УДК 612.118.221.3:546.492
Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, хлорид ртути, гипотонический гемолиз
Key words: mammalian erythrocytes, mercury chloride, hypotonic hemolysis

Шпакова Н. М., Нипот Е. Е., Орлова Н. В.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА РТУТИ НА РАЗВИТИЕ ГИПОТОНИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

EFFECT OF MERCURY CHLORIDE ON DEVELOPMENT OF HYPOTONIC HEMOLYSIS OF MAMMALIAN ERYTHROCYTES

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
Адрес: 61015, Украина, г. Харьков, ул. Переяславская, 23. Тел. +038 (057) 373-41-43
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine
Address: 610015, Ukraine, Kharkov, Pereyaslavskaya street, 23. Tel. +038 (057) 373-41-43

Шпакова Наталия Михайловна, к. б. н., ст. научн. сотрудник
Shpakova Nataliya M., Ph.D., Senior Research Scientist
Нипот Елена Евгеньевна, , к. б. н., ст. научн. сотрудник
Nipot Elena Ye., Ph.D., Senior Research Scientist
Орлова Наталья Викторовна, к. б. н., ст. научн. сотрудник
Orlova Nataliya V., Senior Research Scientist

Аннотация. В работе представлены результаты о взаимодействии хлорида ртути с эритроцитами человека, быка и кролика, находящимися в гипотонических растворах NaCl. Используя кривые изменения оптической плотности эритроцитов разных видов млекопитающих, оценивали скорость гемолиза и конечный уровень повреждения клеток. Наиболее подверженными повреждающему действию ионов ртути оказались эритроциты быка, наименее – клетки кролика. Полученные в работе результаты свидетельствуют в пользу того, что ионы ртути в первую очередь взаимодействуют с липидной компонентой эритроцитарной мембраны.

Summary. *In the work the results on the interaction of mercury chloride with human, bovine and rabbit erythrocytes being in NaCl hypotonic solutions are presented. Using the curves of the changes in optical density of erythrocytes of various mammals there were assessed hemolysis rate and final rate of cell damage. Bovine erythrocytes were the most confirmed to damaging effect of mercury ions and rabbit erythrocytes were the least confirmed. The findings testify to the favor of the fact that mercury ions primarily interact with lipoid component of erythrocyte membrane.*

Введение

Изучение влияния на биологические объекты неблагоприятных факторов окружающей среды, в частности тяжелых металлов, соли которых высокотоксичны для живых организмов, является важной задачей современной науки. Их токсическое действие в значительной степени связано со структурными и, как следствие, функциональными изменениями в клеточной мембране, которая является местом связывания ионов тяжелых металлов. Существует большое количество работ, описывающих влияние ионов ртути на эритроциты человека [3, 4, 6]. Эритроциты животных менее изучены в этом отношении. В связи с этим представляло интерес изучить эффекты солей ртути на эритроциты разных видов млекопитающих, клетки которых характеризуются особенностями липидного и белкового состава их мембран, функционирования транспортных систем.

В данной работе представлены результаты о взаимодействии неорганической ртути с эритроцитами человека, быка и кролика в условиях помещения их в растворы NaCl пониженной тоничности, где наблюдается увеличение объема и частичное разрушение эритроцитов. Исследование влияния ионов ртути на эритроциты разных видов млекопитающих позволит получить дополнительные данные о взаимодействии металла с клеткой и выявить межвидовые особенности реакции эритроцитов человека, быка и кролика на действие ионов ртути.

Материалы и методы

Для исследования использовали эритроциты, полученные из крови человека (Homo sapiens), быка (Bos taurus) и кроли-

ка (Oryctolagus cuniculus), заготовленной на консерванте «Глюгицир». После удаления плазмы эритромассу дважды отмывали в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4) путем центрифугирования при 1500 g в течение 3 мин. и хранили в виде плотного осадка не более двух часов при температуре 0 °С. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

Концентрацию растворов контролировали измерением осмоляльности на осмометре ОМКА 1Ц–01 (Украина).

