

... КРІОБІОЛОГІЯ ... CRYOBIOLOGY ...

УДК: 577.352.547.42

Исследование кинетики детергентного гемолиза эритроцитов, модифицированных ДМСО Е.М.Корниенко

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
geniakor@rambler.ru*

Изучена кинетика гемолиза эритроцитов под действием детергента Тритон X-100 в зависимости от концентрации проникающего криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО). Обнаружено, что развитие гемолитического ответа в присутствии ДМСО имеет стадийный характер. Рассчитаны свободные энергии Гиббса процесса разрушения эритроцитов на разных стадиях детергентного гемолиза. Рассмотрены возможные механизмы защитного действия ДМСО на гемолиз эритроцитов под действием Тритона X-100.

Ключевые слова: эритроциты, кинетика гемолиза, ДМСО, Тритон X-100, свободная энергия Гиббса.

Дослідження кінетики детергентного гемолізу еритроцитів, модифікованих ДМСО Є.М.Корнієнко

Вивчено кінетику гемолізу еритроцитів під дією детергенту Тритон X-100 в залежності від концентрації проникаючого криопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО). Виявлено, що розвиток гемолітичної відповіді в присутності ДМСО має стадійний характер. Розраховані вільні енергії Гіббса процесу руйнування еритроцитів на різних стадіях детергентного гемолізу. Розглянуто можливі механізми захисної дії ДМСО на гемоліз еритроцитів під дією Тритона X-100.

Ключові слова: еритроцити, кінетика гемолізу, ДМСО, Тритон X-100, вільна енергія Гіббса.

The study of the kinetics of detergent hemolysis of erythrocytes modified with DMSO Ye.M.Korniyenko

The kinetics of hemolysis of erythrocytes under the influence of the detergent Triton X-100, depending on the concentration of the penetrating cryoprotectant dimethylsulfoxide (DMSO) has been studied. It has been found that development of hemolytic response in the presence of DMSO has phasic nature. Gibbs free energies of process of destruction of red blood cells at different stages of detergent hemolysis have been calculated. Possible mechanisms of protective effect of DMSO on hemolysis under the influence of Triton X-100 have been considered.

Key words: erythrocytes, kinetics of hemolysis, DMSO, Triton X-100, Gibbs free energy.

Введение

Диметилсульфоксид (ДМСО) является одним из наиболее эффективных проникающих криопротекторов (Григорян и др., 2009), который благодаря высокой защитной эффективности, относительно низкой токсичности и обратимости оказываемых эффектов получил широкое распространение при криоконсервировании биологических объектов разного уровня организации (Коваленко и др., 2009).

Предполагаемый механизм защитного действия ДМСО от низких температур при замораживании заключается в том, что, проникая внутрь клетки, он препятствует образованию и росту кристаллов льда из внутриклеточной воды, сохраняя, таким образом, целостность клетки. Показано также, что ДМСО способен защищать клетки от других разрушающих факторов, в том числе детергентов (Черницкий, Сенькович, 1997). В настоящее время, однако, механизмы этой защиты, в

частности концентрационные эффекты стабилизирующего действия ДМСО на клетки, изучены недостаточно (Коваленко и др., 2009; Черницкий, Сенькович, 1997; Линник и др., 2010; Dyubko et al., 2006).

Целью данной работы было изучение концентрационной зависимости защитного действия ДМСО на эритроциты при их гемолизе, вызванном детергентом Тритон X-100, и определение энергетических параметров этого процесса.

Материалы и методы

Материалом исследования служили эритроциты, которые получали из эритроцитарной массы, заготовленной на глюцицированном консерванте из крови II группы Rh(+) мужчин-доноров на Харьковской областной станции переливания крови. Непосредственно перед экспериментом эритроциты четырёхкратно отмывали путем центрифугирования в течение 3 мин при 3000 об/мин на центрифуге ОПн – ЗУХЛ4.2. в 10-кратном объеме 0,15 моль/л NaCl при комнатной температуре. Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией.

