

JERZY NOWAK*, BOGUSŁAW NEDOSZYTKO**

**BADANIA STRUKTURALNE BŁON KOMÓRKOWYCH ERYTROCYTÓW,
LIMFOCYTÓW I GRANULOCYTÓW U CHORYCH Z ŁUSZCZYCĄ
Z WYKORZYSTANIEM METODY ZNAKOWANIA SPINOWEGO**

**STRUCTURAL ANALYSIS OF THE CELL MEMBRANES OF RED BLOOD
CELLS, LYMPHOCYTES AND GRANULOCYTES IN PSORIATIC PATIENTS
– A SPIN LABEL STUDY**

*Katedra i Zakład Fizyki i Biofizyki AM w Gdańsku

kierownik: prof. dr Bartłomiej Kwiatkowski

**Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii AM w Gdańsku

kierownik: prof. dr Jadwiga Roszkiewicz

W pracy podjęto próbę zbadania wpływu łuszczycy na strukturę warstwy lipidowej błon komórkowych erytrocytów, limfocytów i granulocytów. W tym celu zastosowano metodę znakowania spinowego błon komórkowych, wykorzystującą spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Zastosowane znaczniki (sondy spinowe) umożliwiły śledzenie zmian strukturalnych na różnych głębokościach błony. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono bardzo silne zmiany strukturalne błon limfocytów i granulocytów spowodowane stresem oksydacyjnym oraz niewielkie zmiany w strukturze błon erytrocytarnych związane przypuszczalnie ze zmianą koncentracji cholesterolu.

Łuszczycza jest jedną z najczęstszych chorób skóry, występującą w populacji europejskiej z częstością 2–3%. Jest chorobą przewlekłą, zapalną i charakteryzuje się nadmierną proliferacją oraz zaburzeniami dojrzewania komórek naskórka. Jako skutek tego obserwuje się skrócenie czasu odnowy naskórka i zaburzenia rogowacenia (parakeratoza). W skórze zmienionej chorobowo pojawiają się nacieki złożone głównie z limfocytów T, neutrofilii i makrofagów. Limfocyty, obecne w naciekach, wytwarzają typowe dla limfocytów pomocniczych Th1 prozapalne cytokiny: IL-2, IFN γ , IL-5 oraz TNF α i β . Metabolity tlenu i proteazy uwalniane z aktywowanych komórek indukują oksydacyjne i hydrolityczne uszkodzenia skóry. Wydaje się, że mogą mieć również wpływ na komórki krwi. W przebiegu łuszczycy obserwuje się również zmiany morfologicznego obrazu krwi obwodowej, polegające głównie na zmniejszeniu ilości erytrocytów oraz zwiększeniu ilości leukocytów, szczególnie neutrofilii i bazofili [10, 11]. Wykazano, że u pacjentów z łuszczycą erytrocyty wykazują obniżenie odporności osmotycznej, zmniejszenie

intensywności procesów antyoksydacyjnych oraz wzrost peroksydacji lipidów błonowych [1, 2]. Mimo iż koncepcja oksydacyjnego uszkodzenia błon komórkowych komórek krwi u pacjentów z łuszczycą ma solidny fundament teoretyczny i bywa bardzo często podawana w literaturze, to do chwili rozpoczęcia naszych badań została sprawdzona jedynie dla erytrocytów [5, 6, 7]. Wynika to stąd, że bezpośredni dowód zaistnienia tego typu zmian błonowych wymaga zastosowania biofizycznych metod znacznikowych, a te z kolei – posiadania wysoko specjalistycznego sprzętu spektroskopowego. Dzięki posiadaniu dwóch spektrometrów elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) w pracowni spektroskopii EPR w Katedrze i Zakładzie Fizyki i Biofizyki AMG można równocześnie prowadzić wiele projektów badawczych, polegających między innymi na współpracy z jednostkami klinicznymi. Celem podjętej pracy było zbadanie wpływu przebiegu łuszczycy na strukturę błon komórkowych erytrocytów, limfocytów i granulocytów, wykorzystując tzw. technikę znakowania spinowego błon komórkowych. W wypadku limfocytów i granulocytów były to badania przeprowadzone po raz pierwszy, dla erytrocytów stanowiły częściowe powtórzenie eksperymentów już opublikowanych, a częściowo zostały przeprowadzone z wykorzystaniem innego znacznika spinowego.

MATERIAŁY I METODYKA WYKORZYSTANE W BADANIACH

Przedmiotem badań było 46 pacjentów z łuszczycą zwyczajną hospitalizowanych w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii AMG. Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników. Badania przeprowadzono w latach 2003–2004.

