ISSN 1681-0015

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

БІОЛОГІЯ ТВАРИН

(науково-теоретичний журнал)

Том 8 1 - 2

Львів – 2006

УДК 57.043:591.111.1

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ГІПЕРТОНІЧНОГО КРІОГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ РІЗНИХ ВИДІВ ТВАРИН ПРИ ЗМІНІ ОСМОТИЧНИХ І ТЕМПЕРАТУРНИХ УМОВ СЕРЕДОВИЩА

С. С. ЄРШОВ, Н. В. ОРЛОВА, Н. М. ШПАКОВА

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Проведено порівняльний аналіз гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців (бика, коня і собаки) при зміні осмотичних і температурних умов середовища. Виявлені різниці у розвитку гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів бика, які обумовлені особливостями будови і складу його еритроцитарних мембран.

Ключові слова: ЕРИТРОЦИТИ ССАВЦІВ, ГІПЕРТОНІЧНИЙ КРІОГЕМОЛІЗ, ТЕМПЕРАТУРА, ГІПЕРТОНІЧНЕ СЕРЕДОВИЩЕ.

Ушкодження еритроцитів людини при охолодженні до температури близько 0 °С настає тільки після їхньої попередньої експозиції в гіпертонічному середовищі до початку охолодження. Це явище називають "холодовим шоком" або "гіпертонічним кріогемолізом" еритроцитів. Термін "гіпертонічний кріогемоліз" підкреслює відмінну рису явища гемолізу еритроцитів при охолодженні до температур близько 0 °С – необхідність попередньої експозиції еритроцитів у гіпертонічних розчинах. Зазначене явище добре вивчено на еритроцитах людини: встановлені особливості, закономірності, часові і температурні залежності [1, 2].

Еритроцити ссавців, що характеризуються багатьма загальними рисами будови еритроцитарної мембрани і протікання біохімічних реакцій, можуть відрізнятися не тільки складом білкового і ліпідного компонентів мембрани, але й особливостями гомеостазу клітин. Крім того, еритроцити ссавців можуть розрізнятися за розмірами клітин, а отже – площею поверхні та об'ємом.

Враховуючи вищесказане, метою нашого дослідження було вивчити особливості розвитку гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців, що відрізняються між собою за складом еритроцитарних мембран та цитоплазми, а також вплив змін осмотичності та температури на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів бика, коня і собаки.

Матеріали і методи

Еритроцити одержували з крові бика, собаки, коня, до якої додавали глюгіцировий консервант (n=6). Усі використані середовища готували на 0,01 М фосфатному буфері, pH 7,4. Осмолярність розчинів визначали на осмометрі ОМКА 1Ц-01. Гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів проводили шляхом перенесення еритроцитів у розчини з відповідною концентрацією NaCl та інкубували при температурі 37 °С протягом 10 хв, потім переносили

аліквоту в розчин NaCl, охолоджений до температури 0 °С, на 10 хв. Кінцевий гематокрит – 0,4 %.

При дослідженні впливу різних температур інкубації на етапах I і II 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.

У роботі використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації "хч" і "чда".

Результати й обговорення

Процес гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів складається з двох етапів: перший – інкубування еритроцитів у гіпертонічному середовищі при температурі 37 °С (етап I), другий – охолодження клітин до 0 °С у середовищі тієї ж тонічності (етап II).

На рис. 1 показана залежність гемолізу еритроцитів ссавців (бика, коня, собаки) від концентрації NaCl у середовищі після охолодження клітин від 37 до 0 °С. Встановлено, що гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів коня і собаки починає розвиватися в середовищах, які містять 0,6 М NaCl (1170 мОсмол/кг), а клітин бика у 0,8 М NaCl (1380 мОсмол/кг).

Концентраційні криві гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів характеризуються чітко вираженим максимумом, за винятком клітин бика. Еритроцити собаки мають максимально виражений гемоліз у середовищі, що містить 1,2 М NaCl, а коня у 1,4 М NaCl. Аналогічні концентраційні залежності раніше були отримані для клітин людини [2, 3], однак існували деякі розбіжності відносно осмолярності середовища, в якому виявлялося максимальне пошкодження еритроцитів. Більшість дослідників вважають, що в 1,2 М NaCl еритроцити людини піддаються найбільшому пошкодженню [3, 4]. Для еритроцитів бика (рис. 1) після невеликого максимуму (у середовищі 1,2 М NaCl) спостерігається деяке подальше підвищення рівня лізису клітин при збільшенні концентрації солі в середовищі.

