

Структурные перестройки в клетках и их мембранах при длительном гипотермическом хранении

Н.В. РЕПИН, Т.П. ГОВОРУХА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Structural Rearrangements in Cells and Their Membranes Under Long-Term Hypothermic Storage

N.V. REPIN, T.P. GOVORUKHA

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Проведено морфологическое исследование ультраструктуры мембран эритроцитов и клеток печени, длительное время хранившихся при 4°C. Показано, что после 20 суток хранения наблюдается выраженная дестабилизация структуры их мембран, сопровождаемая образованием спикул и потерей мембранного материала. Ультраструктурное состояние клеток печени после суток хранения в жидкой фазе свидетельствует об их высокой сохранности и обратимости наблюдаемых изменений. По степени лабильности при гипотермическом хранении внутриклеточные структуры располагаются следующим образом: митохондрии, эндоплазматическая сеть, ядерный аппарат.

Ключевые слова: эритроциты, гепатоциты, гипотермия, ультраструктура.

Проведено морфологічне дослідження ультраструктури мембран еритроцитів і клітин печінки, які тривалий час зберігали при 4°C. Показано, що після 20-ї доби зберігання спостерігається виражена дестабілізація структури їхніх мембран, яка супроводжується утворенням спікул і втратою мембранного матеріалу. Ультраструктурний стан клітин печінки після доби зберігання в рідкій фазі свідчить про їхню високу збереженість і оборотність змін, що спостерігалися. За ступенем лабільності при гіпотермічному зберіганні внутрішньоклітинні структури розташовані в такій послідовності: мітохондрії, ендоплазматична мережа, ядерний апарат.

Ключові слова: еритроцити, гепатоцити, гіпотермія, ультраструктура.

Morphological investigation of ultrastructure of erythrocyte membrane and liver cells, stored for a long time under 4°C was carried-out. It was shown, that a manifested destabilisation of their membrane structure, accompanied with spiculae formation and loss of membrane material was observed following 20 days of storage. Ultrastructural state of liver cells after 1 day of storage in a liquid phase testifies to their high integrity and reversibility in the observed changes. By lability extent under hypothermic storage the intracellular structures are graded as follows: mitochondria, endoplasmic reticulum, nuclear apparatus.

Key-words: erythrocytes, hepatocytes, hypothermia, ultrastructure.

По гипотермическому хранению (ГХ) эритроцитов, изолированных гепатоцитов и фрагментов ткани накоплен значительный опыт. В то же время сведения о сроках начала изменения ультраструктуры клеток печени при хранении противоречивы. Считается, что продолжительность хранения биологического материала в жизнеспособном состоянии в составе ткани ограничена, как правило, несколькими часами [4, 5], клеточных суспензий – 1-3 сутками [1], а эритроцитов – 1-2 неделями [2].

Представлялось интересным выяснить временной предел морфологической сохранности структуры печени и эритроцитов при пониженных (4°C) температурах.

Цель работы – изучить структурные перестройки в клетках и их мембранах при длительном гипотермическом хранении.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использованы эритроциты донорской крови, которые хранили при

Адрес для корреспонденции: Репин Н.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Significant experience in hypothermic storage (HS) of erythrocytes, isolated hepatocytes and tissue fragments has been accumulated. At the same time the information about the terms when liver cell ultrastructure begins to change during storage is contradictory. Duration of biological material storage in a viable state as a part of tissue is considered to be generally limited by some hours [4,5], 1-3 days for cell suspensions [1] and 1-2 weeks for erythrocytes [2].

Of interest was to reveal a time limit of morphological integrity for liver structure and erythrocytes under lowered temperatures (4°C).

The work was aimed to study structural rearrangements in cells and their membranes under long-term hypothermic storage.

