. Олійник, В. А. Бондаренко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

У статті представлено результати досліджень щодо впливу фенілгідразину як модифікатора цитоскелета на гіпертонічну чутливість попередньо зневоднених еритроцитів ссавців. Було показано, що клітини людини і коня максимально стійкі до гіпертонічного шоку у 4,0 М NaCl після преінкубації у розчині, що містить 0,4 М NaCl, еритроцити щура — 0,3 М, бика — 1,0 М., тоді як формування метастабільного стану еритроцитів людини, щура і коня спостерігається при інкубації у середовищі, що містить 0,6 М NaCl, і еритроцитів бика — у 2,0 М NaCl. Поєднана дія ФГ і середовища зневоднення супроводжується збільшенням рівня і відносної швидкості гіпертонічного гемолізу еритроцитів тварин.

Ключові слова: ЕРИТРОЦИТИ ЛЮДИНИ, БИКА, ЩУРА, ГІПЕРТОНІЧНИЙ ГЕМОЛІЗ, КОНЯ, ФЕНІЛГІДРАЗИН, ЦИТОСКЕЛЕТ-МЕМБРАННИЙ КОМПЛЕКС, ЗНЕВОДНЕННЯ,.

При низькотемпературній консервації клітинних суспензій на клітини діє цілий ряд несприятливих чинників. До них відносяться високі концентрації солей, зміна температури, pH та ін. [2, 3]. У даний час вважають, що гіпертонічний стрес є одним з основних чинників кріопопошкодження [2]. Тому, перенесення еритроцитів у висококонцентровані сольові розчини при позитивних температурах використовують для моделювання ситуації, що має місце при заморожуванні, і пошуку способів запобігання пошкодженню клітин [2]. Розроблено ряд підходів, що дозволяють понизити чутливість еритроцитів людини до ушкоджувальних чинників кріоконсервування. Зокрема, показано, що попередня інкубація еритроцитів людини в середовищах, що містять NaCl у концентрації 0,4–0,5 М, дозволяє знизити рівень гемолізу еритроцитів у середовищі, що містить 4,0 М NaCl, в 2 рази [4]. Вважають, що в цьому випадку відбувається вихід з еритроцитів незв'язаної води, концентрація внутріклітинного вмісту, що призводить до модифікації цитоскелет-мембранного комплексу, і, як результат, формування стабільного стану клітини. Еритроцити ссавців, що характеризуються загальними рисами функціонування і будови, у той же час мають і видові відмінності як у складі плазматичних мембран, так цитоскелета [10].

У зв'язку з вищевикладеним представляло інтерес дослідити вплив модифікатора цитоскелет-мембранного комплексу фенілгідразину і середовищ зневоднення на чутливість еритроцитів різних видів ссавців (людина, кінь, бик, щур) до дії гіпертонічного шоку (4,0 М NaCl).

Матеріали і методи

Еритроцити одержували з донорської крові людини, бика, щура, коня, що була заготовлена на глюгіцировому консерванті. Після видалення плазми еритромассу двічі відмивали шляхом центрифугування при 1500 g протягом 3 хв у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатний буфер, pH 7,4) і зберігали у вигляді

щільного осаду не більше двох годин при температурі 0 °С. Все використовувані в роботі середовища готували на 0,01 М фосфатному буфері, pH 7,4.

Концентрацію розчинів контролювали вимірюванням осмолярності на осмометрі ОМКА 1Ц-01 (Україна).

Клітини інкубували у помірно гіпертонічних розчинах NaCl протягом 2 хв., після чого їх піддавали дії гіпертонічного стресу шляхом перенесення у розчин, що містить 4,0 М NaCl (гематокріт 0,4 %), на 5 хв. при температурі 25 °С. Кількість гемоглобіну у супернатанті визначали гемоглобінціанідним методом [5] і виражали у відсотках по відношенню до 100 % гемолізу еритроцитів.

