

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 57.043

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПО ИНДЕКСУ СФЕРИЧНОСТИ**Е.В. Давыдова, О.И. Гордиенко***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, 61015, Харьков, gordienko@gala.net*

Поступила в редакцию 30 апреля 2009 г.

Принята 10 июня 2009 г.

В работе исследовано влияние температуры в диапазоне 37-3°C на форму эритроцитов человека. Использовали методы световой микроскопии и определения плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности. Показано, что в области температур 15-8°C резко возрастает доля клеток с малым индексом сферичности (1-1,3) с максимумом при температурах 12 – 10°C, что соответствует появлению и росту на кривых плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности дополнительного максимума. Плотность клеток в диапазоне больших индексов сферичности (>1,7) уменьшается при снижении температуры ниже физиологической и принимает значения, как правило, менее 5% при температурах ниже 20°C. Методом световой микроскопии показано, что при достижении температуры 15°C часть клеток резко изменяет свою форму путем перехода “дискоцит–стоматоцит”, что приводит к мгновенному разрушению сформировавшихся ранее монетных столбиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, форма, индекс сферичности, охлаждение**TEMPERATURE EFFECT ON ERYTHROCYTE DISTRIBUTION BY SPHERICAL INDEX****E.V. Davydova, O.I. Gordiyenko***Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, 61015*

The effect of temperature in the range of 37 - 3°C on human erythrocyte shape was investigated. Methods of light microscopy and determination of cell distribution density by spherical index (SI) were used. The investigation shows that the part of cells with small SI (1-1,3) dramatically increases in the temperature range from 15 to 8°C and has a maximum at 12-10°C, corresponding to appearance and growth of additional maximum in the erythrocyte distribution density curves. The cell density in the range of large SI (>1,7) decreases with temperature fall below physiological one and takes values, as a rule, less than 5% at the temperatures under 20°C. By light microscopy method there was shown that when reaching the temperature of 15°C a part of cells dramatically changes their shape by “discocyte – stomatocyte” transition, that leads to destruction of preliminarily formed rouleaux.

KEY WORDS: erythrocyte, shape, spherical index, cooling**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПО ИНДЕКСУ СФЕРИЧНОСТИ****Е.В. Давыдова, О.И. Гордиенко***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, 61015, Харьков*

В работе исследовано влияние температуры в диапазоне 37-3°C на форму эритроцитов человека. Использовали методы световой микроскопии и определения плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности. Показано, что в области температур 15-8°C резко возрастает доля клеток с малым индексом сферичности (1-1,3) с максимумом при температурах 12 – 10°C, что соответствует появлению и росту на кривых плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности дополнительного максимума. Плотность клеток в диапазоне больших индексов сферичности (>1,7) уменьшается при снижении температуры ниже физиологической и принимает значения, как правило, менее 5% при температурах ниже 20°C. Методом световой микроскопии показано, что при достижении температуры 15°C часть клеток резко изменяет свою форму путем перехода “дискоцит–стоматоцит”, что приводит к мгновенному разрушению сформировавшихся ранее монетных столбиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, форма, индекс сферичности, охлаждение

В научной литературе неоднократно отмечалось, что существование термотропных переходов в мембранах эритроцитов не выявляется традиционными калориметрическими и рентгеноскопическими методами вследствие высокого содержания холестерина [1-3] и особенностей упаковки белков в них [4]. В то же время исследование температурных зависимостей трансмембранных потоков различных веществ и состояния компонентов мембран ЭПР-методами обнаруживает ряд температурозависимых изменений этих характеристик [5-8]. В работе [9] представлены данные о наличии температурозависимых изменений энергии активации пассивного

проникновения криопротекторов различной степени гидрофобности (1,2-ПД и ДМСО) через мембраны нативных и рСМБС – обработанных эритроцитов человека.

