БИОХИМИЯ, 1998, том 63, вып. 12, с. 1630 – 1639

УДК 577.352.4

ИЗМЕНЕНИЕ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВРЕМЕНИ

© 1998 г. С.В. Руденко[1*], Дж.Х. Кроув[1], Ф. Таблин[2]

[1]Section of Molecular and Cellular Biology, and [2]Department of Cell Biology and Anatomy, School of Veterany Medicine, University of California, Davis, CA 95616; fax: (916)752-5305; E-mail: svrudenko@ucdavis.edu

(Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 310015 Харьков, ул. Переяславская, 23; факс: (0572)72-0084; E-mail: rsv@rsv.kharkov.ua)

Поступила в редакцию 21.11.97
После доработки 04.04.98

Описан кинетический метод, позволяющий выявить изменение формы эритроцитов в зависимости от времени при разрешении порядка нескольких секунд. Дается определение индекса формы (ИФ), экспериментальных условий, необходимых для проведения измерений, а также установлена зависимость между ИФ и морфологическим индексом, который часто используется для количественной характеристики морфологии эритроцитов. Кроме того, показано, что этот метод может использоваться для оценки изменений формы при различных условиях эксперимента, вызывающих существенное изменение морфологии эритроцитов (например, добавление лизолецитина или хлорпромазина), а также для выявления изменения формы эритроцитов в процессе химической фиксации для микроскопии. Показано, что отсутствие дополнительных изменений формы эритроцитов при их фиксации глутаровым альдегидом существенно зависит от морфологии клеток в момент фиксации и от их исходного состояния.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, форма, кинетика, глутаровый альдегид, параформальдегид, хлорпромазин, лизофосфатидилхолин.

Форма биологических клеток нередко используется в качестве параметра в клинических и экспериментальных исследованиях. Например, при клинико-лабораторных исследованиях форма эритроцитов и тромбоцитов используется для характеристики их пригодности для гемотрансфузии или для мониторинга при травмах или при таком инвазивном вмешательстве, как криохирургия [1–7]. В таких случаях регистрация изменения формы клеток обычно производится с перерывами и уже после того, как окончилось воздействие, вызвавшее изменение формы клеток [8]. Такая регистрация производится путем непосредственного наблюдения под микроскопом [9, 10]. До настоящего времени не было предложено способа, при помощи которого можно было бы быстро и непрерывно оценивать изменение формы клеток в ходе такого события.

И для клинических, и для экспериментальных исследований представляет интерес независимый метод, при помощи которого можно было бы быстрее, чем под микроскопом, выявить изменение морфологии клеток. В настоящей работе описан кинетический метод, позволяющий выявлять изменение формы эритроцитов при разрешении порядка нескольких секунд, и показана возможность его использования в случае некоторых соединений, действующих на клеточные мембраны.

*Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты. Были использованы следующие реактивы: хлорпромазин-HCl (ХПЗ) фирмы «Calbiochem» (США), яичный лизофосфатидилхолин, глутаровый альдегид (ГА) и параформальдегид фирмы «Sigma» (США).

Оборудование. Измерения проводили при длине волны 920 нм, используя агрегометр Chronolog, Inc., PA с термостатируемым кюветодержателем, снабженным магнитной мешалкой с регулируемой скоростью перемешивания (частота в Гц). Аналоговый выход агрегометра, амплитуда которого пропорциональна пропускаемому свету (I), был соединен со специально сконструированной 10-битовой ADC-платой (ее схема может быть предоставлена) и с компьютером IBM PC-486. Напряжение 0,5 В соответствовало 100% пропусканию (I_0). Поглощение света регистрировали непрерывно с интервалом в 10 или 20 мс. Результаты обрабатывали, как описано в разделе «Результаты исследования».

©1998 Российская Академия Наук. Материал из электронного архива журнала "Биохимия". Статья оцифрована в Отделе Научной Информации НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Использование материала автоматически предполагает выполнение условий Пользовательского соглашения.

Постоянная ссылка на материал: http://journals.belozersky.msu.ru/biochemistry/paper/1998/12/1630.

Подготовка эритроцитов. Кровь брали из вены у здоровых взрослых доноров с добавлением цитрата в качестве антикоагулянта. Эритроциты отделяли от лейкоцитов и плазмы центрифугированием, дважды промывали 10 объемами 0,15 М NaCl и 10 мМ фосфата натрия в фосфатном буфере при pH 7,4 и ресуспендировали в фосфатном буфере до концентрации 10%. Аликвоты (10–12 мкл) полученной клеточной суспензии вносили в кювету агрегометра, содержащую 2 мл фосфатного буфера, до конечной концентрации около $5 \cdot 10^6$ клеток/мл. Изменение формы эритроцитов индуцировали добавлением в кювету аликвот трансформирующих агентов из маточных растворов (0,2 мМ раствор лизолецитина, 40 мМ раствор хлорпромазин, 25 или 2% раствор глутарового альдегида) до получения желаемой концентрации. Время полного перемешивания полученной смеси равнялось 1 с. Все эксперименты проводили при 37°.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Принцип определения формы клеток в суспензии. На рис. 1 представлена типичная картина поглощения света суспензией эритроцитов до и после добавления хлорпромазина, который, как известно, превращает дискоидные эритроциты в стоматоциты (инвагинированные сферы) [10]. Вначале наблюдаются относительно большие флуктуации оптической плотности суспензии (поглощения света) около средних значений. Этот фотосигнал, зарегистрированный фотодетектором агрегометра, пропорционален интенсивности пропускаемого света (I), которая обратно пропорциональна концентрации клеток в суспензии. На вставках на рис. 1 изображен тот же оптический сигнал после прохождения через высокочастотный фильтр, что дает два сигнала, основной оптический сигнал (I) и второй сигнал, соответствующий флуктуациям основного сигнала. Этот второй сигнал (канал), который мы назвали флуктуирующим сигнальным каналом (ФСК), усиливали в 20–30 раз, а затем оба сигнала преобразовывали при помощи компьютера, как описано ниже. На рис. 1 видно, что индуцированное хлорпромазином изменение формы одновременно усиливает поглощение и резко (иногда десятикратно) уменьшает амплитуду флуктуаций ФСК. Очевидно, что амплитуду флуктуаций можно рассматривать как информацию о форме клеток. Эффекты, представленные на рис. 1, мы объясняем следующим образом. Перед добавлением хлорпромазина эритроциты, имеющие форму двояковогнутых дисков, рассеивают свет анизотропно.

