

УДК: 576.324:612.111

## Характеристика быстрых изменений формы эритроцитов в сахарозной среде

С.В.Руденко<sup>1</sup>, Л.Ші<sup>2</sup>, В.А.Бондаренко<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)<sup>2</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)  
rsv@kharkov.ua

Изучена динамика изменений формы эритроцитов человека после их введения в изотоническую сахарозную среду с низким содержанием ионов хлора. Установлено, что наиболее распространенным типом реакции является трехфазная последовательность изменений формы клеток, состоящая из быстрой сферуляции (фаза 1), последующего восстановления дискоидной формы (фаза 2) и повторной сферуляции (фаза 3), конкретные параметры которой могут варьировать в довольно широких пределах. Благодаря указанным трем фазам зависимость индекса формы от времени выглядит в виде пика, параметры которого служат основой для классификации морфологического ответа (МО) клеток по типам. Условно выделено шесть типов МО. Установлено, что конкретный тип МО может варьировать от донора к донору, зависит от длительности инкубации эритроцитов в сток-растворе и его состава, очень чувствителен к конкретному составу раствора сахарозы, присутствию в нем EDTA, ионов кальция, хлоридов, гидрокарбоната, а также очень небольших количеств внеклеточного гемоглобина. В результате этого МО является высоковариабельным, но в то же время высоковоспроизводимым процессом. Для некоторых типов МО процесс изменения формы эритроцитов от сферы к диску и обратно происходит за небольшое время порядка 10 с.

**Ключевые слова:** эритроциты, форма, морфологический ответ, низкая ионная сила, сахароза.

## Характеристика швидких змін форми еритроцитів в сахарозному середовищі

С.В.Руденко, Л.Ші, В.А.Бондаренко

Вивчено динаміку змін форми еритроцитів людини після їхнього введення в ізотонічне сахарозне середовище з низьким вмістом іонів хлору. Встановлено, що найбільш розповсюдженим типом реакції є трифазна послідовність змін форми клітин, що складається зі швидкої сферуляції (фаза 1), наступного відновлення дискоїдної форми (фаза 2) і повторної сферуляції (фаза 3), конкретні параметри якої можуть варіювати в досить широких межах. Завдяки зазначеним трьом фазам залежність індексу форми від часу виглядає як пік, параметри якого є основою для класифікації морфологічної відповіді (МО) клітин по типах. Умовно виділено шість типів МО. Встановлено, що конкретний тип МО може варіювати від донора до донора, залежить від тривалості інкубації еритроцитів у сток-розчині і його складу, дуже чутливий до конкретного складу розчину сахарози, присутності в ньому EDTA, іонів кальцію, хлоридів, гідрокарбонату, а також дуже невеликих кількостей позаклітинного гемоглобіну. У результаті цього МО є досить варіабельним, але в той же час досить відтворюваним процесом. Для деяких типів МО процес зміни форми еритроцитів від сфери до диска і назад відбувається за невеликий час порядку 10 с.

**Ключові слова:** еритроцити, форма, морфологічна відповідь, низька іонна сила, сахароза.

## Characterization of fast shape changes of erythrocytes in sucrose medium

S.V.Rudenko, L.Shi, V.A.Bondarenko

The dynamics of erythrocyte shape changes upon their transfer into sucrose media with low content of chloride ions was studied. The data show that the most prominent type of response is the triphasic sequence of shape changes consisting of fast transformation into the spheres (phase 1), followed by discoid shape restoration (phase 2) and final transformation into spherostomatocytes (phase 3) parameters of which could be significantly varied. Due to phases mentioned above, the shape index dependence versus time (morphological response) is visualized as a spike parameters of which are served as a basis for type classification of response. Six types of morphological response were identified. It was found that individual morphological response could be varied depending on donor used, time of cell equilibration in stock solution and its content. It is very sensitive to composition of sucrose solution like the presence of EDTA, calcium, chlorides, hydrocarbonates as well as very small amount of extracellular hemoglobin. As a result morphological response was found to be a highly variable but at the same time a highly reproducible process. For some types of morphological response the fast shape transformation from sphere to disc and back to sphere occurs within 10 s time interval.

**Key words:** erythrocytes, shape, morphological response, low ionic strength, sucrose.

### Введение

Известно, что эритроциты, функционирующие в русле крови в виде двояковогнутых дисков, приобретают форму стоматоцитов при их переносе в среды с низкой ионной силой, в которых электролит хлорид натрия изоосмотически замещен на сахарозу. Эту трансформацию объясняют деполаризацией мембраны (Glaser et al., 1987; Bennekou et al., 2004) и установленной корреляцией между положительным потенциалом внутри клетки и стоматоцитозом (Glaser, 1998; Muller et al., 1986; Hartmann, Glaser, 1991). Нужно отметить, что в этих условиях происходит также активация некоторых транспортных механизмов, которые в нормальных физиологических условиях редуцированы, например, резко увеличивается проницаемость мембраны для калия и натрия (Sambasivarao et al., 1986; Jones, Knauf, 1985; Zeidler, Kim, 1979) и активируется неселективный потенциал-зависимый канал (NSVDC-nonselective voltage dependent channel) (Bennekou et al., 2004; Barksman et al., 2004). Можно ожидать, что эти аномальные процессы могут отразиться на стационарной форме эритроцитов или на динамике ее изменения при изменении электролитного состава среды, которая не является достаточно изученной. Поэтому целью данной работы было установить и охарактеризовать морфологические изменения эритроцитов, которые могут происходить при их переносе в неэлектролитную среду с помощью неинвазивного метода регистрации динамики изменения формы эритроцитов (Руденко и др., 1998; Руденко, 2006).

### Материалы и методы

Работу проводили на свежих эритроцитах человека, а также в отдельных случаях на эритроцитах, хранившихся в течение не более 4 дней при 4°C, которые после забора на антикоагулянт (цитрат натрия) сначала дважды отмывали путем центрифугирования в течение 2 мин (центрифуга ОПН-3, 3000 об/мин) в незабуференном физиологическом растворе PS (150 мМ NaCl), а затем 100 мкл упакованного осадка переносили в 900 мкл изотонического раствора HBS (150 мМ NaCl, 5 мМ HEPES, pH 7,4) или PS и использовали как сток-суспензию. В отдельных случаях клетки переносили в раствор Рингера (147 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 2,2 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 6,5) или Трисоль (85,5 мМ NaCl, 13,4 мМ KCl, 47,6 мМ NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5). Для изучения изменений формы клеток во времени использовали неинвазивный метод, реализованный с помощью двухканального формометра-агрегометра ФА-01, который наряду с измерением оптической плотности (ОП) или светопропускания измеряет и флуктуации интенсивности светового потока, которые несут информацию о форме клеток. Индекс формы (ИФ) рассчитывался по протоколу, описанному ранее для определения формы эритроцитов (Руденко и др., 1998; Руденко, 2006) и вычислялся по формуле  $ИФ = k \cdot D$ , где  $k$  – постоянный коэффициент, зависящий от коэффициента усиления сигнала и от калибровки прибора, а  $D$  – среднеквадратичное значение амплитуды флуктуаций светового потока, которое вычисляли на временном интервале, равном 1 с. Калибровочный коэффициент  $k$  позволяет сформировать шкалу измерений ИФ, которая отражает степень дискоидности (или сферичности) эритроцитов (1 – для дисков и 0,06 – для сфер). В цилиндрическую стеклянную кювету диаметром 10 мм, содержащую 2 мл раствора HBS, добавляли 9–11 мкл сток-суспензии эритроцитов таким образом, чтобы начальное значение ОП было в пределах  $0,30 \pm 0,02$ . Клеточная суспензия перемешивалась магнитной мешалкой со скоростью 600 об/мин. Динамика морфологических изменений изучалась при введении того же количества клеток в среду 0,3 М сахарозы без буфера «Merck», pH 5,8–6,2. В отдельных экспериментах дополнительные реагенты (от 5 до 100 мкл) добавляли непосредственно в кювету из концентрированных растворов до получения заданной конечной концентрации. Концентрацию гемоглобина в надосадках измеряли с помощью метода Драбкина, используя для калибровки стандартный раствор гемоглобина с концентрацией 120 г/л, или по величине их оптической плотности, измеренной на длине волны 415 нм, относительно стандарта.