Materials and Methods

Donor blood erythrocytes and Wistar rats' liver fragments, stored under 4°C within 30 days and more (for erythrocytes) and up to 6 days (for liver fragments) were used as research object. Investigations of

Address for correspondence: Repin N.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

температуре 4°C 30 сут и более, и фрагменты печени крыс линии Вистар, хранившиеся до 6 суток. Исследования мембран эритроцитов проводили электронно-микроскопическим методом замораживания-скальвания. Образцы криофиксировали сэндвич-методом с помощью двух охлажденных в жидком азоте медных блоков. Скальвание и напыление реплики осуществляли в вакуумной напылительной установке при температуре от -100 до -105°C и давлении 10⁻⁶ мм рт. ст. Образцы печени препарировали по общепринятой методике [3]. Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным водным раствором уранил-ацетата и цитратом свинца. Просмотр образцов проводили с помощью электронных микроскопов: растрового РЭММА-101А и трансмиссионного ПЭМ 125К, снабженного системой съема и анализа изображения САИ-01А (АО "SELMИ", г. Сумы) на основе ССD камеры DX-2 и пакета программ фирмы "KAPPA" (Германия) при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Результаты и обсуждение

Известно, что мембрана интактных эритроцитов при скальвании расщепляется вдоль гидрофобной области, обнажая при этом две относительно гладкие поверхности PF и EF с характерным хаотическим распределением внутримембранных частиц (ВМЧ). Экспериментально доказано, что ВМЧ представляют собой интегральные белки, встроенные в липидную область мембраны. Можно считать установленным, что характер их распределения отражает динамику белок-липидных взаимодействий и определяется структурно-функциональным состоянием мембраны. В норме вращательная и латеральная подвижность мембранных белков резко ограничена, т.е. система мембрана-цитоскелет довольно устойчива, и наблюдать латеральное перераспределение ВМЧ в плоскости мембраны не удается.

Критерием морфологического состояния мембраны служили плотность и характер распределения ВМЧ, а также условия прохождения плотности скола внутри мембраны.

Небольшие сроки хранения эритроцитов (до 10 сут) не приводят к существенным изменениям их формы и ультраструктуры мембран (рис.1). Численные значения плотности ВМЧ, характер прохождения плотности скола находились в пределах нормы. В этот период лишь в цитозоле клеток отмечены компактизация и конденсация гемоглобина, наблюдаемые в виде бифазной, гелеподобной структуры – гладкие, лишенные молекул гемоглобина области и зоны конденсированного гемоглобина (рис. 2). При исследовании распределения плотности ВМЧ на PF- и EF-

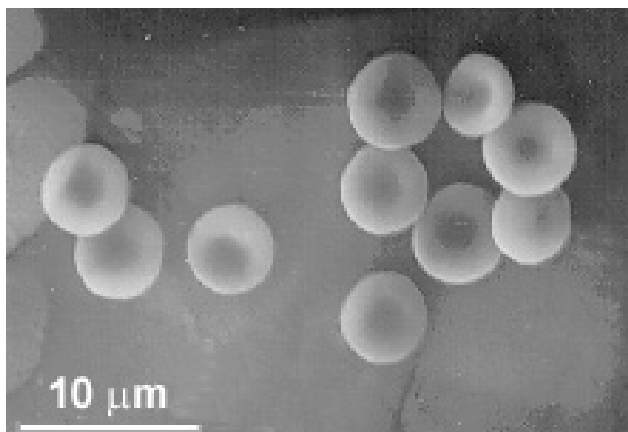
erythrocyte membranes were carried-out using electron-microscopy method of freeze-fracturing. Samples were cryofixed by sandwich-method using two copper blocks, cooled in liquid nitrogen. Fracturing and replica sputtering were carried-out in vacuum sputtering unit at -100 to -105°C and 10⁻⁶ mm hg pressure. Liver samples after each storage term were prepared by the standard methods [3]. Ultrathin sections were counterstained with a saturated uranyl acetate aqueous solution and lead citrate. Liver cell ultrastructure was studied using electron microscopes such as: REMMA-101A scanning and PEM-125K transmission ones, supplied with SAI-01A system for extraction and image analysis ("SELMИ" company, city of Sumy), based on CCD of DX-2 chamber and "KAPPA" Software (Germany) at 75 kV accelerating voltage.

