

УДК 576.52

DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-1-17-22

Скоркина М.Ю.<sup>1</sup>  
Муравьев А.В.<sup>2</sup>

ДИНАМИКА ОСМОРЕГУЛЯТОРНЫХ РЕАКЦИЙ ЭРИТРОЦИТОВ  
ЛЯГУШЕК В НАГРУЗОЧНЫХ ТЕСТАХ *IN VITRO*

1) доцент кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции, доктор биологических наук, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия. *E-mail: skorkina@bsu.edu.ru*

2) профессор кафедры медико-биологических основ спорта, доктор биологических наук, Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского, ул. Республиканская, 108, г. Ярославль 150000 Россия. *E-mail: alexei.47@mail.ru*

**Аннотация**

Изучена динамика осморегуляторных реакций эритроцитов в нагрузочных тестах *in vitro*. Установлено, что в эритроцитах лягушек отсутствует зависимость между жесткостью клетки и интенсивностью использования ею мембранного резерва в механизмах регуляции объема. Увеличение жесткости клетки под влиянием адреналина сопровождается использованием ею около 19% мембранного резерва в тестах с осмотической нагрузкой. Снижение жесткости эритроцитов под влиянием кальциевой нагрузки сопровождается уменьшением объема клетки в гипотонической среде, при этом клетка не участвует в процессах регуляции объема, а ядро задействует ≈29% резервных структур

**Ключевые слова:** эритроциты; адреналиновая нагрузка; кальциевая нагрузка; мембранный резерв; цитоархитектоника эритроцитов.

UDC 576.52

DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-1-17-22

Skorkina M.Yu.<sup>1</sup>  
Muravyov A.V.<sup>2</sup>

DYNAMICS OF OSMOREGULATION REACTIONS OF FROGS'  
ERYTHROCYTES IN LOAD TESTS *IN VITRO*

1) Associate Professor, Department of Ecology, Physiology and Biological Evolution, Doctor of Biology, Belgorod State National Research University, 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia. *E-mail: skorkina@bsu.edu.ru*

2) Professor Department of Medicobiological Bases of Sport, Doctor of Biology, Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinskii, 108 Respublikanskaya St., Yaroslavl, 150000, the Russian Federation  
*E-mail: alexei.47@mail.ru*

**Abstract**

The authors studied the dynamics of osmoregulatory reactions of erythrocytes in load tests *in vitro*. It was found that frogs' erythrocytes have no dependence between the stiffness of cell and its intensity of utilizing the membrane reserve in the mechanisms of volume regulation. The increase of stiffness under the influence of adrenaline was accompanied by the use of about 19% of membrane reserve by the cell in tests of osmotic load. The decrease of stiffness of erythrocytes under the influence of calcium load was accompanied by reduction of volume of the cell in hypotonic medium, and the cell did not participate in the process of volume regulation, however the nucleus used about 29% of reserve structures.

**Key words:** erythrocytes; adrenaline load; calcium load; membrane reserve; relief of surface.

Регуляция объема клеток представляет собой сложный механизм, связанный с гомеостазом внутриклеточных катионов  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  [8, 9, 16], а также концентрацией цитозольного  $Ca^{2+}$ , запускающего полифосфатидилинозитный цикл [1]. Ионная основа регуляции объема в условиях

гипотонии лучше всего изучена на эритроцитах [7] и лимфоидных клетках [18]. Показано, что осморегуляторные реакции клеток контролируются посредством гормонов, модулирующих работу ионных транспортеров с помощью универсальных регуляторных

внутриклеточных сигнальных путей – аденилатциклазного [14] и  $Ca^{2+}$ -сигнального [3, 15]. Физиологический механизм, регулирующий мембранное натяжение во время осмотического стресса, направлен на использование клетками дополнительных мембранных структур, часть из которых представлена запасами плазмалеммы [10], а другая – внутриклеточным мембранным резервом [13]. Кроме того, изменение объема клеток, как правило, связано с трансформацией структуры ядра [12]. Однако на сегодняшний день практически не изучена кинетика осморегуляторных реакций ядра в ответ на снижение осмолярности среды.

Целью выполненного исследования было изучение динамики осморегуляторных реакций эритроцитов лягушек при изменении жесткости клеточной поверхности в нагрузочных тестах *in vitro*.

### Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на эритроцитах половозрелых самцов лягушек *Rana ridibunda Pall* (200 особей). Опыты проведены в период физиологического анабиоза (январь-февраль), животных содержали при температуре  $+2 - +3^{\circ}C$ , в стеклянных садках, наполненных водой на 3-5 см, воду меняли ежедневно. Исследование выполнено с соблюдением всех требований Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными [5] и директивами Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

Кровь брали путем пункции сердца. Стабилизацию крови проводили гепарином (5 Ед/мл). Использование бассейнов поверхностных и внутриклеточных запасов мембранного материала изучали на модели осмотической регуляции объема клеток. Выполнено три серии экспериментов. В первой серии изучали осморегуляторные реакции эритроцитов лягушек в условиях гипотонической нагрузки, во второй и третьей – участие элементов аденилатциклазных и кальциевых сигнальных путей в механизмах осморегуляторных реакций.

Гипотоническую нагрузку проводили по следующей схеме: 1 мл суспензии эритроцитов, полученный путем центрифугирования, делили на три пробы по 10 мкл в каждой. К первой пробе добавляли 50 мкл аутологичной плазмы, ко второй – 50 мкл гипотонического (0,2% NaCl), к третьей – 50 мкл изотонического раствора (0,65% NaCl) хлорида натрия. Формировали

однослойные суспензионные препараты из каждой пробы, в которых через каждые 30 с в течение 10 минут, а затем дополнительно через каждые 15, 30 и 60 мин регистрировали изображения эритроцитов с помощью комплекса аппаратно-программной визуализации морфологических препаратов, анализа и регистрации оптических и морфологических показателей «ВидеоТест» (Санкт-Петербург, регистрационное удостоверение № 29/20010702/6102-04 от 16.02. 2004 г.). На полученных изображениях измеряли габаритные размеры 100 клеток и их ядер. По измеренным габаритным размерам вычисляли значения морфометрических индексов. Об осморегуляторных реакциях клеток судили по показателю использования ими запасов мембранного резерва [4]:

$$MR = \frac{S_{yz} - S_p}{V_p}$$

где MR – относительный мембранный резерв (мкм<sup>-1</sup>);

$S_{yz}$  – площадь поверхности клеток/ядер в умеренно-гипотоническом растворе NaCl (мкм<sup>2</sup>),

$S_p$  – площадь поверхности клеток/ядер в аутологичной плазме (мкм<sup>2</sup>),

$V_p$  – объем клеток/ядер в аутологичной плазме (мкм<sup>3</sup>).

Интенсивность использования относительного мембранного резерва клетками в гипотонической среде оценивали, вычисляя процент относительного мембранного резерва, используемого клеткой от потенциального относительного мембранного резерва эритроцита, помещенного в аутологичную плазму, принимаемого за 100%. Потенциальный относительный мембранный резерв эритроцита в аутологичной плазме рассчитывали как отношение площади поверхности клетки к ее объему.

С целью изучения взаимосвязи между жесткостью клеточной поверхности и интенсивностью использования клеткой мембранного резерва в нагрузочных тестах в проведенном исследовании использован метод функциональных нагрузок, включающий инкубацию клеточных суспензий с адреналином и хлоридом кальция. Адреналиновую нагрузку осуществляли путем инкубации 30 мкл клеточной суспензии в 150 мкл среды Хенкса, содержащей  $10^{-9}$  ммоль/л адреналина в течение 15 мин при комнатной температуре. Кальциевую нагрузку моделировали путем инкубации 30 мкл клеточной

суспензии в 150 мкл среды Хенкса, содержащей  $10^{-6}$  ммоль/л  $Ca^{2+}$  в течение 15 мин при комнатной температуре. По окончании времени воздействия функциональных нагрузок, пробы центрифугировали, 5 мин при 1500 об/мин, надосадочную жидкость убирали, клеточные суспензии подвергали гипоосмотической нагрузке как описано выше.

Исследование упруго-эластических свойств эритроцитов в условиях гипоосмотической и функциональных нагрузок выполнены с использованием метода силовой спектроскопии (эластография), с помощью которого измеряли модуль Юнга, согласно методике описанной в более ранних работах [2].

