

УДК 577.352:612.111.57.086.2.043

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ СРЕДЕ ЭЛЕКТРОЛИТА.

1. МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

Л.Г. Кулешова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61015, Харьков, ул. Перевозская, 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 привесмбранных слоев (гикокаликса) и элиминацией во внеклеточную среду гликопротеинов.

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

Технологический процесс подготовки клеточных суспензий к криоконсервации предполагает целый комплекс процедур, к которым клетки оказываются весьма чувствительными. Первичным звеном, прежде всего отвечающим на внешнее воздействие, является плазматическая мембрана. Одной из стереотипных реакций биомембран считается изменение структурно-функциональных свойств липидного бислоя, следствием чего могут быть разносторонние сдвиги в активности мембранных белков и клетки в целом. Именно перестройка липидного бислоя мембран и изменение их фазового состояния приводит либо к адаптации клетки к внешнему воздействию, либо к ее повреждению [1].

В работе [2] показано, что на этапе предобработки эритроцитов человека криозащитным раствором ПЭГ-1500 уже через 5 мин в среде обнаруживается белок, экстрагируемый из мембран клеток.

На этапе замораживания клеточных суспензий в зоне эвтектических температур клетки подвергаются действию высококонцентрированных солей. Установлено, что при инкубации эритроцитов человека в неизотонических растворах хлорида натрия отмечается существенная гипертоническая устойчивость клеток [3]. Эритроциты практически не разрушаются в течение 60 мин в растворах, содержащих хлорид натрия до 7,5%, что в несколько раз превышает порог изотоничности. [4]. В 4,0М растворе NaCl лизис клеток развивается в течение 2 мин и достигает уровня 90% [5].

Представляло интерес проанализировать морфологический ответ и состояние поверхности эритроцитов человека в гипертонической среде электролита NaCl при комнатной температуре.

Объектом исследования служили эритроциты донорской крови человека, консервированные в среде "Глюгицир". Исследован концентрационный ряд хлорида натрия: 0,34М, 0,85М, 1,28М, 1,4М, 2,3М и 3,42М. Осмолярность растворов контролировали на микроосмометре ОМКА 1Ц-01.

Изучение морфологического ответа эритроцитов донорской крови человека на воздействие гипертонических растворов NaCl проведены методом оптической микроскопии с использованием светового микроскопа МБИ-15У и инвертированного фазово-контрастного микроскопа МБИ-13 с фотографической регистрацией процесса.

Реакцию клеток проводили непосредственно под микроскопом в светлом поле и в фазовом контрасте. С этой целью на покровное стекло наносили каплю крови, к которой с помощью микропипетки добавляли превосходящую по объему аликвоту исследуемого реагента. Во избежание подсыхания препарат покрывали вторым покровным стеклом, в результате чего эритроциты равномерно распределялись во взвешенном состоянии в слое толщиной 10-15 мкм, что позволяло всесторонне фиксировать их форму, начиная с момента реакции [6]. В морфологической оценке особенностей формы и поверхностной архитектоники эритроцитов использовали общепринятую классификацию, приведенную в [7].

Анализ морфоэритрограмм показал следующее. Эритроциты свежей донорской крови человека представляют собой двояковогнутые диски (рис.1., рис.2.1.). О функциональной полноценности клеток свидетельствует их способность к агрегации. В течение 4-10сек (быстрая фаза агрегации) образуются довольно длинные линейные столбики. Во второй фазе агрегации происходит укрупнение агрегатов и формирование разветвленных эритроцитарных цепей.

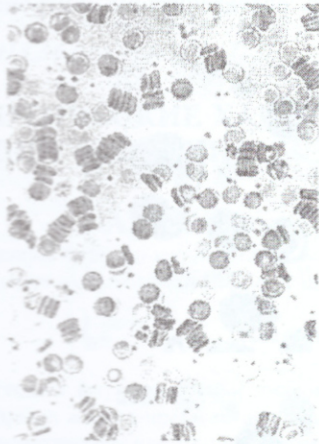


Рис.1. Морфоэритрограмма донорской крови человека.
(светлое поле, норма).
Увеличение при съемке $\times 200$.

