

Влияние pH и ионного состава среды на устойчивость изолированных гепатоцитов крыс к гиперосмотическому стрессу

Т.П. СЕРЕДА, С.Н. ЛЕЖАНИН, В.А. КОПТЕЛОВ, В.А. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Medium pH and Ion Composition on Rat's Isolated Hepatocyte Resistance to Hyperosmotic Stress

SEREDA T.P., LEZHANIN S.N., KOPTELOV V.A., BONDARENKO V.A.

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

Изучали влияние сред различного катионного и анионного состава на устойчивость изолированных гепатоцитов крыс к действию гиперосмотического стресса при различных pH среды. Показано, что повреждающее действие возрастает в ряду катионов $K^+ - Na^+ - Li^+$; в ряду анионов $CH_3COO^- - Cl^- - NO_3^-$. Снижение pH приводит к повышению устойчивости клеток во всех рассмотренных средах, повышение pH, напротив, снижает устойчивость клеток к гиперосмотическому стрессу. Снижение температуры нивелирует эффекты как ионного состава среды, так и щелочного pH.

Ключевые слова: гепатоцит, pH, осмолярность.

Вивчали вплив середовищ різного катіонного та аніонного складу на стійкість ізольованих гепатоцитів до дії гіперосмотичного стресу при різних pH середовища. Показано, що пошкоджуюча дія зростає у ряді катіонів $K^+ - Na^+ - Li^+$; у ряді аніонів $CH_3COO^- - Cl^- - NO_3^-$. Зниження pH призводить до підвищення стійкості клітин у всіх розглянутих середовищах, підвищення pH, навпаки, знижує стійкість клітин до гіперосмотичного стресу. Зниження температури інкубації нівелює ефекти як іонного складу середовища, так і лужного pH.

Ключові слова: гепатоцит, pH, осмолярність.

The influence of the media with different cation and anion composition on rat's isolated hepatocyte resistance to the hyperosmotic stress effect under different pH medium was studied. It was demonstrated that a damaging effect increased in $K^+ - Na^+ - Li^+$ cation series; $CH_3COO^- - Cl^- - NO_3^-$ anion series. A pH decrease results in the augmentation of cell resistance in all observed media, a pH increase, in contrast, reduces the cell resistance to hyperosmotic stress. A temperature decrease levels the effects of both ion medium composition and alkaline pH.

Key-words: hepatocyte, pH, osmolarity.

На сохранность клеток в процессе замораживания-оттаивания влияют осмолярность, температура, pH, состав среды замораживания и другие физико-химические факторы среды [3]. Изучение роли какого-то одного из них без учета других факторов среды не может являться достаточно адекватным для успешного управления процессом замораживания-оттаивания [1], что вызывает необходимость комплексно исследовать воздействие физико-химических факторов среды на клетки.

Цель данного исследования – изучение цитолитиза изолированных гепатоцитов крыс в средах с различной концентрацией ионов в зависимости от pH среды, ее анионного и катионного состава.

Материалы и методы

В ходе исследования использовали следующие реактивы: трипсин (Ferak), HEPES (Merk), Тритон X-100 (Ferak), "Реакхим" "чда" и "хч".

Изолированные гепатоциты получали ферментативным способом с использованием трипсина,

Адрес для корреспонденции: Коптелов В.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-00-71, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Such physical and chemical medium factors as osmolarity, temperature, pH, a freezing medium composition and others affect cell integrity during freeze-thawing process [3]. The study of the role of one of the parameters without taking into account other factors of the medium can not be a quite adequate for a successful freeze-thawing process managing [1], that necessitates a combined study of the effect of physical and chemical medium factors on cells.

The aim of this investigation was to study the rat's isolated hepatocyte cytolysis in the media with different ionic concentration depending on the medium pH, its anion and cation composition.

Materials and methods

In the investigation we used the following reagents: trypsin (Ferak), HEPES (Merk), Triton X-100 (Ferak), the others from "Reakhim" with grade "Chemically pure for analysis" and "Chemically pure".

