

# Оптимизација процеса изоловања хемоглобина из говеђих еритроцита контролисаном хемолизом

Радослава Н. Правилковић<sup>1</sup>, Славко Б. Мојсиловић<sup>2</sup>, Ивана Т. Костић<sup>1</sup>, Весна Љ. Илић<sup>2</sup>, Диана С. Бугарски<sup>2</sup>, Верица Б. Ђорђевић<sup>1</sup>, Бранко М. Бугарски<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Универзитет у Београду, Технолошко–металуршки факултет, Београд, Србија

<sup>2</sup>Универзитет у Београду, Институт за медицинска истраживања, Београд, Србија

## Извод

Дуги низ година, и код нас и у свету, развијају се технолошки поступци за изоловање структурно очуваног и биолошки активног хемоглобина који би могао да се користи као заменик за крв, као извор биолошки високоактивног хемског гвожђа у превенцији анемије код људи и животиња, или као реагенс у дијагностици. У овом раду оптимизован је поступак за изоловање хемоглобина из еритроцита пореклом из отпадне кланичне говеђе крви са циљем добијања препарата хемског гвожђа за превенцију анемије код животиња. Тестирана је осетљивост говеђих еритроцита на осмотску лизу са циљем дефинисања оптималног пуферског система за ефикасно извођење контролисане хемоллизе. Добијени резултати су показали да говеђи еритроцити имају повећану осмотску осетљивост у односу на хумане еритроците, а да је оптималан пуферски систем за извођење њихове контролисане хемоллизе 35 mM натријум-фосфатни/NaCl пуфер pH 7,2–7,4. Контролисана хемоллиза са оптимизованим пуферским системом је изведена у мембранском реакторском систему и остварен је принос хемоглобина од 83±12%. Током овог процеса није дошло до оштећења мембране еритроцита, а интактне мембране празних еритроцита би се могле користити за инкапсулацију биолошки активних супстанци.

**Кључне речи:** контролисана хемоллиза, говеђи еритроцити, хемоглобин, мембрански биореактор.

Доступно на Интернету са адресе часописа: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Хемоглобин, добијен из отпадне кланичне говеђе крви, могао би се, након превођења у одговарајућу фармацеутску форму, користити као извор биолошки високо активног хемског гвожђа за превенцију и/или терапију анемије код људи и животиња. У процесу клања, на 100 kg масе говеда просечно се добија 4,4 литра отпадне крви [1]. Како један литар говеђе крви садржи у просеку 110 g хемоглобина [2], и 0,4 g високо биолошки искористивог хемског гвожђа, при технолошком процесу који има принос од 70%, из крви једне животиње тежине 500 kg би се могло изоловати око 6 g биолошки високо активног хемског гвожђа. Развијање једног оваквог поступка би имало и своје велико економско оправдање, имајући у виду сталне велике потребе за препаратима биолошки искористивог гвожђа у хуманој и ветеринарској медицини. Истовремено, трансформација једног потенцијално токсичног материјала, кланичне крви, у биолошки вредан производ, препарат хемског гвожђа, представљало би и начин за санирање биоазарда.

У последњих неколико деценија, рад многих истраживачких тимова је био фокусиран на покушаје пројектовања протокола индустријских размера за изоловање и пречишћавање хемоглобина са циљем добијања високо пречишћеног, структурно и функционално очуваног молекула који би се користио као полазна сировина за добијање заменика за крв, као додаток у храни за превенцију/терапију хипохромне анемије или као стандард за клиничку дијагностику. Иако хемоглобин чини више од 90% суве масе еритроцита, процес његовог изоловања и пречишћавања је повезан са већим бројем проблема. Овај молекул је веома осетљив и у процесу изоловања може доћи до разлагања на глобинске димере или мономере или до оксидовања у метхемоглобин. До данас је описан велики број процедура за изоловање хемоглобина из еритроцита сисара [3–8]. У већини процедура први корак у изоловању је осмотска лиза еритроцита у дестилованој води или растворима мале јонске јачине (тзв. хипотонични раствори). Наглим увођењем еритроцита у хипотоничне растворе, због разлике у осмотском притиску, мембрана постаје пермеабилна за моновалентне катјоне и у еритроците улази вода након чега они почињу да бубре, тј. облик им се мења од биконкавног до сферног. Како еритроцити почињу да бубре у њиховим мембранама долази до фор-

НАУЧНИ РАД

УДК 59:612.111:544.4:66

Хем. Инд. 66 (4) 519–529 (2012)

doi: 2298/HEMIND1111220085

Преписка: Б. Бугарски, Технолошко–металуршки факултет, Универзитет у Београду, Карнегијева 4, 11000 Београд, Србија-  
Е-пошта: [branko@tmf.bg.ac.rs](mailto:branko@tmf.bg.ac.rs)

Рад примљен: 22. новембар, 2011

Рад прихваћен: 31. јануар, 2012

мирња транзиторног хемолитичког отвора [9] до кога дифундују молекули хемоглобина, и кроз њега излазе у ванћелијски простор. Ово излучивање дела унутарћелијског садржаја смањује напон мембране и хемолитички отвор се затвара. Међутим, у хипотоничним условима еритроцити настављају и даље да бубре, отвара се нови хемолитички отвор, избацује се нова количина хемоглобина из ћелије. Ово се дешава све дотле док еритроцити не набубре до критичног нивоа, након кога више мембрана није у стању да отварањем малог хемолитичког отвора и избацавањем мале количине хемоглобина „компензује“ разлике у осмотским притисцима, него долази до потпуног пуцања ћелија. Главни недостатак оваквог начина изоловања молекула хемоглобина је што се при наглој промени осмотског притиска и пуцању мембране еритроцита не добија препарат који садржи само молекул хемоглобина, него и елементе мембране (неутрални липиди, фосфолипиди, гликолипиди, гликопротеини и др.). Ови контаминанти, чак и ако су присутни само у траговима, могу имати врло неповољне биолошке ефекте [10–14]. Различите методе или комбинације метода се примењују за уклањање стромалних компоненти: центрифугирање, ултрафилтрација, рекристализација, екстракција органским растварачима (хлороформ, толуен, угљентетрахлорид), нормална или тангенцијална микро- или ултрафилтрација, разни типови хроматографија, при чему је најмање пожељна метода уклањања елемената стромае применом органских растварача. Да би се смањила контаминација елементима стромае, неке групе аутора су уместо наглим лизирањем, молекул хемоглобина изоловали постепеним, контролисаним смањивањем јонске јачине раствора, у процесу контролисане хемоллизе [15–17]. У овом процесу, због постепеног и контролисаног смањења јонске јачине раствора еритроцити не бубре нагло, већ постепено. Ово постепено ширење мембране омогућава пулсирајуће отварање хемолитичких отвора што је праћено пулсирајућим постепеним ослобађањем молекула хемоглобина, што се на микрографијама види као ослобађање хемоглобина по читавој површини еритроцита. У овом процесу, због постепеног смањења јонске јачине раствора, мембрана еритроцита савладава осмотски стрес и не долази до пуцања мембране и масовног ослобађања протеинских и липидних контаминаната. На овај начин се релативно чист хемоглобин добија у првом изолационом кораку. Комбинацијом процеса контролисане хемоллизе, микро и ултра тангенцијалне филтрације и јоноизмењивачке хроматографије Bugarski и Dovezenski су 2000. године добили препарат ултрачистог хуманог хемоглобина [17]. Изоловани хемоглобин је имао очувану структуру и биолошку функцију, био је без протеинских и липидних контаминаната, стерилан и апиrogen. Овако пречишћен хемоглобин је

служио као полазни материјал за добијање заменика за крв [18] и био извор биолошки активног гвожђа *in vitro* и *in vivo*. Сарадници Института за медицинска истраживања и Технолошко–металуршког факултета Универзитета у Београду су исти протокол [17] са минималним модификацијама успешно применили и за изоловање хемоглобина из отпадне свињске крви (наши непубликовани резултати). Ово је било могуће због веома сличних реолошких карактеристика мембране хуманих и свињских еритроцита [19]. Циљ овог рада је био оптимизовати процесне параметре предложеног протокола за изоловање хемоглобина из говеђих еритроцита, имајући у виду неке њихове специфичности.

## МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

### Реагенси

*Антикоагуланс*. Као антикоагуланс коришћен је 3,8% натријум-цитрат. На 1 l крви додаје се 100 ml антикоагуланса.

*Изотонични раствор NaCl (физиолошки раствор)*. Као изотоничан раствор у овом раду је коришћен 0,9% раствор NaCl у дестилованој води (физиолошки раствор). pH вредност овог раствора је 5,62.

*Изотонични 10 mM фосфатни буфер (PBS, енгл. phosphate buffered saline)*. 0,8% раствор NaCl пуферизован са 2,8 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и 7,2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2–7,4.

*Хипотоничан буферски раствор: 5 mM натријум-фосфатни ( $\text{Na-PO}_4$ ) буфер, pH 7,2–7,4*. Добија се мешањем 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и 5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  у односу 1:2,5.

### Биолошки материјал

*Опшадна кланична говеђа крв*. Говеђа крв је добијена у кланици Амбар у Сурчину. Крв је прикупљана у стерилне боце од 500 ml у којима је претходно додат антикоагуланс (50 ml 3,8% натријум-цитрата). Крв је након узимања, на амбијенталној температури транспортована до Института за медицинска истраживања, где су или одмах уклањани протеини плазме или је крв до сутрадан чувана на +4 °C.

*Хумана крв*. По 4,5 ml периферне крви здравих давалаца је узимано вакутајнерима са натријум-цитратом као антикоагулансом (Terumo Europe N.V., Белгија). Крв је анализирана на Институту за медицинска истраживања у Београду.

### Методе

*Одређивање концентрације хемоглобина*. Концентрација хемоглобина одређивана је спектрофотометријски, цијанметхемоглобинском методом [20].

Одређивање концентрације метхемоглобина ( $MetHb$  или  $HbFe^{3+}$ ). Концентрација метхемоглобина одређивана је спектрофотометријски модификацијом методе по Evelyn [21].

Одређивање хематокрија. Хематокрит, тј. релативна заступљеност еритроцита у крви је одређиван микрохематокритском методом [22]. Вредност хематокрита је изражена као % еритроцита у крви ( $v/v$ ).

Добијање суспензије „пакованих еритроцијата“. Пуна крв, узета са цитратом је, пре почетка поступка таложења еритроцита и уклањања протеина плазме и антикоагуланта, филтрирана кроз груби филтер од памучне газе, чиме су уклањани спонтано настали угрушци. Еритроцити су из грубо филтриране пуне крви изоловани центрифугирањем крви 20 min на 3500 rpm (центрифуга Megafuge 1.0R, Heraeus). По завршеном центрифугирању течна фаза (плазма) и слој леукоцита су изоловани вакуумском аспирацијом и одбацивани. Да би се потпуно уклонили протеини плазме и антикоагуланс, исталожени еритроцити су, у односу 1:3, ресуспендовани у изотоничном раствору. Суспензија еритроцита је хомогенизована мешањем и центрифугирана 15 min на 3500 rpm. Центрифугирање је поновљено три пута. Суспензија пакованих еритроцита је добијена када је талог са еритроцитима испраним од протеина плазме помешан са изотоничним 10 mM фосфатним пуфером у односу 1:1. Паковани еритроцити су или одмах коришћени за анализе или су остављани до сутрадан на +4 °C.

Тести осмотске фрагилности. Тестом осмотске фрагилности [23] дефинише се осетљивост еритроцита на осмотску хемолизу. Тестом се мери степен хемолизе еритроцита у опадајућим концентрацијама раствора (од 0,85 до 0% NaCl). Суспензије еритроцита у растворима NaCl су хомогенизоване мешањем, и после 20 min инкубације на собној температури, су центрифугиране 5 min на 2000 rpm (центрифуга Megafuge 1.0R, Heraeus). Супернатанти, који садрже хемоглобин из лизираних еритроцита су пипетирањем пажљиво одвојени од талoga са нелизираним еритроцитима и у њима је мерена апсорбанца на 540 nm ( $A_{540}$ ) на UltroSpec 3300pro спектрофотометру (AmershamBioscience, Шведска). Степен, тј. проценат хемолизе у сваком од испитиваних раствора је израчунат према следећој формули:

$$EH = 100Hb_e / Hb_t \quad (1)$$

где вредност  $Hb_e$  представља апсорбанцу  $A_{540}$  која је пропорционална количини хемоглобина (Hb) у супернатанту, а  $Hb_t$  представља вредност  $A_{540}$  која је пропорционална количини Hb ослобођеног у дестилованој води, тј. при 100% хемолизе.

На основу добијених података конструисане су криве осмотске фрагилности које представљају зависност % хемолизе од концентрација (%) NaCl.

Концентрација NaCl при којој се постиже 50% од максималне хемолизе, означена као  $H_{50}$ , добијена је на основу Boltzman-ове сигмоидалне нелинеарне регресионе анализе експериментално добијених података GraphPad Prism софтвером.

Одређивање степена осмотског бубрења говеђих еритроцијата. Степен осмотског бубрења тј. „swelling“ индекса говеђих еритроцита одређиван је коришћењем две различите експерименталне процедуре. У првој, рађеној по модификованој методи коју су дали Vitvitsky и сар. [24], степен осмотског бубрења је одређиван мерењем хематокрита и степена хемолизе еритроцита у растворима са опадајућим концентрацијама јона који су направљени мешањем у различитим односима изотоничног 0,9% раствора NaCl и хипотоничног 5 mM натријум-фосфатног пуфера. Други начин одређивања степена осмотског бубрења је рађен методом проточне цитометрије. На основу добијених резултата ових мерења као и на основу микроскопске анализе еритроцита у суспензији, одређен је степен осмотског бубрења еритроцита, као и концентрација раствора при коме су сви еритроцити лизирани (тј. у раствору су остале само неоштећене мембране еритроцита, тзв. „духови“).

Одређивање степена осмотског бубрења говеђих еритроцијата модификованом методом по Vitvitsky и сар. Једнаке запремине суспензије пакованих говеђих еритроцита (средња вредност хематокрита  $70 \pm 11$ ) и фосфатних пуфера са опадајућим концентрацијама (155, 139, 124, 109, 94, 80, 65, 50, 35, 20, 12 и 5 mM) су помешане и добијене суспензије су хомогенизоване мешањем и инкубиране 30 min на собној температури. Концентрације пуфера добијене на овај начин су дате у табели 1 (колона 1). Током инкубације су из сваке од суспензија узети узорци за одређивање хематокрита. По истеку 30 min било је могуће центрифугирати суспензије еритроцита у трајању од 15 min при брзини од 3500 rpm (центрифуга Megafuge 1.0R, Heraeus). По завршеном центрифугирању, супернатанти су пажљиво попуљени пипетом и у њима је измерена вредност апсорбанце на 540 nm ( $A_{540}$ ) на UltroSpec 3300pro спектрофотометру (AmershamBioscience, Шведска). Током трајања центрифугирања суспензија еритроцита, одређен је хематокрит за сваку од ових суспензија. Количина еритроцита по хематокритској цевчици је била  $\sim 5 \times 10^7$ .