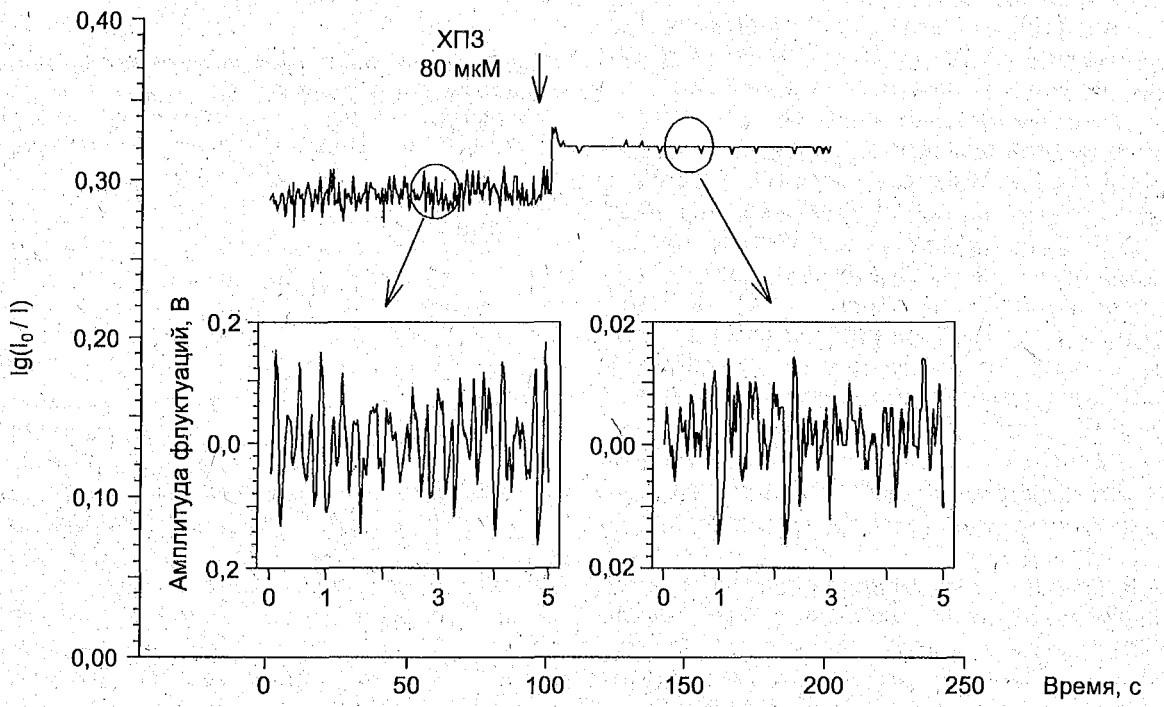


Рис. 1. Регистрация изменений поглощения света ($\lg(I_0/I)$) суспензией дискоидных эритроцитов под влиянием хлорпромазина (стрелка), где I_0, I – амплитуда оптических сигналов, пропорциональных соответственно интенсивности света после прохождения через кювету без клеток и через кювету, содержащую клетки. На вставках представлены более подробно фрагменты сигнала I после прохождения через высокочастотный фильтр и усиления

При их перемещениях в суспензии анизотропия непрерывно меняется, что вызывает выраженные флуктуациям сигнала. При добавлении хлорпромазина эритроциты превращаются в стоматоциты, которые дают изотропное светорассеяние независимо от их ориентации в луче света, что приводит к уменьшению флуктуаций. Альтернативным объяснением могла бы служить возможная агрегация эритроцитов на дне кюветы в присутствии хлорпромазина. Но такое объяснение несостоятельно, так как подобная агрегация обусловила бы снижение поглощения; однако поглощение при добавлении хлорпромазина возрастает.

2. Определение амплитуды флуктуаций. Несмотря на то, что изменение амплитуды флуктуаций хорошо видно простым глазом, мы хотели оценить их количественно в связи с их возможным стохастическим распределением во времени. Мы думаем, что такое распределение отражает случайный характер ориентации клеток в световом луче в турбулентных течениях жидкости в кювете. Амплитуду флуктуаций поглощения мы оценивали, преобразуя сигнал следующим образом. Прежде всего, поступивший флуктуирующий сигнал, изображенный на рис. 1 (вставки), выражали в абсолютной величине (рис. 2, верхний график). Затем полученный сигнал пропускали через цифровой низкочастотный фильтр, используя компьютер. На рис. 2 приведены примеры такой фильтрации при различных временных константах. Видно, что увеличение временной константы повышает четкость фильтрованного сигнала. Но одновременно это снижало временное разрешение при измерении быстрых изменений амплитуды флуктуаций, которые наблюдались сразу же после добавления хлорпромазина к эритроцитам. Необходимо было найти компромисс между сглаживанием данных и временным разрешением. Чтобы получить высокое разрешение во времени при регистрации быстрых изменений формы, мы применили фильтрацию через низкочастотный фильтр с постоянной времени, равной 1 с.

3. Влияние частоты перемешивания на амплитуду флуктуаций. Поскольку флуктуирующий сигнал возникает при анизотропном светорассеянии несферическими клетками, то частота, при которой клетки перемешиваются в световом луче, должна влиять на амплитуду сигнала. Если сигнал преобразовывается так, как описано выше, то при различной частоте перемешивания получается картина, представленная на рис. 3.

