

## **ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ТЕРМОИНДУКЦИИ. МИНИОБЗОР**

Муравлёва Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А., Колесникова Е.А., Демидчик Л.А., Калина А.С.

*Казахстанский государственный медицинский университет, Караганда, Республика Казахстан, e-mail: [muravlev@inbox.ru](mailto:muravlev@inbox.ru), [vilen53@mail.ru](mailto:vilen53@mail.ru), [mythrandir79@mail.ru](mailto:mythrandir79@mail.ru)*

Проведен анализ данных исследования влияния высоких температур на физико-химические параметры эритроцитов. В условиях термоиндукции нарушается осмотическая резистентность, деформабильность и способность к обратимой агрегации эритроцитов. Приведены результаты, демонстрирующие различную термочувствительность периферических и интегральных белков мембраны эритроцитов. Изменение терморезистентности эритроцитов наблюдалось при некоторых патологических состояниях (синдром Дауна, пневмония). Показана полезность метода термического анализа импеданса эритроцитов для диагностических целей.

Ключевые слова: эритроциты, действие высоких температур, физико-химические характеристики.

Muravluova L.E., Molotov-Lushansyi V.B., Kluev D.A., Kolesnikova E.A., Demidchik L.A., Kalina A.S.

## **PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF ERYTHROCYTES UNDER TERMOINDUCTION. MINIREVIEW.**

*Karaganda State Medical University, The Republic of Kazakhstan, e-mail: [muravlev@inbox.ru](mailto:muravlev@inbox.ru), [vilen53@mail.ru](mailto:vilen53@mail.ru), [mythrandir79@mail.ru](mailto:mythrandir79@mail.ru)*

An analysis of research data on the effect of high temperature physical and chemical properties of red blood cells was made. The disorders of osmotic resistance, deformability, and ability to reversible aggregation of erythrocytes were showed under termoinduction. The results demonstrated the different termosensitivity of peripheral and integral membrane proteins of erythrocytes. The changes of erythrocyte termoresistance at some pathological conditions (Down's syndrome, pneumonia) were described. The areas of usefulness of thermal analysis of red cell impedance for the diagnosis were shown.

**Key words:** erythrocytes, impact of high temperature physical and chemical characteristics.

Нарушение физико-химических свойств и метаболизма эритроцитов наблюдается при достаточно большом спектре патологических состояний. Но эти изменения могут носить не столь очевидный характер и не выявляются обычными рутинными методами. В этом случае действие экстремального фактора на эритроциты *in vitro* позволит оценить их адаптивный потенциал и выявить вероятные структурно-функциональные нарушения. Одним из таких подходов к исследованию красных клеток *in vitro* является термоиндукция.

Исследования влияния высокой температуры на свойства эритроцитов были начаты достаточно давно. Первоначальные исследования были посвящены изучению действия высоких температур на физико-химические свойства красных клеток.

Так, S. Ваар проведено исследование влияния эффектов высокой температуры на осмотические свойства эритроцитов. Было показано, что повышение температуры образцов цельной крови в течение 20 минут до 40°C, 45°C, 50°C и 55°C приводило к изменению осмотической резистентности эритроцитов, которое оценивалось по тесту лизиса. При достижении температуры 50°C были установлены различия в термочувствительности красных клеток. Менее всего были устойчивы к действию высокой температуры клетки «среднего возраста», т.е. те, которым предстояло жить в системе гемодинамики, как минимум, 2 месяца [6]. Изменение осмотической резистентности эритроцитов в условиях термоиндукции также отмечено и другими исследователями [29].

В более позднем исследовании Ваар S. и Arrowsmith D. J. [7] было внесено уточнение относительно термочувствительности эритроцитов разного возраста. Образцы цельной крови подвергали нагреванию до 49°C и 50°C в условиях одинаковой временной экспозиции. По морфологическим изменениям эритроциты были разделены на старые и молодые, причем последние демонстрировали низкую терморезистентность.

Показано, что при действии высоких температур менялась эластичность мембран эритроцитов. По мнению авторов, изменение эластичности мембран эритроцитов обусловлено денатурацией мембранных белков, причем определен температурный диапазон необратимых переходов: между 46° и 50°C [27].

