О НАРУШЕНИИ РЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУРАХ

ON THE VIOLATION OF THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTES DURING BIOCHEMICAL PROCEDURES

КАТЮХИН Л.Н.

KATIUKHIN L.N.

ФГБУН Институт эволюционной
физиологии и биохимии им.
И.М.Сеченова Российской
академии наук

Sechenov Institute of Evolutionary
Physiology and Biochemistry, Russian
Academy of Sciences

office@iephb.ru

office@iephb.ru

doi: 10.18411/pivsn-3

idsp: pivsn-3

АННОТАЦИЯ

Представлены изменения осмотических профилей деформируемости эритроцитов при инкубации с буфером HEPES и концентрационных нагрузках цельной крови ацетилхолином и трет-бутилгидропероксидом *in vitro*. Показано резкое снижение деформируемости в зоне 200-230 мосмоль/кг H₂O. Феномен проявляется в виде выраженного излома профилей осмотической деформируемости. Дано объяснение найденным изменениям деформационных свойств эритроцитов.

Ключевые слова: эритроцит, эктацитометрия, деформируемость.

ABSTRACT

Changes in the osmotic profiles of erythrocyte deformability during incubation with HEPES buffer and concentration loads of whole blood with acetylcholine and tert-butyl hydroperoxide *in vitro* are presented. A sharp decrease in the deformability in the zone 200-230 mosmole/kg H₂O is shown. The phenomenon manifests itself in the form of a pronounced fracture of the profiles of osmotic deformability. The found changes in the deformation properties of erythrocytes are explained.

Keywords: erythrocytes, ektacytometry, deformability.

ВВЕДЕНИЕ

Периодически публикуются сообщения, в которых работы проводятся на эритроцитах, отмытых эффективным и распространенным буфером HEPES, и длительных инкубациях в условиях 37°C. Так, имеются работы по исследованию влияния этилпараоксона, ингибирующего ацетилхолинэстеразу, и трет-бутилгидропероксида, индуцирующего оксидативный стресс, и других агентов, изменяющих структурно-функциональные свойства эритроцитов. Корректность проведения подобных исследований требует уточнения в интерпретации результатов таких экспериментов.

Мы применили метод градиентной осмотической эктацитометрии, считающийся эталонным золотым стандартом в арсенале диагностических средств изучения функциональных свойств красных клеток крови [1]. Осмотическая градиентная эктацитометрия, разработанная в семидесятые годы, является высокоточным и информативным методом изучения эритроцитов и эффективным диагностическим тестом заболеваний красных кровяных клеток. К большому сожалению, вследствие

технической сложности и высокой стоимости аппаратуры этот метод нечасто используется в клинике, а результаты наблюдений редко обсуждаются.

Рисунок 1. Осмоскан эритроцитов здоровых доноров в нативной крови.

В основе метода лежит измерение удлинения эритроцитов, рассчитываемой по величинам большого (А) и малого (Б) диаметра дифракционного эллипса по формуле $A-B/A+B$ в среде поливинилпирролидона с вязкостью $\eta=10$ сР при постоянном приложенном напряжении сдвига $\tau=10,5$ Н/м² в ячейке Куэтта в диапазоне осмоляльности (100-500) мосмоль/кг Н₂О. Классический профиль осмотической деформируемости нативных эритроцитов крови здоровых доноров, или осмоскан (см. рис. 1), характеризуется следующими параметрами: $I_{мин}$ - деформируемость в точке максимальной сферуляции эритроцита, как нами показано [2], может служить мерой структурной целостности мембраны и ее водной проницаемости; $O_{мин}$ - осмоляльность при $I_{мин}$, непосредственно коррелирующая с осмотической хрупкостью и отношением S/V эритроцита; $I_{макс}$ - интегральная деформируемость, определяемая детерминантами реологических свойств эритроцитов (площадь поверхности, объем, внутренняя вязкость, механические свойства клеточной мембраны); $O_{макс}$ - осмоляльность, определяющая собой функцию ионных каналов; $O_{гипер}$ - осмоляльность при 50% $I_{макс}$ в гипертонической области отражает состояние гидратации гемоглобина, а также механические свойства мембраны; $(O_{гипер} - O_{мин})$ - диапазон осмотических свойств эритроцитов; $I_{τ_{мин}}$ - значение деформируемости при минимальном напряжении сдвига ($\tau=1,0-1,5$ Н/м²) в зоне изотонической осмоляльности как мера мембранной микровязкости [3].

