БИОХИМИЯ, 2010, том 75, вып. 8, с. 1133 – 1141

УДК 577.352.4

РЕКОНСТРУКЦИЯ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТОВ В ХОДЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА

© 2010 г. С.В. Руденко[1*], М.К. Саид[2]

[1] *Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков 61015, Украина; электронная почта: rsv@kharkov.ua*

[2] *Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61077, Украина*

Поступила в редакцию 15.01.10
После доработки 10.03.10

В работе исследовали изменение формы эритроцитов человека в ходе морфологического ответа в сахарозной среде, модифицированного бензалконием хлоридом. Показано, что обработка эритроцитов фиксирующими реагентами на основе глутарового альдегида или формалина в различных временных точках процесса в большинстве случаев приводит к неадекватной фиксации текущей формы клеток. Использованный способ реконструкции формы эритроцитов с учетом эффекта самого фиксатора показал, что бензалконий хлорид проявляет свойства эхиноцитарного агента, эффект которого увеличивается с ростом концентрации детергента. Показано, что бензалконий хлорид может индуцировать прямой переход формы эритроцитов из сферостоматоцитов в сфероэхиноциты без изменения сферической формы клеток. С другой стороны, обратный переход из сфероэхиноцита в стоматоцит всегда сопровождался некоторым уплощением клеток, хотя дискоидная форма в ряде случаев также не достигалась. Наши данные указывают на несимметричность морфологических переходов эритроцитов в сахарозной среде, что противоречит континиумной модели и модели бислойной пары. Вероятно, существенная неоднородность нативной мембраны эритроцита играет бóльшую роль в морфологических переходах этих клеток, чем предполагалось ранее.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, форма, морфологический переход, морфологический ответ, сахароза, бензалконий хлорид.

При физиологических условиях нормальные эритроциты человека имеют форму двояковогнутого диска. Известно, что многие реагенты могут обратимо модифицировать эту форму при постоянной площади поверхности и объеме [1–4]. Одна серия реагентов, включающая анионные амфипаты, высокие значения концентрации солей и pH, истощение по АТФ, обогащение холестерином и близость к стеклянной поверхности, индуцирует серию кренированных форм, называемых *эхиноцитами* и характеризующихся наличием спикул. Другая серия агентов – катионные амфипаты, низкие концентрации солей или значения pH, истощение по холестерину, индуцирует вогнутые формы, называемые *стоматоцитами*. Эти трансформации клеточной формы являются универсальными в том смысле, что вид формы и порядок ее появления не зависит от того, какой именно эхиноцитарный или стоматоцитарный агент ее вызывает. Объяснение этим изменениям формы эритроцитов дали Хофман [5] и Шитс с Сингером [6], которые предположили существование механизма, включающего мембранный дисбаланс и небольшие изменения в площади поверхности ΔA_0 между двумя бислоями клеточной мембраны. Таким образом, любой эффект, который приводит к расширению внешнего монослоя по отношению к внутреннему (увеличение ΔA_0) приводит к формированию выпуклых структур на клеточной поверхности (эхиноцитарные спикулы), и наоборот, расширение внутреннего монослоя (уменьшение ΔA_0) способствует формированию вогнутостей, т.е. стоматоцитарных форм. Другая, недавно предложенная модель постулирует, что форма эритроцита определяется эластичностью изгиба липидного бислоя и сдвиговой эластичностью мембранного скелета [7, 8]. Эта теория (теория бислойной пары, ТБП) объясняет универсальность основного перехода стоматоцит-дискоцит-эхиноцит или обратного перехода, постулируя, что все формомодулирующие агенты (физические или химические) действуют полностью или главным обра-

* Адресат для корреспонденции.

зом, влияя на ΔA_0. Эта модель способна воспроизвести различные стадии эхиноцитоза или стоматоцитоза за счет простого варьирования относительных площадей липидного бислоя, а также предсказать существование других форм за пределами этой основной последовательности, которые наблюдаются при определенных условиях [7]. ТБП была успешно применена для качественного и количественного объяснения изменения формы эритроцитов при действии различных экзогенных стимулов [9–15]. Недавно мы охарактеризовали морфологические переходы, которые спонтанно возникают при перенесении эритроцитов в неэлектролитную среду сахарозы с низким содержанием хлора – морфологический ответ (МО) [15, 16]. Механизм этого явления в настоящее время неясен, однако хорошая воспроизводимость этой простой модельной системы позволяет использовать ее для проверки теоретических представлений о механизмах регуляции формы эритроцитов в иных условиях, отличающихся от физиологических. Поскольку было установлено, что катионный детергент бензалконий хлорид способен встраиваться в мембрану эритроцитов и изменять их форму в физиологическом растворе [17], он может быть использован как модификатор состояния поверхности мембран клеток. Этот детергент имеет коэффициент распределения порядка 1000 [17] и, кроме того, его влияние на форму эритроцитов в неэлектролитной среде ранее не было исследовано. В связи с этим, целью данной работы было более подробно охарактеризовать морфологию эритроцитов на различных стадиях МО, модифицированного бензалконий хлоридом, и выяснить в какой степени эффект его действия находится в соответствии с положениями теории бислойной пары.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использовали свежие эритроциты человека, которые были любезно предоставлены клинической лабораторией Института медицинской радиологии им. С.П. Григорьева АМН Украины. Кровь забирали в вакуумные пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта. После самопроизвольной седиментации осадок отмывали один раз физиологическим раствором (150 мМ NaCl) и второй раз – изотоническим раствором HBS (150 мМ NaCl, 5 мМ HEPES, pH 7,4). Затем осадок ресуспендировали в HBS, доводя до конечного объема в 1 мл, и использовали как сток-суспензию.