Регистрацию динамики гипотонического гемолиза эритроцитов проводили на установке для измерения светорассеяния клеточных суспензий. Уровень гемолиза рассчитывали по формуле: Гемолиз = $(1 - A/A_o) \cdot 100$ %, где А – оптическая плотность исследуемого образца после завершения гемолиза, A_o – оптическая плотность контрольного образца, соответствующая 0 % уровню гемолиза. Скорость гемолиза рассчитывали как изменение оптической плотности за единицу времени. Использовали максимальное значение скорости для каждого образца.

Хлорид ртути в различных концентрациях вносили в кювету перед добавлением эритроцитов.

Статистически результаты были обработаны с помощью критерия Манна – Уитни.

Результаты и их обсуждение

Гипотонический гемолиз эритроцитов часто используется как тест для определения изменений в их плазматической мембране. Степень повреждения клетки в гипотонической среде определяется способностью мембраны к растяжению и репарации возникших в ней повреждений. Поскольку эритроциты млекопитающих обладают различной чувствительностью к снижению тоничности окружающей среды [2], то в работе были выбраны различные гипотонические среды, в которых уровень гемолиза эритроцитов составляет примерно 60 %. Концентрация NaCl в этих средах была 75, 80 и 85 мМ для эритроцитов человека, кролика и быка соответственно. Исходя из приведенных значений, наиболее чувствительными к гипотоническому гемолизу являются эритроциты быка, наименее – клетки человека. Возможно, отмеченная разница в гипотонической чувствительности эритроцитов млекопитающих обусловлена качественно-количественными особенностями липидного состава их мембран. Поскольку холинсодержащие фосфолипиды в эритроцитах быка представлены исключительно сфингомиелином (при фактически полном отсутствии фосфатидилхолина), их мембрана является более жесткой по сравнению с мембраной эритроцитов человека, в которой представлены оба фосфолипида [10]. Очевидно, что более жесткая мембрана эритроцитов быка обладает меньшей способностью к растяжению, что и проявляется в большей чувствительности этих клеток к действию гипотонических сред. Степень повреждения в гипотонической среде может также определяться значениями поверхностно-объемного отношения клеток. Известно [1], что для эритроцитов быка, кролика и человека величины отношения площади поверхности к объему составляют 2,22; 2,11; 1,99 соответственно. Таким образом, клетки, характеризующиеся большим значением поверхностно-объемного отношения, легче повреждаются в гипотонических средах.

На рис. 1 представлены типичные кривые гипотонического гемолиза эритроцитов млекопитающих на примере клеток человека в средах, содержащих различные концентрации $HgCl_2$. Динамика изменения оптической плотности эритроцитов в присутствии хлорида ртути характеризуется определенными особенностями. Для небольших концентраций ртути (рис. 1б) наблюдается рост как уровня, так и скорости повреждения эритро-

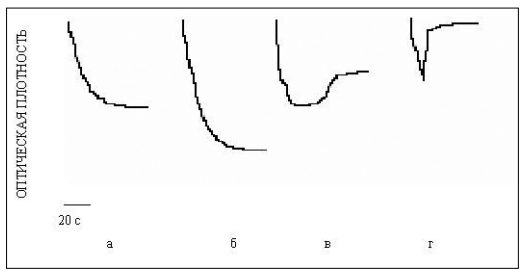


Рис. 1. Типичные кривые гипотонического гемолиза эритроцитов человека в средах с различными концентрациями $HgCl_2$; а – контроль, б – 25 мкМ, в – 100 мкМ, г – 500 мкМ .

цитов по сравнению с контрольным образцом (рис. 1а), в то время как при более высоких значениях (рис. 1в, 1г) – на фоне дальнейшего роста скорости гемолиза отмечается снижение конечного уровня повреждения клеток. Используя кривые изменения оптической плотности эритроцитов разных видов млекопитающих, мы оценивали скорость гемолиза и конечный уровень повреждения клеток. Полученные данные для эритроцитов человека представлены на рисунке 2.

