

••• КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ ••• BRIEF COMMUNICATIONS •••

УДК: 577.12:577.112:577.24

Влияние длительного введения *in vivo* низких доз Co^{2+} на гемолиз эритроцитов

У Сі, Є.М.Корнієнко, А.Д.Плотніков, І.С.Піріна, Е.В.Кот, Ю.Г.Кот, Е.Э.Перський

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
korgenia@gmail.com*

Изучено влияние внутрижелудочного введения в течение 15 и 36 суток Co^{2+} в дозах 0,012 и 0,06 мг/кг/сутки на гемолиз под действием HCl эритроцитов 3-месячных крыс породы Вистар. Животные были разделены на 5 групп. В группе 1 – контрольной – они получали чистую воду в течение 36 суток. В группах 2 и 3 – растворы CoCl_2 в вышеуказанных дозах в течение 15 суток, а группах 4 и 5 – в течение 36 суток. Растворы соли и воду вводили через внутрижелудочный зонд ежедневно. Эритроциты получали из цельной крови крыс. Гемолиз вызывали добавлением HCl до ее конечной концентрации 0,002 н. Кинетику гемолиза эритроцитов регистрировали по изменению оптической плотности образцов с шагом регистрации 1 с. В качестве показателей гемолиза были выбраны время структурной перестройки мембраны эритроцитов до начала процесса их разрушения и скорость ее разрушения. Показано, что ионы кобальта вносят дополнительное дестабилизирующее действие на мембраны эритроцитов. Этот эффект усиливается с увеличением дозы Co^{2+} и длительности его введения.

Ключевые слова: эритроциты, гемолиз, Co^{2+} .

Вплив тривалого введення *in vivo* низьких доз Co^{2+} на гемоліз еритроцитів

У Сі, Є.М.Корнієнко, А.Д.Плотніков, І.С.Піріна, К.В.Кот, Ю.Г.Кот, Є.Е.Перський

Вивчено вплив внутрішньошлункового введення впродовж 15 і 36 діб Co^{2+} в дозах 0,012 і 0,06 мг/кг/добу на гемоліз під дією HCl еритроцитів 3-місячних щурів породи Вістар. Тварини були розділені на 5 груп. У групі 1 – контрольній – вони отримували чисту воду протягом 36 діб. У групах 2 і 3 – розчини CoCl_2 у вищевказаних дозах протягом 15 діб, а групах 4 і 5 – протягом 36 діб. Розчини солі і воду вводили через внутрішньошлунковий зонд щодня. Еритроцити одержували з цільної крові щурів. Гемоліз індукували додаванням HCl до її кінцевої концентрації 0,002 н. Кинетику гемолізу еритроцитів реєстрували за зміною оптичної щільності зразків з кроком реєстрації 1 с. Як показники гемолізу були обрані час структурної перебудови мембрани еритроцитів до початку процесу їх руйнування і швидкість її руйнування. Показано, що іони кобальту вносять додаткову дестабілізуючу дію на мембрани еритроцитів. Цей ефект посилюється зі збільшенням дози Co^{2+} і тривалості його введення.

Ключові слова: еритроцити, гемоліз, Co^{2+} .

The influence of Co^{2+} low doses *in vivo* prolonged administration on the erythrocytes hemolysis

U Si, Ye.M.Korniyenko, A.D.Plotnikov, I.S.Pyrina, Ye.V.Kot, Yu.G.Kot, Ye.E.Persky

The effect of intragastric injection of Co^{2+} in doses of 0.012 and 0.06 mg/kg/day for 15 and 36 days on the hemolysis of 3-month-old Wistar rats red blood cells by the action of HCl has been studied. The animals were divided into 5 groups. Group 1 – the control – the animals got clean water for 36 days, in groups 2 and 3 – CoCl_2 solutions in the above-mentioned doses for 15 days, and in groups 4 and 5 – these solutions for 36 days. Water and salt solutions were administered by intragastric gavage daily. Erythrocytes were obtained from whole blood of rats. Hemolysis induced by the addition of HCl to its final concentration of 0,002 N. Erythrocyte hemolysis kinetics was recorded by changes in the optical density of samples with registration step of 1 s. The time of red blood cells membrane restructuring before beginning the process of their destruction and the rate of its destruction were selected as indicators of hemolysis. It has been shown that cobalt ions provide additional destabilizing effect on the erythrocyte membrane. This effect increases with the dose of Co^{2+} and the duration of its administration.

