

Влияние условий дегидратации и ионной силы среды регидратации на осмотический отклик и уровень лизиса регидратированных эритроцитов

С. В. Пателарос

НИИ проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
310015, Харьков, ул. Переславская, 23

Проведенные исследования показали, что между объемными изменениями эритроцитов и уровнем гемолиза не существует прямой связи. Это свидетельствует о том, что постгипертонический лизис (ПЛ) не развивается по коллоидно-осмотическому механизму, а обусловлен формированием мембранных повреждений на этапе регидратации. Эти повреждения регулируются и могут быть ингибированы повышением ионной силы среды регидратации. Клетки в условиях гипертонической инкубации не повреждаются, однако повышается их чувствительность к последующим мембранным дефектам. ПЛ проявляется больше в неэлектролитных (сахарозных) средах по сравнению с электролитными (NaCl, ChCl), где мембраны восстанавливают свою исходную проницаемость медленнее, чем в сахарозных средах.

Введение. Дегидратация эритроцитов, происходящая при их инкубации в гипертонических растворах солей и неэлектролитов, оказывает значительное влияние на состояние как цитоплазматических компонентов, так и клеточной мембраны [1, 2]. Существует предположение о том, что эритроциты наиболее чувствительны не столько к гипертонической инкубации, сколько к обратному процессу — их возвращению в исходные физиологические условия. Надо отметить, что возникающий при этом лизис эритроцитов (постгипертонический лизис — ПЛ) является одним из важных компонентов криоповреждения эритроцитов при замораживании — оттаивании, однако его механизм остается неясным.

В работе [3] высказано предположение о том, что постгипертоническое повреждение эритроцитов связано, главным образом, с предварительной их инкубацией в гипертонических условиях. Авторы [4—6] показали, что ПЛ зависит от концентрации гипертонических сред, в которых изначально ингибируются клетки, а также от времени экспозиции

и концентрации солей в изотоническом растворе, где происходит последующая регидратация. В публикации [7] также пришли к выводу, что мембраны эритроцитов не меняют своей проницаемости до фазы регидратации, однако при повышении температуры среды мембраны становятся проницаемыми для непроницающих в норме веществ, что ведет к коллоидно-осмотическому набуханию и лизису части клеток.

В данной работе исследуется механизм ПЛ и возможность его регулирования на основе данных, показывающих влияние разных факторов сред дегидратации и регидратации на развитие ПЛ, а также осмотический отклик эритроцитов при их переходе от гипертонических в изотонические условия.

Материалы и методы. В работе использованы донорские эритроциты второй группы, заготовленные на консерванте Глюгидир, со сроком хранения не более пяти дней. Клетки трижды отмывали физиологическим раствором (150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl-буфер, рН 7,4), центрифугировали (3000 об/мин, 3 мин) и удаляли надосадочную жидкость. Осадок полученных эритроцитов хранили при 0 °С не более 1 ч. Для исследования

динамики гемолиза, а также изменения формы регидратированных эритроцитов в зависимости от условий дегидратации были произведены измерения с большим диапазоном параметров инкубации клеток. После отмывки эритроцитов осадок клеток в объеме 100 мкл помещали в 900 мкл гипертонического раствора сахарозы (0,5—1,2 М) (5 мМ фосфатный буфер, рН 7,4) при температуре 0—37 °С в течение 5—60 мин. Далее при комнатной температуре (18—20 °С) 10 мкл суспензии перемещали в специальную кювету монохроматора СФ-4А, содержащую разные изотонические среды 0,15 М NaCl или 0,27 М сахарозы, либо 0,15 М ChCl (холин-хлорид) (буфер 10 мМ трис-HCl, рН 7,4). В кювете клетки постоянно перемешивали магнитной мешалкой.

С помощью монохроматора СФ-4А спектрофотометрическим методом определяли степень гемолиза клеток, а также изменения их формы при переходе от гипертонических в изотонические условия. При длине волны 720 нм, расходимости светового пучка 3 светопоглощение (или оптическая плотность — OD) эритроцитарной суспензии прямо пропорционально количеству интактных клеток, т. е. уровню гемолиза [8, 9]. Кривые динамики изменения OD регистрировали на самописце. При этом можно выделить две характеристики светового сигнала — амплитуду его изменения и ширину шумовой дорожки (амплитуда флуктуации), несущие соответственно информацию о степени гемолиза и дискоидности (и сферичности) клеток [8, 10].

