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 57.043:591.111.1

ДО ПИТАННЯ ПРО МОЖЛИВУ КОРЕЛЯЦІЮ МІЖ ВИХОДОМ ІОНІВ K^+ І РОЗВИТКОМ ГЕМОЛІТИЧНОГ ПОШКОДЖЕННЯ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ В УМОВАХ ГІПЕРТОНІЧНОГО КРІОГЕМОЛІЗУ

Н. М. Шпакова, С. С. Єршов, О. Є. Нігот

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

У статті проведено дослідження витіку іонів K^+ з еритроцитів ссавц гіпертонічних середовищах при варіюванні температури і концентрації солі, а та гемолізу клітин при подальшому їх охолодженні до 0 °С. Виявлено, що вихід іонів еритроцитів людини і тварин збільшується по мірі зростання концентрації сол середовищі й досягає практично максимального значення у розчині, що містить 2,0 М N у той час, як залежності гемолізу еритроцитів різних видів ссавців відрізняют Для еритроцитів усіх досліджених видів ссавців спостерігається збільшення р кріогемолізу при підвищенні температури інкубації, але збільшення рівня виходу ка характерно тільки для еритроцитів людини, коня і кроля. Припущено, що витік калію єдиною умовою, що визначає характер розвитку гемолітичного пошкодження клітин умовах кріогемолізу.

Ключові слова: ЕРИТРОЦИТ, ГІПЕРТОНІЧНІ СЕРЕДОВИЩА, КРІОГЕМОЛ ССАВЦІ, ВИТІК ІОНІВ КАЛІЮ

Холодової шок біологічних об'єктів, тобто пошкодження при охолоджуванні до 0 °С ізотонічних умовах, певною мірою моделює процес заморожування [1]. Для лізису еритроцит ссавців при зсуві температури від 37–0 °С необхідні гіпертонічні умови, тому запропонова називати це явище гіпертонічним кріогемолізом [2]. Вважають, що необхідність сенсибіліза клітин людини і тварин гіпертонічними середовищами до охолоджування обумовлена високи вмістом холестерину в еритроцитарних мембранах [1, 3, 4]. Гіпертонічний кріогемол еритроцитів складається з 2-х етапів. Перший етап —інкубація еритроцитів у гіпертонічном середовищі при температурі 37 °С, а другий —охолоджування клітин до 0 °С у середовищ тієї ж осмолярності. При дослідженні гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів людини був показано, що на першому етапі спостерігається витік іонів K^+ з клітин, хоча еритроцити ш не гемолізують у вказаних умовах [5, 6], а лізис еритроцитів розвивається тільки на другом етапі при подальшому охолоджуванні клітин до 0 °С [6–8].

Мета роботи — на прикладі еритроцитів різних видів ссавців (людина, кінь, бик кроль) виявити можливу кореляцію між витіком іонів K^+ у гіпертонічних середовищах при 37 °С і гемолізом клітин при їх подальшому охолоджуванні до 0 °С, а також дослідити вплив температури середовища попередньої інкубації на вихід K^+ і рівень гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів.

Матеріали і методи

Еритроцити одержували з крові людини, коня, бика, кроля, що була заготовлена на глюгіцировому консерванті (n=6). Усі використані середовища готували на 0,01 М фосфатному буфері, pH 7,4. Осмолярність розчинів визначали на осмометрі ОМКА ІІ-01.

Гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів проводили шляхом перенесення еритроцитів у розчин з відповідною концентрацією NaCl та інкубували при температурі 37 °С протягом 10 хв, потім переносили аліквоту у розчин NaCl, охолоджений до температури 0 °С, на 10 хв. Кінцевий гематокрит — 0,4 %.

При дослідженні впливу різних температур інкубації на першому і другому етапах гіпертонічного кріогемолізу суспензію еритроцитів інкубували у термостаті з температурою, яка регулюється (t ± 0,5 °С).

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

Вимірювання рівня іонів калію за допомогою іоноселективного калієвого електроду проводилося на іонометрі універсальному ЕВ-74 з використанням іонселективного електроду ЕЛІС-121К і електроду порівняння ЕВЛ-1М3.1, заповненого насиченим розчином KCl, із застосуванням електролітичного ключа, заповненого розчином 1 М Li_2SO_4. Електродну систему калібрували розчинами KCl з відомою концентрацією (від 10^{-5} до 10^{-1} М) [9].