Полученные экспериментальные данные обработаны методом вариационной статистики. Экспериментальные данные представлены в виде

среднеарифметических значений с их средними стандартными ошибками. Достоверность различий определяли с использованием t критерия Стьюдента.

### Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных экспериментов установлено, что объем эритроцитов лягушек в гипотонической среде был снижен по сравнению с объемом клеток, помещенных в аутологичную плазму. В гипотонической среде клетка не использовала резервы плазмалеммы в реакциях регуляции объема, в отличие от ядра, которое интенсивно включалось в осморегуляторные реакции. На 270 секунде инкубации ядро использовало  $\approx 55\%$  мембранного резерва, а к концу инкубации (1800 секунда)  $\approx 89\%$  резерва (рис. 1).

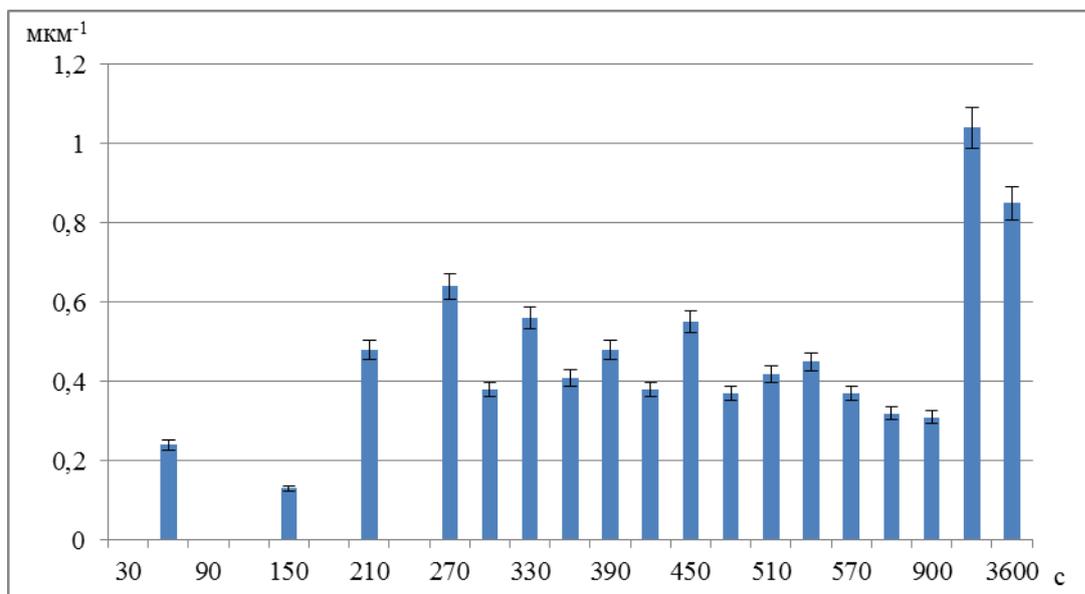


Рис. 1. Относительный мембранный резерв, используемый ядром эритроцитов в гипотонической среде

Fig. 1. Relative membrane reserve utilized by the erythrocytes nucleus in hypotonic medium

Под влиянием адреналиновой нагрузки эритроциты теряли эллипсоидную форму, объем их увеличился. Жесткость эритроцитов под

влиянием адреналина возросла на 64% ( $p < 0,05$ ; табл.).

Таблица

### Особенности рельефа поверхности эритроцитов лягушек под влиянием кальциевой и адреналиновой нагрузок

Table

#### The features of relief of surface of frogs' erythrocytes under the influence of calcium and adrenaline load

Параметр	Плазма	Адреналин	$Ca^{2+}$
Модуль Юнга, $\mu Pa$	$2,37 \pm 0,15$	$3,89 \pm 0,01^*$	$1,46 \pm 0,08^*$
Глубина погружения кантилевера, нм	$694,92 \pm 7,54$	$209,23 \pm 1,50^*$	$1797,98 \pm 21,25^*$

\*- Статистически достоверные различия между значениями в плазме по сравнению со значениями в пробах с адреналиновой и кальциевой нагрузками по критерию Стьюдента при  $p < 0.05$ .

