

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ПОДВИЖНОСТЬ И МОРФОМЕТРИЯ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС ПРИ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

УДК 576.31:612.111:616.45.001.6—001.1

Поступила 11.05.2010 г.



В.Н. Крылов, д.б.н., профессор, зав. кафедрой физиологии и биохимии человека и животных¹;

А.В. Дерюгина, к.б.н., доцент кафедры физиологии и биохимии человека и животных¹;

С.Н. Плескова, д.б.н., доцент кафедры биотехнологии, физической и аналитической химии²

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород;

²Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева, Н. Новгород

Цель работы — изучение взаимосвязи изменения электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) и их морфометрических показателей при моделировании стресса у крыс.

Материалы и методы. Анализ изменения ЭФПЭ и их морфометрических характеристик при развитии стресс-реакции у крыс, смоделированной с использованием разных стресс-агентов, выполнен с помощью сканирующей зондовой микроскопии.

Результаты и обсуждение. Установлено, что снижение ЭФПЭ при стрессе нивелируется блокадой адренорецепторов и сопровождается увеличением сферичности эритроцитов.

Ключевые слова: электрофоретическая подвижность эритроцитов, сканирующая зондовая микроскопия, адренореактивность.

English

Electrophoretic mobility and morphometry of the rat erythrocytes at the stress effects

V.N. Krylov, B.D., professor, head of the human and animal physiology and biochemistry chair¹;

A.V. Deryugina, c.b.s., assistant professor of the human and animal physiology and biochemistry chair¹;

S.N. Pleskova, B.D., assistant professor of the biotechnology, physical and analytical chemistry chair²

¹N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod state university, N. Novgorod;

²R.E. Alexeev Nizhny Novgorod state technical university, N. Novgorod

Aim of work is a study of the erythrocyte electrophoretic mobility (EePhM) change intercommunication and their morphometric values at a stress simulation in rats.

Materials and methods. An analysis of the EePhM change and their morphometric characteristics at a stress-reaction development in rats, simulated with a use of different stress-agents, is made with a use of a scanning probe microscopy.

Results and discussion. It is established, that the EePhM decrease at a stress is leveled by the adrenoceptor block and is accompanied with the erythrocyte sphere increase.

Key words: electrophoretic mobility of erythrocytes, scanning probe microscopy, adrenoactivity.

Для контактов: Крылов Василий Николаевич, тел. раб. 8(831)465-23-03; e-mail: kfg@bio.unn.ru.

Выявление типовых реакций систем организма при разных патологических процессах позволит не только понять общезакономерности развития и течения альтерационного процесса в организме, но и диагностировать его на ранних этапах. Одной из таких систем может быть кровь, состояние которой можно определить с помощью анализа электрофоретической подвижности ее форменных элементов, в частности эритроцитов (ЭФПЭ). Установлено, что регистрация перемещения клеток крови в электрическом поле позволяет оценить не только их электрокинетический потенциал и, следовательно, морфофункциональное состояние мембран, но и гомеостаз других систем организма. Так, снижение отрицательного заряда и, следовательно, ЭФПЭ коррелирует с ускорением процесса агрегации эритроцитов, свидетельствуя о нарушении реологических свойств крови — не только об изменении вязкости и структуры, но и об иницировании процесса тромбообразования [1]. Выявлены определенные корреляции изменения ЭФПЭ крови у больных при различных видах патологии [2—4]. Более того, анализ литературных данных свидетельствует об однообразном изменении подвижности эритроцитов — ее снижении — при самых разных заболеваниях: у пациентов, страдающих гепатитом [4], при инфекционных и опухолевых процессах [5], у больных хронической и подростковой гипопластической анемией [6], при физических нагрузках и психическом напряжении [7]. Это позволяет предположить, что изменение ЭФПЭ является отражением общих закономерностей изменения гомеостаза организма.

Мы полагаем, что однонаправленность изменения ЭФПЭ при различных экстремальных воздействиях и патологии, проявляющаяся ее снижением, является общей неспецифической реакцией организма. В связи с тем, что в основе многих патологических процессов и чрезвычайных раздражителей лежит развитие разной степени выраженности стресса [8], можно предположить, что изменение ЭФПЭ является ранним критерием стресс-реакции. Данное положение доказано нами ранее в опытах на животных: изменение ЭФПЭ у крыс при стрессовых воздействиях носит однотипный двухфазный характер — первоначальное снижение с последующим повышением и восстановлением по мере отмены стресса [9, 10].

