Национальная Академия наук Украины,
отделение молекулярной биологии, биохимии, экспериментальной и клинической физиологии

Институт проблем криобиологии и криомедицины

3

1999

ISSN 0233-7673

National Academy of Sciences of the Ukraine
Department of Molecular Biology, Biochemistry, Experimental and Clinical Physiology
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

3
1999

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Катков И. И. Некоторые аспекты осмотической реакции клеток. II. Объем воды и внутриклеточная концентрация проникающих криопротекторов в точках максимального отклонения объема в системах со многими растворенными веществами 3

Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Орлова Н. В. Влияние додецил-β,D-мальтозида на устойчивость предварительно дегидратированных эритроцитов к гиперосмотическому и холодовому шоку . . 10

Микулинский Ю. Е. Регуляция активности белков холодового шока 16

Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Шарлай Т. М. Динамика активности α-ГФДГ в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее гипотермического хранения 21

Загнойко В. И. О гипометаболическом влиянии фракции эпителия кишечника зимнеспящего суслика *C. undulatus* на консервирование эмбрионов млекопитающих 27

Нардид О. А. Влияние замораживания на структурно-функциональные свойства некоторых гемопротеинов 31

Кравченко Л. П., Семенченко О. А., Семенченко А. Ю., Белоус А. М. Влияние водно-солевого экстракта плаценты человека на сохранность изолированных гепатоцитов в условиях гипотермии . . 35

Цуцаева А. А., Высеканцев И. П., Дарченко А. Л. Динамика репаративных процессов в бактериях *Escherichia coli* после лиофилизации 39

Зинченко А. В., Зинченко В. Д. Исследование акустической эмиссии в водных растворах глицерина и 1,2-пропандиола при охлаждении–нагреве 43

Кощий С. В., Луговой В. И., Компаниец А. М., Николенко А. В. Криопротекторы ряда алкоксизамещенных глицерина 46

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Керос В. А. Криоконсервирование тестикулярной ткани плодов человека и создание низкотемпературного банка для последующего использования в клинической трансплантологии 54

КРИОМЕДИЦИНА

Грищенко В. И., Щербина Н. А., Лазуренко В. В. Некоторые аспекты применения локальной гипотермии в акушерско-гинекологической практике 59

Питько В. А. Исследование влияния криоэкстракта хориона и экстракта плаценты на морфологические показатели при экспериментальном воспалительном процессе 64

Потапова Л. В. Влияние имплантаций криоконсервированной ткани тимуса на иммунореактивность организма больных эндометриозом 69

Винник Ю. А., Котенко А. Е., Чибисов Л. П. Интраоперационное криовоздействие в лечении рака прямой кишки 72

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Сынчикова С. П. Влияние глюкопиранозидов на устойчивость эритроцитов человека к гиперосмотическому стрессу 77

Бондаренко В. А., Кутиков А. Е., Никишкова И. Н. Электроэнцефалограмма и морфофункциональные особенности головного мозга животных разного возраста при общем охлаждении . . . 80

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1999

УДК 57.043.612.111 UDC 57.043.612.111

Влияние глюкопиранозидов на устойчивость эритроцитов человека к гиперосмотическому стрессу

О. П. СЫНЧИКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Glucopyranosides Effect on Human Erythrocyte Resistance to Hyperosmotic Stress

O. P. SYNCHYKOVA

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

Гиперосмотический стресс является одним из основных факторов криоповреждения клеток. Поэтому для моделирования ситуации, имеющей место при замораживании, эритроциты переносили при положительных температурах в высококонцентрированные солевые растворы. Как насыщение клеток глюкозой [2], так и предварительная дегидратация эритроцитов снижают уровень гиперосмотического лизиса [3]. Известно, что некоторые производные глюкопиранозида защищают эритроциты от гипотонического повреждения [6, 7]. В то же время гипертонический лизис клеток практически не изучен, хотя представляет значительный интерес для криобиологии.

Цель работы — изучение влияния представителей гомологичного ряда алкил-β,D-глюкопиранозидов, относящихся к неионным амфифилам, на чувствительность эритроцитов к действию гиперосмотического стресса.

Объектом исследования служили эритроциты, которые получали из донорской крови II группы по стандартной методике [3]. Гиперосмотический шок осуществляли перенесением клеточной суспензии в 4,0 М раствор NaCl. Конечный гематокрит 3.1×10^{-3}. Кинетику гиперосмотического гемолиза регистрировали спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности суспензии эритроцитов при длине волны 720 нм в кювете с постоянным перемешиванием. Все среды готовили на 5 мМ фосфатном буфере.