Самостоятельным направлением являлось изучение термогемолиза эритроцитов. Подробное исследование этого процесса было проведено Ямайкиной И.В. [5]. Степень гемолиза эритроцитов существенно зависела не только от температуры, но и от длительности её воздействия. Глушаевой Т.С. и Ягиным В.В. показано, что при 60-минутной экспозиции эритроцитов при температуре 40°C количество негемолизированных эритроцитов составило 90,2 %, при температуре 50°C – 85,6 %, при температуре 60°C – 81,2 % [1].

Исследованиями Choi J. W., Pai S. Hw. [10] продемонстрировано, что в образцах цельной крови до и после теплового воздействия при 50°C в течение 5 минут не менялись такие параметры как число эритроцитов, концентрация гемоглобина или среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH). В тоже время, тепловое воздействие достоверно индуцировало повышение гематокрита и средний объем эритроцита (MCV).

Большой интерес вызывают результаты исследования действия высоких температур на деформабильность эритроцитов. Установлено, что при инкубации эритроцитов при 48–55°C меняется деформабильность красных клеток. Определено время, при котором клетки сохраняют деформабильность в диапазоне температур 48–

55°C. Более длительная инкубация приводит к резкому снижению способности к деформации эритроцитов. По мнению авторов исследования, наиболее чувствительны к нагреванию белки эритроцитарной мембраны [12].

Проведено исследование влияния сдвига напряжения на деформабильность эритроцитов в условиях термоиндукции. Установлено, что в диапазоне температур от 2 до 50°C в условиях сдвига напряжения эритроциты приобретали удлинённую форму. Выяснено, что существенное усиление текучести мембраны эритроцитов имело место при увеличении температуры среды инкубации от 2° до 24-37°C и между 48° и 50°C [31].

Luo Jisheng Zuo et al. [24] показано, что нагревание эритроцитов крови здоровых людей в течение 20 минут вызывало деформацию красных клеток, причем значительное изменение формы клеток и гемолиз имели место в диапазоне температур от 48° до 50°C. Белки мембран эритроцитов демонстрировали различную термочувствительность. Так, денатурация некоторых интегральных белков мембран эритроцитов, в частности,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы, наступала при температуре свыше 54 °С.

Повышение температуры влияло не только на деформабильность, но и на обратимость агрегации эритроцитов при напряжении сдвига [23].

Сравнительно недавно определилось новое направление: исследование эффектов химических или физических факторов на эритроциты в условиях термоиндукции. Так, показано снижение деформируемости эритроцитов при их прогревании до 48°C. Сочетанное действие гипертермии и лантана приводило к снижению агрегации эритроцитов *in vitro* [4]. Добавление сахарозы в среду инкубации снижало термоиндуцированный лизис эритроцитов [16]. Тарасовой Ю. В. [3] показано, что экспозиция эритроцитов в течение 30 минут при 50° приводила к усилению сапонин-опосредованного гемолиза, что, по мнению автора, свидетельствовало о вовлечении в этот процесс белков цитоскелета.

Показано, что при действии высоких температур меняется связывание эритроцитов с химическими веществами, в частности, с билирубином. По мнению авторов исследования, наблюдаемый эффект связан с изменением топографии мембран красных клеток [28]. Leuko W et al. установлено, что увеличение температуры среды инкубации эритроцитов в диапазоне от 39°C до 49°C повышало интенсивность перекисного окисления липидов мембран эритроцитов, индуцированное смесью 0.1 мМ  $\text{FeCl}_3$  + 1.5 мМ аскорбат. В тоже время само по себе гипертермическое воздействие не провоцировало активации перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов [22].

Фундаментальным направлением является исследование молекулярных механизмов, участвующих в реализации термического повреждения эритроцитов. Так,

Gershfeld NL, Murayama M. высказано мнение, что термоиндуцированный гемолиз эритроцитов опосредован состоянием липидного бислоя мембраны [14].

Зубаировым Д.М. и соавт. [2] исследовалось распределение аминофосфолипидов между бислоями мембраны эритроцитов при термическом воздействии. При температурах 50°C и 56°C через 30 – 120 минут экспозиции зафиксирована презентация фосфатидилсерина на внешней поверхности эритроцита.