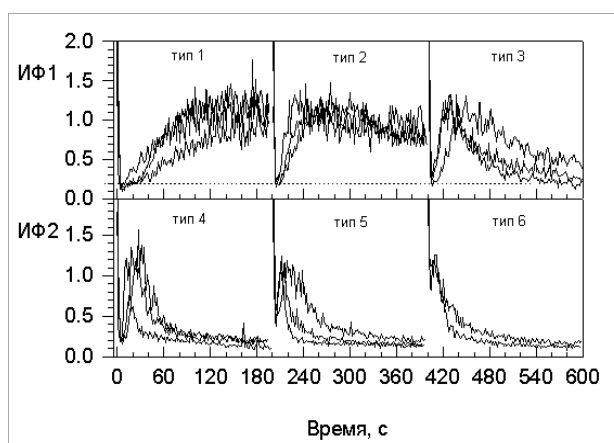
Стационарная морфология клеток через 5 мин после их эквilibрации в кювете или ее динамика контролировались оптической микроскопией в тонком жидком слое без применения фиксирующих агентов, чтобы иметь возможность учесть эффект стекла (Eriksson, 1990). На рисунках представлены типичные данные, от 3 до 5 независимых экспериментов, проведенных с кровью различных доноров при комнатной температуре 20–22°C. В работе использовали следующие реактивы: сахарозу фирмы «Merck», EDTA (четырёхнатриевую соль), додецилсульфат натрия (SDS) «Sigma», HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) «Serva», гемоглобин-стандарт для клинических исследований «Россия», раствор Рингера «Юрия-Фарм, Украина», раствор Трисоль «ЗАО Биофарма, Украина».

## Результаты

Целью данной работы было зарегистрировать и охарактеризовать изменения формы эритроцитов при их введении в неэлектролитную среду, но поскольку морфология этих клеток достаточно критична к наличию микропримесей и, поэтому, существенно зависит от чистоты реагентов, необходимо было вначале убедиться, что наблюдаемый ответ связан именно с изменением электролитного состава среды, а не с какими-то другими, сопутствующими факторами. В данной ситуации, не зная априори реакцию эритроцитов, есть риск спутать эффекты собственно сахарозы, низкой ионной силы, неконтролируемых микропримесей, а также эффекты взаимодействия всех этих факторов. В связи с этим мы максимально упростили состав сред, используемых для отмывки и эквilibрации эритроцитов, и проверили растворы, приготовленные из сахарозы различных производителей. Поскольку получаемые результаты не отличались достаточной стабильностью, что могло быть связано с качеством сахарозы, для исключения фактора «производителя» было решено использовать только один препарат сахарозы производства «Merck», который по характеристикам содержал минимальное количество примесей. Несмотря на это, кинетика изменения индекса формы, которая регистрировалась после введения эритроцитов в среду сахарозы, варьировала от эксперимента к эксперименту, что могло указывать на то, что морфологическая реакция клеток зависит от индивидуальных показателей образцов крови, в частности от ее группы или каких-либо иных свойств. Оказалось, однако, что ответ эритроцитов одного и того же донора также подвергался подобным вариациям. Для того чтобы выяснить возможные причины обнаруженной вариабельности, мы проанализировали 201 контрольный морфологический ответ, полученный на крови 68 доноров. При этом было приготовлено 45 образцов сахарозных растворов емкостью 100 мл каждый.

Анализ полученных данных позволил установить, что зависимость ИФ от времени после введения эритроцитов в сахарозную среду (морфологический ответ (МО)) может быть условно подразделена на 6 основных типов, характерные примеры которых приведены на рис. 1. Основанием для подобной классификации является вид зависимости ИФ от времени и некоторые ее количественные показатели.

Как можно видеть, в целом морфологический ответ представляет собой кривую в виде широкого или узкого пика, конкретные количественные показатели которого могут значительно отличаться. Такая форма зависимости ИФ от времени указывает на то, что клетки после помещения их в раствор сахарозы сначала быстро сферулируются, что фиксируется по значительному уменьшению ИФ (фаза 1). Затем значение ИФ восстанавливается до величин, характерных для дискоидных клеток в физиологическом растворе – 1,0–1,2 (фаза 2), после чего ИФ снова уменьшается (фаза 3).



**Рис. 1. Примеры характерных типов изменения индекса формы эритроцитов во времени (морфологического ответа) после их введения в сахарозную среду (0,3 М). Каждая кривая соответствует полному отдельному эксперименту, включающему выделение эритроцитов различных доноров и приготовление новых растворов сахарозы**

Первые 4 типа характеризуются низким (меньше 0,2) значением ИФ, которое клетки достигают на фазе 1. Отличие между ними состоит в последующей динамике изменения ИФ. Тип 1 характеризуется наименьшей скоростью восстановления ИФ на фазе 2. Для типа 2 эта скорость больше и начинает появляться фаза 3, т.е. вторичное уменьшение ИФ. Для типа 3 эта фаза

становиться ще більш вираженою, но значення ІФ не зменшується до 0,2 на характерному часовому відрізку перетворень 3–5 хв. Тип 4 відрізняється від типу 3 тим, що всі фази стають чітко визначеними, залежність має форму достатньо вузького піка, а значення ІФ зліва і справа від максимуму менше 0,2. Типи 5 і 6 характеризуються, в основному, тим, що значення ІФ на фазі 1, т.е. в початку морфологічного відповіді, перевищує 0,2, що говорить про те, що еритроцити в цьому випадку не піддаються повній сферуляції, а в випадку типу 6 взагалі слабо змінюють свою близьку до дисконічної форму, оскільки ІФ залишається близьким до одиниці. Критичне значення ІФ рівне 0,2 вибрано тому, що, за нашими даними, клітки, які мають менше значення індекса, мікроскопічно мають сильну ступінь стоматоцитоза або ехіноцитоза.