Модификацию эритроцитов производили 40-минутной экспозицией с ДМСО в концентрациях 5% (об.), 12% (об.), 15% (об.), 20% (об.) (гематокрит 40–45 %). Контролем были клетки, не подвергавшиеся действию ДМСО. Гемолиз проводили, добавляя к суспензии эритроцитов в криопротекторной среде, содержащей ДМСО, раствор Тритона X-100 в H₂O до конечной концентрации 1,87·10⁻³% (об). Концентрация клеток в образцах составляла 10⁶ кл/мл.

Кривые гемолиза эритроцитов регистрировали по изменению оптической плотности образцов, которое записывали на спектрофотометре Coleman при длине волны λ=670 нм и при непрерывном щадящем перемешивании (Хакл и др., 2008). Полученные данные передавались в компьютер по интерфейсу USB, на электронный USB самописец на базе микроконтроллера АТМ mega16 с программным обеспечением и усилителем сигнала. Регистрацию сигнала проводили с частотой 1 с.

Константы скорости гемолиза определяли по тангенсу угла наклона соответствующих участков кинетических кривых на их полувысотах и рассчитывали свободную энергию Гиббса процесса разрушения эритроцитов по модифицированному уравнению Эйринга (Эйринг и др., 1983):

$$\Delta G = -RT \ln(k'h/kT) \quad (1),$$

где – ΔG свободная энергия Гиббса; R – универсальная газовая постоянная – 8,31 Дж/К×моль; T – температура в градусах Кельвина; h – постоянная Планка – 6,63×10⁻³⁴ Дж/с; k – постоянная Больцмана – 1,38×10⁻²³ Дж/К; k' – константа скорости процесса.

Расчеты ΔG проводили с помощью программы Origin Pro 8.5.

На стадии торможения гемолиза под действием ДМСО рассчитывали также коэффициенты корреляций между его концентрацией и временем, скоростью гемолиза по формуле (Ферстер, Ренц, 1983):

$$r_{xy} = \{n\sum(x_i \cdot y_i) - \sum x_i \cdot \sum y_i\} / \sqrt{\{n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2\} \{n\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2\}} \quad (2),$$

где r_{xy} – коэффициент линейной корреляции Пирсона, x – время либо скорость гемолиза; y – концентрация ДМСО, между которыми рассчитывается коэффициент корреляции, n – число измерений.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными программами Microsoft Excel с использованием критериев достоверности Стьюдента и Манна-Уитни. Достоверными считали результаты с p<0,05.

Кривые, представленные на рисунках, являются типовыми для серии повторяемых опытов (не меньше трех).

Результаты и обсуждение

На рис.1 приведены кривые гемолиза эритроцитов под действием Тритона X-100 при разных концентрациях ДМСО по сравнению с контролем. Как видно, процесс развития гемолиза образцов эритроцитов – как контрольных, так и модифицированных ДМСО, имеет выраженный стадийный характер.

Во всех случаях первая стадия гемолиза – латентная, на которой преобладающим процессом является образование бесспектриновых везикул, протекает медленно, и количество разрушенных на этой стадии эритроцитов очень мало (Черницкий, Сенькович, 1997; Иванов, 2001; Черницкий и др., 2000)

С повышением концентрации ДМСО время прохождения этой стадии увеличивается, а количество разрушенных эритроцитов, судя по уменьшению крутизны соответствующего участка кинетических кривых, снижается по сравнению с контролем.

Следующий участок кинетических кривых намного круче и отражает вторую стадию гемолиза эритроцитов – процесс образования пор в мембране, в результате чего происходит коллоидно-осмотический лизис клеток, заканчивающийся полным разрушением мембран и выходом из них гемоглобина.