Известно, что в нормальных физиологических условиях липиды биологических мембран находятся в жидко-кристаллическом состоянии. Мембранные компоненты при этом способны вращаться и колебаться, перемещаться вдоль монослоев, а также совершать перескоки из одного монослоя в другой. При охлаждении агрегатное состояние липидов мембран меняется. Вследствие гетерогенности и сложности состава мембраны термотропные переходы происходят не сразу по всей поверхности мембраны, занимая широкий интервал температур [10,11]. Прежде всего, такие изменения могут происходить в приобластных липидах, обедненных по холестерину [3], что может вызвать конформационные изменения мембранных белков. В работе [12] показано, что конформационные изменения интегральных белков, в частности белка полосы 3, приводят к расширению (сжатию) одного из монослоев мембранного бислоя, приводя к изменению формы эритроцитов. Ранее было показано, что плотность распределения эритроцитов человека по индексу сферичности является не только важной объективной характеристикой популяции красной крови человека при различных патологиях [13-15], но может использоваться также при оценке влияния различных факторов на эритроциты *in vitro* [16]. В частности, в криобиологических исследованиях этот метод был успешно применен для изучения влияния гипертонии на состояние популяции эритроцитов в зависимости от степени гипертоничности и времени ее влияния на клетки [17].

Целью настоящей работы является исследование влияния охлаждения на изменение формы эритроцитов методом определения плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на эритроцитах донорской крови человека, полученной на консерванте “Глюгицир”. Для определения плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности методом малоуглового рассеяния получали экспериментальные кривые осмотической хрупкости в диапазоне температур 37-0°C [18]. Измерения проводили в температурных точках: 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 27, 30 и 37°C. Кривые плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности определяли из экспериментальных кривых осмотической хрупкости на основании физико-математической модели гипотонического гемолиза в растворе непроницающего вещества [19,20].

Для микроскопического контроля влияния температуры на эритроциты разведенные в плазме клетки помещали на стекло термостатированной камеры микроскопа Axio Observer Z1 (масляно-имерсионный объектив х63) и регистрировали изображения клеток в диапазоне температур 37-3°C с шагом 1°C. Снижение температуры осуществлялось очень медленно, чтобы избежать влияния скорости охлаждения на клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе [21] было показано, что кривые распределения эритроцитов по индексу сферичности изменяются при охлаждении клеток, однако измерения были проведены только в трех температурных точках. Для выявления температур, при которых происходят наиболее выраженные изменения кривых, мы провели измерения в 10 температурных точках. Полученные кривые распределения индекса сферичности в популяциях 7 доноров были проанализированы по относительному содержанию клеток в диапазонах индексов сферичности 1 – 1,3, 1,3 – 1,7 и в диапазоне индексов

сферичности $>1,7$ (рис. 1-3), как это было сделано в работе [17]. Температурная зависимость относительного количества клеток в диапазоне малых индексов сферичности (1–1,3) свидетельствуют о резком росте процента эритроцитов, близких к сферическим, в диапазоне температур 15–8°C с максимумом при температурах 12 – 10°C (рис.1). Плотность клеток в диапазоне больших индексов сферичности ($>1,7$) уменьшается при снижении температуры ниже физиологической (37°C) и принимает значения, как правило, менее 5% при температурах ниже 20°C (рис.2). Минимум на температурных зависимостях относительного количества клеток в среднем диапазоне индексов сферичности (1,3 – 1,7) (рис.3) в области температур 15–10°C связан с набуханием части клеток и переходом их в диапазон индексов сферичности 1 – 1,3 (максимум на рис.1). Уменьшение же относительного количества клеток в среднем диапазоне индексов сферичности при температурах больших 25°C связано с их переходом в диапазон индекса сферичности $>1,7$ (рис.2) (т.е. с уплощением клеток при температурах близких к физиологическим). Такое уменьшение прослеживается не для всех доноров, поскольку фракция клеток со средним индексом сферичности в области температур $>25^\circ\text{C}$ одновременно пополняется за счет клеток из левого крыла распределения. Это подтверждается падением кривых относительного количества клеток в диапазоне 1-1,3 для некоторых доноров и усредненной кривой для этого диапазона (рис1).