Максимальная амплитуда флуктуаций отмечалась при перемешивании с частотой 5,0–7,1 Гц, так что все последующие эксперименты проводились при частоте 7,1 Гц.

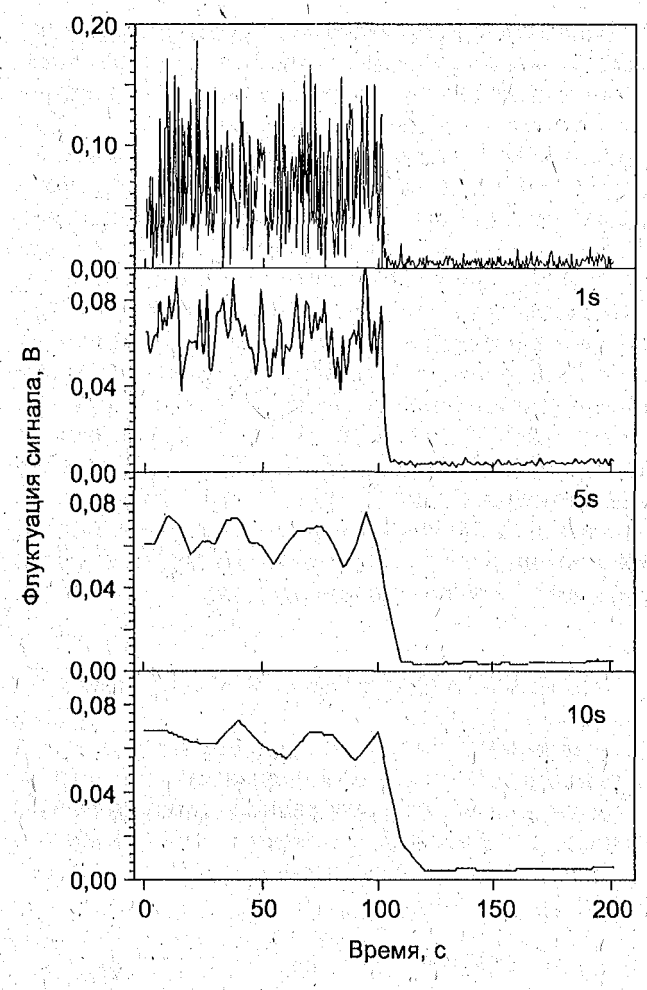


Рис. 2. Изменение амплитуды флуктуаций сигнала, обусловленное его преобразованием (рис. 1) – выражением в абсолютной величине с последующим пропусканием через низкочастотный фильтр с постоянными времени 1, 5 и 10 с

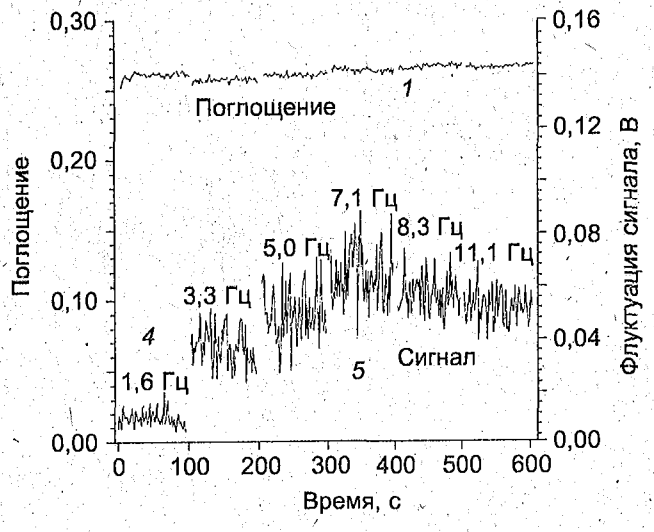


Рис. 3. Зависимость поглощения и флуктуаций сигнала суспензии дискоидных клеток от частоты перемешивания после прохождения через низкочастотный фильтр с постоянной времени 1 с

4. Влияние концентрации клеток на амплитуду флуктуаций и определение индекса формы. При равномерном увеличении концентрация эритроцитов в суспензии поглощение света в основном оптическом канале линейно зависело от концентрации клеток, как и ожидалось (рис. 4). Напротив, при низкой концентрации клеток амплитуда флуктуаций возрастала при ее увеличении, но быстро достигалось плато, которое сохранялось в сравнительно широком диапазоне поглощения (0,2–0,4). Это свойство флуктуаций позволяет дать определение количественного параметра, характеризующего форму эритроцитов. Мы определяем индекс формы (ИФ) для клеточной суспензии как среднюю амплитуду флуктуаций после вышеописанных преобразований; при перемешивании клеток в суспензии при частоте свыше 5 Гц и при концентрации клеток, соответствующей поглощению в диапазоне 0,2–0,4 единиц.

Минимальное значение ФСК равно нулю. Это значение соответствует идеальным клеткам (сферическим, с ровной поверхностью). Флуктуации не наблюдаются также при отсутствии перемешивания. Это можно считать независимым подтверждением того, что флуктуации обусловлены изменением ориентации клеток в световом луче. Если ориентация клеток не меняется (например, если клеточная суспензия не подвергается перемешиванию) или если изменение ориентации клеток не влечет за собой изменения площади светорассеяния (как в случае сферы), то флуктуации оптического сигнала не возникнут. Максимальные флуктуации, которые, как будет показано ниже, соответствуют суспензии одинаковых дискоидных клеток, зависят также от условий эксперимента, а именно, от частоты перемешивания, формы кюветы (цилиндрическая или прямоугольная), амплитуды электрического сигнала фотодетектора и от его усиления. Однако все эти переменные можно учесть при калибровке системы. Для этого мы использовали фиксированные суспензии дискоидных клеток. Значение ИФ дискоцитов было принято за 1, и это значение должно соответствовать результатам измерений при соответствующих условиях. Проведенная по двум точкам калибровка дает шкалу для измерения ИФ в диапазоне от 0 до 1.

