

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-2-143-379-382

УДК 57.043:615.21/.26:547.426.1:612.111

*Чабаненко Е. А., Шапкина О. А., Орлова Н. В., Шпакова Н. М.***ВЛИЯНИЕ ГЛИЦЕРИНА НА ПОСТГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ШОК ЭРИТРОЦИТОВ**

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

chabanenkoolena@gmail.com

Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами. Работа выполнена соответственно научному направлению работы отдела криоцитологии ИПКиК НАН Украины по теме «Исследование чувствительности эритроцитов млекопитающих к охлаждению, дегидратации и замораживанию при действии модифицирующих факторов и криопротекторов», № государственной регистрации 0114U0001318.

Вступление. При низкотемпературном консервировании биологических объектов на них действует ряд криоповреждающих факторов, таких как формирование кристаллов льда, изменение температуры, pH, тоничности среды и др. Биологические объекты при температуре -196°C можно хранить достаточно долго, поскольку в этих условиях протекание биохимических процессов заторможено. Повреждение биологического материала происходит как на этапе его замораживания, так и отогрева. Влияние на клетки факторов криоповреждения, действующих на этапе замораживания, моделируют с помощью гипертонического шока и гипертонического криогемолиза. Изучению этого вопроса посвящено достаточно много работ [1,2]. В то же время криоповреждающие факторы, действие которых реализуется на этапе отогрева биологических объектов, изучены в меньшей степени. Их действие моделируют с помощью постгипертонического шока (ПГШ), когда клетки переносят из среды, содержащей высокие концентрации соли, в физиологический раствор [3,4].

В работах Семионовой Е.А. с соавт. [3] показано, что уровень постгипертонического лизиса (ПГЛ) эритроцитов в значительной степени зависит от среды дегидратации: ее состава, концентрации веществ и продолжительности экспозиции клеток в ней. Причем это характерно не только для эритроцитов человека, но и для клеток животных [3].

Эритроциты человека успешно хранят при низкой температуре под защитой глицерина, причем совершенствование метода продолжается и в настоящее время [5]. В процессе размораживания этих объектов по мере таяния льда концентрация внутри- и внеклеточных веществ, в том числе и криопротектора, изменяется и может достигать уровня 6 моль/л [6]. В этой ситуации можно говорить о возможном токсическом влиянии глицерина на клетки. Поскольку действие изменяющихся concentra-

ций соли и глицерина происходит одновременно, представляло интерес с использованием модельного подхода ПГШ изучить влияние глицерина на устойчивость эритроцитов.

Цель исследования. Изучить влияние глицерина на чувствительность эритроцитов человека к действию постгипертонического шока.

Объект и методы исследования. Для исследования использовали эритроциты человека, которые выделяли из донорской крови по стандартной методике [3]. Постгипертонический шок эритроцитов осуществляли перенесением клеток из гипертонического раствора, содержащего 1,5 моль/л NaCl (среда дегидратации) в изотонический раствор, содержащий 0,15 моль/л NaCl (среда регидратации) при 37 или 0°C . Все среды были приготовлены на фосфатном буфере (0,01 моль/л, pH 7,4). Конечный гематокрит составлял 0,4%. Эксперимент проводился в двух вариантах. В первом варианте эритроциты, предварительно обработанные глицерином (20 мин, 37°C), подвергали действию ПГШ (контроль). Во втором варианте клетки, обработанные глицерином, также подвергали действию ПГШ, однако в среде дегидратации (1,5 моль/л NaCl) присутствовал глицерин. Уровень гемолиза эритроцитов в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон X - 100 («Merck», Германия) в концентрации 0,1%.

Статистическую обработку полученных экспериментальных результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0» («StatSoft Inc., США»). Экспериментальные данные представляли как среднее арифметическое значение количественных показателей (M) \pm стандартная ошибка среднего арифметического (m).

Результаты исследований и их обсуждение. Развитие постгипертонического лизиса эритроцитов наблюдается в том случае, когда клетки переносят в среду регидратации из сред, содержащих NaCl в концентрациях, превышающих 0,8 моль/л [4]. Исходя из этого, концентрация соли в среде дегидратации была выбрана 1,5 моль/л NaCl.

