

Порівняльне вивчення дії механічного стресу на еритроцити людини і тварин

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;
E-mail: starling_nataly@mail.ru*

Досліджували чутливість еритроцитів людини та тварин (бик, щур, кролик, кінь) до дії механічного стресу. Показано, що така дія призводить до часозалежного (5-60 хв) виходу катіонів калію з еритроцитів ссавців та часткового гемолітичного пошкодження клітин. При цьому рівні вивільнення іонів калію і гемолізу не збігалися для еритроцитів усіх ссавців, крім кролика. Найбільш чутливими до механічного стресу (60 хв) за гемолітичним пошкодженням були еритроцити щура (32 %), за вивільненням іонів калію – еритроцити бика (66 %), найменш чутливими за обома показниками – еритроцити кролика (близько 20 %). Проведений кореляційний аналіз показав статистично значущий негативний зв'язок між значеннями механічного гемолізу еритроцитів ссавців і поверхнево-об'ємного співвідношення клітин ($r_s = -0,900$, $P = 0,037$). Обговорюється можлива відповідність вмісту фосфатидилетаноламіну в мембранах еритроцитів ссавців і рівня втрати катіонів калію під час дії механічного стресу.

Ключові слова: еритроцити ссавців; механічний стрес; катіони калію; гемолітичне пошкодження.

ВСТУП

Головне функціональне навантаження еритроцитів – транспортування кисню до усіх органів та тканин. Їх найважливішою фізичною характеристикою, що забезпечує функціонування, є здатність до деформації, яка дає змогу проходити по судинах, розміри яких подібні або навіть менші за еритроцит. Здатність еритроцитів до деформації залежить від ендогенних (в'язкоеластичні властивості мембрани; в'язкість цитоплазми, розміри клітин) [1] і екзогенних факторів [2]. Так, механічний стрес, який відбувається при використанні систем штучного кровообігу, спричинює її зменшення [3]. Слід відмітити, що навіть невелике зниження цього показника супроводжується зменшенням прохідності клітин по капілярах, що призводить до тканинної ішемії [4]. Механічні напруги, що виникають у мембрані еритроцитів при їх деформації, можуть спричинити руйнування клітин [3].

© Н.М. Шпакова, Н.В. Орлова, О.Є. Ніпот, Д.І. Александрова

Для вивчення механічного впливу на еритроцити використовують різні методи і способи. Деякі з них дають змогу оцінити деформацію тільки одного або декількох еритроцитів [5], інші дають інформацію про стан клітинної суспензії в цілому [6-8]. Ці способи мають деякі особливості. Так, для методу продавлювання клітинної суспензії через медичну голку властива низька відтворюваність результатів і невеликий об'єм суспензії [7], метод, запропонований Заводником із співавт. [6], характеризується досить низьким рівнем гемолітичного пошкодження клітин при тривалій дії стресу. У роботі [9] еритроцити піддають дії механічного стресу перемішуванням клітинної суспензії з пластиковими кульками за допомогою магнітної мішалки. Такий підхід дає змогу збільшити об'єм суспензії, який є достатнім для повної і всебічної характеристики клітин після дії стресу, підвищити рівень гемолітичного пошкодження еритроцитів і відтворюваність результатів.

Дослідження реакції клітин людини і різних видів тварин на дію механічного стресу є досить актуальними [10–12]. Для роботи були обрані еритроцити ссавців, що відрізняються за розмірами, транспортними характеристиками клітинної мембрани, а також за певними особливостями складу цитоплазми і цитоскелет-мембранного комплексу [13–17].

Мета нашої роботи – дослідити в порівняльному аспекті чутливість еритроцитів ссавців (людина, бик, щур, кролик, кінь) до дії механічного стресу (за рівнем гемолітичного пошкодження та вивільненням катіонів калію з клітин).

МЕТОДИКА

Для дослідження використовували еритроцити, отримані з донорської крові людини, бика, коня, кролика та щура, заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцир». Всі маніпуляції проводили відповідно до вітчизняних та міжнародних біоетичних норм.

Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали центрифугуванням (центрифуга ОПн-3У4.2, 3000 об/хв, 3 хв) у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, рН 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше 4 год при 0°C.