Несмотря на индивидуальный характер кривых плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности, усредненные температурные зависимости относительного количества клеток в отдельных диапазонах индексов сферичности (рис.1-3) в целом повторяют таковые, полученные для индивидуальных распределений. Это свидетельствует об общем характере полученных закономерностей. Таким образом, результаты, полученные методом определения распределения эритроцитов по индексу сферичности, свидетельствуют о температурозависимых изменениях состояния мембран эритроцитов, отражающихся на их форме. Особенно существенные изменения наблюдаются в области температур 15–8°C. Считается, что именно в этой области температур (при температурах $>0^\circ\text{C}$) происходят самые масштабные изменения состояния мембран эритроцитов [1,5-9].

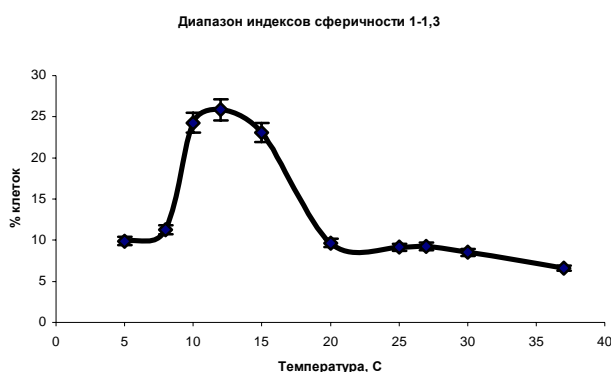


Рис. 1 Зависимость относительного количества клеток в диапазоне индексов сферичности 1 – 1,3 от температуры

Нами была предпринята попытка подтвердить полученные результаты микроскопическим методом. Хотя использованный нами метод определения распределения эритроцитов по индексу сферичности является более чувствительным и регистрирует даже незначительные изменения формы и связанные с этим изменения индекса сферичности, мы предположили, что резкое увеличение количества клеток с

малым индексом сферичности при температурах ниже 15°C , наблюдаемое на кривых распределения, можно зарегистрировать и методом световой микроскопии. При разведении клеток плазмой вначале разрозненные эритроциты в процессе наблюдения постепенно собирались в монетные столбики. Монетные столбики сохранялись вплоть до температуры 16°C (рис. 4А). При достижении температуры 15°C резко изменилась картина в поле микроскопа: клетки пришли в движение, разрушились монетные столбики, часть клеток утратила дискоидную форму (рис. 4В). Однако через некоторое время (≈ 1 мин) клетки вновь начали складываться в монетные столбики (рис. 4С) и при температуре 5°C картина почти не отличалась от таковой при 16°C , за исключением одиночных сферостоматоцитов и сфероцитов (рис. 4D).

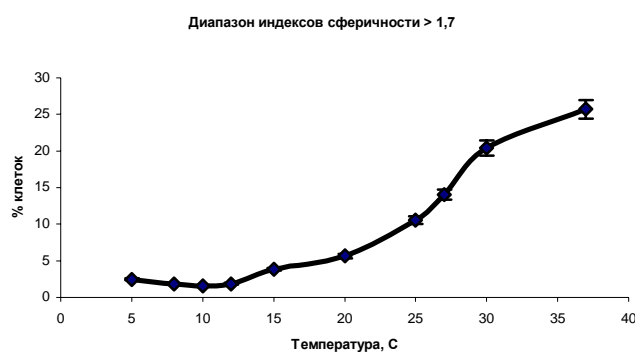


Рис. 2 Зависимость относительного количества клеток в диапазоне индексов сферичности $>1,7$ от температуры