В тоже время высказано мнение, что терморезистентность эритроцитов зависит в большей степени от устойчивости белков.

Клетки и тени мембран эритроцитов подвергали тепловому воздействию в диапазоне температур от 50° и 75° С. Спонтанная фрагментация целых клеток наблюдалась при 50° С., т.е. в точке перехода, которая ассоциирована с денатурацией спектрина. Гемолиз наблюдался при 65°C. Образование микровезикул теней зафиксирована при температуре свыше 70°C. Также автор указывает на существенную роль компонентов цитоскелета, которые утрачивают способность к полимеризации/деполимеризации, что и приводит к блеббингу [11].

Lerock J.R. et al. [21] продемонстрировано, что в динамике нарастающего термического воздействия мембраны эритроцитов имеют три транзиции (точки перехода) при 50.0°, 56.8° и 63.8° С. На основании этих исследований была предложена модель термогемолиза эритроцитов. Согласно этой модели, при температуре 50.0° происходит денатурация спектрина, которая хотя и необходима для лизиса клеток, но недостаточна. Лизис мембраны обусловлен денатурацией других мембранных белков, которая происходит при повышении температуры до 60°C.

Нарушение фолдинга спектрина происходит при 49.5° С, но денатурация спектрина самого по себе недостаточна для индукции термогемолиза. Активности  $Ca^{2+}$ -АТФазе и  $Na^{+}$ - $K^{+}$ -АТФазе снижаются при температуре свыше 45°C и 43°C, соответственно. Это может быть результатом нарушения фолдинга белков. В тоже время, при нагревании эритроцитов до 49°C в среде инкубации не обнаружено увеличение содержания белка, который определяли, используя метод Лоури [8]. При прогреве эритроцитов от 46°C до 54° С зафиксировано увеличение выхода калия [25]. Также выявлена зависимость степени гемолиза эритроцитов от времени. После нагревания эритроцитов до 42°C и 47° С после 48 часов процент гемолизированных клеток был выше, чем непосредственно после нагревания [15].

Под руководством Ivanov I.T. [16-20] была проведена серия исследований механизма реализации нарушений в эритроцитах, индуцированных тепловым воздействием. Прежде всего, было показано, что проницаемость мембран эритроцитов

при их нагреве имеет 2 максимума: при 48-52 °С и 62-67 °С. Оба эти максимума определены участием разных белков мембран. В первом случае это периферический белок спектрин. Во втором случае изменение проницаемости происходило за счет повреждения интегральных белков [16].

Исследовали влияние времени увеличения температуры нагревания в диапазоне от 20° до 70°С. Время  $t(1/2)$ , при котором достигался 50 % гемолиз при температуре экспозиции 53°С, было выбрано как критерий устойчивости эритроцитов к термогемолизу. Для интактных эритроцитов это время в среднем составило 38 минут. При обработке веществ, повышающих термостабильность, это время возросло до 62 минут. Установлено, что денатурация спектрина наблюдается при температуре 50°С, анионного обменника – при 67°С. Соединения, вызывающие увеличение термостабильности эритроцитов, по всей вероятности, вызывают предденатурационную перегруппировку копий анионного обменника, что и определяет резистентность к нагреванию [20].

Также установлено, что нагревание эритроцитов до 50° и 65°С приводило не только к снижению устойчивости, но и изменению емкостного сопротивления красных клеток. Высказано мнение, что снижение устойчивости эритроцитов обусловлено денатурацией периферического белка спектрина. Изменение емкостного сопротивления обусловлено увеличением проницаемости для ионов за счет тепловой денатурации белка анионообменника. Предложено использовать данный метод для диагностики наследственно обусловленных изменений в мембранах эритроцитов [18].

На основании этих исследований Ivanov I. T. и соавт. предложен новый метод термического анализа импеданса эритроцитов. Он определяет три процесса в эритроцитарной мембране: падение мембранного потенциала при температуре 49.5, активация пассивной проницаемости для  $PO_4^{2-}$  при 37°С и неорганических ионов при 61.5°С. Процесс падения мембранного потенциала обусловлен денатурацией спектрина. Анионообменник вовлечен в более поздние процессы. Показано, что у больных мембранными дефектами эритроцитов падение мембранного потенциала и сферизация эритроцитов наблюдалась при 53°С. Этот метод обнаруживает мембранные дефекты, связанные с повреждением спектрина и анионообменного канала, и может быть использован при диагностике анемии, а также для дифференциальной диагностики анемий и гемоглобинопатий [17;19].