Results and discussion

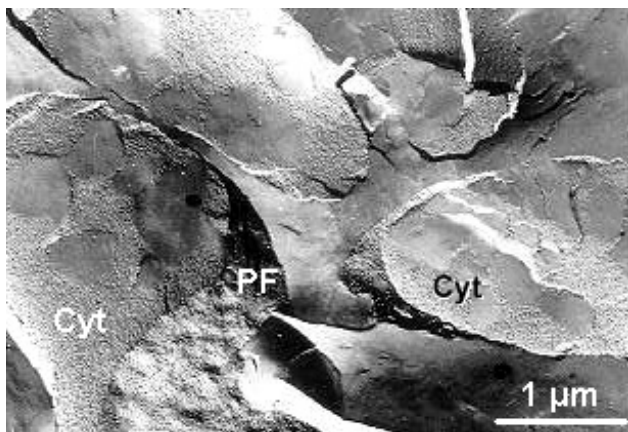
Membrane of intact erythrocytes during fracturing is known to be splitted along hydrophobic area thereby uncovering two relatively smooth PF and EF surfaces with a typical chaotic distribution of so-called intramembranous particles (IMPs). As experimentally approved, IMPs are integral proteins built into membrane lipid area. The fact that a character of their distribution reflects dynamics of protein-lipid interactions and is determined by structural and functional membrane state can be considered as established one. Rotative and lateral mobility of membrane proteins is sharply limited in the norm, i.e. membrane-cytoskeleton system is quite resistant and observation for lateral IMPs redistribution in membrane surface is failed.

Density and character of IMPs distribution, as well as the conditions of chip density passing inside membrane served as the criterion for membrane morphological state.

Short terms of erythrocyte storage (up to 10 days) do not result in considerable changes in their shape and membrane ultrastructure (Fig. 1). Numerical values of IMPs density, the character of chip density passing were within the normal range. In this period only in cell cytosol there were noted hemoglobin compacting and condensation, observed as biphasic, gel-like structure: smooth, hemoglobin molecule-free areas and those of condensed hemoglobin (Fig. 2). When investigating IMPs density redistribution on PF- and EF-surfaces of erythrocyte membrane chip there was found out that at a relatively equal IMPs total density in comparison with the control cells during initial step of storage, a stable tendency of their redistribution between internal (PF) and external (EF) membrane monolayers in favour of the latter was observed. This testifies to a change in protein-lipid and protein-protein interactions both in a membrane itself and between integral components of membrane and cytoskeleton.



a a



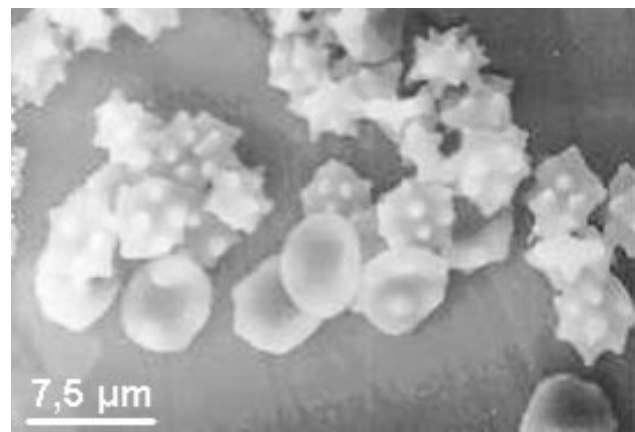
b b

Рис. 1. Морфологическое состояние (а) и структура цитозоля (б) эритроцитов после 10 сут ГХ. Cyt – цитозоль.
Fig. 1. Morphological state (a) and cytosol (Cyt) structure (b) of erythrocytes after 10 days of HS.

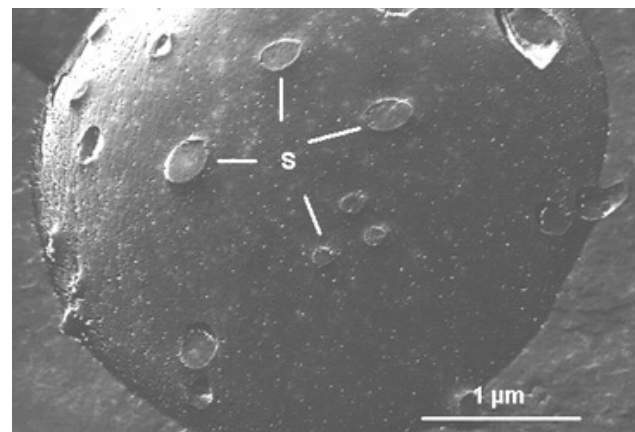
поверхностях скола мембраны эритроцитов установлено, что при относительно одинаковой с контрольными клетками суммарной плотности ВМЧ в процессе начального этапа хранения отмечается устойчивая тенденция их перераспределения между внутренним (PF) и внешним (EF) монослоями мембраны в пользу последнего. Это свидетельствует об изменении белок-липидных и белок-белковых взаимодействий как в самой мембране, так и между интегральными компонентами мембраны и цитоскелетом.