Известно, что определяющим условием развития повреждения эритроцитов при действии ПГШ является этап дегидратации клеток [3]. Представляло интерес исследовать влияние глицерина и про-

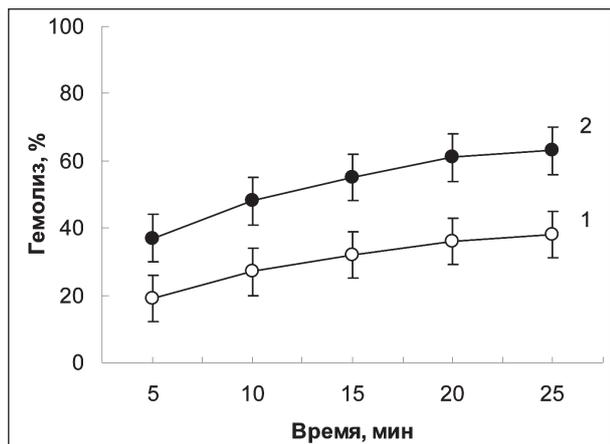


Рис. 1. Зависимость уровня постгипертонического гемолиза эритроцитов, предварительно обработанных глицерином (15%), от времени инкубации в среде дегидратации (1,5 моль/л NaCl) при 37°C: 1 – контроль; 2 – глицерин в среде дегидратации.

должительности экспозиции клеток в среде дегидратации на уровень постгипертонического лизиса эритроцитов. Время инкубации клеток в среде регидратации было фиксированным и составляло 5 мин. Полученные данные представлены на **рисунке 1**. В качестве контрольных клеток рассматриваются эритроциты, которые были предварительно обработаны глицерином (15%), а затем подвергнуты действию ПГШ.

Как видно из **рисунка 1**, временная зависимость ПГЛ эритроцитов (зависимость 1) характеризуется ростом уровня гемолиза по мере увеличения продолжительности инкубирования клеток в среде дегидратации от 5 до 20 мин. При дальнейшем увеличении времени инкубации прирост гемолитического повреждения эритроцитов незначителен.

В том случае, когда клетки, предварительно обработанные глицерином, переносили в среду дегидратации, содержащую глицерин, характер полученной временной зависимости ПГЛ эритроцитов (**рис. 1**, зависимость 2) аналогичен контрольной. Как видно из **рисунка 1**, в случае присутствия глицерина в среде дегидратации уровень повреждения эритроцитов выше примерно в 1,7 раз. Следует отметить, что максимальный уровень постгипертонического повреждения контрольных эритроцитов, который регистрируется при 25 мин инкубирования в среде дегидратации, соизмерим с минимальным уровнем постгипертонического гемолиза клеток, который наблюдается при их 5 мин экспозиции в среде дегидратации, содержащей глицерин. В связи с вышеизложенным для дальнейших экспериментов было выбрано время экспозиции клеток в среде дегидратации – 20 мин.

На **рисунке 2** представлена зависимость ПГЛ эритроцитов, обработанных глицерином, от продолжительности инкубирования клеток в среде регидратации при фиксированном времени экспозиции в среде дегидратации (20 мин). В случае присутствия глицерина в среде дегидратации уровень повреждения клеток выше (примерно в 1,7 раз) по сравнению с контролем во всем временном диа-

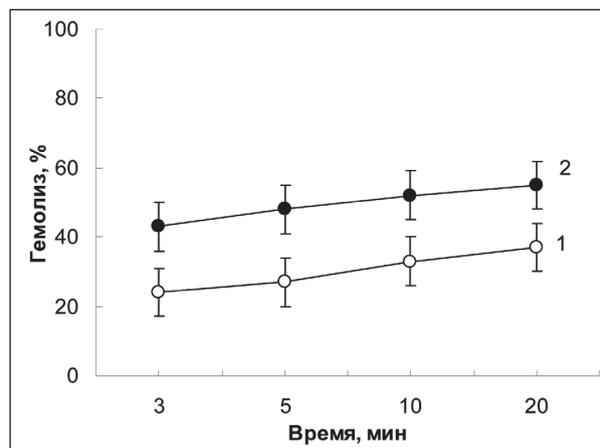


Рис. 2. Зависимость уровня постгипертонического гемолиза эритроцитов, предварительно обработанных глицерином (15%) от времени инкубации в среде регидратации (0,15 моль/л NaCl) при 37°C: 1 – контроль; 2 – глицерин в среде дегидратации.