Клітини піддавали дії механічного стресу перемішуванням клітинної суспензії (гематокрит 20%) в ємності, що була заповнена пластиковими кульками діаметром 5 мм, при кімнатній температурі (22°C). Об'єм суспензії був 5 мл, кількість пластикових кульок – 31. Перемішували за допомогою магнітної мішалки ММ-5, швидкість обертання – 1200 об/хв [9]. Через різні часові інтервали (5-60 хв) відбирали суспензії еритроцитів для визначення виходу гемоглобіну та іонів калію з клітин.

Рівень гемолізу еритроцитів досліджували спектрофотометрично при довжині хвилі

543 нм. За 100% приймали поглинання проби, в яку додавали тритон X-100 (0,1 %).

Вихід іонів калію з еритроцитів в умовах стресу визначали за допомогою іонометра універсального ЕВ-74 з використанням іонселективного електрода ЕЛІС-121К і електрода порівняння ЕВЛ-1М3.1. Концентрацію іонів калію вимірювали в супернатанті суспензії еритроцитів (гематокрит 20%). 100 %-й вихід іонів калію з еритроцитів отримували руйнуванням клітин у результаті триразового циклу заморожування-розморожування.

Гематокрит суспензії еритроцитів визначали на мікрогематокритній центрифугі МГЦ-8 [18]. Осмоляльність розчинів речовини досліджували кріоскопічним методом із використанням осмометра ОМКА-1Ц-01.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми Statistica 6.0. Для перевірки статистичної значущості відмінностей досліджуваних числових показників застосовували критерії t Стьюдента та Манна-Уїтні. Кореляційний аналіз з використанням непараметричного коефіцієнта рангової кореляції Спірмена (r_s) застосовували для аналізу зв'язків між досліджуваними показниками. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пошкодження клітин за умов механічного стресу оцінювали за двома показниками: вихід катіонів калію з клітин та рівень гемолізу (рис. 1). Слід відмітити, що тривала дія стресу призводить до часозалежного виходу K^+ з еритроцитів людини і тварин. Однак характер втрати цих катіонів клітинами ссавців має видові особливості.

При порівнянні часового проміжку, після якого починається витік катіонів калію з еритроцитів ссавців, видно, що мінімально значуща втрата катіонів калію клітинами щура (перевищує 10 %) спостерігається після 10 хв, бика – 15 хв, кролика, людини і

коня – 30 хв дії стресу (див. рис. 1). В умовах тривалого інкубування еритроцитів при механічному стресі (60 хв) відбувається ви-

хід катіонів калію з клітин кролика на рівні 20 %. Для еритроцитів коня, людини і щура втрата калію становить 30-45 %, у той час як для клітин бика цей показник набагато вищий (65 %).

Найбільш стійкими до дії механічного стресу є клітини кролика, які містять максимальну кількість катіонів калію порівняно з еритроцитами інших досліджених ссавців