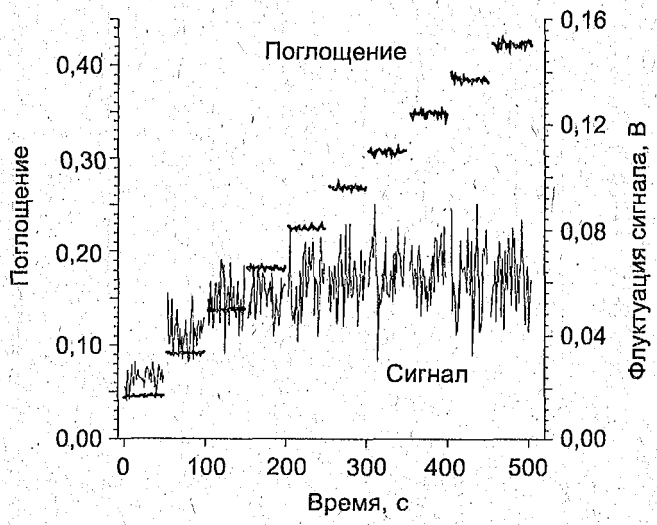


Рис. 4. Зависимость поглощения и флуктуаций сигнала от концентрации дискоидных клеток в суспензии после прохождения через низкочастотный фильтр с постоянной времени 1 с. Каждое приращение в поглощении света соответствует добавлению 5 мкл эритроцитов из концентрированной клеточной суспензии

5. Точность измерения ИФ. На рис. 3 и 4 видно, что амплитуда флуктуаций поглощения, характеризующая ИФ, не является постоянной даже после преобразования и прохождения через низкочастотный фильтр, а колеблется около некоторого среднего значения. Следовательно, существенное значение имеет точность при измерении ИФ, т.е. способность раздельного определения двух близких величин. В связи с этим амплитуду флуктуаций фиксированных суспензий дискоцитов, пойкилоцитов и стоматоцитов, полученных в результате обработки эритроцитов соответственно лизолецитином и хлорпромазином, измеряли на протяжении длительного времени (10 мин), после чего данные разбивали на 10 интервалов по 50 с каждый. ИФ вычисляли для каждого интервала при различном времени интегрирования, от 10 до 50 с. (Время интегрирования означает, что значение ИФ вычисляли, исходя из всех значений флуктуаций сигнала, относящихся к данному временному интервалу.) Оказалось (табл. 1), что при увеличении времени интегрирования уменьшаются стандартная ошибка и стандартное отклонение, а также доверительный интервал для средних значений ИФ, что указывает на повышение точности измерений. Отношение 99% доверительного интервала к среднему значению можно использовать для характеристики относительной ошибки измерения. Как видно из табл. 1, это отношение уменьшается от примерно 10% при времени интегрирования 10 с до примерно 5% при времени интегрирования 50 с. Таким образом, при кратком времени интегрирования (10 с) метод позволяет раздельно определять два значения ИФ, различающиеся между собой на 10%, а при более продолжительном времени интегрирования (20–50 с) различающиеся на 5%.

6. Зависимость ИФ от относительного содержания дискоцитов в суспензии. Чтобы проверить возможность использования ИФ для характери-

Таблица 1. Индекс формы, вычисленный для фиксированных суспензий дискоцитов, стоматоцитов и пойкилоцитов. Ампли
но в течение 10 мин, результаты преобразовывали, как описано выше с последующим подразделением периода изменения н
значенных как результаты 1–10; ИФ вычисляли как среднюю величину флуктуаций в интервале интегрирования

Интервал интегрирования, с	Дискоциты					Стоматоциты					
	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50	10
результаты 1	1,0620	1,0190	0,9730	0,9720	0,9610	0,6340	0,6520	0,6500	0,6290	0,6430	0,2420
2	0,9370	0,9540	0,9720	0,9510	0,9580	0,7110	0,6620	0,6550	0,6550	0,6530	0,2360
3	0,9740	0,9800	0,9860	0,9690	0,9760	0,7550	0,6860	0,6690	0,6640	0,6610	0,2420
4	1,1380	1,0770	1,0440	1,0430	1,0190	0,6210	0,6550	0,6800	0,6660	0,6480	0,2390
5	1,0130	0,9890	1,0100	1,0220	0,9960	0,6790	0,6510	0,6410	0,6550	0,6670	0,2520
6	0,8170	0,9340	0,9710	0,9570	1,0060	0,7680	0,7320	0,7180	0,6980	0,6970	0,2240
7	1,0850	1,0380	1,0460	1,0960	1,0670	0,7250	0,6830	0,6580	0,6410	0,6420	0,2550
8	0,9290	0,9250	0,9750	0,9640	0,9780	0,7470	0,7210	0,7180	0,7170	0,7080	0,2190
9	1,0460	0,9930	1,0080	1,0130	1,0390	0,6740	0,6590	0,6590	0,6570	0,6680	0,2240
10	0,9220	0,9890	1,0080	0,9960	1,0040	0,7450	0,7150	0,6800	0,6770	0,6660	0,2300
среднее	0,9923	0,9898	0,9993	0,9983	1,0004	0,7059	0,6816	0,6728	0,6659	0,6653	0,2363
среднее квадрат. откл.	0,0949	0,0465	0,0288	0,0459	0,0346	0,0516	0,0310	0,0268	0,0260	0,0220	0,0121
средняя квадрат. ошибка	0,0300	0,0147	0,0091	0,0145	0,0109	0,0163	0,0098	0,0085	0,0082	0,0069	0,0039
95% доверит. интервал	0,0679	0,0333	0,0206	0,0329	0,0248	0,0369	0,0222	0,0192	0,0186	0,0157	0,0086
99% доверит. интервал	0,0975	0,0478	0,0296	0,0472	0,0356	0,0531	0,0319	0,0275	0,0267	0,0226	0,0124
(ИФ/среднее) * 100%	9,8	4,8	2,9	4,7	3,5	7,5	4,7	4,1	4,0	3,4	5,2

стики формы клеток в смешанной популяции эритроцитов различной формы, был проведен следующий эксперимент (рис. 5). Суспензию с высоким содержанием дискоцитов (ИФ = 0,86) смешивали в различных соотношениях с суспензией сферопойкилоцитов (ИФ = 0,08) и сферостоматоцитами (ИФ = 0,15). Поглощение смешанных суспензий оставалось постоянным, независимо от процента дискоцитов (данные не представлены), но в обоих случаях ИФ линейно зависел от содержания дискоцитов (рис. 5). Таким образом, если в клеточной суспензии содержится только два типа клеток, например дискоциты и пойкилоциты, то относительное содержание дискоцитов можно вычислить в том случае, если значение ИФ для этого типа пойкилоцитов получено в результате независимых измерений.