Для изучения динамики морфологического ответа (МО) клеток в стандартной сахарозной среде (0,3 М) без буфера использовали двухканальный формометр-агрегометр ФА-01, который наряду с измерением оптической плотности (ОП) или светопропускания, измеряет флуктуации интенсивности светового потока, которые несут информацию о форме клеток [18]. Индекс формы (ИФ) рассчитывали по протоколу, описанному ранее для определения формы эритроцитов [18], и вычисляли 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 7–9 мкл сток-суспензии эритроцитов с учетом, чтобы начальное значение ОП было в пределах $0{,}30 \pm 0{,}01$, что соответствует концентрации 6 млн клеток в 1 мл. Клеточную суспензию перемешивали с помощью магнитной мешалки со скоростью 600 об/мин. Динамику морфологических изменений изучали при введении того же количества клеток в среду сахарозы («Merck»), pH 5,8–6,2. В отдельных экспериментах дополнительные реагенты (от 0,5 до 10 мкл) добавляли непосредственно в кювету из концентрированных растворов до получения заданной конечной концентрации [15].

Для фиксации формы эритроцитов к 2 мл клеточной суспензии добавляли 0,2 мл фиксирующих реагентов следующего состава: FRa – 5%-ный глутаровый альдегид, 20 мМ фосфатный буфер, 150 мМ NaCl, pH 6,4; FRb – 4%-ный формалин, 50 мМ фосфатный буфер, pH 7,4; FRab – смесь реагентов FRa и FRb в соотношении 1 : 1; FR5 – 5%-ный глутаровый альдегид, 20 мМ фосфатный буфер, 0,3 М сахароза, pH 5,7. После выдерживания клеток в этом растворе в течение нескольких часов, образцы центрифугировали, осадки изучали микроскопически и фотографировали при увеличении 800. Использовали сток – раствор детергента бензалконий хлорид (BzA) («Fluka», Германия) с концентрацией 0,4 мг/мл. Эксперименты проводили при комнатной температуре 22–24°.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При обработке эритроцитов в физиологическом растворе (HBS) различными фиксирующими реагентами в некоторых случаях были

видны небольшие изменения ИФ, указывающие на то, что процедура фиксации несколько влияет на форму клеток и зависит от донора и типа реагента. Однако, в целом, было установлено, что во всех случаях клетки фиксируются в форме дисков с небольшим количеством других форм, что свидетельствует о достаточно адекватной фиксации эритроцитов используемыми фиксирующими реагентами в физиологическом растворе. В сахарозном растворе клетки динамически изменяли свою форму, претерпевая трехфазный морфологический ответ (МО), в котором первая фаза является эхиноцитарной, вторая – дискоцитарной, третья – стоматоцитарной [15, 16]. При фиксации эритроцитов на стоматоцитарной фазе 3 ИФ во всех случаях увеличивался, при использовании фиксаторов FRa, FRab и FR5 эритроциты имели форму стоматоцитов, тогда как в случае фиксатора FRb – форму эхиноцитов. Отсюда следует, что фиксатор FRb (формалин) в сахарозной среде неадекватно фиксирует эритроциты, трансформируя их, преимущественно, в эхиноциты. Поэтому мы не использовали этот фиксатор в последующих экспериментах. Фиксатор FRab, также содержащий формалин, увеличивал ИФ в большей степени, чем другие, но, при этом, клетки все равно оставались стоматоцитами, хотя степень их стоматоцитоза была меньше по сравнению с другими реагентами, которые содержали только глутаровый альдегид (данные не приведены).