При сроках хранения 10-25 суток отмечены существенные изменения формы эритроцитов и поверхности скола их мембран, образование выпячиваний и выростов на мембранной поверхности, характерных для истощенных по АТФ эритроцитов (рис. 2, а), а также уменьшение времени кислотного гемолиза эритроцитов и возрастание их однородности по отношению к этому показателю. Величина гемолиза была не столь значительной и составляла в среднем 3-5%.

Начиная с 20-х суток, происходит процесс набухания эритроцитов, а на их поверхности



a a



b b

Рис. 2. Морфологическое состояние поверхности эритроцитов: а – до 20 сут ГХ; б – формирование спикул (S) на поверхности после 20 сут ГХ.

Fig. 2. Morphological state of erythrocyte surface: a – up to 20 days' HS; b – spiculae (S) formation on surface after 20 days' HS.

Under 10-25 days' storage term there were observed considerable changes in erythrocyte shape and chip surface of their membranes, formation of in- and outgrowths on membrane surface, typical for exhausted by ATP erythrocytes (Fig. 2, a), as well as a decrease in time of erythrocyte acid hemolysis and increase in their heterogeneity in respect of this index. Hemolysis value was not so significant and made 3-5% on average.

Starting with the 20th day the process of erythrocyte swelling occurs and spiculae (typical membrane outgrowths) appear on their surface (Fig. 2, b). At a long-term storage (30 days and more) we observed smooth, IMPs-free vesicular formations in erythrocyte suspension, that testified to their lipid origin, as well as an increase in IMPs density on PF-surface. Vesicle formation reflects an intensive loss in membrane material.

Thus, cell and especially its membrane, being a dynamic structure, actively responds to changed conditions by modifying its structure.

Studying the effect of temperature factor on ultrastructure of nucleated cells enabled to trace the

появляются характерные мембранные выросты – спиккулы (рис. 2, б). При длительном сроке хранения (30 сут и более) в суспензии эритроцитов нами отмечены гладкие, лишенные ВМЧ везикулярные образования, что свидетельствует об их липидной природе, а также возрастание плотности ВМЧ на РF-поверхности. Образование везикул отражает интенсивную потерю мембранного материала.

Таким образом, клетка и особенно ее мембрана, являясь динамической структурой, активно реагирует своей модификацией на изменяющиеся условия.

Изучение влияния температурного фактора на ультраструктуру ядросодержащих клеток позволило проследить последовательность деградации клеточных органелл при хранении.

Гипотермическое хранение фрагментов печени в среде 199 в течение 24 ч показало сохранение ее основных морфологических характеристик – трабекулярного строения печеночных долек и структуры микрососудистого русла. Ультраструктурный анализ гепатоцитов подтверждает сохранность всех клеточных структур, а также тесную связь элементов белоксинтезирующей и энергообеспечивающей систем клетки. Форма гепатоцитов и межклеточные контакты остаются неповрежденными. Ядро, как одна из наиболее устойчивых клеточных органелл, в данных условиях полностью сохраняет свою структуру (рис. 3). В цитоплазме гранулярный ЭПР представлен узкими канальцами, окружающими митохондрии, и параллельными цистернами, которые сосредоточены, главным образом, в околядерной зоне. Агранулярный ЭПР в виде небольших везикул и сравнительно коротких трубочек распределен по всей цитоплазме.

Ультраструктура митохондрий близка к нормальной. Для них характерны округлая или овальная форма, четкая двойная мембрана и матрикс средней электронной плотности со слабовыраженными кристами. Аппарат Гольджи состоит из пузырьков и плоских цистерн, содержимое которых имеет низкую электронную плотность. Гликоген в виде скоплений гранул и розеток рассредоточен по всей цитоплазме. Как и в норме, эндотелий синусоидных капилляров представлен уплощенными эндотелиоцитами (рис. 4) с широкими порами и фенестрами в их периферических отростках, а также печеночными макрофагами. Желчные капилляры и пространство Диссе содержат хорошо выраженные микроворсинки, образованные цитолеммой гепатоцитов.