7. Взаимосвязь между ИФ и морфологическим индексом. Приведенные эксперименты позволяют сделать уверенный вывод о наличии прямой корреляции между изменением ИФ и изменением формы. Это было показано для следующего случая. ИФ определяли для эритроцитов, трансформированных в стоматоциты или пойкилоциты, соответственно, хлорпромазином или лизолецитином и фиксированных 1% глутаровым альдегидом. Эти же суспензии исследовали микроскопически. На основании микроскопического анализа вычисляли морфологический индекс (МИ) согласно классификации

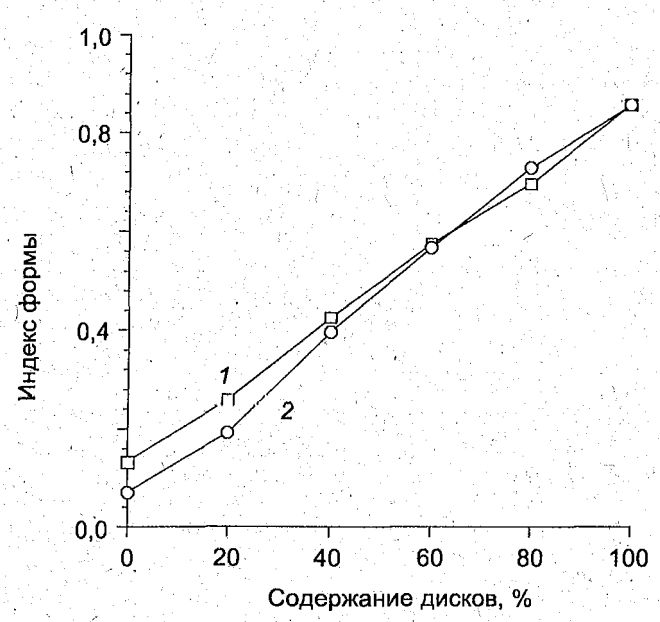


Рис. 5. Зависимость индекса формы смешанной суспензии эритроцитов от содержания дисков в суспензии дискоцитов и стоматоцитов (*1*) или в суспензии дискоцитов и пойкилоцитов (*2*)

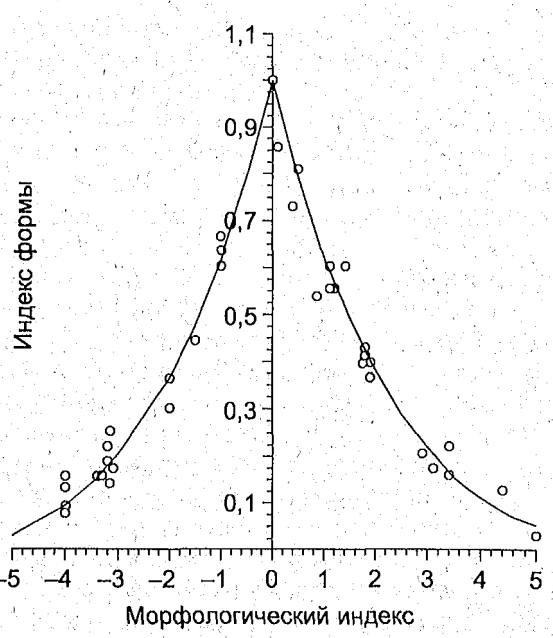


Рис. 6. Взаимосвязь между МИ и ИФ. Эритроциты превращали в пойкилоциты, добавляя лизолецитин, или в стоматоциты, добавляя хлорпромазин, и фиксировали 0,5% раствором ГА. ИФ и МИ определяли в одних и тех же пробах при помощи метода определения ИФ и микроскопического анализа согласно классификации Бейсис [11]

Бейсиса [11]. Была обнаружена выраженная корреляция между ИФ и МИ (рис. 6). ИФ оказался особенно чувствительным к незначительным изменениям дискоидной формы клеток при значениях, близких к 1. Эритроциты с ИФ, равным или меньшим 0,1, представляли собой сферостоматоциты или сферопойкилоциты с ровной поверхностью, и их МИ при микроскопическом анализе был равен соответственно –4 или +5.

Однако значения МИ, равные –4 или +5, были характерны для клеток различной формы и соответствовали широкому спектру значений ИФ, особенно в случае стоматоцитов. Это может быть обусловлено тем, что при ровной поверхности клетки могут не иметь правильной сферической формы, а скорее напоминать эллипсоиды. Эта эллипсоидная форма отражается величиной ИФ, но не описывается значением МИ. Если клетки имели сферическую форму, то, независимо от ее окончательно типа, значение их ИФ было близко к нулю. Следовательно, ИФ можно использовать для количественной характеристики шарообразности клеток в изучаемой суспензии, не принимая во внимание преобладающее изменение формы клеток. Таким образом, ИФ представляет собой интегральный количественный параметр, характеризующий средний уровень шарообразности (или дискоидности) клеточной популяции. Однако значение ИФ