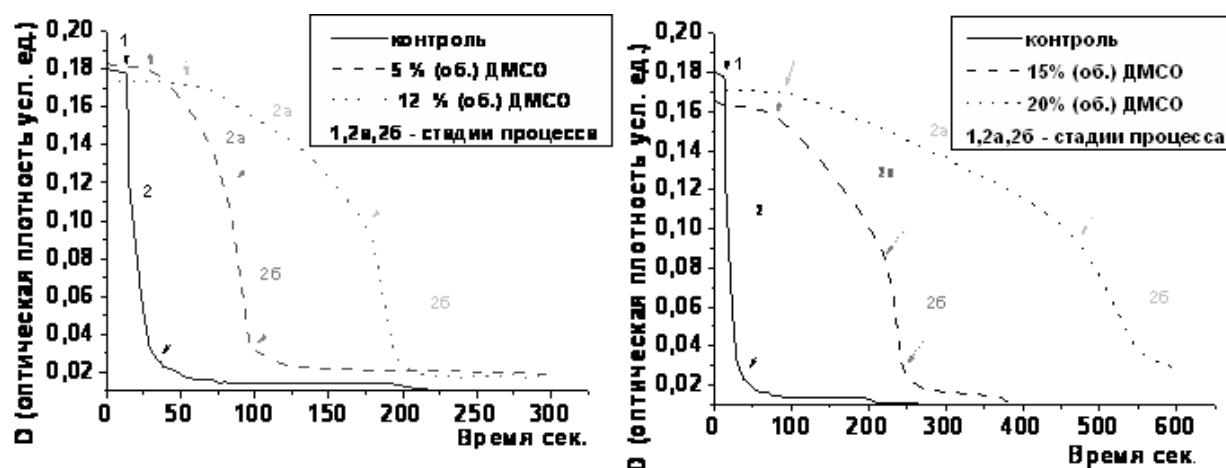


Рис. 1. Влияние концентрации ДМСО на кинетику гемолиза эритроцитов под действием Тритона X-100

Именно на второй стадии защитное действие ДМСО становится наиболее выраженным. Участок кинетической кривой гемолиза контрольных эритроцитов, отражающий эту стадию, – гладкий, с постоянной на всём его протяжении крутизной.

Этот же участок кривой гемолиза эритроцитов, модифицированных ДМСО, состоит из двух частей – 2а и 2б. Крутизна первой меньше, а второй – практически та же, что и для контрольных эритроцитов. Таким образом, скорость гемолиза эритроцитов, модифицированных ДМСО, в начале второй стадии, на участке 2а, замедляется, и, соответственно, увеличивается его время. Точка перегиба между частями 2а и 2б участка кинетических кривых, отражающих эту стадию, соответствует моменту, когда защитное действие ДМСО практически заканчивается.

Снижение скорости разрушения эритроцитов на второй стадии приводит к снижению средней скорости и увеличению общего времени полного детергентного гемолиза модифицированных эритроцитов по сравнению с контролем.

В табл. 1 приведены рассчитанные по кинетическим кривым значения времён общего гемолиза, его средней скорости, скорости гемолиза на его второй стадии, а также соответствующих свободных энергий Гиббса, подсчитанных по формуле (1) для контрольных и модифицированных ДМСО эритроцитов.

Как видно, наибольший защитный эффект наблюдается при обработке эритроцитов 20% раствором ДМСО. Так, у модифицированных эритроцитов по сравнению с контрольными скорость гемолиза на стадии 2а снижается в 12 раз, на стадии 2б – в 4 раза, а величина энергии их разрушения на этих стадиях значимо выше, чем у клеток, не обработанных ДМСО.

Для оценки роли различных концентраций ДМСО в защите эритроцитов от действия Тритона X-100 методом наименьших квадратов были построены зависимости величин скорости и времени

гемолиза клеток от этих концентраций на стадии 2а, когда защитное действие протектора выражено наиболее сильно (рис. 2).

Таблица 1.