В работе использовали гексил-β,D-глюкопиранозид (С6), октил-β,D-глюкопиранозид (С8), децил-β,D-глюкопиранозид (С10) производства фирмы Calbiochem и реактивы отечественного производства квалификации ХЧ и ЧДА.

При перенесении эритроцитов в 4,0 М раствор NaCl клетки разрушаются и лизируют. Если в лизирующей среде в момент внесения клеток присутствуют глюкопиранозиды в определенных концентрациях, то уровень гиперосмотического гемолиза значительно снижается. Оптимальные концентрации и максимальная антигемолитическая активность веществ в условиях гиперосмотического стресса клеток представлены в таблице. Видно, что с ростом алкильной цепи глюкопиранозида концент-

Антигемолитическая активность алкил-β,D-глюкопиранозидов при концентрациях, обеспечивающих максимальный защитный эффект эритроцитов в условиях гиперосмотического стресса

Вещество	Блокирующая концентрация, мМ	Антигемолитическая активность, %
Гексил-β,D-глюкопиранозид	2,8	76
Октил-β,D-глюкопиранозид	0,45	86
Децил-β,D-глюкопиранозид	0,03	88

Hyperosmotic stress is one of the main factors of cell cryodamage. Therefore for the modelling of a situation, taking place during freezing, the erythrocytes were transferred under positive temperatures into highly concentrated salt solutions. Both the saturation of cells with glucose [2], and preliminary dehydration of erythrocytes reduce the level of hyperosmotic lysis [3]. It is known, that some derivatives of glucopyranoside protect erythrocytes against hypotonic damage [6, 7]. At the same time hypertonic lysis of cells is practically not studied, but is of a significant interest for cryobiology.

The aim of the work is the investigation of the effect of alkyl-β,D-glucopyranosides, referred to non-ionic amphiphiles, on the sensitivity of erythrocytes to the effect of hyperosmotic stress.

Erythrocytes, obtained from a donor's blood of the II-nd group according to standard methods [3] served as an object of this study. Hyperosmotic shock was accomplished by means of the transfer of cellular suspension into 4.0 M NaCl solution. Final hematocrit made 3.1×10^{-3}. Hyperosmotic lysis kinetics was spectrophotometrically recorded by a reduction of optical density of erythrocyte suspension at the wavelength of 720 nm in a cuvette with a constant stirring. All media were prepared in 5 mM phosphate buffer.

In the work hexyl-β,D-glucopyranoside (C6), octyl-β,D-pyranoside (C8), decyl-β,D-glucopyranoside (C10) of Calbiochem firm production and reagents of home production of the "chemically pure" and "pure for analysis" were used.

When removing erythrocytes into 4,0 M NaCl solution the cells destroyed and lysed. If in a lysing medium in the moment of cell introduction there are glucopyranosides in certain concentrations, then the level of hyperosmotic hemolysis significantly decreases. Optimal concentrations and maximum antihemolytical activity of substances under conditions of hyperosmotic stress of the cells were presented in the Table. It is evident, that with the growth of glucopyranoside alkyl chain the concentration, under which maximum antihemolytical effect is observed, reduces by one order for every two -CH_2 groups. With an increase in the length of alkyl chain an antihemolytical activity of substances increases from 75% for C6 up to 90% for C8 and C10.

Antihemolytical activity of alkyl-β,D-glucopyranosides under concentrations, providing a maximum protective effect of erythrocytes under the conditions of hyperosmotic stress

Substance	Blocking concentration, mM	Antihemolytical activity, %
Hexyl-β,D-glucopyranoside	2.8	76
Octyl-β,D-glucopyranoside	0.45	86
Decyl-β,D-glucopyranoside	0.03	88

рация, при которой наблюдается максимальный антигемолитический эффект, снижается примерно на порядок на каждые две $-CH_2$ группы. С увеличением длины алкильной цепи антигемолитическая активность веществ возрастает от 75% для С6 до 90% для С8 и С10.

При действии высокой тоничности среды в мембране эритроцита образуются дефекты, которые в зависимости от условий среды могут увеличиваться до размера гемолитической поры. Исходя из того, что глюкопиранозиды оказывают защитное действие в условиях как гипотонического [6, 7], так и гиперосмотического стресса, можно предположить, что эффект этих соединений обусловлен их способностью влиять на процессы, связанные с эволюцией гемолитической поры.