The isolated hepatocytes were obtained according the enzymatic method using trypsin [8]. 6-12 months' Wistar male and female rats were narcotised with

Address for correspondence: Koptelov V.A., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720071, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

описанным в [8]. Крыс линии Вистар обоего пола в возрасте 6-12 мес наркотизировали тиопенталом натрия, после чего вскрывали брюшную полость. В воротную вену вставляли канюлю диаметром 1 мм и закрепляли лигатурой, надсекали нижнюю полую вену и перфузировали 7-10 мин при температуре 37°C буферным раствором следующего состава: 0,27 М сахарозы, 6 мМ КСl, 3 мМ NaHCO₃, 2 мМ ЭДТА, 10 мМ HEPES, pH 7,4.

После этого печень удаляли из брюшной полости, зажимом пережимали верхнюю полую вену и рециркуляторно перфузировали в течение 3-5 мин тем же раствором, содержащим дополнительно 0,05% трипсина.

Диспергирование осуществляли продавливанием сквозь нейлон в растворе Хенкса на холоде. После фильтрования пробирки с клеточной суспензией отстаивали на холоде 20 мин.

Затем суспензию центрифугировали 3 мин при 50 g, надосадочную жидкость удаляли и для очистки суспензии дважды центрифугировали при тех же условиях в течение 1 мин. Экспресс-оценку проводили с помощью трипанового синего [4]. Жизнеспособность выделенных клеток составляла 85 – 90 %, количество – (250-350)×10⁶ кл./мл.

В экспериментах использовали растворы солей следующих концентраций (моль/л): 0,55; 0,75; 0,95; 1,2; 1,8. Растворы готовили на 0,01 М фосфатном буфере с различным pH. К 3 мл каждого раствора добавляли 0,75×10⁶ кл./мл среды инкубации, инкубировали 10 мин. Затем пробы центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2-х минут и отбирали пробы для определения активности маркерного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Для определения общей активности ЛДГ в 3 мл дистиллята помещали 0,75×10⁶ кл./мл и инкубировали на холоде в течение часа или к 3 мл физраствора добавляли 0,75×10⁶ кл./мл и 100 мкл 20%-го раствора Тритона X-100 и инкубировали 1 ч.

Активность ЛДГ определяли с применением UW-теста [4].

Результаты и обсуждение

Данные, представленные на рис. 1, отражают зависимость влияния на клетки гиперосмотических концентраций различных солей с изменением их концентрации при pH 7,4. Видно, что в средах, содержащих хлорид натрия, цитолиз регистрируется начиная с концентрации соли 0,95 М, достигая при наиболее высокой концентрации значений порядка 80%. В средах с хлоридом лития наблюдается аналогичная зависимость. В то же время в средах, содержащих хлорид калия, цитолиз не превышает 30% во всем рассмотренном концентрационном диапазоне. Аналогичная

sodium thiopental, afterwards the abdominal cavity was dissected. We put a 1 mm cannula in a portal vein and fixed with ligature, an inferior portal vein was incised and perfused for 7-10 min under 37°C with a buffer solution of following composition: 0.27 M of sucrose, 6 mM of KCl, 3 mM of NaHCO₃, 2 mM of EDTA, 10 mM of HEPES, pH 7,4

Afterwards the liver was removed out of abdominal cavity, a superior portal vein was clamped and perfused in a recirculatory way for 3-5 min with the same solution, containing in addition 0.05% trypsin.

The dispersion was done with pressing through the nylon in Hanks' solution in cold. After filtration the vials with a cellular suspension were maintained in cold for 20 min.

Then the suspension was centrifuged for 3 min at 50 g, a supernatant was removed and twice centrifuged to purify suspension under the same conditions for 1 min. The express-evaluation was carried-out with trypane blue usage [4]. The viability of isolated cells made 85-90%, a number did (250-350)×10⁶ cells/ml.