Влияние концентрации ДМСО (%об) на общее время гемолиза t (с); на скорости гемолиза: среднюю – v_{cp} , стадий 2а – v_{2a} и 2б – $v_{2б}$ (D усл. ед./с) и свободную энергию Гиббса разрушения эритроцитов на стадиях 2а – ΔG_{2a} и 2б – $\Delta G_{2б}$ (кДж/моль)

Концентрация ДМСО	t	v_{cp}	Стадия 2а		Стадия 2б	
			v_{2a}	ΔG_{2a}	$v_{2б}$	$\Delta G_{2б}$
0	75±2,53	(2,17±0,40)·10 ⁻³	(2,2±0,56)·10 ⁻³	85,92±0,47	-/-	-/-
5	100±2,91*	(1,53±0,17)·10 ⁻³ *	(0,84±0,03)·10 ⁻³ *	84,96±0,07*	(2,61±0,30)·10 ⁻³	83,55±0,42
12	200±4,10*	(0,74±0,07)·10 ⁻³ *	(0,68±0,02)·10 ⁻³ *	85,88±0,08	(2,21±0,33)·10 ⁻³	83,39±0,48
15	250±4,58*	(0,56±0,04)·10 ⁻³ *	(0,76±0,05)·10 ⁻³ *	86,03±0,11	(2,14±0,18)·10 ⁻³ *	83,31±0,22
20	570±6,90*	(0,24±0,01)·10 ⁻³ *	(0,18±0,002)·10 ⁻³ *	88,88±0,03*	(0,58±0,01)·10 ⁻³ *	86,20±0,07*

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) относительно контроля.

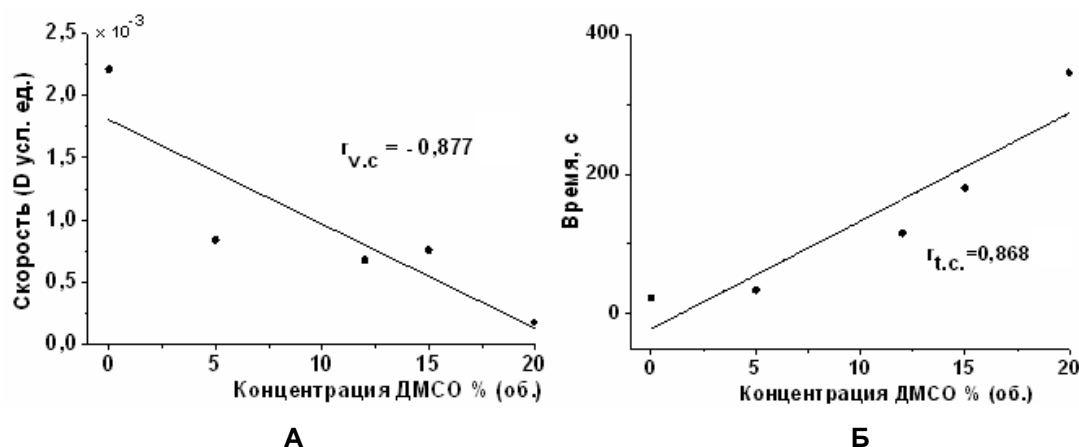


Рис. 2. Зависимости скорости (А) и времени (Б) протекания гемолиза эритроцитов под действием Тритона X-100 от концентрации ДМСО на стадии 2а

Поскольку полученные зависимости представляют собой прямые, по формуле (2) были рассчитаны коэффициенты линейной корреляции Пирсона между временем и скоростью гемолиза и концентрацией ДМСО. Результаты расчётов приведены в табл. 2.

Таблица 2.

Коэффициенты линейной корреляции между временем t_2 и скоростью гемолиза v_2 на стадии 2а и концентрацией ДМСО

Показатель	С
t_2	$r_{tc}=0,868$
v_2	$r_{vc}=-0,877$

В соответствии с ними для концентрации ДМСО существует высокая положительная корреляция со временем и отрицательная – со скоростью гемолиза на стадии 2а.

Для обсуждения возможного механизма защиты эритроцитов от действия Тритона X-100 обработкой ДМСО следует рассмотреть как возможные пути взаимодействия этих веществ с одними и теми же структурными компонентами клеточной мембраны, так и непосредственно друг с другом.