Многие вещества способны модифицировать стандартный МО в сахарозной среде, воздействуя на его различные фазы [15, 16, 19]. На рис. 1 представлены данные для BzA. Видно, что результат зависит от концентрации BzA и фазы МО, на которой он действует. Изменения ИФ достоверно показывают, что BzA изменяет форму эритроцитов, которая отличается от дискоидной, когда значение ИФ меньше единицы, но к какому классу эта форма относится остается неясным. Например, второй широкий пик на рис. 1 (ИФ 1, кривая *1*), формирующийся после добавления BzA, может характеризовать как эхиноцитарные, так и стоматоцитарные формы клеток. При большей концентрации BzA ИФ имеет низкое значение на фазе 1 и после добавления на максимуме МО (рис. 1, ИФ 2), а при добавлении на фазе 3 появляется небольшой переходной пик. Для решения вопроса о том, какие формы возникают после действия BzA на различных фазах МО, мы фиксировали эритроциты на максимуме второго пика и в других временных точках. Данные, приведенные на рис. 1 (ИФ3), показывают, что действие FRa и FRab при фиксации на максимуме имеет разнонаправленный характер. Первый реагент увеличивает ИФ, а второй – его уменьшает. В другом случае, фиксация FRa не меняет ИФ, а FRab снова приводит к его уменьшению (рис. 1, ИФ3, кривая *2*). Оба реагента уменьшали ИФ при фиксации эритроцитов, к которым добавляли большое количество BzA (рис. 1, ИФ 4). Эти данные, в совокупности, говорят о том, что сам процесс фиксации существенно влияет на текущую форму эритроцитов в сахарозной среде, которая содержит BzA. Более того, как видно из снимков, представленных на рис. 2, формы, получающиеся в результате фиксации различными реагентами, могут принципиально отличаться. Это говорит о том, что метод фиксации не дает нам возможности объективно судить о форме клеток на той или иной стадии модифицированного МО. Другой метод непосредственного наблюдения за формой эритроцитов под микроскопом на стеклянной поверхности в тонком слое или капле жидкости, усложнен артефактами, обусловленными эффектом стекла [20], которые сильно проявляют себя в отношении модифицированных BzA эритроцитов в сахарозной среде. Исходя из этого, мы попытались реконструировать морфологию клеток, основываясь на следующих соображениях и экспериментальных фактах. Соображения сводятся к тому, что мы можем выдвинуть гипотезу о характере изменения формы клеток в тех или иных условиях и сопоставлять ее с полученными данными с учетом влияния самого фиксирующего реагента.

Полученные нами и другие данные [15, 16] указывают на то, что эритроциты на фазе 3 имеют форму стоматоцитов. Поэтому, мы фиксировали их после инкубации клеток в сахарозной среде в течение 30 мин в присутствии различных концентраций BzA. Результаты, приведенные в таблице, показывают, что с увеличением концентрации BzA наблюдается прогрессирующее увеличение числа эхиноцитов в образцах, фиксированных FRab, дисков и других плоских клеток в образцах, фиксированных FRa. Это означает, что при фиксации стоматоцитов реагент FRa делает их более плоскими, т.е. уменьшает степень стоматоцитоза. Тоже сначала делает и реагент FRab, но далее, при увеличении концентрации BzA, он начинает формировать эхиноциты. На основании этого можно сделать вывод, что при фиксации оба реагента проявляют собственный эхиноцитарный тип действия, причем сила реагента FRab в этом отношении превышает силу реагента FRa. Учитывая это свойство реагентов, теперь можно интерпретировать данные, представленные на рис. 1. Наш вывод полностью согласуется с предположением о том, что второй пик ИФ после добавления