Степен бубрења еритроцита (*swelling index*) у сваком од испитиваних раствора је израчунат по следећој формули:

$$V / V_0 = H_t (100 - EH_0) / (H_{t_0} (100 - EH)) \quad (2)$$

где је  $V/V_0$  промена запремине еритроцита, тј. степен бубрења,  $H_t$  хематокрит у испитиваном раствору,  $H_{t_0}$  хематокрит у изотоничном раствору,  $EH$

Табела 1. Зависности хематокриџа (Hct), степена хемоллизе (%) и степена бубрења од концентрације пуфера. Резултати представљају средњу вредност пет независних експеримената

Table 1. Hematocrit (Hct), the extent of hemolysis (%) and swelling index as a function of buffer concentration. Results are presented as mean  $\pm$ SD values of five experiments

Концентрација пуфера за хемолизу (mM)	Hct (%)	Степен хемоллизе (%)	Степен бубрења (V/V <sub>0</sub> )
155	35 $\pm$ 5	1,0 $\pm$ 1,7	1,00 $\pm$ 0,00
141	37 $\pm$ 4	1,1 $\pm$ 1,8	1,01 $\pm$ 0,02
129	37 $\pm$ 5	1,1 $\pm$ 1,9	1,04 $\pm$ 0,04
116	39 $\pm$ 4	1,6 $\pm$ 2,1	1,06 $\pm$ 0,06
103	40 $\pm$ 5	2,7 $\pm$ 2,5	1,08 $\pm$ 0,10
91	41 $\pm$ 5	6,0 $\pm$ 4,3	1,15 $\pm$ 0,12
78	38 $\pm$ 5	22,3 $\pm$ 9,8	1,32 $\pm$ 0,17
65	23 $\pm$ 5	68,1 $\pm$ 12,0	1,85 $\pm$ 0,58
53	11 $\pm$ 5	87,8 $\pm$ 6,5	1,84 $\pm$ 0,60
40	5 $\pm$ 1	93,5 $\pm$ 4,5	1,88 $\pm$ 0,46
34	н.д.	96,2 $\pm$ 2,2	Није детектовано
27	н.д.	98,96 $\pm$ 3,6	Није детектовано
23	н.д.	100 $\pm$ 0	Није детектовано

степен хемоллизе у испитиваном раствору,  $EH_0$  степен хемоллизе у изотоничном раствору.

Степен хемоллизе је израчунат према једначини (1).

Одређивање степена бубрења проточном цитометријом. Као друга метода за одређивање степена бубрења еритроцита коришћена је проточна цитометрија. Ова метода омогућава да се, на нивоу сваког појединачног анализираних еритроцита (до  $10^5$  анализираних еритроцита по узорку), измери интензитет расипања светлости током проласка ћелија у струји флуида кроз проточни цитометар. Мерења су рађена на CyFlow CL проточном цитометру (Partec, Немачка). Ласерска светлост која се од ћелија одбија под малим углом ( $0,5$  до  $10^\circ$ ), тј. светлост одбијена у правцу ласерског зрака (*forward light scatter*, FSC) је пропорционална величини ћелије. Ласерска светлост која се од ћелија одбија под углом од  $90^\circ$  (*side light scatter*, SSC) дефинише степен њене унутрашње гранулираности. FSC и SSC имају јединствене вредности за сваки анализирани еритроцит у узорку, а комбинација ова два параметра користи да би се дефинисале различите популације ћелија у узорку. Резултати ове анализе приказани су у виду двопараметарског FSC-SSC хистограма у коме се, за сваку анализирану ћелију, на апсциси налазе FSC вредности (дефинишу величину ћелија), док се на ординати налазе SSC вредности (дефинишу унутрашњу гранулираност ћелија). Промену запремине еритроцита у растворима различите јонске јачине, тј. степен бубрења смо одређивали тако што смо по  $10 \mu\text{l}$  суспензије пакованих еритроцита додавали у  $2 \text{ ml}$  фосфатног пуфера са опадајућом концентрацијом. После  $20 \text{ min}$  инкубације на собној температури еритроцити су анали-

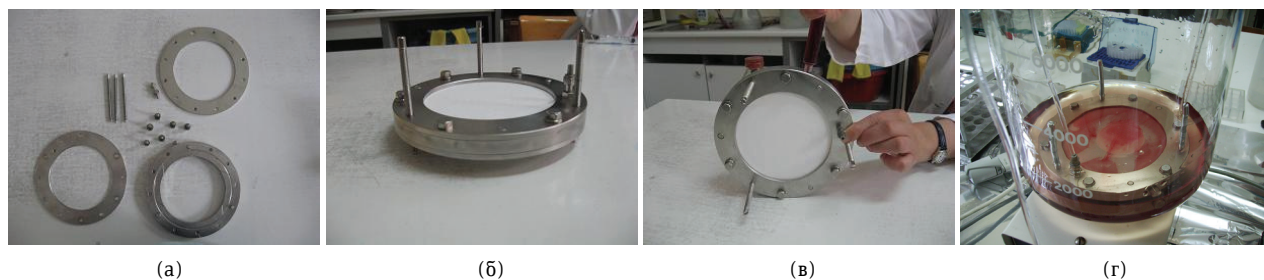
зирани проточном цитометријом. Степен бубрења за сваку од дефинисаних група еритроцита је могуће израчунати по формули:

$$V / V_0 = FSC^t / FSC^0 \quad (3)$$

где је  $FSC^t$  вредност FSC у испитиваном раствору и  $FSC^0$  вредност FSC у изотоничном раствору.

Микроскопска анализа еритроцита и њихових мембрана еритроцита („духова“). Еритроцити и „духови“ еритроцита су анализирани под микроскопом са фазним контрастом (AhiоScor 2+ (Carl Zeiss, Немачка)) под увећањем објектива  $40\times$  и укупним увећањем  $400\times$ . Фотомикрографије су добијене и обрађиване помоћу AxioVision 4.7 софтвера (Carl Zeiss, Немачка).

Контролисана хемолиза говеђих еритроцита у мембранском реактору. Реакција хемоллизе се одвијала у мембранском реактору који се шаржно пунио суспензијом еритроцита. Реакторски модул, запремине  $104 \text{ ml}$ , се састоји од три челичне плоче прстенастог облика које се спајају помоћу вијака (слика 1а). Пре спајања плоча вијцима, између плоча се постављају, претходно натопљене физиолошким раствором, целулозно-ацетатне мембране са величином пора од  $0,8 \mu\text{m}$  и пречником од  $142 \text{ mm}$  (Sartorius AG, Goettingen, Немачка). Састављен реакторски модул је приказан на слици 1б. На овај начин се између мембрана формира простор у коме ће се одвијати реакција контролисане хемоллизе. Такође, пре спајања плоча, у простор између две мембране се убацује магнетно зрно димензија  $3 \text{ cm} \times 0,7 \text{ cm}$ , које обезбеђује мешање унутар мембранског реактора. Да би се у потпуности одстранио кисеоник из



Слика 1. Мембрански реактор: а) делови модула, б) састављен модул, в) пуњење модула и д) процес хемолизе у реактору.  
Figure 1. Membrane reactor: a) module elements, b) constructed module, c) charged module and d) process of hemolysis.

система, сви пуфери и суспензија еритроцита су пре пуњења модула барботирани азотом.