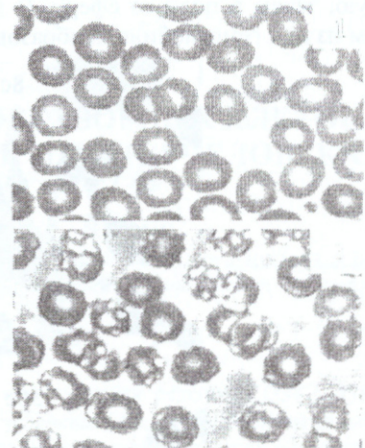


Рис.2. Трансформация эритроцитов донорской крови человека в 0,34М растворе NaCl:
1 – норма; 2- через 16 с
(фазово-контрастная микроскопия).
Увеличение при печати $\times 1458$.

При введении в суспензию клеток 0,34М (712мОсм/л) раствора NaCl морфологическая картина существенно не изменялась. Развивался незначительный акантоцитоз (рис.2.2). Реакция эритроцитов на введение 0,85М и 1,28М NaCl (соответственно 1550мОсм/л и 2512 мОсм/л сопровождалась быстрой дегидратацией, при которой клетки принимали складчатую форму, а их мембрана теряла регулярность. В течение экспозиции деформация эритроцитов сохранялась (рис.3.1, 3.2). В поле зрения наблюдались единичные эритроциты в предгемолитической форме (сферэхиноцитоз).

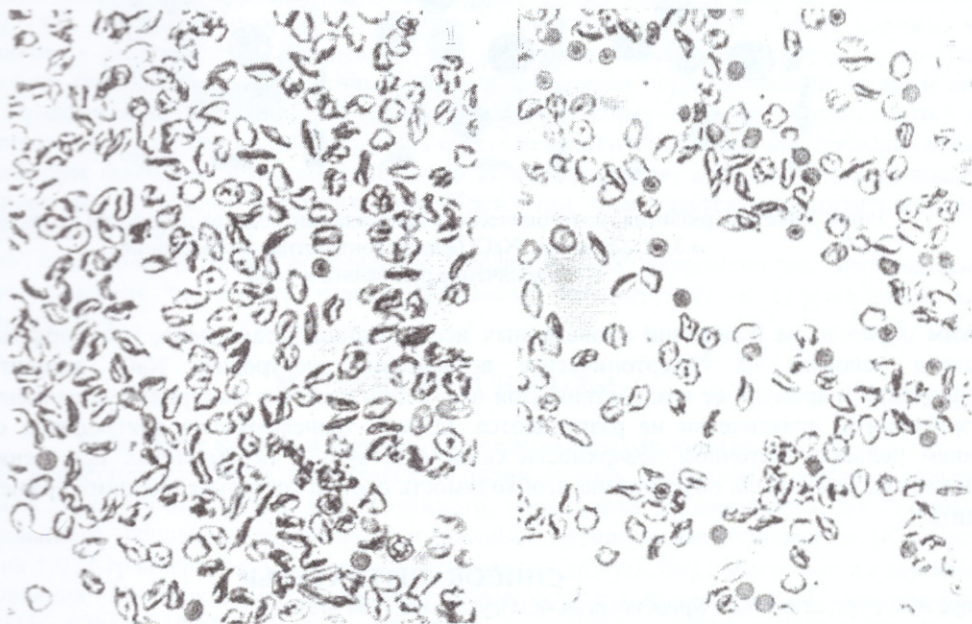


Рис.3. Трансформация эритроцитов донорской крови человека в 1,28М растворе NaCl
1 – 2 минуты реакции; 2 – через 55 минут (светлое поле).
Увеличение при съемке $\times 160$.

