

## ... ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ...

УДК: 612.111:57.043:577.352.4

### Влияние прединкубации эритроцитов человека и быка в растворах сахарозы на устойчивость клеток к гипертоническому шоку Д.И.Александрова<sup>1</sup>, Н.В.Орлова<sup>2</sup>, Н.М.Шпакова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

Исследовали чувствительность эритроцитов человека и быка к гипертоническому шоку в 4,0 М NaCl после предварительного инкубирования клеток в растворах сахарозы умеренной гипертоничности при различных температурах. Показано, что предварительная инкубация в растворах сахарозы изменяет устойчивость эритроцитов человека и быка к 4,0 М NaCl. Минимальный уровень гипертонического гемолиза эритроцитов человека отмечается после прединкубации клеток в 0,6 М сахарозе при всех температурах инкубации, а эритроцитов быка – в 1,0 М растворе при 37, 25 и 15°C. Для эритроцитов быка кривая зависимости гипертонического гемолиза от концентрации сахарозы на этапе прединкубации при 0°C имеет иной характер, чем при других температурных режимах. Максимальная устойчивость эритроцитов человека и быка к гипертоническому шоку коррелирует с максимальным изменением объема клеток в сахарозных средах на этапе прединкубации.

Ключевые слова: *гипертонический шок, эритроциты, предварительное обезвоживание, температура, гематокрит.*

#### Введение

Решение проблем криобиологии требует изучения механизмов повреждения клеток при охлаждении. В процессе замораживания клетки подвергаются действию высоких концентраций солей, образующихся при вымораживании свободной воды, что негативно сказывается на выживании клеток (Белоус, Грищенко, 1994).

Динамика гемолиза эритроцитов в гипертонических средах при положительных температурах не отличается от уровня повреждения клеток, наблюдающегося в условиях замораживания от 0 до –30°C. Поэтому в качестве модели замораживания используют гипертонический шок, который заключается в перенесении клеток в высококонцентрированные солевые среды (Гордиенко, Коваленко, 1997; Поздняков, 1989). Такой подход позволяет оценить вклад гипертонии в общее повреждение эритроцитов в условиях замораживания. Кроме того, на клетки отрицательное действие оказывают не только осмолярность среды, но и такие факторы, как ионная сила растворов и температура внешней среды (Черницкий, Воробей, 1981; Белоус и др., 1983).

В работах Позднякова было показано, что предварительная инкубация эритроцитов человека в умеренно гипертонических растворах электролитов и неэлектролитов изменяет устойчивость клеток к последующему гипертоническому шоку в 4,0 М NaCl (Поздняков, 1989). Эритроциты человека и быка характеризуются различной чувствительностью к гипертоническому шоку (Ершов и др., 2004; Александрова, Шпакова, 2007), что связывают с различиями состава их плазматической мембраны и цитоплазмы (Bogner et al., 2002; Utoh et al., 1992; Harvey, 1997).

**Целью исследования** было сравнительное изучение чувствительности эритроцитов человека и быка к гипертоническому шоку в 4,0 М NaCl после предварительного инкубирования клеток в средах сахарозы умеренной гипертоничности при температурах 0, 15, 25, 37°C.

#### Объект и методы исследования

В экспериментах использовали эритроциты донорской крови человека и быка, полученные по стандартной методике (Шпакова и др., 1995). Все среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4. Концентрацию растворов контролировали измерением осмолярности на осмометре ОМКА 1Ц–01 (Украина).

Клетки инкубировали в умеренно гипертонических растворах сахарозы в течение 2 мин, после чего их переносили в среду, содержащую 4,0 М NaCl (конечный гематокрит 0,4%), на 5 мин при определенной температуре (37, 25, 15 или 0°C). Количество гемоглобина в супернатанте определяли

спектрофотометрически ( $\lambda=543$  нм) и выражали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии детергента тритона X-100 (0,1%).

Изменения объема эритроцитов человека и быка в средах предварительной инкубации контролировали измерением гематокрита (микроцентрифуга МГЦ-8).

Исследования проводили не менее 6 раз в 2-х параллельных пробах. Результаты обрабатывали статистически с использованием критериев Манн–Уитни и ANOVA.