Было показано, что амфифильные соединения, в том числе и децил-β,D-глюкопиранозид, в концентрациях, при которых наблюдается максимальный и полумаксимальный антигемолитический эффект при гипотоническом лизисе, оказывают влияние на состояние мембраны, что проявляется в изменении ее проницаемости для ионов калия и фосфата [7]. Оптимальные концентрации веществ при гиперосмотическом стрессе гораздо ниже, чем соответствующие величины концентраций при гипотоническом гемолизе. Для децил-β,D-глюкопиранозида концентрации отличаются в 25 раз. Если данное соединение использовали в концентрации 0,3 мМ, что соответствует максимальной защите эритроцитов при гиперосмотическом гемолизе, изменений транспортных характеристик мембраны не наблюдалось [7].

Кинетические кривые изменений оптической плотности суспензии эритроцитов в зависимости от времени внесения гексилглюкопиранозида в лизирующую среду представлены на рис. 1. Кривая *1* отражает развитие гемолиза эритроцитов в 4,0 М NaCl. Кинетика гиперосмотического лизиса в присутствии блокирующей концентрации С6 представлена кривой *2*. Кривые *3–6* отражают ситуацию, когда вещество вносится в кювету после запуска литического процесса через определенные временные интервалы. Аналогичные данные для С8 и С10 представлены на рис. 2.

Очевидно, максимальный защитный эффект всех исследуемых глюкопиранозидов наблюдается лишь тогда, когда вещество присутствует в лизирующей среде в момент действия осмотического стресса. Подобная закономерность была обнаружена ранее для катионных амфифильных соединений [1, 4]. При изменении постановки эксперимента, когда добавление вещества производится после начала гиперосмотического лизиса эритроцитов, защитный эффект уменьшается и через 50 с наблюдается полное отсутствие блокирования гемолиза (рис. 2).

Исходя из того, что процесс гемолиза происходит по принципу "все или ничего" [5], а эритроциты представляют собой достаточно гетерогенную популяцию, можно предположить, что развитие гиперосмотического лизиса во времени (около 3-х минут) обусловлено последовательным повреждением различных субпопуляций эритроцитов. Тот факт, что глюкопиранозиды, внесенные в лизирующую среду после запуска литического процесса, протектируют клетки, позволяет считать, что защищенными являются те клетки, которые по той или иной причине начали лизировать несколько позже. Защитный эффект амфифильных соединений в данном случае может быть связан с их способностью изменять физико-химические свойства мем-

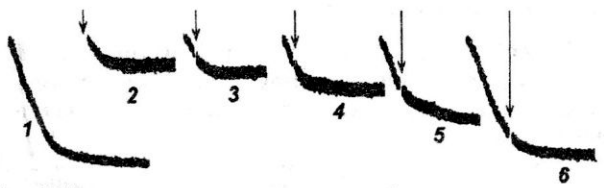


Рис. 1. Изменение во времени оптической плотности суспензии при лизисе эритроцитов в 4,0 М NaCl: *1* – лизис клеток при отсутствии С6; *2–6* – добавление С6 через 0, 5, 10, 25 и 50 с после начала гиперосмотического лизиса.

Fig. 1. The change in time of optic density of suspension at erythrocyte lysis in 4.0 M NaCl: *1* – cell lysis without C6; *2–6* – an addition of C6 in 0, 5, 10, 25 and 50 sec after the start of hyperosmotic lysis.

Under the effect of a high medium tonicity in the erythrocyte membrane the defects form, they may be increased depending on the medium conditions up to the size of hemolytical pore. Taking into consideration that glucopyranosides cause a protective effect both under conditions of hypotonic [6, 7] and hyperosmotic stress, one can suppose that the effect of these compounds is stipulated by their ability to affect the processes, connected to the evolution of a hemolytical pore.

It has been demonstrated, that amphiphilic compounds, including decyl-β,D-glucopyranoside, under concentrations when a maximum and half-maximum antihemolytical effect at a hypotonic lysis is observed, cause the effect on a membrane state, that manifests in the change of its permeability for potassium and phosphate ions [7]. Optimal concentrations of substances at hyperosmotic stress are much lower, than corresponding values of concentrations at hypotonic lysis. For decyl-β,D-glucopyranoside the concentrations differ in 25 times. If given compound is used in the concentration of 0.3 mM, that corresponds to a maximum protection of erythrocytes at hyperosmotic hemolysis, then no changes in transport characteristics are observed [7].

Kinetic curves of the changes in optical density of suspension of erythrocytes depending on a time of the introduction of hexylglucopyranoside into a lysing medium are presented in Fig. 1. The curve *1* reflects the development of hemolysis of eryhtrocytes in 4.0 M NaCl. Hyperosmotic lysis kinetics in the presence of blocking concentration C6 is presented by the curve *2*. The curves *3–6* reflect the situation, when the substance is placed into a cuvette after the triggering of lytic process in certain time intervals. Similar data for C8 and C10 are presented in Fig. 2.