Таким образом, изменение ЭФПЭ может служить убедительным маркером идущего в организме патологического процесса. Однако для большего доверия к предлагаемому методу необходимо выявить механизмы, через которые реализуется это изменение. Учитывая, что ЭФПЭ определяется суммарным зарядом их мембраны, зависящим от соотношения мембранных структур, можно предположить, что рассмотренные типовые изменения ЭФПЭ связаны с такими же типовыми структурными перестройками мембран эритроцитов, приводящими к изменению их морфологии. С другой стороны, изменения структуры мембраны могут быть следствием взаимодействия ее рецепторов со стресс-реализующими агентами — катехоламинами и кортикостероидами. Ранее нами было установлено, что

в условиях *in vitro* обработка эритроцитов адреналином вызывает четкое снижение ЭФПЭ [9].

Цель работы — изучение взаимосвязи изменения электрофоретической подвижности эритроцитов и их морфометрических показателей при моделировании стресса у крыс.

Материалы и методы. Исследование проведено на 50 нелинейных белых крысах-самках массой 200—250 г. Содержание животных соответствовало Правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Крыс кормили натуральными и брикетированными кормами в соответствии с утвержденными нормами. Животные прошли карантин и акклиматизацию в условиях вивария в течение 14 сут.

Крысы были разделены на 5 групп. Для моделирования стресс-реакции 1-й группе животных в качестве стресс-агента внутрибрюшинно вводили пчелиный яд (0,1 мг/кг); 4-й группе — внутрибрюшинно адреналин на фоне блокатора β -адренорецепторов (пропранолол, 0,2 мг/кг); 2-ю группу составили животные после внутрибрюшинного введения пчелиного яда на фоне пропранолола (спустя 10 мин после инъекции пропранолола); 3-я группа — внутрибрюшинное введение адреналина гидрохлорида в дозе 0,1 мг/кг; 5-я группа — внутрибрюшинное введение 0,9% хлорида натрия (контроль).

Забор крови производили из подъязычной вены до и через 15, 60, 120, 180 мин после введения веществ. Исследовали динамику изменения ЭФПЭ и морфологию эритроцитов. Используемые в опытах эритроциты трижды отмывали 0,85% раствором хлористого натрия, центрифугируя 10 мин при 1500 об./мин. Измерение ЭФПЭ проводили методом микроэлектрофореза [11], регистрируя время прохождения эритроцитами в микрокамере расстояния 10 мкм в трис-HCl-буфере с рН-7,4 при силе тока 10 мА.

Морфологию эритроцитов оценивали методом сканирующей зондовой микроскопии, который позволяет исследовать поверхность биологических объектов с высокой степенью разрешения. Мазки для исследования готовили по методике [12]. Для фиксации мазков использовали 2% глутаровый альдегид в течение 60 мин [13]. Оценку формы каждого эритроцита делали по нескольким наиболее характерным точкам трех сечений через центр клетки (два — диагональных и одно — в направлении линии сканирования). Для исследования поверхности клеток применяли сканирующий зондовый микроскоп Solver Bio (NT MDT, Россия). Использовались кремневые зонды с жесткостью 0,03 Н/м, радиус закругления кончика зонда составлял 20 нм. Фиксированные препараты исследовали в контактном и неконтактном режимах сканирования.

Полученные данные были обработаны с помощью пакетов прикладных программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel с использованием методов одномерной статистики.

Результаты и обсуждение. В процессе экспериментов установлено, что введение животным стресс-агента пчелиного яда приводило к типичной двухфазной реакции ЭФПЭ — первоначальному снижению с последую-

Таблица 1

Динамика изменения электрофоретической подвижности эритроцитов крови крыс, мкм·см·В⁻¹·с⁻¹

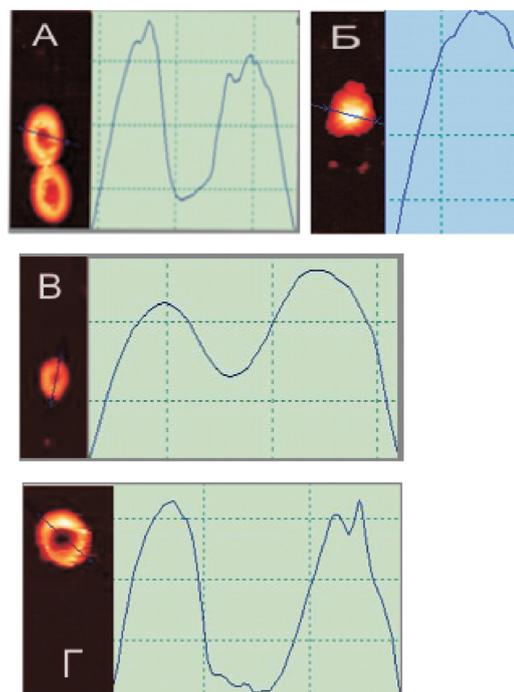
Время, мин	Физиологический раствор (контроль)	Пчелиный яд	β-адреноблокатор + пчелиный яд	Адреналин
15	1,24±0,02	1,14±0,03**	1,29±0,03	1,06±0,09**
60	1,19±0,02	1,24±0,02*	1,43±0,02*	0,99±0,08**
120	1,23±0,04	1,43±0,03**	1,67±0,04*	0,92±0,08**
180	1,30±0,02	1,41±0,03**	1,49±0,02*	0,93±0,07**

Примечание: * — статистически значимая разница показателей с контрольной группой (p<0,05); + — с группой, в которой яд вводился на фоне β-адреноблокатора (p<0,05). Уровень ЭФПЭ интактных животных составил 1,32±0,02 мкм·см·В⁻¹·с⁻¹.