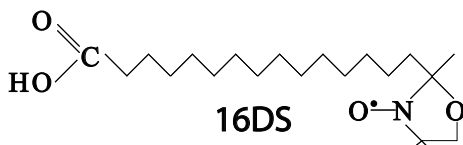
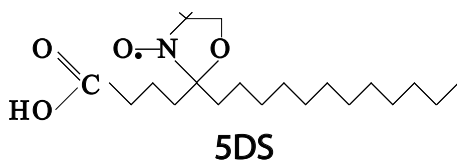
Izolacja komórek do badań

Od każdego dawcy pobierano 5 ml krwi obwodowej na heparynę. Do rozdziału komórek na frakcje limfocytów, granulocytów i erytrocytów stosowano wirowanie w gradiencie gradisolu L oraz gradisolu G (POLFA), odpowiednio dla limfocytów i granulocytów. Erytrocyty uzyskiwano z osadu gradisolu G.

Spinowe znakowanie komórek, oznaczenia EPR, analiza widm EPR

Do badań strukturalnych błon komórkowych wykorzystano *n*-doksylowe pochodne kwasu stearynowego z nitroksylową grupą reporterową w pozycji $n = 5$ (5DS) oraz $n = 16$ (16DS) łańcucha kwasu stearynowego (SIGMA). Strukturę stosowanych znaczników (sond) spinowych przedstawia ryc. 1.

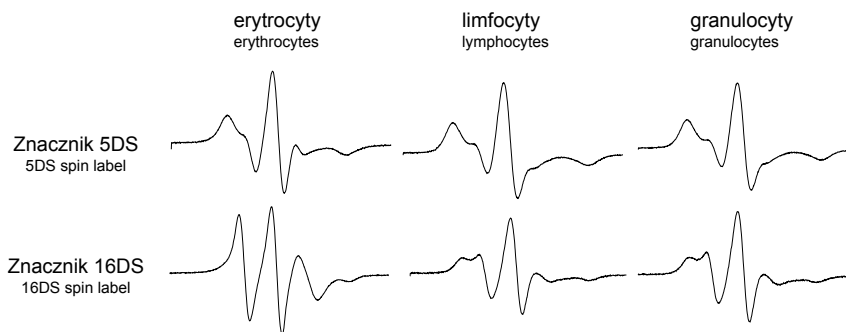
Cząsteczki sond spinowych wnikają do warstwy fosfolipidowej błony komórkowej, gdzie przyjmują ustawienie wymuszone sąsiedztwem fosfolipidów. Podobnie dynamika oraz przestrzenny charakter ruchu molekularnego sond spinowych w błonie zależy od ich oddziaływania z komponentami lipidowymi i proteinowymi, tworzącymi tę strukturę. W przeprowadzonych pomiarach dobrano eksperymentalnie tak niskie stężenie znaczników, by po ich inkorporacji do błony nie wystąpił efekt poszerzenia linii widmowych EPR spowodowany oddziaływaniem wymiennym między ich cząsteczkami (efekt ten nie występuje, gdy stosunek molowy cząsteczek znacznika w błonie do lipidów błonowych nie przekracza 1%). Do znakowania



Ryc. 1. Wzory strukturalne znaczników (sond) spinowych stosowanych w pracy. Kropką oznaczono niesparowany elektron tworzący grupę reporterową znacznika

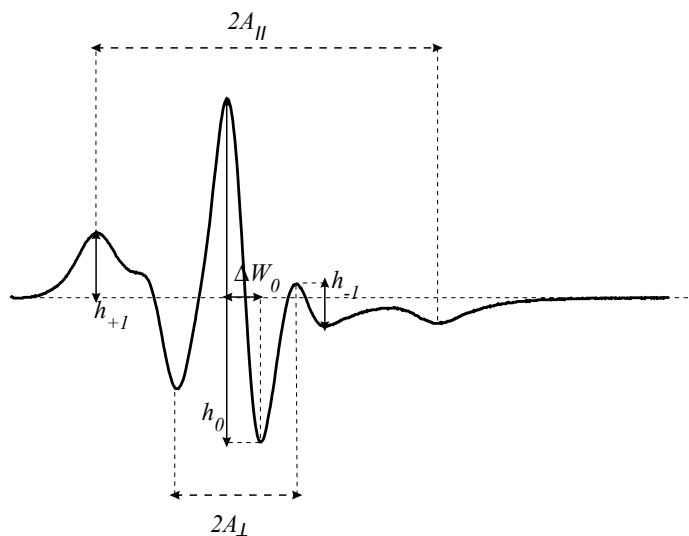
Fig. 1. Chemical structures of spin labels used in experiments. The dot notes the position of the unpaired electron