Key words: erythrocytes, hemolysis, Co^{2+} .

Введение

В ряде работ было показано, что ионы кобальта в концентрациях, превышающих 0,6 мг/кг/сутки (NOAEL – уровень отсутствия видимого негативного эффекта), дестабилизируют мембраны эритроцитов даже при однократном введении в организм лабораторных животных (Smith, 1971; Кочарли и др., 2012; Ганусова, Баранник, 2014). Работ же, посвященных хроническому действию ионов кобальта в концентрациях, существенно меньших NOAEL, на структурную стабильность эритроцитов, практически нет.

Целью данной работы было изучение длительного действия малых доз ионов Co^{2+} на структурную устойчивость эритроцитов к гемолизу.

Объекты и методы исследования

Исследования проведены на 3-месячных белых крысах-самцах породы Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария Харьковского национального университета им. В.Н.Каразина.

В экспериментах соблюдали рекомендации проведения медико-биологических исследований согласно закону Украины «О защите животных от жестокого обращения» (Закон Украины №3447-IV, 2006) с изменениями, внесенными в соответствии с Законом №1759-VI (Зміни..., 2010).

Величина NOAEL кобальта для человека и лабораторных животных составляет 0,6 мг/кг/сутки (Toxicological profile for cobalt, 2004). Поэтому в экспериментах использовали 2 дозы Co^{2+} – 0,012 мг/кг/сутки (доза I) и 0,06 мг/кг/сутки (доза II), которые вводили растворами CoCl_2 с концентрациями $0,692 \times 10^{-4}$ М/л и $3,46 \times 10^{-4}$ М/л соответственно.

Животные были разделены на 5 групп по 6 особей в каждой. В группе 1 – контрольной – они получали чистую воду в течение 36 суток. В группах 2 и 3 – растворы CoCl_2 в дозах I и II соответственно в течение 15 суток. В группах 4 и 5 – дозы I и II в течение 36 суток.

Растворы соли и воду вводили через внутрижелудочный зонд ежедневно.

Эритроциты получали из цельной крови крыс после их декапитации под тиопенталовым наркозом в дозе 60 мкг/кг. Кровь смешивали в отношении 0,02 : 1 с 0,15 М/л NaCl, куда заранее добавляли 5 мкл гепарина с активностью 5000 ед/мл. Смесь четырёхкратно отмывали центрифугированием в течение 3 мин при 3000 об/мин на центрифуге ОПН-ЗУХЛ4.2 в 10-кратном объеме 0,15 М/л NaCl при комнатной температуре. Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. 5 мкл полученного осадка эритроцитов суспендировали в 1,0 мл 0,15 М/л NaCl и помещали в кювету толщиной 1 см.

Гемолиз вызывали добавлением HCl, концентрация которой в образцах суспензии эритроцитов составляла 0,002 н. (Черницкий, 2002). В этих условиях оптическая плотность образцов в кювете была равна 0,2.

Кинетику гемолиза эритроцитов регистрировали по изменению оптической плотности образцов, которую записывали на компьютеризированном спектрофотометре Coleman при $\lambda=670$ нм и непрерывном перемешивании, не разрушающем клетки. Регистрацию оптической плотности проводили с частотой 1 с.

Гемолиз для каждого животного измеряли на 6 образцах крови; полученные кривые кинетики усредняли.

В качестве показателей гемолиза были выбраны время структурной перестройки мембраны основной массы эритроцитов до начала кооперативного процесса их разрушения t_n и скорость её разрушения. Последнюю оценивали по изменению оптической плотности образцов в процессе разрушения мембраны, отнесенную ко времени этого изменения – $V=D_p/\Delta t_p$. Величины ΔD_p и Δt_p измеряли на соответствующих участках кинетических кривых.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни (Glantz, 2007). Результаты представлены в виде $M \pm sd$, где M – среднее арифметическое, sd – стандартное отклонение. Достоверными считали результаты с $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены усреднённые по всем измеренным образцам кривые кинетики гемолиза крови контрольных животных и животных, получавших в течение 15 и 36 дней Co^{2+} в количестве 0,012 мг и 0,06 мг на кг массы тела.