Для определения влияния ионной силы среды регидратации на гемолиз и осмотическое поведение регидратированных эритроцитов в изотоническую среду добавляли 4 М NaCl или 4 М KCl до конечной их концентрации в растворе 350 мМ, после того как туда была перенесена суспензия клеток. Кроме того, был проверен уровень ПЛ клеток в растворах NaCl разной осмолярности (0,2—0,5 М).

Данные об изменениях уровня гемолиза и формы клеток сопоставляли с информацией об объемных распределениях клеток, которые были определены спектроцитометрическим анализатором ЭЦА-01 (метод спектроскопии импульсов сопротивления — СИС). Принцип его действия основан на измерении изменений электрического тока (D_t), протекающего в цепи между электродами, возникающих, когда клетки с потоком жидкости проходят через цилиндрическое отверстие датчика, разделяющего электроды. Измеряя ток через отверстие датчика, можно измерить объем клеток [11, 12]. Разбавленную суспензию дегидратированных эритроцитов

(время дегидратации 15 или 30 мин, температура 37 °С) прокачивали (скорость 0,5—1,5 м/с) через измерительное микроотверстие (диаметр 50 мкм) в кювету с изотоническим раствором NaCl. Через микроотверстия пропускали постоянный электрический ток (не более 0,2 мА) и спустя 12 мин регистрировали его импульсы, обусловленные прохождением клеток через датчик, в виде гистограмм объемных распределений эритроцитов на экране ЭВМ. Последующие измерения проводили через 12 мин после установления концентрации NaCl 350 мМ. Указанные условия измерения (ток, диаметр, скорость) не приводят к электрическому пробое мембран [12] и к значительным деформациям клеток при прохождении датчика [11], минимизируя погрешности регистрации объемных распределений. Объем клеток определяется по формуле:

$$V = f \cdot D_t \cdot K / I,$$

где V — объем клеток; D_t — изменение тока при прохождении клеток через измерительное отверстие; I — ток в свободном от клеток отверстии; K — коэффициент, зависящий от геометрии измерительной зоны датчика; $f = 1,2$ для дискоцитов, $f = 1,5$ для сфероцитов [11].

Результаты и обсуждение. На рис. 1, 2 представлены данные об изменении светопоглощения (OD) суспензии эритроцитов, преинкубированных при 37 °С в среде, содержащей 1, 2 М сахарозы, а затем ресуспендированных в изотонических средах NaCl, холин-хлорида ChCl и сахарозы. Видно, что регидратация приводит к прогрессивному уменьшению светопоглощения в течение 1—15 мин. С увеличением продолжительности гипертонической инкубации от 1 до 30 мин уменьшается дискоидность регидратированных клеток и увеличивается степень их набухания и лизиса, что выражается в более значительном уменьшении светопоглощения суспензии и амплитуды флуктуации сигнала [8]. При этом лизис особенно явно проявляется в неэлектролитной среде.

В ранних работах ПЛ связывали с «нагружением» клеток в гипертонических растворах непроницаемыми в нормальных условиях ионами Na⁺ и сахарозы. Соответственно предполагалось, что при возвращении таких клеток в изотонические условия они гемолизуют по коллоидно-осмотическому механизму [5, 6, 13]. Однако позже выяснилось, что непосредственно на этапе гипертонической инкубации не наблюдается значительного поступления в клетки ионов Na или сахарозы [14]. В то же время включение в эритроциты Na и сахарозы было обнаружено после переноса клеток