Експериментальні результати приведені як середнє аріфметичне ± стандартна похибка середнього.

У роботі використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації "х.ч." і "ч.д.а.".

Результати та обговорення

На рис.1 представлені залежності виходу іонів K^+ при температурі 37 °С (крива 1) і гемолізу еритроцитів ссавців при подальшому охолоджуванні до 0°С (крива 2) від концентрації NaCl у середовищі. Видно, що залежності гемолізу еритроцитів різних видів ссавців відрізняються. Так, для еритроцитів людини і коня ці залежності мають максимум у точках 1,2 і 1,4 М NaCl відповідно (рис.1 а і б), а для еритроцитів бика і кроля рівень гемолізу поступово наростає (рис.1 в і г). У той же час вихід іонів K^+ з еритроцитів людини і тварин збільшується по мірі зростання концентрації солі у середовищі і досягає практично максимального значення в розчині, що містить 2,0 М NaCl,.

Як видно з рисунку 1 а і б, при незначному виході іонів K^+ з еритроцитів людини і коня (~10 %) гемоліз досягає значного рівня (~50%). Після досягнення максимального значення гемолізу еритроцитів цих видів спостерігається його зниження на тлі подальшого виходу іонів K^+. Тоді як практично повний вихід калію з еритроцитів людини спостерігається в 1,8 NaCl і еритроцитах коня — в 2,0 М NaCl, рівень гемолізу у даному випадку складає всього 20 % і 60 % відповідно (рис. 1 а і б).

Таким чином, це свідчить про те, що для еритроцитів людини і коня існує кореляція між виходом іонів K^+ на етапі попередньої інкубації при 37 °С і рівнем пошкодження клітин при охолоджуванні до 0 °С у концентраційному діапазоні 0,6–1,2 і 0,6–1,4 М NaCl, відповідно. Цікаво відзначити, що в цьому діапазоні концентрацій зростання рівня гемолізу клітин при охолоджуванні до 0 °С випереджує зростання виходу іонів K^+ при 37 °С.