### Результаты исследований

Для изучения влияния предварительного обезвоживания эритроцитов на чувствительность к гипертоническому стрессу клетки инкубировали в средах, содержащих от 0,3 М до 1,2 М сахарозы, а затем переносили в 4,0 М раствор NaCl. Структурные изменения биологических мембран являются температурно-зависимыми (Белоус и др., 1983), поэтому исследования проводили при температурах 0, 15, 25, 37°C.

После инкубации клеток в изотоническом растворе сахарозы и последующем их перенесении в раствор, содержащий 4,0 М NaCl, при 37°C уровень гемолиза составляет 70% (рис. 1). Увеличение концентрации сахарозы в среде прединкубации до 0,4–0,6 М сопровождается повышением устойчивости эритроцитов человека к перенесению в 4,0 М раствор NaCl. Минимальная степень гемолиза в растворе, содержащем 4,0 М NaCl, наблюдается после прединкубации клеток в 0,6 М растворе сахарозы, – 40%. Повышение концентрации сахарозы до 0,8–1,0 М приводит к снижению устойчивости к 4,0 М раствору NaCl, что выражается в повышении значений гемолиза до 80–90 %. Экспозиция эритроцитов человека при температурах 25, 15 и 0°C приводит к смещению кривых концентрационных зависимостей по оси ординат в направлении более низких значений, однако форма полученных кривых практически одинакова.

Таким образом, наиболее устойчивыми к действию гиперосмотического стресса являются эритроциты человека, инкубированные при нулевой температуре. Минимальный уровень гемолиза при всех температурах отмечается после прединкубации клеток в 0,6 М растворе сахарозы. Значения гемолитического повреждения клеток изменяются от 40% – при температуре 37°C – до 18% по мере снижения температуры эксперимента.

На рис. 2 представлены зависимости развития гипертонического гемолиза эритроцитов быка в 4,0 М NaCl от концентрации сахарозы в средах предварительной инкубации при разных температурах. Видно, что при 37°C уровень гипертонического гемолиза эритроцитов быка, перенесенных из изотонических условий (0,3 М сахарозы), составляет 65%. Увеличение концентрации среды в среде прединкубации до 0,4–1,0 М сахарозы сопровождается увеличением устойчивости клеток к переносу в 4,0 М раствор NaCl. Наиболее устойчивыми к гиперосмотическому раствору (4,0 М NaCl) являются клетки, предварительно инкубированные в 1,0 М растворе сахарозы: уровень их лизиса в 4,0 М NaCl составляет 20%. Таким образом, предварительное инкубирование в 1,0 М растворе сахарозы позволяет снизить уровень последующего гипертонического гемолиза эритроцитов быка на 40%. Дальнейшее увеличение концентрации сахарозы до 1,2 М приводит к большему снижению устойчивости клеток к переносу в 4,0 М раствор NaCl, что выражается в повышении уровня гемолиза (на 10%), однако, при этом не наблюдается выраженной правой ветви, характерной для эритроцитов человека (рис. 1). Кривая зависимости гипертонического гемолиза от концентрации сахарозы в средах предварительной инкубации, снятая спектрально, повторяет ход кривой при 37°C (рис. 2). Это позволяет предполагать, что процессы, происходящие в клетке при указанных температурах, аналогичны. Снижение температуры эксперимента до 15°C приводит к сглаживанию левой ветви кривой гипертонического гемолиза. На фоне более низкого исходного уровня гипертонического лизиса эритроцитов быка (примерно 40%) экспозиция клеток в 0,4–0,8 М сахарозы практически не изменяет их чувствительность к 4,0 М раствору NaCl, а в 1,0 М сахарозе наблюдается снижение значений гемолиза до 25%.

Повышение концентрации сахарозы на этапе прединкубации до 1,2 М не приводит к значительному изменению значений гемолиза в 4,0 М растворе NaCl.

При 0°C исходный уровень гипертонического лизиса эритроцитов быка наиболее низкий для всех исследуемых температур и составляет 20%. В диапазоне концентрации сахарозы 0,3–0,6 М в средах прединкубации уровень гипертонического повреждения практически не изменяется.

Следует отметить, что при температурных режимах 16, 25 и 37°C эритроциты быка характеризуются минимальной чувствительностью к 4,0 М раствору NaCl после экспозиции в растворе, содержащем 1,0 М сахарозу, причем уровень минимального гемолиза одинаков и составляет 20%.