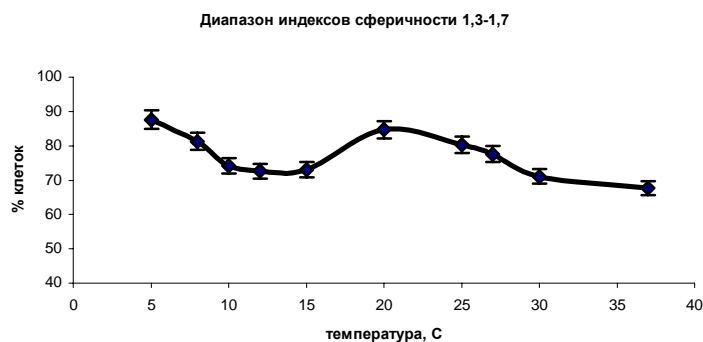


Рис. 3 Зависимость относительного количества клеток в диапазоне индексов сферичности 1,3 – 1,7 от температуры

Полученные при микроскопическом исследовании результаты хорошо согласуются с данными метода определения распределения эритроцитов по индексу сферичности. Разрушение монетных столбиков и утрата дискоидной формы частью клеток совпадает с ростом количества клеток с малым индексом сферичности при 15°C (рис. 1). Также полученные результаты хорошо согласуются с данными о температурной зависимости проницаемости эритроцитов человека для криопротекторов [9]. Именно в области $15-12^{\circ}\text{C}$ наблюдается падение энергии активации и больший разброс результатов. Такая же нестабильность и разброс результатов наблюдались в этом интервале температур при исследовании температурной зависимости времени обмена молекул воды эритроцитами [6].