błon komórkowych wykorzystywano 50 μM roztwory 5DS i 16DS w etanolu. Procedurę tę przeprowadzano wytwarzając wstępnie warstwę znacznika na ściankach próbówki PVC poprzez odparowanie na nich 2 μl roztworu znacznika. Do tak przygotowanej próbówki wprowadzano 1ml zawiesiny komórek, wytrząsano przez 30 sekund i pozostawiano na 30-minutową inkubację w temperaturze pokojowej. Po okresie inkubacji pobierano 150 μl zawiesiny do szklanej kapilary, którą umieszczano w kwarcowej rurce pomiarowej we wnętrzu rezonansowej spektrometru EPR (VARIAN E-7). Widma EPR tak oznakowanych komórek rejestrowano w temperaturze pokojowej (22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ przy następujących parametrach skaningu: częstotliwość mikrofal 9,75 GHz, szerokość skanu 100G, centrum skanu 3370G, częstotliwość modulacji pola magnetycznego 100 kHz, amplituda modulacji 5G, stała czasowa skanu 0,1 s, czas skanu 4 min. Przykładowe widma uzyskane dla erytrocytów, granulocytów oraz limfocytów oznakowanych sondami spinowymi 5DS oraz 16DS przedstawia ryc. 2.



Ryc. 2. Przykładowe widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) otrzymane dla erytrocytów, limfocytów i granulocytów oznakowanych znacznikami 5DS (grupa reporterowa blisko zewnętrznej powierzchni błony) oraz 16DS (grupa reporterowa w centralnej części błony)

Fig. 2. EPR spectra of erythrocytes, lymphocytes and granulocytes labeled with 5DS (labeled moiety at carbon 5, closest to polar headgroups) and 16DS (labeled moiety at carbon 16, closest to the bilayer center)



Ryc. 3. Parametry odczytywane z widm EPR w celu określenia dynamiki i przestrzennego charakteru molekularnego ruchu cząsteczki znacznika

Fig. 3. EPR spectrum parameters dependent on dynamics and degrees of freedom of the spin label molecule

Ryc. 3 przedstawia parametry, które odczytywano z każdego widma w celu dalszych obliczeń.

Podstawowym parametrem poddanym analizie był parametr uporządkowania S wyliczony dla uzyskanych widm EPR z zależności [8, 9, 4]:

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{ZZ} - \frac{1}{2}(A_{XX} + A_{YY})} \cdot \frac{a}{a'}, \quad (1)$$

gdzie a jest związkiem między stałymi rozszczepienia izotropowego dla cząsteczek nitroksylowych w fazie krystalicznej:

$$a = \frac{1}{3} \cdot (A_{XX} + A_{YY} + A_{ZZ}), \quad (2)$$

zaś a' związkiem między stałymi rozszczepienia izotropowego dla cząsteczek nitroksylowych w błonie (faza ciekłokrystaliczna):

$$a' = \frac{1}{3} \cdot (A_{//} + 2A_{\perp}). \quad (3)$$

Wartości $A_{//}$ oraz A_{\perp} są odczytane z uzyskanych widm – z odległości między zewnętrznymi maksimumami rozszczepienia nadsubtelnego oraz między maksimumami wewnętrznymi, tak jak to przedstawia ryc. 3. Analogiczne wartości dla znacznika w fazie krystalicznej przyjęto na podstawie danych literaturowych: $A_{XX} = A_{YY} = 6,1\text{G}$, $A_{ZZ} = 32,4\text{G}$.

Parametr uporządkowania S przyjmuje wartości zawierające się w przedziale $0 \leq S \leq 1$. Wartość maksymalna $S = 1$ oznacza, że ruch cząsteczki znacznika nie występuje a jego rozkład przestrzenny jest całkowicie izotropowy; wartość minimalna $S = 0$ jest w sytuacji, gdy ruch cząsteczek znacznika jest całkowicie izotropowy (stan maksymalnego nieuporządkowania). Wartość parametru uporządkowania wyznaczana dla sond spinowych w błonach biologicznych zależy od wielu czynników związanych ze stanem błony: stosunku białek i lipidów w błonie, stosunku nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych, zawartości cholesterolu, poziomu związanego z błoną Ca^{++} . Parametr uporządkowania jest więc bardzo czułym parametrem związanym z płynnością błony lipidowej [8, 9].

