

<https://doi.org/10.31043/2410-2733-2019-3-58-62>

УДК 611.018.51:617-089.87:619

Ф. И. Алистратова, В. Г. Скопичев

Роль цитоскелета при деформации эритроцитов в стрессовых ситуациях

Аннотация. В статье приведены результаты воздействия «Цитохалазина В» на изменение топографии мембран красных клеток крови и перестройку элементов цитоскелета с помощью сканирующей электронной микроскопии. В ходе проведенных исследований изучена степень нарушения структуры мембранных белков, изменения формы клеток и элементов цитоскелета, которые наблюдаются при кастрации хрячков. Динамика изменения архитектоники мембран эритроцитов составляет одну из характеристик этиопатогенеза ряда нарушений нормального функционирования индивидуума. Оценка данных изменений проводили на образцах крови с помощью сканирующей электронной микроскопии. Эритроциты предварительно фиксировали в условиях, исключающих деформацию поверхности клеток. Проводили дегидратацию в спиртовых растворах увеличивающейся концентрации, высушивали переходом критической точки CO_2 в установке НСП-«Hitachi». В ходе исследования наблюдали характерные для данного цитостатика изменения рельефа поверхности клеточных мембран. При действии препарата «Цитохалазин В» наблюдали образование редких длинных тяжей, имеющих высокую оптическую плотность при окраске по Гейденгайну. Отмечена значительная гетерогенность в интенсивности окраски, выявлены зоны плотной окраски гематоксилином. Показаны зоны локализации актина в примембранных областях через 30–45 минут действия цитохалазина.

Использование препарата «Цитохалазин В» в условиях изоосмотической среды приводит к внутренней перестройке мембранных белков эритроцитов, а также определяет изменение формы клеток. Данное воздействие можно считать аналогом стрессорного фактора. В моделируемых условиях запускаются механизмы мембранодеструктивного воздействия на белки цитоскелета эритроцитов, приводящие к изменению поверхности мембраны и как следствие нарушению некоторых параметров микроциркуляторного русла. Можно предположить, что данная модель стрессорного воздействия может быть использована для оценки влияния стресс-факторов на фосфолипидный матрикс мембраны эритроцитов крови.

Ключевые слова: «Цитохалазин В», эритроциты, цитоскелет, фосфолипидный матрикс мембраны, трансформация.

Авторы:

Алистратова Флюра Илгизовна — аспирант, ассистент кафедры биохимии и физиологии; e-mail: alisraatova@yandex.ru;

Скопичев Валерий Григорьевич — доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии; e-mail: fysiology@yandex.ru.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», 196084, Россия, Санкт-Петербург, Черниговская улица, д. 5.

Введение. Основой увеличения производства продукции животноводства является создание благоприятных условий содержания, направленных на стимуляцию роста, продуктивности и раскрытие генетического потенциала животных. Важную роль также играет снижение отрицательного воздействия различных производственных стрессовых факторов [1, 2, 3].

На сегодняшний день недостаточно изучены особенности морфологии мембран форменных элементов крови в период послеоперационного стресса у хрячков. Однако, в практике сельскохозяйственного устоя как в крупных комплексах, так и в частных хозяйствах неизбежны плановые операции, наиболее часто встречающихся из которых является орхидэктомия хрячков. Сегодня хоро-

шо известны механизмы воздействия стресса на кровеносную систему животных. Основной реакцией системы крови является повышение числа эхиноцитов в периферической крови, что приводит к нарушению морфофункциональных характеристик клеток и продуцирует объяснимый рост числа нарушений микроциркуляторного русла [3, 4].

Спектрин является первостепенным количественно преобладающим белком мембранного каркаса эритроцитов. Он составляет 76% от общей массы. Спектрин обеспечивает наибольшую деформируемость эритроцитов и участвует в сохранении интегративной целостности мембран. С внутренней стороны мембраны он образует с актином белковую сеть. При удалении спектрин из мембран клетки теряют способность сохранять свою целостность и распадаются на везикулы размером около 1 мкм. Спектрин и актин являются актомиозиноподобными сократительными белками. Они выполняют как цитоскелетную, так и цитокинетическую функцию [5].

Даже неполное удаление спектрин из теней эритроцитов продуцирует повышение латеральной подвижности в мембране интегральных белков. Отсюда следует, что связь с цитоскелетной сетью накладывает на поведение мембранных белков значительные ограничения. Кроме того, антицитоскелетные препараты, такие, как цитохалазины (в данном случае «Цитохалазин В») в определенной мере оказывают влияние на деформируемость эритроцитов [4, 6].