Шаржу је чинило 100 ml суспензије пакованих еритроцита који су непосредно пре хемолизе помешани са физиолошким раствором у односу 1:1. Суспензија еритроцита је у реактор уведена помоћу пластичног шприца (слика 1в). Реакциони модул са суспензијом еритроцита је потапан у „реакциону посуду“ (стаклена чаша пречника 220 cm и запремине од 10 l претходно напуњену са 950 ml физиолошког раствора) – слика 1г. Помоћу перисталтичке пумпе (инфузиона пумпа, IP610, Биомедицина, Београд), протоком од 900 ml/min у модул се уводио нискомоларни пуфер за лизу, добијен мешањем 8 делова 5 mM натријум фосфатног пуфера, pH 7,2–7,4 и 2 дела 0,9% раствора NaCl. Истовремено са укључивањем пумпе, укључена је и лабораторијска хоризонтална ротациона мешалица, (Yellow line OS 5 basic (Ika Werbe GmbH & Co, Немачка)) чија је брзина била 320 o/min. Смањивањем јонске јачине раствора у модулу, ослобађао се хемоглобин из еритроцита и дифундовао кроз мембране еритроцита у физиолошки раствор у реакторској чаши.

Ток хемолизе је праћен мерењем апсорбанце на 540 nm ( $A_{540}$ ) раствора у реакторској посуди, тј. мерењем апсорбанце хемолизата. Мерење је рађено на UltraSpec 3300pro спектрофотометру (Amersham-

Bioscience, Шведска). Узорци су се првих 15 min реакције узимали у временским интервалима од 1 min, до 30 min у временским интервалима од 3 min, до 60 min у временским интервалима од 5 min, а затим је настављено у временским интервалима од 10 min. Реакција је прекинута након 90 min.

Принос хемоглобина (PR) у једном процесном циклусу је израчунат на основу следеће једначине:

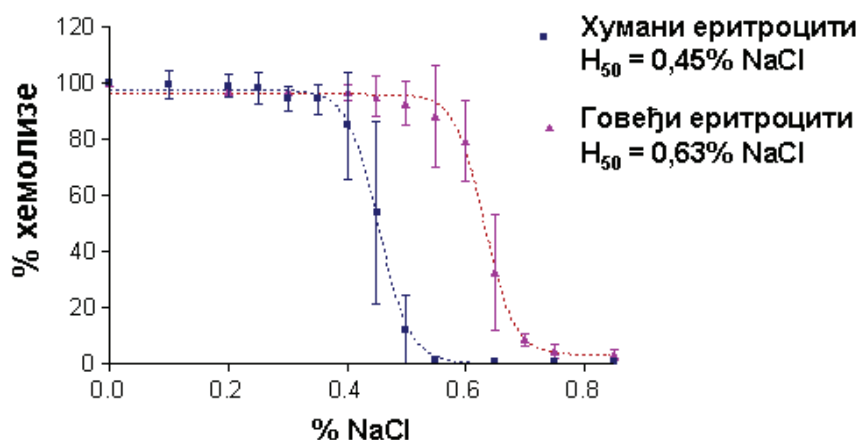
$$PR\% = 100 \frac{m_h}{m_i} \quad (4)$$

где је  $m_i$  почетна маса хемоглобина у суспензији еритроцита пре хемолизе и  $m_h$  маса хемоглобина у хемолизату на крају процеса.

## РЕЗУЛТАТИ

### Тест осмотске фрагилности

У овом раду је најпре испитана осмотска фрагилност говеђих еритроцита. При томе је осмотска фрагилност пакованих еритроцита изражена као промена процента (%) хемолизе у зависности од концентрације NaCl. Резултати добијени за говеђе еритроците су упоређени са осмотском фрагилношћу хуманих еритроцита (слика 2). Тест осмотске фрагилности је дао типичну сигмоидалну криву.



Слика 2. Криве осмотске фрагилности говеђих и хуманих еритроцића.

Figure 2. Erythrocyte osmotic fragility curves for human and bovine erythrocytes - the extent of hemolysis (EH) as a function of solute concentration.

Резултати обраде експериментално добијених резултата (Boltsman-ова сигмоидална нелинеарна регресиона анализа) показали су да постоји статистички значајна разлика између говеђих и хуманих еритроцита у осетљивости на осмотску лизу, при чему су говеђи еритроцити фрагилнији од хуманих. Концентрација NaCl при којој се постиже 50% од максималне хемоллизе ( $H_{50}$ ) за хумане еритроците је 0,45%, док је за говеђе та вредност 0,63% NaCl. Наши резултати су у сагласности са литературним подацима [25–28]. Већа осмотска фрагилност говеђих еритроцита у односу на хумане се објашњава специфичностима у структури мембране: мембрана говеђих еритроцита је мање кохезивна у односу на хумане [29], садржи мање фосфатидилхолина и више сфингомијелина [28], фосфадитилетаноламин је концентрисан углавном у спољашњем слоју мембране [30], а постоје и разлике у унутарћелијској концентрацији јона  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ .

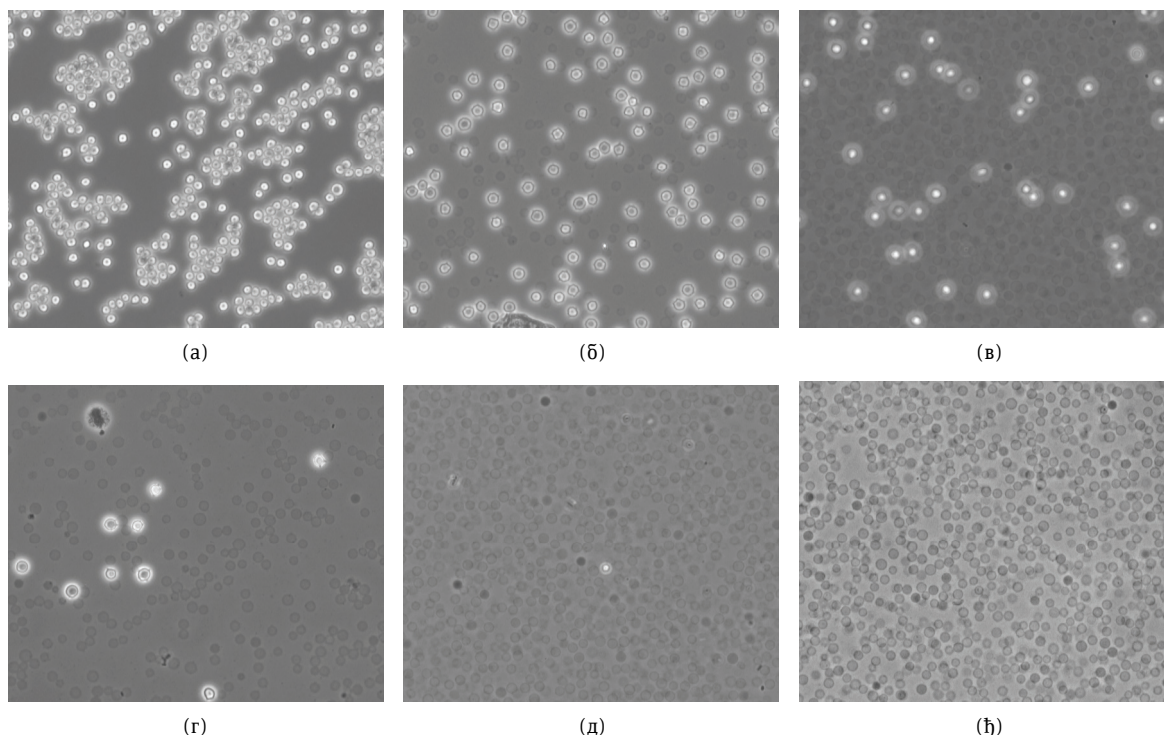
#### Одређивање степена осмотског бубрења говеђих еритроцита

Степен осмотског бубрења говеђих еритроцита је одређен модификованом методом по Vitvitsky и сар. [24]. Ова метода подразумева мерење хематокрита и ослобођеног хемоглобина (тј. степена хемоллизе) еритроцита у низу пуферских раствора са опадајућим концентрацијама NaCl. У табели 1 је

приказана зависност хематокрита, степена (%) хемоллизе и степена бубрења од концентрације пуфера. Резултати морфолошке анализе еритроцита и празних мембрана еритроцита заосталих након хемоллизе приказани су на слици 3.