Работа проведена на цельной гепаринизированной крови (100 ед/мл) 15 взрослых крысах линии Вистар (по 5 в группе) после декапитации на гильотине. Число эритроцитов довели аутологичной плазмой до $(6,0 \pm 0,1) \times 10^{12}$ эр/л. Для эктацитометрии использовали цельную кровь, которую перед помещением в ячейку Куэтта развели в 30 раз основным РVP буфером pH 7,35 состава: 3,1% поливинилпирролидон (М.в. 360, 000, Sigma), 0,04% NaN₃, 6,34 мМ Na₂HPO₄·12H₂O, 2,00 мМ NaH₂PO₄·2H₂O, 1,00 мМ EDTA 2Na·2H₂O с вязкостью 12 сП при 37⁰С [4]. Необходимые концентрации ацетилхолина (Sigma) и раствора трет-бутилгидропероксида в ДМСО (Sigma), индуцирующего оксидативный стресс, производили *ex tempore* буфером с осмоляльностью 300 мОсм, pH 7,4 состава (мМ): 135 NaCl, 5,5 KCl, 1,5 MgCl, 10 HEPES, 5 D-глюкозы, как в работе [5]. Результаты представлены для следующих концентраций: третбутил - 5 мкМ (0,8 аттомоль/эр), 0,1 мМ (17 аттомоль/эр) и 10 мМ (1,7 фемтомоль/эр), ацетилхолин - 6 мкМ (1 аттомоль/эр), 20 мкМ (3 аттомоль/эр) и 200

мкМ (33 аттомоляр). К 400 мкл крови добавляли аликвоты объемом 10 мкл (2,5%). Пробы крови в закрытых пробирках типа Эппендорф объемом 500 мкл инкубировали 10 минут в указанном режиме. Конечная концентрация диметилсульфоксида (ДМСО, Sigma) в экспериментах составляла 0,009%. Предварительные эксперименты показали, что указанная концентрация ДМСО не меняла профилей осмотической деформируемости эритроцитов. Исследование производили при стабилизированной температуре 25°C.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить последствия процедур подготовки крови на реологические свойства эритроцитов крыс, а также выяснить характер влияния третбутилгидропероксида, как промотора индуцированного окислительного стресса, и ацетилхолина, как признанного средства, опосредованно улучшающего качество жизни. Выявить причину наблюдавшихся ранее при патологии и в эксперименте изменения профилей осмотической деформируемости эритроцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Деформационный профиль нативной крови без буфера характеризуется плавной зависимостью от осмоляльности суспензионной среды. Но уже добавка к цельной крови 1,7% HEPES-буфера вызывает сдвиг точки **Омин** в гипотоническую область: (164±4) мОсм и (180±2) мОсм в контроле, и увеличение параметра I_{мин}: (0,200±0,014) отн.ед. против (0,250±0,008) отн.ед. в контроле, $p < 0,05$ (рис. 2А).

Рисунок 2. Концентрационные зависимости осмосканов.

Добавки третбутила и ацетилхолина вызывают такие же изменения (табл.1).

Таблица 1.

Параметры осмоскана Омин и Імин.