Поскольку вся популяция эритроцитов крови представлена клетками различного возраста, их мембраны также отличаются по свойствам и, соответственно, по структурной стабильности. Поэтому кривая кинетики гемолиза состоит из нескольких участков. Можно выделить три наиболее существенных. Первый (I) соответствует разрушению эритроцитов с наименее прочной мембраной. Второй (II) определяется процессами структурной перестройки и возникновением дефектов в мембранах основной массы эритроцитов, происходящими под действием HCl. И, наконец, третий участок кривой (III) соответствует процессу кооперативного разрушения мембран основной массы эритроцитов.

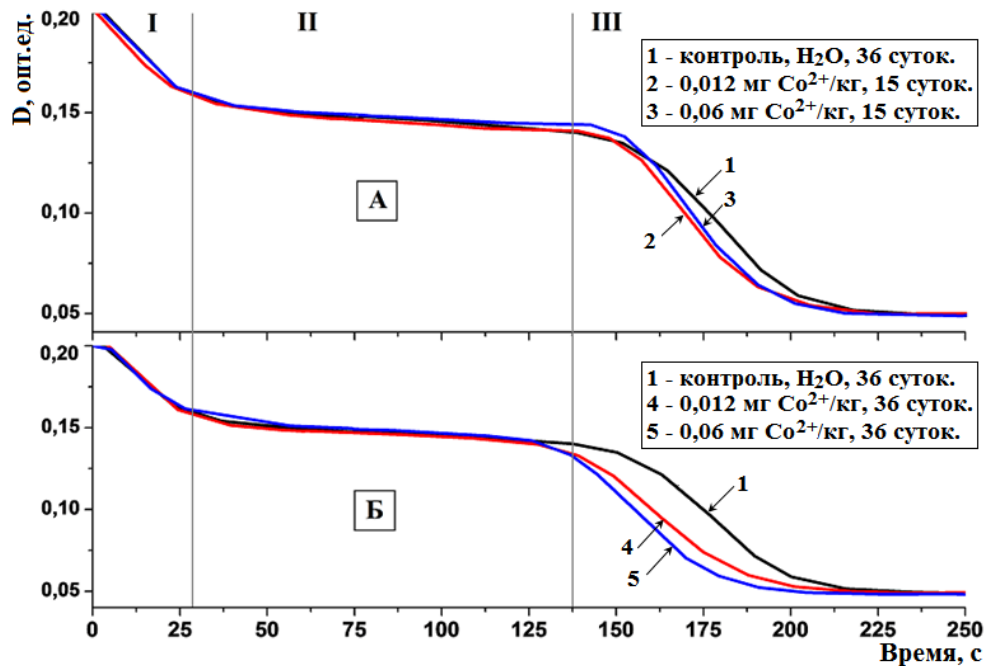


Рис. Влияние Co^{2+} на кинетику кислотного гемолиза эритроцитов 3-месячных крыс. А – 15, Б – 36 суток введения Co^{2+}

Средние численные значения t_n и $\Delta D_p/\Delta t_p$, рассчитанные по кинетическим кривым гемолиза эритроцитов всех измеренных образцов крови каждой из групп животных, приведены в табл. 1.