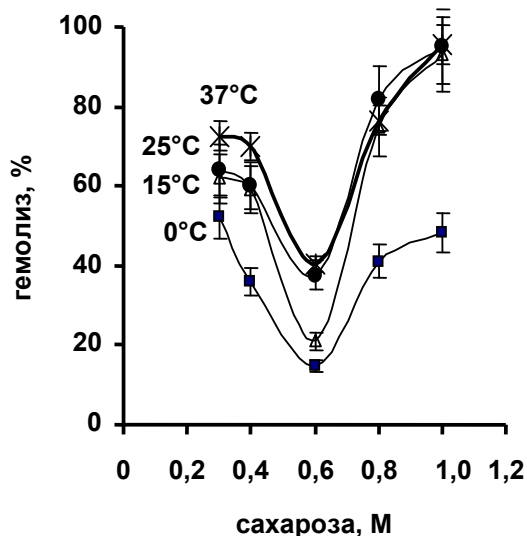


Рис. 1. Влияние предварительной инкубации в 0,2–1,0 М сахарозы на устойчивость к гипертоническому шоку эритроцитов человека в 4,0 М NaCl при температуре 37, 25, 15 и 0°C ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

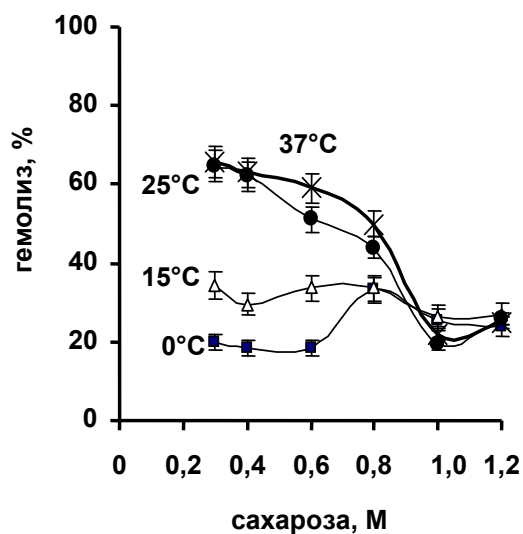


Рис. 2. Влияние предварительной инкубации в 0,2–1,0 М сахарозы на устойчивость к гипертоническому шоку эритроцитов быка в 4,0 М NaCl при температуре 37, 25, 15 и 0°C ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Для того чтобы оценить изменение объема эритроцитов человека и быка под влиянием сред предварительного обезвоживания, проводили измерения гематокрита в растворах, содержащих различные концентрации сахарозы (рис. 3 и 4). Исследования проводили при температуре 37 и 0°C. Контролем являлся объем клеток, инкубированных в изотоническом (0,3 М) растворе сахарозы при 37°C, значения которого принимали за 100%.

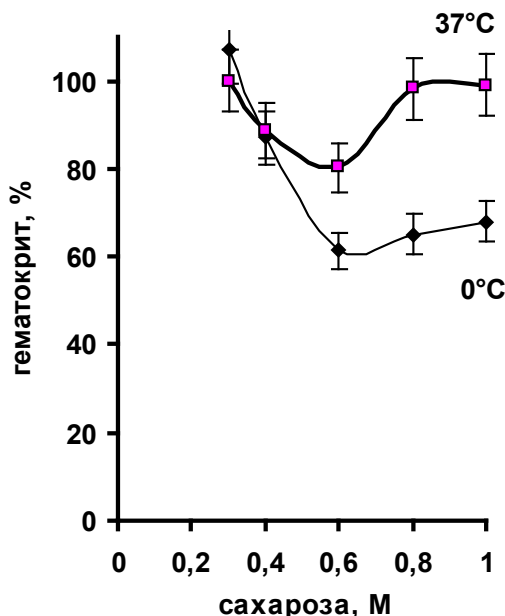


Рис. 3. Изменение объема эритроцитов человека в процессе предварительной инкубации в средах, содержащих 0,3–1,2 М сахарозы, при температуре 37 и 0°C ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