It is evident, that a maximum protective effect in all studied glucopyranosides is observed only when the substance exists in a lysing medium at the moment of osmotic stress effect. Similar regularity was found earlier for cation amphiphilic compounds [1, 4]. Changing the experiment protocol, when the addition of substance is accomplished after the start of hyperosmotic lysis of erythrocytes, a protective effect reduces and in 50 sec a complete absence of hemolysis blocking is observed (Fig. 2).

Taking into account, that the process of hemolysis occurs according to the "everything or nothing" principle [5], and erythrocytes represent quite a heterogenous population, one can suppose that the development of hyperosmotic lysis in a time (about 3 minutes) is stipulated by a subsequent damage of different subpopulations of erythrocytes. That fact, that glucopyranosides, placed into a lysing medium after the triggering of lytic processs, protect the cells, allows to assume, that the cells started to lyse a little later due to a this or that reason, can be considered as protected ones. Protective effect of amphiphilic compounds in this case can be related to their ability to change physical and chemical membrane properties. During the building-in of amphiphilic compounds into a membrane there is its perturbation, in the result of what the living time of transmembrane pore may change.



Рис. 2. Антигемолитическая активность алкил-β,D-глюкопиранозидов при перенесении эритроцитов в 4,0 М NaCl (температура 22 °С).*1–5* – добавление вещества в блокирующих концентрациях через 0, 5, 10, 25, 50 с после начала гиперосмотического лизиса.

Fig. 2. Antihemolytical activity of alkyl-β,D-pyranosides when transferring the erythrocytes into 4.0 M NaCl (temperature of 22 °C). *1–5* – addition of the substance of blocking concentrations after the start of hyperosmotic lysis in 0, 5, 10, 25, 50 sec.

браны. При встраивании амфифильных соединений в мембрану происходит ее пертурбация, в результате чего может изменяться время жизни трансмембранной поры.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дунаевская О. Н., Шпакова Н. М.* Защитный эффект трифторперазина при гиперосмотическом шоке эритроцитов // Укр. биохим. журн.– 1997.– 69, № 2.– С. 30–34.
2. *Мельникова О. В., Бондаренко Т. П.* Модифицирующее действие глюкозы на чувствительность эритроцитов к температурному и осмотическому стрессу // Физико-химические процессы в криобиологических системах.– Харьков, 1991.– С. 68–78.
3. *Поздняков В. В.* Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к температурному шоку: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1989.– 16 с.
4. *Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А.* Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– 60, № 10.– С. 1624–1631.
5. *Akeson S. P., Mel H. C.* Osmotic hemolysis and fragility. A new model based on membrane disruption, and a potential clinical test // Biochim. Biophys. Acta.– 1982.– 79.– P. 201–211.
6. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced antihaemolysis is not casually related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Interactions.– 1991.– 79.– P. 335–347.
7. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.* Permeability alterations and antiheamolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– 860, № 3.– P. 510–524.

Поступила 02.06.99

REFERENCES

1. *Dunaevskaya O. N., Shpakova N. M.* Protective effect of thriphtorperazine at hyperosmotic shock of erythrocytes // Ukr. Biochem. J.– 1997.– 69, № 2.– P. 30–34.
2. *Melnikova O. V., Bondarenko T. P.* Modifying effect of glucose on the sensitivity of erythrocytes to temperature and osmotic stress // Physical and chemical processes in cryobiological systems.– Kharkov, 1991.– P. 68–78.
3. *Pozdnyakov V. V.* The effect of composition and osmolarity of the medium on resistance of eryhtrocytes to a temperature shock: Author's abstract of PhD (biology) thesis.– Kharkov, 1989.– 16 p.
4. *Shpakova N. M., Pantaler E. R., Bondarenko V. A.* Antihemolytical effect of chlorpromazine at hyperosmotic and cold shock of erythrocytes // Biochemistry.– 1995.– 60, № 10.– P. 1624–1631.
5. *Akeson S. P., Mel H. C.* Osmotic hemolysis and fragility. A new model based on membrane disruption, and a potential clinical test // Biochim. Biophys. Acta.– 1982.– 79.– P. 201–211.
6. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced antihaemolysis is not casually related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Interactions.– 1991.– 79.– P. 335–347.
7. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.* Permeability alterations and antiheamolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– 860, № 3.– P. 510–524.

Accepted in 02.06.99