нельзя использовать для характеристики гетерогенности суспензии. Одинаковые значения ИФ могут быть получены для однородных суспензий стоматоцитов или пойкилоцитов (недискоидных клеток), а также для смешанных суспензий дискоидных и недискоидных клеток. Значение ИФ меньше 1 не может также характеризовать тип трансформации клеток (пойкилоцит и/или стоматоцит) в клеточной суспензии. Для этого более удобен МИ, так как он непосредственно указывает на преобладающую морфологию клеток. Значения МИ положительны для пойкилоцитов и отрицательны для стоматоцитов. Поэтому для характеристики морфологии клетки при помощи ИФ необходимо исследовать неидентифицированные клетки под микроскопом. Однако при этом исследовании нет необходимости подсчитывать клетки, а нужно только визуально оценить их морфологический тип. Свойства МИ и ИФ сопоставлены в табл. 2. При этом сопоставлении видно, что по многим показателям ИФ позволяет лучше характеризовать морфологию клеточных суспензий. ИФ определяется быстрее, более точно, и позволяет характеризовать изменение формы даже в тех суспензиях, где оба типа трансформации (пойкилоцитоз и стоматоцитоз) могут происходить одновременно. Такие комплексные суспензии нельзя характеризовать при помощи МИ, даже если допустить, что МИ можно получить путем вычислений. Поскольку величина МИ для пойкилоцитов положительна, а для стоматоцитов отрицательна, то при равном содержании пойкилоцитов и стоматоцитов в суспензии, например при +1 и –1, МИ будет равен нулю, а это значение указывает на присутствие только дискоидной формы. ИФ, напротив, будет снижен, отражая относительное содержание недискоидных клеток в суспензии.

8. Определение изменения формы в процессе фиксации. Предлагаемый метод характеристики формы эритроцитов дает уникальную возможность определить, можно ли адекватно фиксировать эритроциты для микроскопического анализа после различных воздействий, а также оценить те изменения, которые могут быть обусловлены самим фиксирующим агентом [12]. На рис. 7 видно, что добавление низкой концентрации глутарового альдегида (0,025%) сразу же вызывает изменение ИФ суспензии дискоидных клеток. Более высокая концентрация глутарового альдегида (0,5%), по-видимому, не влияет на ИФ. Однако в обоих случаях поглощение света клеточной суспензией значительно возрастало. Такой же эффект наблюдался в других опытах независимо от исходной морфологии клеток, когда ГА использовали для фиксации эритроцитов (данные не представлены). Это было вызвано изменением коэффициента отражения цитозоля эритроцитов под влиянием глутарового альдегида и соответствующим изменением светорассеяния, поскольку красная окраска клеток становилась коричневой. Чтобы определить концентрацию, при которой фиксация клеток сопровождалась бы наименьшим изменением их первоначальной формы, были проведены экспе-

Таблица 2. Сравнение свойств морфологического индекса и индекса формы

Свойство	Морфологический индекс	Индекс формы
Субъективность при идентификации различных форм клеток	Имеет место	Отсутствует
Идентификация преобладающего морфологического типа клеток: стоматоциты, пойкилоциты	Возможна	Необходимо дополнительное микроскопическое исследование
Требование фиксации клеток	Имеются	Отсутствуют
Количество идентифицируемых морфологических типов для клеточных форм	5 – для пойкилоцитов 4 – для стоматоцитов	~ 20 для стоматоцитов и пойкилоцитов
Точность определения	20%	5–10%
Временное разрешение	>10 сек – исходя из скорости фиксирования ГА	2–3 сек
Применимость для характеристики суспензий, содержащих пойкилоциты и стоматоциты	Неприменим	Применим

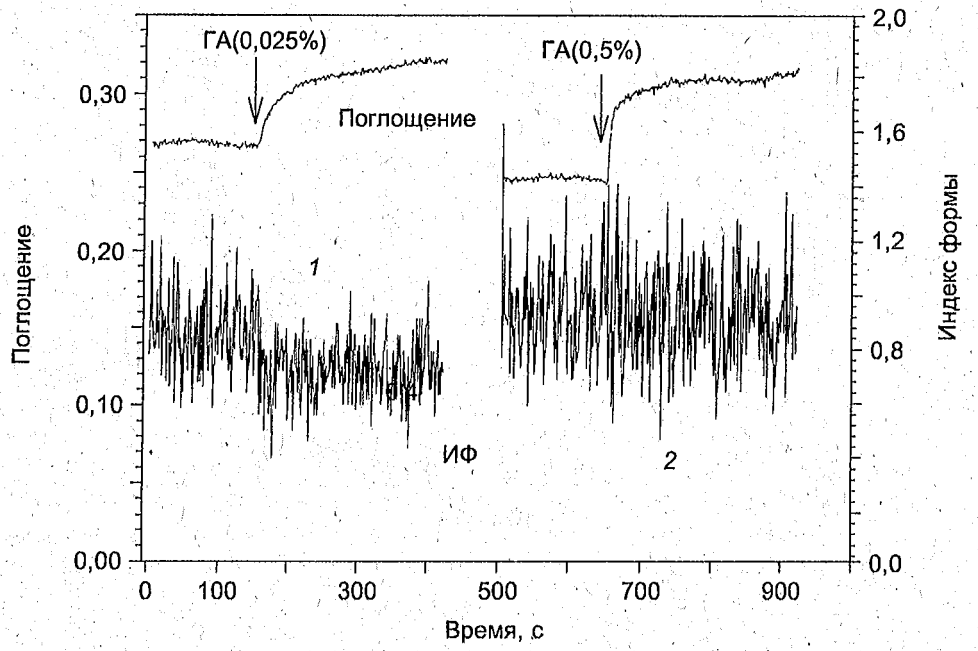


Рис. 7. Изменения поглощения и ИФ суспензии эритроцитов при фиксации глутаровым альдегидом (ГА) (стрелки) в конечной концентрации 0,025% (трек *1*) и 0,5% (трек *2*)

рименты с различной концентрацией глутарового альдегида и суспензиями клеток различной первоначальной формы. Из данных, приведенных в табл. 3, видно, что ИФ клеток до фиксации и после нее сильно зависел от первоначальной морфологии этих клеток. Эффект был наиболее выражен при фиксации стоматоцитов. В этом случае процедура фиксации приводила к значительному увеличению ИФ, что отражало большую «дискоидность» клеток после фиксации по сравнению с их исходным состоянием. Глутаральдегид вызывал небольшое (но статистически достоверное, $p < 0,05$) изменение формы дискоцитов в процессе фиксации, но не влиял на форму пойкилоцитов.