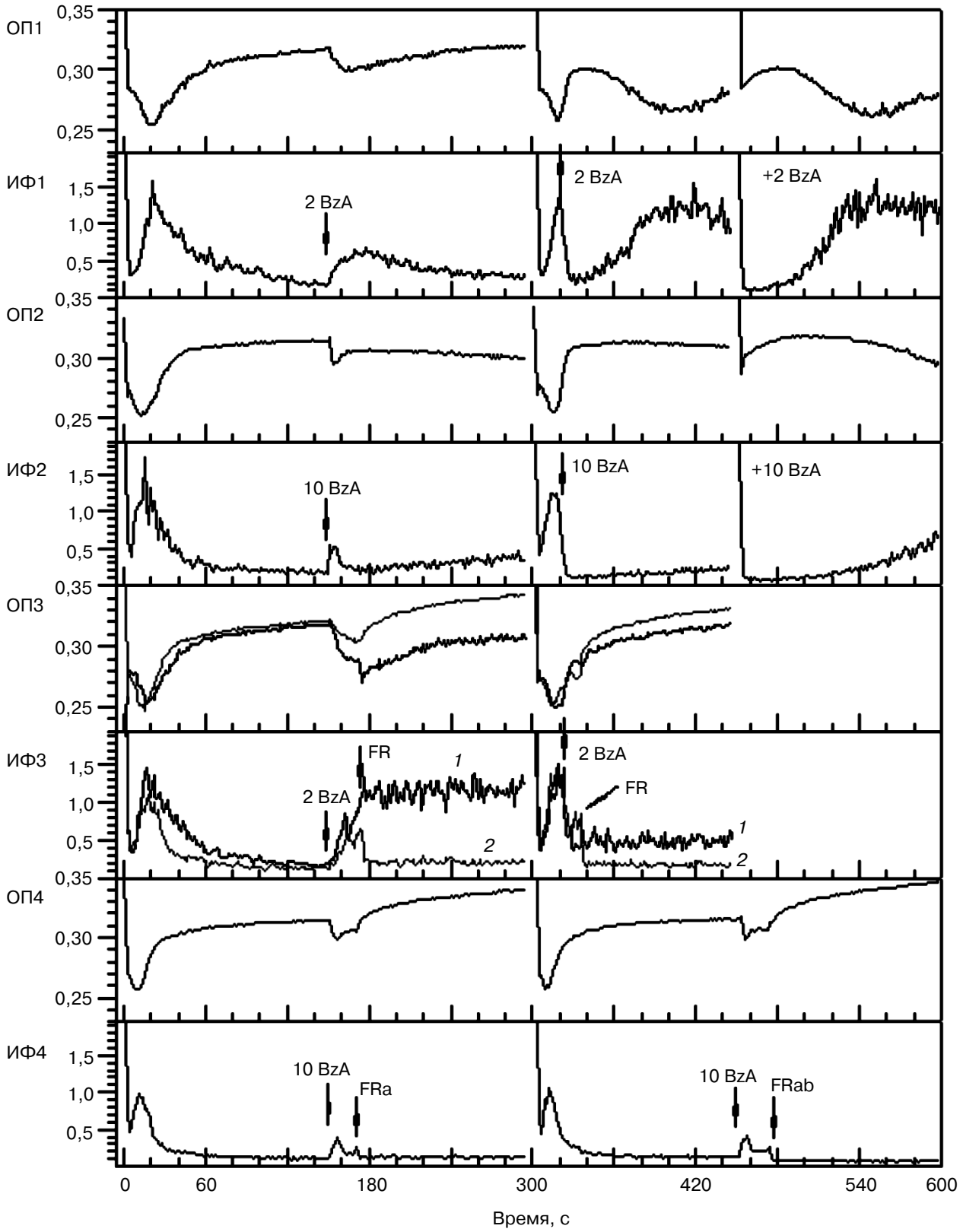


Рис. 1. Изменения ОП и ИФ эритроцитов в ходе МО и при действии BzA, и фиксирующих реагентов на его различных стадиях. Стрелки и обозначения возле них обозначают тип и объем (в мкл) добавленного реагента. Обозначения со знаком (+) означают, что этот объем BzA был добавлен в кювету до клеток. Обозначения FR на ИФ 3 означает добавление 0,2 мл фиксирующего реагента FRa для кривых *1* и FRab – для кривых *2*

