

УДК 577.352:612.111.57.086.2.043

## ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ СРЕДЕ ЭЛЕКТРОЛИТА. 2. СОСТОЯНИЕ ВНЕШНИХ ПРИМЕМБРАННЫХ СЛОЕВ

Л.Г. Кулешова

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61015, Харьков, ул.Переяславская, 23.*

Поступила в редакцию 1 июня 2002г.

В работе методами спектрофотометрии, оптической световой и фазово-контрастной микроскопии изучено состояние поверхности эритроцитов человека в гипертонической среде электролита NaCl. Установлено, что эритроциты человека отличаются значительной гипертонической устойчивостью. Однако в результате дегидратационных процессов происходит трансформация эритроцитов с существенным изменением рельефа клеточной поверхности, что в свою очередь сопровождается частичной деструкцией внешних примембранных слоев (гликокаликса) и элиминацией во внеклеточную среду гликопротеинов.

**Ключевые слова:** эритроцит, гипертония, мембрана, гликокаликс, микроскопия, спектрофотометрия.

Внешняя поверхность плазматических мембран клеток человека и животных представляет собой тонкий слой толщиной порядка 1 мкм, так называемый гликокаликс. Гликокаликс или внешние примембранные слои клеток (ВПМС) - сравнительно недавно открытая структура, образованная белками, гликопротеинами и полисахаридами, которые синтезируются той же клеткой. Эта структура связана с липидным бислоем клеточной мембраны и, естественно, сильно влияет на его свойства. Однако многие вопросы строения, состава и функциональной роли внешних примембранных слоев изучены недостаточно. Сложность изучения гликокаликса обусловлена его лабильностью и быстрым разрушением при манипуляциях с клетками [1].

Авторами [2] разработана методика прижизненного выявления ВПМС клеток с помощью высокомолекулярного красителя фталоцианиновой группы - альцианового синего (АС). Альциановый синий традиционно используется в гистологических и электронномикроскопических исследованиях для идентификации гликопротеинов и мукополисахаридов в фиксированных тканях, в частности для выявления их на поверхности клеток. Результаты, изложенные в работе [3], убедительно доказывают, что АС связывается с гликопротеинами и полисахаридами гликокаликса и что уменьшение в нем их содержания после обработки клеток трипсином влечет за собой падение сорбции АС клеточной поверхностью. Существование зависимости между содержанием в гликокаликсе гликопротеинов и полисахаридов и сорбцией АС клеточной поверхностью подтверждено также при изучении функциональных и структурных изменений поверхности эритроцитов человека после облучения их УФ лучами различной длины волны [4].

В работе предпринята попытка оценить состояние поверхности эритроцитов человека после гипертонического воздействия электролита NaCl при комнатной температуре методом прижизненной окраски суспензии клеток альциановым синим.

Предыдущими исследованиями нами [5] показано, что гемолиз эритроцитов в пределах до 1,28M NaCl незначительный, однако при этом отмечается существенное нарушение регулярности плазматической мембраны. Представляло интерес проанализировать состояние ВПМС именно в этом интервале гипертоничности.

Объектом исследования служили эритроциты донорской крови человека, консервированные в среде "Глюгидир". Для получения эритроцитарной массы кровь трижды отмывали физиологическим раствором (0,15M NaCl). Концентрацию клеток в экспериментах поддерживали постоянной путем смешения уплотненной эритроцитарной массы в определенном соотношении с реагентом. Исходный гематокрит составлял 0,99. Исследовано воздействие 0,34M, 0,85M, 1,28M растворов NaCl. Время экспозиции клеток в гипертонических растворах соли составляло 15 мин. После этого в суспензию клеток в соотношении 1:1 (по объему) добавляли приготовленный на физиологическом растворе 0,01% раствор АС (Alcian Blue 8GS фирмы SERVA, США). Время окрашивания клеток составляло 10 мин, не считая времени

центрифугирования проб для получения супернатанта. Степень выраженности гликокаликса эритроцитов человека оценивали по интенсивности сорбции альцианового синего клетками, которую определяли спектрофотометрически по изменению концентрации красителя в растворе после окрашивания ими клеток (так называемый метод "косвенного" определения) в области 617 нм, соответствующей максимальному поглощению красителя. При фотометрировании супернатантов после воздействия на эритроциты гипертонических растворов NaCl и их окрашивания АС оптическую плотность измеряли также в области 410–420 нм (полоса Сор), соответствующей характерному поглощению гемоглобина, для контроля уровня гемолиза клеток. Концентрацию свободного гемоглобина в мг% и АС в % определяли по градуировочным кривым. Статистическую обработку результатов проводили с применением критерия Стьюдента-Фишера.