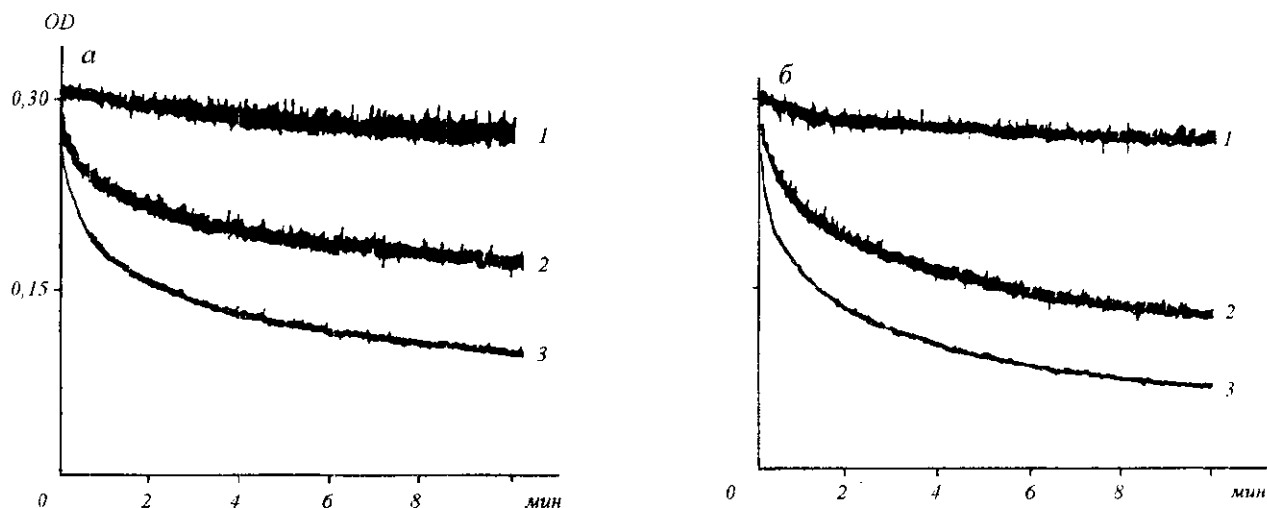


Рис. 1. Динамика изменения оптической плотности (OD) эритроцитов при их регидратации в различных электролитных изотонических средах: а — 0,15 М NaCl; б — 0,15 М ChCl (холин-хлорид). Клетки инкубировали в 1,2 М растворе сахарозы при 37 °С в течение 1 (1); 15 (2); 30 мин (3)

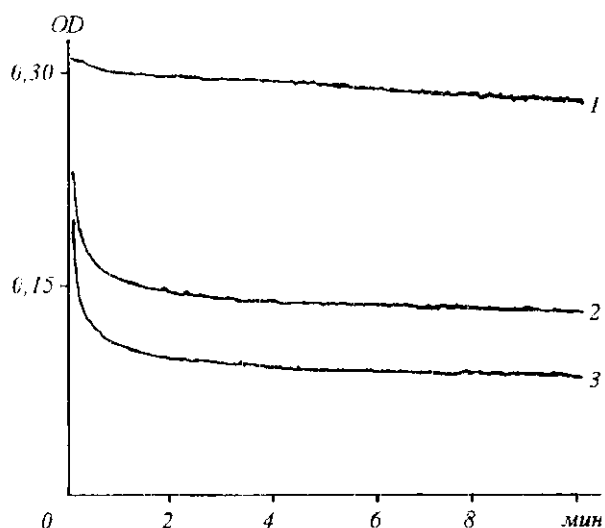


Рис. 2. Динамика изменения оптической плотности (OD) эритроцитов при их регидратации в изотоническом 0,27 М растворе сахарозы после дегидратации в 1,2 М гипертоническом растворе сахарозы при 37 °С в течение 1 (1); 15 (2); 30 мин (3)

из гипертонических в изотонические условия, что можно объяснить значительным возрастанием проницаемости мембраны непосредственно на этапе

восстановления объема клеток до изотонической величины [15].

Согласно другим данным, мембрана эритроцитов, прошедших через фазу лизиса, способна замыкаться и восстанавливать проницаемость, близкую к исходной [7, 15]. Это подтверждается и результатами данной работы (см. рис. 1, 2), согласно которым регидратация в изотонической сахарозе сопровождается относительно быстрым прекращением критического набухания эритроцитов по сравнению с изотоническими растворами NaCl и ChCl, где этот процесс растянут во времени (см. рис. 1, 2). Последнее означает, что непроницаемость мембраны для молекул сахарозы восстанавливается раньше, чем для ионов Na и холин-хлорида, имеющих меньший размер. Исходя из этого можно прийти к выводу о том, что восстановление исходной проницаемости мембраны эритроцитов происходит раньше в неэлектролитных, чем в электролитных средах.

Таким образом, из сравнения кривых на рис. 1, 2 следует, что поведение эритроцитов при регидратации зависит от времени инкубации в гипертонической сахарозе (время дегидратации) и состава регидратирующей среды.

Набухание и гемолиз эритроцитов при регидратации указывают на то, что при восстановлении объема клеток может происходить нарушение

структурной целостности плазматической мембраны с появлением дефектов, приводящих к гемолизу.