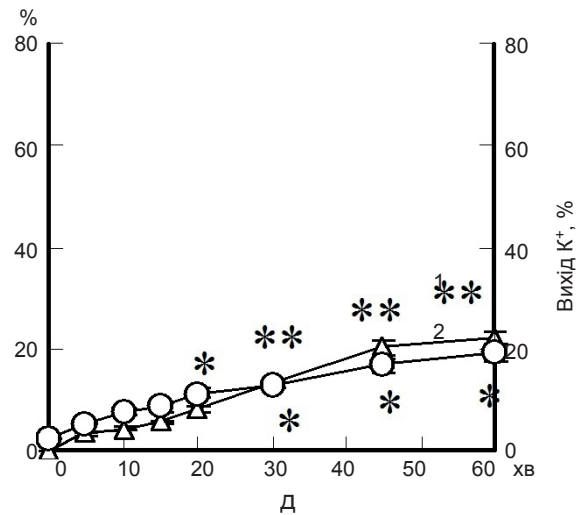
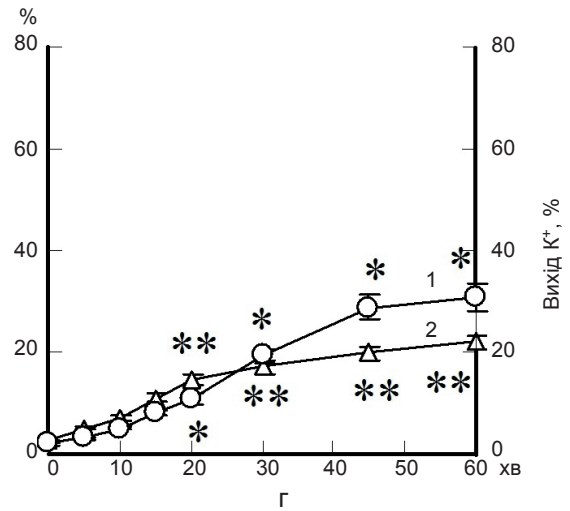
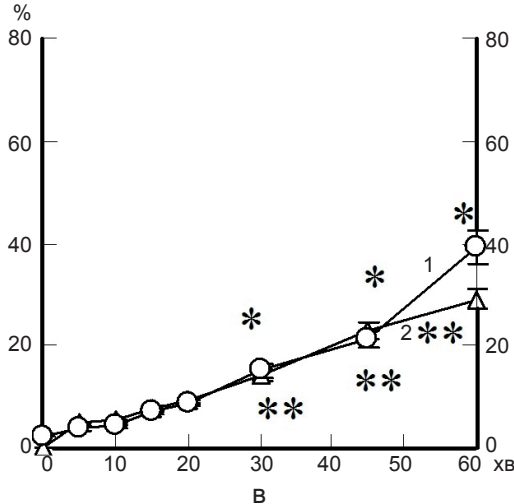
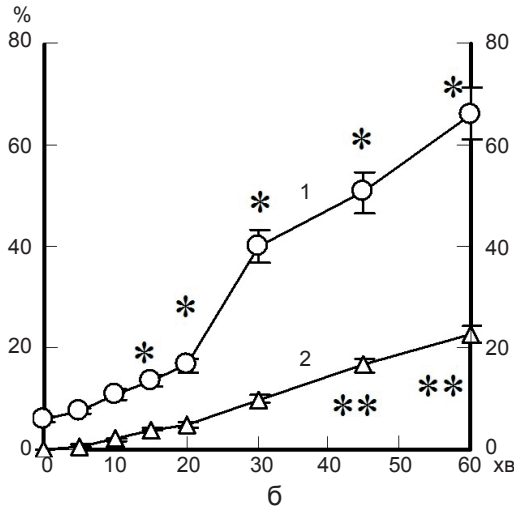
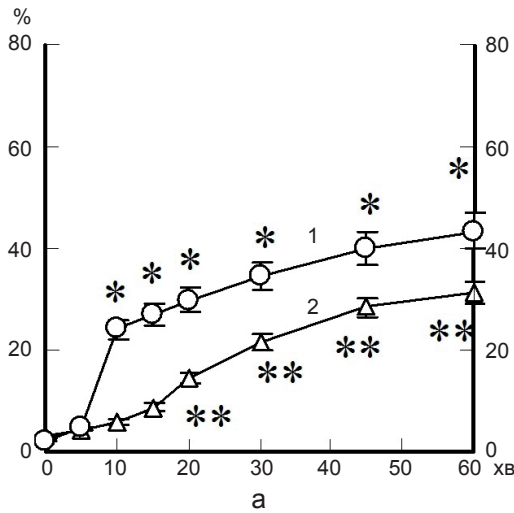


Рис. 1. Залежності виходу катіонів калію з клітин (1) і рівня гемолізу еритроцитів ссавців (2) від тривалості дії механічного стресу: а – щур, б – бик, в – людина, г – кінь, д – кролик.

*, ** $P < 0,05$ – статистично значущі відмінності порівняно з контрольними значеннями гемолізу і виходу K^+ з клітин відповідно.

[14]. Клітини бика, які є натрійвмісними, характеризуються мінімальним вмістом катіонів калію [14] і високою чутливістю до дії стресу (див. рис. 1).

В умовах стресу разом з втратою еритроцитами ссавців внутрішньоклітинних катіонів калію може спостерігатися вихід макромолекул гемоглобіну (див. рис.1). Рівень гемолізу еритроцитів ссавців залежить від тривалості дії стресу на клітини. Слід відмітити вірогідні відмінності між рівнем механічного гемолізу еритроцитів людини і щура порівняно з клітинами бика, коня і кролика (за умов дії стресу протягом 60 хв; $P < 0,05$).

Проведений кореляційний аналіз із використанням коефіцієнта рангової кореляції Спірмена показав статистично значущий зв'язок між значеннями механічного гемолізу еритроцитів тварин і розмірами їх клітин [4,10,12] (рис.2). Так, найбільш чутливі до дії механічного стресу еритроцити щура та людини характеризуються меншим поверхнево-об'ємним співвідношенням (S/V) порівняно з більш стійкими клітинами бика, кролика і коня [19-21].