In the experiments we used the salines of following concentrations (mol/l): 0.55; 0.75; 0.95; 1.2; 1.8. The solutions were prepared on a 0.01 M phosphate buffer with different pH. To 3 ml of each solution we added

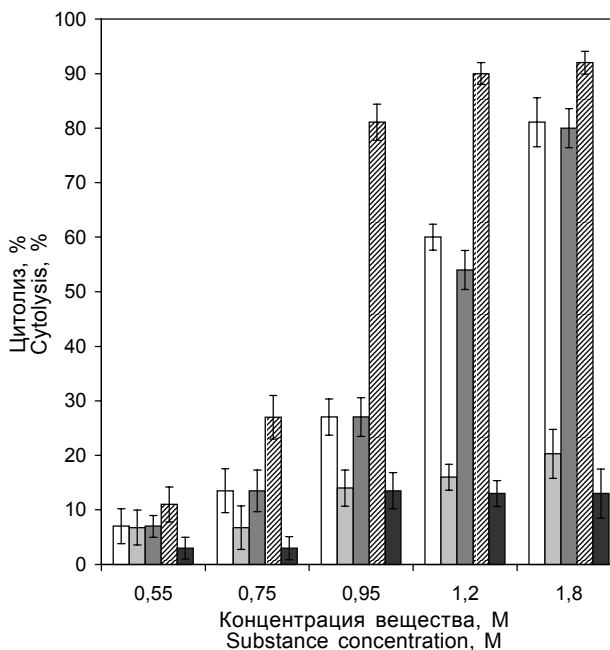


Рис. 1. Цитолиз изолированных гепатоцитов крыс в средах с различной концентрацией соли: □ – хлорид натрия; ■ – хлорид калия; ■ – хлорид лития; ▨ – нитрат натрия; ■ – ацетат натрия; pH 7,4, температура инкубации 37°C, время инкубации 10 мин.

Fig. 1. Cytolysis of rat's isolated hepatocytes in the media with different salt concentration: □ – sodium chloride; ■ – potassium chloride; ■ – lithium chloride; ▨ – sodium nitrate; ■ – sodium acetate; pH 7.4; 37°C incubation temperature; 10 min incubation time.

зависимость отмечается и в средах, содержащих ацетат натрия.

В средах с нитратом натрия наблюдается максимальный выход ЛДГ по сравнению со всеми остальными средами. В среде с концентрацией соли 0,95 М цитолиз достигает 80 %, нарастая при дальнейшем повышении концентрации нитрата натрия.

Наблюдаемые различия в действии на клетку сред разного катионного состава могут объясняться влиянием ионов с различными радиусами на структуру водного растворителя – фактора, в значительной степени определяющего стабильность мембранных структур клетки. Помимо этого, от радиуса ионов зависит их способность пересекать мембрану и индуцировать перераспределение воды из клетки и в нее, тем самым детерминируя объем клетки в среде с соответствующим электролитным составом. Натрий и литий – относительно небольшие ионы, способные быстро проникать сквозь мембранные дефекты, вызванные действием гиперосмотического раствора, что ведет к набуханию и последующему разрушению клеток [9]. Калий – более крупный ион, поэтому проницаемость мембраны для него в выбранных экспериментальных условиях значительно ниже, что предотвращает набухание [2].

Действие на клетку различных анионов определяется, скорее всего, их гидратированным радиусом. Среди выбранных анионов максимальный гидратированный радиус – у ацетата, минимальный – у нитрата [6]. По мере уменьшения гидратированного радиуса увеличивается хаотропное действие иона на ближайшие к мембране слои воды, что и может отражаться на устойчивости клеток к осмотической дегидратации.

На рис. 2 представлена зависимость для сред с рН 6,0. Во всех средах цитолиз не превышает 25-30 %. Но при повышенном рН среды (рис. 3) значительный цитолиз наблюдается уже в среде с концентрацией соли 0,55 М (нитрат натрия). В средах, вызывавших повреждение с рН 7,4 (нитрат и хлорид натрия, хлорид лития), при концентрации соли 0,95 М отмечали практически полный цитолиз. В средах, содержащих ацетат натрия и хлорид калия, при повышении концентрации соли до 1,2 М цитолиз составляет порядка 50%.