Реєстрацію динаміки гіпертонічного гемолізу еритроцитів проводили на установці для вимірювання світлорозсіювання клітинних суспензій. Швидкість гемолізу еритроцитів визначали як тангенс кута нахилу дотичної, проведеної до кінетичної кривої зміни оптичної щільності суспензії еритроцитів, що були поміщені у висококонцентровані сольові середовища.

Модифікацію цитоскелета еритроцитів свіжоприготованим розчином фенілгідразину (ФГ) у кінцевій концентрації 1 мМ здійснювали за методом [6]. Клітини в умовах постійного перемішування (гематокріт 5 %) інкубували у фізіологічному розчині (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатний буфер, pH 7,4) при температурі 37 °С протягом 10 хв. У кінці періоду інкубації еритроцити двічі відмивали фізіологічним розчином і використовували у подальшій роботі.

У роботі були використані фенілгідразин фірми «Sigma» і реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації "х.ч." і "ч.д.а.".

Дослідження проводили на крові 6 донорів.

Статистичну оцінку даних проводили по критеріях Mann-Whitney і ANOVA. Відмінності між групами вважали статистично достовірними при $P < 0,05$.

Результати та обговорення

На рисунку 1 представлені дані про рівень (а) і швидкість (б) гіпертонічного гемолізу нативних еритроцитів людини, бика, щура і коня. Видно, що максимальне пошкодження клітин характерне для еритроцитів людини, мінімальне — для клітин коня (рис.1 а).

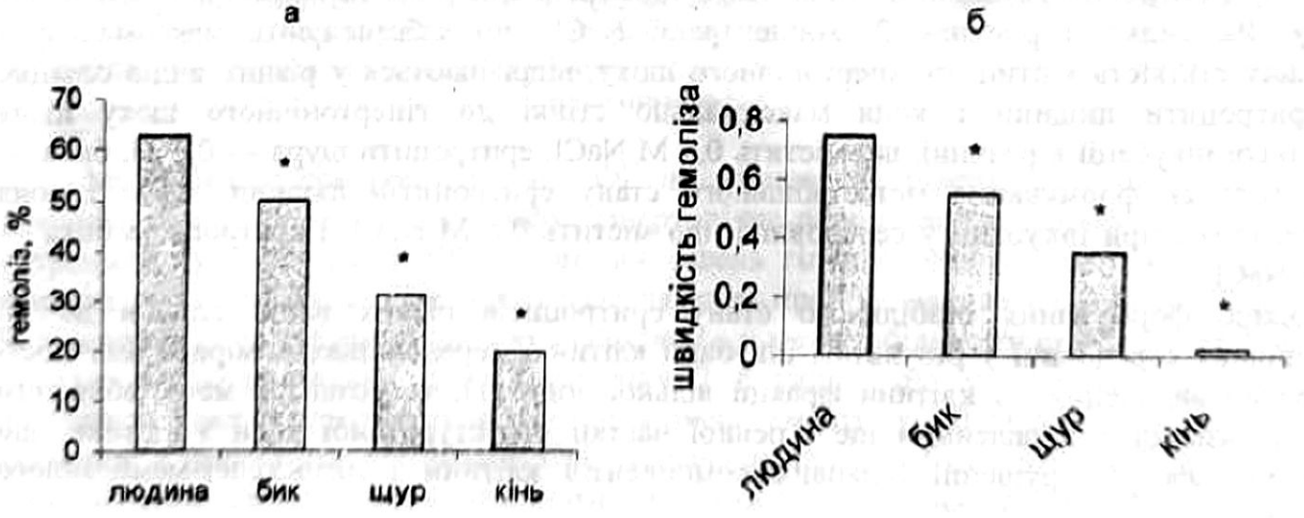

Рис. 1 Рівень (а) і швидкість (б) гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців в середовищі, що містить 4,0 М NaCl (25 С). * — порівняно з еритроцитами людини, P<0,05

Швидкість гіпертонічного гемолізу еритроцитів коня приблизно в 30 разів нижче у порівнянні з еритроцитами людини (рис.1 б). По мірі зниження, як рівня гемолізу