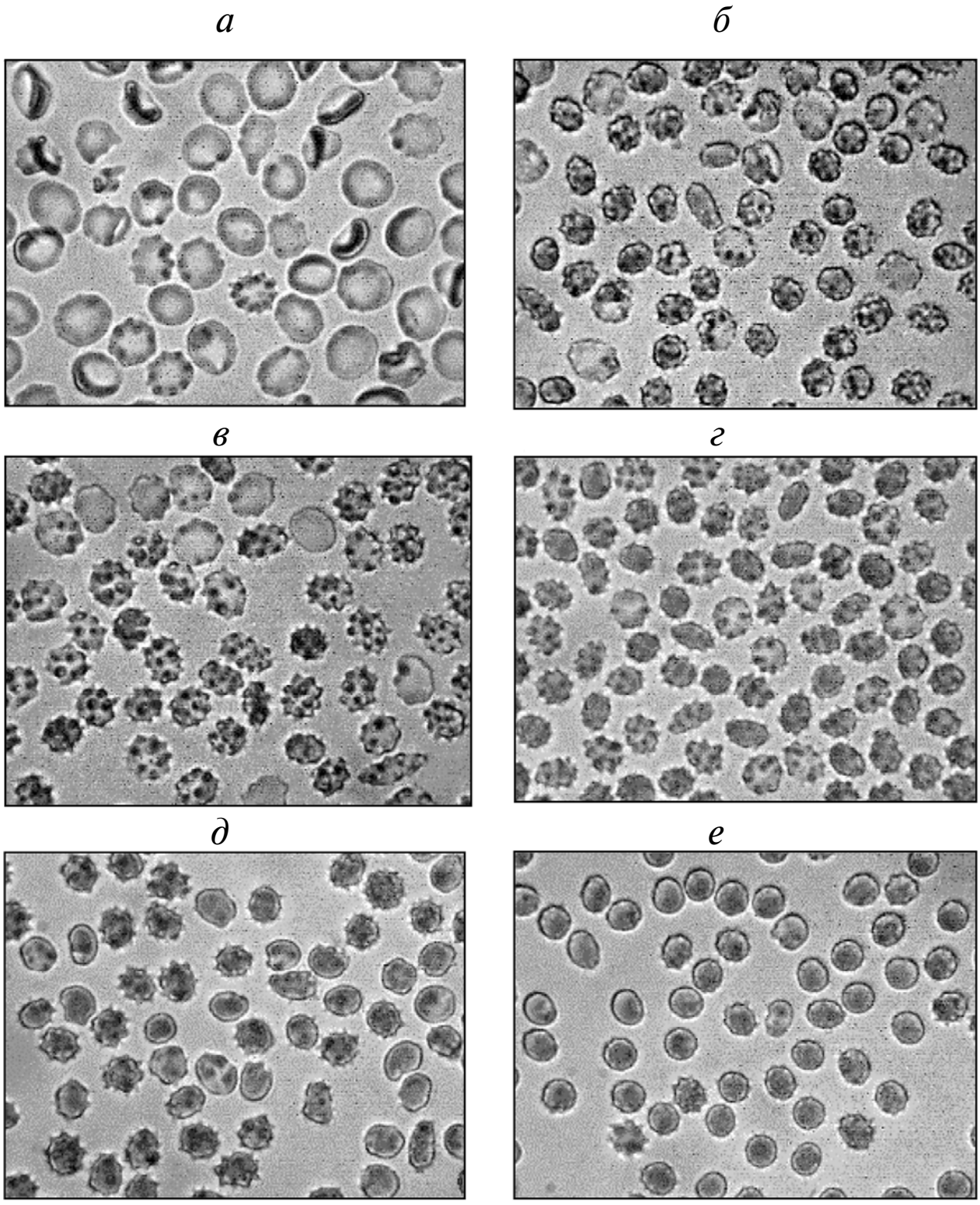


Рис. 2. Морфология эритроцитов после фиксации в различных временных точках МО, соответствующая данным, представленным на рис. 1. *а* – ИФ 3, FRa, кривая *1*; *б* – ИФ 3, FRb, кривая *2*, при фиксации на максимуме второго пика ИФ после добавления BzA через 150 с после клеток (первая половина ИФ 3); *в* – ИФ 3, FRa, кривая *1*; *г* – ИФ 3, FRab, кривая *2*, при фиксации после добавления BzA через 20 с после клеток (вторая половина ИФ 3); *д* – ИФ 4, FRa; *е* – ИФ 4, FRab

Преимущественная форма эритроцитов после фиксации реагентами FRa и FRab в зависимости от концентрации BzA

Концентрация BzA, мкг/мл	Фиксирующий реагент FRa	Фиксирующий реагент FRab
0	S	S
0,2	S	S
0,4	S	S + E
1	S + D	E + A + S
2	D + A	E + A

Примечание. Эритроциты в стандартной концентрации вводили в среду сахарозы, содержащую указанное количество BzA, инкубировали 30 мин и фиксировали как указано в методах исследования. S – стоматоциты; D – дискоциты; E – эхиноциты; A – плоские акантоциты. В случаях, когда образцы содержали клетки с различной формой, сумма начинается с формы, которая является наиболее распространенной в данном образце.

BzA осуществляется в пределах стоматоцитарных форм клеток. Именно поэтому FRa сдвигает эти формы в сторону более плоских форм (увеличивает ИФ), а реагент FRab, который обладает более сильным эхиноцитарным действием, чем FRa, формирует эхиноциты (рис. 2). При добавлении BzA на максимуме МО он индуцирует формирование эхиноцитов, поэтому FRa достаточно адекватно их фиксирует, а FRab усиливает этот эхиноцитоз, что видно по уменьшению ИФ. Подтверждением нашего вывода можно также считать то, что если фиксировать клетки реагентом FRa не на максимуме второго пика, а значительно позже его (через 500 с), то увеличение ИФ будет меньше, и в образцах наблюдаются в основном стоматоцитарные формы (данные не приведены). При увеличении концентрации BzA действие этого эхиноцитарного фактора усиливается, и клетки быстро приобретают форму сфероэхиноцитов, которая одинаково фиксируется обоими фиксирующими реагентами (рис. 2, *д*, *е*). Наблюдается прямой переход стоматоцитов в сфероэхиноциты без достижения промежуточных дискоидных форм. Хотя небольшие пики в значениях ИФ и ОП можно интерпретировать как некое транзиторное состояние между стоматоцитом и сфероэхиноцитом, на представленных снимках можно обнаружить гладкие сфероподобные клетки, которые выпускают тонкие спикулы. Каких-либо уплощенных клеток в этих точках фиксации не наблюдается. Следовательно, сфероэхиноцит в этих условиях может формироваться непосредственно из сферостоматоцита, т.е. крайних противоположных классов этих форм.

Мы также исследовали вопрос о возможности обратного перехода между эхиноцитом и стоматоцитом. При этом мы исходили из аналогичного предположения, что если эхиноцит подвергнуть действию стоматоцитарного стимула, то он должен сначала индуцировать переход эхиноцита в дискоцит, а при увеличения силы стимула, возможно, и более непосредственный переход в стоматоцит, минуя дискоидную форму. В настоящее время мы знаем несколько факторов, которые в неэлектролитной среде обладают стоматоцитарным действием на МО. К этим факторам относятся кальций, Na2EDTA и низкие значения pH (HCl) [15]. Эти агенты обладают интересным свойством. Если клетки вносятся в сахарозную среду в их присутствии, то фаза 1 МО полностью ингибируется, т.е. клетки не переходят в эхиноциты, а остаются дискоидными. При этом кальций и HCl несущественно влияют на фазу 3, а Na2EDTA несколько ее ингибирует. Если же агенты добавлять к клеткам через небольшой промежуток времени после начала МО, то они активируют последующие фазы МО, а если добавлять на фазе 3, то активируют ее, т.е. проявляют качества стоматоцитарного стимула. Поскольку BzA активирует фазу 1 МО и превращает эритроциты в сфероэхиноциты, добавление указанных стоматоцитарных агентов на этой фазе позволяет проверить высказанное предположение. Мы установили: действительно все реагенты в небольших концентрациях приводят к быстрому и значительному увеличению ИФ, что свидетельствует о переходе эхиноцитов в диски, это можно интерпретировать как компенсацию эхиноцитоза за счет действия стоматоцитарного фактора. Такой ответ сохранялся при увеличении концентрации кальция до 10 мМ. При этом как кальций, так и Na_2EDTA ингибировали фазу 3 МО, и клетки длительное время сохраняли дискоидную форму. Это говорит о более сложной природе влияния кальция и Na_2EDTA на МО, чем простое предположение об их стоматоцитарном типе действия, поскольку в этом случае мы должны были ожидать и стимуляции стоматоцитарной фазы 3, что в действительности не происходит. Таким образом, эти два реагента проявляют свое стоматоцитарное действие в присутствии BzA только на фазе 1, которое заключается в уплощении клеток, но не приводит к формированию стоматоцитов. Более близким к теоретическим ожиданиям оказалось действие HCl. Из данных, представленных на рис. 3 (ИФ 1), видно, что не-