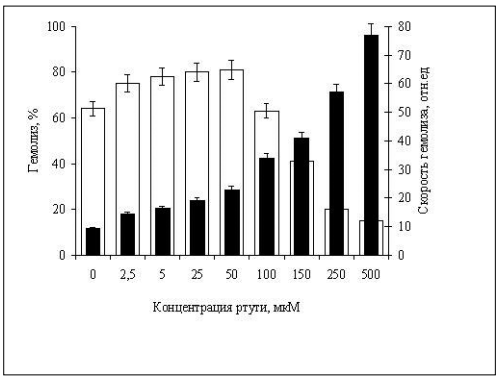


Рис. 2. Зависимость уровня (□) и скорости (■) гемолиза эритроцитов человека от концентрации $HgCl_2$ в среде инкубации (75 мМ NaCl, 5 мМ фосфатный буфер, pH 7,4).

Видно, что с увеличением концентрации $HgCl_2$ до определенного значения уровень гемолиза эритроцитов несколько возрастает, после чего наблюдается выраженное снижение повреждения (более чем в 3 раза по сравнению с контролем). В то же время следует отметить, что скорость гемолиза нарастает во всем диапазоне исследуемых концентраций $HgCl_2$.

Аналогичные данные были получены для эритроцитов кролика (рис. 3) и быка (рис. 4). Обращает на себя внимание тот факт, что концентрационные зависимости уровня и скорости гипотонического гемолиза эритроцитов человека, кролика и быка имеют схожий характер.

Из результатов, представленных на рисунках 2–4, видно, что существует критическая концентрация хлорида ртути, при превышении которой наблюдается снижение конечного уровня повреждения. Если для эритроцитов быка и человека эта критическая концентрация – 50 мкМ $HgCl_2$, то для клеток кролика она ниже и составляет 25 мкМ.

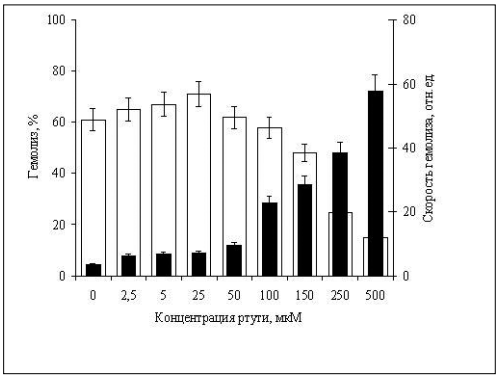


Рис. 3. Зависимость уровня (□) и скорости (■) гемолиза эритроцитов кролика от концентрации $HgCl_2$ в среде инкубации (80 мМ NaCl, 5 мМ фосфатный буфер, pH 7,4).

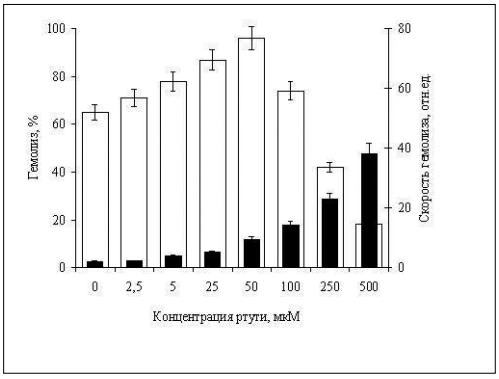


Рис. 4. Зависимость уровня (□) и скорости (■) гемолиза эритроцитов быка от концентрации $HgCl_2$ в среде инкубации (85 мМ NaCl, 5 мМ фосфатный буфер, pH 7,4).

Следует отметить, что при одном и том же уровне гемолиза (~ 60 %) контрольных клеток значения скорости гипотонического повреждения эритроцитов разных видов млекопитающих различны, причем эта величина максимальна для эритроцитов человека и минимальна для эритроцитов быка (рис. 2–4). Согласно работам [5, 8], различия в скорости гипотонического гемолиза эритроцитов млекопитающих могут быть обусловлены текучестью их мембран. Авторы этих работ полагают, что в эритроцитах, обладающих более жесткой мембраной, затруднено формирование гемолитических пор, что и обуславливает меньшую скорость гипотонического гемолиза этих клеток при одинаковом уровне повреждения (рис. 2–4).