Через 1,5-2 сут хранения в клетках происходят набухание и частичная деструкция мембран гранулярного ЭПР, что приводит к увеличению количества свободных рибосом. Набухание мито-

sequence for cell organella degradation during storage. Under liver fragment hypothermic storage in 199 medium during 24 hrs there was noted the integrity in its principal morphological characteristic, such as trabecular structure of liver lobules and microvascular channel structure. Ultrastructural analysis of hepatocytes confirms the integrity of all cell structures, as well as a tight relationship between elements of protein-synthesising and energy-efficient cell system. Hepatocyte shape and intercellular contacts remain undamaged. Under these conditions a nucleus as one of the most resistant cell organella completely preserves its structure (Fig. 3). In cytoplasm the endoplasmic reticulum (EPR) is presented by narrow channels, surrounding mitochondria and parallel cisterns, mostly located in perinuclear area. Agranular EPR as small vesicles and comparatively short tubes is distributed along all cytoplasm.

The mitochondria ultrastructure is close to the normal one. They are characterised by a roundish or oval shape, distinct double membrane and matrix of average electron density with a slightly manifested crysts. Golgi apparatus comprises vesicles and flat cisterns with low electron density in their content. Glycogen in the form of granule and rosula accumulations is distributed along all cytoplasm. Endothelium of sinusoid capillaries is presented by flattened endotheliocytes (Fig. 4) with wide pores and fenestras in their peripheric islets, as well as by hepatic macrophages as in the norm. Biliary capillaries and Disse's space comprise well manifested microvilli, formed by hepatocyte cytomembrane.

Following 1.5-2 days of storage a swelling and partial membrane destruction of granular EPR in cells occur, resulting in an increase of free ribosome number. Mitochondria swelling is accompanied with matrix

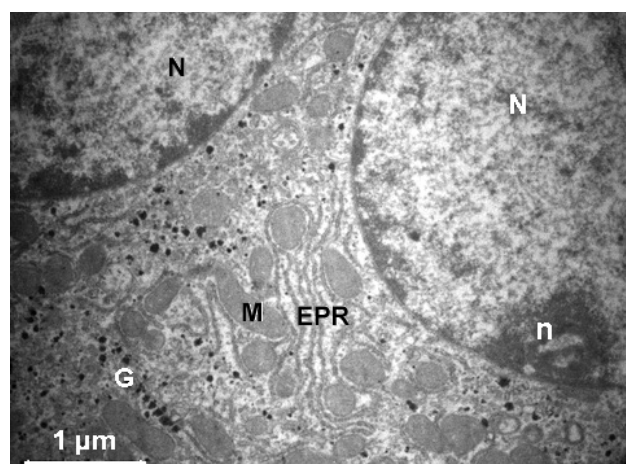


Рис. 3. Фрагмент двуядерного гепатоцита после 24 ч ГХ в среде 199: N – ядро; M – митохондрия; EPR – эндоплазматический ретикулум; G – розетки гликогена; n – ядрышко.

Fig. 3. Fragment of two-nuclear hepatocyte after 24 hrs' HS in 199 medium. N – nucleus; M – mitochondrion; EPR; G – glycogen; n – nucleolus.

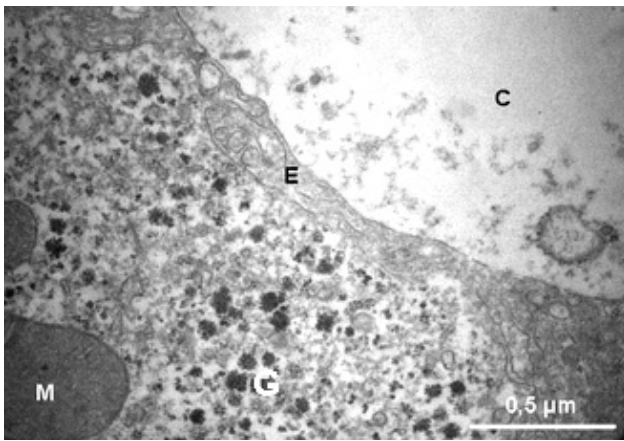


Рис. 4. Состояние ультраструктуры синусоидного капилляра после 24 ГХ в среде 199. Обозначения те же, что на рис. 3; E – эндотелий.

Fig. 4. State of sinusoid capillary ultrastructure after 24 hrs' HS in 199 medium. The same legends as for Fig.3, E – endothelium.