большая концентрация HCl приводит к стимуляции восстановления ИФ с последующим его уменьшением, тогда как большие концентрации уменьшают амплитуду возникающего пика ИФ. Эти данные можно интерпретировать как переход между эхиноцитами и стоматоцитами. На рис. 3 (ИФ 2) показано как фиксаторы влияют на окончательную форму эритроцитов. Как и в предыдущих случаях, фиксация реагентом FRa приводит к увеличению ИФ, а фиксация FRab – к ее уменьшению.

Полученная картина характерна для фиксации стоматоцитов. На фотографиях таких клеток в первом случае наблюдаются диски и стоматоциты, а во втором – эхиноциты (данные не приведены). Таким образом, можно утверждать, что HCl действительно индуцирует переход эхиноцитов в стоматоциты. Что же касается вопроса о том, может ли этот переход осуществляться без промежуточной дискоидной формы, как в случае обратного перехода стоматоцит–эхиноцит, наши данные не могут дать на него определенного ответа. С одной стороны, на возможность такого перехода указывает то, что изменения как ИФ, так и ОП, которые при этом происходят, в два–три раза меньше, чем должны были быть, если бы переход происходил через дискоидную форму (сравни рис. 3, ОП 1 и ОП 2). Однако это может быть связано как с большой скоростью процесса, так и с гетерогеннностью клеточной популяции, что приводит к усреднению эффекта и занижает величину изменения ИФ.

В других экспериментах с различными концентрациями BzA и HCl мы всегда регистрировали небольшие пики как на кривых ОП, так и ИФ, что, скорее всего, указывает на то, что в процессе этого перехода форма клеток в той или иной степени отклоняется от формы сфероэхиноцита. На наш взгляд наиболее правдоподобной моделью является следующая: чтобы клетка из эхиноцита перешла в стоматоцит, должна быть предварительно уменьшена степень эхиноцитоза, но не обязательно должен быть переход в дискоидную форму. Иными словами, наши данные указывают на возможность перехода эхиноцит–стоматоцит, если степень эхиноцитоза еще не достигла определенной критической величины. Если же клетки имеют степень эхи-