щим повышением (табл. 1), адреналин вызывал только снижение ЭФПЭ. Введение того и другого агентов на фоне блокады β-адренорецепторов пропранололом уменьшало или полностью отменяло реакцию снижения ЭФПЭ, но не изменяло фазу повышения ЭФПЭ в ответ на введение пчелиного яда.

Следует отметить, что при стресс-реакциях концентрация адреналина в плазме возрастает в десятки раз уже через несколько минут [14], при внутрибрюшинном введении собакам пчелиного яда — через 1—5 мин [15]. Снижение ЭФПЭ в такой ситуации может иметь следующий механизм: повышенный уровень катехоламинов и адренореактивность эритроцитов приводят к ингибированию Na,K-АТФ-азы [16] и, соответственно, к накоплению кальция в цитозоле эритроцита, меняющего характер межмолекулярных взаимодействий. Установлено, что адреналин модифицирует состав электрофоретических полос эритроцитарной мембраны, снижая относительное содержание полос 3, 6 и 7 и увеличивая содержание белка полосы 2,3. Активация адренорецепторов вызывает повышение уровня цАМФ в клетке и стимулирует протеинкиназы, которые в свою очередь вызывают фосфорилирование белков полос 3; 4,1; 4,9 и спектрина, анкирина, аддуцина. Результатом увеличения уровня фосфорилирования белковых компонентов является уменьшение сродства между их молекулами [17]. Полученные данные свидетельствуют, что механизм снижения ЭФПЭ связан с действием катехоламинов на мембрану эритроцитов, которые, в свою очередь, определяют модификацию морфофункциональной организации клеток. Это положение было подтверждено при анализе морфометрических характеристик эритроцитов.

Результаты исследований показали, что у изученных образцов крови интактных животных диаметр клетки эритроцитов составил 7,40±0,09 мкм, толщина в области краев клетки — 1,33±0,05 мкм. При сравнении АСМ-изображений нормальных эритроцитов и эритроцитов, полученных после исследуемых видов воздействия, были выявлены изменения размеров клеток, а также топографии и рельефа поверхности мембраны эритроцитов (см. рисунок). После стрессового воздействия диаметр клеток и толщина в области краев уменьшались, а размер центральной зоны увеличивался



Морфология эритроцитов крови крыс после внутрибрюшинного введения исследуемых веществ: А — физиологического раствора; Б — адреналина; В — пчелиного яда; Г — пчелиного яда на фоне пропранолола

(табл. 2). При этом действие адреналина вызывало наибольший рост сферичности клеток, регистрируемый до конца эксперимента. Внутрибрюшинное введение пчелиного яда вызывало обратимые изменения морфологии клеток. При этом на 15-й минуте регистрировалось увеличение сферичности клеток, однако менее выраженное по сравнению с действием адреналина. Пчелиный яд на фоне β-адреноблокатора в этот период не вызывал достоверного изменения формы клеток по сравнению с интактными образцами.

Следует отметить, что выявленные изменения морфометрических параметров эритроцитов, по всей видимости, являются стереотипной реакцией клетки на повышенные концентрации в крови катехоламинов. Сопоставление данных изменения ЭФПЭ с их морфо-

Таблица 2

Динамика изменения морфометрических показателей эритроцитов крови крыс через 15 мин после введения веществ, мкм

Группы животных	Диаметр клеток	Периферическая зона	Центральная зона
Интактные	7,40±0,09	1,33±0,05	0,29±0,10
Физиологический раствор	7,14±0,08	1,29±0,09	0,27±0,09
Адреналин	4,45±0,08*	0,06±0,02*	2,36±0,04*
Пчелиный яд	5,26±0,09*	0,90±0,08*	0,63 ±0,08*
Пчелиный яд на фоне β-адреноблокатора	6,57±0,08*	1,22±0,09	0,08±0,02*

* — статистически значимое различие значений с интактной группой, p<0,05.