Наиболее вероятное объяснение действия такого фактора, как концентрация протонов при изменении рН, – влияние на формирование литических пор. Считается, что края литических пор отрицательно заряжены и повышенные концентрации протонов способствуют их замыканию. Напротив, при снижении концентрации протонов поры могут расти в размере, что способно привести к нарушению проницаемости плазматической мембраны

0.75×10⁶ cells/ml of incubation medium and incubated for 10 min. Then the samples were centrifuged under 1000 rpm during 2 min and selected to determine the activity of lactate dehydrogenase (LDG) labelled enzyme. In order to find out the LDG total activity we placed 0.75×10⁶ cells/ml into 3 ml of distillate in cold for 1 hr or to 3 ml of physiological solution we added 0.75×10⁶ cells/ml and 100 µl of a 20% Triton X-100 solution and incubated for 1 hr.

LDG activity was determined with UW-test [4].

Results and discussion

The data, presented in Fig. 1 reflect the dependence of hyperosmotic concentration effect of various salts on cells with a change in their concentration under pH 7.4. It is seen, that in the media with sodium chloride the cytolysis is recorded starting from 0.95 M salt concentration, by achieving under the highest concentration the values about 80%. The similar dependence is observed in the media with lithium chloride. At the same time in potassium chloride-media the cytolysis does not exceed 30% in all considered concentration range. The same dependence is noted in sodium acetate media.

The maximum LDG release in comparison with other media is observed in sodium nitrate-media. In the medium with 0.95 salt concentration the cytolysis achieves 80% by increasing with further augmentation of sodium nitrate concentration.

The observed differences in the action on a cell of the media with different cation composition can be explained by the effect of ions with different radius on the structure of aqueous solvent: the factor, determining in a considerable extent the stability of cell membrane structure. In addition, the capability of ions to cross a membrane and to induce the water redistribution out of a cell and into it depends on their radius, determining thereby the cell volume in the medium with corresponding electrolyte composition. Sodium and lithium are relatively small ions, capable to rapidly penetrate through the membrane defects, caused by the action of hyperosmotic solution, that results in the swelling and following cell destruction [9]. Potassium is bigger ion, therefore the membrane penetration for it in the selected experimental conditions is considerably lower, that prevents swelling [2].

The effect of different anions on a cell is mostly determined by their hydrated radius. Among the selected anions the maximum hydrated radius is for acetate, the minimum is for nitrate [6]. With a decrease in a hydrated radius there is an increase in chaotropic ion effect on the closest to a membrane water layers, that can be reflected on cell resistance to osmotic dehydration.

Fig. 2 shows the dependence for the media with pH 6.0. In all media the cytolysis does not exceed 25-30%. However during an increased pH of the medium

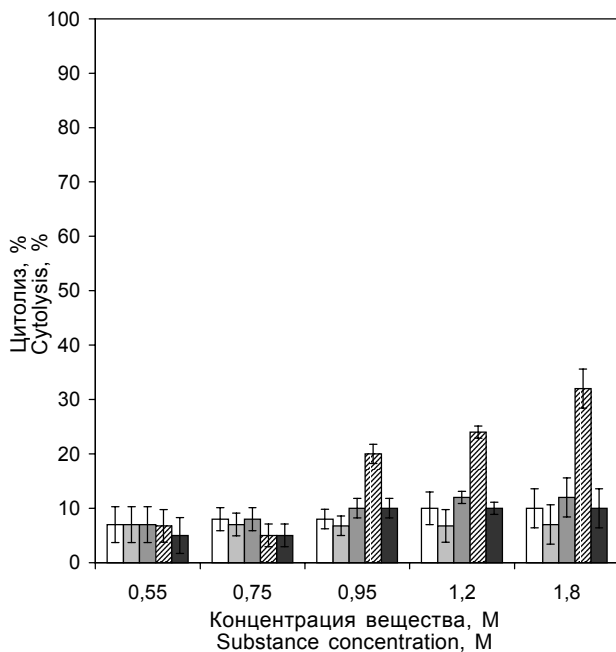


Рис. 2. Цитолиз изолированных гепатоцитов крыс в средах с различной концентрацией соли: □ – хлорид натрия; ▒ – хлорид калия; ■ – хлорид лития; ▨ – нитрат натрия; ■ – ацетат натрия; pH 6,0; температура инкубации 37°C; время инкубации 10 мин.