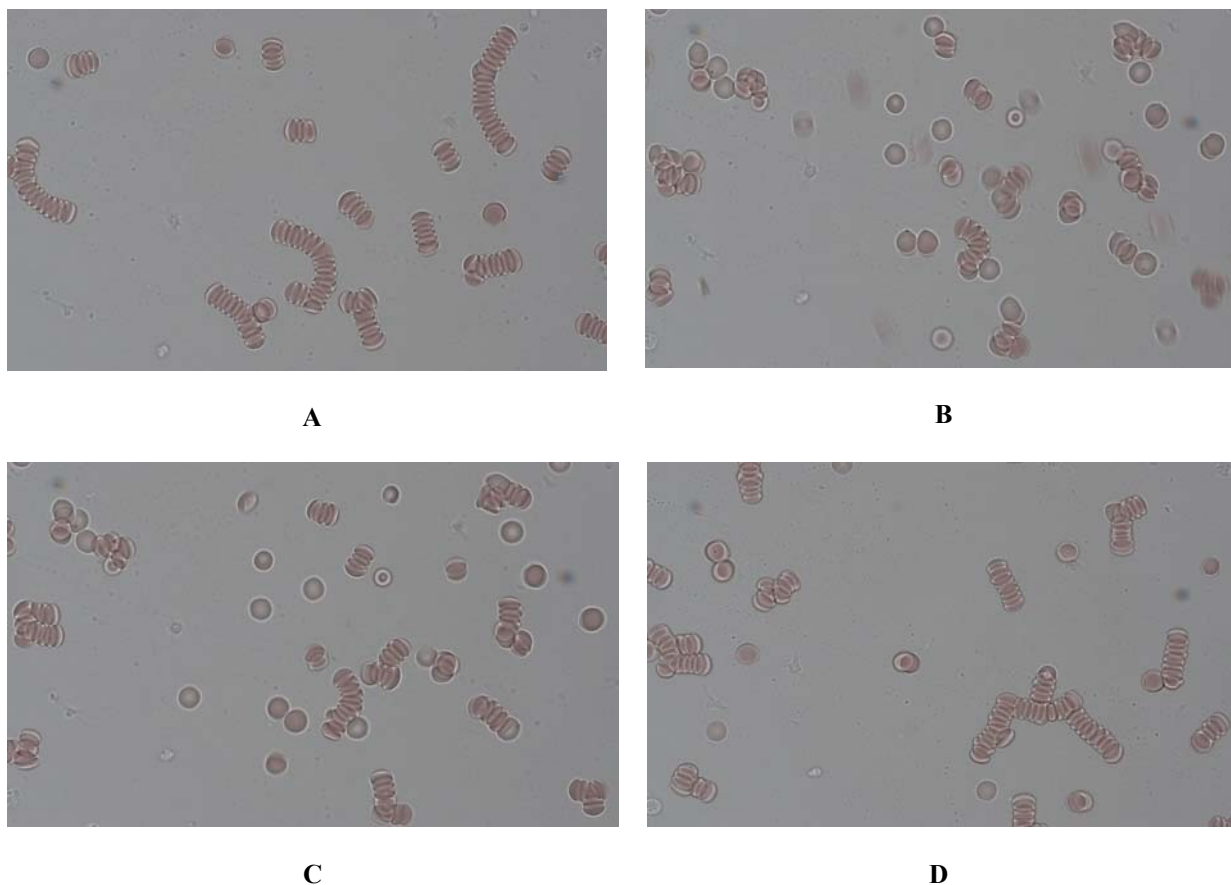


Рис. 4 Микрофотографии эритроцитов человека: **А** - 16°C, время 16-43; **В** - 15°C, время 16-49; **С** - 15°C, время 16-50; **Д** - 5°C, время 18-05.

Наблюдаемый нами при микроскопическом исследовании эффект температуры на эритроциты можно объяснить, исходя из следующих представлений. По-видимому, в зоне структурно-фазового перехода при 15°C в мембране эритроцита изменяется соотношение между площадями внешнего и внутреннего монослоев мембраны, например, за счет погружения белков конической формы вглубь бислоя [12]. При этом отношение площади поверхности внешнего монослоя к площади поверхности внутреннего монослоя мембраны увеличивается. В соответствии с гипотезой бислойной пары [22] это приводит к быстро протекающему образованию стоматоцитов путем зеркального выпучивания одной из лунок эритроцита относительно касательной плоскости к боковой поверхности эритроцита [23]. Известно, что монетные столбики образуются за счет мостиковых связей между внешними поверхностями соседних эритроцитов, которые связывают мембраны, противодействуя силам электрического отталкивания. Мостиковая сила агрегации в расчете на единицу площади контактирующих поверхностей составляет 10^{-2} Н/м² и связь между клетками легко разрывается даже в небольших сдвиговых потоках [24]. Поэтому, можно предположить, что силы отталкивания, возникающие при мгновенном переходе “дискоцит–стоматоцит”, достаточны для распада монетных столбиков.

ВЫВОДЫ

1. Плотность распределения эритроцитов по индексу сферичности изменяется с температурой. Наиболее резко возрастает доля клеток с малым индексом