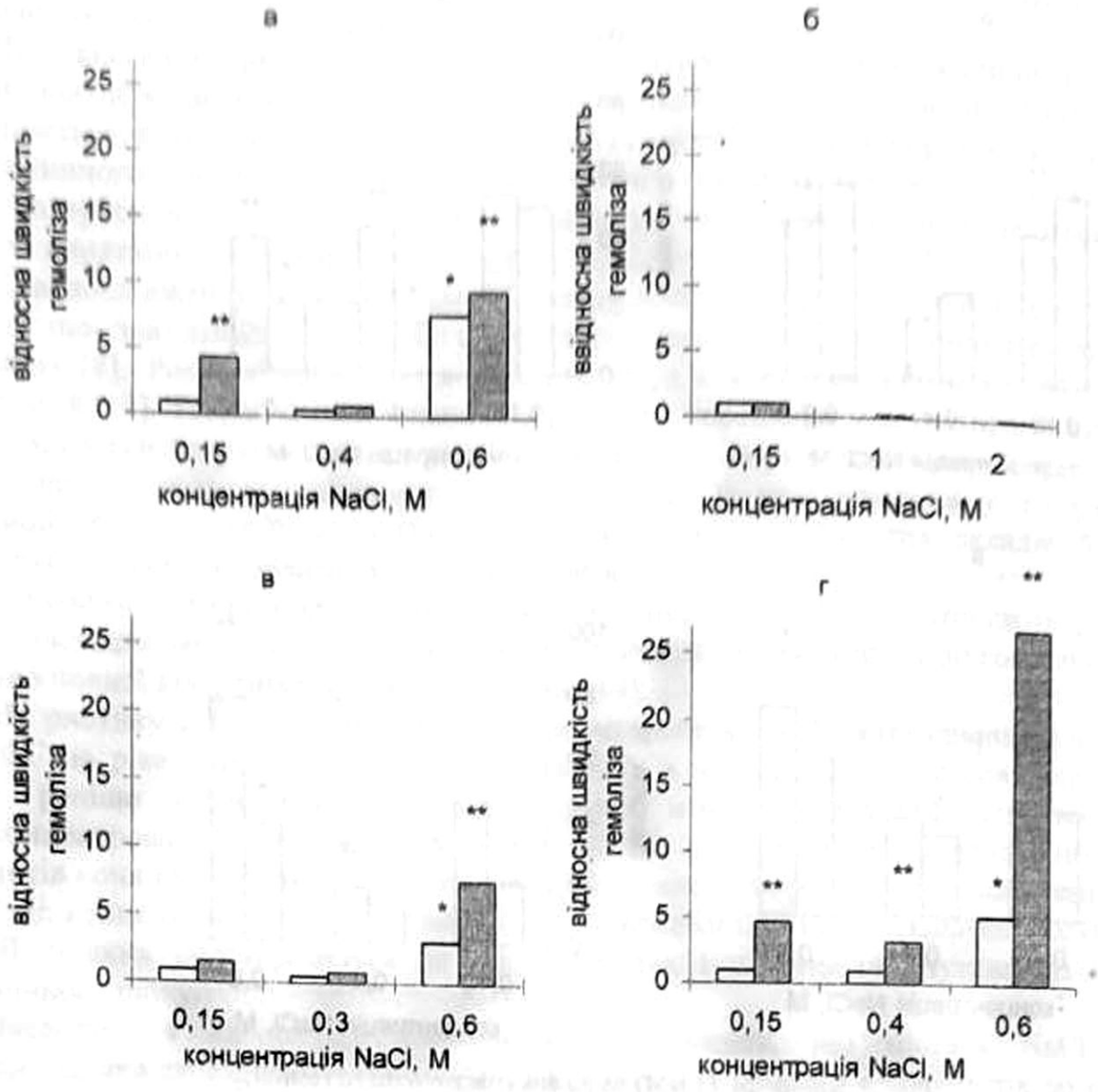

Рис. 3 Вплив ФГ (1 мМ) і попереднього зневоднення на відносну швидкість гемолізу еритроцитів людини (а), бика (б), щура (в), коня (г) в 4,0 М NaCl (25 С):): ☐ — контроль, ▒ — ФГ. * — порівняно з не модифікованими еритроцитами, що були перенесені з фізіологічного розчину, $P<0,05$; ** - порівняно з немодифікованими еритроцитами, перенесених з розчинів, що мають однакову концентрацію NaCl, $P<0,05$.