Fig. 2. Cytolysis of rat's isolated hepatocytes in the media with different salt concentration: □ – sodium chloride; ▒ – potassium chloride; ■ – lithium chloride; ▨ – sodium nitrate; ■ – sodium acetate; pH 6.0; 37°C incubation temperature; 10 min incubation time.

клетки и дальнейшему лизису [7, 8]. Указанный фактор может оказывать существенное влияние на агрегатное состояние мембранных белков, прежде всего белков цитоскелета. Имеются данные, что при низких pH увеличивается прочность ассоциации цитоскелетных белков с мембраной, что также может повышать устойчивость клетки [8].

Совершенно иная картина наблюдается при снижении температуры среды инкубации до 0°C. В таблице приведены данные цитолиза изолированных гепатоцитов крыс в различных средах при гипотермической температуре и разных pH (30 мин инкубации). Из представленных данных видно, что в течение получаса выход ЛДГ не наблюдается во всех рассмотренных средах, за исключением сред, содержащих нитрат, где можно зарегистрировать 30%-й цитолиз. Гипотермическая температура нивелирует как эффекты, связанные с влиянием ионов на состояние мембраны, так и эффекты, вызываемые pH. Подобные эффекты могут быть связаны с влиянием околонулевой температуры на состояние мембранных дефектов, инициированных как гипертоническим воздействием, так и специфическим действием солей на мембранную воду и на стабильность и целостность мембраны [1].

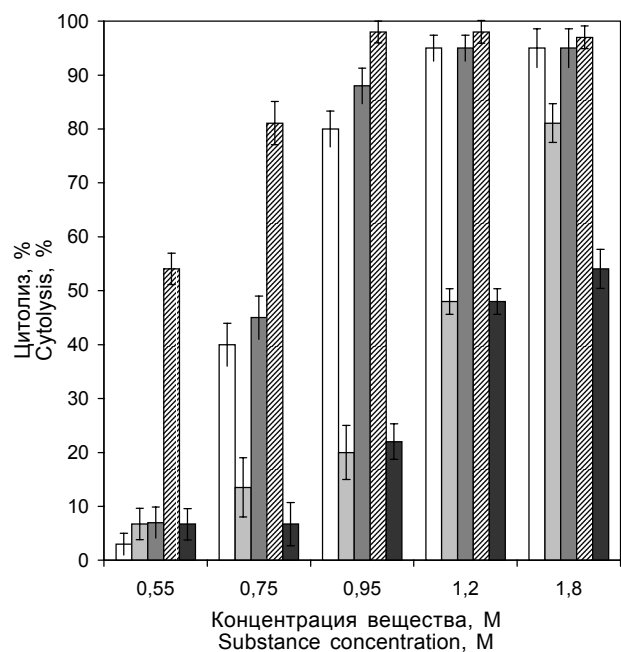


Рис. 3. Цитолиз изолированных гепатоцитов крыс в средах с различной концентрацией соли: □ – хлорид натрия; ▒ – хлорид калия; ■ – хлорид лития; ▨ – нитрат натрия; ■ – ацетат натрия; pH 8,0; температура инкубации 37°C; время инкубации 10 мин.

Fig. 3. Cytolysis of rat's isolated hepatocytes in the media with different salt concentration: □ – sodium chloride; ▒ – potassium chloride; ■ – lithium chloride; ▨ – sodium nitrate; ■ – sodium acetate; pH 8.0; 37°C incubation temperature; 10 min incubation time.

