

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА FeCl_3 -ИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2018 г. Ю.А. Шереметьев, А.Н. Поповичева, Г.Я. Левин

Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр МЗ РФ,
603155, Нижний Новгород, Верхневолжская набережная, 18/1

E-mail: ya.sher777@rambler.ru

Поступила в редакцию 21.07.16 г.

После доработки 21.03.18 г.

Исследована агрегация интактных и истощенных по АТФ эритроцитов человека, индуцированная FeCl_3 в финальной концентрации 200 мкМ. Изучены форма эритроцитов, стабильность их цитоскелета, деформация в сдвиговом потоке и содержание анионных участков мембран клеток. Показано, что истощение эритроцитов по АТФ приводит к изменению формы эритроцитов: дискоциты превращаются в эхиноциты. При этом снижается стабильность цитоскелета мембран и нарушается деформация эритроцитов и уменьшается содержание анионных участков мембраны эритроцитов, истощенных по АТФ. Агрегация таких эритроцитов значительно снижена. Обсуждается возможный механизм FeCl_3 -индуцированной агрегации эритроцитов человека.

Ключевые слова: эритроциты, форма, термоиндукция, деформация, анионные участки мембран, агрегация, АТФ, FeCl_3 .

DOI: 10.1134/S0006302918040099

Известно, что для изучения механизмов сосудистого тромбоза используют модель, в которой экспериментальным животным вводят раствор FeCl_3 [1–5]. При этом используют значительные концентрации FeCl_3 , достигающие 500 мМ. Было показано, что FeCl_3 вызывает агрегацию тромбоцитов и эритроцитов *in vivo*. В механизме агрегационного действия FeCl_3 на эритроциты важная роль отводится электростатическому взаимодействию трехвалентного катиона железа с отрицательно заряженной поверхностью эритроцитов [5]. Однако механизм действия FeCl_3 на эритроциты остается малоизученным.

В настоящей работе мы изучили кинетику FeCl_3 -индуцированной агрегации эритроцитов. Для выяснения механизма действия FeCl_3 на эритроциты мы изучили его влияние не только на интактные эритроциты, но и на модифицированные клетки. Модификацию физико-химического состояния эритроцитов проводили путем их истощения по АТФ. Исследовали форму эритроцитов, стабильность их цитоскелета, деформацию в сдвиговом потоке и содержание анионных участков мембран клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали кровь восьми здоровых доноров. Кровь отбирали в вакуумные пробирки, содержащие 3,8%-й цитрат натрия (соотношение 9 : 1). Кровь центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин. Плазму, тромбоциты и лейкоциты удаляли, а эритроциты трижды промывали физиологическим раствором.

Эритроциты, истощенные по АТФ, получали путем инкубации 0,5%-й суспензии клеток в забуференном физиологическом растворе (10 мМ трис- HCl , 150 мМ NaCl , рН 7,4) при 37°C в течение 24 ч [6].

Агрегацию эритроцитов, индуцированную FeCl_3 (Sigma, США), исследовали на лазерном агрегометре 230LA-2 (НПФ «Биола», Россия). Предварительно прибор калибровали по двум точкам. При этом светопропускание образца эритроцитарной суспензии принимали за 0%, а забуференного физиологического раствора – за 100%. Для оценки агрегации в кювету прибора вносили 0,9 мл 0,5%-й суспензии эритроцитов и перемешивающий элемент магнитной мешалки. Кювету помещали в термостатируемую (37°C) ячейку прибора. Через 30 с после начала перемешивания в кювету добавляли 0,1 мл раствора хлорного железа в финальной концен-

трации 200 мкМ. Скорость вращения мешалки составляла 900 об/мин. Агрегация эритроцитов сопровождалась снижением оптической плотности суспензии, что регистрировалось фотометрически в виде записи кривой агрегатограммы. Агрегацию эритроцитов оценивали по максимальной амплитуде агрегатограммы (максимальное светопропускание M_a , %).