Под влиянием адреналиновой нагрузки в гипоосмотической среде клетка задействовала на поддержание объема около 19% резервных структур к концу часовой инкубации. Ядро не участвовало в осморегуляторных реакциях.

В условиях кальциевой нагрузки жесткость клеток снизилась на 25% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (см. табл. 2). В условиях гипоосмотической нагрузки клетки не использовали дополнительных мембранных структур в регуляции объема. Однако на уровне ядра, было установлено использование относительного мембранного резерва на 90 секунде воздействия, а затем к концу инкубации на 570 секунде в гипотонической среде ядро задействовало  $\approx 28\%$  мембранных структур (рис. 2).

В регуляцию объема вовлечены не только транспортные системы плазмалеммы, но и морфологические образования, представленные

поверхностным и внутриклеточными бассейнами мембранного резерва. Известно, что величина доступного для использования мембранного резерва зависит от организации сети цитоскелета. В частности показано, что нарушение сети цитоскелета увеличивает доступный мембранный резерв, используемый клетками, в то время как увеличение плотности микротрубочек снижает размер доступного резерва [17]. Основываясь на данном предположении, в проведенном исследовании дополнительно выполнено две серии экспериментов с кальциевой и адреналиновой нагрузкой.

В условиях адреналиновой нагрузки жесткость эритроцитов увеличилась примерно в 1.6 раза, при этом в тестах с осмотической нагрузкой в начале инкубации клетки использовали не более 1% дополнительных мембранных структур в регуляции объема.

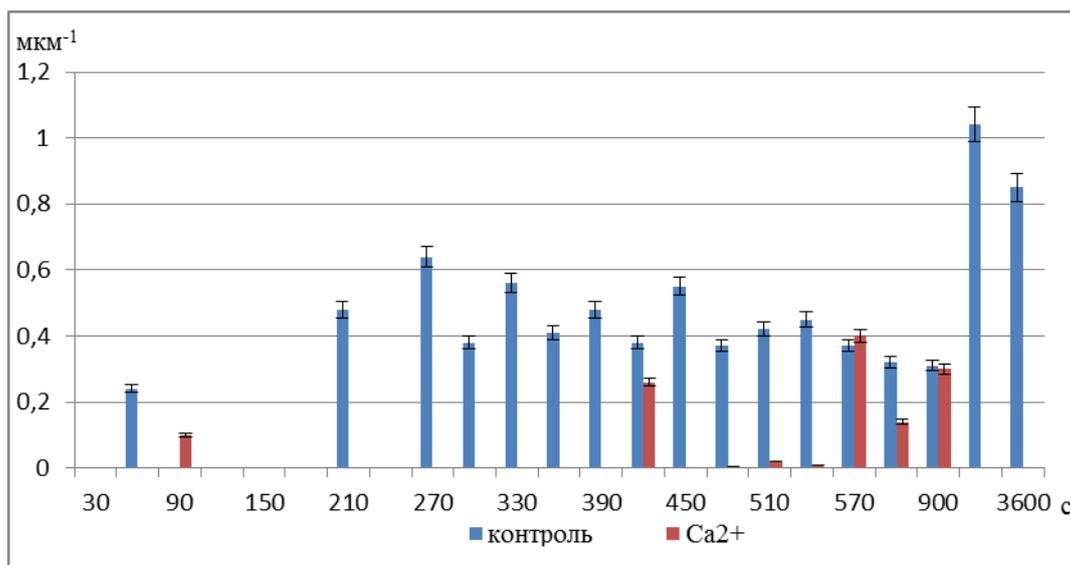


Рис. 2. Относительный мембранный резерв, используемый ядром эритроцитов в гипотонической среде под влиянием кальциевой нагрузки.

Fig. 2. Relative membrane reserve utilized by the erythrocytes nucleus in hypotonic medium under the influence of calcium load

Под влиянием  $Ca^{2+}$ -нагрузки жесткость клеток снизилась, при этом клетки также не использовали в регуляции объема структуры мембранного резерва при проведении осмотических тестов. Не исключено, ионы  $Ca^{2+}$  запуская полимеризацию актина [11], увеличивают плотность расположения микротрубочек, что ограничивает использование клетками поверхностного мембранного бассейна в процессах регуляции объема при снижении осмолярности среды.