- сферичности в области температур 15-8°C с максимумом при температурах 12 – 10°C, что соответствует появлению и росту на кривых плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности дополнительного максимума.
2. Плотность клеток в диапазоне больших индексов сферичности ($>1,7$) уменьшается при снижении температуры ниже физиологической (37°C) и принимает значения, как правило, менее 5% при температурах ниже 20°C.
 3. При достижении температуры 15°C часть клеток резко изменяет свою форму путем перехода “дискоцит–стоматоцит”, что приводит к мгновенному разрушению сформировавшихся монетных столбиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черницкий Е. А., Воробей А. Б. Структура и функция эритроцитарных мембран. – Минск: Наука и техника, 1981.- 243 с.
2. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах.- К.:Наукова думка, 1988-205с.
3. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.-К.: Наук.думка, 1982.-256 с.
4. А.М. Белоус. Роль белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток // Криобиология. – 1990. – № 3. – с. 3 – 12.
5. Е.А. Черницкий, А.В. Воробей, С.В. Конев. Термические переходы в эритроцитарных мембранах, выявляемые по проницаемости их к АНС/Биофизика,1978, том 23, вып. 1, с.80-84.
6. Гордиенко О.И., Емец Б.Г., Жилиякова Т.А., Шейкин В.И. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой// Биологические мембраны-1985-2, 3.-с. 310-314
7. Л.В. Цымбал, В.А. Моисеев. Исследование термоиндуцированных структурных изменений мембран эритроцитов методом спиновых зондов // Биол. мембраны,1985, том 2, № 2, с. 190-194.
8. Л.В. Цымбал, И.И. Гаврилова, В.А. Моисеев. Влияние температуры и криопротекторов на структурно-функциональное состояние эритроцитов зрелого организма и плода человека // Криобиология, 1988-3, 27-31.
9. Гордиенко О.И. Влияние температуры на проницаемость мембран эритроцитов человека для 1,2-пропандиола та диметилсульфоксиду // Проблемы криобиологии-2003-1-с. 38-45.
10. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. -Киев: Наук. думка, 1994.-143 с.
11. Маршелл Э. Биофизическая химия: В 2 т.: Пер. с англ/М.: Мир, 1981.-т.1.-360 с.
12. Thomas Betz et al. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells // Bioelectrochemistry 70 (2007) 122-126.
13. Gordienko O.I., Gordienko Yu.E, Makedonska V.O. Estimation of erythrocyte population state by spherical index distribution // Bioelectrochemistry. Special Issue:-Bioelectrochemistry of red blood cells.-2004.-62.-2.-P.119-122.
14. Гордиенко О.И., Македонська В.О., Коваленко І.Ф., Алексеева Л.І. Щільність імовірності розподілу клітин за індексом сферичності в популяціях еритроцитів хворих на гіпо- та гіпертиреоз//Вісн.Харк.ун-ту.-2001.-528.- Біофіз.вісник, вип.2(9).-С.67-70.
15. Гордиенко О.И., Гордиенко Е.О., Алексеева Л.И., Коваленко І.Ф. Оцінка стану популяції еритроцитів людини по їх розподілу за індексом сферичності//Доповіді НАНУ.-2002.-10.-С.172-177.
16. Алексеева Л.И. Динамика изменения плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности в гипертонических растворах хлорида натрия: дис. ... кандидата биол. наук: 03.00.19 / Х., 2007. – 142 с.
17. Алексеева Л.И., Коваленко С.Є., Холодный В.С., Гордиенко О.И. Витік калію і щільність розподілу за індексом сферичності в популяціях еритроцитів при експозиції в гіпертонічних розчинах хлориду натрію // Проблемы криобиологии-2005-15-с.159-172.
18. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко І.Ф., Розанов Л.Ф. Экспериментальное изучение кинетики гипотонического и кислотного гемолиза эритроцитов человека методом малоуглового рассеяния // Проблемы криобиологии.-1994.-№1.- с. 32-38.
19. Пат. 47910А (Україна) МПК⁷ G01N33/49. Спосіб визначення щільності ймовірності розподілу еритроцитів за індексом сферичності./Гордиенко Е.О., Гордиенко О.И., Гордиенко Ю.Є., Коваленко І.Ф., Алексеева Л.И.//2002.- Бюл.№7.
20. Гордиенко Е.О., Гордиенко О.И, Коваленко І.Ф., Паніна Ю.Є., Алексеев О.О. Фізико-математичний аналіз та експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові людини за індексом сферичності // Біофізичний вісник. – 2000. – Вип. 6 (1). – с. 75-78.
21. Гордиенко О.И. Оцінка коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембран еритроцитів за зсувом кривої розподілу еритроцитів за індексом сферичності//Вісн.Харк.ун-ту.-2003.-№606.-Біофіз. вісник.-вип.2(13).-С.78-81.
22. Sheetz M.P., Singer S.J. Biological membranes as a bilayer couples. A mechanism of drug erythrocyte interaction// Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.-1974, V.71.-P.4457-4461.
23. Погорелов А.В. Изгибание поверхностей и устойчивость оболочек. М.:Наука.-1986.-96 с.
24. Н. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрина Н.Х. Реология крови. М.:Медицина.- 1982.-272 с.