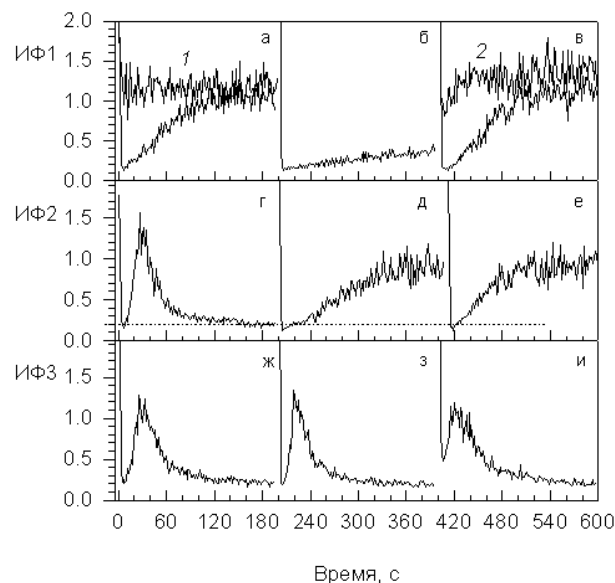
Дані таблиці показують, що, серед всіх досліджуваних нами випадків, перші 4 типи зустрічаються приблизно з однаковою ймовірністю, а ймовірність типу 5 і, в особливості, типу 6, значно менше.

Таблиця.

**Процент зустрічальності різних типів морфологічного відповіді еритроцитів при їх введенні в середу сахарози (0,3 М) серед всіх досліджуваних випадків (n=201)**

Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 4	Тип 5	Тип 6
20,4	20,4	20,9	24,9	10,9	2,5

Далі було встановлено, що еритроцити одного донора можуть демонструвати різні типи морфологічного відповіді в різних зразках сахарози, що показано на рис. 2. При цьому було помічено, що в більш старих зразках сахарози, які зберігалися при 2°C, відзначається тенденція до морфологічного відповіді типу 1 і 2 (рис. 2, а–в, д, е), тоді як в свіжих розчинах сахарози – до типу 3 і 4.



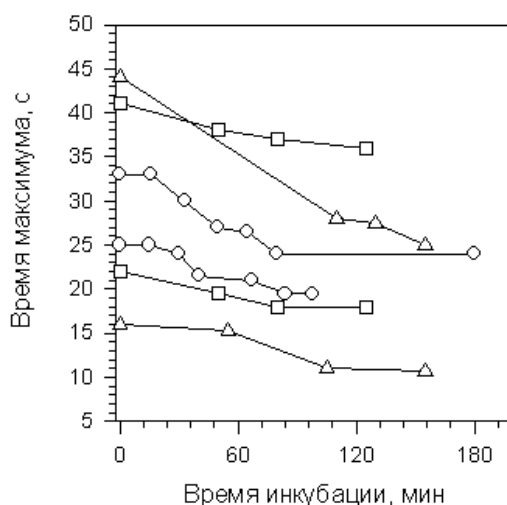
**Рис. 2. Кінетика трансформації еритроцитів одного донора в різних зразках розчину сахарози з концентрацією 0,3 М з терміном зберігання не більше трьох днів при температурі 2°C. Крива 1 – реакція кліток при їх введенні в фізіологічний розчин (HBS); крива 2 – при їх введенні в розчин сахарози (0,3 М), додатково містить 15 мМ NaCl**

Для уточнення припущення, що властивості сахарозних розчинів, приготованих за стандартною процедурою, тим не менше, можуть відрізнятися (наприклад, в результаті бактеріального забруднення), був проведений перевіряючий експеримент на еритроцитах одного донора, які в одному розчині давали відповідь типу 1, а в другому – типу 4. Змішуючи ці два різних розчини сахарози, ми отримали, що з збільшенням вмісту сахарози з відповіддю типу 4 в суміші МО послідовно трансформуються від типу 1 до типу 4 через типи 2 і 3. Це говорить про те, що

исходные свойства этих растворов в отношении МО эритроцитов действительно отличаются, хотя какова основа этих различий, остается неясным. Можно было предположить, что такой широкий разброс контрольной реакции эритроцитов при их введении в сахарозную среду связан с двумя основными факторами: 1) изменением свойств растворов сахарозы, например, за счет бактериального загрязнения или наличия микропримесей и 2) изменением свойств эритроцитов в процессе их выделения и хранения.

Для того чтобы исключить изменения свойств сахарозы, по крайней мере, за счет бактериального загрязнения, приготовленные растворы использовали в течение не более двух дней (в день приготовления и на следующий день) и хранили при 2°C.

В известной мере вариабельность может быть обусловлена дрейфом свойств клеток при их инкубации в сток-растворе. Действительно, как следует из рис. 3, наблюдается изменение характера МО во времени.



**Рис. 3. Зависимость времени достижения максимума ИФ в процессе трансформации эритроцитов в среде сахарозы (0,3 М) от времени, прошедшем после выделения клеток. Эритроциты 6 доноров инкубировали при комнатной температуре в сток-растворе HBS**

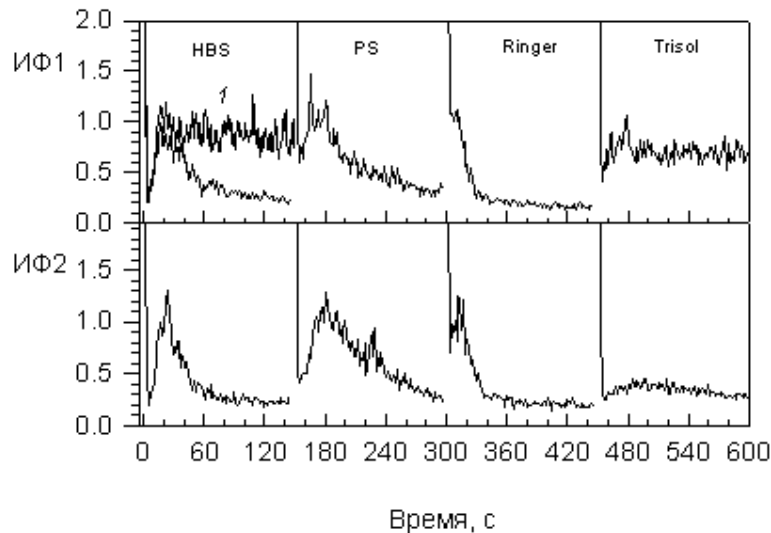
По мере увеличения продолжительности инкубации пик МО обостряется, а его максимум сдвигается влево по оси времени. Видно, что этот процесс также может отличаться для различных доноров. Клетки одних доноров могут быть достаточно стабильными и мало изменяться со временем, тогда как клетки других доноров в тех же условиях могут изменяться в большей степени, что отражается на их МО.

На рис. 4 показано, что МО сильно зависит от состава сток-раствора, в котором отмываются и хранятся клетки в ходе эксперимента. Клетки, инкубированные в HBS, показывают МО типа 4, в PS – типа 5, в растворе Рингера – типа 6, а в растворе Трисоль некоего промежуточного типа. При этом можно отметить, что в растворах HBS, PS и Рингера клетки мало изменяют свою реакцию через 2 и 4 часа после выделения, но сильно меняют ее в Трисоль. Оказалось, что того количества раствора Трисоль, которое вносится в сахарозу вместе с клетками (7–10 мкл), и защелачивания среды с  $pH=6,0\pm 0,2$  до  $pH=7,0\pm 0,2$  уже достаточно, чтобы видимым образом изменить МО клеток, инкубированных в HBS (рис. 4, кривая 1), но этого не происходит при внесении в среду такого же количества PS или раствора Рингера.