Результаты опытов, представленные на рис. 8, показывают сложную взаимосвязь между лекарственно-обусловленным изменением формы клеток и последующим действием глутарового альдегида, который использовали для фиксации полученной морфологии. Добавление лизолецитина к клеточной суспензии вызывало быстрое

Таблица 3. Значения ИФ для дискоцитов, стоматоцитов и пойкилоцитов до и после взаимодействия с разными концентрациями глутарового альдегида. Эритроциты инкубировали в фосфатном буфере в течение 50 с, а затем добавляли аликвоты 25% ГА до указанной конечной концентрации. ИФ рассчитывали при интервале интегрирования 50 с до добавления ГА и после инкубации эритроцитов с ГА в течение 5 мин

Концентрация ГА, %	Дискоциты		Стоматоциты		Пойкилоциты	
	до	после	до	после	до	после
0,0500	0,826	0,643	0,089	0,145	0,079	0,091
0,1000	0,763	0,702	0,088	0,147	0,087	0,081
0,2500	0,807	0,711	0,079	0,146	0,091	0,090
0,4000	0,781	0,702	0,081	0,132	0,086	0,087
среднее	0,794	0,689	0,084	0,149	0,087	0,088
среднее квадратичное отклонение	0,028	0,031	0,004	0,015	0,005	0,004
средняя квадратичная ошибка	0,014	0,016	0,002	0,007	0,002	0,002
95%	0,044	0,050	0,005	0,019	0,006	0,005
	p <0,05		p <0,001		Недостоверно	

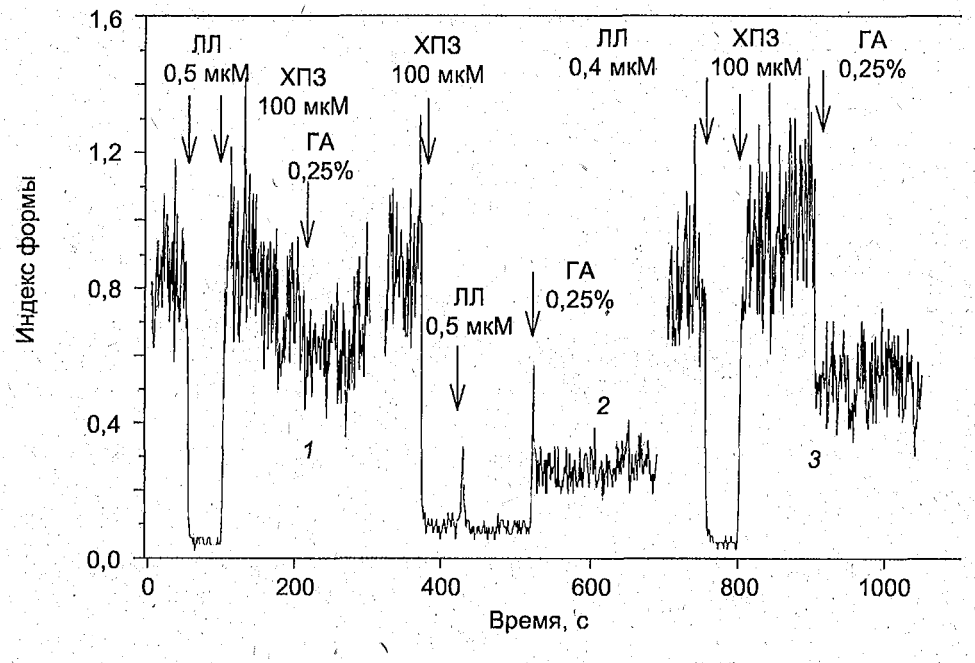


Рис. 8. Изменения ИФ суспензии эритроцитов под влиянием лизолецитина (ЛЛ), хлорпромазина (ХПЗ) и глутарового альдегида (ГА). Стрелками показано добавление аликвот реактивов для получения указанных конечных концентраций. Описание треков 1–3 см. в тексте

превращение клеток в сферопойкилоциты, которое сопровождалось снижением ИФ почти до нуля (трек 1). Последующее применение хлорпромазина, вызывающего стоматоцитоз, превращало клетки в дискоидные, компенсируя этим эффект лизолецитина. Полученная в итоге морфология клеток (близкая к дискоидной), по-видимому, адекватно фиксировалась 0,25% глутаровым альдегидом, поскольку его добавление не вызывало существенных изменений ИФ. Близость формы этих клеток к дискоидной непосредственно подтверждалась также результатами микроскопического анализа после фиксации (данные не представлены, см. также рис. 6).