Анализом добијених резултата приказаних у табели 1 показано је да се са смањењем концентрације пуфера мења вредност хематокрита, расту степен хемоллизе и степен бубрења говеђих еритроцита. Резултати микроскопске анализе (слика 3) су показали да говеђи еритроцити, зависно од узорка, потпуно лизирају и преводе се у „духове“ без пуцања мембране у пуферима чија је моларност износила 52,7 и 40 mM. На основу ових резултата је одлучено да се процес контролисани хемоллизе изводи у фосфатном пуфером добијеним мешањем 2 дела 0,9% раствора NaCl и 8 делова 5 mM натријум-фосфатног пуфера, pH 7,2-7,4, чија је финална концентрација износила 34,8 mM.

Максималан степен бубрења говеђих еритроцита је био ~1,8 (при концентрацији пуфера од 40 mM) што је био неочекиван резултат имајући у виду да хумани еритроцити, за које се показало да су мање фрагилни од говеђих еритроцита, имају приближно исти степен бубрења [31]. Због тога је одлучено да се степен бубрења говеђих еритроцита одреди и проточном цитометријом која представља софистицирану методу за анализу ћелија.



Слика 3. Микроскопска анализа говеђих еритроцита (свеће ћелије) и мембране лизираних еритроцита (шамне ћелије) у пуферима опадајуће јонске јачине: а) 155, б) 91, в) 78, г) 65, д) 53 и е) 34 mM. Објектив са фазним контрастом, увећање објектива  $\times 40$ , укупно увећање  $\times 400$ .

Figure 3. Phase contrast micrographs (magnification  $\times 400$ ) of hemolysates produced by osmotic hemolysis using Na-phosphate/NaCl buffer of the following concentrations: a) 155, b) 91, c) 78, d) 65, e) 53 and f) 34 mM.

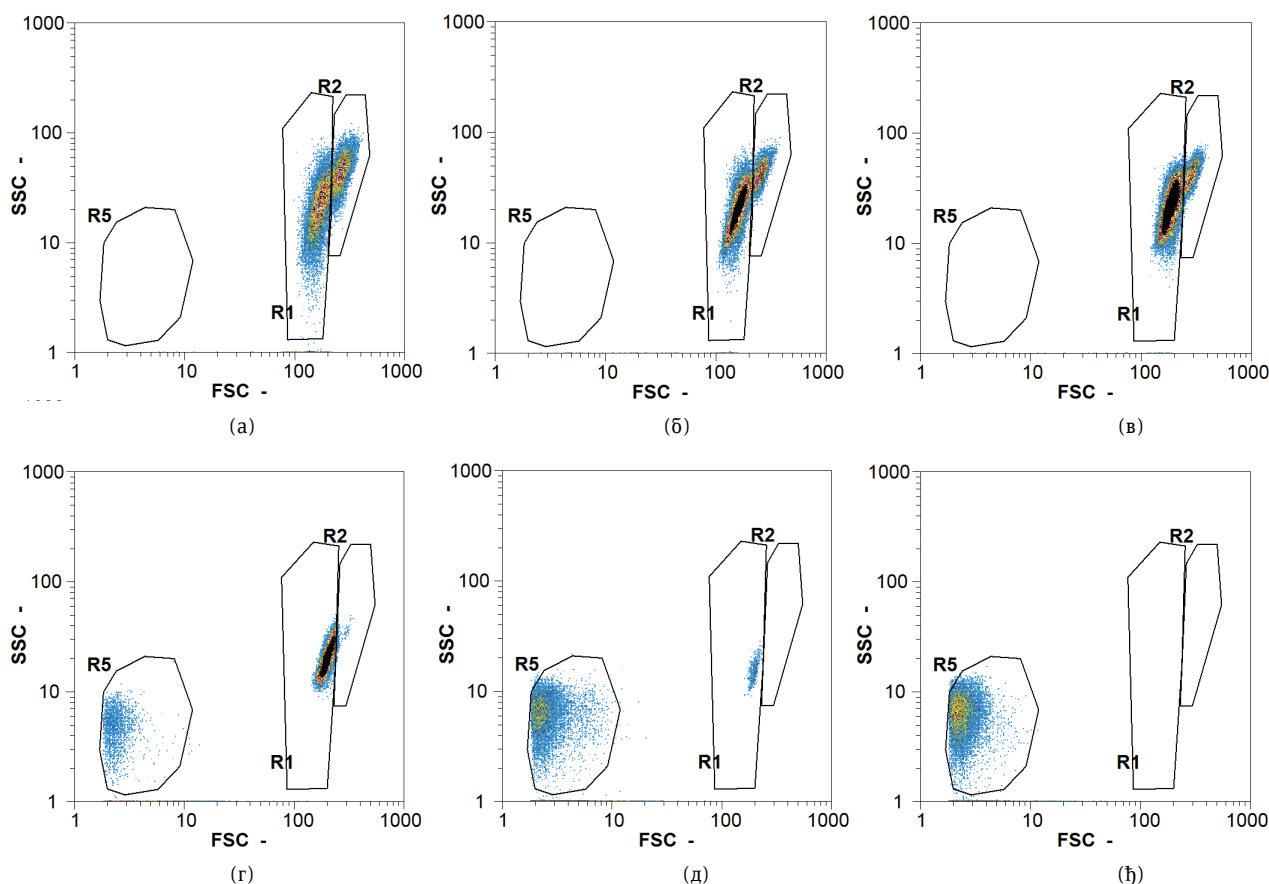


### Одређивање степена осмотског бубрења говеђих еритроцита проточном цитометријом

Резултатима проточне цитометрије, приказаних у облику двопараметарских FSC-SSC дијаграма показано је да се у изотоничном раствору уочавају две субпопулације говеђих еритроцита, R1 и R2, које се међусобно разликују по вредности FSC, тј. по величини (слика 4а). Постојање више субпопулација није био неочекиван резултат с обзиром на то да је појкилоцитоза (присуство еритроцита различите величине и морфологије) карактеристична за говеђе еритроците [2]. У хипотоничним растворима (124 и 109 mM) се такође уочавају две субпопулације еритроцита (слике 4б и 4в). У пуферу чија је концентрација износила 94 mM, уочена је и трећа „ћелијска“ субпопулација означена као R5, а која у ствари представља празне мембране еритроцита заостале после хемолизе, тј. „духове“ (слика 4г). Ова ћелијска субпопулација постаје доминантнија са даљим смањењем моларности пуфера (слике 4д и 4ђ).