Мерой сорбции АС клеточной поверхностью служил коэффициент распределения красителя между клеткой и средой, определяемый по изменению концентрации свободного АС в суспензии клеток. Расчет количества АС сорбированного одной клеткой проводили по формуле:

$$Q = \frac{C_0 - C}{nV},$$

где  $n$  - количество клеток в 1 мл,  $V$  - объем окрашиваемой суспензии (последний составлял 5 мл, что определялось емкостью кювет спектрофотометра),  $C_0$  - концентрация АС в исходной смеси до окрашивания клеток,  $C$  - концентрация АС в супернатанте после воздействия на клетки реагентов. Контролем служила степень сорбции АС клетками в физиологическом растворе.

Как показал микроскопический анализ морфоэритрограмм (рис.1.1, рис.1.2) АС в используемой концентрации не повреждает клетки и не проникает в цитоплазму. После 10 минут окрашивания эритроцитов АС наблюдается трансформация дискоцитов (нормоцитов) в эхиноциты (рис.1.2). Выраженный эхиноцитоз эритроцитов может быть обусловлен встраиванием молекул красителя во внешний монослой мембраны [6,7].

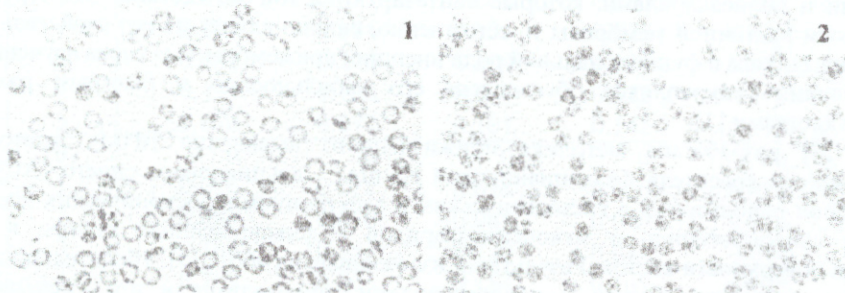


Рис.1 Прижизненное окрашивание эритроцитов человека 0.01% АС.  
1 - начало взаимодействия; 2 - через 10 минут.  
Увеличение при съемке  $\times 200$ .

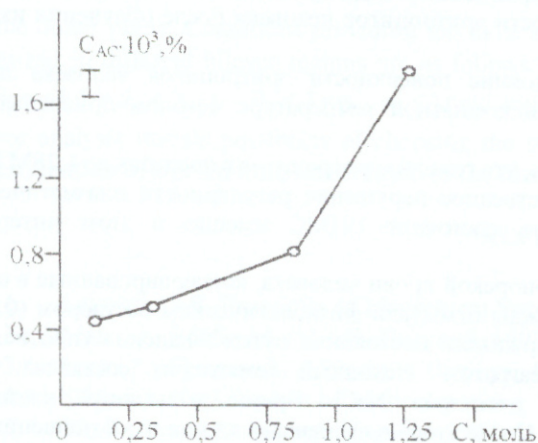


Рис.2. Кинетика накопления АС в супернатанте при гипертоническом воздействии электролита NaCl на эритроциты человека

Спектрофотометрические исследования показали следующее. Сорбция АС клетками в изотонических условиях (контроль) максимальна (в супернатанте регистрируется минимальная концентрация АС) (рис.2). При увеличении внесклеточной гипертоничности концентрация АС в супернатантах возрастает. Поскольку суспензия эритроцитов представляет собой гетерогенную систему, в которой имеются популяции клеток различного возраста, вполне естественно, что их гипертоническая устойчивость должна также отличаться. Однако, как показал параллельный контроль уровня гемолиза исследуемых проб, он составлял менее 1%.

