

М.Т. Луценко

КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ СТРОЕНИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ

Лаборатория «Механизмы этиопатогенеза и восстановительных процессов органов дыхания при неспецифических заболеваниях легких» (зав. — академик РАМН проф. М.Т. Луценко) Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН, г. Благовещенск

Описан аппаратно-программный фотометрический метод создания галереи изображений эритроцитов различных форм (дискоциты, эхиноциты, мишеневидные, дегенеративные формы). С помощью программы Bio Vision изучено строение мембран эритроцитов каждого вида, что позволило установить относительное содержание в них уплотненных белково-липидных комплексов, варьирующее по мере морфофункциональных изменений различной степени.

Ключевые слова: эритроцит, мембрана, белково-липидный комплекс, уплотнение участков мембраны, Bio Vision.

Липиды и белковые молекулы мембран изучают гель-электрофорезом, тонкослойной хроматографией и другими методами. Однако получить визуальное представление о конформационном состоянии белково-липидного комплекса в условиях, когда мембрана частично или полностью теряет свое жизненно активное состояние и эти участки уплотняются, до настоящего времени не удавалось. Известно, что эритроциты периферической крови под влиянием патогенных факторов способны изменять свою форму. Дискоциты могут принимать вид эхиноцитов, мишеневидных и дегенеративно-измененных форм. Эти преобразования сопровождаются изменением плотности белково-липидных комплексов клеточной мембраны [1, 2].

Целью настоящего исследования явилась разработка метода морфологической визуализации уплотненных участков мембран с подсчетом доли площади, занимаемой этими участками, для каждого типа эритроцитов.

Исследовали периферическую кровь 30 людей в возрасте 30–35 лет, не болевших до момента взятия крови в течение 6 мес. Исследования проводили на базе поликлиники Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН с учетом требований Хельсинской декларации («Рекомендации для врачей по биомедицинским исследованиям на людях», 2000).

Предложенный способ осуществляется следующим образом.

1. Каплю свежей крови, полученной после прокола кожи пальца, помещают на стекла StatSpin (Stat Spin Inc, США), которые размещают в центрифуге DiffSpin Slide Spinner модели

M700-10 (Stat Spin Inc, США). Мазок изготавливается в течение 3 с после запуска центрифуги. Это даёт возможность получить на стекле монослой эритроцитов.

2. Неокрашенные мазки помещают под микроскоп установки «Аппаратно-программного определения фотоморфометрических параметров клеток для диагностики заболеваний МекосЦ» (Мекос, Россия). С помощью этой установки автоматически (по данным анализа 1500 клеток) составляется таблица относительного содержания эритроцитов морфологически различных видов: дискоцитов, эхиноцитов, мишеневидных, дегенеративных форм. Установка «Мекос» позволяет после определения относительного содержания различных форм эритроцитов сгруппировать их в виде галереи: дискоциты (рис. 1, а), эхиноциты (см. рис. 1, б), мишеневидные (см. рис. 1, в), дегенеративные формы (см. рис. 1, г).

3. Из каждой галереи выбирают по 50 эритроцитов, которые подвергают компьютерному анализу с целью определения площади уплотненных участков мембраны и их доли в мембране дискоцитов (рис. 2, а), эхиноцитов (см. рис. 2, б), мишеневидных (см. рис. 2, в) и дегенеративных форм (см. рис. 2, г). Выделяют фазы по ранжам (пиксели на дюйм). Предварительно стандартизируется будущее изображение: ширина рисунка — 10 см, разрешающая способность — 300 пикселей на дюйм при постоянном увеличении 40.

Путем анализа неокрашенных мазков периферической крови здоровых людей на фотометрической установке «Мекос» обнаружено, что доля дискоцитов в среднем составляла $87,0 \pm 1,1\%$, эхиноцитов — $2,50 \pm 0,06\%$, мишеневидных — $10,5 \pm 0,06\%$, дегенеративных форм — $0,04 \pm 0,01\%$.