пазоне. Несмотря на тенденцию к повышению ПГЛ эритроцитов с увеличением времени инкубирования в среде регидратации, статистически значимых различий не выявлено. Поэтому в дальнейших исследованиях было выбрано время инкубирования клеток в среде регидратации 5 мин.

Результаты сравнительного анализа полученных данных (**рис. 1 и 2**) свидетельствуют о том, что ПГЛ эритроцитов в присутствии глицерина в большей степени зависит от продолжительности инкубирования клеток на этапе дегидратации, чем на этапе регидратации.

В гипертонических растворах эритроциты, обработанные глицерином, сжимаются в результате выхода из них воды. В плазматических мембранах таких клеток образуются дефекты, через которые могут входить внеклеточные вещества (катионы Na^+) и выходить глицерин. Затем при переносе клеток в среду регидратации они набухают в результате входа воды. Если эритроциты достигают значений критического гемолитического объема, то повреждаются [7,4]. Таким образом, этап регидратации позволяет лишь проявить изменения в плазматической мембране, которые сформировались на этапе дегидратации клеток.

По-видимому, в случае присутствия глицерина в среде дегидратации суммарное содержание внутриклеточных веществ становится выше за счет входа внеклеточного глицерина. Поэтому на этапе регидратации в эритроциты должно войти больше воды, в результате чего значительное количество клеток достигает критического объема, что и проявляется в более высоком уровне ПГЛ (**рис. 1 и 2**, зависимость 2).

После инкубирования эритроцитов с разными концентрациями глицерина (5, 10, 15%) их подвергали действию ПГШ при 37 и 0°C. Данные представлены в **таблице 1**. Видно, что с повышением концентрации глицерина уровень гемолиза эритроцитов возрастает как при температуре 37, так и при 0°C. При 37°C уровень гемолиза при использовании

глицерина в концентраціях 5 і 10% знаходиться на рівні пошкодження кліток, які були не оброблені криопротектором. По-видимому, глицерин повністю виходить із кліток на стадії дегідратації, тому рівень постгіпертонічного гемолізу не змінюється. При високій концентрації глицерина (15%), можливо, не весь глицерин виходить із кліток на етапі дегідратації, тому на етапі регідратації води в клітку повинно прийти більше, згідно з описаним механізмом.

Таблиця 1.

Влияние предобработки глицерином на уровень гемолиза (%) эритроцитов, перенесенных из 1,5 в 0,15 моль/л NaCl

Температура	Концентрация глицерина, %			
	0	5	10	15
37°C	26 ± 4	25 ± 5	25 ± 4	36 ± 6 *
0°C	22 ± 4	84 ± 6 *	92 ± 7 *	93 ± 7 *

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными в отсутствие глицерина ($p < 0,05$).

При 0°C даже использование 5% концентрации глицерина приводит к достаточно высокому значению уровня ПГЛ клеток (85%). Это может указывать на то, что на этапе дегидратации глицерин не успевает выйти из клеток, поскольку с понижением температуры скорость переноса веществ через клеточную мембрану падает в соответствии с законом Аррениуса [8].

Исходя из этого, представляло интерес исследовать, что будет происходить с эритроцитами, обработанными глицерином, в условиях ПГШ, если добавить криопротектор на этапе дегидратации.

Как видно из **таблицы 2**, добавление глицерина (в соответствующей концентрации) в гипертоническую среду приводит к дополнительному увеличению ПГЛ эритроцитов по сравнению с контролем (**табл. 1**). При 37°C увеличение концентрации глицерина (на каждые 5%) приводит к приросту уровня ПГЛ примерно в 1,5 раза. Присутствие глицерина в

гипертонической среде может приводить к дополнительному увеличению внутриклеточного содержания глицерина на этапе дегидратации. Вследствие этого на этапе регидратации в клетки должно войти больше воды, что и проявляется в высоком уровне постгипертонического повреждения клеток.

Таблиця 2.

Влияние глицерина в среде дегидратации (1,5 моль/л NaCl) на уровень постгипертонического гемолиза эритроцитов, предварительно обработанных глицерином (%)

Температура	Концентрация глицерина, %			
	0	5	10	15
37°C	26 ± 4	27 ± 5	38 ± 4 *	63 ± 6 *
0°C	22 ± 4	79 ± 4*	97 ± 2*	98 ± 2*

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными в отсутствие глицерина ($p < 0,05$).