Изменения, возникающие в мембране эритроцитов при регидратации, могут отражаться на осмотическом поведении клеток, в частности, на характере их осмотического ответа при помещении в гипертонические или гипотонические среды. В связи с этим была изучена динамика осмотического отклика клеток в широком диапазоне концентраций дегидратирующих сред. На рис. 3 представлены серии кривых, отражающих динамику лизиса эритроцитов, регидратированных в электролитной

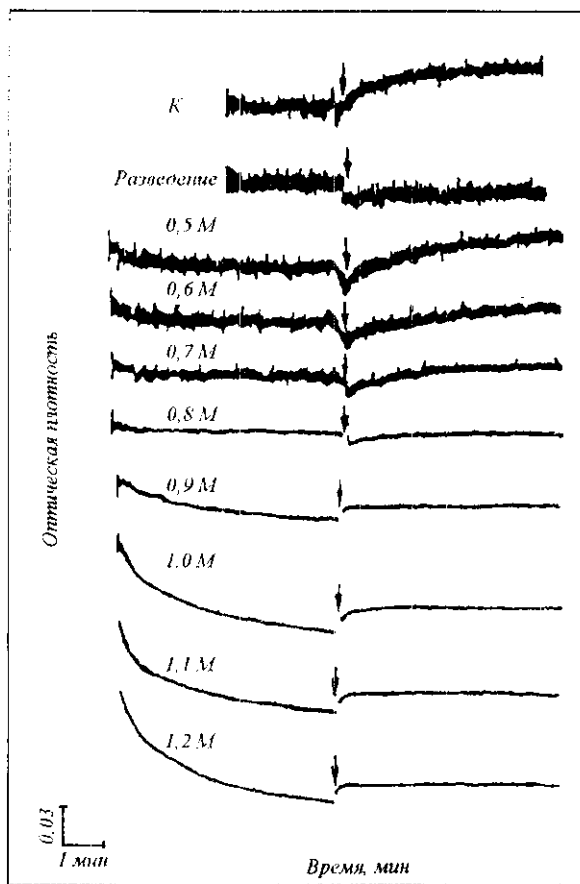


Рис. 3. Изменение оптической плотности суспензии эритроцитов при регидратации клеток в среде, содержащей 0,15 М NaCl после инкубации в разных гипертонических растворах сахарозы (0,5—1,2 М) при 37 °С в течение 15 мин. Стрелками указаны моменты добавления в кювету концентрированного раствора 4 М NaCl до конечной его концентрации в среде 0,33 М. Показан ответ контрольных эритроцитов на добавление 4 М NaCl и уменьшение светопропускания при разведении тем же количеством физиологического раствора

среде после 15 мин инкубации в гипертонических растворах сахарозы от 0,5 до 1,2 М, а также осмотический отклик клеток при увеличении осмолярности внешней среды до 330 мМ после добавления концентрированного 4 М раствора NaCl. Видно, что осмотический отклик эритроцитов зависит от степени первоначальной дегидратации, т. е. от концентрации исходного гипертонического раствора. При этом можно выделить три диапазона концентрации сахарозы, в пределах которых характер осмотического отклика клеток существенно отличается.

В первом диапазоне концентраций (0,5—0,6 М) параметры осмотического отклика сравнимы как в случае контрольных клеток, так и в случае, когда эритроциты находились в тех же условиях в течение 1 и 15 мин (см. рис. 1, а) В связи с этим можно утверждать, что кратковременная (1 мин) дегидратация не приводит к существенному изменению осмотического поведения эритроцитов и нарушению их мембранной структуры после регидратации, хотя в неэлектролитной среде наблюдается набухание, но не лизис клеток в данный период времени дегидратации (см. рис. 2).

Во втором диапазоне концентрации (0,7—0,9 М) отмечается постепенная сферуляция клеток, однако динамика осмотического отклика невысокая.

Третий диапазон (1—1,2 М) характеризуется максимальным уровнем осмотического отклика и наиболее высокой скоростью набухания и лизиса клеток. Как видно из рис. 3, увеличение ионной силы среды регидратации добавлением 4 М NaCl после внесения клеток в изотоническую среду приводит к ингибированию гемолиза.