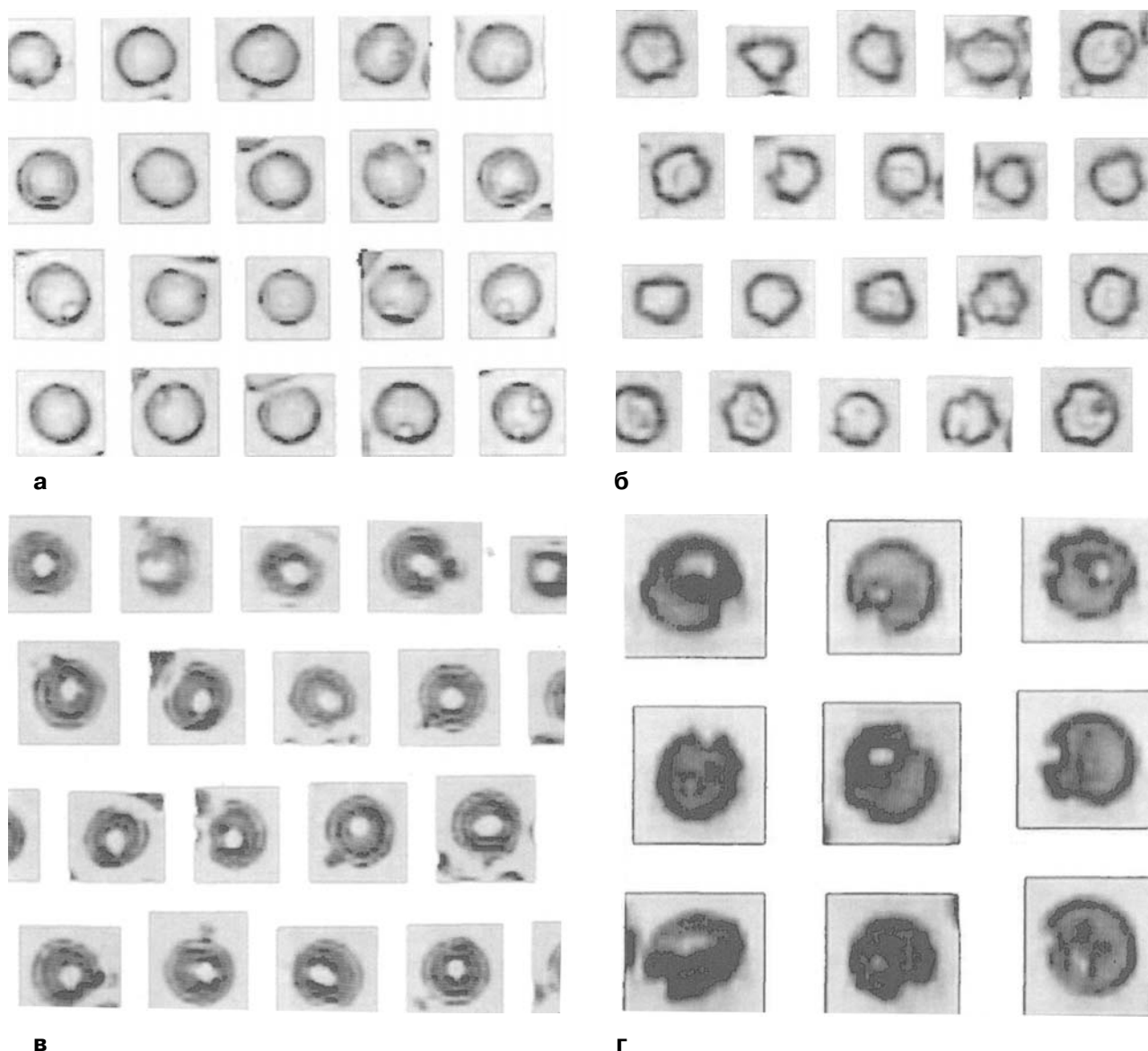


Рис. 1. Галерея дискоцитов (а), эхиноцитов (б), мишеневидных (в) и дегенеративных форм (г) эритроцитов периферической крови здоровых людей, полученная с помощью аппаратно-программной фотоморфометрической установки «Мекос».

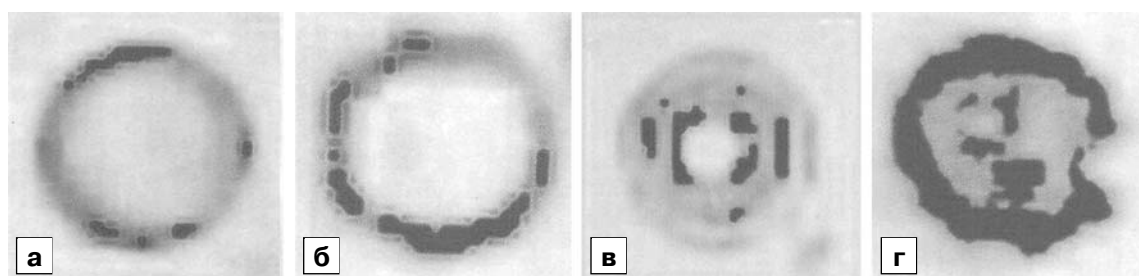


Рис. 2. Уплотненные белково-липидные участки в мембранах дискоцитов (а), эхиноцитов (б), мишеневидных (в) и дегенеративных форм (г) эритроцитов периферической крови здоровых людей.