Деформацию эритроцитов в искусственном сдвиговом потоке [7] изучали в специально сконструированном устройстве (рис. 1) [8]. Устройство состоит из наружного вращающегося цилиндра и крышки, в которой укреплен внутренний цилиндр коаксиально наружному. Верхняя часть внутреннего цилиндра закреплена зажимом для обеспечения его неподвижности при вращении наружного цилиндра. 1,5 мл 2%-й суспензии эритроцитов вводили через отверстие во внутреннем цилиндре в зазор между цилиндрами и создавали напряжение сдвига 24 Па. Через 20 с через отверстие во внутреннем цилиндре вводили 1 мл 0,7%-го раствора глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (10 мМ Na₂HPO₄, 150 мМ NaCl, рН 7,4), а еще через 10 с вращение прекращали. Фиксированные эритроциты помещали в поле зрения светового микроскопа и проводили микрофотосъемку.

Состояние цитоскелета эритроцитов оценивали предложенным нами методом. Принцип его основан на том, что при 49–50°C происходит денатурация основного белка цитоскелета спектрина [9,10]. В результате наблюдается диссферическая трансформация эритроцитов – дискциты превращаются в микросфероциты. Это связано, в частности, с тем, что денатурация спектрина приводит к везикуляции и фрагментации эритроцитов [11,12]. Чем менее стабилен цитоскелет, тем сильнее будет происходить везикуляция и фрагментация эритроцитов. В результате этого будет увеличиваться количество микросферических форм эритроцитов.

0,5%-ю суспензию клеток помещали на водяную баню и прогревали при 49°C в течение 8 мин. После этого эритроциты фиксировали в 0,25%-м растворе глутарового альдегида, приготовленном на фосфатном буфере, и изучали их морфологию. Об изменении состояния цитоскелета эритроцитов судили по количеству микросферических форм клеток (%). Подсчет количества микросферических эритроцитов проводили на 1000 клеток.

Содержание анионных участков эритроцитов изучали предложенным нами методом с помощью катионного красителя акридинового оранжевого. Его принцип заключается в том, что положительно заряженный краситель свя-



Рис. 1. Схема устройства для деформации эритроцитов в сдвиговом потоке.

зывается с отрицательно заряженными участками мембраны эритроцитов. Степень связывания красителя определяют по изменению оптической плотности раствора. Метод осуществляется следующим образом. К 2 мл 0,005%-го раствора катионного красителя акридинового оранжевого, приготовленного на забуференном физиологическом растворе, добавляли 0,05 мл отмытых эритроцитов и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После этого центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин. Далее на спектрофотометре Specol (Carl Zeiss, Германия) при длине волны 412 нм определяли оптическую плотность исходного раствора красителя и надосадочной жидкости после инкубации с эритроцитами. Рассчитывали количество связанного красителя с анионными участками поверхности эритроцитов по формуле: $A = 100 - (C \cdot 100) / B$, где A – количество связанного эритроцитами красителя (%), B – оптическая плотность исходного раствора (в ед. экстинкции), C – оптическая плотность раствора красителя после инкубации с эритроцитами (в ед. экстинкции). По количеству связанного красителя судили о содержании анионных участков мембран эритроцитов.

Для изучения формы эритроциты фиксировали в 0,25%-м растворе глутарового альдегида, приготовленном на фосфатном буфере.

Все морфологические исследования проводили с помощью светового микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия), оснащенного мегапиксельной цифровой телевизионной камерой цветного изображения. Для этого с каждого образца осуществляли микрофотосъемку в количестве не менее 20 фотографий.

Результаты исследования обработаны методами непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона.