функциональными характеристиками позволило установить связь степени снижения ЭФПЭ с увеличением сферичности клеток. Мы полагаем, что при действии адреналина происходит перестройка молекулярной архитектоники поверхности эритроцита, приводящая к перераспределению эффективного отрицательного заряда. Известно, что распределение заряда на поверхности мембраны неравномерно: более высокая его плотность — на выпуклых сторонах [18]. Выявленное изменение соотношения «диаметр—толщина клетки» при увеличении адренореактивности клеток указывает на снижение жесткости цитоскелета и «частичное» распределение олигосахаридов гликокаликса [19].

Заключение. Снижение электрофоретической подвижности эритроцитов при стресс-реакции организма животных связано с адренореактивностью эритроцитов и их морфологической перестройкой. Указанная морфофункциональная перестройка клеток крови может быть типичной для разных видов стресса и, соответственно, служить в качестве раннего и значимого показателя развития патологического процесса в организме и степени вовлеченности в него стрессреализующих систем.

НИР проведена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009—2013 годы». ГК №П604.

Литература

1. Stoltz J.F., Donner M. Red blood cell aggregation: measurements and clinical application. *Jurk j of med Sciences* 1991; 15(1): 26—32.
2. Матюшичев В.Б., Шамратова В.Г., Ахунова А.Р. Соотнесенность электрофоретической подвижности эритроцитов крови человека с уровнем гемоглобина в норме и при почечной патологии. *Физиол человека* 1997; 23(4): 110—113.
3. Матюшичев А.Б., Шамратова В.Г. Картина электрофоретической подвижности эритроцитов крови при

больших физических нагрузках и психическом напряжении. *Физиол человека* 1995; 21(4): 123—128.

4. Матюшичев В.Б., Шамратова В.Г., Гуцаева Д.Р. Связь кислотно-щелочного состояния крови с электрофоретической подвижностью эритроцитов при патологии печени. *Цитология* 1995; 37(5/6): 444—448.
5. Матюшичев В.Б., Шамратова В.Г. Изменение электрофоретической подвижности эритроцитов при онкопатологии. *Биофизика* 1996; 41(5): 1093—1096.
6. Козинец Г.И., Борзова Л.В., Кульман Р.А. Поверхностный заряд клеток крови и некоторые аспекты его биологической роли. *Лаб дело* 1975; 5: 284—289.
7. Бароненко В.А. Эритроцит — мишень для стресса. *Наука в СССР* 1988; 30(1): 5—18.
8. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Кайгородова Е.В., Часовских Н.Ю., Старикова Е.Г. Митогеноактивированные протеинкиназы JNK и p38 — редокс-зависимые молекулярные мишени нарушения апоптоза при окислительном стрессе. *Успехи физиол наук* 2009; 40(2): 3—11.
9. Крылов В.Н., Густов А.В., Дерюгина А.В. Электрофоретическая подвижность эритроцитов и стресс. *Физиология человека* 1998; 24(6): 108—111.
10. Крылов В.Н., Дерюгина А.В. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов при стрессовых воздействиях. *Бюлл эксп биол и мед* 2005; 136(4): 364—366.
11. Харамоненко С.С., Ракитянская А.А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии. Минск: Беларусь; 1974; 143 с.
12. Pleskova S.N., Zaslavzkaia M.I., Guschina Yu.Yu., Koksharov I.A., Erastova Yu.G. Morphological investigation of human blood neutrophil phagocytosis in vitro by AFM. *Phys Low-Dim Struct* 2001; 3/4: 249—260.
13. Dufrene Y.F. Application of atomic force microscopy to microbial surface: from reconstituted cell surface layers to living cell. *Micron* 2001; 32: 153—165.
14. Тюрмина О.А., Кузьмин А.И., Медведев О.С. Дифференцированная активация симпатической нервной системы и выброса катехоламинов при нейрогликопении у бодрствующих крыс. *Бюл эксперим биол и мед* 1997; 124(11): 509—512.
15. Vick J.A., Shipman W.H., Brooks R.B., Hasset C.C. Beta-adrenergic and antiarythmic effects of a compound of bee venom. *Amer bee J* 1972; 112: 288—293.
16. Маслова М.Н. Молекулярные механизмы стресса. *Российский физиол журн им. И.М. Сеченова* 2005; 91(11): 1320—1328.
17. Сторожок С.А., Ссаников А.Г., Белкин А.В. Зависимость стабильности деформабельности мембран эритроцитов от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета. *Научный вестник ТГУ* 2009; 3: 3—10.
18. Чижевский А.Л. Биохимические механизмы реакции оседания эритроцитов. Новосибирск: Наука; 1980; 178 с.
19. Гуцина Ю.Ю., Плескова С.Н., Преснухина Н.Г., Крылов В.Н., Гуцина И.А. Морфометрический СЗМ-анализ клеток крови в норме и при альтерациях. *Электромагнитные поля в биологии и медицине* 2006; 24—33.