При вивченні гіпотонічного лізису ери-

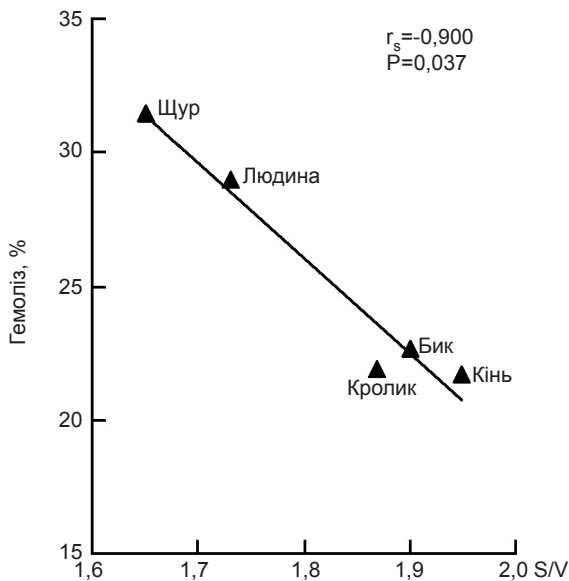


Рис.2. Взаємозв'язок рівня гемолізу еритроцитів ссавців за умов дії механічного стресу (60 хв) та їх поверхнево-об'ємним відношенням (S/V)

троцитів ссавців показано, що клітини за зниженням чутливості до гіпотонічних середовищ (оцінюється за індексом осмотичної крихкості) можна розташувати в ряд: кінь, бик, кролик, людина, щур [22]. Виходячи з результатів нашої роботи, еритроцити за зниженням чутливості до механічного стресу (оцінюється за гемолізом після 60 хв дії стресу) розташовуються в ряд: щур, людина, бик, кролик, кінь (див. рис. 1). Порівняльний аналіз послідовностей, які представлені вище, свідчить, що еритроцити ссавців, які чутливі до гіпотонічного лізису, достатньо стійкі до дії механічного стресу. Відомо, що гіпотонічне пошкодження пов'язують із розривом еритроцитарної мембрани внаслідок її розтягування при надходженні води у клітину [23]. Це говорить про те, що в наших експериментальних умовах переважним видом деформації еритроцитів є не розтягування, а стиск і зсув.

При порівнянні ступеня втрати іонів калію та молекул гемоглобіну для еритроцитів різних ссавців в умовах механічного стресу видно, що тільки для еритроцитів кролика рівні вивільнення іонів калію і гемолізу збігаються протягом усього часу дослідження. Таким чином, втрата клітинами кролика катіонів калію здійснюється тільки за рахунок руйнування клітин.

Для еритроцитів інших ссавців вихід іонів калію починає перевищувати рівень гемолітичного пошкодження після певного часу інкубування: людини – 50 хв, коня – 30 хв, щура – 5 хв, бика – 0 хв. Таким чином, для еритроцитів цих ссавців є два типи пошкодження в умовах стресу: повне та сублітичне. Останнє виявляється у вивільненні іонів калію з еритроцитів. В цілому до механічного впливу найбільш стійкими виявилися еритроцити кролика, рівень пошкодження яких за обома показниками (гемоліз та вивільнення іонів калію) був найменшим. Найбільш чутливими до стресу за рівнем гемолізу були еритроцити щура, за вивільненням іонів калію – еритроцити бика.

В основі пошкодження еритроцитів ссавців за умов дії стресу лежать процеси, що

пов'язані з формуванням трансмембранних дефектів [22,23]. Переважна більшість ліпідів мембран еритроцитів схильна до формування бішару, але деякі з них, наприклад фосфатидилетаноламін (ФЕА), утворюють гексагональні структури [24], що забезпечують мембрані додаткову «рухливість». За мембранним вмістом ФЕА (у відсотках від загального вмісту фосfolіпідів) еритроцити ссавців (за винятком клітин бика) можна розташувати в ряд: кролик (31,9), людина (27,2), кінь (24,3), щур (21,5) [17]. Слід зазначити, що мембрани еритроцитів щура, які найбільш чутливі до механічного стресу за виходом катіонів калію містять мінімальну кількість цього ліпиду, а механічно-стійкі клітини кролика характеризуються максимальним його вмістом (див. рис.1). Таким чином, чим вищий вміст ФЕА, тим менш чутливі клітини до механічного стресу. Схоже, що більш високий внутрішньомембранний вміст «небішарового» ФЕА в еритроцитах кролика дає змогу запобігати формуванню мембранних дефектів, проникних для внутрішньоклітинних катіонів калію, через транзиторну локальну реорганізацію бішару за умов дії механічного стресу.

Підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок, що рівень пошкодження еритроцитів ссавців при механічного стресу визначається не тільки видом ссавця, а і показником оцінювання. Наявність незначного пошкодження клітин за одним показником (наприклад, рівень гемолізу) не гарантує відсутності прихованих порушень, які виявлялися додатковими методами (наприклад, іонометричний метод для дослідження вивільнення іонів калію з клітин). Це ще раз підкреслює важливість всебічного вивчення клітин при дії стресових факторів. Аналізуючи такі результати, можна підібрати еритроцити тварин, реакція яких на стрес за деякими показниками буде близькою до еритроцитів людини. У цьому разі екстраполяція результатів доклінічних досліджень, що проведені на еритроцитах тварин на еритроцити людини буде обгрунтованою і правомірною.

**Н.М. Шпакова, Н.В. Орлова, Е.Е. Ніпот,
Д.И. Александрова**

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Исследовали чувствительность эритроцитов человека и животных (бык, крыса, кролик, лошадь) к действию механического стресса. Показано, что такое действие приводит к времязависимому (5-60 мин) выходу катионов калия из эритроцитов млекопитающих и частичному гемолитическому повреждению клеток. При этом уровни высвобождения ионов калия и гемолиза не совпадали для эритроцитов всех млекопитающих, кроме кролика. Наиболее чувствительными к механическому стрессу (60 мин) по гемолитическому повреждению были эритроциты крысы (32%), по высвобождению ионов калия – эритроциты быка (66%), наименее чувствительными по обоим показателям – эритроциты кролика (около 20%). Проведенный корреляционный анализ показал статистически значимую отрицательную связь между значениями механического гемолиза эритроцитов млекопитающих и поверхностно-объемного соотношения клеток ($r_s = -0,900$, $P = 0,037$). Обсуждается возможное соответствие между содержанием фосфатидилэтаноламина в мембранах эритроцитов млекопитающих и уровнем потери катионов калия во время действия механического стресса.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих; механический стресс; катионы калия; гемолитическое повреждение.

**N.M. Shpakova, N.V. Orlova, E.E. Nipot,
D.I. Aleksandrova**

COMPARATIVE STUDY OF MECHANICAL STRESS EFFECT ON HUMAN AND ANIMAL ERYTHROCYTES

Sensitivity of human and animal (bovine, rat, rabbit, equine) erythrocytes to the effect of mechanical stress has been studied. Mechanical stress effect was demonstrated to result in a time-dependent (5-60 min) release of potassium cations out of mammalian erythrocytes and a partial hemolytic cell damage. Herewith the release levels of potassium ions and hemolysis did not coincide for erythrocytes of all the mammals except rabbit ones. The most sensitive to mechanical stress (60 min) by the parameters of hemolytic damage and potassium ion release were rat (32%) and bovine (66%) erythrocytes respectively, the lowest sensitive by both parameters were rabbit ones (about 20%). Implemented correlation analysis has demonstrated a statistically significant negative relation between the values of mechanical hemolysis of mammalian erythrocytes and surface-volumetric ratio of cells ($r_s = -0.900$, $P = 0.037$). A feasible relationship between the content of phosphatidylethanolamine in mammalian erythrocyte membranes and the level of potassium cation loss under mechanical stress effect is under discussion.

Key-words: mammalian erythrocytes; mechanical stress; potassium cations; hemolytic damage.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