При помещении эритроцитов в гипотоническую среду, содержащую $HgCl_2$, происходит взаимодействие ионов ртути с поверхностью клеточной мембраны. Связывание ионов ртути происходит как с липидами, так и с бел-

ками эритроцитарной мембраны. В работе [3] показано, что преимущественным местом связывания являются аминогруппы полярных головок фосфолипидов, в частности фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина, что приводит к значительному увеличению жесткости мембраны. Это, в свою очередь, обуславливает снижение способности клеточной мембраны к растяжению в гипотонической среде и, как следствие, увеличению уровня гемолиза. Известно [10], что эритроциты всех исследуемых видов млекопитающих незначительно отличаются по содержанию фосфатидилэтаноламина. В то же время содержание фосфатидилсерина в эритроцитах быка примерно в 1,5 раза выше, чем в эритроцитах человека и кролика. Следовательно, увеличение жесткости мембраны в результате модификации фосфатидилсерина ионами ртути может лежать в основе более значительного роста повреждения клеток быка при небольших концентрациях $HgCl_2$ (рис. 4) по сравнению с клетками кролика и человека (рис. 2, 3). К уменьшению текучести мембран может привести и взаимодействие $HgCl_2$ с белками мембран, поскольку возможно как прямое взаимодействие ионов ртути с белками, так и опосредованное влияние через фосфатидилсерин, участвующий в прикреплении цитоскелета к эритроцитарной мембране [9].

Известно, что взаимодействие ионов ртути с эритроцитами ведет к потере клетками ионов калия [4]. Это может приводить к уменьшению объема набухшей клетки, росту оптической плотности и, соответственно, снижению уровня конечного повреждения. Для эритроцитов кролика снижение конечного уровня повреждения происходит при меньших значениях концентрации хлорида ртути (рис. 3), чем для эритроцитов быка и человека. Это можно объяснить более высоким содержанием аквапоринов в эритроцитах кролика. Ртутьсодержащие вещества, в том числе и $HgCl_2$, взаимодействуют с аквапоринами, что проявляется в блокировании водного транспорта [6]. В условиях гипотонии это приведет к замедлению набухания клетки и в сочетании с выходом ионов калия является дополнительным фактором, обуславливающим снижение уровня конечного повреждения.

Однако следует отметить, что эритроциты быка являются низкокалиевыми клетками [1] и рост оптической плотности в этом случае нельзя объяснить уменьшением объема клеток из-за выхода ионов калия. Возможно, при увеличении концентрации $HgCl_2$ часть ионов ртути проникает внутрь клетки через повреждения мембраны и связывается с гемоглобином и цитоплазматическими белками, формируя комплексы, которые не могут покинуть клетку. Проведенные нами микроскопические исследования эритроцитов человека в гипотонических растворах в присутствии $HgCl_2$ выявили формирование крупных образований на поверхности эритроцита, предположительно в районе формирования гемолитической поры (данные не приведены). Вследствие этого может повышаться плотность самой клетки и, как следствие, оптическая плотность суспензии [7]. Также нельзя исключить возможность микровезикуляции, которая будет вносить вклад в рост оптической плотности в результате увеличения числа рассеивающих центров [4].

Заключение

Таким образом, наиболее подверженными повреждающему действию ионов ртути оказались эритроциты быка, так как для них наблюдалась наиболее выраженная активация гипотонического гемолиза. Для эритроцитов кролика характерен наименьший рост уровня гемолиза, однако снижение повреждения наблюдалось при более низкой концентрации $HgCl_2$, чем для эритроцитов других видов млекопитающих. Это может свидетельствовать о том, что нарушение водного транспорта в эритроцитах кролика наступает при более низких значениях концентрации $HgCl_2$. Тот факт, что вначале происходит активация гемолиза эритроцитов, связанная с увеличением жесткости мембраны, свидетельствует о том, что в первую очередь происходит взаимодействие ионов ртути с липидной компонентой мембраны. Взаимодействие ионов ртути с белками либо запаздывает, либо процесс взаимодействия занимает больше времени, и, как следствие, видимые результаты взаимодействия проявляются позже.