Площадь и относительное содержание уплотненных белково-липидных участков определяются с помощью компьютерной программы Bio Vision. Ранж — 120. Стандартное окно: ширина — 10 см, разрешение — 300 пикселей/дюйм. Ув. 40.

видных — $1,60 \pm 0,10\%$ и дегенеративных форм — $7,20 \pm 0,09\%$. На этом же аппарате можно для каждого случая создать галерею из изображений исследуемых эритроцитов и изучить их с помощью компьютера, используя программу Bio Vision (см. рис. 2, а–г).

Наконец, выбирая отдельные эритроциты из каждой галереи с помощью программы Bio Vision, определяли в каждом эритроците число уплотненных белково-липидных комплексов. Расчеты показали, что у здоровых людей на один дискоцит приходится площадь величиной в $10,35 \pm 0,08$ усл. ед. (ранж 120), что составляет $1,403 \pm 0,004\%$ по отношению к площади всей мембраны (см. рис. 2, а). В эхиноцитах площадь уплотненных участков составляет $19,25 \pm 0,20$ усл. ед., доля по отношению ко всей мембране — $2,83 \pm 0,03\%$ (см. рис. 2, б). В мишеневидных эритроцитах эти показатели составляют соответственно $32,0 \pm 0,3$ усл. ед. и $4,476 \pm 0,008\%$ (см. рис. 2, в). В дегенеративных формах эритроцитов уплотненные участки мембраны занимают площадь в $92,0 \pm 1,1$ усл. ед., что составляет $14,8 \pm 0,8\%$ (см. рис. 2, г).

Данные о структуре мембраны эритроцита, как было указано выше, получены либо с помощью сканирующей электронной микроскопии, либо методом гель-электрофореза [3, 5]. С изменением цитоскелета мембраны связана деформируемость эритроцита, а также снижение стойкости эритроцита к осмотическому гемолизу. Стареющие сферические эритроциты теряют способность к деформации, что связано с уплотнением цитоскелета. Происходит агрегация спектрина и гемоглобина [4]. При этом следует полагать, что в деформируемости эритроцита играет роль не только белковый скелет, но и липиды мембраны (фосфолипиды, холестерин), что и определяет, в конечном счете, ее текучесть и проницаемость для других веществ. Однако оценить это с помощью гель-электрофореза или визуально при использовании сканирующей электронной микроскопии невозможно. Новый методический подход — определение плотности участков мембраны с использованием компьютерной программы Bio Vision — позволяет при строго стандартизирован-

ных условиях анализа оценить ее изменения в различных формах эритроцитов и определить количество уплотненных липидно-белковых участков, приходящихся на единицу площади мембраны. Устанавливая с помощью компьютерной программы Bio Vision фазу яркости в 120 пикселей, можно определить площадь уплотненных участков в каждой из форм эритроцитов. Наибольшая площадь приходится на мембраны в дегенеративных формах эритроцитов, наименьшая — на мембраны дискоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кассирский И.А. и Алексеев Г.А. Клиническая гематология. М., Медицина, 1970.
2. Рябов С.И. и Шостка Г.Д. Молекулярно-генетические аспекты эритропоэза. Л., Медицина, 1973.
3. Branton D., Cohen C.M. and Tyler J. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. Cell, 1981, v. 24, p. 24–32.
4. Snyder L.M., Leb L., Piotrowski J. et al. Irreversible spectrin-hemoglobin crosslinking in vivo: a marker for red cell senescence. Brit. J. Haematol., 1983, v. 53, № 3, p. 379–384.
5. Steck T.L. The organization of proteins in human red blood cell membrane. J. Cell. Biol., 1974, v. 62, p. 1–19.

Поступила в редакцию 09.12.08
Получена после доработки 26.08.09

COMPUTER ASSESSMENT OF MEMBRANE STRUCTURE IN VARIOUS ERYTHROCYTE FORMS

M.T. Lutsenko

The photometric computer image analysis method is described. It is based on the creation of the gallery of the images of various erythrocyte forms (discocytes, echinocytes, target cells and degenerative forms). Using the Bio Vision program, the structure of membranes of each type of erythrocytes was studied. It was found that the morpho-functional changes of erythrocytes of various degrees were accompanied by the alterations in the relative content of condensed membrane protein-lipid complexes.

Key words: erythrocyte, membrane, protein-lipid complex, membrane densities, Bio Vision.

Laboratory of the Mechanisms of Etiopathogenesis and Regenerative Processes of Respiratory Organs in Non-specific Pulmonary Diseases, Far Eastern Center of Respiratory Physiology and Pathology, RAMS SB, Blagoveshchensk.