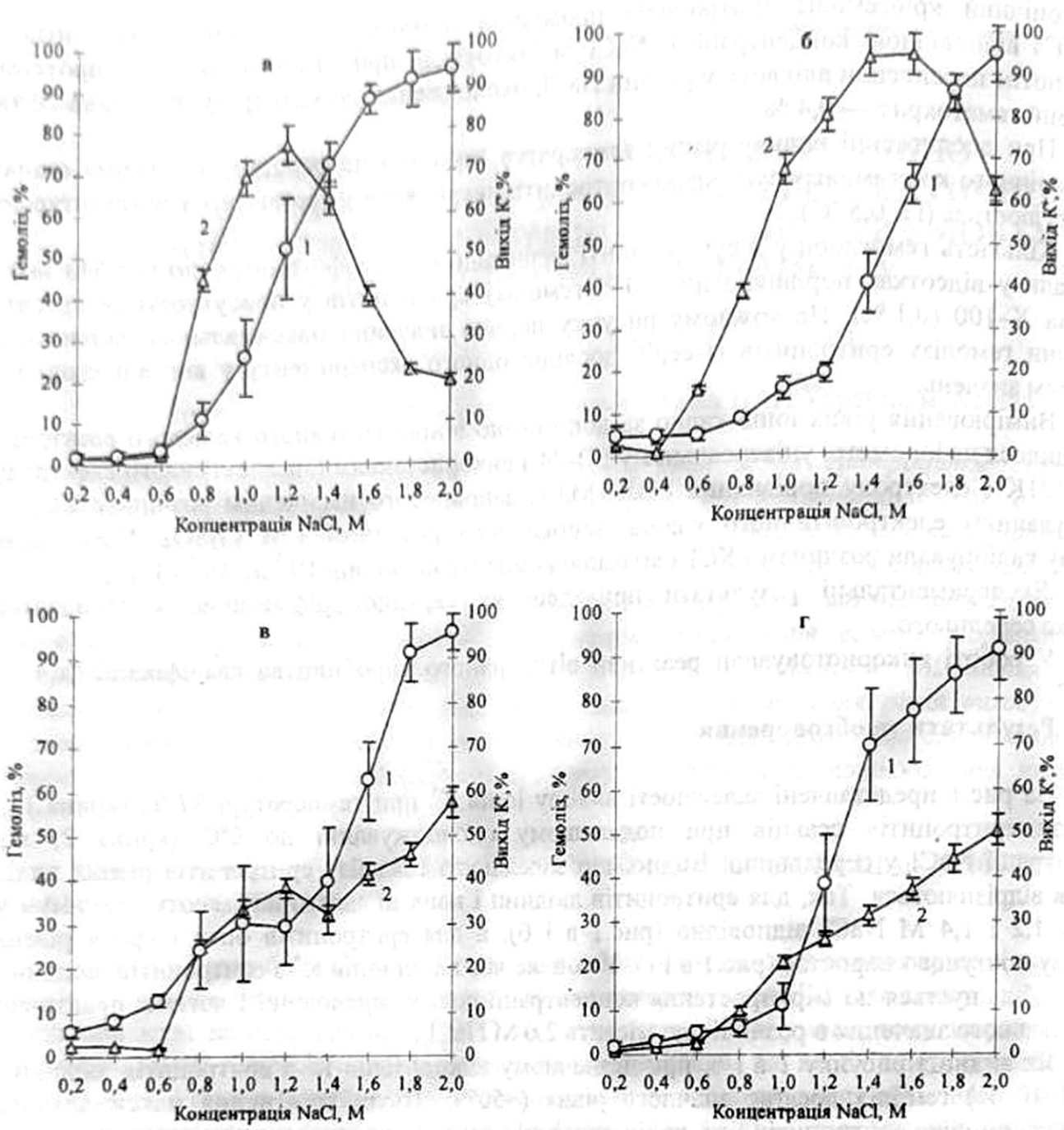


Рис.1 Залежності виходу іонів K+ при температурі 37 °C (крива 1) і рівня гемолізу еритроцитів ссавців при охолоджуванні до 0 °C (крива 2) від концентрації NaCl у середовищі:
а — людина, б — кінь, в — бик, г —кроль.

Як видно з рисунку 1 в і г, для еритроцитів бика і кроля спостерігається позитивна кореляція між виходом калію і рівнем гемолізу при охолоджуванні у всьому досліджуваному концентраційному діапазоні NaCl. Проте, слід зазначити, що в середовищі, що містить NaCl в концентрації вище 1,4 М, для еритроцитів бика і 1,2 М NaCl для еритроцитів кроля, вихід іонів K^+ при 37 °C випереджує зростання рівня гемолізу при охолоджуванні клітин.

Вважають, що в гіпертонічних середовищах відбувається витік іонів калію з клітин у результаті утворення мембранних мікродефектів, які зароджуються або активуються під впливом підвищеної осмолярності середовища [1,10]. На етапі охолоджування еритроцитів, ймовірно, відбувається зростання цих мікродефектів і, як наслідок, вихід молекул гемоглобіну. Виходячи з одержаних нами даних (рис.1), можна вважати, що при приблизно однаковій швидкості формування мікродефектів в еритроцитах ссавців процес їх зростання до розміру гемолітичної пори на етапі охолоджування до 0 °C в еритроцитах людини і коня

відбувається набагато легше, ніж у клітинах бика і кроля. Вказані відмінності, мабуть, обумовлені особливостями цитоскелет-мембранного комплексу еритроцитів різних видів ссавців [11–14].

Виявлена відсутність кореляції між виходом калію і рівнем кріогемолізу еритроцитів людини і коня у певному діапазоні концентрацій солі (рис.1 а і б) може бути обумовлена двома причинами. З одного боку, умови гіпертонії можуть змінювати стан внутріклітинного гемоглобіну і викликати його агрегацію, внаслідок чого сформований комплекс не в змозі покинути клітину. З іншого боку, можуть відбуватися зміни на рівні еритроцитарної мембрани, внаслідок чого буде ускладнено формування макропір, проникних для крупних молекул гемоглобіну.