При 0°C наблюдается высокий уровень ПГЛ эритроцитов во всем используемом концентрационном диапазоне глицерина. По данным работы Межидова С.Х. [9], при 0°C глицерин (20%) практически не входит в эритроциты, находящиеся в гипертонической среде (0,4 моль/л NaCl). Исходя из этого, можно предположить, что в наших условиях глицерин, присутствующий на этапе дегидратации, не входит в клетки, а как непроницающее вещество вносит дополнительный вклад в повышение осмотического давления внешней среды.

Выводы. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что постгипертонический лизис эритроцитов человека зависит от концентрации глицерина и его присутствия на разных этапах эксперимента, а также от температуры и продолжительности инкубирования клеток в среде дегидратации.

Перспективы дальнейших исследований. Дальнейшие исследования предполагают более подробное изучение влияния температуры и глицерина на гемолитическое повреждение клеток в условиях постгипертонического шока.

Литература

1. Shpakova NM, Ershov SS, Ershova NA, Aleksandrova DI. Temperaturata i osmolyarnost' kak faktory, opredelyayushchiye ustoychivost' eritrotsitov mlekopitayushchikh. Vestnik problem biologii i meditsiny. 2015;1(3):242-5. [in Russian].
2. Shpakova NM. Temperaturna ta osmotychna stiykist' erytrotytiv riznykh vydyd ssvatsiv [avtoreferat]. Kharkiv: Instytut problem kriobiologii i kriomedytyny; 2014. 44 s. [in Ukrainian].
3. Semionova EA, Ershova NA, Ershov SS, Orlova NV, Shpakova NM. Osobennosti proyavleniya postgipertonicheskogo lizisa eritrotsitov nekotorykh mlekopitayushchikh. Problemy kriobiologii i kriomedytyny. 2016;26(1):73-83. [in Russian].
4. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic. Cryobiology. 2008 Dec;57(3):251-6.
5. Semionova EA, Orlova NV, Shpakova NM. Effektivnost' khlorpromazina na etape udaleniya glitserina iz zamorozhennykh eritrotsitov. V Mizhnarodna naukovu-praktychna internet-konferentsiya. Suchasni dosyahnennya farmatsevtichnoyi tekhnologii i biotekhnologii; 2016 Lyst 18; Kharkiv: «NFaU»; 2016. s. 532-5. [in Russian].
6. Rozanov LF, Rozanova ED. Otsenka vnutrikletochnoy kontsentratsii glitserina v eritrotsitakh cheloveka metodom perturbatsionnoy differentsial'noy spektrofotometrii. Problemy kriobiologii. 1992;2:55-7. [in Russian].
7. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel. Eur. Biophys. J. 2013 Jan;42(1):33-46.
8. Hordiyenko OI, Kovalenko SYe, Kovalenko IF. Mekhanizmy pronykannya hlitserynu kriz' membrany erytrotytiv lyudyny. Problemy kriobiologii i kriomedytyny. 2012;22(4):389-97. [in Ukrainian].
9. Mezhdov SKh, Moiseyev VA. Vliyaniye kontsentratsii vnutrikletochnogo gemoglobina na pronitsayemost' eritrotsitov. Problemy kriobiologii. 1995;4:50-1. [in Russian].

ВПЛИВ ГЛІЦЕРИНУ НА ПОСТГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК ЕРИТРОЦИТІВ

Чабаненко О. О., Шапкина О. О., Орлова Н. В., Шпакова Н. М.

Резюме. В роботі досліджено залежності постгіпертонічного гемолізу еритроцитів, оброблених гліцерином, від тривалості інкубування клітин на етапі дегідратації і регідратації, а також від концентрації гліцерину. Встановлено, що визначальним у розвитку гемолізу еритроцитів є етап дегідратації. Якщо при 37°C постгіпертонічний гемоліз еритроцитів підвищується зі зростанням концентрації гліцерину (5, 10, 15%), то при 0°C високий рівень пошкодження клітин спостерігається при всіх концентраціях гліцерину.