Взаимодействие эритроцитов с 1,4М и 2,3М (соответственно 2600мОсм/л и 4250мОсм/л) растворами NaCl характеризовалось стабилизацией обезвоженного состояния с последующим незначительным отсроченным гипертоническим гемолизом. При введении в суспензию клеток 3,42М раствора NaCl (более 4500мОсм/л) деформированные при обезвоживании эритроциты через 40 сек резко трансформировались в

неполную, затем в полную сферу. В дальнейшем наблюдалось обесцвечивание эритроцитов, связанное с выходом из них гемоглобина, и образование теней (рис.4).

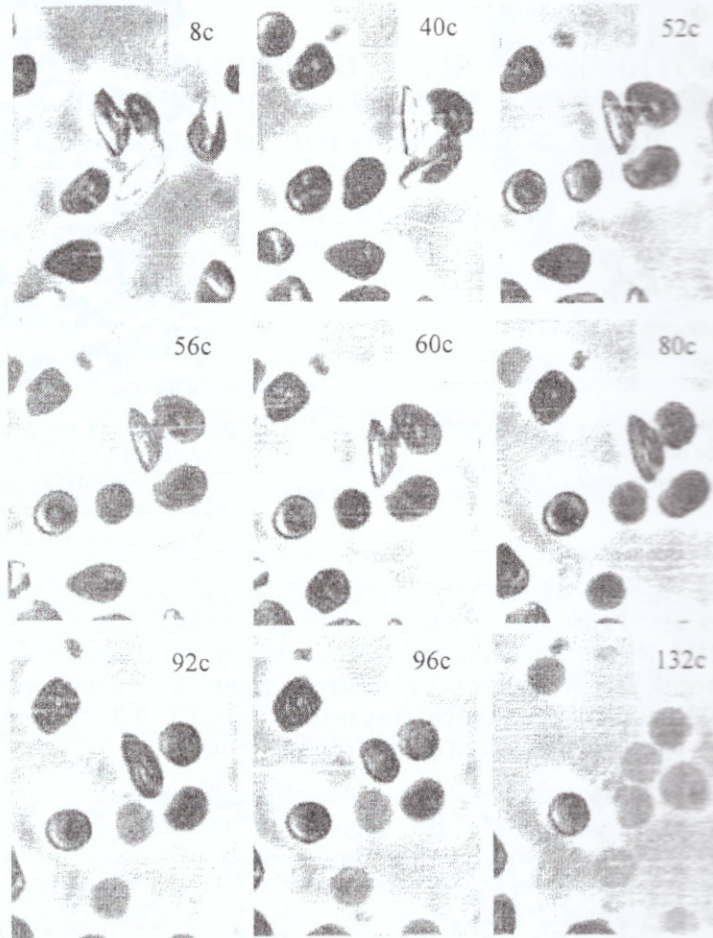


Рис.4. Кинетика развития гипертонического гемолиза эритроцитов донорской крови человека в 3,42М растворе NaCl (фазово-контрастная микроскопия). Увеличение при печати x 1458

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что морфологический ответ эритроцитов человека на гипертоническое воздействие электролита NaCl зависит от величины гипертоничности и времени ее воздействия. При инкубации клеток в электролите с концентрацией NaCl до 1,28М эритроциты практически не разрушаются. Однако трансформация эритроцитов с существенным изменением рельефа клеточной поверхности свидетельствует о несомненных нарушениях в структуре мембран клеток, чем и была обусловлена необходимость оценки состояния внешних прамембранных слоев эритроцита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология.-К.:Наук.думка,1994.-431с.
2. Кучеренко Ю.В., Розанова Е.Д.//Проблемы кробиологии.-1999.-№4.-С.21-23.
3. Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф.//Кробиология и кробиомедицина.-1980.-№7.-С.40-44.
4. Голованов М.В.//Гематология и трансфузиология.-1991.-№7.-С.39-40.
5. Кулешова Л.Г., Орлова Н.В., Шлакова Н.М.//Проблемы кробиологии.-2001.-№1.-С.8-14.
6. Кулешова Л.Г.//Проблемы кробиологии.-1988.-№1.-С.48-52.
7. Bessis M. Living Blood Cells and their Ultrastructure.-Berlin, Heidelberg, New-York.-1973.-767p.