Третбутил			Ацетилхолин		
	Імин	Омин		Імин	Омин
Контроль+HEPES	0,107±0,006	194±4	Контроль+HEPES	0,095±0,005	196±4
0,8 аттомоль/эр	0,171±0,008*	182±3*	1 аттомоль/эр	0,120±0,008*	182±3*
17 аттомоль/эр	0,152±0,001*	176±3*	3 аттомоль/эр	0,142±0,001*	180±2*
1,7 фемтомоль/эр	0,168±0,012*	170±2*	33 аттомоль/эр	0,128±0,009*	181±3*

На графиках результатов экспериментов (рис. 2), отчетливо заметно появление излома осмоскана в зоне (200-230) мОсм. Подобные искажения профилей осмотической деформируемости эритроцитов встречаются и в сообщениях по наблюдениям в клинике и лабораторных экспериментах. На гладком профиле в зоне (200-230) мОсм появляется дополнительный изгиб вплоть до формирования второй точки инверсии. Этот феномен отмечен при ксероцитозе, серповидноклеточной анемии [6-8], при стомацитарном эллиптоцитозе и овалоцитозе [9, 10], при обработке эритроцитов возрастающими концентрациями лизолецитина и диамида [11], гидроксимочевинной [12], динитробензолом [7], адитретином [13]. Появлению двух гипотонических минимумов на осмосканах либо вовсе не уделяется внимания, либо объясняется присутствием клеточных популяций с 2-мя различными отношениями S/V, либо наличием вовсе недеформируемых клеток. Но факт появления изгиба осмоскана всегда в одной зоне осмоляльности наводит на размышления о генерализованной причине, связанной со структурной особенностью оригинальной формы эритроцита.

ОБСУЖДЕНИЕ

Практика изучения реологических свойств и волюморегуляции эритроцитов диктует проведение исследования в первые 3-5 часов после взятия крови при хранении образцов на тающем льду в наполненных доверху герметичных пробирках, как и подготовка буфера. В наших экспериментах (рис. 2А) уже 1,7%-ная доля буфера вызвала достоверный сдвиг точки Омин в гипотоническую сторону, при этом возростала пористость мембраны (показатель Імин). Аналогичные изменения обнаруживают добавки третбутила и ацетилхолина (рис 2Б, В; табл. 1, 2). Диапазон концентраций веществ, используемых в предпринятом исследовании, не позволил нам обнаружить выраженного специфического характера их влияния на реологические свойства эритроцитов при 10-минутной инкубации. Только третбутил увеличивает излом осмограмм. Выраженной дозовой зависимости не выявлено. В наших экспериментах закономерный сдвиг осмоляльности **Омин** в гипоосмотическую область свидетельствует об увеличении торроидальности эритроцитов, или удельной поверхности S/V. Тот же эффект по отношению к чистому контролю с нативной кровью отмечен в пробах с буфером. Таким образом, эффект вызван влиянием 4-(2-гидроксизтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты в составе буфера.

Структурные нарушения составляют одну из основных причин хронической наследственной гемолитической анемии, сфероцитоза, эллипсоцитоза и стоматоцитоза, основой которых является изменение вязкостноэластических свойств мембран, механической стабильности и объема красных клеток соответственно. Как следствие, деформируемость эритроцитов ухудшается настолько, что обеспечение организма кислородом и удаление продуктов обмена не обеспечивают нормальной жизнедеятельности, а сами эритроциты преждевременно удаляются из кровообращения селезенкой. В процессе выполнения работы выявились характерные особенности влияния препаратов в составе HEPES-буфера на функциональные свойства мембран эритроцитов.

Мембрана эритроцита представляет собой высокодинамичную структуру фосфолипидного бислоя, прикрепленного к спектриновой сети анкирин-комплексными соединениями. Эти вертикальные связи обеспечивают сильное уплотнение мембраны, предотвращающее ее везикуляцию, а боковые связи между димерами спектрина и спектрин-актином-4.1R в соединенном комплексе являются ключевыми регуляторами мембранной механической стабильности, предотвращающей фрагментацию мембраны. Присутствие различных ассоциированных переносчиков ионов, котранспортеров и каналов, встроенных в мембрану, опосредует поддержание объема клеток и степень гидратации гемоглобина. Мембрана эритроцита имеет две вогнутости. Наружная представляет собой жидкостно-нерастяжимый липидный бислой зашпигованный с мембранными белками. Она характеризуется высокой вязкостью (0,1-1 Pas) и жесткостью на изгиб, достаточной для обнаружения тепловых движений, известных как мерцание (фликкер). Внутренняя оболочка - это цитоскелет из спектриновых тетрамеров, образующих двумерную сеть. Узлы этой сети привязаны к липидному бислою с помощью трансмембранных белков. Эти анкеры подвижны в мембране так, что как скелет и липиды могут скользить относительно друг друга [14].