У табели 2 је приказана зависност степена бубрења еритроцита од концентрације пуферског раствора. При томе је степен бубрења изражен као ре-

лативна промена вредности FSC у односу на FSC вредност у изотоничном раствору. Резултати приказани у табели 2 показују да субпопулација мањих еритроцита R1 бубри, тј. повећава свој пречник у односу на почетну вредност до ~20%. Популација већих еритроцита R2 има мањи степен бубрења и повећава свој пречник у односу на почетну вредност до ~10%. Међутим, ако се степен бубрења субпопулације R2 изрази кроз јединичну вредност за популацију R1, добија се да је максимални степен бубрења ~80%, што одговара степену бубрења одређеном методом по Vitvitsky и сар. [24] (табела 1). Ово указује на то да висока вредност за степен бубрења добијена методом по Vitvitsky и сар. [24] заправо није реална вредност, него представља резултат несавршености методе која не може да раздвоји ћелијске популације по величини ћелија. Поређење резултата обе коришћене методе је графички представљено на слици 5, а степен корелације резултата ове две методе је износио 0,95 за популацију R1 и 0,83 за популацију R2.



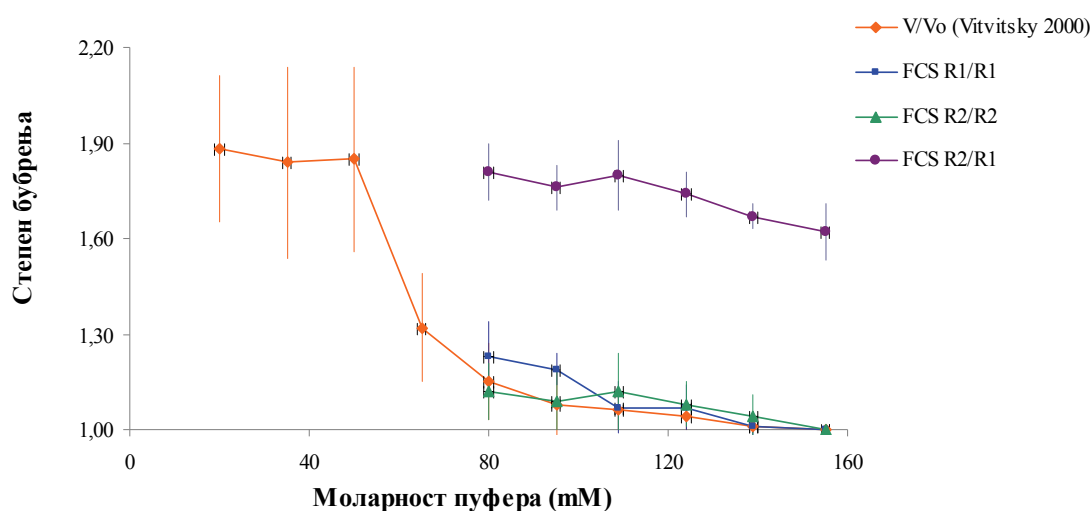
Слика 4. Резултати анализе говеђих еритроцита проточном цитометријом у пуферима одагајуће јонске јачине: а) 155, б) 124, в) 109, г) 94, д) 80 и њ) 78 mM. Приказани су резултати једног репрезентативног од њих експеримената.

Figure 4. Results for flow cytometry of bovine erythrocytes using Na-phosphate/NaCl buffer of the following concentrations: а) 155, б) 124, в) 109, г) 94, д) 80 and њ) 78 mM.

Табела 2. Степен бубрења две популације говеђих еритроциста у хипоосмотским растворима. Резултати представљају средњу вредност три независна експеримента

Table 2. The swelling index of two populations of bovine erythrocytes in hypoosmotic solution. Results are presented as mean  $\pm$  SD values of three experiments

Концентрација пуфера, mM	$FSC_{R1}^t / FSC_{R1}^0$	$FSC_{R2}^t / FSC_{R2}^0$	$FSC_{R2}^t / FSC_{R1}^0$
155,0	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	1,62 $\pm$ 0,09
139	1,01 $\pm$ 0,04	1,04 $\pm$ 0,07	1,67 $\pm$ 0,04
124	1,07 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,07	1,74 $\pm$ 0,07
109	1,07 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,12	1,80 $\pm$ 0,11
94	1,19 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,09	1,76 $\pm$ 0,07
80	1,23 $\pm$ 0,11	1,12 $\pm$ 0,09	1,81 $\pm$ 0,09



Слика 5. Степен бубрења говеђих еритроциста одређен модификованом методом по Vitvitsky и сар, (2000) (средња вредност пет независних експеримента) и проценом цитометријом (средња вредност три независна експеримента).

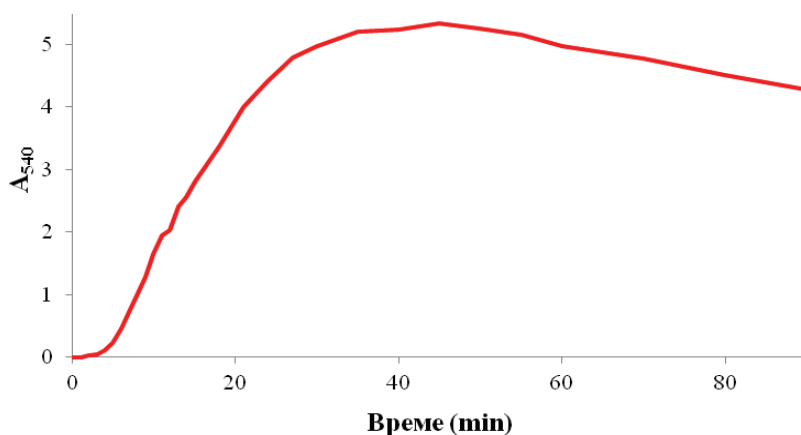
Figure 5. The swelling index of bovine erythrocytes determined by protocol Vitvitsky et al. (2000) (results are presented as mean  $\pm$  SD values of five experiments) and by flow cytometry (results are presented as mean  $\pm$  SD values of three experiments).

#### Процес контролисане хемоллизе говеђих еритроцита у мембранском реактору

Контролисана хемоллиза је изведена у мембранском реактору при чему је хипоосмотски пуфер увећан протоком од 900 ml/h. Процес је трајао 90 min. Ослобађање хемоглобина из еритроцита, тј. процес

хемоллизе, је праћен на основу промене апсорбанце ( $A_{540}$ ) раствора у реакторској посуди (хемолизата). На слици 6 је приказан ток процеса хемоллизе у једном репрезентативном експерименту.

Уочава се да је протекло 5 min до детектовања ослобођеног хемоглобина. Максимална концентра-



Слика 6. Ток контролисане хемоллизе говеђих еритроциста.

Figure 6. The time course of hemoglobin release during hemolysis process in the membrane reactor.



ција хемоглобина је достигнута у 45. min. Међутим, процес контролисане хемоллизе је извођен до 90 min што је омогућило да се постигне принос хемоглобина од  $83 \pm 12\%$  (просечна вредност за пет процесних циклуса).