Для зручності викладу результатів швидкості гіпертонічного лізису зневоднених і модифікованих ФГ еритроцитів представлені у відносних одиницях, тобто нормовані на швидкість гіпертонічного лізису нативних клітин.

З рисунку 3 видно, що інкубація еритроцитів різних видів ссавців у середовищах попередньої інкубації, що призводить до формування стабільного стану (рис. 2), не викликає зміну відносної швидкості гіпертонічного гемолізу. У разі метастабільних клітин спостерігається достовірне зростання відносної швидкості гіпертонічного гемолізу еритроцитів всіх ссавців, за винятком клітин бика. Звертає на себе увагу особлива поведінка еритроцитів людини, для яких не спостерігається кореляції між рівнем гіпертонічного гемолізу нестабільних клітин і його швидкістю.

Модифікація еритроцитів людини і коня ФГ викликає достовірне збільшення відносної швидкості гіпертонічного гемолізу клітин, які були перенесені в 4,0 М NaCl з 0,15 М NaCl. Поєднана дія ФГ і середовища зневоднення, що призводить до формування метастабільного стану клітин, супроводжується зростанням відносної швидкості гіпертонічного гемолізу, особливо вираженим для еритроцитів коня.

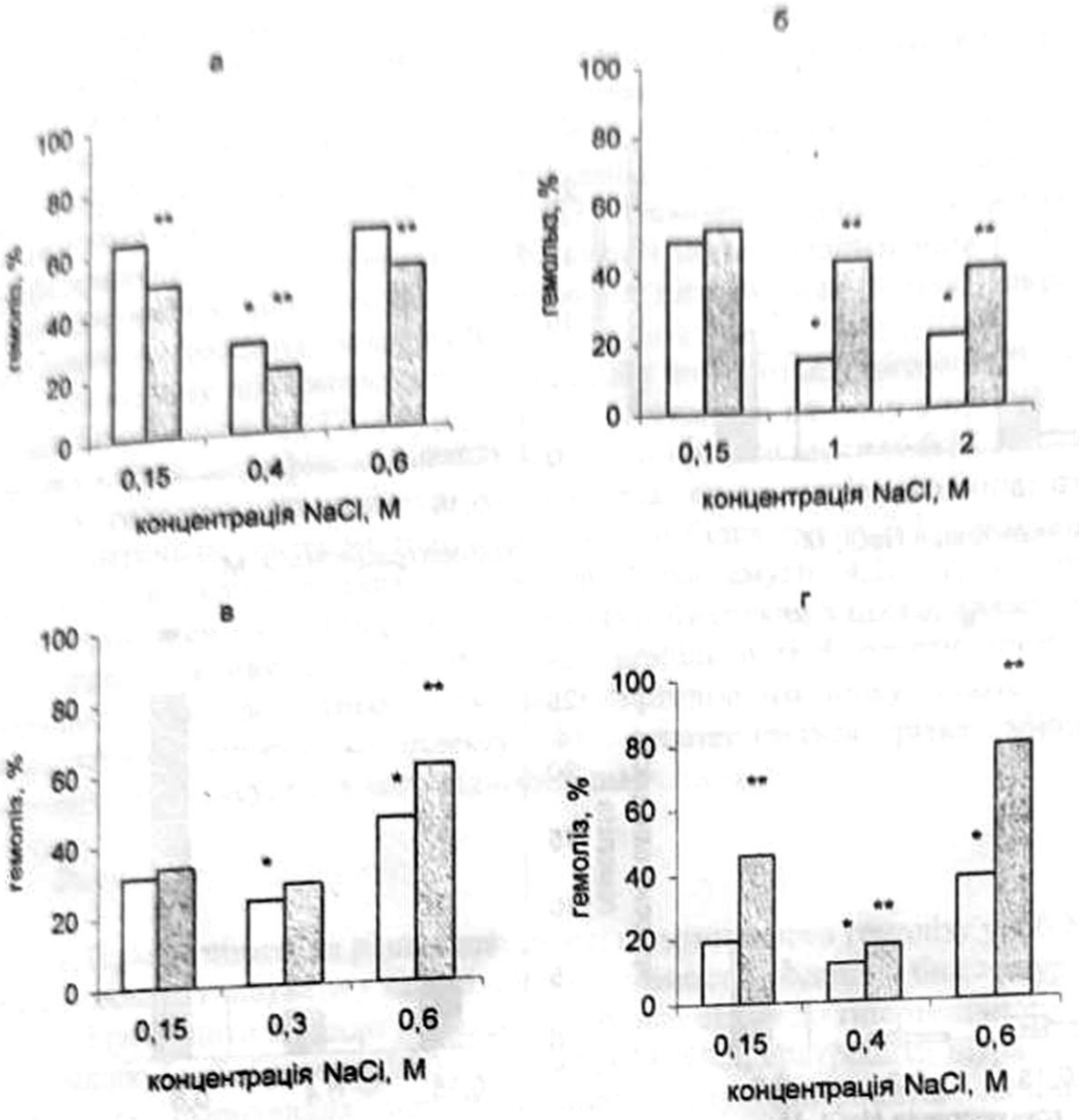

Рис. 2. Вплив ФГ (1 мМ) на рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини (а), бика (б), щура (в), коня (г) в 4,0 М NaCl після попередньої інкубації у середовищах з різною концентрацією NaCl (25 С): ☐ - контроль, ▨ - ФГ. * — порівняно з немодифікованими еритроцитами, що були перенесені з фізіологічного розчину, $P<0,05$; ** — порівняно з немодифікованими еритроцитами, перенесених з розчинів, що мають однакову концентрацію NaCl, $P<0,05$