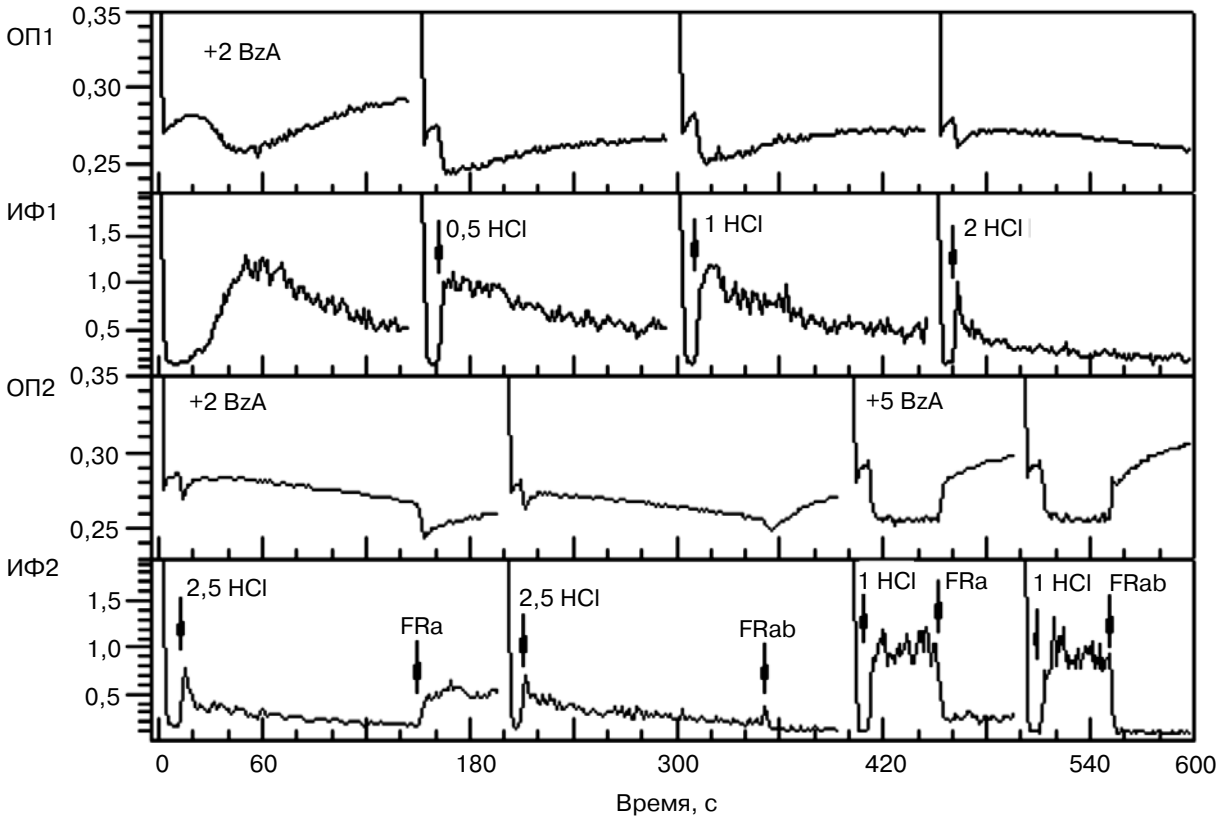


Рис. 3. Влияние BzA и HCl на динамику МО. Стрелки показывают момент добавления указанного объема (в мкл) HCl (0,1 М) или 0,2 мл фиксирующих реагентов в суспензию эритроцитов. Обозначения со знаком (+) означают, что этот объем BzA был добавлен в кювету до клеток

ноцитоза большую, чем критическая, они не могут преобразоваться в стоматоцит без предварительного уплощения. Это подтверждается наблюдениями, что если HCl добавлять на различных стадиях фазы 2 МО в присутствии BzA, то начиная с определенной величины ИФ кислота вызывает переход клеток в стоматоциты без переходного пика ИФ и ОП. Возможно, таким образом, можно в дальнейшем определить пороговую величину ИФ и охарактеризовать форму клеток в этом состоянии морфологически. В этом состоит отличие перехода эхиноцит–стоматоцит от обратного перехода стоматоцит–эхиноцит, который может происходить, практически, без изменения близкой к сферической форме клетки. Наши данные подтверждают общие представления о том, что между эхиноцитарными и стоматоцитарными стимулами наблюдается антагонизм, т.е. один фактор компенсирует действие другого. Это хорошо прослеживается в случаях, когда клетки с течением времени уменьшают свою чувствительность к блокирующему действию BzA. При этом их реакция приближается к контрольному МО и требуется меньшее количество кислоты, чтобы вызвать такой же ответ. И, наоборот, если концентрация BzA увеличивается, т.е. степень эхиноцитоза возрастает, количество кислоты (стоматоцитарного фактора) следует также увеличивать. Таким образом, варьируя соотношение обоих реагентов, можно получать практически идентичные морфологические переходы эритроцитов.

Как следует из полученных нами данных, фиксация эритроцитов на различных фазах МО, как правило, приводит к изменению их текущей формы. Только в некоторых случаях фиксация происходит без существенного изменения ИФ, что позволяет считать, что эти клеточные формы фиксируются достаточно адекватно. Это, по-видимому, объясняется тем, что BzA, сам по себе, вызывает значительное повышение чувствительности клеток к модифицирующему действию фиксирующих реагентов, в первую очередь к FRab. Возможно, в этом проявляется синергизм в действии этих двух эхиноцитарных факторов. Это подтверждается и данными, что адекватная фиксация дискоидной формы реагентом FRa при концентрации BzA 0,4 мкг/мл (данные не приведены) сменяется неадекватной и приводит к резкому уменьшению ИФ и формированию эхиноцитов при концентрации 1 мкг/мл (рис. 3, ИФ 2). Согласно нашему представлению, морфологический переход сферостоматоцит–сфероэхиноцит можно объяснить с помощью теории бислойной пары. Если площадь поверхности внешнего монослоя увеличивается за счет встраивания молекул BzA, то это может привести к формированию тонких спикул, которые растут на гладкой внешней поверхности стоматоцита. Рост этих новых спикул может сопровождаться исчезновением инвагинаций, которые исходно расположены внутри стоматоцита и, таким образом, приводить к образованию сфероэхиноцита. Если же рост спикул и рассасывание инвагинаций происходит с разной скоростью, то это может объяснить, почему эритроцит не разворачивается в диск. Однако для этого надо допустить, что события на спикулах и инвагинациях происходят в достаточной степени независимо друг от друга, т.е. являются локальными, а не генерализованными, что предполагает теория бислойной пары. Обратный переход объяснить сложнее, даже с использованием предположения о локальном характере спикул. Для преобразования сфероэхиноцита в стоматоцит, ему необходимо, в первую очередь, редуцировать спикулы, что неизбежно должно приводить к уплощению клетки. Такое частичное уплощение, действительно, подтверждается нашими экспериментами. Однако остается непонятным, почему, будучи запущенным, этот процесс уплощения не идет далее и не приводит к формированию дискоцитов, как это происходит в случае стандартного МО, как в присутствии, так и в отсутствии BzA? Какие причины приводят к тому, что, достигнув определенной стадии эхиноцитоза, клетка начинает превращаться в стоматоцит, минуя дискоидную форму, остаются непонятными и требуют дальнейшего изучения.