Список литературы

1. Комарова, Н. К. Физико-химические свойства эритроцитов крови человека и животных в норме и при некоторых эндогенных и экзогенных воздействиях на организм. Учебно-методическое пособие / Н. К. Комарова с соавт. – Оренбург : ОГАУ, 2003. – 20 с.

2. Шпакова, Н. М. Осмотичний і температурний стресс еритроцитів різних видів ссавців / Н. М. Шпакова // Біологія тварин. – 2011. – Т. 12. – № 1. – С. 382–391.

3. Delnomdedieu, M. Interaction of inorganic mercury salts with model and red cell membranes: importance of lipid binding sites / M. Delnomdedieu, J. W. Allis // Chem Biol Interact. – 1993 – Vol. 88. – № 1. – P. 71–87.

4. Kyung-Min, Lim. Low-level mercury can enhance procoagulant activity of erythrocytes: a new contributing factor for mercury-related thrombotic disease / Lim Kyung-Min et. al // Environ Health Perspect. – 2010. – Vol. 118. – № 7. – P. 928–935.

5. Minetti, M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells / M. Minetti, M. Ceccarini, A. M. Di Stasi // J Cell Biochem. – 1984. – Vol. 25. – № 2. – P. 61–72.

6. Pribush, A. Kinetics of erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media / A. Pribush, D. Meyerstein, N. Meyerstein // Biochim Biophys Acta. – 2002. – Vol. 1558. – № 2. – P. 119–132.

7. Salhany, J. M. Light-scattering measurements of hemoglobin binding to the erythrocyte membrane. Evidence for transmembrane effects related to a disulfonic stilbene binding to band 3 / J. M. Salhany, K. A. Cordes, E. D. Gaines // Biochemistry. – 1980. – Vol. 19. – № 7. – P. 1447–1454.

8. Sato, Y. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes. / Y. Sato, H. Yamakose // Biol Pharm Bull. – 1993. – Vol. 16. – № 5. – P. 506–12.

9. Yawata, Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model / Y. Yawata. – Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003. – 448 p.

10. Wessels, J. M. C. 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 / J. M. C. Wessels, J. H. Veerkamp // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – Vol. 291. – № 1. – P. 190–196.

JSAP
JOURNAL OF SMALL ANIMAL PRACTICE
РОССИЙСКОЕ ИЗДАНИЕ

Издательский дом **«Логос Пресс»** представляет вашему вниманию первое переводное оригинальное научно-практическое издание для ветеринарных врачей, освещающее проблемы лечения и профилактики заболеваний мелких домашних животных – журнал **«JSAP /Российское издание»**.

Данный проект – Российская версия журнала «Journal of Small Animal Practice» – официального печатного органа Британской ассоциации ветеринарии мелких домашних животных (BSAVA), осуществляющей свою деятельность с 1957 года.

На страницах издания публикуются обзорные статьи, результаты исследований и описания клинических случаев, авторами которых являются специалисты ведущих мировых центров ветеринарной науки и практики. В рубрике «Российская ветеринарная практика» представлены материалы о новых лекарственных средствах и принципах фармакотерапии мелких домашних животных.

Журнал представляет теоретическую и практическую ценность для ветеринарных врачей различных специальностей, студентов и преподавателей профильных ВУЗов.

Номера журнала представлены в Российской книжной палате, центральных библиотеках РФ, научной электронной библиотеке (НЭБ) и на сайте издательства www.jsap.ru.

Наши координаты:
E-mail: info@logospress.ru, *тел.:* + 7 (495) 220-48-16, *факс:* + 7 (499) 978-57-43

реклама