Kolejnymi z wyznaczanych z widm EPR parametrów były czasy korelacji znacznika w błonie, charakteryzujące dynamikę ruchu molekularnego [3, 12]:

$$\tau_B = \frac{1}{2} \cdot C_1 \cdot \Delta W \cdot \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} - \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} \right), \quad (4)$$

$$\tau_C = \frac{1}{2} \cdot C_2 \cdot \Delta W \cdot \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} + \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 2 \right), \quad (5)$$

gdzie ΔW , h_0 , h_{+1} , h_{-1} są parametrami odczytanymi z uzyskanych widm EPR (ryc. 3), a wartości stałych C_1 i C_2 przyjęto, zgodnie z literaturą: $C_1 = 1,27 \cdot 10^{-9}$ s, $C_2 = 1,19 \cdot 10^{-9}$ s. (Ponieważ w analizie uzyskanych wyników porównywano jedynie zmiany wyliczonych z zależności (1), (4) i (5) wartości, wielkości stałych współczynników równań nie miały istotnego znaczenia). Czasy korelacji τ_B i τ_C określają odpowiednio dynamikę ruchu cząsteczki znacznika związaną z jego dyfuzją lateralną w kierunku prostopadłym do jego długiej osi (τ_B) oraz rotacją w błonie (τ_C). Czasy te można poglądowo interpretować na sposób „fotograficzny” – jako maksymalne czasy otwarcia migawki, przy których fotografowany obiekt widoczny jest na zdjęciu jako „nie poruszony”. Ze wzrostem dynamiki ruchu ulegają one skróceniu.

WYNIKI

Ryc. 2 przedstawia otrzymane w wybranych przypadkach widma EPR spinowo oznakowanych erytrocytów, granulocytów i limfocytów. Kształty widm są typowe dla zastosowanych sond spinowych, wskazują na pełną inkorporację sond do błon badanych komórek oraz na zaniebdywane oddziaływanie wymienne między cząsteczkami znaczników w błonie. Dla każdego z użytych znaczników (5DS, 16DS) bardzo wyraźnie widać również różnicę w kształtach widm otrzymanych dla różnych komórek. Różnice te wynikają z różnej struktury błon tych komórek, powodującej ich różną mikrolepkość (płynność). Dla każdej z grup komórek widać ponadto różnicę między widmem otrzymanym dla znacznika 5DS i 16DS. Wynika ona z różnej lokalizacji nitroksylowej grupy reporterowej cząsteczki znacznika w błonie. Dla sondy 5DS położenie tej grupy jest bliskie zewnętrznej, silnie polarnej części błony, co w konsekwencji daje efekt silnej immobilizacji znacznika w błonie. W wypadku znacznika 16DS lokalizacja tej grupy jest bliższa wewnętrznej, centralnej części błony, gdzie niewielka polarność środowiska pozwala na znacznie większą dynamikę ruchu oraz mniejszy stopień jego anizotropii. Ilościowy opis tych efektów zawierają tabele I i II.

Tab. I

Wartości parametru uporządkowania S oraz czasów korelacji τ_B i τ_C dla błon komórkowych erytrocytów, limfocytów i granulocytów oznakowanych znacznikiem 5DS: z.s. znamiennosc statystyczna dla hipotezy, że wartość danego parametru dla grupy kontrolnej oraz grupy z łuszczycą jest różna (n.z. – różnica nieznacząca)

The values of order parameter S, correlation times τ_B and τ_C calculated for erythrocytes, lymphocytes and granulocytes membranes labeled with 5DS spin probe: z.s. level of significance for the hypothesis of different parameter values between control and psoriatic samples (n.z. – non significant)

Znacznik 5DS / 5DS spin label									
	kon- trola control	łusz- czyca psoriasis	z.s.	kon- trola control	łusz- czyca psoriasis	z.s.	kontrola control	łuszcz- czyca psoriasis	z.s.
	S	S		τ_B	τ_B		τ_C	τ_C	
Erytrocyty Erythrocytes	0,674	0,688	n.z.	7,570	7,699	<0,01	13,578	14,084	n.z.
Limfocyty Lymphocytes	0,725	0,749	<0,01	4,795	3,747	<0,001	12,229	10,819	<0,001
Granulocyty Granulocytes	0,721	0,731	<0,01	5,024	4,115	<0,001	11,906	11,242	<0,01