В условиях классических измерений при $\tau=10 \text{ Н/м}^2$, когда деформируется и вязкое внутреннее содержимое эритроцита, максимальные деформационные свойства проявляются, как правило, в зоне изотонических концентраций крови. При низком напряжении сдвига ($\tau=1,8 \text{ Н/м}^2$) в деформацию вовлекается только мембрана, когда приложенного усилия недостаточно для преодоления сопротивления вязкости внутриклеточного раствора гемоглобина. Удлинение затрагивает лишь боковые части торроидального эритроцита с некоторым смещением центральной области. При этом максимальная деформируемость эритроцитов отмечается именно при осмоляльности около (200-225) мОсм, когда эритроцит приобретает форму уплощенного эллипса, и кривизна не препятствует его удлинению. Ранее мы провели наблюдение по изменению профиля красных клеток в камере Горяева при осмотических нагрузках. Действительно, в зоне концентраций (200-225) мОсм эритроцит трансформируется из двояковогнутой в эллипсоидную.

Эластичный цитоскелетный ответ выражается в сдвиговом эффекте при напряжении мембраны. Сеть может локально сжиматься или растягиваться в результате относительного смещения анкерных белков, в то время как общая площадь поверхности мембраны остается постоянной. Эта спектриновая сеть растянута в покое в двояковогнутой форме и оказывает сжимающее усилие на липидный бислой при набухании эритроцитов, когда центральная часть клетки неизбежно проходит стадию круга, и в плоскость центрального круга оказывается «втиснутым» излишек площади, как показано на рисунке 3.

Рисунок 3. Трансформация двояковогнутой формы эритроцита.

Впервые причину этого феномена мы описали, произведя эксперименты по оценке осмотического профиля деформируемости эритроцитов при низких напряжениях сдвига [3]. Позднее оценка явления сделана У. Нео с соавторами [15]. Авторы утверждают, что данный феномен может играть важную роль в микроциркуляции, где осмолярность колеблется в широких пределах. Действительно, осмотичность крови может существенно меняться в различных отделах кровеносной

системы, но только в сторону ее возрастания. Даже при реабсорбции воды и растворенных в ней веществ из ультрафильтра плазмы крови в канальцах почки первичным является поступление в сосуды натрия, а затем воды, что никак не может привести к гипоосмии. Существенного снижения осмоотического осмотического давления в сосудах крови при физиологических условиях не наблюдается. Данный феномен следует рассматривать как чисто физическое проявление уникальной формы эритроцита при ее трансформации в опыте и при тяжелой патологии.

При изучении реологических свойств крови и волюморегуляции в модельных экспериментах на разбавленных суспензиях и отмытых красных клетках необходимо учитывать, что буфер на основе HEPES нарушает функциональные свойства таких деликатных объектов, как эритроцит. *В наших экспериментах с 1,7%-м содержанием буфера (0,3 аттомоляр/эр) отмечаются уже заметные изменения реологических свойств. К примеру, методом малоуглового рассеяния исследуются концентрации клеток в ячейке 10^7 эр/л. При таком разведении молярная доля 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты в составе HEPES-буфера составляет 1 микромоляр/эр. Следовательно, поверхность каждого эритроцита, лишенного естественного белкового и липидного окружения, атакуется на 13 порядков большим количеством 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты. Таким образом, рутинные биохимические процедуры с кровью сопровождаются частичной утратой деформационных способностей эритроцитов в зоне (200-230) мОсм в результате специфического влияния HEPES-буфера. Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России АААА-А18-118012290142-9.*