Известны две модели сольюбилизации и фрагментации мембран детергентами. Первая – это кооперативное связывание молекул детергента с мембраной, последующий их перенос внутрь клетки и связывание с внутренним монослоем. Вторая – экстракция липидов из внешнего монослоя мембраны прямым переносом в детергентные мицеллы. В обоих случаях мембраны фрагментируются с образованием смешанных везикул, содержащих молекулы липидов или белков и детергентов. Сольюбилизация мембран неионным детергентом Тритон X-100 происходит, вероятнее всего, в результате кооперативного связывания преимущественно с липидными компонентами белоксодержащих мембран (Криобиология ..., 1987; le Maire et al., 2000).

Известно также, что ДМСО способен как проникать внутрь эритроцитов через гидрофильные белковые аквапориновые каналы, так и встраиваться в наружный липидный монослой плазматических мембран, взаимодействуя с их липидными и белковыми компонентами и изменяя их структурные свойства (Корниенко, Посохов, 2011; Давыдова, Гордиенко, 2009).

Таким образом, и Тритон X-100, и ДМСО являются, по-видимому, конкурентами во взаимодействии с одними и теми же структурными компонентами клеточной мембраны, в первую очередь, липидами. Поэтому предварительная обработка эритроцитов ДМСО должна снизить степень связывания Тритона X-100 с липидами мембраны и, соответственно, эффективность их деструкции этим детергентом.

Возможен и прямой механизм повышения структурной устойчивости мембран обработкой ДМСО за счёт образования водородных связей с молекулами структурной воды, взаимодействующими с макромолекулами мембран, что приводит к их стабилизации.

Выводы

Предварительная обработка эритроцитов ДМСО повышает их устойчивость к гемолизу под действием неионного детергента Тритона X-100. Между концентрацией ДМСО, временем и скоростью гемолиза существуют высокая положительная и отрицательная корреляции соответственно.

Список литературы

- Григорян К.Р., Маркарян Ш.А., Азнаурян М.Г. Влияние диметилсульфоксида и диэтилсульфоксида на термическую денатурацию человеческого альбумина // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т.19, №3. – С. 3–9. /Grigoryan K.R., Markaryan Sh.A., Aznauryan M.G. Vliyanie dimetilsul'foksida i diethylsul'foksida na termicheskuyu denaturatsiyu chelovecheskogo al'bumina // Problemy kriobiologii. – 2009. – Т.19, №3. – С. 3–9./
- Давыдова Е.В., Гордиенко О.И. Влияние температуры на проницаемость мембран эритроцитов для криопротекторов с различной степенью гидрофобности // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т.19, №3. – С. 261–272. /Davydova Ye.V., Gordiyenko O.I. Vliyanie temperatury na pronitsaemost' membran eritrotsitov dlya krioprotektorov s razlichnoy stepen'yu gidrofobnosti // Problemy kriobiologii. – 2009. – Т.19, №3. – С. 261–272./
- Иванов И.Т. Сравнение механизмов кислотного и щелочного гемолиза эритроцитов человека // Биофизика. – 2001. – Т.46, Вып.2. – С. 281–290. /Ivanov I.T. Sravneniye mekhanizmov kislotnogo i shelochnogo gemoliza eritrotsitov cheloveka // Biofizika. – 2001. – Т.46, Vyp.2. – С. 281–290./
- Коваленко Г.В., Коваленко И.Ф., Линник Т.П. Механизм транспорта ДМСО, глицерина и этиленгликоля через мембраны эритроцитов крысы и кролика // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2009. – Вип.10, №878. – С. 109–116. /Kovalenko G.V., Kovalenko I.F., Linnik T.P. Mekhanizm transporta DMSO, glitserina i etilenglikolya cherez membrany eritrotsitov krysy i krolika // Visnyk Kharkiv'skogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2009. – Vyp.10, №878. – С. 109–116./
- Корниенко Е.М., Посохов Е.А. Локализация проникающего криопротектора диметилсульфоксида в мембране эритроцитов: исследование методом флуоресцентных зондов // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2011. – Вип.14, №971. – С. 135–139. /Korniyenko Ye.M., Posokhov Ye.A. Lokalizatsiya pronikayushchego krioprotektora dimetilsul'foksida v membrane eritrotsitov: issledovaniye metodom fluorestsentnykh zondov // Visnyk Kharkiv'skogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2011. – Vyp.14, №971. – С. 135–139./
- Криобиология и биотехнология. Под ред. А.А.Цуцаевой и др. – К.: Наукова думка, 1987. – 215с. /Kriobiologiya i biotekhnologiya. Pod red. A.A.Tsutsayevoy i dr. – K.: Naukova dumka, 1987. – 215s./
- Линник Т.П., Дюбко Т.С., Мартынюк Н.И., Терещенко А.В. Взаимодействие криопротекторов с липосомами из суммарных липидов спермиев петуха // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т.20, №1. – С. 34–46. /Linnik T.P., Dyubko T.S., Martynyuk N.I., Tereshchenko A.V. Vzaimodeystviye krioprotektorov s liposomami iz summarnykh lipidov spermiyev petukha // Problemy kriobiologii. – 2010. – Т.20, №1. – С. 34–46./
- Ферстер Э., Рёнц Б. Методы корреляционного и регрессионного анализа. – М.: Финансы и статистика, 1983. – 303с. /Ferster E., Rents B. Metody korrelyatsionnogo i regressionnogo analiza. – M.: Finansy i statistika, 1983. – 303s./