С целью установления роли цитостатиков на трансформацию рельефа поверхности эритроцитов, а также перестройке элементов цитоскелета, проводили инкубацию клеток в присутствии 10 мкМ «Цитохалазина В», разобщающего взаимодействие актиновых филаментов [9]. Цитохалазин специфически связывается с растущими плюс-концами актиновых филаментов, тем самым блокируя присоединение к ним новых мономеров актина. Таким образом, нарушается «тредмиллинг» — процесс непрерывного движения отдельных молекул актина от одного конца филамента к другому [8, 9].

Цель исследования — анализ стресс-индуцированной устойчивости мембран эритроцитов крови на модели повреждения фосфолипидного матрикса препаратом «Цитохалазин В».

Задачи исследования: моделирование условий, вызывающих мембранную деструкцию путем инкубирования клеток крови с цитостатическим препаратом, оказывающим разобщающее действие на белки мембранного цитоскелета; оценка роли белков мембранного каркаса эритроцитов под действием цитостатика (цитохалазина В) на изменение топографии поверхности клеток.

Материалы и методы исследования. В предварительных опытах обнаружено, что в крови появляется значительное количество деформированных эритроцитов — эхиноцитов, как следствие проведения операции орхидэктомии [2]. Для работы использовались эритроциты крови поросят. Эритроциты традиционно являлись универсальной моделью для оценки степени изменения мембранных белков [6]. Цитоскелет выявляли с помощью метода, предложенного Ченцовым и соавторами (1982). Использовали в качестве лизирующего агента Тритон X-100 в сочетании с 4 М глицерином и последующую окраску филаментарного материала железным гематоксилином по Гейденгайну. В качестве цитостатиков были использованы цитохалазин В (10 мг/мл, Serva, 60 мин) [7].

Динамику изменения клеточных мембран регистрировали на предварительно подготовленных образцах крови. Для проведения сканирующей электронной микроскопии: эритроциты фиксировали 1,5 процентным глутаральдегидом, приготовленным на (0,1 М) какодилатном буфере, (рН 7,2,). Далее проводили дегидратацию в спиртовых растворах восходящей концентрации и высушивали образцы по средствам перехода критической точки CO₂ в установке НСР- «Hitachi». После монтировали на предметных столиках, напыляли золотом в ионном напылителе (НСР-300) и исследовали в электронном микроскопе в сканирующем режиме (JSM-T200).

Результаты и их обсуждение. Структурные перестройки мембран эритроцитов сопутствовали серьёзным сдвигам осмолярности среды, динамическим условиям функционирования — инкубация клеток, которое провоцирует изменение их объема. Из литературных источников известно, что изменение объемных характеристик эритроцитов находится в параллели с нарушениями белков мембранного каркаса [5, 7].

В проведенной серии экспериментов было обнаружено, что «Цитохалазин В» в изоосмотических условиях вызывает изменение внутренней структуры эритроцитов, а также определяет изменение формы клеток.

Анализ результатов исследования позволяет предположить, что белки и элементы цитоскелета, составляющие каркас эритроцитарной мембраны, играют наиболее значимую роль в структурно-функциональных перестройках клеточных мембран. Использование препарата «Цитохалазин В» приводило к деструктивным процессам, а также отделению спектрин от мембраны эритроцитов [7].

Для выяснения трансформации формы клеток были проведены эксперименты под действием цитостатика «Цитохалазин В» на эритроциты крови.

В ходе исследования наблюдались характерные для данного цитостатика изменения рельефа поверхности (рис.1). При действии препарата «Цитохалазин В» наблюдалось образование редких длинных тяжей, имеющих высокую оптическую плотность при окраске по Гейденгайну.

В основе изменения формы клеток лежат перестройки цитоскелета, что было выявлено с помощью окраски гематоксилином. Также отмечали появление фибриллярных толстых сплетений, окружающих клетку по периметру.

Рассматривая распределение выявляемых при окраске элементов цитоскелета, необходимо отметить значительную гетерогенность в интенсивности окраски (рис. 2) — наряду с клетками, содержащими редкие, разрозненные пучки волокон, часто наблюдаются клетки цитоплазма которых заполнена многочисленными взаимно переплетающимися волокнами. Изменения состояния цитоскелета приводили к характерным изменениям формы клеток, которые при действии «Цитохалазина В» приобретали вид «пауков»

Закключение. Результаты настоящей работы подтверждают полученные ранее факты о значительных изменениях топографии клеточной поверхности эритроцитов в начальные сроки действия цитохалазинов. Выявлены зоны плотной окраски гематоксилином, которые, вероятно, соответствуют скоплению актина в краевых складках клеток. Такая трактовка совпадает с описанным в литературе характерным перераспределением актина в клетках эритроцитов при действии цитостатиков [8].