В заключение следует отметить, что некоторые полученные нами данные не могут быть объяснены с помощью теории бислойной пары в ее исходной форме [6, 11] и других более модифицированных моделей [7, 8, 21], которые рассматриваются как основа наших представлений о механизмах изменения формы эритроцитов. Сведения о локальном характере формирования спикул и инвагинаций мембраны эритроцитов также объясняют полученные результаты не полностью, поэтому необходим пересмотр текущих моделей этого процесса.

Авторы выражают благодарность Институту медицинской радиологии им. С.П. Григорьева АМН Украины за поддержку и предоставление базы для выполнения настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hoffman, J.F. (1987) *Blood Cells*, **12**, 565–588.
2. Hoffman, J.F. (2004) *Blood Cells Mol. Dis*, **32**, 335–340.
3. Wong, P. (1999) *J. Theor. Biol.*, **196**, 343–361.
4. Wong, P. (2005) *J. Theor. Biol.*, **233**, 127–135.
5. Hoffman, J.F. (1972) *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **12**, 771–774.
6. Sheetz, M.P., and Singer, S.J. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4457–4461.
7. Lim, H.W.G., Wortis, M., and Mukhopadhyay, R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16766–16769.
8. Mukhopadhyay, R., Lim, H.W.G., and Wortis, M. (2002) *Biophys. J.*, **82**, 1756–1772.
9. Chi, L.M., and Wu, W.G. (1990) *Biophys. J.*, **57**, 1225–1232.
10. Ferrell, J.E.J., Lee, K.J., and Huestis, W.H. (1985) *Biochemistry*, **24**, 2849–2857.
11. Sheetz, M.P., Painter, R.G., and Singer, S.J. (1976) *J. Cell Biol.*, **70**, 193–203.
12. Sheetz, M.P., and Singer, S.J. (1976) *J. Cell Biol.*, **70**, 247–251.
13. Iglic, A., Kralj-Iglic, V., and Hagerstrand, H. (1998) *Eur. Biophys. J.*, **27**, 335–339.
14. Lange, Y., and Slayton, J.M. (1982) *J. Lipid Res.*, **23**, 1121–1127.
15. Rudenko, S.V. (2009) *Blood Cells Mol. Dis.*, **42**, 252–261.
16. Rudenko, S.V. (2009) *Bioelectrochemistry.*, **75**, 19–25.
17. Руденко С.В., Саид М.К., Бондаренко В.А. (2009) *Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Біофізічний вісник., Вип.* **2(23)**, 69–76.
18. Руденко С.В., Кроуф Дж.Х., Таблин Ф. (1998) *Биохимия*, **63**, 46–55.
19. Руденко С.В., Мухамед Хани Румиех, Бондаренко В.А. (2007) *Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Біофізічний вісник., Вип.* **1 (18)**, 53–60.
20. Eriksson, L.E. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1036**, 193–201.
21. Tachev, K.D., Danov, K.D., and Kralchevsky, P.A. (2004) *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **34**, 123–140.

RECONSTRUCTION OF ERYTHROCYTE SHAPE DURING MODIFIED MORPHOLOGICAL RESPONSE

S. V. Rudenko[1*], M. Kh. Saeid[2]

[1] *Institute for Problem of Cryobiology and Cryomedicine of NASU, 23 Pereyaslavskaya st., Kharkov, 61015 Ukraine; E-mail: rsv@kharkov.ua*

[2] *V. N. Karazin Kharkov National University, 4 Svobody sq., Kharkov, 61077 Ukraine*

Received January 15, 2010
Revision received March 10, 2010

In this work, changes in red blood cells shape during morphological response in sucrose solution modified by benzalkonium chloride were investigated. It has been shown that fixing the cell shape using glutaraldehyde- or formaldehyde-based fixative solutions in some temporal points usually leads to fixation of current cell shape in inadequate fashion. Applying a method of reconstruction of red blood cell shape taking into account the mode of fixative action itself, we showed that benzalkonium chloride demonstrates echinocytic effect depending on concentration of detergent. It has been shown that benzalkonium chloride is able to induce direct transition from spherostomatocyte toward spheroechinocyte without altering close to sphere shape of the cells. On the other hand, the reverse transition from spheroechinocyte toward spherostomatocyte was always accompanied by some flattening of the cells, although the disk shape in some instances was not been achieved. The data points to asymmetrical shape transitions of erythrocytes in sucrose solutions, which contradicts the continuum and bilayer couple models of shape regulation. It seems likely that largely nonuniform structure of native red blood cell membrane plays a more important role in morphological transitions of these cells than earlier suggested.

Key words: erythrocyte, shape, morphological transition, morphological response, sucrose, benzalkonium chloride