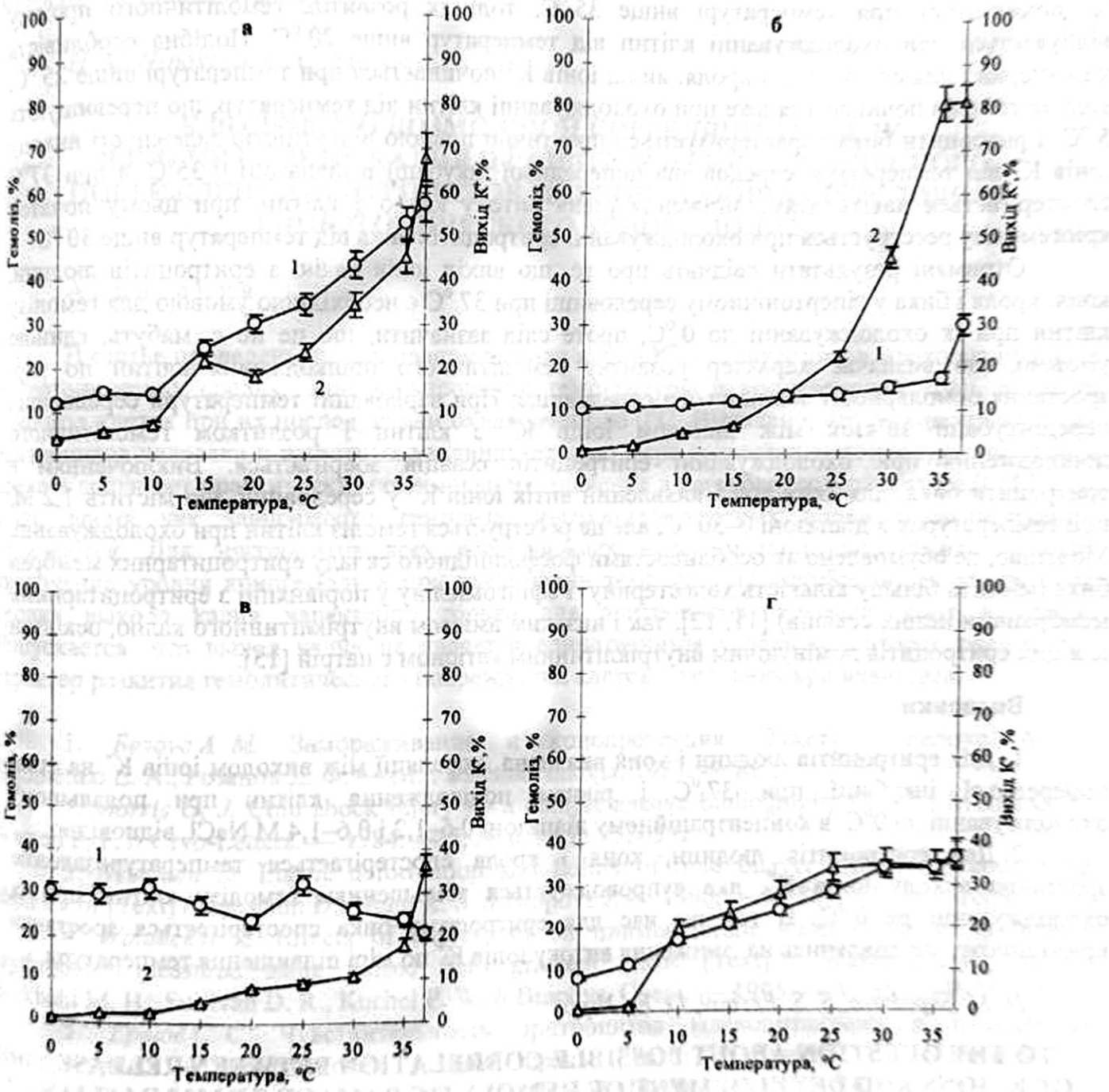


Рис.2 **Вплив початкової температури інкубації на вихід іонів K^+ (крива 1) і рівень гемолізу еритроцитів ссавців при їх подальшому охолоджуванні до 0°С (крива 2) у середовищі, що містить 1,2 М NaCl: а — людина, б — кінь, в — бик, г — кроль.**