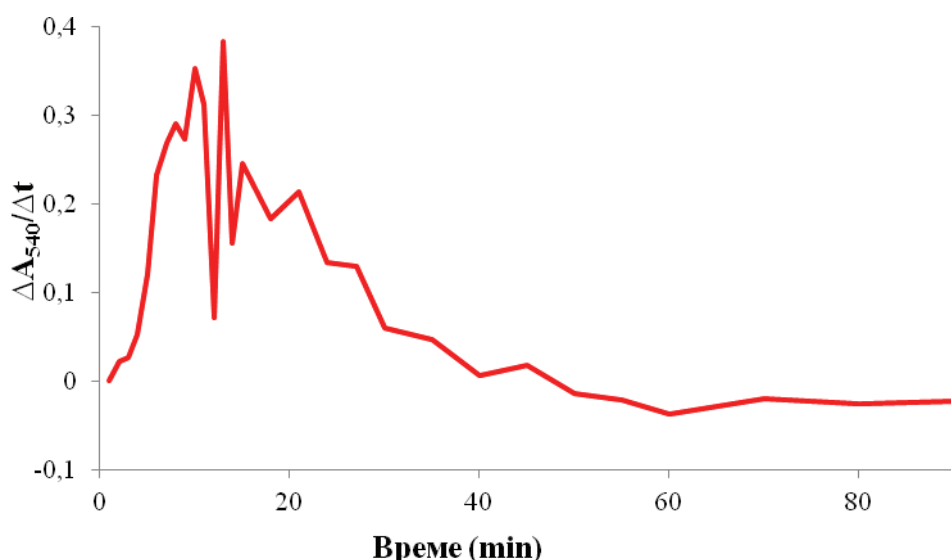
Промена брзина хемоллизе са временом је добијена као диференцијална промена концентрације хемоглобина (апсорбанце раствора  $A_{540}$ ). На слици 7 уочава се да је контролисана хемоллиза нестаационар процес.

Спектралне карактеристике хемолизата су показале да је добијени хемоглобин у форми биолошки активног оксихемоглобина (удео метхемоглобина је био мањи од 5%) (слика 8).

Микроскопска анализа хемолизата добијеног на крају процеса контролисане хемоллизе је показала присуство празних, неоштећених мембрана еритроцита, тзв. „духова“ (слика 9).

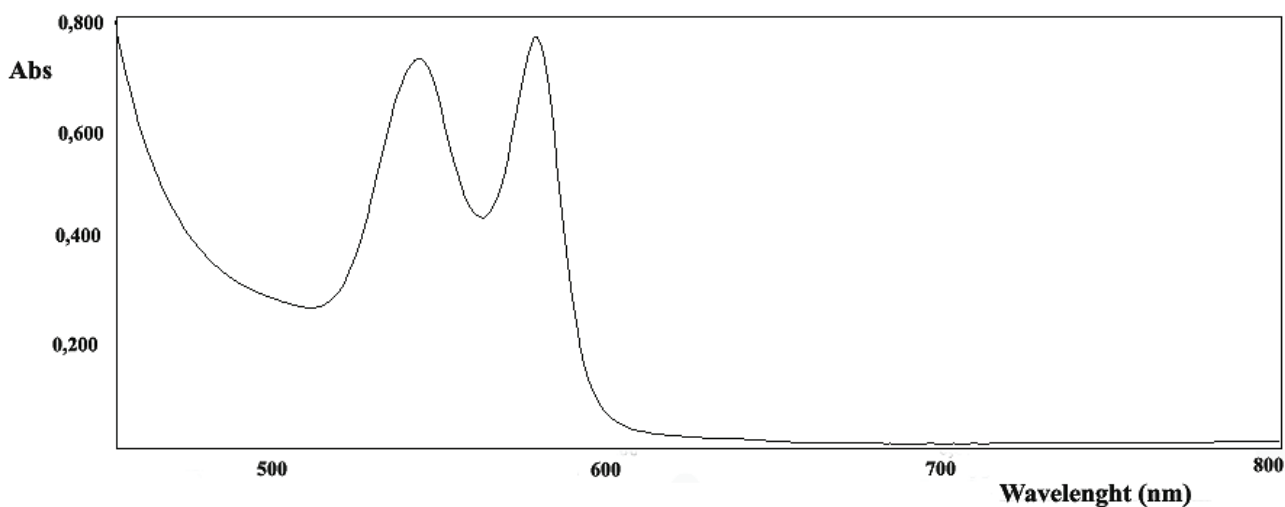
### ЗАКЉУЧАК

У процесу контролисане хемоллизе говеђих еритроцита пореклом из отпадне кланичне крви могуће је, процесом контролисане хемоллизе у мембранском реактору (укупне запремине 1,4 l) изоловати хемоглобин са приносом од  $\sim 83\%$ . Оптимизовани процесни параметри су следећи: концентрација хипотоничног пуферског раствора је 35 mM, проток



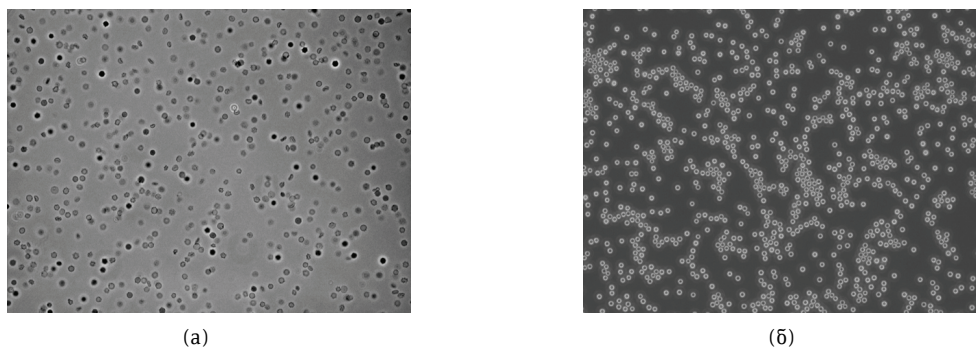
Слика 7. Брзина ослобађања хемоглобина из говеђих еритроциста у функцији времена у процесу контролисане хемоллизе током 90 min трајања циклуса.

Figure 7. Differential hemolysis curve.



Слика 8. Апсорбциони спектар хемоглобина из хемолизата добијеног процесом контролисане хемоллизе говеђих еритроциста.

Figure 8. Absorption spectra of bovine hemoglobin isolated in the process of gradual hemolysis.



(a)

(b)

Слика 9. Микроскопска анализа говеђих еритроциста пре почетка хемоллизе (а) и мембране лизираних еритроциста осталих у мембранском реактору након хемоллизе (б). Објектив са фазним контрастом, увећање објектива  $\times 40$ , укупно увећање  $\times 400$ .

Figure 9. Phase contrast micrographs (magnification  $\times 400$ ) of a) the erythrocyte suspension prior to hemolysis and b) erythrocyte ghosts produced by gradual hemolysis in the erythrocytes membrane bioreactor.

раствора за хемолизу 900 ml/min и трајање процеса 90 min. Изоловани хемоглобин је био у форми биолошки активног оксихемоглобина, а садржај метхемоглобина није прелазео 5%. Као резултат процеса контролисане хемоллизе, осим хемоглобина, добијају се интактне празне мембране еритроцита тзв. „духови“ који представљају потенцијалне носаче за инкапсулацију биолошки активних супстанци. На овај начин би се добиле потпуно нове лековите формулације на бази потпуно биолошке мембране за интравенску или интраперитонеалну примену.

#### Захвалница

Овај рад је реализован у оквиру националног пројекта ИИИ46010 који финансира Министарство просвете и науке Републике Србије и међународног Еурека пројекта ХЕМИРОН Е!4486. Аутори захваљују кланици „Амбар“ у Сурчину за донације узорака крви и дипл. инг. Марији Девић на сарадњи.