Этот факт объясняет, почему уровень гемолиза меньше в гипертонических средах по сравнению с изотоническими [14, 16], однако механизм подобного влияния эритроцитов на развитие лизиса остается неясным. Можно предположить, что главным действующим фактором в этих условиях является ионная сила среды, контролирующая скорость замыкания дефектов мембраны, возникающих при регидратации.

Данные, представленные на рис. 1—3, показывают, что трансформация клеток в сфероциты на этапе регидратации не всегда сопровождается гемолизом клеток. Однако гемолиз наступает при увеличении параметров гипертонической инкубации (осмолярность, время). Это свидетельствует о том, что ПЛ развивается не по коллоидно-осмотическому механизму, а обусловлен внутриклеточными изменениями, происходящими в эритроцитах на этапе предварительной дегидратации [16, 17] и

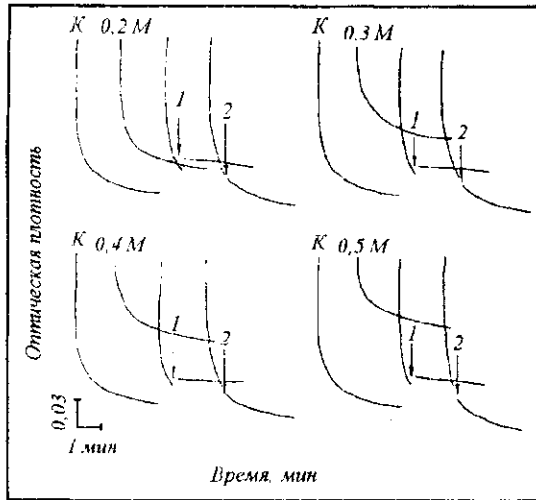


Рис. 4. Влияние ионной силы NaCl (0,2—0,5 М) на динамику развития ПЛ. Стрелками обозначены моменты добавления: 1 — концентрированного раствора 4 М NaCl для получения конечной концентрации 0,33 М; 2 — того же количества физиологического раствора для изменения светопоглощения при разбавлении. Клетки регидратировали в 0,15 М NaCl после дегидратации в 1,2 М сахарозе в течение 15 мин при 37 °С

ведущими к снижению устойчивости плазматической мембраны к постгипертоническим повреждениям. Поскольку уровень лизиса в условиях гипертонической инкубации незначителен [16], можно сделать вывод о том, что в случае ПЛ мембранные повреждения клеток возникают непосредственно на этапе регидратации, т. е. при переносе клеток в изотонические условия.

На рис. 4 показано влияние ионной силы NaCl на динамику развития ПЛ. При этом увеличение ионной силы происходит до и после внесения клеток в среду регидратации. Стрелками 2 показано добавление физиологического раствора (0,15 М NaCl) для изменения ОД при разбавлении, а стрелками 1 — добавление концентрированного раствора NaCl для того, чтобы получить необходимую конечную концентрацию. Видно, что с увеличением ионной силы от 0,2 до 0,5 М усиливается блокирование гемолиза; причем оно проявляется более слабо, если ионная сила возрастает после внесения клеток в среду. Разбавление среды регидратации приводит к уменьшению ОД. Данные, приведенные на рис. 4, показывают, что величина изменения объема клеток при регидратации неоднозначно определяет уровень повреждения клеток

при ПЛ, поскольку клетки (сфероциты) сохраняют свою форму во всех случаях как до, так и после блокирования гемолиза. При этом блокирование не приводит к восстановлению исходной формы или объема клеток (дискоцитов).

Следовательно, степень нарушения проницаемости мембраны при ПЛ зависит не столько от изменения объема или формы клеток, сколько от изменения ионной силы среды, при увеличении которой гемолиз ингибируется.

Для проверки объемных изменений регидратированных клеток как до, так и после изменения осмолярности среды регидратации, применен метод СИС, позволяющий оценить объем эритроцитов.