Модифікація еритроцитів бика ФГ не впливає на рівень гіпертонічного гемолізу контрольних клітин і значно підвищує гіпертонічне пошкодження заздалегідь зневоднених еритроцитів (у 2–2,5 раза). ФГ не змінює рівень гіпертонічного лізису клітин щура, як нативних, так і стабільних еритроцитів (заздалегідь проінкубованих в 0,3 М NaCl) (рис. 2 в). По відношенню до клітин щура, що знаходяться у метастабільному стані (0,6 М NaCl), ФГ проявляє пошкоджувальну дію. З рисунку 2 г видно, що у разі модифікованих ФГ еритроцитів коня спостерігається зростання рівня гемолізу у 4,0 М NaCl у всіх випадках у порівнянні з нативними клітинами. Слід зазначити, що обробка клітин ФГ призводить до зростання рівня гемолізу нативних клітин, а також зневоднених еритроцитів в 0,6 М NaCl приблизно в 2 рази у порівнянні з контролем. У той же час рівень гемолізу модифікованих ФГ і зневоднених клітин у 0,4 М NaCl значною мірою не відрізняється від контролю.

На рисунку 3. представлені результати дослідження швидкості розвитку гемолітичного пошкодження еритроцитів різних видів ссавців після інкубації в середовищах, в яких спостерігається формування як стійкого, так і нестійкого стану клітин до дії 4,0 М NaCl, а також при модифікації клітин ФГ.

еритроцитів, так і його швидкості, еритроцити ссавців можна розташувати в послідовності: людина > бик > щур > кінь.

При внесенні еритроцитів у висококонцентровані сольові розчини ви швидкий відтік води з клітини, що супроводжується різкою зміною її об'єму спостерігається витік катіонів і вихід молекул гемоглобіну. При порівняльному внутріклітинного складу еритроцитів 40 видів ссавців Bogner та співавт. [10] показ змістом внутріклітинної води еритроцити ссавців значною мірою не відрізняються одного, за винятком клітин верблюда.