Föller M. et. al. предпринята попытка выяснить молекулярный механизм развития анемии при гипертермии. Показано, что увеличение температуры от 37° до 41° С стимулирует связывание аннексина V эритроцитов человека. Этот эффект сопровождается

увеличением концентрации кальция в цитозоле, снижением внутриклеточной АТФ, сморщиванию клеток и экспозиции фосфатидилсерина на поверхности мембраны. Такие эритроциты быстро удаляются из гемодинамики (eryptosis), что может привести к анемии при гипертермии [13].

Были проведены исследования термочувствительности эритроцитов при патологических состояниях. Так, в диапазоне температур 48–54°C определяли термочувствительность эритроцитов крови больных с синдромом Дауна. Установлено, что терморезистентность эритроцитов крови больных синдромом Дауна была в 1.6 раза выше таковой здоровых лиц [26].

Bochorishvili M. et al. [9] показано, что в термограммах цельной крови здоровых детей раннего возраста присутствуют три эндотерма (endotherms) при 60.5°C, 70°C and 80°C. В термограммах детей с пневмонией только один – при 70°C. Авторами предположено, что эндотерм при 60.5°C появляется вследствие денатурации альбумина, не связанного с жирными кислотами. Эндотермы при 70°C and 80°C обусловлены денатурацией эритроцитов. Авторами предложено использовать определение термограмм цельной крови для изучения нарушения обмена белков при пневмонии.

Как следует из приведенных результатов, термоиндукция как метод анализа физико-химических свойств и состояния мембран эритроцитов является перспективной, особенно в аспекте доклинического скрининга препаратов, повышающих терморезистентность, а также при изучении механизмов развития патологических процессов и разработки новых диагностических процедур.

### **Список литературы**

1. Глушаева Т.С., Ягин В.В. Влияние яда щитомордника на гемолиз эритроцитов в условиях высокой внешней температуры / Материалы V конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». – Томск: СибГМУ, 2004. – 139 с.
2. Нарушение липидной асимметрии при термогемоллизе эритроцитов человека /Зубаиров Д.М., Андрушко И.А., Зубаирова Л.Д. и др. // Гематология и трансфузиология. – 2003. – № 3. – С.33-35.
3. Тарасова Ю. В. Белки плазмы крови как регуляторы гемолитического процесса: автореф. канд. дис. СПб., 2000. – 24 с.
4. Шереметьев Ю. А. Шереметьева А.В. Влияние диамида на деформируемость и  $Ca^{2+}$ -индуцируемые агрегацию и слияние эритроцитов человека // Биофизика. – 2003. – Вып. 2. – С. 256-258.