Відомо, що маленькі еритроцити стійкіші до гіперосмотичного середовища у порівнянні з великими [5]. Однак у випадку гіпертонічного кріогемолізу, коли на клітини діють підвищена осмолярність і охолодження, ми не виявили такої залежності. Еритроцити бика, що значно менші за розміром від клітин собаки, але близькі за розміром до клітин коня [6], виявилися більш стійкими до стресового впливу (рис. 1).

Отримані нами результати узгоджуються з даними про різне відношення між вмістом фосфатидилхоліну і сфінгомієліну в мембрані еритроцитів досліджуваних видів тварин. Так, найвище відношення між вмістом цих фосфоліпідів у мембрані еритроцитів собаки (4,343) корелює з найбільшим рівнем гіпертонічного кріогемолізу (95%), у коня ці показники становлять відповідно 3,141 – 80%, у бика – 0,136 і 35%. Відношення між вмістом цих фосфоліпідів у мембрані є одним з факторів, що визначає текучість мембрани. Є дані [7], що еритроцити ссавців з низьким відношенням цих фосфоліпідів (рідинний стан) менше ушкоджуються при дії катіонних пептидів, ніж еритроцити з високим відношенням. Така ж залежність спостерігається і при гіпертонічному кріогемолізі: еритроцити бика мають самий низький рівень гіпертонічного кріогемолізу (1,2 М NaCl) – 35%.

Якщо рівень ізотермічного (37 °С) гемолізу еритроцитів ссавців у розчинах NaCl з концентрацією 1,00–2,25 М не перевищує 5 %, то можна вважати, що внесок спонтанного гемолізу еритроцитів ссавців на етапі попередньої інкубації при температурі 37 °С при гіпертонічному кріогемолізі незначний [8].

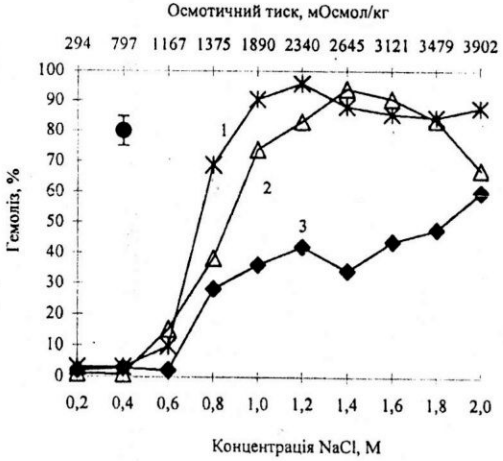


Рис. 1. **Залежність рівня гемолізу еритроцитів ссавців від концентрації NaCl в середовищі при охолодженні від 37 до 0 °С: 1–собака, 2–кінь, 3–бик**

При дослідженні методом ЕПР спектрометрії з використанням жирнокислотного спінового зонда структурно-динамічного стану мембран еритроцитів людини, які знаходяться у гіпертонічних розчинах NaCl, було показано поступове зниження плинності мембрани аж до 900 мОсм/кг, після чого цей показник залишався незмінним [9]. Про слабку залежність мікров'язкості від іонної сили середовища повідомляють і інші автори [10].

Визначальною у гемолітичному ушкодженні еритроцитів є різка зміна температури у діапазоні від 37 до 0 °С, а роль тонічності середовища, що збільшується, полягає у зміні сенсибілізації клітин до цього впливу. Очевидно, внаслідок збільшення тонічності середовища у клітині накопичуються сховані ушкодження, які виявляються вже на етапі охолодження до 0 °С.

Для подальших експериментів при дослідженні особливостей гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців було використано електролітне середовище з осмолярністю 2340 мОсмол/кг (1,2 М NaCl), у якому рівень пошкодження клітин максимальний або досить виражений. Крім того, такий вибір середовища був обумовлений також необхідністю порівняння наших результатів з даними, отриманими іншими дослідниками [3, 4].

Виходячи з того, що зміна температури є одним з найважливіших факторів гіпертонічного кріогемолізу, становило інтерес дослідити вплив температури інкубаційного середовища на процес кріогемолізу еритроцитів у досліджуваних видів тварин.