(Fig. 3) a considerable cytolysis is observed even in the medium with 0.55 M salt concentration (sodium nitrate). In the media, caused the damage with 7.4 pH (sodium nitrate and chloride, lithium chloride), a practically complete cytolysis was noted at 0.95 M salt concentration. In sodium acetate and potassium chloride media when increasing the salt concentration up to 1.2 M, cytolysis makes about 50%.

The most probable explanation of the action of such factor as proton concentration during pH change is the effect on a lytic pore formation. The edges of lytic pores are believed to have a negative charge and the increased proton concentrations contribute to their closing. In contrast, when decreasing the proton concentration, an increase in pore size can occur, that may result in the impairment in cell plasmatic membrane permeability and further lysis [7, 8]. The mentioned factor can affect the aggregate state of membrane proteins, and first of all, cytoskeletal proteins. There are the data, that under low pH the tightness of cytoskeletal protein association with a membrane augments, that can increase a cell resistance as well [8].

A quite different picture is observed when decreasing the temperature of incubation medium down to 0°C. The table demonstrates the data of isolated rat hepatocyte cytolysis in different media under hypothermic

Влияние pH среды на выход ЛДГ из изолированных гепатоцитов крыс в различных гипертонических средах при 0°C (10 мин инкубации)

Effect of medium pH on LDG release out of rat's isolated hepatocytes in different hypertonic media at 0°C (10 min incubation)

Концентрация, М Concentration, M	Вещества Substances								
	NaCl			Холинхлорид Choline chloride			Нитрат Nitrate		
	pH 6,0	pH 7,4	pH 8,0	pH 6,0	pH 7,4	pH 8,0	pH 6,0	pH 7,4	pH 8,0
0,55	5,0±0,3	4,0±0,4	6,7±0,5	2,7±0,1	5,0±0,1	5,2±0,3	5,2±0,5	8,0±0,5	8,5±0,4
0,75	3,0±0,2	7,0±0,3	7,0±0,5	3,5±0,3	7,0±0,5	8,0±0,4	5,0±0,2	10,7±0,4	9,5±0,7
0,95	4,0±0,4	5,0±0,2	7,0±0,3	3,5±0,3	6,0±0,4	9,5±0,7	6,0±0,2	10,8±1,2	20,0±1,0
1,2	5,0±0,3	4,0±0,1	8,0±0,5	5,4±0,4	5,0±0,3	9,0±0,6	4,0±0,1	13,5±1,2	27,0±5,0
1,8	7,0±0,4	6,7±0,4	6,7±0,7	5,0±0,3	8,0±0,5	8,7±0,87	8,0±0,7	17,0±1,4	30,0±3,0
	KCl			NaAc					
	pH 6,0	pH 7,4	pH 8,0	pH 6,0	pH 7,4	pH 8,0			
0,55	6,0±1,0	5,0±0,5	6,7±0,7	6,0±0,3	5,0±0,4	5,0±0,6			
0,75	6,7±0,8	6,0±0,3	6,7±0,5	7,0±0,1	5,0±0,1	5,0±0,5			
0,95	7,0±0,6	6,0±0,3	7,0±0,9	7,0±0,7	8,0 ±0,1	6,0±0,4			
1,2	7,0±0,5	6,7±0,6	7,0±0,9	6,0±0,5	8,0±0,7	6,0±0,7			
1,8	6,7±0,5	6,7±0,4	7,0±0,5	7,0±0,5	7,8±0,4	14,0±0,8			

Выводы

Полученные результаты показывают, что устойчивость клеток к гиперосмотическому стрессу зависит от ионного состава и pH среды: понижение pH приводит к повышению устойчивости клеток к осмотическому воздействию, повышение pH, напротив, ее снижает. При этом влияние ионов может быть комплексным и в средах с катионами реализовываться по осмотическому механизму, а с анионами – по хаотропному. Снижение температуры среды инкубации нивелирует как действие осмотического фактора, так и специфическое действие ионов на мембрану гепатоцитов.

temperature and different pH (30 min incubation). The presented data show, that during a half of an hour the LDG release is not observed in all observed media, excluding those with nitrate, where 30% cytolysis can be recorded. Hypothermic temperature levels both the effects, related to the ion influence on a membrane state, and those, caused by pH. The similar effects can be related to the influence of about zero temperature on a membrane defect state, initiated by both hypertonic effect and specific salt one on a membrane water, as well as membrane stability and integrity of a membrane [1].