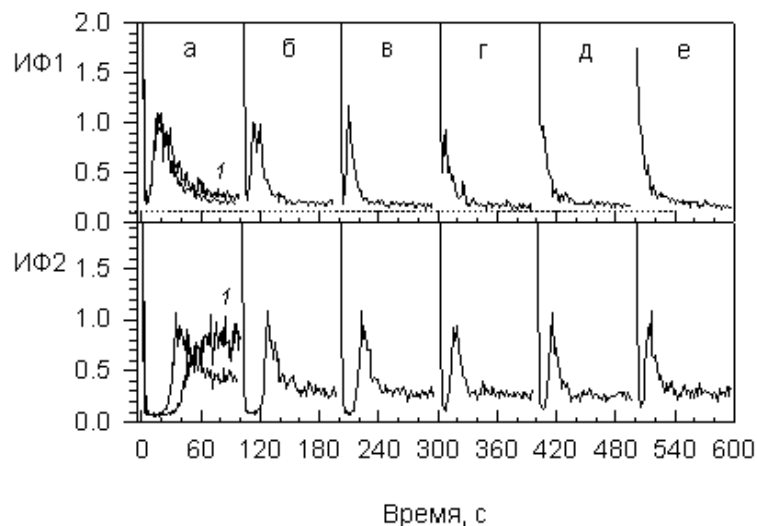
Это говорит о том, что МО типа 6 в случае раствора Рингера не связан с тем количеством катионов кальция, который вносится одновременно с клетками (конечная концентрация ~10 мкМ). Само по себе внесение гидрокарбоната из раствора Трисоль (конечная концентрация ~250 мкМ) также не может объяснить сильное изменение МО клеток, инкубированных в этом растворе, через 4 часа. Следовательно, можно заключить, что два фактора – конкретный состав раствора сахарозы с учетом добавок, вносимых в него вместе с клетками из сток-раствора, и сам его состав существенно влияют на МО.

Поскольку МО клеток, инкубированных в растворе Рингера, значительно отличается от МО клеток в HBS, и, принимая во внимание его зависимость от времени инкубации клеток в сток-растворе, можно предположить, что в регуляции МО принимают участие катионы кальция, а также

компоненты, выделяющиеся в среду в результате спонтанного гемолиза эритроцитов, в первую очередь, гемоглобин. Действительно, добавление небольшого количества надосадка из сток-раствора клеток, в котором визуально наблюдался небольшой гемолиз, в раствор сахарозы, приводило к подобному эффекту, а именно к сдвигу влево пика МО свежего образца крови. На рис. 5 показан эксперимент, который моделирует влияние гемолиза на МО эритроцитов в отсутствие и в присутствии EDTA. Аликвоту клеток полностью лизировали в бидистиллированной воде и затем соответствующее количество этого раствора добавляли в кювету, чтобы обеспечить заданный уровень гемолиза. Как видно, гемоглобин и EDTA обладают разнонаправленным действием на МО.



**Рис. 4.** Зависимость МО эритроцитов в среде сахарозы (0,3 М), измеренного через 2 часа (ряд 1) и 4 часа (ряд 2) после выделения клеток одного донора, от состава сток-раствора, в котором отмывали и инкубировали клетки при комнатной температуре. Кривая 1 показывает МО эритроцитов, инкубированных в HBS, после их внесения в сахарозную среду, дополнительно содержащую такое же количество раствора Trisol, которое вносили в кювету вместе с клетками в случае, показанном в колонке Trisol



**Рис. 5.** Влияние гемолизата, моделирующего спонтанный гемолиз эритроцитов в сток-растворе, на кинетику формотрансформации эритроцитов в отсутствие (ряд 1) и присутствии в сахарозной среде (0,3 М) EDTA в концентрации 50 мкМ (ряд 2). Уровень гемолиза в %: а – 0,5; б – 1; в – 2; г – 5,0; д – 10; е – 20. Эксперименты проведены через 2 часа после выделения клеток. Кривые 1 в обоих рядах соответствуют контрольному МО в двух средах без добавления гемолизата (0% гемолиза)

Первый сдвигает пик МО влево, а второй – вправо по оси времени. При этом, основной сдвиг максимума ИФ происходит уже в пределах небольших концентраций (~ 2–3 %) гемоглобина как в отсутствие, так и в присутствии EDTA. Это говорит о том, что продукты лизиса эритроцитов, предположительно внеклеточный гемоглобин, в небольших количествах могут существенно модифицировать МО эритроцитов в сахарозной среде, в то время как значительно большие их количества не оказывают совершенно никакого влияния на форму клеток в изотоническом солевом растворе (данные не приведены). EDTA оказывает противоположное гемоглобину влияние, и с увеличением ее концентрации максимум ИФ сдвигается вправо по оси времени. Количественно эффект EDTA также зависит от образца крови (рис. 6).

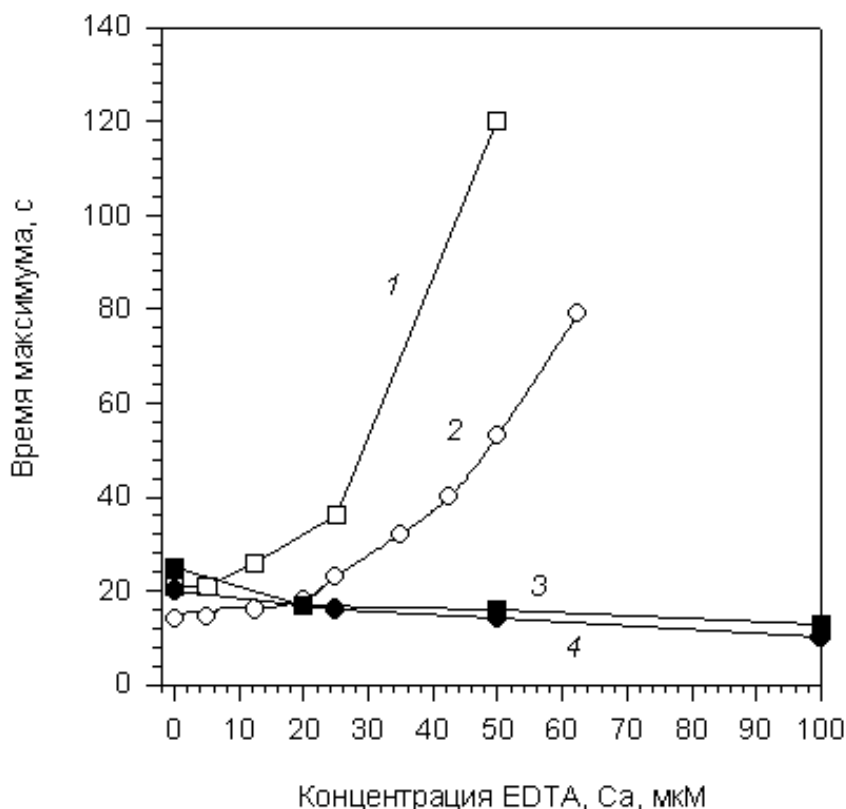
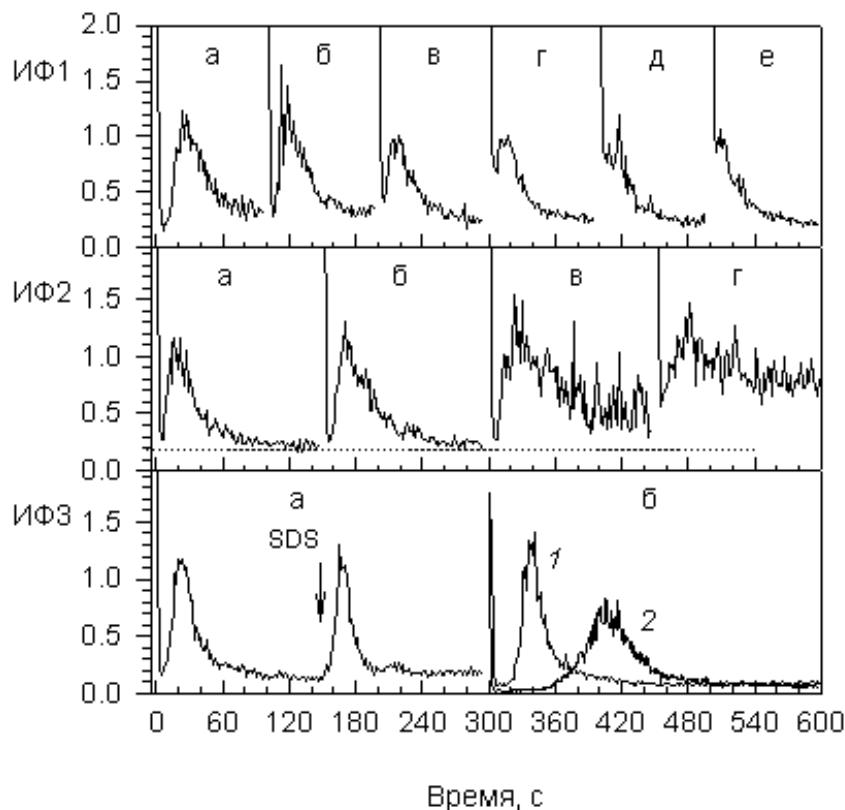