Однако, если эти же вещества добавляли в обратном порядке, то дискоидная форма не восстанавливалась. После добавления лизолецитина клетки быстро трансформировались в сферопойкилоциты после кратковременного промежуточного состояния, наблюдаемого сразу же после добавления реактива (трек 2). Попытки зафиксировать клетки в окончательной форме приводили к резкому повышению ИФ, что указывает на непосредственное влияние глутарового альдегида на форму клеток. Следует отметить, что попытки зафиксировать клетки в форме пойкилоцитов, варьируя конечную концентрацию глутарового альдегида или его содержание в маточном растворе, либо используя параформальдегид в качестве фиксирующего агента (данные не представлены), также были безуспешными. Во всех случаях мы получали картину, аналогичную представленной треком 2. Трек 3 представляет еще один пример изменения формы клеток при фиксации глутаровым альдегидом. При этом трек 3 эквивалентен треку 1, когда фиксация казалась вполне адекватной, за исключением использования несколько меньшей концентрации лизолецитина (сравните треки 1 и 3). Несмотря на то, что добавление хлорпромазина восстанавливало дискоидную форму клеток, такое же количество глутарового альдегида существенно снижало ИФ в отличие от предшествующего случая. Это означает, что дискоидные клетки обладают различной чувствительностью к действию глутарового альдегида. Этот эффект, по-видимому, можно объяснить тем, что нормальная двояковогнутая форма эритроцитов представляет собой результат взаимодействия четырех слоев мембраны эритроцитов: двух липидных слоев, внутреннего цитоскелета и наружного гликокаликса. Взаимодействие посторонних молекул с этими слоями и избирательное изменение площади поверхности приводит к изменению формы клеток. Лизолецитин встраивается в наружный слой плазматической мембраны и увеличивает площадь ее поверхности, обусловливая пойкилоцитоз, в то время как двойственный катион хлорпромазин, по-видимому, распределяется во внутреннем слое, что обусловливает стоматоцитоз [9, 10]. Можно предположить, что между лизолецитином и

хлорпромазином устанавливается какое-то равновесие, так что действие одного соединения компенсируется действием другого и дискоидная форма в итоге не изменяется. Действительно, на рис. 8 видно (треки 1 и 3), что хлорпромазин восстанавливает дискоидную форму эритроцитов после того, как под действием лизолецитина они приобрели форму пойкилоцитов. Однако новое равновесие не может быть столь же устойчивым, как нативная конфигурация мембраны. Можно ожидать, что даже слабое дополнительное воздействие, которое приводят к относительно малому уменьшению или увеличению площади поверхности каждого слоя мембраны, будет нарушать это равновесие и вызовет выраженное изменение формы. Так, влияние глутарового альдегида можно объяснить следующим образом: в начальной фазе взаимодействия глутарового альдегида с мембраной эритроцита нарушаются сбалансированные эффекты лизолецитина и хлорпромазина и форма клеток при этом изменяется. Следовательно, способность глутарового альдегида дополнительно изменять форму клеток зависит от исходного состояния мембраны эритроцитов, в частности, от характера и интенсивности предшествующих воздействий. Поскольку различные воздействия в каждом случае затрагивают различные области мембраны (липидный бислой, цитоскелет или гликокаликс), то невозможно предсказать, вызовет или нет фиксация дополнительные изменения и насколько значительны будут эти изменения. Тем не менее предложенный метод позволяет обнаруживать эти изменения и оценивать их величину и значимость.

Авторы выражают благодарность доктору А. Оливеру за критические замечания по статье и за грант RUIHL57810-01, предоставленный Национальным институтом здравоохранения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chernoff, A., and Snyder, E.L. (1992) *Transfusion*, **32**, 386–390.
2. Wencel-Drake, J.D. (1992) *Blood Cells*, **18**, 476–479.
3. Nystrom, M.L., Barradas, M.A., Jeremy, J.Y., and Mikhalidis, D.P. (1994) *Thromb. Haemost.*, **71**, 646–650.
4. Boomgaard, M.N., Joustra-Dijkhuis, A.M., Gouwerok, C.W.N., Steneker, I., Reesink, H.W., Loos, J.A., Pietersz, R.N.I., and De Korte, D. (1994) *Transfusion*, **34**, 311–316.
5. Rowe, A.W. (1995) *Infusionsther. Transfusiosmed.*, **22**, 36–40.
6. Szoland, K., Nowak, M., Zaborowski, A., and Bryszewska, M. (1995) *Biomed. Lett.*, **51**, 237–246.
7. Metzelar, M.H., Korteweg, J., Sixma, J.J., and Neiuwenhuis, H.K. (1993) *J. Lab. Clin. Med.*, **121**, 579–587.
8. Tablin, F., Oliver, A.E., Walker, N.J., Crowe, L.M., and Crowe, J.H. (1996) *J. Cell Physiol.*, **168**, 305–313.
9. Ferrel, J.E., Lee, K., and Huestis, W.H. (1985) *Biochemistry*, **24**, 2849–2857.
10. Chen, J.Y., and Huestis, W.H. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1323**, 299–309.
11. Bessis, M (1973) *In Red Cell Shape: Physiology, Pathology, Ultrastructure*. Bessis, M., Weed, R.I., and Leblond, P.F. ed., Springer-Verlag, New York. 1–23.
12. Morel, F.M.M., Baker, R.F., and Wayland, H (1971) *J. Cell Biol.*, **48**, 91–100.

TIME-DEPENDENT SHAPE CHANGES IN ERYTHROCYTES

S.V. Rudenko[1], J.H. Crowe[1], F. Tablin[2]

[1]*Section of Molecular and Cellular Biology, School of Veterany Medicine, University of California, Davis, CA 95616, USA; fax: (916) 752-5305, E-mail: svrudenko@ucdavis.edu*

[2]*Department of Cell Biology and Anatomy, School of Veterany Medicine, University of California, Davis, CA 95616, USA*

Submitted November 21, 1997
Revision submitted April 4, 1998

A kinetic method for detecting changes in erythrocyte shape with time resolution on the order of seconds is described. The definition of shape index (SI) and the experimental conditions under which the measurements should be conducted are given and the relationship between SI and morphological index, which is often used to quantitatively assess morphology of erythrocytes, is established. Further, it is shown that the method can be used to assess shape changes under a variety of experimental conditions known to cause major perturbations in the morphology of erythrocytes (such as addition of lysolecithin or chlorpromazine) and to detect changes in shape during chemical fixation for observation with microscopy. The ability of glutaraldehyde to fix red blood cells without additional alteration in shape strongly depends on the morphology that is being fixed and the initial state of the cells.

KEY WORDS: erythrocytes, shape, kinetics, glutaraldehyde, paraformaldehyde, chlorpromazine, lysophosphatidylcholine.