Conclusions

The results obtained demonstrate that cell resistance to hyperosmotic stress depends on the medium ion composition and pH: pH decrease results in the augmentation of cell resistance to an osmotic effect, pH increase, in contrast, decreases it. At the same time the ion influence can be combined and in the media with cations can be realised via an osmotic mechanism, and with a chaotropic one as for anions. A temperature decrease in the incubation medium levels both the osmotic factor effect and the ions specific action on a hepatocyte membrane.

Литература

1. Белоус А. М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 256 с.
2. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф дис.... докт. биол. наук.– Харьков, 1988.– 38 с.
3. Гулевский А.К. Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах.– Киев: Наук. думка, 1988.– 208 с.

4. *Меньшиков В.В.* Лабораторные исследования в клинике.– М.: Медицина, 1987.– 197 с.
5. *Поздняков В. В.* Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1989.– 16 с.
6. *Синюков В.В.* Структура одноатомных жидкостей, воды и водных растворов электролитов.– М.: Наука, 1976.– 256 с.
7. *Пат. України № 37910А.* Спосіб одержання ізольованих гепатоцитів / В.А. Бондаренко, В.О. Коптьолов, О.В. Кудотсева, С.М. Лежанін, Т.П. Середа. Заявлено 01.01.2000. Опубл. 15.05.01. Бюл. № 4
8. *Araki T., Roelofsen B., Op Den Kamp J. A. F., Van Deenen L.L.M.* Temperature-dependent vesiculation of human erythrocytes caused by hypertonic salt: a phenomenon involving lipid segregation // *Cryobiology*.– 1982.– Vol.19, N5.– P. 353-361.
9. *Clarke R.J., Lufert C.* Influence of anions and cations on the dipole potential of phosphatidilcholine vesicles: a basis for the Hofmeister effect // *Biophys. J.*– 1999.– Vol.76.– P. 2614-2624.

Поступила 15.04.2003

References

1. *Belous A.M., Bondarenko V.A.* Structural changes in biological membranes at cooling.– Kiev: Nauk. dumka, 1982.– 256 p.
2. *Bondarenko V.A.* Development and prevention of temperature shock in erythrocytes: Author's abstract of thesis for doctor's degree obtaining (biology).– Kharkov, 1988.– 38 p.
3. *Gulevsky A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M.* Barrier properties of biomembranes under low temperatures.– Kiev: Naukova dumka, 1988.– 208p.
4. *Menshikov V.V.* Laboratory investigations in a clinic.– Moscow: Meditsina, 1987.– 197 p.
5. *Pozdnyakov V.V.* Effect of medium composition and osmolarity on erythrocyte resistance to osmotic and temperature shock: Author's abstract of thesis for candidate's degree obtaining (biology).– Kharkov, 1989.– 16 p.
6. *Sinyukov V.V.* Structure of monoatomic liquids, water and electrolyte aqueous solutions.– Moscow: Nauka, 1976.– 256p.
7. *Patent of Ukraine N 37910A* Method for isolated hepatocyte procurement / Bondarenko V.A., Koptelov V.A., Kudotseva O.V., Lezhanin S.M., Sereda T.P. Filed 01.04.2000. Published 15.05.01. Bull. N4.
8. *Araki T., Roelofsen B., Op Den Kamp J.A.F., Van Deenen L.L.M.* Temperature-dependent vesiculation of human erythrocytes caused by hypertonic salt: a phenomenon involving lipid segregation // *Cryobiology*.– 1982.– Vol. 19, N5.– P.353-361.
9. *Clarke R.J., Lufert C.* Influence of anions and cations on the dipole potential phosphatidilcholine vesicles: a basis for the Hofmeister effect // *Biophys. J.*– 1999.– Vol.76.– P.2614-2624.

Accepted in 15.04.2003