В таблице 1 приведены количественные данные сорбции АС одним эритроцитом в зависимости от величины гипертонического воздействия.

Таблица 1. Сорбция АС одним эритроцитом (г) в зависимости от гипертоничности электролита NaCl.

| № п/п | Концентрация реагента (М) | Сорбция АС ( $\times 10^{-12}$ , г) |
|-------|---------------------------|-------------------------------------|
| 1     | 0,15                      | 9,1 $\pm$ 0,02                      |
| 2     | 0,34                      | 9,0 $\pm$ 0,05                      |
| 3     | 0,85                      | 8,5 $\pm$ 0,02                      |
| 4     | 1,28                      | 6,4 $\pm$ 0,03                      |

Как следует из данных таблицы, воздействие 0,34М раствора NaCl не вызывает деструкции ВПМС эритроцитов поскольку степень сорбции АС в данном случае на уровне контроля. Достоверное снижение сорбции АС по сравнению с контролем отмечается при гипертонии 0,85М NaCl. Так как среди веществ белковой природы АС связывается только с гликопротеинами [3], снижение сорбции АС поверхностью эритроцитов может явиться следствием частичного разрушения их гликокаликса и элиминацией во внеклеточную среду его компонентов.

Тот факт, что в условиях умеренной внеклеточной гипертонии наблюдается деструкция примембранных слоев эритроцитов человека оказывается весьма важным для понимания возможных первопричин гипертонического криогемолиза – явления, которое сопровождается охлаждением клеток, предварительно выдержанных в гипертонических средах, до субнулевых температур. На основании многочисленных экспериментальных данных определены основные закономерности гипертонического криогемолиза и сформулирована его биофизическая модель [8,9]. В частности, установлено, что чувствительность к последующему охлаждению эритроциты человека приобретают при их предварительной экпозиции при комнатной температуре в гипертонических средах с концентрацией NaCl выше 0,8М [10]. Результаты данной работы свидетельствуют о том, что именно в этой концентрационной зоне (0,85М NaCl) начинается частичное разрушение гликокаликса клеток. Следствием этого процесса, вероятнее всего, может быть нарушение белок-липидных взаимодействий в мембране и латеральная сепарация ее компонентов, что в свою очередь, несомненно, должно отразиться на особенностях структурно-фазовых превращений в мембране при охлаждении в температурном интервале 8-13°C [11] и характере развития гипертонического криогемолиза.

### ВЫВОДЫ

Таким образом, гипертонические растворы электролита NaCl вызывают трансформацию эритроцитов человека с существенным изменением рельефа клеточной поверхности, сопровождающейся частичной деструкцией внешних примембранных слоев. Деструкцию ВПМС можно рассматривать как один из возможных первичных пусковых механизмов гипертонического криогемолиза.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Комиссарчик Я.Ю., Левин С.В.//Цитология.-1974.-т.XVI,№5.-С.528-544.
2. Крыленков В.А., Левин С.В., Самойлова К.А.//Цитология.-1979.-т.XXI,№2.-С.157-163.
3. Крыленков В.А., Левин С.В., Самойлова К.А.//Цитология.-1979.-т.XXI,№4.-С.470-473.
4. Арцишевская Р.А., Самойлова К.А.//Цитология.-1983.-т.XXV,№12.-С.1387-1392.
5. Кулешова Л.Г.//Вісн. ХДУ N568. Біофізичний вісник.-2002.-Вип.2.-С.54-56.
6. Маркин В.С.//Биофизика.-1981.-XXVI,вып.1.-С.158-167.
7. Черный В.В., Пауличке М.//Биологические мембраны.-1990.-т.7,№8.-С.838-842.
8. Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е.//Проблемы криобиологии.-1997.-N3.-С3-7.
9. Коваленко С.Е.// Вісн.ХДУ N422 Біофізичний вісник.-1998.-Вип.2.-С.82-84.
10. Moriss G.J.,Coulson G.,Meyer M.A.,et.al.// Cryoletters.-1983.-4.-P.179-192.
11. Minetti M., Ceccarini M.,Di Stasi A.M.M.// J.Cell.Biochem.-1984.-25.-P.61-72.