На рис. 5 представлена зависимость среднего относительного объема эритроцитов после дегидра-

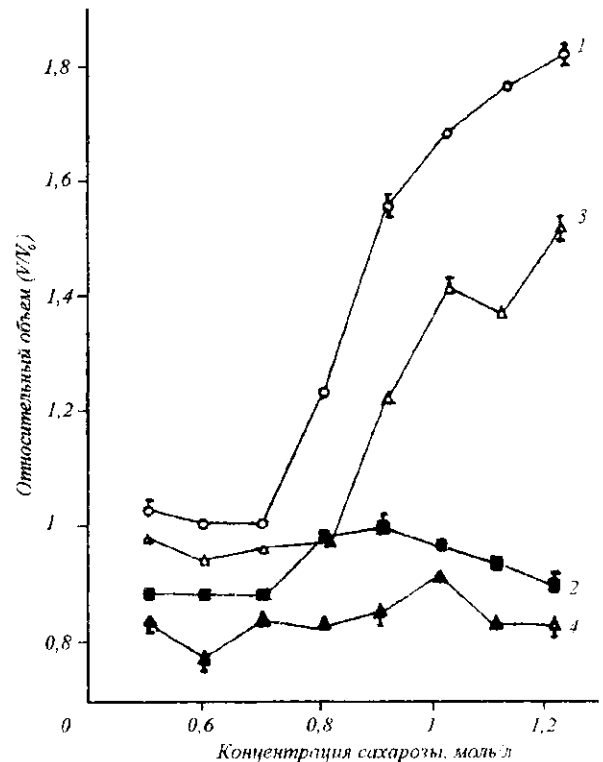


Рис. 5. Зависимость среднего относительного объема эритроцитов через 12 мин после регидратации в изотоническом растворе NaCl (1, 3) и через 12 мин после увеличения концентрации соли в этом растворе до 350 мМ NaCl (2, 4) от концентрации сахарозы в среде дегидратации. Клетки дегидратировали в сахарозных средах при 37 °С в течение 15 (3, 4) и 30 мин (1, 2)

тации и доведения концентрации соли в этом растворе до 350 мМ NaCl. Через 15 и 30 мин инкубации при 37 °С дегидратированные эритроциты помещали в изотоническую среду NaCl и спустя 12 мин снимали гистограммы распределения клеток по объему. Последующие измерения осуществляли через 12 мин после доведения концентрации NaCl до 350 мМ. Эти зависимости показывают, что значительно набухание клеток (свыше 10 % от исходного изотонического объема) наблюдается при регидратации, если концентрация сахарозы превышает 0,7 М для времени дегидратации 30 мин и 0,8 М для времени инкубации 15 мин. Как для 15, так и для 30 мин инкубации во всем диапазоне концентраций сахарозы отмечается сниженный уровень объема регидратированных эритроцитов после увеличения осмолярности среды.

Приведенные на рис. 5 данные указывают на то, что наблюдаемое сжатие клеток соответствует представлениям о приобретении клетками формы эхиноцитов после изменения тоничности среды регидратации в случае дегидратации в гипертонических средах сахарозы с концентрацией 0,5—0,7 М. Однако сниженный уровень объема, отмеченный в остальном диапазоне концентраций сахарозы (от 0,8 до 1,2 М), свидетельствует об уменьшении или прекращении дальнейшего увеличения объема сфероцитов после введения NaCl. Упомянутый эффект, возможно, объясняет ранее описанное блокирование ПЛ при увеличении ионной силы среды регидратации клеток.

Полученные данные указывают на аддитивность действия вышеперечисленных факторов (степень, время и температура дегидратации) в механизме повреждения эритроцитов при регидратации. Увеличение этих параметров приводит к ускорению накопления необратимых изменений в клетках, в результате которых эритроциты лизируют при последующей регидратации.

Вышеизложенные результаты позволяют заключить, что в основе лизиса эритроцитов, индуцированного при переносе их из гипертонической в изотоническую среду, лежит не коллоидно-осмотический процесс, а формирование на стадии регидратации мембранных дефектов или пор, индуцированных внутриклеточными структурными и биохимическими изменениями, которые развиваются на этапе начальной инкубации клеток в гипертонических условиях. Увеличение параметров дегидратации (температура, осмолярность и время) стимулирует развитие необратимых изменений в форме и объеме мембран регидратированных клеток, однако повышение ионной силы среды регидратации ингибирует этот эффект.

S. V. Patelaros

Вплив умов дегідратації та іонної сили середовища регідратації на осмотичний відгук і рівень лізису регідратованих еритроцитів

Резюме

В результаті проведених досліджень показано, що між об'ємними змінами еритроцитів та рівнем гемолізу не існує прямого зв'язку. Це свідчить про те, що постгіпертонічний лізис (ПЛ) не розвивається за колоїдно-осмотичним механізмом, а обумовлений формуванням мембранних пошкоджень на етапі регідратації. Останні регулюються і можуть бути пригнічені зростанням іонної сили середовища регідратації. Клітини в умовах гіпертонічної інкубації не пошкоджуються, однак підвищується їхня чутливість до наступних мембранних дефектів. ПЛ вирізняється більше в неелектролітних (сахарозних) середовищах порівняно з електролітними (NaCl, ChCl), де мембрани відновлюють свою первинну проникність повільніше, ніж у сахарозних середовищах.