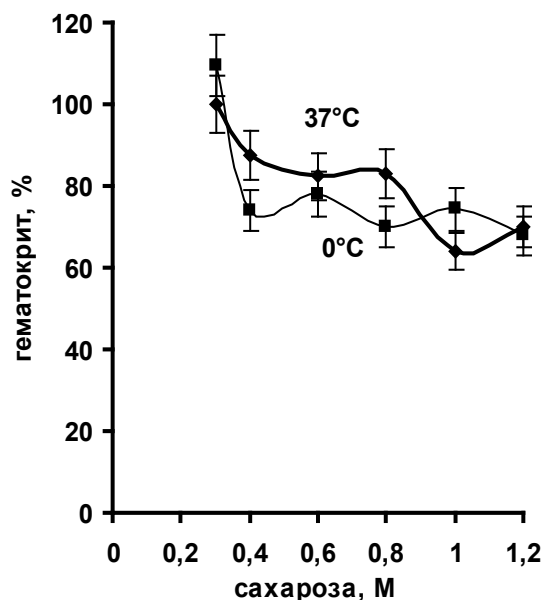


Рис. 4. Изменение объема эритроцитов быка в процессе предварительной инкубации в средах, содержащих 0,3–1,2 М сахарозы, при температуре 37 и 0°C ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

При 37°C по мере увеличения концентрации сахарозы до 0,4–0,6 М объем эритроцитов человека уменьшается на 20% и достигает минимальных значений в 0,6 М растворе сахарозы

(рис. 3). Дальнейшее повышение концентрации сахарозы до 0,8–1,0 М сопровождается увеличением объема клеток. При 0°C инкубация эритроцитов человека в 0,4–0,6 М растворе сахарозы также приводит к уменьшению объема клеток более, чем на 40%. Однако дальнейшее повышение концентрации сахарозы в среде инкубации не сопровождается значительными изменениями объема клеток.

Как видно из рис. 1 и 3, максимальная устойчивость эритроцитов человека к гипертоническому шоку коррелирует с максимальным изменением объема клеток. На этапе прединкубации в сахарозных средах при температуре 37°C объем эритроцитов человека с увеличением концентрации сахарозы до 0,6 М уменьшается на 20%, при температуре 0°C – на 40%. Возможно, что большая устойчивость клеток к гипертоническому шоку в 4,0 М растворе NaCl при 0°C обеспечивается за счет наибольшего сжатия объема клеток при 0°C – в 2 раза по сравнению с инкубацией при 37°C (рис. 1).

Инкубация эритроцитов быка при 37°C (рис. 4) в средах, содержащих 0,4–0,6 М сахарозы, приводит к уменьшению объема клеток на 20–25 %. В 1,0 М растворе сахарозы объем клеток достигает минимальных значений – уменьшается на 40% по сравнению с контролем.

При инкубировании клеток при 0°C отмечается уменьшение объема клеток в 0,4 М растворе сахарозы приблизительно на 40%. Однако, дальнейшее повышение концентрации сахарозы не сопровождается изменениями объема эритроцитов, в отличие от результатов, полученных при 37°C.

Таким образом, в среде, содержащей 1,0 М сахарозы и обеспечивающей максимальную устойчивость клеток быка в 4,0 М растворе NaCl, отмечается максимальное уменьшение объема клеток при температуре 37°C.

### Обсуждение

В работах Позднякова (Поздняков, 1989) было показано, что инкубирование эритроцитов человека в умеренно гипертонических растворах приводит к повышению устойчивости клеток к последующему перенесению в 4,0 М раствор NaCl. Авторы полагают, что формирование устойчивого состояния происходит благодаря обезвоживанию и выходу из клеток осмотически активной воды по градиенту концентрации.

Представленные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что увеличение устойчивости предварительно проинкубированных в сахарозных средах эритроцитов человека (при 37 и 0°C) и быка (при 37°C) к 4,0 М NaCl (рис. 1 и 2) коррелирует с постепенным уменьшением объема этих клеток на этапе, предшествующем гипертоническому стрессу (рис. 3 и 4). Минимальная степень гипертонического гемолиза эритроцитов быка отмечается после прединкубации клеток в 1,0 М растворе сахарозы, в отличие от эритроцитов человека, достигающих минимального гемолиза в 4,0 М NaCl после предварительного выдерживания клеток в растворе, содержащем 0,6 М сахарозы. Максимальное сжатие клеток быка и человека наблюдается именно в этих средах. Таким образом, мы получили не только экспериментальное подтверждение идеи, высказанной Поздняковым, но и показали, что максимальная устойчивость к гипертоническому стрессу определяется максимальным сжатием клеток на этапе прединкубации не только для эритроцитов человека, но и для клеток быка.