хондрий сопровождается просветлением матрикса и частичным разрушением крист. В аппарате Гольджи преобладают вакуолеобразные и везикулярные структуры. В ядрах клеток появляется изрезанность контура без нарушения ширины перинуклеарного пространства, изменяется соотношение между гетеро- и эухроматином с увеличением доли конденсированных участков.

Однако и при данных сроках хранения встречаются значительные участки ткани, в которых сохранность ультраструктуры достаточно высокая. Как видно из рис. 5, структура ЭПР, а также его топологическая связь с митохондриями и кариолеммой практически не нарушаются.

В условиях более длительного гипотермического хранения в большей степени наблюдаются динамические изменения структуры митохондрий (набухание, дезорганизация крист) и ЭПР (фрагментация, вакуолизация и расширение цистерн, уменьшение количества рибосом). Количество гликогена в цитоплазме гепатоцитов значительно уменьшается, что сопровождается появлением обширных просветленных областей. В зависимости от условий хранения (влажная камера или жидкая фаза) наблюдались либо стагнация, либо расширение просветов синусоидов. Обнаруживаются также разрушенные клетки эндотелиоцитов. Пролонгация сроков хранения до 72 ч и далее приводит к деструкции всех клеточных компонентов ткани независимо от условий хранения.

Следует также отметить, что после 48 ч различие в условиях гипотермического хранения фрагментов печени приводит к значительным, часто разнонаправленным изменениям в структуре ткани и клеток. Это проявляется не только на ее основных морфологических характеристиках

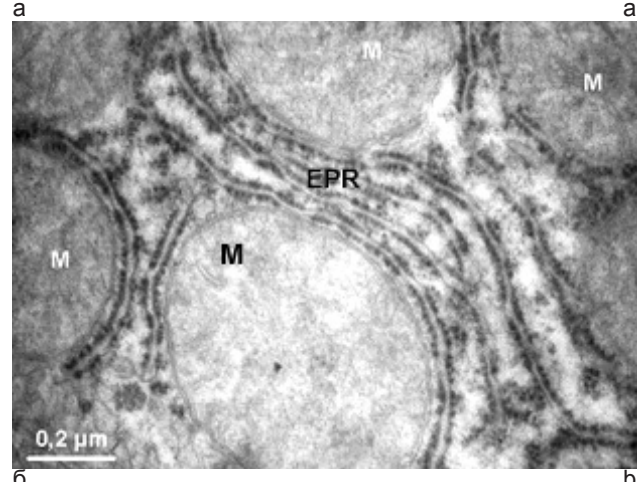
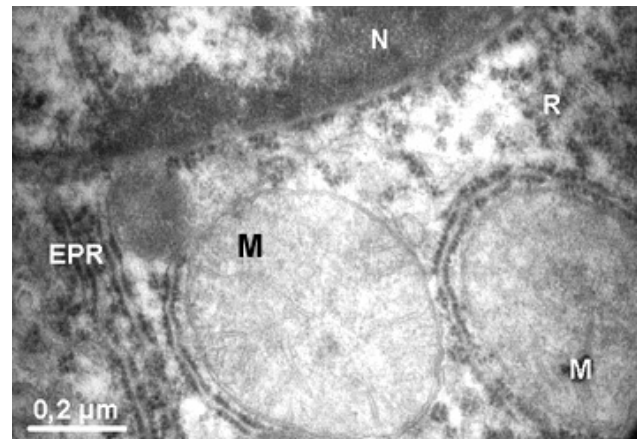


Рис. 5. Ультраструктура фрагмента участка гепатоцита после 48ч ГХ во влажной камере. а – зона ядра; б – сохранение топологической связи ЭПР с митохондриями. Обозначения те же, что на рис. 3.

Fig. 5. Ultrastructure of hepatocyte site fragment after 48 hrs' HS in humid chamber: a – nucleus area; b – preservation of EPR topological relation with mitochondria. The same legends as for Fig.3.

enlightenment and a partial cryst destruction. Vacuole-like and vesicular structures predominate in Golgi apparatus. The contour unevenness with no change in perinuclear space width appears in cell nuclei, there is a change in ratio between hetero- and euchromatin with an increase in a part of condensed sites.

However even under these storage terms the considerable sites of tissues with quite high ultrastructure integrity are seen. As presented in Fig. 5, the EPR structure, as well as its topologic relationship with mitochondria and kariolemma are not practically impaired.