S. V. Patelaros

Influence of dehydration conditions and ionic strength of rehydration media on osmotic response and lysis of rehydrated erythrocytes

Summary

Posthypertonic lysis (PL) of erythrocytes represents one of the main factors of red blood cells (RBC) injuring caused by their low temperature preservation. Therefore PL mechanism is of great interest from the point of view of increasing cells stability after their melting. The present report deals with the investigation of the osmotic response of the rehydrated RBC in the electrolyte and non-electrolyte isotonic media, preincubated under hypertonic solutions. PL has been found to be related to the formation of membrane hemolytic pores at the stage of rehydration during restoration of the RBC volumes and not under conditions of hypertonic incubation. Hemolytic pores depend on both dehydration and rehydration conditions, such as osmolarity and ionic strength. Hemolysis is stronger manifested in the non-electrolyte media, it is intensified by the prolongation to the hypertonic incubation, while the rise in the ionic strength of the rehydration medium results in its inhibition. Peculiarities in osmotic behaviour of rehydrated erythrocytes allow to conclude the changes in their cytoplasm organisation relative to native cells.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болдырев А. А. Введение в биомембранологию.—М.: Изд-во МГУ, 1990.—206 с.
2. Черницький Е. А., Воробей А. Б. Структура и функции эритроцитарных мембран.—Минск, 1981.—300 с.
3. Mazur P., Cole K. W. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration // *Cryobiology*.—1985.—22.—P. 509—536.
4. Lovelock J. E. The hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing // *Biochim. et biophys. acta*.—1953.—N 10.—P. 414—426.
5. Zade-Oppen A. M. M. Posthypertonic hemolysis in sodium chloride systems // *Acta Physiol. Scand.*—1968.—73, N 4.—P. 341—364.
6. Zade-Oppen A. M. M. The effect of mannitol, sucrose, raffinose and dextran on posthypertonic hemolysis // *Ibid.*—74, N 1—2.—P. 195—206.
7. Pegg D. F., Diaper M. P. On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes // *Biophys. J.*—1988.—54, N 3.—P. 471—488.
8. Hani A., Grenoth R. The dependence of the hemolysis potency

- of bile salts // *Biochim. et biophys. acta.*—1990.—1027.—P. 199—204.
9. Young J. D. E., Leong L. G., Dinome M. A. et al. A semiautomated hemolysis microassay for membrane lytic proteins // *Anal. Biochem.*—1986.—154.—P. 649—654.
10. А. с. № 1573429. Устройство для определения оптической плотности биологических суспензий / А. В. Дегтярев, С. В. Руденко, Т. П. Бондаренко // *БИ.*—1990.
11. Akeson S. P., Mel H. C. Erythrocyte and ghost cytoplasmic resistivity and voltage // *Biophys. J.*—1983.—44, N 3.—P. 397—403.
12. Bichery C. Y., Mel H. C. Membrane and cytoplasmic resistivity properties of normal and sickle red blood cells // *Cell Biophys.*—1986.—8.—P. 243—259.
13. Zade-Oppen A. M. M. Posthypertonic hemolysis in sucrose systems // *Experientia.*—1970.—26, N 3.—P. 1087—1088.
14. Woolgar A. E., Morris G. J. Same combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on posthypertonic hemolysis of human red blood cells // *Cryobiology.*—1973.—10.—P. 82—86.
15. Daw A., Farrant J. Morris G. J. Membrane leakage of solutes after human thermal shock of freezing // *Cryobiology.*—1973.—10, N 2.—P. 155—163.
16. Бондаренко В. А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Дис. ... д-ра биол. наук.—Харьков, 1990.—446 с.
17. Поздняков В. В., Бондаренко В. А. Взаимодействие между начальными осмотическими условиями среды и устойчивостью эритроцитов на гипертонический стресс в 4 М NaCl // *Криобиология.*—1989.—№ 1.—С. 40—43.

Поступила в редакцию 07.04.98