#### LITERATURA

- [1] de Oliveira Roça, Humane slaughter Of Bovine. Emb-rapa: First Virtual Global Conference on Organic Beef Cattle Production; September 02 to October 15, 2002, available from: <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congressovirtual/pdf/ingles/02en03.pdf>
- [2] N.C. Jain, Essentials of Veterinary Hematology, Lea & Febiger Philadelphia, 1993.
- [3] S.M. Christensen, F. Medina, R.W. Winslow, S.M. Snell, A. Zegna, M.A. Marini, Preparation of human hemoglobin A<sub>0</sub> for possible use as a blood substitute, J. Biochem. Biophys. Methods. **17** (1988) 143–154.
- [4] H. Sakai, S. Takeoka, H. Yokohama, Y. Seino, H. Nishide, E. Tsuchida, Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment, Protein. Expr. Purif. **4** (1993) 563–569.
- [5] R.M. Winslow, K.W. Chapman, Pilot-scale preparation of hemoglobin solutions, Methods Enzymol. **231** (1994) 3–16.
- [6] C.T. Andrade, L.A. Barros, M.C. Lima, E.G. Azero, Purification and characterization of human hemoglobin: effect of the hemolysis conditions, Int. J. Biol. Macromol. **34** (2004) 233–240.
- [7] M.L. Dimino, A.F. Palmer, Purification of bovine hemoglobin via fast performance liquid chromatography, J. Chromatogr., B **856** (2007) 353–357.
- [8] G. Sun, A.F. Palmer, Preparation of ultrapure bovine and human hemoglobin by anion exchange chromatography, J. Chromatogr., B **867** (2008) 1–7.
- [9] P. Seeman, Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lyssolecithin, J. Cell Biol. **32** (1967) 55–70.
- [10] N.I. Birndorf, H. Lopas, S.J. Robboy, Disseminated intravascular coagulation and renal failure: Production in the monkey with autologous red blood cell stroma, Lab. Invest. **25** (1971) 314–319.
- [11] M. Relihan, M.S. Litwin, Effects of stroma-free hemoglobin solution on clearance rate and renal function, Surgery **71** (1972) 395–399.
- [12] W. Odling-Smee, C. McLarnon, Haemoglobin solution as an oxygen-carrying resuscitation fluid in haemorrhagic shock, Ir. J. Med. Sci. **153** (1984) 385–388.
- [13] M. Feola, J. Simoni, P.C. Canizaro, R. Tran, G. Raschbaum, F.J. Behal, Toxicity of polymerized hemoglobin solutions, Surg. Gynecol. Obstet. **166** (1988) 211–222.
- [14] R. Lee, N. Atsumi, E.E. Jr Jacobs, W.G. Austen, G.J. Vlahakes, Ultrapure, stroma-free, polymerized bovine hemoglobin solution: evaluation of renal toxicity, J. Surg. Res. **47** (1989) 407–411.
- [15] D. Danon, Osmotic hemolysis by a gradual decrease in the ionic strength of the surrounding medium, J. Cell Comp. Physiol. **57** (1961) 111–117.
- [16] R.D. MacGregor, C.A. Tobias, Molecular sieving of red cell membranes during gradual osmotic hemolysis, J. Memb. Biol. **10** (1972) 345–356.
- [17] B. Bugarski, N. Dovezenski, Hemofarm Konzern. Verfahren zur Herstellung von Hemoglobin, Deutsches Patentamt DE 19707508, 2000.
- [18] B. Bugarski, N. Dovezenski, N. Stojanovic, D. Bugarski, Hemofarm Konzern. Emulsion containing hydrophobic

- nanodrops with bound hemoglobin molecules in a hydrophilic phase as a blood substitute, Deutsches Patentamt DE 2002-10209860 WO 2003074022, 2003.
- [19] A.V. Cardoso, A.O. Camargos, Geometrical aspects during formation of compact aggregates of red blood cells, *Mat. Res.* **5** (2002) 263–268.
- [20] O.W. Van Assendelft, A.H. Holtz, S.M. Lewis, Recommended method for the determination of the hemoglobin content of blood. I.C.S.H. Publications World Health Organization, 1984, 1.4.1.
- [21] K.A. Evelyn, H.A.T. Malloy, Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood, *J. Biol. Chem.* **126** (1938) 655–662.
- [22] J.C. Sabine, D.J. Nickolai, A microhematocrit method and its use with citrated blood, *Blood.* **7** (11) (1952) 1128–1131.
- [23] A.K. Parpart, P.B. Lorenz, E.R. Parpart, J.R. Gregg, A.M. Chase, The osmotic resistance (fragility) of human red cells, *J. Clin. Invest.* **26** (1947) 636–640.
- [24] V.M. Vitvitsky, E.V. Frolova, M.V. Martinov, S.V. Komarova, F.I. Ataulkhanov, Anion permeability and erythrocyte swelling, *Bioelectrochemistry* **52** (2000) 169–177.
- [25] S.P. Burger, T. Fujii, D.J. Hanahan, Stability of the bovine erythrocyte membrane. Release of enzymes and lipid components, *Biochemistry* **7** (1968) 3682–3700.
- [26] W.W. Christie, in: *Lipid metabolism in ruminant animals* W.W. Christie, Ed., Pergamon, Oxford, 1981, pp. 95–191.
- [27] M. Matsumoto, M. Miwa, Study on the new phospholipid, n-acyl-1-alkyl glycerophosphorylethanolamine, from bovine erythrocytes, *Biochem. Biophys. Acta* **296** (1973) 350–364.
- [28] J. Florin-Christensen, C.E. Suarez, M. Florin-Christensen, M. Wainszelbaum, W.C. Brown, T.F. McElwain, G.H. Palmer, A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (2001) 7736–7741.
- [29] S.P. Burger, T. Fujii, D.J. Hanahan, Stability of the bovine erythrocyte membrane. Release of enzymes and lipid components, *Biochemistry* **7** (1968) 3682–3700.
- [30] G. Gimenez, M. Florin-Christensen, M.L. Belaunzarán, E.L. Isola, C.E. Suárez, J. Florin-Christensen, Evidence for a relationship between bovine erythrocyte lipid membrane peculiarities and immune pressure from ruminal ciliates, *Vet. Immunol. Immunopathol.* **119** (2007) 171–179.
- [31] A.W. Jay, Geometry of the human erythrocyte, I. Effect of albumin on cell geometry, *Biophys. J.* **15** (1975) 205–222.

## SUMMARY

### OPTIMIZATION OF GRADUAL HEMOLYSIS FOR ISOLATION OF HEMOGLOBIN FROM BOVINE ERYTHROCYTES

Radoslava Pravilović<sup>1</sup>, Slavko Mojsilović<sup>2</sup>, Ivana Kostić<sup>1</sup>, Vesna Ilić<sup>2</sup>, Diana Bugarski<sup>2</sup>, Verica Đorđević<sup>1</sup>, Branko Bugarski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Department of Chemical Engineering, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>University of Belgrade, Institute for Medical Research, Belgrade Serbia

(Scientific paper)

In this work, we describe an optimized procedure based on gradual hemolysis for the isolation of hemoglobin derived from bovine slaughterhouse erythrocytes in a membrane bioreactor. The membrane bioreactor system provided high yields of hemoglobin (mainly oxyhemoglobin derivative) and its separation from the empty erythrocyte membranes (ghosts). Ten different concentrations of hypotonic media were assessed from the aspect of the extent of hemolysis, hematocrit values of the erythrocyte suspensions, cell swelling and membrane deformations induced by decreased salt concentration. Effective gradual osmotic hemolysis with an extent of hemolysis of 83% was performed using 35 mM Na-phosphate/NaCl buffer of pH 7.2–7.4. Under these conditions most of the cell membranes presented the appearance of the normal ghosts under phase contrast microscope. The results show that isolation process yielded predominantly to oxyhemoglobin. Kinetic studies showed that maximal concentration of hemoglobin was reached after 40 min, but the process cycle at which recovery of 83% was achieved lasted for 90 min.

**Keywords:** Gradual hemolysis • Bovine erythrocytes • Hemoglobin • Membrane bioreactor