Ядро активно привлекает в регуляцию своего объема мембранные резервы в условиях гипотонии как без нагрузки, так и под влиянием ионов  $Ca^{2+}$ , однако при инкубации с адреналином осморегуляторные реакции на уровне ядра не выявлены.

#### Закключение

Таким образом, установленное, в проведенном исследовании, уменьшение объема эритроцитов лягушек в гипотонической среде, согласуется с данными представленными в

литературе. В состоянии физиологического анабиоза в эритроцитах лягушек сохраняется высокая активность  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -насоса [6] и снижается выход  $\text{K}^+$ , который играет ключевую роль в механизмах регуляторного сокращения объема [19]. В эритроцитах лягушек зависимость между жесткостью клетки и интенсивностью использования ею мембранного резерва в механизмах регуляции объема не выявлена. Увеличение жесткости клетки под влиянием адреналина сопровождается уменьшением объема клеток в гипотонической среде и отсутствием реакций регуляции объема со стороны ядра, при этом клетка использовала около 19% резерва к концу нагрузки. Снижение жесткости эритроцитов под влиянием кальциевой нагрузки, сопровождается уменьшением объема клетки в гипотонической среде, при этом ядро задействует  $\approx 29\%$  резервных структур в регуляции объема.

#### Список литературы

1. Гусев Н.Б. Внутриклеточные  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки. Часть 2. Структура и механизмы функционирования // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 5. С. 10-16.
2. Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Муравьев А.В., Сладкова Е.А. Использование наномеханического сенсора для изучения морфофункциональных свойств лимфоцитов здоровых доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. № 3. С. 172-175.
3. Ткачук В.А. Мембранные рецепторы и внутриклеточный кальций // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7 (1). С. 10-15.
4. Федорова М.З., Левин В.Н. Использование мембранного резерва лимфоцитами крови при деформации и в условиях гипотонии // Биологические мембраны. 2001. Т.18 (14). С. 306-311.
5. Хельсинская декларация этических принципов. 2008.
6. Agalakova N.A., Lapin A.V., Gusev G.P. Temperature effect on ion transport across the erythrocyte membrane of the frog *Rana Temporaria* // Comparative Biochemistry and Physiology. 1997. V. 170 (9). P. 411-418.
7. Cala P.M. Volume regulation by Amphiuma red blood cells. The membrane potential and its implication regarding the nature of the ion-flux pathways // J. of General Physiology. 1980. V. 76. P. 683-708.
8. Fahlke C., Fischer M. Physiology and pathophysiology of Cl<sup>-</sup>-K<sup>+</sup>/barthrin channels // Frontiers in physiology. 2010. V. 1. P. 1-12.
9. Grinstein S., Cohen S., Rothstein A. Mechanism of osmotic activation of Na/H exchange in rat thymic lymphocytes // J. of General Physiology. 1985. V. 85. P. 765-787.
10. Groulx N., Bourdreault F., Orlov S.N., Grygorczyk R. Membrane reserves and hypotonic cell swelling // J. Membr. Biol. 2006. V. 214. P. 43-56.

11. Hoffman E.K. Intracellular signaling involved in volume regulatory decrease // Cell Physiol. Biochem. 2000. V. 10. P. 273-288.

12. Ingber D.E. Opposing views on tensegrity as a structural framework understanding cell mechanics // J. of Applied. Physiology. 2000. V. 89. P. 1663-1670.

13. Kageyama K., Onoyama Y., Kogawa H., Gato E., Tanolec K. The maximum and minimum water content and cell volume of human erythrocytes in vitro // Biophys. Chem. 1989. V. 34. P. 79-82.

14. Kaloyianni M., Doukakis I. Effect of adrenaline on glucose transport in red cells of *Rana Balcanica* // Gen. Physiol. Biophys. 2003. V. 22. P. 69-80.

15. Mohanty M.J., Ye M., Li X., Rossi N.F. Hypotonic swelling-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release by an  $\text{IP}_3$ -intensive  $\text{Ca}^{2+}$ -store // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2001. V. 281. P. 555-562.