Обращает на себя внимание тот факт, что клетки человека и быка достигают максимальной устойчивости к перенесению в 4,0 М NaCl после прединкубации в средах, содержащих разные концентрации сахарозы (рис. 1 и 2). В случае эритроцитов быка зона стабильности клеток смещается в сторону больших концентраций сахарозной среды (рис. 2). Именно при такой концентрации неэлектролита эритроцитами быка достигается степень обезвоживания, приводящая к формированию стабильного состояния клеток. Можно сказать, что область «объемной» дегидратации эритроцитов быка намного шире, чем область обезвоживания эритроцитов человека. Результаты проведенного нами исследования согласуются с полученными ранее данными по изучению гипертонической устойчивости эритроцитов быка к 4,0 М NaCl после инкубации клеток в электролитных средах умеренной тоничности, содержащих 0,2–0,4 М NaCl (Александрова, Шпакова, 2007). В этом случае клетки быка также достигали максимальной устойчивости к гипертоническому шоку в 4,0 М NaCl после их прединкубации в средах с более высокой концентрацией соли по сравнению с эритроцитами человека. В отличие от клеток человека, эритроциты быка характеризуются большим содержанием осмотически неактивной воды, которая связана с молекулами гемоглобина, имеющего сравнительно высокие показатели гидрофильности (Vogner et al., 1998, 2005). Полагают (Vogner et al., 2005; Rapatz, Luyet, 1977), что повышенная осмотическая устойчивость клеток быка может быть обусловлена высоким связыванием воды и формированием более плотной упаковки гемоглобина.

Повышение концентрации сахарозы на этапе прединкубации до 0,8–1,0 М снижает устойчивость эритроцитов человека к последующему гипертоническому шоку в 4,0 М NaCl (рис. 1), что коррелирует с наблюдаемым увеличением объема клеток (рис. 3). В процессе инкубирования эритроцитов человека в растворах, содержащих 0,8–1,0 М сахарозы, происходит не только удаление из клеток

объемной, но также и структурированной воды. Под влиянием гипертонических растворов сахарозы, 0,8–1,0 М, происходит нарушение барьерной функции плазматической мембраны, в результате чего наблюдается поступление в клетку неконтролируемого потока воды, что и проявляется в увеличении клеточного объема (рис. 3). Для эритроцитов быка наблюдается лишь некоторое увеличение как чувствительности к 4,0 М после экспозиции в 1,2 М растворе сахарозы, так и гематокрита на этапе прединкубации. Возможно, наблюдаемые особенности в реакции эритроцитов человека и быка на осмотические и температурные факторы могут быть связаны с различиями не только внутриклеточного состава, но и их плазматических мембран. Так, в мембранах эритроцитов быка практически отсутствует фосфатидилхолин, но при этом содержится большое количество сфингомиелина (Utoh et al., 1992), содержание которого коррелирует со снижением проницаемости мембран (Benga, Borza, 1995).

### Выводы

Для эритроцитов человека минимальное значение гипертонического гемолиза в 4,0 М NaCl отмечено после прединкубации в 0,6 М сахарозе. Изменение температуры инкубации от 0 до 37°C не приводит к изменению формы кривых, изменяется лишь уровень гипертонического повреждения.

Для эритроцитов быка минимальная степень гипертонического гемолиза отмечается при прединкубации клеток в 1,0 М сахарозы. Правая ветвь кривой гипертонической чувствительности не достигнута. Формы полученных кривых при температуре 37 и 0°C различны.

Максимальная устойчивость эритроцитов человека и быка к гипертоническому шоку коррелирует с максимальным изменением клеточного объема.