Правомочность использования сравнительно простой методики выявления изменения цитоскелета подтверждается также сопоставлением картин сканирующей электронной микроскопии клеток эритроцитов с цитохимическим препаратом «Цитохалазин В».

Выводы. Таким образом, влияние стресса на морфологию форменных элементов крови и выявленные при действии «Цитохалазина В» изменения топографии клеточной поверхности обусловлены значительными перестройками цитоскелета — системы микрофиламентов.

Полученные данные позволяют полагать, что при воздействии стресс-факторов различного ге-

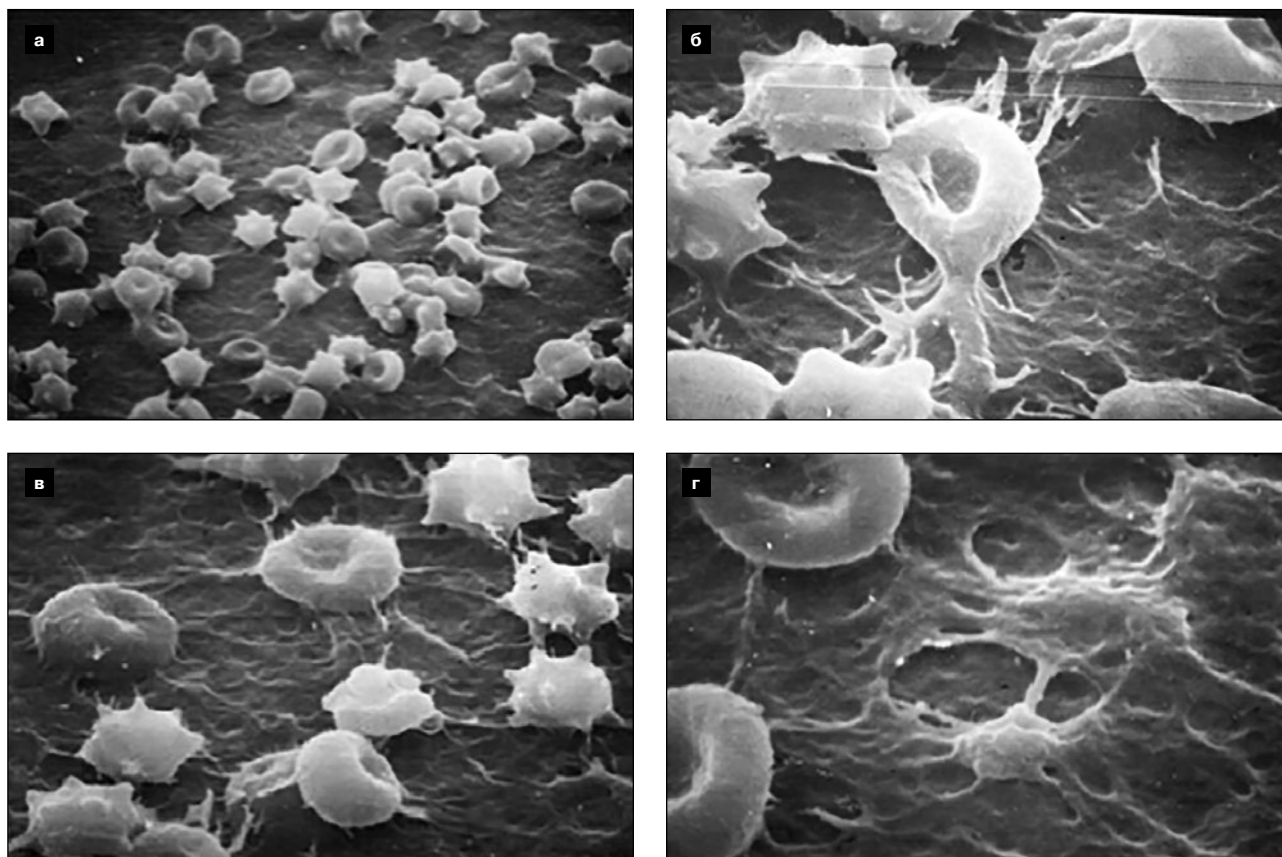


Рис. 1. Рельеф поверхности клеток эритроцитов при действии цитостатиков.