Ключові слова: еритроцити, постгіпертонічний шок, гліцерин, постгіпертонічний лізис.

ВЛИЯНИЕ ГЛИЦЕРИНА НА ПОСТГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ШОК ЭРИТРОЦИТОВ

Чабаненко Е. А., Шапкина О. А., Орлова Н. В., Шпакова Н. М.

Резюме. В работе исследованы зависимости постгипертонического гемолиза эритроцитов, обработанных глицерином, от продолжительности инкубирования клеток на этапе дегидратации и регидратации, а также от концентрации глицерина. Установлено, что определяющим в развитии гемолиза эритроцитов является этап дегидратации. Если при 37°C постгипертонический гемолиз эритроцитов повышается с ростом концентрации глицерина (5, 10, 15%), то при 0°C высокий уровень поврежденных клеток наблюдается при всех концентрациях глицерина.

Ключевые слова: эритроциты, постгипертонический шок, глицерин, постгипертонический лизис.

GLYCEROL EFFECT ON POSTHYPERTONIC SHOCK OF ERYTHROCYTES

Chabanenko O. O., Shapkina O. O., Orlova N. V., Shpakova N. M.

Abstract. The glycerol effect on the sensitivity of human erythrocytes to posthypertonic shock has been studied in the research.

Posthypertonic shock was simulated by transferring the erythrocytes from the dehydration medium (1.5 mol/L NaCl) to the rehydration medium (0.15 mol/L NaCl) at 37 and 0°C. The experiment was carried out in two versions. In the first, the erythrocytes previously pretreated with glycerol (20 min, 37°C) were subjected to posthypertonic shock (control). In the second version, pretreated cells with glycerol were also exposed to posthypertonic shock, but glycerol was present in the dehydration medium (1.5 mol/L NaCl).

The study of glycerol effect on posthypertonic lysis of human erythrocytes made it possible to reveal that the level of hemolysis of the cells treated with glycerol depends on the duration of their incubation in a dehydration medium. Thus, as the incubation time in the dehydration medium increased from 5 to 20 min, the posthypertonic hemolysis of erythrocytes grew. With a further rise in incubation time of cells, the hemolytic damage growth is insignificant. In the case when erythrocytes, pretreated with glycerol, which were transferred to a dehydration medium containing glycerol, the level of posthypertonic hemolysis of erythrocytes have been increased approximately in 1.7 times. Proceeding from these results, to perform the following experiments, the exposure time of the cells in the dehydration medium was 20 min.

Since the statistically significant differences on posthypertonic lysis of erythrocytes with increasing incubation time in the rehydration medium (0.15 mol/L NaCl) were not detected, so in further studies the cells were incubated in rehydration medium for 5 min.

Based on the obtained experimental results, a mechanism for the development of posthypertonic lysis of erythrocytes in the presence of glycerol is proposed. So, in the dehydration medium, the erythrocytes pretreated with glycerol are getting shrunk as a result of the water loss, and in the plasmatic membranes there were formed the defects, via those the water enters cells at the rehydration stage. When the erythrocytes reach the critical hemolytic volume, then lysis occurs. In the case of the glycerol presence in the dehydration medium, the total content of intracellular substances becomes higher due to the entrance of extracellular glycerol. Therefore, at the rehydration stage, more water should enter the cell; that is an evidence of a higher posthypertonic lysis level.

The usage of different concentrations of glycerol allowed to reveal that at 37°C the posthypertonic lysis level of erythrocytes has not been changed with the use of 5 and 10% glycerol and increase if glycerol concentration is 15%.

The addition of glycerol to the dehydration medium leads to an increase of posthypertonic hemolysis of erythrocytes at glycerol concentrations (10 and 15%) approximately in 1.5 times. Apparently, glycerol does not completely come out from the cells during the dehydration stage. This leads to an increase of erythrocytes hemolytic damage at the rehydration stage. At 0°C the high level of posthypertonic lysis of control cells and erythrocytes transferred to the rehydration medium from the dehydration medium containing glycerol (when used throughout the concentration range) is observed.

Further studies suggest a more detailed investigation of the effect of temperature and glycerol on the posthypertonic shock of cells hemolytic damage.

Key words: erythrocytes, posthypertonic shock, glycerol, posthypertonic lysis.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 27.02.2018 року