Рис. 6. Зависимость времени достижения максимума ИФ в процессе трансформации эритроцитов от концентрации EDTA и катионов кальция в среде сахарозы (0,3 М) для доноров 1 (кривые 1, 3) и 2 (кривые 2, 4)

Интересной и характерной особенностью действия EDTA является то, что она выраженным образом удлиняет время фазы 1, которая в норме занимает несколько секунд. В присутствии EDTA эта фаза удлиняется до десятков секунд и выглядит в виде лаг-периода, где ИФ имеет минимальное значение, перед началом его восстановления на фазе 2 (рис. 5).

Влияние гемолизата и EDTA не может объясняться изменением pH при их добавлении в раствор сахарозы, поскольку эти изменения при максимальных используемых концентрациях, в отличие от Трисоль, не превышали 0,5 единиц pH. В проверочных экспериментах было установлено, что такое изменение pH существенно не влияет на МО эритроцитов.

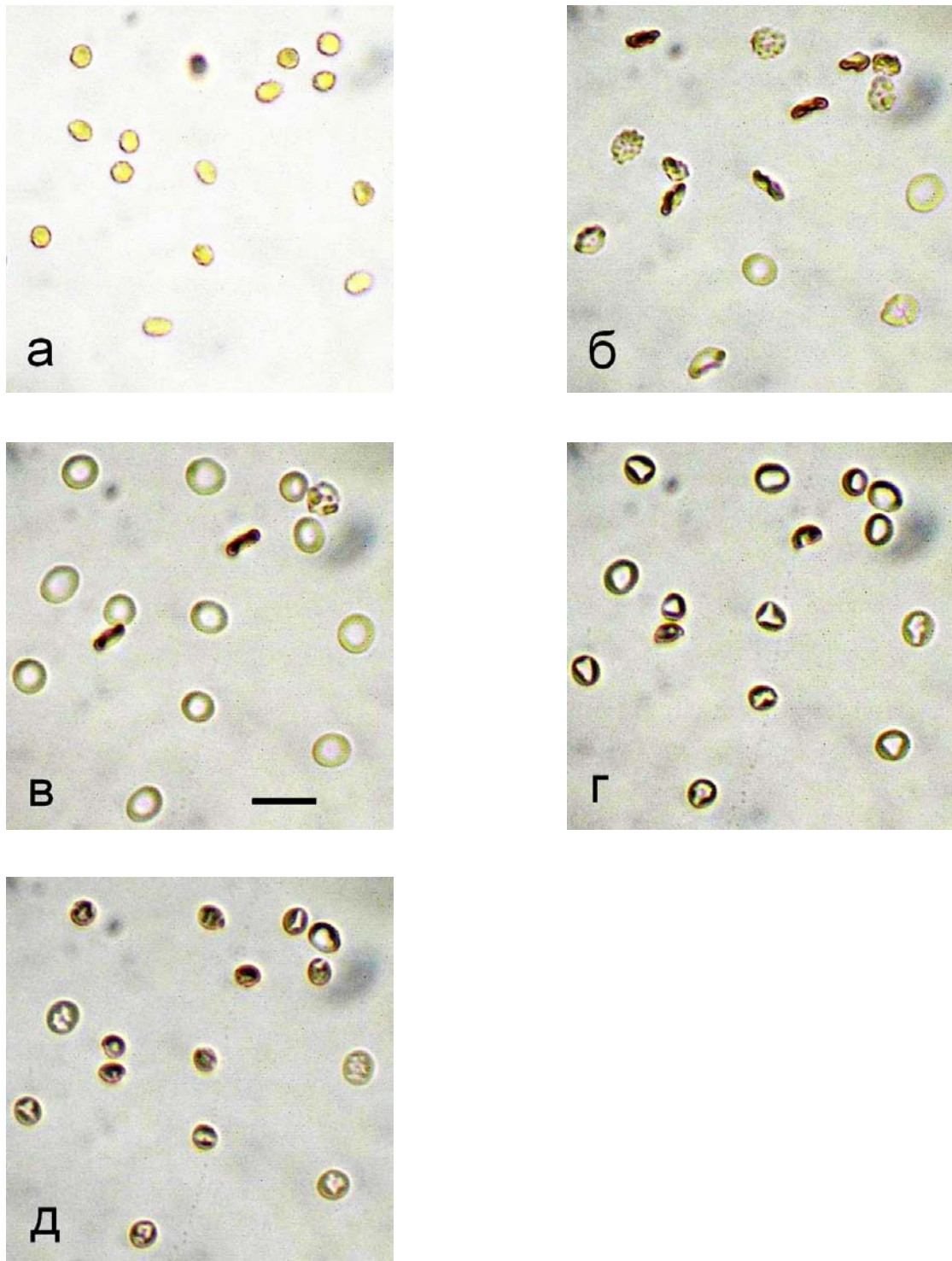
Кальций в диапазоне концентраций от 10 до 500 мкМ действует подобно гемоглобину, а именно сдвигает пик МО влево и формирует ответы типа 5 и 6 (см. рис. 7, в–е), т.е., как и ожидалось, действует противоположно EDTA, однако его эффект, по сравнению с EDTA, значительно слабее. Аналогично, в этих концентрациях, кальций также не оказывает влияния на форму эритроцитов в физиологическом растворе. Исходя из экспоненциального характера зависимости времени максимума ИФ от концентрации EDTA и слабой зависимости от концентрации кальция (рис. 6), можно заключить, что EDTA имеет свой собственный эффект на МО эритроцитов, кроме ее действия как хелатора катионов кальция. В последнем случае можно было ожидать зависимость с насыщением, когда избыток EDTA устранял бы влияние остаточных катионов кальция, присутствующих в среде, что не соответствует экспериментальным данным.