Tab. II

Wartości parametru uporządkowania S oraz czasów korelacji τ_B i τ_C dla błon komórkowych erytrocytów, limfocytów i granulocytów oznakowanych znacznikiem 16DS: z.s. znamiennosc statystyczna dla hipotezy, że wartość danego parametru dla grupy kontrolnej oraz grupy z łuszczycą jest różna. (n.z. – różnica nieznacząca)

The values of order parameter S, correlation times τ_B and τ_C calculated for erythrocytes, lymphocytes and granulocytes membranes labeled with 16DS spin probe: z.s. level of significance for the hypothesis of different parameter values between control and psoriatic samples (n.z. – non significant)

Znacznik 16DS / 16DS spin label									
	kon- trola control	łusz- czyca psoriasis	z.s.	kon- trola control	łusz- czyca psoriasis	z.s.	kontrola control	łuszcz- czyca psoriasis	z.s.
	S	S		τ_B	τ_B		τ_C	τ_C	
Erytrocyty Erythrocytes	0,315	0,324	n.z.	2,054	1,942	n.z.	2,537	2,377	n.z.
Limfocyty Lymphocytes	0,661	0,624	<0,01	6,515	4,775	<0,001	9,311	7,062	<0,001
Granulocyty Granulocytes	0,654	0,634	<0,01	6,388	5,922	<0,01	9,091	8,417	<0,01

W przypadku erytrocytów, zarówno dla znacznika 5DS jak i 16DS, nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic między wartościami wyliczanych parametrów dla komórek z grupy kontrolnej oraz pochodzących od pacjentów z łuszczycą. Wyjątkiem jest tutaj czas korelacji τ_B , który dla znacznika 5DS wykazał większą wartość dla grupy z łuszczycą. Wynik ten można interpretować jako zmniejszenie płynności błon erytrocytarnych w tej grupie. Zmianę taką, obserwowaną w zewnętrznych regionach błony (sonda 5DS), najczęściej tłumaczy się zwiększeniem sztywności błony.

Dla limfocytów i granulocytów wszystkie wyznaczane parametry wykazały statystycznie znamienne różnice wartości między obydwoma badanymi grupami. Bardzo ciekawym efektem, który tutaj zaobserwowano dla obu typów komórek, był wzrost wartości parametru uporządkowania S w stosunku do grupy kontrolnej dla zewnętrznej części błony (sonda 5DS) oraz zmniejszenie jego wartości w regionie centralnym (sonda 16DS). Wartości czasów korelacji τ_B i τ_C limfocytów i granulocytów od pacjentów z łuszczycą uległy w porównaniu z grupą kontrolną skróceniu – zarówno w peryferyjnych jak i centralnych obszarach błon komórkowych.

DYSKUSJA, WNIOSKI

Erytrocyty

W przeciwieństwie do danych innych autorów [5, 6, 7], zaobserwowane przez nas zmiany strukturalne błon erytrocytarnych spowodowane łuszczycą są niewielkie i, w zasadzie, zaniebdywalne. Trudno jest ten fakt wyjaśnić, warto tylko zwrócić uwagę, że nasze badania były przeprowadzone na liczniejszych grupach. Zmiany wartości parametru uporządkowania S i czasów korelacji obydwu znaczników, choć statystycznie nieistotne, mogą być spowodowane większą pulą cholesterolu błonowego w błonach erytrocytarnych u pacjentów z łuszczycą. Z całą pewnością można jednak wykluczyć jako przyczynę tych zmian stres oksydacyjny w błonie erytrocytarnej, ponieważ w takim wypadku obserwuje się znacznie silniejsze zmiany wartości tych parametrów.

Limfocyty, granulocyty

Błony komórkowe limfocytów i granulocytów u pacjentów z łuszczycą, w swych peryferyjnych obszarach, wykazały efekt zmniejszenia płynności, czego odbiciem było zwiększenie wartości parametru uporządkowania S. Regiony centralne błon tych komórek ujawniły również bardzo silne zaburzenie swjej struktury, jednakże dające w efekcie zmniejszenie wartości parametru S, oznaczające zwiększenie płynności tych obszarów. Ponadto uzyskane wyniki wskazują, że zmiany strukturalne głębokich obszarów błony, bliskich jej części centralnej, były większe niż zmiany, które zaszły na jej powierzchni. Obraz taki jest bardzo typowy dla zmian strukturalnych spowodowanych stresem oksydacyjnym w błonie prowadzącym do peroksydacji lipidów. Dodatkowym potwierdzeniem tego wniosku jest zaobserwowane skrócenie czasów korelacji obu znaczników, świadczące również o generalnym wzroście płynności błony.