Дослідження впливу температури на розвиток гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів проводили у 2-х варіантах: варіювали температуру 1-го етапу гіпертонічного кріогемолізу у діапазоні 5–37 °С при постійній температурі 2-го етапу (0 °С) або змінювали температуру 2-го етапу (5–37 °С) при незмінному температурному режимі 1-го етапу (37 °С).

На рис. 2 подані величини гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів, отримані при охолодженні клітин до 0 °С від різних значень температур у середовищі, що містить 1,2 М NaCl. Початком лізису клітин вважали перевищення рівня гемолізу 10 %. Проведені дослідження показали, що еритроцити собаки починають гемолізувати при охолодженні від

15 до 0 °С. Подальше підвищення температури на 1-му етапі гіпертонічної інкубації супроводжується досить повільним збільшенням гемолізу клітин. Лізис еритроцитів коня починає розвиватися при зміні температури від 20 до 0 °С. Оскільки кут нахилу лінійної ділянки кривої кріогемолізу еритроцитів коня більший, ніж у клітин собаки, можна говорити про інтенсивніший розвиток процесу лізису еритроцитів у вказаних температурних інтервалах. Початкове ушкодження клітин бика у гіпертонічному середовищі спостерігається в тому випадку, коли охолодження суспензії вібувається від досить високої температури (33 °С), у порівнянні з ушкодженням еритроцитів собаки і коня. Отже, ми спостерігаємо деяку видову специфіку розвитку гемолітичного процесу еритроцитів тварин досліджуваних видів, обумовленого різними температурами 1-го етапу кріогемолізу.

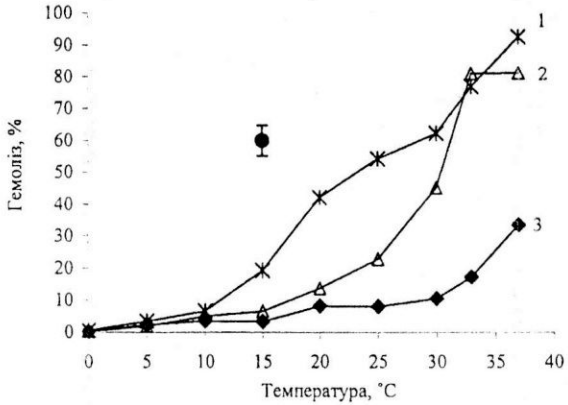


Рис. 2. **Залежність рівня гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців від початкової температури інкубації в середовищі, яке містить 1,2 М NaCl: 1–собака, 2–кінь, 3–бик**

Дані, отримані при зміні температурного режиму, що полягав у варіюванні температури на 2-му етапі кріогемолізу при фіксованій температурі 1-го етапу (37 °С), подані на рис. 3. З них видно, що еритроцити собаки і коня виявляють чутливість у гіпертонічному середовищі при охолодженні до 15 °С, при цьому профілі гемолітичних кривих майже ідентичні. Характер розвитку гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів бика інший: по-перше, вихід гемоглобіну з клітин спостерігається при охолодженні від 37 до 5 °С і, по-друге, інтенсивність літичного процесу менш виражена. Таким чином, варіювання температури на 2-му етапі кріогемолізу дозволило виявити подібність у розвитку гемолітичного ушкодження еритроцитів собаки і коня та суттєву відмінність реакції клітин бика на охолодження в гіпертонічному середовищі.

Деякі автори температурну залежність холод-індукованого гіпертонічного лізису інтактних еритроцитів людини досліджували при інкубуванні клітин у 0,9 М розчині сахарози при різних температурах (9–46 °С) і наступному охолодженні до 0 °С. Вони спостерігали відсутність ушкодження клітин при температурі нижче 18 °С. Протектуючий ефект низької температури на 1-му етапі автори пояснюють формуванням холестерин-збагачених доменов, що призводять до зміни стану бішару і/або конформації

мембраннопов'язаних білків [11]. У роботі [2] критичною температурою розвитку гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів у електролітних і неелектролітних середовищах була температура 12 °С.