а — стягивание клеток после действия «Цитохалазина В»; б — формирование отростков на мембране эритроцитов, обработанных «Цитохалазином В»; в — набухание эритроцитов и появление тонких клеточных отростков; г — значительное уменьшением объёма клеток

неза возникают изменения структуры белков цитоскелета мембран эритроцитов, приводящие к изменению поверхности мембраны и, как следствие, нарушению параметров системы микроциркуляции.

Модель воздействия препаратом «Цитохалазин В» в качестве стресс-агента, приводящего к изменению топографии мембран и перестройке элементов цитоскелета эритроцитов крови, можно считать перспективной для использования.

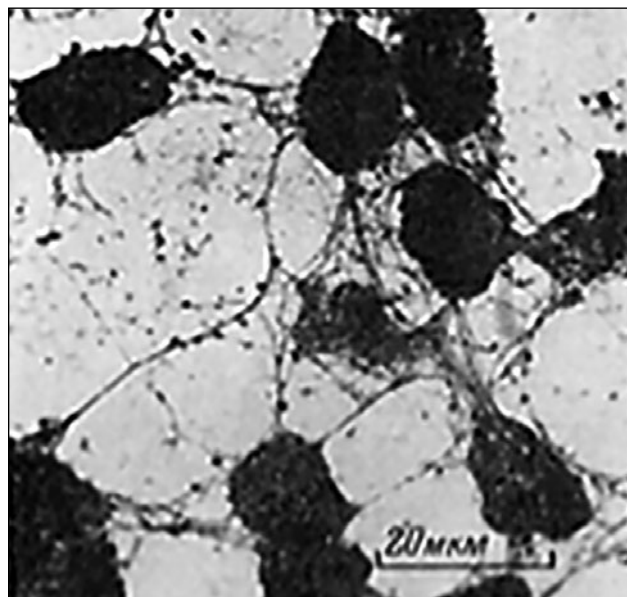


Рис. 2. Распределение окрашенного гематоксилином материала цитоскелета в клетках эритроцитов (цитохалазин В).

Литература

1. Ефанова Н. В. Влияние контакта стрессированных свиней на иммунную систему интактных животных / Н. В. Ефанова, П. Н. Смирнов // Достижения науки и техники АПК. — 2012. — № 2. — С. 79–80.
2. Скопичев В. Г. Воздействие кастрации на морфологию эритроцитов / В. Г. Скопичев, Н. Н. Богачев // Международный вестник ветеринарии. — 2017. — № 2. — С. 42–45.
3. Ченцов Ю. С. Простой способ выявления центриолей и цитоскелета в клетках в клетках культуры ткани с помощью светового микроскопа / Ю. С. Ченцов, И. Н. Воробьев, Е. С. Надеждина // Цитология. — 1982. — Т. 24. — № 3. — С. 243–247.
4. Sergeeva A. S. The relation of erythrocyte sphericity with membrane proteins in arterial hypertension / A. S. Sergeeva, Y. I. Pivovarov, I. V. Babushkina, L. A. Dmitrieva // Russian Journal of Cardiology. — 2016. — №4. — P. 52–58.
5. Остаповець Л. І. Цитогенетична характеристика ооцитів свиней при отриманні партеногенетичних ембріонів після інгібування редукційного ділення мейозу in vitro / Л. І. Остаповець // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького. — 2010. — № 2-2 (44).
6. Боровская М. К. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза / М. К. Боровская, Э. Э. Кузнецова, В. Г. Горохова и др. // Acta Biomedica Scientifica. — 2010. — № 3. — С. 334–354.
7. Mulcahy L. A. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake / L. A. Mulcahy, R. C. Pink, D. R. Carter // J. Extracell. Vesicles. — 2014. — № 3.
8. Гомзикова М. О. Исследование свойств мембранных везикул, полученных с помощью цитохалазина из клеток человека НЕК293 / М. О. Гомзикова, А. А. Ризванов // Гены и клетки. — 2015. — № 3. — С. 6–11.
9. Biancone L. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles / L. Biancone, S. Bruno, M. C. Deregibus et al // Nephrol Dial Transplant. — 2012. — № 27(VIII). — P. 3037–42.

Alistratova F., Skopichev V.