При дослідженні початку розвитку гіпертонічного лізису еритроцитів ссав показано, що для лізису невеликих еритроцитів необхідні більш концентрован середовища [8]. Розміри еритроцитів людини, щура і коня складають 87, 54, і відповідно [8, 18]. Таким чином, можна говорити про кореляцію між розмірами цих отриманими нами результатами по рівню і швидкості гіпертонічного гемолізу ерит ссавців (рис. 1): чим крупніша клітина, тим вище її пошкодження у гіпертон середовищі. З цього ряду випадають еритроцити бика, об'єм яких складає 5 мк Еритроцити бика відрізняються від решти видів еритроцитів як домін внутріклітинним катіоном (вони відносяться до високонатрієвих еритроцитів [16]) ліпідним складом мембран — для них характерний високий вміст сфінгомієліна н практично повної відсутності фосфатіділхоліна [14].

На рисунку 2 представлені дані про вплив попереднього зневоднення і модиф клітин ФГ на рівень гемолізу еритроцитів ссавців в 4,0 М NaCl. Для еритроцитів Є людини раніше було показано, що клітини можуть набувати стійкості до висококонцентрованих сольових розчинів після попереднього зневоднення [1]. еритроцитів коня і щура також були отримані залежності рівня гіпертонічного гемолізу М NaCl від концентрації солі у середовищі на попередньому етапі і визначені розчини, п інкубації, в яких спостерігається як зниження, так і підвищення чутливості клітин гіпертонічного шоку.

Зневоднення клітин здійснювали у середовищах, що містять NaCl у та концентрації, яка забезпечує максимальну і мінімальну стійкість еритроцитів до подальш дії 4,0 М NaCl (тобто призводить до формування стабільного і метастабільного ста клітин) [4]. Контролем служили клітини, що були перенесені у 4,0 М NaCl з фізіологічно розчину. Як видно з рисунку 2, концентрації NaCl, що забезпечують максимальну мінімальну стійкість клітин до гіпертонічного шоку, відрізняються у різних видів ссавців Так, еритроцити людини і коня максимально стійкі до гіпертонічного шоку після попередньої інкубації в розчині, що містить 0,4 М NaCl, еритроцити щура — 0,3 М, бика — 1,0 М., тоді як формування метастабільного стану еритроцитів людини, щура і коня спостерігається при інкубації у середовищі, що містить 0,6 М NaCl, і еритроцитів бика — у 2,0 М NaCl.

Якщо формування стабільного стану еритроцитів різних видів ссавців до дії гіпертонічних середовищ у результаті інкубації клітин у середовищах помірної тонічності обумовлено видаленням з клітини фракції вільної води [1], то розвиток метастабільного стану пов'язаний з видаленням ще і певної частки структурованої води з клітини, що виявлятиметься у порушенні білкових компонентів клітини і цитоскелет-мембранного комплексу.

Стан еритроцитарної мембрани обумовлює характер відповіді клітини на стресові дії. ФГ руйнує спектрін без утворення високомолекулярних агрегатів [6]. Використання даного модифікатора дозволяє досліджувати особливості поведінки клітин із зміненим цитоскелетом в умовах висококонцентрованих сольових середовищ.

Обробка еритроцитів людини ФГ призводить до зниження рівня гіпертонічного

Відомо, що основною мішенню дії ФГ є білкові компоненти еритроцитів. Втрата фосфоліпідної асиметрії в мембранах еритроцитів людини під дією ФГ не спостерігається, на відміну від клітин хворих з природженою патологією [13]. Обробка еритроцитів ФГ призводить до модифікації як мембранних (спектрін, білок смуги 3), так і цитозольних білків [20]. У роботі показано, що деградація цитоскелетного білка здійснюється по АТФ-незалежному протеолітичному шляху [11]. Показано значне зменшення загальних вільних сульфгідрильних груп у спектрині і більшості інших поліпептидів [17]. Обробка ФГ може супроводжуватися збільшенням зв'язування цитозольних білків, зокрема гемоглобіну, з мембраною еритроцитів людини [20].