**Рис. 7. Влияние кальция (ряд 1), NaCl (ряд 2) и SDS (ряд 3) на кинетику трансформации эритроцитов в сахарозной среде (0,3 М).** Концентрации кальция в мкМ: а – 0, б – 20, в – 50, г – 100, д – 250, е – 500. Концентрации NaCl в мМ: а – 0, б – 1,5, в – 2,5, г – 4,25. Ряд 3, а – стрелкой указан момент добавления SDS до конечной концентрации 50 мкМ. Ряд 3, б – кривые 1 и 2 соответствуют случаю, когда то же количество SDS изначально присутствует в среде. Для кривой 2 среда дополнительно содержала 4 мМ NaCl и концентрация эритроцитов в кювете была в 3 раза больше, чем во всех остальных случаях. Эксперименты проведены через 2 часа после выделения клеток

Поскольку измерение ИФ основано на анализе оптических характеристик клеток в суспензии, вывод о том, что в данном случае мы имеем дело с изменением морфологии клеток (Руденко и др., 1998) в сахарозной среде, которая по ряду свойств отличается от физиологического солевого раствора, желательнее подтвердить данными микроскопии. Непосредственное наблюдение за эритроцитами, извлеченными из кюветы, не выявило полного соответствия между данными микроскопии и МО, определяемым по изменению ИФ. В основном, это относится к тому, что под микроскопом также наблюдалась динамика морфологических изменений и, зачастую, там, где ИФ уже имел стабильное значение. Мы связываем это с тем, что эффект стекла (Eriksson, 1990) может вносить дополнительный вклад в процесс и, таким образом, то, что происходит под стеклом, не в полной мере соответствует тому, что наблюдается в кювете. Попытки фиксации клеток в момент максимума ИФ с помощью глутарового альдегида не привели к успеху, поскольку оказалось, что в сахарозной среде он мгновенно сферулирует клетки в момент фиксации (Руденко и др., 1998). В связи с этим были предприняты попытки видоизменить систему так, чтобы она стала более стабильной в отношении последовательности морфологических превращений. На рис. 7 показано, что эхиноцитарный агент SDS, будучи добавлен в сахарозную среду до или после клеток, вызывает четкий МО типа 4. Однако этот ответ протекает быстро (~50 с) и его трудно зафиксировать микроскопически. Увеличение содержания NaCl в сахарозной среде до 4 мМ замедляет МО и расширяет его (рис. 7, кривая 2). Морфология клеток в ходе этого перехода представлена на рис. 8, из которого видно, что он состоит из следующей последовательности: сферозхиноцит – эхиноцит – дискоцит – стоматоцит – сферостоматоцит, которая по характеру и временным характеристикам совпадает с той, которая регистрируется по ИФ.





**Рис. 8.** Изменение морфологии эритроцитов в ходе морфологического ответа в среде сахарозы (0,3 М) в присутствии 50 мкМ SDS и 4 мМ NaCl, соответствующее изменению ИФ, показанному на рис. 7 (ряд 3, кривая 2). Снимки сделаны через интервалы времени после введения клеток в среду в секундах: а – 50, б – 75, в – 105, г – 130, д – 240. Масштаб – 10 мкм

Единственное отличие между ними заключается в том, что временные параметры перехода, регистрируемого микроскопически, воспроизводятся не столь хорошо, как перехода, регистрируемого по ИФ, – он может происходить как быстрее, так и медленнее последнего. Учитывая большую

чувствительность исследуемой системы к микроокружению, этот факт не представляется столь уж удивительным и может объясняться как эффектом стекла (Eriksson, 1990), так и тем, что при измерении МО в кювете клетки перемешиваются и, следовательно, подвергаются сдвиговому стрессу, который также может влиять на динамику МО. Предварительные данные по анализу изменения оптической плотности суспензии эритроцитов в ходе МО без перемешивания показывают, что контрольный МО, в отсутствие SDS, немного замедлен по сравнению с ситуацией с перемешиванием (данные не приведены), хотя, в целом, кардинальных различий между ними нет. Этого, однако, не происходит в случае SDS, где эта разница минимальна и составляет несколько секунд. Следует признать, что МО в тонком слое жидкости, сохраняя основную последовательность превращений, протекает иным образом, и нужно с осторожностью сравнивать результаты, полученные на этих двух системах. Это, тем не менее, не меняет нашего основного вывода, что изменения ИФ в ходе МО напрямую отражают морфологические превращения эритроцитов из сфероцитов в дискоциты и обратно.

В заключение мы снова вернулись к вопросу, в какой мере типы МО могут быть связаны с чистотой используемых растворов сахарозы, и в одновременном сравнительном эксперименте на трех донорах сравнили МО в сахарозе «Merck» (квалификация о.с.ч., С1) с сахарозой квалификации ч.д.а. (С2), а также с сахарозой (о.с.ч.), которую хранили при комнатной температуре в течение 7 дней и в которой наблюдали признаки бактериального загрязнения (С3). Контрольный МО трех доноров был близок (тип 4 и 5) и не отличался в С1 и С2. В растворе С3 тип МО всех доноров с небольшими вариациями изменился на тип 1. Это означает, что разброс по типам МО не связан с разным уровнем микропримесей в сахарозе (о.с.ч.) и (ч.д.а) и он не влияет на воспроизводимость результатов, по крайней мере, в контроле. Результат с С3 говорит, что бактериальное загрязнение действительно может изменить тип МО. Однако это не объясняет наличие типа 1 в наших экспериментах, поскольку в 50% случаев он наблюдался на свежеприготовленных растворах, где загрязнение исключается.

### Обсуждение

Полученные данные в совокупности позволяют дать объяснение обнаруженной существенной вариабельности морфологической реакции эритроцитов в неэлектролитной среде с номинальным отсутствием ионов хлора.