Таблица 1.
Влияние Co^{2+} на время структурной перестройки мембраны эритроцитов 3-месячных крыс до начала процесса её кооперативного разрушения t_n , (с) и на скорость её разрушения V , (опт. ед./с) $\times 10^{-4}$, $M \pm sd$, $n=6$

Сутки	Условия эксперимента	Показатель	
		t_n	V
36	Контроль – $\text{H}_2\text{O} + 0,002 \text{ н HCl}$	$125,0 \pm 11,0$	$19,7 \pm 0,88$
15	0,012 мг $\text{Co}^{2+}/\text{кг} + 0,002 \text{ н HCl}$	$120,5 \pm 14,0$	$22,8 \pm 1,16^{*\wedge}$
36		$115,0 \pm 8,0$	$28,4 \pm 0,97^{*\wedge}$
15	0,06 мг $\text{Co}^{2+}/\text{кг} + 0,002 \text{ н HCl}$	$112,5 \pm 5,0$	$27,9 \pm 1,14^{*\#}$
36		$105,5 \pm 5,0^*$	$31,6 \pm 1,13^*$

Примечание: * – различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контролем; # – различия достоверны ($p < 0,05$) между 15 и 36 сутками; ^ – различия достоверны ($p < 0,05$) между двумя дозами на соответствующие сутки.

В соответствии с полученными результатами, при качественном подобии кривых гемолиза эритроцитов у контрольных и подопытных животных видно, что при обеих дозах Co^{2+} и при обоих сроках введения крутизна участка III больше у подопытных животных. По сравнению с контролем после 36 суток введения Co^{2+} скорость гемолиза увеличивается в 1,6 раза.

Кроме того, по сравнению с контролем, время до начала кооперативного разрушения мембран основной массы эритроцитов (участки I + II) уменьшается при введении Co^{2+} в течение 36 суток на 16%.

Таким образом, в процессе кислотного гемолиза эритроцитов ионы кобальта усиливают дестабилизирующее действие HCl даже в дозах, в 10 и 50 раз меньших NOAEL. При этом дополнительный дестабилизирующий эффект Co^{2+} повышается с увеличением дозы и длительности его введения.

Список литературы

- Ганусова Г.В., Баранник Т.В. Влияние хлоридов кобальта и ртути на показатели пероксидного окисления липидов в сыворотке крови и резистентность эритроцитов самок крыс // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2014. – Вип.22, №1126. – С. 16–21. /Ganusova G.V., Barannik T.V. Vliyaniye khloridov kopal'ta i rtuti na pokazateli peroksidnogo okisleniya lipidov v syvorotke krovi i rezistentnost' eritrotsitov samok krysov // Visnyk Kharkivskogo natsional'nogo universitetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2014. – Vyp.22, №1126. – S. 16–21./
- Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» №3447-IV від 21.02.2006. – ВВР. – 2006. – №27. – Ст.230. /Zakon Ukrainy «Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokogo povodzhennya» №3447-IV vid 21.02.2006. – VVR. – 2006. – №27. – St.230./
- Зміни, внесені до Закону №3447-IV згідно із Законом №1759-VI від 15.12.2009. – ВВР. – 2010. – №9. – Ст.76. /Zminy, vneseni do Zakonu №3447-IV zgidno iz Zakonom №1759-VI vid 15.12.2009. – VVR. – 2010. – №9. – St.76./
- Кочарли Н.К., Гумматова С.Т., Абдуллаев Х.Д., Зейналова Н.М. Влияние ионов тяжелых металлов на мембранную устойчивость эритроцитов в норме и при различной патологии организма // Фундаментальные исследования. – 2012. – №11. – С. 299–303. /Kocharli N.K., Gummatova S.T., Abdullayev H.D., Zeynalova N.M. Vliyaniye ionov tyazhelykh metallov na membrannuyu ustoychivost' eritrotsitov v norme i pri razlichnoy patologii organizma // Fundamental'nyye issledovaniya. – 2012. – №11. – S. 299–303./
- Черницький Г.А. Способ определения резистентности эритроцитов. – Минск: Наука-Белорусь, 2002. – 101с. /Chernitskiy G.A. Sposob opredeleniya rezistentnosti eritrotsitov. – Minsk: Nauka-Belorus', 2002. – 101s./
- Glantz S.A. Primer of biostatistics. McGraw-Hill, 2007. – P.298.
- Smith R.P. Cobalt lysis and methemoglobin accumulation in human erythrocyte suspensions // Experimental Biology and Medicine. – 1971. – Vol.136, no 3. – P. 701–706.
- Toxicological profile for cobalt. U.S. Agency for toxic substances and disease registry. – 2004. – p.47. (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp33.pdf>.)

Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov

Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 05.10.2016