

УЧАСТИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ЦИТОСКЕЛЕТА В РЕГУЛЯЦИИ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НЕЙТРОФИЛОВ И ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Коваленко Е.И., Хозянин О.К., Коваленко Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Функционирование клеток крови в организме ключевым образом зависит от их геометрических и механических характеристик. Процессы активации нейтрофилов – хемотаксис, адгезия, уничтожение инфекционных агентов путем фагоцитоза и при формировании внеклеточных ловушек, как и перемещение эритроцитов в сосудистой системе включают деформацию мембран и изменение соотношения площади поверхности к объему этих клеток, что может сопровождаться изменением механических напряжений поверхности. Целью работы было определить параметры, характеризующие геометрические и механические свойства нейтрофилов и эритроцитов при различных воздействиях на клетки, в частности, при изменении осмолярности среды и действии воспалительных медиаторов, а также установить роль цитоскелета в регуляции механических свойств мембран.

Эритроциты и нейтрофилы изолировали из периферической крови здоровых доноров: нейтрофилы - из образцов крови не позже 3 часов после взятия у донора (свежей крови), эритроциты – из свежей крови и из образцов, хранившихся при минус 4 °С в течение более 2-х суток (старой крови). Процедура изолирования нейтрофилов включала осаждение эритроцитарной массы с высокомолекулярным декстраном, градиентное центрифугирование лейкоцитарной массы с фиколл-триомбрастом, плотностью 1,077 г/см³. Фракции нейтрофилов и эритроцитов отмывали дважды в растворе 0,15 М NaCl. Полученные клетки ресуспензировали в сбалансированном солевом растворе Эрла (рН=7,3, 300 мОсм/л). Затем клетки помещали в водные растворы с различным содержанием NaCl (осмолярность 60-1000 мОсм/л). Геометрические параметры клеток оценивали методом нефелометрии с помощью нефелометров, разработанных на кафедре биофизики БГУ [1]. При нефелометрическом анализе использовали суспензии при парциальном объеме клеток не более 10⁻³. Результаты нефелометрии верифицировали методом световой микроскопии.

Установлено, что в изотонических условиях неактивированные нейтрофилы представляют собой сфериды с диаметром $d=8,4\pm 0,2$ мкм, эритроциты, изолированные из свежей крови, имеют диаметр $d=7,6\pm 0,2$ мкм и толщину $a=2,5\pm 0,2$ мкм (дискоциты), а эритроциты из старой крови

деформированы и могут быть аппроксимированы сфероидом с диаметром $d=4,7\pm 0,2$ мкм.

Выявлено, что нейтрофилы при набухании в гипотонических условиях могут достигать максимального диаметра $\sim 12,5$ мкм (при осмолярности 120 мОсм/л), при этом площадь поверхности нейтрофилов возрастает в ~ 2 раза, а объем – в 3,5 раза, далее клетки разрушаются. Модуль упругости для мембраны нейтрофилов составляет около 1 МПа и при снижении осмолярности до 120 мОсм/л практически не изменяется. На рис. 1 показаны результаты определения коэффициента упругости для интактных нейтрофилов и действия на клетки различных факторов.

Как обнаружено, при действии на нейтрофилы ингибиторов сборки микрофиламентов и микротрубочек (цитохалазина В и колхицина), а также активатора нейтрофилов fMLP площадь поверхности плазматической мембраны и клеточный объем значительно возрастают. Нейтрофилы, подвергнутые действию цитохалазина В, колхицина или fMLP, при осмотическом набухании могут достигать большего объема без разрыва. При этом характер деформации отличается от такового у интактных нейтрофилов, происходит значительное изменение модуля упругости (см. рис. 1).

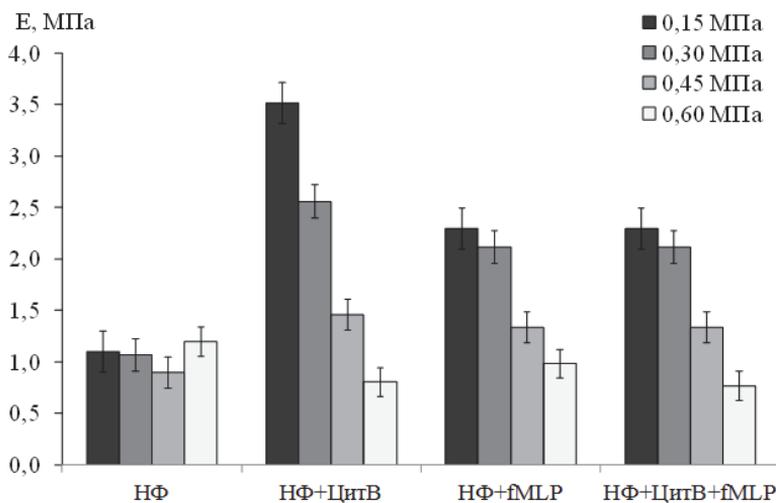


Рис.1. Модуль упругости для нейтрофилов, определенный для различных значений механических напряжений при растяжении клеток (мембран) в гипотонических условиях. НФ – нейтрофилы, ЦитВ – цитохалазин В