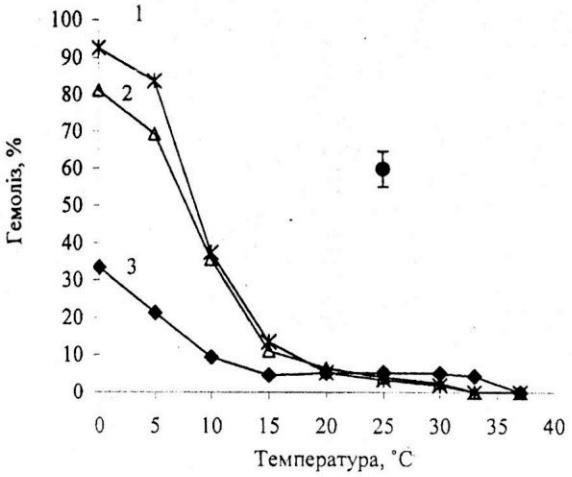


Рис. 3. **Залежність рівня гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців від кінцевої температури інкубації в середовищі, яке містить 1,2 М NaCl: 1–собака, 2–кінь, 3–бик**

Отримані нами результати і дані літератури [2–4, 11] свідчать про певну схожість реакцій еритроцитів людини та клітин коня і собаки на сукупну дію підвищеної осмолярності й охолодження (гіпертонічний кріогемоліз) і чітко виявлені відмінності у реакціях еритроцитів бика в аналогічних умовах.

При дослідженні фазових переходів у сферичних бішарних мембранах, виготовлених із сумарних мембранних ліпідів еритроцитів бика, методом ЕПР спектрометрії були виявлені конформаційні зміни в ліпідних бішарах при температурі 36–38 °С [12]. Про наявність переходу при температурі 33–36 °С свідчать і результати, отримані при вивченні особливостей транспорту води в еритроцитах бика [13]. Слід зазначити, що температурна залежність осмотичної крихкості еритроцитів бика залежить від віку тварини: якщо для телят точка перегину кривої осмотичної крихкості відзначена при 20 °С, то для дорослих тварин вона зсувається до вищих значень температур і виявляється при 30 °С [14]. Крім того, мембрани еритроцитів бика відрізняються від еритроцитів інших тварин за вмістом фосфоліпідів, до складу яких входить холін. Мембрани еритроцитів бика не містять фосфатидилхоліну, або мають його у слідових кількостях, вони збагачені сфінгомієліном, що характеризується температурою фазового переходу у межах 20–37 °С [15].

При вивченні впливу цілого ряду гемолізинів на еритроцити ссавців була показана їхня різна стійкість. Зокрема, за чутливістю еритроцитів ссавців до гемолізину з Fusobacterium necrophorum клітини коня і собаки відносяться до високочутливих, у той час як еритроцити бика – до низькочутливих [16]. У роботі [17] вивчався гемоліз еритроцитів

людини і тварин під дією serratamic acid з Serratia marcescens і було показано, що клітини людини, коня і кролика, які містять фосфатидилхолін, гемолізують у зазначених умовах, на відміну від еритроцитів барана і бика, у яких практично відсутній зазначений фосфоліпід. Додавання до середовища екзогенного фосфатидилхоліну супроводжувалося пригніченням гемолітичного процесу. Аналогічні результати були отримані при дослідженні дії Т-2 токсину на еритроцити ссавців, тобто спостерігалося ушкодження тільки клітин, мембрани яких містять фосфатидилхолін [18].

Про важливу роль фосфоліпідів, до складу яких входить холін, у гіпертонічному кріогемолізі свідчать також дані інших авторів [19]. Зокрема встановлено, що втрата мембранами еритроцитів людини фосфатидилхоліну і сфінгомієліну супроводжується зниженням рівня гіпертонічного кріогемолізу.

Таким чином, можна вважати, що відмінності у розвитку гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів бика обумовлені особливостями будови і складу його еритроцитарних мембран.

Висновки

Гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів ссавців починає розвиватися у середовищі з концентрацією NaCl, що перевищує 0,6 М, і досягає максимуму в 1,2–1,4 М NaCl. Виявлено певну схожість розвитку гемолітичного процесу еритроцитів коня і собаки в умовах поєднаної дії підвищеної осмолярності й охолоджування середовища на відміну від еритроцитів бика.

S. S. Yershov, N.V. Orlova, N. M. Shpakova

COMPARATIVE ANALYSIS OF HYPERTONIC CRYOHEMOLYSIS ERYTHROCYTES OF DIFFERENT SPECIES OF ANIMALS AT VARYING OF OSMOTIC AND TEMPERATURE ENVIRONMENT CONDITIONS

Summary

The comparative analysis of hypertonic cryohemolysis of mammal erythrocytes (bull, horse and dog) has been conducted at the change of osmotic and temperature conditions of environment. The distinguishing features of hypertonic cryohemolysis development of bovine erythrocytes have been discovered which has been determined by the structure and composition peculiarities of bovine erythrocyte membranes.

Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine

1. *Dubbelman T.V.A.R., de Bruijne A.W., Christianse K., van Steveninck J.* Hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // J. Membrane Biol. – 1979. – 50, № 3–4. – P. 225–240.
2. *Takahashi T., Williams R. J.* Thermal shock hemolysis in human red cells. I. The effects of temperature, time,and osmotic stress // Cryobiology. – 1983. – 20, № 5. – P.507–520.
3. *Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Бабийчук Л. А.* Температурозависимые изменения структуры эритроцитов. Сообщение 1. Роль ионов и фазовых переходов в индукции процессов криогемолиза // Криобиология и криомедицина. – 1983. – № 12. – С. 13–24.
4. *Шпакова Н. М., Бондаренко В. А.* Действие хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов // Биохимия. – 1991. – 56, № 12. – С. 2125–2130.
5. *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.
6. *Клибрин А. И., Тиунов Л. А.* Функциональная неравнозначность эритроцитов. – Л.:, Наука, 1974.– 148 с.

7. *Oyewale J. O.* Changes in osmotic resistance of erythrocytes of cattle, pigs, rats and rabbits during variation in temperature and pH // Zentralbl Veterinarmed A. – 1992. – 39, № 2. – P. 98–104.
8. *Ершов С. С., Орлова Н. В., Шпакова Н. М.* Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды // Пробл. криобиологии. – 2004. – № 3. – С. 51–57.
9. *Takahashi T., Noji S., Erbe E. F., et al.* Cold shock hemolysis in human erythrocytes studied by spin probe method and freeze-fracture electron microscopy // Biophys. J. – 1986. – 49, № 2. – P. 403–410.
10. *Herrmann A., Frnold K., Lassmann G., Glaser R.* Structural transitions of the erythrocyte membrane: an ESR approach // Acta Biol. Med. Ger. – 1982. – 41, № 4. – P. 289–298.
11. *Gordon L. M., Mobley P. W.* Thermotropic lipid phase separations in human erythrocyte ghosts and cholesterol-enriched rat liver plasma membranes // J. Membrane Biol. – 1984. – 79, № 1. – P. 75–86.
12. *Langner M., Komorowska M., Koter M., Gomulkiewicz J.* Phase transitions in spherical bilayer membranes prepared of bulk erythrocyte membrane lipids // Gen. Physiol. Biophys. – 1984. – 3, № 6. – P. 521–526.
13. *Langner M, Galdzicki Z, Gomulkiewicz J.* A method for the determination of the filtration coefficient for spherical bilayers prepared from bulk erythrocyte membrane lipids // Gen. Physiol. Biophys. – 1986. – 5, № 2. –P. 193–199.
14. *Imre S.* Comparative study of the transition temperature of calf and adult cattle erythrocytes // Blut. – 1983. – 46, № 5. – P. 289–293.
15. *van Dijck P.W.M., van Zoelen E.J.J., Seldenrijk R., et al.* Calorimetric behaviour of individual phospholipids classes from human and bovine erythrocyte membranes // Chem. Phys. Lipids. – 1976. – 17, № 2–3. – P. 336–343.
16. *Amoako KK, Goto Y, Misawa N, Xu DL, Shinjo T.* Interactions between Fusobacterium necrophorum hemolysin, erythrocytes anderythrocyte membranes // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – 150, № 1. – P. 101–106.
17. *Miyazaki Y, Hara-Hotta H, Matsuyama T, Yano I.* Hemolysis of phosphatidylcholine-containing erythrocytes by serratamic acid from Serratia marcescens // Int. J. Biochem. – 1992. – 24, № 7. – P. 1033–1038.
18. *DeLoach J. R., Gyongyossy-Issa M. I., Khachatourians G. G.* Species-specific hemolysis of erythrocytes by T-2 toxin // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1989. – 97, № 1. – P. 107–112.
19. *Green L. A. D., Hui H. L., Green F. A., et al.* The role of choline phospholipids in hypertonic cryohemolysis // Cryobiology. – 1983. – 20, № 1. – P. 25–29.