Хакл Е.В., Берест В.П., Гаташ С.В. Устойчивость эритроцитов человека к гемолизу под действием полипептидного антибиотика грамицидина S // *Біофізичний вісник*. – 2008. – Т.20 (1). – С. 114–120. /Khaki Ye.V., Berest V.P., Gatash S.V. Ustoychivost' eritrotsitov cheloveka k gemolizu pod deystviyem polipeptidnogo antibiotika gramitsidina S // *Biofizychnyy visnyk*. – 2008. – Т.20 (1). – С. 114–120./

Черницкий Е.А., Сенькович О.А. Гемолиз эритроцитов детергентами // *Биологические мембраны*. – 1997. – Т.14, №4. – С. 385–393. /Chernitskiy Ye.A., Sen'kovich O.A. Gemoliz eritrotsitov detergentami // *Biologicheskiye membrany*. – 1997. – Т.14, №4. – С. 385–393./

Черницкий Е.А., Сенькович О.А., Розин В.В. Зависимость параметров гемолиза и везикуляции эритроцитов от концентрации Na-додецилсульфата: везикулярно-конкурентный гемолиз // *Биологические мембраны*. – 2000. – Т.17, №5. – С. 503–508. /Chernitskiy Ye.A., Sen'kovich O.A., Rozin V.V. Zavisimost' parametrov gemoliza i vezikulyatsii eritrotsitov ot kontsentratsii Na-dodetsilsulfata: vezikulyarno-konkuretnyy gemoliz // *Biologicheskiye membrany*. – 2000. – Т.17, №5. – С. 503–508./

Эйринг Г., Лин С., Лин С.М. Основы химической кинетики: Пер с англ. – М.: Мир, 1983. – 528с. /Eyring G., Lin S., Lin S.M. Osnovy khimicheskoy kinetiki: Per s angl. – М.: Mir, 1983. – 528s./

Dyubko T.S., Onishchenko E.V., Pivovarenko V.G. Influence of freezing and low molecular weight cryoprotectants on microsomal membrane structure: a study by multiparametric fluorescent probe // *J. Fluoresc.* – 2006. – Vol.16. – P. 817–823.

le Maire M., Champeil P., Moller J.V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol.1508, № 1–2. – P. 86–111.

Представлено: О.П.Бєлзоров / Presented by: O.P.Belozorov

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 13.03.2012