### Список литературы

- Александрова Д.И., Шпакова Н.М. Влияние предварительного обезвоживания эритроцитов человека и быка на устойчивость к гипертоническому шоку при разных температурах // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2007. – Вип.1. – С. 73–77.
- Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Бабийчук Л.А. Температурнозависимые изменения структуры эритроцитов. Сообщение 1. Роль ионов и фазовых переходов в индукции процессов криогемолиза // *Криобиология и криомедицина.* – 1983. – Вып.12. – С. 13–24.
- Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – К.: Наук. думка, 1994. – 427с.
- Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е. Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза // *Проблемы криобиологии.* – 1997. – №3. – С. 17–24.
- Ершов С.С., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды // *Проблемы криобиологии.* – 2004. – №3. – С. 51–57.
- Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1989. – 16с.
- Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. – Наука и техника, 1981. – 216с.
- Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // *Биохимия.* – 1995. – Т.60, №10. – С. 1624–1631.
- Benga G., Borza T. Diffusional water permeability of mammalian red blood cells // *Comp. Biochem. Physiol.* 1995. – Vol.112B, №4. – P. 653–659.
- Bogner P., Csutora P., Cameron I. et al. Augmented water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camelids // *Biophysical J.* – 1998. – Vol.75. – P. 3085–3091.
- Bogner P., Miseta A., Berente Z. et al. Osmotic and diffusive properties of intracellular water in camel erythrocytes: Effect of hemoglobin crowdedness // *Cell Biology J.* – 2005. – №29. – P. 731–736.
- Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // *J. Biophys.* – 2002. – Vol.31. – P. 145–152.
- Harvey J.W. The Erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders // In: J.Kaneko, J.Harvey, M.Bruss: *Clinical biochemistry of domestic animals.* – Academic press, 1997. – P. 157–205.
- Rapatz G., Luyet B. Hemolysis in several animal species after rapid freezing of blood // *J. Cell Physiology.* – 1977. – Vol.2. – P. 373–376.
- Utoh J., Zaikowcki-Brown J.E., Harasaki H. Effects of heat on fragility and morphology of human and calf erythrocytes // *J. Invest. Surg.* – 1992. – Vol.5, №4. – P. 305–313.

**Вплив передінкубації еритроцитів людини і бика в розчинах сахарози на стійкість клітин до гіпертонічного шоку****Д.І.Александрова, Н.В.Орлова, Н.М.Шпакова**

Досліджували чутливість еритроцитів людини та бика до гіпертонічного шоку в 4,0 М NaCl після попередньої інкубації клітин у розчинах сахарози помірної гіпертонічності при різних температурах. Показано, що попередня інкубація у розчинах сахарози змінює стійкість еритроцитів людини та бика до 4,0 М розчину NaCl. Мінімальний рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини відмічається після передінкубації клітин в 0,6 М розчині сахарози при всіх температурах інкубації, а еритроцитів бика – в 1,0 М розчині при 37, 25 і 15°C. Для еритроцитів бика крива залежності гіпертонічного гемолізу від концентрації сахарози на етапі передінкубації при 0°C має інший характер, ніж при інших температурних режимах. Максимальна стійкість еритроцитів людини та бика до гіпертонічного шоку корелює з максимальною зміною об'єму клітин в сахарозних середовищах на етапі передінкубації.

Ключові слова: *гіпертонічний шок, еритроцити, попереднє обезводнення, температура, гематокрит.*

**Pre-incubation effect of human and bovine erythrocytes in sucrose solutions on cell resistance to hypertonic shock****D.I.Aleksandrova, N.V.Orlova, N.M.Shpakova**

Sensitivity of human and bovine erythrocytes to hypertonic shock in 4,0 M NaCl after preliminary incubation of cells in sucrose solutions of moderate hypertonicity under various temperatures has been studied. It has been shown that preliminary incubation in sucrose solutions varies the resistance of human and bovine erythrocytes to 4,0 M NaCl. Minimal level of hypertonic hemolysis of human erythrocytes is noted after pre-incubation of cells in 0,6 M sucrose at all incubation temperatures and in 1,0 M solution at 37, 25 and 15°C for bovine erythrocytes. For bovine erythrocytes the dependence curve of hypertonic hemolysis on sucrose concentration at pre-incubation stage at 0°C is of different character than at other temperature regimens. Maximum resistance of human and bovine erythrocytes to hypertonic shock correlates with the maximum change in cell volume in sucrose media at pre-incubation stage.

Key words: *hypertonic shock, erythrocytes, preliminary dehydration, temperature, hematocrit.*

---

Представлено О.В.Шаповаловою

Рекомендовано до друку Є.Е.Перським