REFERENCES

- Plasenzotti R, Stoiber B, Posch M, Windberger U. Red blood cell deformability and aggregation behaviour in different animal species. *Clin Hematol Microcirc.* 2004;31(2):105-11. PubMed PMID: 15310945.
- Muravyov AV, Kislov NB, Tikhomirova IA, Mikhailov PB, Muravyov AA. Influence of plasma viscosity and hematocrit on deformation of erythrocytes. *Russ J Biomech.* 2013;17(2):75-83 [Russian].
- Baskurt OK, Meiselman HJ. Red blood cell mechanical stability test. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;55(1):55-62. PubMed PMID: 23445627.
- Kameneva MV, Undar A, Aniaki JM, Watach MJ, Calhoun JH, Borovetz HS. Decrease in red blood cell deformability caused by hypothermia, hemodilution, and mechanical stress: factors related to cardio pulmonary bypass. *ASAIO J.* 1999 Jul-Aug;45(4):307-10. PubMed PMID: 10445736.
- Pantaler ER, Degtyarev AV, Zhutchenko IA. Dynamic deformation of single red blood cells in hypertonic media. Theoretical and practical aspects of modern cryobiology: Collection of scientific papers. Kiev: Naukova Dumka; 1989:6-9 [Russian].
- Zavodnik IB, Piletskaya TP, Stepuro II. Mechanical lysis of human erythrocytes. Membranes stabilizing by plasma proteins. *Ukr Biochem J.* 1991;63(6):72-8 [Russian].
- Fedosova SN, Kudokotseva EV. Modifying action of curantyl on the osmotic susceptibility of red blood cells. *Problems of Cryobiology.* 1995;(1):27-31 [Russian]
- Baskurt OK, Uyuklu M, Meiselman HJ. Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage. *Biorheology.* 2004;41(2):79-89. PubMed PMID: 15090678.
- Shpakova NM, Orlova NV, Alexandrova DI, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, assignee. Method of erythrocyte destruction. Ukraine patent 52701, IPC⁸ G 01 N 33/48. № u 2010 00983. 2010 Sept 10. [Ukraine]
- Jikuya T, Tsutsui T, Shigeta O, Sankai Y, Mitsui T. Species differences in erythrocyte mechanical fragility: comparison of human, bovine, and ovine cells. *ASAIO J.* 1998 Sep-Oct;44(5):M452-5. PubMed PMID: 9804471.
- Pohl M, Wendt MO, Pelzer S. Characterization of mechanical in vitro hemolysis and sub-hemolysis. 2: Variables of state and dimensionless characteristic values of hemolysis. *Biomed Tech. (Berl.).* 2000 Mar;45(3):51-6. German. PubMed PMID: 10761285.
- Yokoyama N, Sakota D, Nagaoka E, Takatani S. Alterations in red blood cell volume and hemoglobin concentration, viscoelastic properties, and mechanical fragility caused by continuous flow pumping in calves. *Artif Organs.* 2011 Aug;35(8):791-9. PubMed PMID: 21843294.
- 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;42(1):33-46. PubMed PMID: 23104624.
- Bogner P, Sipos K, Ludány A, Somogyi B, Miseta A. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes. *Eur Biophys J.* 2002;31(2):145-52. PubMed PMID: 12012118.
- Liu L, Lei T, Bankir L, Zhao D, Gai X, Zhao X, et al. Erythrocyte permeability to urea and water: comparative study in rodents, ruminants, carnivores, humans, and birds. *J Comp Physiol B.* 2011 Jan;181(1):65-72. PubMed PMID: 20878327.
- Matei H, Frentescu L, Benga G. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *J Cell Mol Med.* 2000 Oct-Dec;4(4):270-6. PubMed PMID: 12067461.
- Wessels JMC, Veerkamp JH. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *Biochim Biophys Acta.* 1973 Jan 2;291(1):190-6. PubMed PMID: 4684609.
- Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics: a handbook. Kondrahina SP, editor. Moscow: ColosS; 2004. 520 p. [Russian].
- Betticher DC, Geiser J. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu. *Comp Biochem Physiol A.* 1989;93(2):429-32. PubMed PMID: 2573457.
- Jones DA The importance of surface area/volume ratio to the rate of oxygen uptake by red cells. *J Gen Physiol.* 1979 Nov;74(5):643-6. PubMed PMID: 512634.
- Kowluru R, Bitensky MW, Kowluru A, Dembo M, Keaton PA, Buican T. Reversible sodium pump defect and swelling in the diabetic rat erythrocyte: Effects on filterability and implications for microangiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 May;86(9):3327-31. PubMed PMID: 2541440.
- Shpakova NM. Temperature and osmotic resistance of erythrocytes of different mammalian species [dissertation]. Kharkov: Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine; 2014 [Russian].
- Gordienko EA, Gordienko YuE, Gordienko OI. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon. *Cryo Letters.* 2003 Jul-Aug;24(4):229-44. PubMed PMID: 12955170.
- Ivkov VG, Berestovsky GN. Dynamic structure of lipid bilayer. Moscow: Nauka; 1981. 293 p. [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 09.07.2014