The role of the cytoskeleton in the deformation of erythrocytes in stressful situations

Abstract. The article presents the results of the action of «Cytochalazine B» on the change in the topography of the membranes of red blood cells and the rearrangement of cytoskeleton elements using scanning electron

microscopy. In the course of the studies, the degree of violation of the structure of membrane proteins, changes in the shape of cells and cytoskeleton elements, which are observed during castration of boars, were studied. The dynamics of changes in the architectonics of erythrocyte membranes is one of the characteristics of the etiopathogenesis of a number of disorders in the normal functioning of the individual. These changes were evaluated on blood samples using scanning electron microscopy. Red blood cells were pre-fixed under conditions excluding deformation of the cell surface. Dehydration in alcohol solutions of increasing concentration was carried out, dried by the transition of the critical point of CO₂ in the HCP-Hitachi installation. During the study, changes in the surface relief of cell membranes characteristic of this cytostatic were observed. Under the action of the drug cytochalasin B, the formation of rare long strands with high optical density was observed when stained according to Heidenhain. The significant heterogeneity in the color intensity was noted, areas of dense hematoxylin staining were identified as well. The localization zones of actin are shown in the near-membrane regions after 30-45 minutes of cytochalazine action.

The use of the drug «Cytochalazine B» in an isosmotic environment leads to an internal rearrangement of erythrocyte membrane proteins, and also determines a change in the shape of cells. This effect can be considered an analogue of the stress factor. Under simulated conditions, the mechanisms of membrane-destructive action on erythrocyte cytoskeleton proteins are triggered, leading to a change in the surface of the membrane and, as a result, a violation of some parameters of the microvasculature. It can be assumed that this model of stress exposure can be used to assess the effect of stress factors on the phospholipid matrix of the blood erythrocyte membrane.

Key words: «Cytochalazine B», red blood cells, cytoskeleton, phospholipid membrane matrix, trans.

Authors:

Alistratova F. — graduate student, assistant of the Biochemistry and physiology Department; e-mail: alistratova@yandex.ru;

Skopichev V. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), Professor of the Department of Biochemistry and Physiology; e-mail: fisiology@yandex.ru.

St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia, 5 Chernigovskaya, 196084.

References

1. Efanova N. V. The influence of contact of stressed pigs on the immune system of intact animals / N. V. Efanova, P. N. Smirnov // Achievements of science and technology of the agro-industrial complex. — 2012. — № 2. — P. 79–80.
2. Skopichev V. G. Effects of castration on morphology of erythrocytes / V. G. Skopichev, N. N. Bogachev // International Journal of Veterinary Medicine. — 2017. — № 2. — P. 42–45.
3. Chentsov Yu. S. A simple way to identify centrioles and cytoskeleton in cells in tissue culture cells using a light microscope / Yu. S. Chentsov, I. N. Vorobyov, E. S. Nadezhdina // Tsitologiya. — 1982. — V. 24. — № 3. — P. 243–247.
4. Sergeeva A. S. The relation of erythrocyte sphericity with membrane proteins in arterial hypertension / A. S. Sergeeva, Y. I. Pivovarov, I. V. Babushkina, L. A. Dmitrieva // Russian Journal of Cardiology. — 2016. — № 4. — P. 52–58.
5. Ostapowicz L. I. Cytogenetic characteristics of oocytes of pigs in obtaining parthenogenetic embryos after inhibition of meiotic division of meiosis in vitro / L. I. Ostapowicz // scientific Bulletin of Lviv national University of veterinary medicine and biotechnologies named after S. S. Gigicogo. — 2010. — № 2-2 (44).
6. Borovskaya M. K. Structural and functional characteristics of the erythrocyte membrane and its changes in pathologies of different genesis / M. K. Borovskaya, E. Kuznetsova, V. G. Gorokhova, and al. // Acta Biomedica Scientifica. — 2010. — № 3. — P. 334–354.
7. Mulcahy L. A. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake / L. A. Mulcahy, R. C. Pink, D. R. Carter // J. Extracell. Vesicles. — 2014. — №3.
8. Gomzikova M. O. Study of the properties of membrane vesicles obtained using cytochalasin from human cells HEK293 / M. O. Gomzikova, A. A. Rizvanov // Genes and cells. — 2015. — № 3. — P. 6–11.
9. Biancone L. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles / L. Biancone, S. Bruno, M. C. Deregibus et al // Nephrol Dial Transplant. — 2012. — № 27 (VIII). — P. 3037–42.