Эритроциты при набухании в гипотонических условиях достигают максимального диаметра ~7-8 мкм при 160 мОсм/л, при этом максимальное растяжение мембраны не превышает 40 % (относительно площади мембраны нормального эритроцита дискоцита), при дальнейшем снижении осмолярности эритроциты разрушаются. Модуль упругости для эритроцитов из свежей крови составляет около 2 МПа, тогда как для эритроцитов из старой крови – около 1 МПа (см. рис. 2). Цитохалазин В не влияет на объем эритроцитов и упругие свойства эритроцитарных мембран, что может быть связано с отсутствием необходимости формирования актиновых микрофиламентов в поддержании формы эритроцита и его деформируемости.

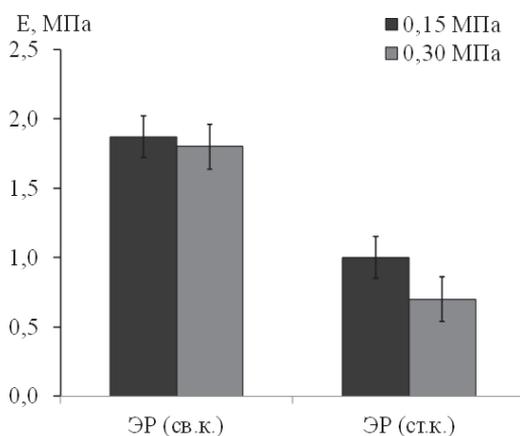


Рис. 2. Модуль Юнга для эритроцитов из свежей крови (ЭР, св.к.) и из старой крови (ЭР, ст.к.) при различных значениях механического напряжения в гипотонических условиях

Таким образом, нейтрофилы и эритроциты значительно отличаются по механическим свойствам и способности к деформации, причем актиновые микрофиламенты и тубулиновые микротрубочки важны в обеспечении определенных упругих свойств нейтрофилов, но не эритроцитов. При истощении эритроцитов в ходе хранения в условиях *in vitro* и при активации нейтрофилов происходит изменение их геометрических и механических свойств.

Литература

1. Investigation of blood cell properties using laser diffractometry and kinetic nephelometry / S.A. Kavalenka, A.I. Kavalenka, V.V. Popov, T.D.L. Nguyen, V.A. Loban / Journal of Physics, 2014, Vol. 541, 012043.

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НЕЙТРОФИЛОВ НА ЭРИТРОЦИТЫ

Коваленко Е.И., Нгуен Тхи Зеу Лен, Коваленко Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Развитие ряда патологий связано с нарушением функционирования клеточного звена иммунитета и изменениями структурно-функциональных свойств клеток крови, в частности, эритроцитов и нейтрофилов [1, 2]. Понимание механизмов взаимодействия клеток при их функционировании, знания особенностей нарушения структурно-функциональных свойств клеток наряду с фундаментальной значимостью имеет важное прикладное значения для диагностики и прогнозирования развития заболеваний, а также для разработки способов терапии. Целью работы было изучить механизмы изменения структурно-функциональных характеристик эритроцитов и нейтрофилов при взаимодействии этих клеток в условиях стимуляции нейтрофилов.

Эритроциты и нейтрофилы изолировали из крови здоровых доноров стандартными методами. Клетки ресуспензировали в сбалансированном солевом растворе Эрла. Кинетические параметры гемолиза эритроцитов оценивали методом нефелометрии. Количество и тип гемоглобина, высвобождаемого при гемолизе, определяли спектрофотометрически. Анализ морфологии клеток проводили методом световой микроскопии.

Установлено, что нейтрофилы, активированные форболовым эфиром РМА или хемоаттрактантом fMLP, приводят к повреждению эритроцитов и нарушению механических свойств их мембран (упругости, пластичности, прочности). Нейтрофилы, активированные fMLP, индуцируют сжатие эритроцитов и увеличение жесткости их мембран, замедление гемолиза и высвобождения гемоглобина во внеклеточную среду. При активации нейтрофилов РМА наблюдается снижение упругости и прочности мембран эритроцитов и усиление разрушения эритроцитов при хранении, гипосмотическом и кислотном воздействии. На рис. 1 показаны результаты, иллюстрирующие влияние перехватчика NO (PTIO), ингибитора НАДФН-оксидазы (DPI) и блокаторов сборки