Это происходит потому, что МО является процессом, который, в отличие от других, более консервативных процессов, чрезвычайно чувствителен к модуляции из-за того, что его конкретная кинетика зависит от комбинации многих «слабых» факторов, часть из которых (например, стабильность мембран эритроцитов конкретного донора, их исходное состояние, газовый обмен в растворах) экспериментально не контролируется. В результате получается, что даже при строгом соблюдении протокола эксперимента конкретный МО может варьировать по типу, оставаясь при этом высоковоспроизводимым процессом. Высокая воспроизводимость МО подтверждается в экспериментах, проводимых через 2–3 часа после выделения клеток, когда в течение нескольких последующих часов можно получать идентичные контрольные кривые соответствующего типа (рис. 4, 7). Основанием для такого предположения является сильная зависимость МО от концентрации внеклеточного гемоглобина (рис. 5) и то, что он развивается как раз в условиях активации аномальных транспортных путей (NSVDC,  $K^+(Na^+)/H^+$  обменник) в средах с низкой ионной силой и номинальным отсутствием ионов хлора (Bennekou et al., 2004; Barksman et al., 2004; Kummerow et al., 2000). Это явление не наблюдается в сахарозных средах с повышенной ионной силой (рис. 2, кривая 2), в физиологическом солевом растворе (рис. 2, кривая 1) или при определенных условиях (рис. 4, колонка Trisol). Указанные условия, как известно, приводят к значительному увеличению проницаемости мембран для катионов, массивному выходу ионов хлора в обмен на OH зашелачиванию цитоплазмы, сжатию клеток и, естественно, к деформации мембраны (Sambasivarao et al., 1986; Jones, Knauf, 1985; Zeidler, Kim, 1979; Kummerow et al., 2000; Gimsa et al., 1994). В результате одновременного и интенсивного протекания всех этих и, возможно, других процессов МО приобретает свойства случайного или бифуркационного процесса, когда незначительные изменения исходных параметров, к которым относятся конкретный состав сахарозного раствора и функциональное состояние клеток, которое может задаваться составом сток-раствора инкубации, могут направить систему по другой траектории. Мы видели, что другой, слабо контролируемый фактор, содержание гидрокарбоната в среде, может оказать влияние на ход МО (рис. 4). Как следствие, мы не можем с определенностью предсказать вид МО в конкретном эксперименте, но можем утверждать, что это будет один из 6 условно выделенных типов, показанных на рис. 1. Вышеприведенные соображения подтверждаются экспериментально с SDS, который в данном случае выступает как «сильный» фактор, способный самостоятельно вызвать морфологический переход клеток в сфероэхиноциты. Здесь важно подчеркнуть, что SDS индуцирует МО типа 4, будучи

добавлен в раствор как до, так и после клеток (рис. 7, ряд 3), но, что более существенно – его присутствие в среде устраняло все различия между растворами сахарозы. Независимо от того, какой тип ответа (от типа 1 до типа 6) демонстрировали эритроциты в контроле, их ответ в присутствии SDS всегда был одинаков. При этом результат, практически, не зависел от исходного состояния эритроцитов в растворах HBS и PS, а также имел минимальный разброс между различными донорами. Таким образом это подтверждает, что вариабельность МО в контроле обусловлена действием комбинации условно «слабых» факторов.

Остается дискуссионным вопрос, можно ли, скрупулезно соблюдая все условия проведения эксперимента, контролируя чистоту препаратов и состояние растворов и клеток, добиться стопроцентного воспроизведения МО, например, типа 4 во всех случаях? На наш взгляд, усилия в данном направлении могут не иметь практического смысла, если полагать, что данный процесс является вариабельным по своей сути. Целесообразно при анализе получаемых результатов просто учитывать это отличительное свойство. Другим подходом может быть селекция исходных условий и отбор для анализа МО определенного типа (например, наиболее представительного, на наш взгляд, типа 4).

Мы видели, что МО эритроцитов при их помещении в сахарозную среду с номинальным отсутствием ионов хлора может быть подразделен на 6 типов, показанных на рис. 1. Такая классификация исходно являлась условной и служила для упрощения оперирования с разными типами кривых. В целом, реакция клеток в этих условиях является трехфазной, а временные характеристики каждой из фаз могут отличаться. Представленные данные дают основание полагать, что в различных условиях указанные фазы могут регулироваться независимо друг от друга. Например, добавка гидрокарбоната (рис. 4, кривая 1) не влияет на фазы 1 и 2, но устраняет фазу 3. Инкубация клеток в PS и в растворе Рингера (рис. 4), увеличение в среде концентрации NaCl (рис. 7, ряд 2) и кальция (рис. 7, ряд 1) приводит к увеличению начального значения ИФ на фазе 1, что указывает на то, что клетки в данных условиях сферулируются не полностью или не сферулируются совсем (рис. 7, ряд 1, д, е). EDTA и SDS увеличивают длительность фазы 2, а гемоглобин ускоряет фазы 2 и 3 (рис. 5). Иные объяснения, что реакции типа 5 и 6 обусловлены недостаточным временным разрешением прибора или несинхронной реакцией эритроцитов, в результате чего регистрируется некий суммарный эффект, представляются маловероятными, поскольку, напротив, исходя из зависимости ИФ от времени, особенно для типа 4, и данных микроскопии (рис. 8), можно констатировать, что МО является высококооперативным процессом, когда большое число клеток достаточно одновременно проходят все его стадии, включая и стадию дискоцитов, которая соответствует максимуму ИФ со значением порядка 1,2. Во-вторых, «мертвое» время прибора, которое определяется временем перемешивания аликвоты клеток после их введения в кювету, составляет 1,2–1,5 с, что существенно меньше, чем время достижения максимума ИФ в случае кальция (~ 9 с, рис. 7). В-третьих, в тех случаях, когда быстрая фаза 1 действительно имеет место, она отчетливо видна, даже если время пика ИФ составляет порядка тех же 9 с (рис. 5, ряд 1, в, ряд 2, д, е). Из характера изменения кривых МО при увеличении концентрации гемолизата можно заключить, что именно в этом случае временного разрешения прибора уже недостаточно для регистрации быстрой фазы 1 и, следовательно, в этих условиях эритроциты способны совершать очень быстрый переход дискоцит – сфероцит – дискоцит, который занимает, по-видимому, 1–2 с. Таким образом, различные типы МО являются результатом изменений отдельных фаз в общей трехфазной последовательности морфологических превращений эритроцитов.

Особенностью описанного МО является то, что он, в случае типа 4, представляет собой достаточно быстрый процесс, который протекает в условиях видимого отсутствия дополнительных ингредиентов, включая буферные растворы для поддержания постоянства pH, способных сами по себе изменить форму клеток. Мы определили, что в растворе сахарозы, дополнительно содержащей *Нерес* (5 мМ), процесс формотрансформации протекает иным образом, чем в его отсутствие, что отражает сильную зависимость МО от ионной силы среды и состава раствора (рис. 4, 7). В стандартном случае минимальная полуширина пика ИФ для МО типа 4 составляет порядка 10 с.