16. Okada Y., Sato K., Numota T. Pathophysiology and purrles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel // The J. of Physiology. 2009. V. 587. P. 2141-2149.

17. Raucher D., Sheetz M. Characteristic of a membrane reservoir buffering membrane tension // Biophysical J. 1999. V. 77. P. 1992-2002.

18. Roti-Roti L.W., Rothstein A. Adaptation of mouse leukemic cells (L51784) to anisotonic media // Exp. Cell Res. 1973. V. 79. P. 295-310.

19. Strange K. Cellular volume homeostasis // Adv. Physiol. Educ. 2004. V.28. P. 155-159.

#### References

1. Gusev N.B. The Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -binding Proteins. Part 2. Structure and mechanisms of functioning. Soros Educational Journal. 1998. № 5. Pp. 10-16.
2. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Muravyov A.V., Sladkova E.A. The use of nanomechanical sensor for studies of morphofunctional properties of lymphocytes from healthy donors and patient with chronic lymphoblastic leukemia. Cells Technologies in Biology and Medicine. 2012. № 3. Pp. 172-175.
3. Tkachuk V.A. Membranous receptors and intracellular calcium. Soros Educational Journal. 2001. V.7 (1). Pp. 10-15.
4. Fedorova M.Z., Levin V.N. The use of membrane reserve by blood lymphocytes during the processes of deformation and under hypotonic conditions. Biol. Membr. 2001. V. 18 (14). Pp. 306-311.
5. Declaration of Helsinki Ethical Principles. 2008.
6. Agalakova N.A., Lapin A.V., Gusev G.P. Temperature effect on ion transport across the erythrocyte membrane of the frog *Rana Temporaria*. Comparative Biochemistry and Physiology. 1997. V. 170 (9). Pp. 411-418.
7. Cala P.M. Volume regulation by Amphiuma red blood cells. The membrane potential and its implication regarding the nature of the ion-flux pathways. J. of General Physiology. 1980. V. 76. Pp. 683-708.
8. Fahlke C., Fischer M. Physiology and pathophysiology of Cl<sup>-</sup>-K<sup>+</sup>/barthrin channels. Frontiers in Physiology. 2010. V. 1. Pp. 1-12.
9. Grinstein S., Cohen S., Rothstein A. Mechanism of osmotic activation of Na/H exchange in rat thymic

lymphocytes. J. of General Physiol. 1985. V. 85. Pp. 765-787.

10. Groulx N., Bourdreault F., Orlov S.N., Grygorczyk R. Membrane reserves and hypotonic cell swelling. J. Membr. Biol. 2006. V. 214. Pp. 43-56.

11. Hoffman E.K. Intracellular signaling involved in volume regulatory decrease. Cell Physiol. Biochem. 2000. V. 10. Pp. 273-288.

12. Ingber D.E. Opposing views on tensegrity as a structural framework understanding cell mechanics. J. of Applied. Physiology. 2000. V. 89. Pp. 1663-1670.

13. Kageyama K., Onoyama Y., Kogawa H., Gato E., Tanolec K. The maximum and minimum water content and cell volume of human erythrocytes in vitro. Biophys. Chem. 1989. V. 34. Pp. 79-82.

14. Kaloyianni M., Doukakis I. Effect of adrenaline on glucose transport in red cells of Rana Balcanica. Gen. Physiol. Biophys. 2003. V. 22. Pp. 69-80.

15. Mohanty M.J., Ye M., Li X., Rossi N.F. Hypotonic swelling-induced  $Ca^{2+}$  release by an  $IP_3$ -intensive  $Ca^{2+}$ -store. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2001. V. 281. Pp. 555-562.

16. Okada Y., Sato K., Numota T. Pathophysiology and purrles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. The J. of Physiology. 2009. V. 587. Pp. 2141-2149.

17. Raucher D., Sheetz M. Characteristic of a membrane reservoir buffering membrane tension. Biophysical J. 1999. V. 77. Pp. 1992-2002.

18. Roti-Roti L.W., Rothstein A. Adaptation of mouse leukemic cells (L51784) to anisotonic media. Exp. Cell Res. 1973. V. 79. Pp. 295-310.

19. Strange K. Cellular volume homeostasis. Adv. Physiol. Educ. 2004. V.28. Pp. 155-159.