PIŚMIENNICTWO

1. Baz K., Cimen M. Y. B., Kocuturk A., Yazici A. C., Eskandari G., Ikizoglu G., Api H., Atik U.: Oxidant/antioxidant status in patients with psoriasis. *Yonsei Med. J.* 2003, 44,6, 987. – 2. Briganti S., Picardo M.: Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2003, 17, 6, 663. – 3. Cannon B., Polnaszek C. F., Butler K. W., Eriksson L. E., Smith I. C. P.: The fluidity and organization of mitochondrial membrane lipids of the brown adipose tissue of cold-adapted rats and hamsters as determined by nitroxide spin probes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1975, 167, 2, 505. – 4. Cassera M. B., Silber A. M., Gennaro A. M.: Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance (EPR) spin label study. *Biophys. Chem.* 2002, 99, 2, 117. – 5. Górnicki A.: Domain structure of erythrocyte membranes in psoriasis: an EPR study. *J. Dermatol. Sci.* 2002, 29,3, 214. – 6. Górnicki A., Gutsze A.: Erythrocyte membrane fluidity changes in psoriasis: an EPR study. *J. Dermatol. Sci.* 2001, 27,1, 27. – 7. Górnicki A., Gutsze A.: In vivo and in vitro influence of etretinate on erythrocyte membrane fluidity. *Eur. J. Pharmacol.* 2001, 423, 2/3, 127. – 8. Griffith O. H., Jost P. C.: Spin labels in biological membranes. Spin labeling: theory and applications, Ed. Berliner L. J., New York, Academic Press, 1976, 454. – 9. Koter M., Grzeźlińska E.: Interpretacja widm znaczników spinowych stosowanych w badaniach płynności lipidów błon. *Zagad. Biofiz. Współcz.*, 1989, 14, 103. – 10. Rocha-Pereira P., Santos-Silva A., Rebelo I., Figueiredo A., Quintanilha A., Teixeira F.: The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 2004, 150, 5, 917.
11. Rocha-Pereira P., Santos-Silva A., Rebelo I., Figueiredo A., Quintanilha A., Teixeira F.: Dislipidemia and oxidative stress in mild and in severe psoriasis as a risk for cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta.* 2001, 303, 1/2, 33.
12. Schreier S., Polnaszek C. F., Smith I. C. P.: Spin labels in membranes. problems in practice. *Biochim. Biophys. Acta* 1978, 515, 4, 395.

J. Nowak, B. Nedoszytko

STRUCTURAL ANALYSIS OF THE CELL MEMBRANES OF RED BLOOD CELLS,
LYMPHOCYTES AND GRANULOCYTES IN PSORIATIC PATIENTS – A SPIN LABEL STUDY

Summary

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disorder characterized by a focal dense infiltration of neutrophils, T lymphocytes and macrophages that migrate from the vascular system to the skin. Oxygen metabolites and proteases released by activated inflammatory cells may induce oxidative and proteolytic damage in the skin and blood cells. Patients with psoriasis showed changes in blood cell count: reduced red blood cells (RBC) number, and increased number of leukocytes, mainly neutrophils and basophils. RBC have reduced antioxidant defense, osmotic fragility and elevated membrane lipid peroxidation.

The aim of our study was to determine the influence of such effects on the cells membrane structures and dynamics of membrane molecular motion. The study was performed in 46 psoriatic patients and in 20 control healthy donors. From each person the erythrocytes, lymphocytes and granulocytes were isolated from peripheral blood. The cells were marked with spin labels: 5-doxyl-stearic acid (5DS) and 16-doxyl-stearic acid (16DS) and electron spin resonance spectra (EPR) were analyzed.

The spin labels used in our study allowed to observe the membrane structure changes near their external (5DS) or the medium part (12DS). The EPR parameters, which were calculated from the obtained EPR spectra, were: an order parameter S , correlation times τ_B and τ_C (lateral and rotational).

The results obtained from the analysis of EPR spectra show that the erythrocytes isolated from psoriatic patients have a lower membrane fluidity. This effect could be related to an increase in the cholesterol content.

We have also found an increase in membrane fluidity in psoriatic patients' lymphocytes and granulocytes, especially in the medium part of the membranes. This could be related to lipid peroxidation process.

Adres: dr Jerzy Nowak
Katedra i Zakład Fizyki i Biofizyki AMG
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
e-mail: jnowak@amg.gda.pl