На рис. 2 представлені результати впливу температури першого етапу кріогемолізу на вихід іонів K^+ (крива 1) і рівень гемолізу еритроцитів ссавців при подальшому охолоджуванні до 0 °С (крива 2) у середовищі, що містить 1,2 М NaCl. Для еритроцитів усіх видів ссавців спостерігається збільшення рівня кріогемолізу при підвищенні температури інкубації. Для еритроцитів людини і коня збільшення рівня гемолізу досить добре виражене і досягає близько 70–80 % при їх охолоджуванні від 37 до 0 °С на відміну від клітин бика і кроля, рівень пошкодження яких складає лише 35 %. При порівнянні кривих температурних залежностей виходу K^+ і гемолізу еритроцитів людини видно, що як витік іонів K^+, так і початок зростання гемолітичного пошкодження відбувається в діапазоні температур 10–15 °С (початком лізису клітин та виходу іонів K^+ вважали 10 % рівень цих показників) і подальша зміна даних параметрів відбувається погоджено. Для еритроцитів коня вихід іонів K^+ починається при температурі вище 35 °С, тоді як розвиток гемолітичного процесу відбувається при охолоджуванні клітин від температур вище 20 °С. Подібна особливість характерна і для еритроцитів кроля: вихід іонів K^+ починається при температурі вище 25 °С, тоді як гемоліз починається вже при охолоджуванні клітин від температур, що перевищують 5 °С. Еритроцити бика характеризуються практично повною відсутністю залежності виходу іонів K^+ від температури середовища попередньої інкубації в діапазоні 0–35°С, а при 37°С спостерігається навіть деяке зниження рівня витоку калію з клітин, при цьому початок кріогемолізу реєструється при охолоджуванні еритроцитів бика від температур вище 30 °С.

Отримані результати свідчать про те, що вихід іонів калію з еритроцитів людини, коня, кроля і бика у гіпертонічному середовищі при 37 °С є необхідною умовою для гемолізу клітин при їх охолоджуванні до 0 °С, проте слід зазначити, що це не є, мабуть, єдиною умовою, що визначає характер розвитку гемолітичного пошкодження клітин по мірі зростання осмолярності зовнішнього середовища. При варіюванні температури середовища передінкубації зв'язок між виходом іонів K^+ з клітин і розвитком гемолітичного пошкодження при охолоджуванні еритроцитів ссавців зберігається. Виключенням є еритроцити бика, для яких хоч і виявлений витік іонів K^+ у середовищі, що містить 1,2 М, при температурах в діапазоні 0–30 °С, але не реєструється гемоліз клітин при охолоджуванні. Можливо, це обумовлено як особливостями фосфоліпідного складу еритроцитарних мембран бика (містить більшу кількість холестерину і сфінгомієліну у порівнянні з еритроцитарними мембранами інших ссавців) [11, 12], так і низьким вмістом внутріклітинного калію, оскільки для цих еритроцитів домінуючим внутріклітинним катіоном є натрій [15].

Висновки

1. Для еритроцитів людини і коня виявлена кореляції між виходом іонів K^+ на етапі попередньої інкубації при 37 °С і рівнем пошкодження клітин при подальшому охолоджуванні до 0°С в концентраційному діапазоні 0,6–1,2 і 0,6–1,4 М NaCl. відповідно.

2. Для еритроцитів людини, коня і кроля спостерігається температурозалежне зростання виходу іонів K^+, яке супроводжується збільшенням гемолізу клітин при їх охолоджуванні до 0 °С. В той же час для еритроцитів бика спостерігається зростання кріогемолізу, не дивлячись на зниження витоку іонів K^+ по мірі підвищення температури.

N. M. Shpakova, S. S. Ershov, O. E. Nipot

TO THE QUESTION ABOUT POSSIBLE CORRELATION BETWEEN RELEASE OF K^+ IONS AND DEVELOPMENT OF HEMOLYTIC DAMAGE OF MAMMALIAN ERYTHROCYTES UNDER HYPERTONIC CRYOHEMOLYSIS

Summary

The paper covers the studies of release of potassium ions from mammalian erythrocytes in hypertonic media under varying the temperature and concentrations of salt and cell hemolysis at their further cooling down to 0°C. It has been shown that release of K^+ ions from human and animal erythrocytes increases with salt concentration and and arrives at practically a maximal value in solution, containing 2,0 M of NaCl, while dependences erythrocytes hemolysis of different mammals types differ. For the red blood cells of all investigated types of mammals there is an increase of level of cryohemolysis at the increase of temperature of incubation, but increase of level of release of potassium ions characteristically only for erythrocytes of man, horse and rabbit. Potassium release is assumed as not single condition determining the character of development of hemolytic damage of cell under cryohemolysis.