ЗАКЛЮЧЕНИЯ

При изучении реологических свойств крови и волюморегуляции в модельных экспериментах на разбавленных суспензиях и отмытых красных клетках необходимо учитывать, что буфер на основе HEPES нарушает функциональные свойства таких деликатных объектов, как эритроцит. *В наших экспериментах с 1,7%-м содержанием буфера (0,3 аттомоляр/эр) отмечаются уже заметные изменения реологических свойств. К примеру, методом малоуглового рассеяния исследуются концентрации клеток в ячейке 10^7 эр/л. При таком разведении молярная доля 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты в составе HEPES-буфера составляет 1 микромоляр/эр. Следовательно, поверхность каждого эритроцита, лишенного естественного белкового и липидного окружения, атакуется на 13 порядков большим количеством 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты. Таким образом, рутинные биохимические процедуры с кровью сопровождаются частичной утратой деформационных способностей эритроцитов в зоне (200-230) мОсм в результате специфического влияния HEPES-буфера. Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России АААА-А18-118012290142-9.*

1. Vent-Schmidt J., Waltz X., Pichon A., Hardy-Dessources M.D., Romana M., Connes P. 2015. Indirect viscosimetric method is less accurate than ektacytometry for the measurement of red blood cell deformability. Clin Hemorheol Microcirc. 59(2), 115-21.
2. Katiukhin L.N. 2014. A method for evaluation of membrane permeability for water by the erythrocyte osmotic deformability profiles. Bull. Exp. Biol. and Med. 157 (1), 116-118.
3. Катюхин Л.Н. 2014. Деформационные кривые как оценка степени вогнутости эритроцита. В мире научных открытий. 2 (50), 394-399.
4. Johnson R.M. 1989. Ektacytometry of red blood cells. Meth. Enzymol. 173(T), 35-54.
5. Миндукшев И.В., Скверчинская Е.А., Хмелевской Д.А., Добрылко И.А., Гончаров Н.В. 2017. Ингибитор ацетилхолинэстеразы параоксон усиливает индуцированный in vitro оксидативный стресс в эритроцитах крыс. Биол. мемб. 34(6), 147-154.
6. Ballas S.K., Smith E.D. 1992. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. Blood. 79(8), 2154-2163.

7. Chiu D.T., Lai K.M., Xu C.M., Liour S.S., Lee J., Liu T.Z. 1993. Direct alteration of erythrocyte membrane properties by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene without oxidant challenge. *Exp Hematol.* 21(1), 114-118.
8. Parrow N.L., Tu H., Nichols J., Violet P.C., Pittman C.A., Fitzhugh C., Fleming R.E., Mohandas N., Tisdale J.F., Levine M. 2017. Measurements of red cell deformability and hydration reflect HbF and HbA2 in blood from patients with sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis.* 65, 41-50.
9. Delaunay J. 2004. The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations. *Semin Hematol.* 41(2), 165-172.
10. Schischmanoff P.O., Cynober T., Miélot F., Leclerc L., Vasseur-Godbillon C., Baudin-Creuzat V., Magowan C., Yeung J., Mohandas N., Tchernia G., Delaunay J. 1999. Southeast Asian ovalocytosis in White persons. *Hemoglobin.* 23(1), 47-56.
11. Clark M.R., Mohandas N., Shohet S.B. 1983. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood.* 61 (5), 899-910.
12. Ballas S.K., Dover G.J., Charache S. 1989. Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo. *Am J Hematol.* 32 (2), 104-111.
13. Górnicki A. 2006. Influence of the retinoid acitretin on erythrocyte microrheology in vitro. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 44(12), 648-654.
14. Viallat A., Abkarian M. 2014. Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 36 (Issue 3), 237–243.
15. Heo Y., Jung H., Shin S. 2015. Osmotic deformability of erythrocytes at various shear stresses. *Clin Hemorheol Microcirc.* 59 (3), 211-218.