На відміну від еритроцитів ссавців, що вивчаються, цитоскелет еритроцитів коня не містить білок смуги 4,2 [7, 15]. Це можна розглядати як одну з причин високої чутливості вказаних клітин, модифікованих ФГ, до гіпертонічного шоку (4,0 М NaCl). Білок смуги 4,2 є одним з головних компонентів цитоскелета еритроцитів людини, який зв'язується з цитоплазматичним доменом трансмембранного білка смуги 3 і взаємодіє з анкіріном [12, 21]. Пацієнти, клітини яких позбавлені білка смуги 4,2, страждають від вродженої гемолітичної анемії з мікросфероцитозом [19]. Виходячи з цього, вважають, що білок смуги 4,2 відіграє важливу роль у підтримці стабільності і пластичності еритроцитів [21]. Еритроцити коня достатньо стійкі до гіпертонічного шоку, проте, у разі модифікації цитоскелет-мембранного комплексу ФГ спостерігається різке збільшення як рівня гіпертонічного лізису, так і його відносної швидкості.

Висновки

1. По мірі зниження рівня і швидкості гіпертонічного гемолізу у 4,0 М NaCl еритроцити ссавців можна розташувати у наступній послідовності: людини > бик > щур > кінь.

2. Еритроцити людини і коня максимально стійкі до гіпертонічного шоку у 4,0 М NaCl після прединкубації у розчині, що містить 0,4 М NaCl, еритроцити щура — 0,3 М, бика — 1,0 М., тоді як формування метастабільного стану еритроцитів людини, щура і коня спостерігається при інкубації у середовищі, що містить 0,6 М NaCl, і еритроцитів бика — у 2,0 М NaCl.

3. ФГ знижує рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини на відміну від еритроцитів тварин. Поєднана дія ФГ і середовища зневоднення, що призводить до формування метастабільного стану клітин, супроводжується збільшенням рівня і відносної швидкості гіпертонічного гемолізу еритроцитів тварин, особливо вираженим для еритроцитів коня.

Shpakova N. M., Alexandrova D. I., Oliynik O. O., Bondarenko V. A.

EFFECT OF PHENYLHYDRAZINE ON HYPERTONIC SENSITIVITY OF PRE-DEHYDRATED MAMMALIAN ERYTHROCYTES

Summary

The effects of phenylhydrazine (PH) modifier of cytoskeleton-membrane complex and the media of preliminary dehydration on sensitivity of mammalian erythrocytes were investigated. It has been shown that the man and horse erythrocytes are maximally steady to hypertensive shock in 4,0 M NaCl after pre-incubation in solution, containing 0,4 M, rat erythrocytes - 0,3 M, bovine erythrocytes - 1,0 M, while forming of the metastable state of man, rat, horse erythrocytes is observed during pre-incubation in an environment, containing 0,6 M NaCl and bovine erythrocytes

- in 2,0 M NaCl. The joint effect of PH and dehydration medium is accompanied with i increasing and relative rate of hypertonic hemolysis of mamm dian erythrocytes.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryon dicine of the National Academy Science of Ukraine, Kharkov

Шпакова Н. М., Александрова Д. И., Олейник О. А. Бондаренко В. А.

ВЛИЯНИЕ ФЕНИЛГИДРАЗИНА НА ГИПЕРТОНИЧЕСКУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ОБЕЗВОЖЕННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Аннотация

В статье представлены результаты исследований влияния фенилгидразина в модификатора цитоскелета на гипертоническую чувствительность предварителе обезвоженных эритроцитов млекопитающих. Было показано, что клетки человека и лоша максимально устойчивы к гипертоническому шоку в 4,0 М NaC после прединкубации растворе, содержащем 0,4 М, эритроциты крысы — 0,3 М, быка — 1,0 М, в то время к формирование метастабильного состояния эритроцитов человека, крысы, лоша наблюдается при прединкубации в среде, содержащем 0,6 М NaCl и эритроцитов быка в 2,0 М NaCl. Сочетанное действие ФГ и среды обезвоживания сопровождается увеличени уровня и относительной скорости гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих

1. Александрова Д. И., Шпакова Н. М. Влияние предварительного обезвоживани эритроцитов человека и быка на устойчивость к гипертоническому шоку при разны температурах [Текст] // Вісник проблем біології і медицини. - 2007. –1. – С. 73 – 77.

2. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембра при охлаждении [Текст].- Киев: Наук. думка, 1982.- 255 с.

3. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология [Текст]. — К. : Наук. думка, 1994.– 432 с.

4. Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивост эритроцитов к осмотическому и температурному шоку [Текст]: Автореф. дис. ... канд. биол наук. – Харьков, 1989. – 16 с.

5. Энциклопедия клинических лабораторных тестов [Текст], под редакцией Тиц Н.У., «Лабинформ».- М.- 1997.-С. 128.

6. Arduini A., Storto S., Belfiglio M., Scurti R., Mancinelli G., Federici G. Mechanism o spectrin degradation induced by phenylhydrazine in intact human erythrocytes [Text] // Biochim Biophys. Acta. -1989.-979, № 1.- P. 1-6.

7. Baskurt O.K., Farley R.A., Meiselman H.J. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study // Am. J. Physiol. -1997.- 273, № 6, Pt 2.- P. H2604-2612.

8. Betticher D. C., Geiser J. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu // Comp. Biochem. Physiol. A. – 1989. – 93, № 2. – P. 429–432.

9. Bogner P., Csutora P., Cameron I.L., Wheatley D.N., Miseta A. Augmental water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camelids // Biophys. J. –1998.– 75.- P. 3085-3091.

10. Bogner P., Sipos K., Ludány A., Somogyi B., Miseta A. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // Eur. Biophys. J.- 2002.- 31.- P.145–152.

11. Choudhury T.D., Das N., Chattopadhyay A., Datta A.G. Effect of oxidative stress and erythropoietin on cytoskeletal protein and lipid organization in human erythrocytes // Pol. J. Pharmacol. – 1999.- 51, № 4.- P. 341-350.

12. Cohen C.M., Dotimas E., Korsgren C. Human erythrocyte membrane protein band 4.2 (pallidin) // Semin. Hematol. – 1993.- 30.- P. 119-137.

13. de Jong K., Geldwerth D., Kuypers F.A. Oxidative damage does not alter membrane phospholipid asymmetry in human erythrocytes // Biochemistry.- 1997.-36, № 22.- P. 6768-6776.

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

15. Guerra-Shinohara E.M., Barretto O.C. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species // Braz. J. Med. Biol. Res.- 1999.- 32.- № 6. P. 683-687.

16. Halperin J.A., Brugnara C., Van Ha T., Tosteson D.C. Voltage-activated cation permeability in high-potassium but not low-potassium red blood cells // Am. J. Physiol.- 1990.- 258, № 6, Pt 1.- P. C1169-72.

17. Hashmi A.N., Saleemuddin M. Phenylhydrazine causes sulfhydryl oxidation and protein aggregation in hemoglobin-free human erythrocyte membranes // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1996.- 40, № 3.- P. 543-550.

18. Starek A., Szymczak W., Zapor L. Hematological effects of four ethylene glycol monoalkyl ethers in short-term repeated exposure in rats // Arch. Toxicol.- 2008.- 82.- P. 125–136.

19. Su Y., Ding Y., Jiang M., Hu X., Zhang Z. Protein 4.2 Komatsu (D175Y) associated with the lack of interaction with ankyrin in human red blood cells // Blood Cells, Molecules, and Diseases.- 2007.- 38.- P. 221–228.

20. Yamamoto K., Yamada M., Kato Y. Age-related and phenylhydrazine-induced activation of the membrane-associated cathepsin E in human erythrocytes // J. Biochem.- 1989.- 105, № 1.- P. 114-119.

21. Yawata Y., Kanzaki A., Yawata A. Genotypic and phenotypic expressions of protein 4.2 in human erythroid cells // Gene Funct. Dis.- 2000.- 2.- P. 61-81.