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

Н. М. Шпакова, С. С. Ершов, Е. Е. Нипот

К ВОПРОСУ О ВОЗМОЖНОЙ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ВЫХОДОМ ИОНОВ КАЛИЯ И РАЗВИТИЕМ ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО КРИОГЕМОЛИЗА.

Аннотация

В статье проведены исследования выхода ионов K^+ из эритроцитов млекопитающих в гипертонических средах при варьировании температуры и концентрации соли, а также гемолиза клеток при их последующем охлаждении до 0°С. Выявлено, что выход ионов K^+ из эритроцитов человека и животных увеличивается по мере возрастания концентрации соли в среде и достигает практически максимального значения в растворе, содержащем 2,0 М NaCl, в то время как зависимости гемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих отличаются. Для эритроцитов всех исследованых видов млекопитающих наблюдается увеличение уровня криогемолиза при увеличении температуры инкубации, но увеличение уровня выхода калия характерно только для эритроцитов человека, коня и кроля. Допускается, что выход калия не является единственным условием, которое определяет характер развития гемолитического повреждения клеток в условиях криогемолиза.

1. *Белоус А. М.* Замораживание и криопротекция [Текст] / Белоус А. М., Гордиенко Е. А., Розанов Л. Ф. — М. : Высшая школа, 1987. — 81 с.

2. *Morris G. J.* Cold shock injury — a comprehensive bibliography [Text] / Morris G. J., Watson P. F. // Cryo-Letters. — 1984. — 5, № 6. — P. 352–372.

3. *Needham D.* Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol [Text] / Needham D., Nunn R. S. // Biophys J. — 1990. — V. 58. — P. 997–1009.

4. *Waldeck A. R.* Effects of cholesterol on transmembrane water diffusion in human erythrocytes measured using pulsed field gradient NMR [Text] / Waldeck A. R., Nouri-Sorkhabi M. H., Sullivan D. R., Kuchel P. W. // Biophys. Chem. — 1995. — V. 55. — P. 197–208.

5. *Ершов С. С.* Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды [Текст] / Ершов С. С., Орлова Н. В., Шпакова Н. М. // Пробл. криобиологии. — 2004. — Т. 14, № 3. — С. 51–57.

6. *Шпакова Н. М.* Реакция эритроцитов человека, быка и кроля на изменение осмотических и температурных параметров среды [Текст] / Шпакова Н. М., Ершов С. С., Орлова Н. В. // Вісник проблем біології і медицини. — 2007. — Вип.4. — С. 81–85.

7. *Шпакова Н. М.* Гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих [Текст] / Шпакова Н. М., Ершов С. С. // Пробл. криобиологии. — 2006. — Т. 16, № 3. — С. 286–291.

8. *Єршов С. С.* Порівняльний аналіз гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів різних видів тварин при зміні осмотичних і температурних умов середовища [Текст] / Єршов С. С., Орлова Н. В., Шпакова Н. М. // Біологія тварин. — 2006. — Т. 8. — С. 123–129.

9. *Rodrigues-Garcia J.* Transferability of results obtained for sodium, potassium and chloride ions with different analysers [Text] / Rodrigues-Garcia J., Sogo T., Otero S., Paz J. M. // Clin. Chim. Acta. — 1998. — V. 275. — P. 151–162.

10. *Bondarenko T. P.* The formation and development of a transmembrane pore as a decisive event in the thermal and ocmotic effect [Text] / Bondarenko T. P. Pantaler E. R. Shpakova N. M. et al. // 32-nd Annual Meeting of Society for Cryobiology. — Madison, USA, 1995. — P. 2–54.

11. *Florin-Christensen J.* A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes [Text] / Florin-Christensen J.,. Suarez C.E., Florin-Christensen M. et al. // PNAS Biochemistry. — 2001. — V. 98, № 14. — P. 7736–7741.

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

13. *Guerra-Shinohara E. M.* The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species [Text] / Guerra-Shinohara E. M., Barretto O. C. // Braz. J. Med. Biol. Res. — 1999. — V. 32, № 6. — P. 683–687.

14. *Virtanen J. A.* Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model [Text] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — V. 95, №. 9. — P. 4964–4969.

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