5. Ямайкина И.В. Термогемолиз эритроцитов: автореф. дис. канд. биол. наук. – Минск, 1989. – 18 с.
6. Vaar S. Osmotic resistance of heat-damaged erythrocytes *J. Clin. Path.* 1967; 20:239-243.
7. Vaar S., Arrowsmith D. J. Thermal damage to red cells *J. Clin. Path.* 1970; 23: 572-576.
8. Bartosz G et al. J. Hyperthermia, unlike ionizing radiation and chemical oxidative stress, does not stimulate proteolysis in erythrocytes. *Int J Biochem.* 1990; 22:25-30.
9. Bochorishvili M. et al. Thermal Characteristics of Blood in Early Age Children with Pneumonia Tbilisi state medical university. 2004. Volume 4, Issue 3. P. 21-25.
10. Choi J. W., Pai S. Hw. Changes in Hematologic Parameters Induced by Thermal Treatment of Human Blood *Annals of Clinical & Laboratory Science.* 2002; 32:393-398.
11. Coakley WT. Hyperthermia effects on the cytoskeleton and on cell morphology. *Symp Soc Exp Biol.* 1987; 41:187–211.
12. Deeley J. O. Th, Crum L. A., Coakley W. T. The influence of temperature and incubation time on deformability of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1979. Volume 554, Issue 1, 13. P. 90-101.
13. Föller M. et. al. Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death *Eur J Clin Invest.* 2010; 40 (6): 534–540.
14. Gershfeld NL, Murayama M. Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: temperature dependence of hemolysis. *J Membr Biol.* 1988; 101: 67–72.
15. Hirsch J et al. Indicators of Erythrocyte Damage after Microwave Warming of Packed Red Blood Cells. *Clinical Chemistry.* 2003; 49:792-799.
16. Ivanov I.T. Impact of thermohaemolysis-associated membrane alteration on the passive ion permeability and life-span of erythrocytes *Journal of Biochemical and Biophysical Methods, Journal of Thermal Biology.* Volume 24, Issue 2. April 1999. P. 143-150.
17. Ivanov I.T., Tolekova, A., Chakaarova, P., Erythrocyte membrane defects in hemolytic anemias found through derivative thermal analysis of electric impedance, *J Biochem Biophys Methods.* 2007. 70: 641–648.
18. Ivanov I.T., M. Karabaliiev, P. Zagorchev Temperature and frequency dependences of the resistance and capacitance of erythrocyte membranes as a tool for detecting anemia of the type membranopathy. *Trakia Journal of Sciences.* 2010. Vol. 8, Suppl. 2. P. 43-48.
19. Ivanov I.T. Impedance spectroscopy of human erythrocyte membrane: Effect of frequency at the spectrin denaturation transition temperature. *Bioelectrochemistry.* 2010. Volume 78, Issue 2, P. 181-185.
20. Ivanov I.T., Zheleva A., Zlatanov I. Anion exchanger and the resistance against thermal haemolysis. *Int J Hyperthermia.* 2011; 27(3):286-96.

21. Lepock J.R. et al. Relationship of hyperthermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1989; 980:191-201.
22. Leyko W, Ertel D, Bartosz G. Effect of hyperthermia and lipid peroxidation on the erythrocyte membrane structure. *Int J Radiat Biol*. 1991. May; 59(5):1185-93.
23. Lim HJ, Nam JH, Lee YJ, Shin S. Measurement of the temperature-dependent threshold shear-stress of red blood cell aggregation. *Rev Sci Instrum*. 2009; 80(9):096-101.
24. Luo Jisheng Zuo et al. The effect of hyperthermia on human erythrocyte. *Journal of East China Normal University (Natural Science)*.1988-03.
25. Prinsze C, Tijssen K, Dubbelman TM, Van Steveninck J. Potentiation of hyperthermia-induced haemolysis of human erythrocytes by photodynamic treatment. Evidence for the involvement of the anion transporter in this synergistic interaction. *Biochem J*. 1991; 277:183-188.
26. Przybylska M, Bryszewska M, Kdziora J. Thermosensitivity of red blood cells from Down's syndrome individuals *Bioelectrochemistry*. 2000. Volume 52, Issue 2. P. 239-249.
27. Rakow A L, Hochmuth R M Effect of heat treatment on the elasticity of human erythrocyte membrane. *Biophys J*. 1975; 15(11): 1095–1100.
28. Rashid H, Mohammad K Ali, Tayyab S. Effect of pH and temperature on the binding of bilirubin to human erythrocyte membranes *J. Biosci*. 2000. Vol. 25. No. 2. P. 157–161.
29. Richieri G. V., Howard M. C. Temperature effects on osmotic fragility, and the erythrocyte membrane *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). – Biomembranes*. Volume 813, Issue 1. 28 February 1985. P. 41-50.
30. Waugh R., Evans E.A. Thermoelasticity of red blood cell membrane *Biophys J*. 1979. Apr.; 26(1):115-31.
31. Williamson J.R, Shanahan M.O, Hochmuth R.M. The influence of temperature on red cell deformability. *Blood*. 1975; 46(4):611-24.

#### **Рецензенты:**

Омарова И.М., д.м.н., зав. отделением химиотерапии Карагандинского областного онкологического диспансера, г. Караганда.

Койчубеков Б.К., д.б.н., зав. кафедрой медицинской биофизики и информатики Карагандинского государственного медицинского университета, г. Караганда.

**Работа получена 08.09.2011.**