Известно, что морфология эритроцитов зависит от перераспределения мембранных компонент между двумя бислоями (Schrier et al., 1992; Chen, Huestis, 1997), и изменение морфологии как эритроцитов, так и липидных везикул может быть использовано для анализа этого процесса (Daleke, Huestis, 1989; Lopez-Montero et al., 2005; Smriti et al., 2007; Paradopulos et al., 2007). Можно ожидать, что в условиях сильной деполяризации мембраны процесс трансмембранного переноса липидов (флип-флоп) также имеет место, более того он может быть весьма существенным, поскольку как сам поток, так и стационарное распределение заряженных липидов экспоненциально зависят от величины трансмембранного потенциала (Haest et al., 1997). Если действительно МО имеет в своей основе перераспределение мембранных компонент, то, исходя из его характерного времени (~10 с),

скорость их перераспределения представляет в этом случае одну из самых высоких из известных на сегодняшний день процессов трансмембранного переноса липидов в натуральных мембранах. Недавно было определено, что наиболее быстрой спонтанной трансмембранной диффузией обладают спин-меченные церамиды с характерным временем порядка 1,1 мин (Lopez-Montero et al., 2005), а полу-время флип-флопа фосфолипидов в гигантских везикулах в присутствии белков эндоплазматического ретикулума составило порядка нескольких минут (Paradopoulos et al., 2007). Кроме этого, можно отметить, что в условиях, когда мембрану эритроцитов обрабатывали агентами, нарушающими ее стабильность, к которым относятся детергенты различных классов (Pantaler et al., 2000), скорость флип-флопа значительно возрастала. К тому же эффекту в случае липидных везикул приводили низкомолекулярные литические пептиды типа мелиттина, но не грамицидина, которые обеспечивали характерное время флип-флопа флуоресцентного липидного аналога порядка нескольких секунд (Fattal et al., 1994). В работе (Broring et al., 1989) была сделана оценка характерного времени транспорта олеиновой кислоты через мембрану эритроцитов, которое оказалось менее 15 с.

Можно сделать вывод, что в условиях сильной деполяризации мембраны в неэлектролитной среде и активации дополнительных транспортных механизмов может наблюдаться явление быстрых морфологических преобразований, которое не наблюдается в обычных физиологических условиях и в сахарозных средах с повышенной ионной силой. Мы полагаем, что выяснение его природы требует более подробного изучения роли механизмов, контролирующих трансмембранный обмен мембранных компонент, которые включают систему транспортных энзимов типа флиппаз, флоппаз и скрамблаз (Devaux et al., 2006).

#### Список литературы

- Руденко С.В., Кроуф Дж.Х., Таблин Ф. Изменение формы эритроцитов в зависимости от времени // Биохимия. – 1998. – Т.63, №12. – С. 46–55.
- Руденко С.В. Агрегация эритроцитов как модель агрегации тромбоцитов // Биологические мембраны. – 2006. – Т.23, №1. – С. 61–68.
- Barksmann T.L., Kristensen B.I., Christophersen P., Bennekou P. Pharmacology of the human red cell voltage-dependent cation channel. Part I. Activation by clotrimazole and analogues // Blood Cells Mol. Dis. – 2004. – Vol.32, №3. – P. 384–388.
- Bennekou P., Barksmann T.L., Kristensen B.I. et al. Pharmacology of the human red cell voltage-dependent cation channel. Part II: inactivation and blocking // Blood Cells Mol. Dis. – 2004. – Vol.33, №3. – P. 356–361.
- Broring K., Haest C.W., Deuticke B. Translocation of oleic acid across the erythrocyte membrane. Evidence for a fast process // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – Vol.986, №2. – P. 321–331.
- Chen J.Y., Huestis W.H. Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta. – 1997. – Vol.1323, №2. – P. 299–309.
- Daleke D.L., Huestis W.H. Erythrocyte morphology reflects the transbilayer distribution of incorporated phospholipids // J. Cell Biol. – 1989. – Vol.108, №4. – P. 1375–1385.
- Devaux P.F., Lopez-Montero I., Bryde S. Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells // Chem. Phys. Lipids. – 2006. – Vol.141, № (1–2). – P. 119–132.
- Eriksson L.E. On the shape of human red blood cells interacting with flat artificial surfaces – the “glass effect” // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – Vol.1036, №3. – P. 193–201.
- Fattal E., Nir S., Parente R.A., Szoka F.C.J. Pore-forming peptides induce rapid phospholipid flip-flop in membranes // Biochemistry. – 1994. – Vol.33, №21. – P. 6721–6771.
- Gimsa J., Schnelle T., Zechel G., Glaser R. Dielectric spectroscopy of human erythrocytes: investigation under the influence of nistatin // Biophys. J. – 1994. – Vol.66, №2. – P. 1244–1253.
- Glaser R. Does the transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ) or the intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ) control the shape of human erythrocytes? // Biophys. J. – 1998. – Vol.75, №1. – P. 569–570.
- Glaser R., Fujii T., Muller P. et al. Erythrocyte shape dynamics: influence of electrolyte conditions and membrane potential // Biomed. Biochim. Acta. – 1987. – Vol.46, №2–3. – P. S327–S333.
- Haest C.W., Oslender A., Kamp D. Nonmediated flip-flop of anionic phospholipids and long-chain amphiphiles in the erythrocyte membrane depends on membrane potential // Biochemistry. – 1997. – Vol.36, №36. – P. 10885–10891.
- Hartmann J., Glaser R. The influence of chlorpromazine on the potential-induced shape change of human erythrocyte // Biosci. Rep. – 1991. – Vol.11, №4. – P. 213–221.
- Jones G.S., Knauf P.A. Mechanism of the increase in cation permeability of human erythrocytes in low-chloride media. Involvement of the anion transport protein capnophorin // J. Gen. Physiol. – 1985. – Vol.86, №5. – P. 721–738.

- Kummerow D., Hamann J., Browning J.A. et al. Variations of intracellular pH in human erythrocytes via K(+)(Na+)/H(+) exchange under low ionic strength conditions // *J. Membr. Biol.* – 2000. – Vol.176, №3. – P. 207–216.
- Lopez-Montero I., Rodriguez N., Cribier S. et al. Rapid transbilayer movement of ceramides in phospholipid vesicles and in human erythrocytes // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol.280, №27. – P. 25811–25819.
- Muller P., Herrmann A., Glaser R. Further evidence for a membrane potential-dependent shape transformation of the human erythrocyte membrane // *Biosci. Rep.* – 1986. – Vol.6, №11. – P. 999–1006.
- Pantaler E., Kamp D., Haest C.W. Acceleration of phospholipid flip-flop in the erythrocyte membrane by detergents differing in polar head group and alkyl chain length // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol.1509, №(1–2). – P. 397–408.
- Papadopoulos A., Vehring S., Lopez-Montero I. et al. Flippase activity detected with unlabeled lipids by shape changes of giant unilamellar vesicles // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol.282, №21. – P. 15559–15568.
- Sambasivarao D., Rao N.M., Sitaramam V. Anomalous permeability and stability characteristics of erythrocytes in non-electrolyte media // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1986. – Vol.857, №1. – P. 48–60.
- Schrier S.L., Zachowski A., Devaux P.F. Mechanisms of amphipath-induced stomatocytosis in human erythrocytes // *Blood.* – 1992. – Vol.79, №3. – P. 782–786.
- Smriti, Nemerqut E.C., Daleke D.L. ATP-dependent transport of phosphatidylserine analogues in human erythrocytes // *Biochemistry.* – 2007. – Vol.46, №8. – P. 2249–2259.
- Zeidler R.B., Kim H.D. Effects of low electrolyte media on salt loss and hemolysis of mammalian red blood cells // *J. Cell Physiol.* – 1979. – Vol.100, №3. – P. 551–561.

**Представлено: Т.П.Бондаренко / Presented by: T.P.Bondarenko**

**Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським / Recommended for publishing by: Ye.E.Persky**

© С.В.Руденко, Л.Ші, В.А.Бондаренко, 2009  
© S.V.Rudenko, L.Shi, V.A.Bondarenko, 2009