Dynamic changes in mitochondria structures (their swelling, cryst disorganisation) and EPR (fragmentation, vacuolisation and cistern widening, reduction of ribosome number) are mostly seen under conditions of more long-term hypothermic storage. Glycogen amount in hepatocyte cytoplasm reduces in a considerable extent with appearance of extended enlightened areas. Depending on storage conditions (humid chamber or fluid phase) either sinusoid lumen

(балочном строении печеночных долек и структуре микрососудистого русла), но и ультраструктуре клеток.

Выводы

Гипотермическое хранение (24 ч) фрагментов печени в жидкой фазе (среда 199) обеспечивает высокий уровень сохранности клеток. Ультраструктурное состояние клеток таково, что позволяет говорить об обратимости наблюдаемых изменений.

Начало развития аутолитических процессов в ткани печени проявляется к 48 ч хранения.

Изучение влияния температурного фактора на ультраструктуру гепатоцитов позволило проследить последовательность деградации клеточных органелл в процессе хранения. По степени лабильности при гипотермическом хранении внутриклеточные структуры располагаются следующим образом: митохондрии, эндоплазматическая сеть, ядерный аппарат.

Литература

1. *Кравченко Л.П., Шанина И.В., Белоус А.М., Сампсон В.* Эффективность сахарозосодержащего раствора при холодном хранении целой печени крысы // Пробл. криобиологии.– 1997.– №3.– С. 45-48.
2. *Крымский Л.Д., Нестайко Г.В., Рыбалов А.Г.* Растровая электронная микроскопия сосудов и крови.– М.: Медицина, 1976.– 168 с.
3. *Уикли Б.* Электронная микроскопия для начинающих.– М.: Мир.– 1975.– 324 с.
4. *Griffiths B.J.N., Evans P.J.* Ultrastructural changes in hypothermically preserved hepatocytes // *Cryobiology.*– 2000.– Vol. 40, N2.– P. 176-181.
5. *Stefanovich P., Ezzell R.M., Sheehan S.J. et. al.* Effects of hypothermia on the function, membrane integrity and cytoskeletal structure of hepatocytes // *Cryobiology.*– 1995.– Vol.32, N4.– P. 389-403.

Поступила 14.11.2005

stasis or extension were observed. Destroyed cells of endotheliocytes are also seen. Prolongation of storage terms up to 72 hrs and more results in destruction of all cell components of tissue independently on storage conditions.

Of note is that after 48 hrs a difference in hypothermic storage conditions for liver fragments results in significant, often the changes of versatile directions in tissue and cell structure. This affects not only its main morphological characteristics (beam structure of liver lobules and microvascular channel structure), but cell ultrastructure as well.

Conclusions

Hypothermic storage (24 hrs) of liver fragments in liquid phase (199 medium) provides a high level of cell integrity. Ultrastructural state of cells is that one enabling to suggest about a reversibility of observed changes.

Beginning of autolytic process development in liver tissue manifests to the 48 hr of storage.

Studying the effect of temperature factor on hepatocyte ultrastructure enables to trace the sequence of cell organella degradation during storage. By lability extent under hypothermic storage the intracellular structures are graded as follows: mitochondria, endoplasmic reticulum, nuclear apparatus.

References

1. *Kravchenko L.P., Shanina I.V., Belous A.M., Sampson V.* Efficiency of a sucrose-containing solution in cold storage of the whole rat liver // *Problems of Cryobiology.*– 1997.– N3.– P. 45-48.
2. *Krymsky L.D., Nestajko G.V., Rybalov A.G.* Scanning electron microscopy of vessels and blood.– Moscow: Meditsina, 1976.– 168 p.
3. *Wickly B.* Electron microscopy for beginners.– Moscow: Mir, 1975.– 324 p.
4. *Griffiths B.J.N., Evans P.J.* Ultrastructural changes in hypothermically preserved hepatocytes // *Cryobiology.*– 2000.– Vol. 40, N2.– P. 176-181.
5. *Stefanovich P., Ezzell R.M., Sheehan S.J. et. al.* Effects of hypothermia on the function, membrane integrity and cytoskeletal structure of hepatocytes // *Cryobiology.*– 1995.– Vol.32, N4.– P. 389-403.

Accepted in 14.11.2005