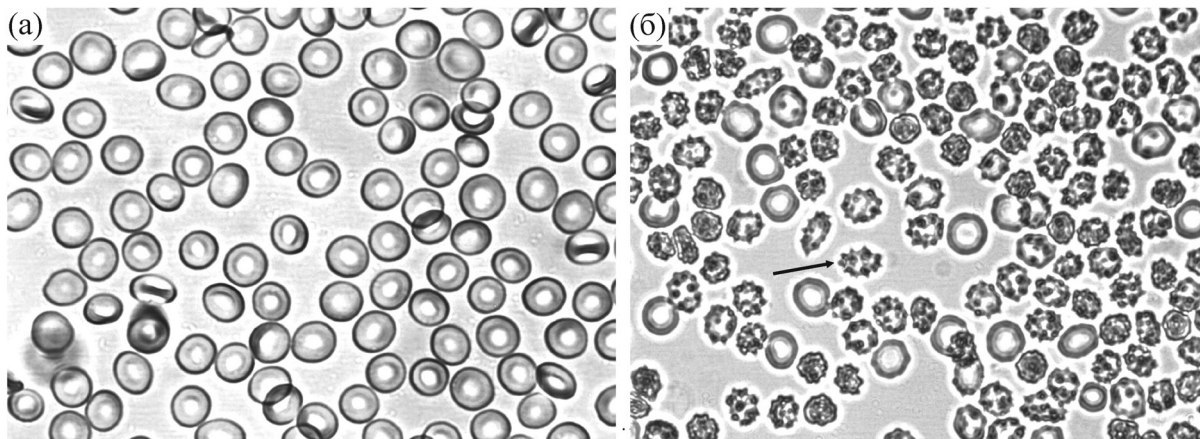


Рис. 2. Морфология intactных эритроцитов (а) и эритроцитов, истощенных по АТФ (б). Фиксация глутаровым альдегидом. Стрелкой указаны эхиноциты.

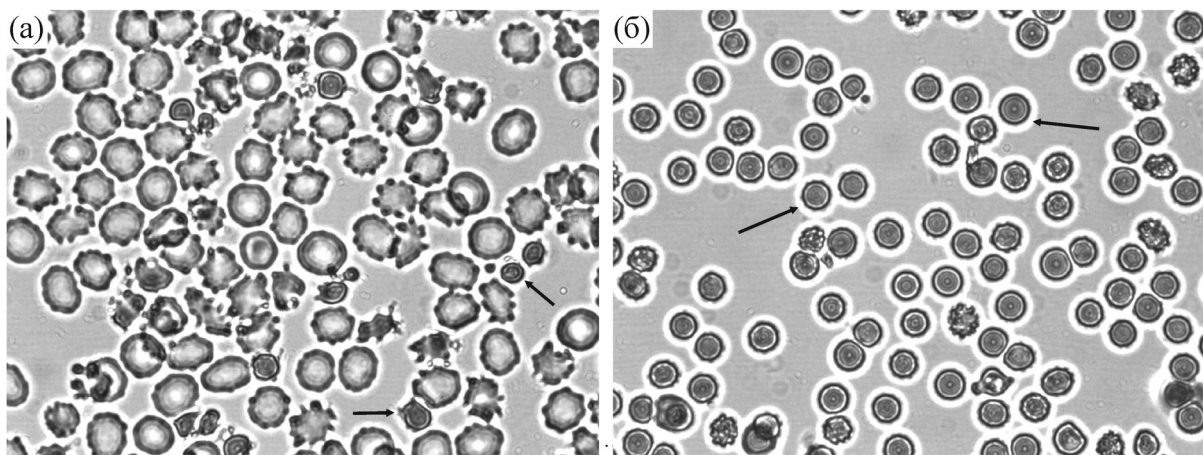


Рис. 3. Термоиндукция intactных эритроцитов (а) и эритроцитов, истощенных по АТФ (б). Фиксация глутаровым альдегидом. Стрелками указаны микросфероциты.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Истощение эритроцитов по АТФ приводит к появлению большого количества эхиноцитов (рис. 2б). Однако до настоящего времени малоизученными у таких эритроцитов остаются стабильность цитоскелета и их деформация в искусственном сдвиговом потоке. Поэтому мы изучили состояние цитоскелета и деформацию эритроцитов при их истощении по АТФ. На рис. 3а видно, что после прогревания intactных эритроцитов при 49°C образуется небольшое количество микросферических форм. В то же

время термоиндукция эритроцитов, истощенных по АТФ, приводит к статистически достоверному увеличению количества микросфероцитов (табл. 1, рис. 3б). Это свидетельствует о снижении стабильности цитоскелета эритроцитов, истощенных по АТФ. Резко нарушается деформация таких эритроцитов в искусственном сдвиговом потоке (рис. 4б). Видно, что у эритроцитов, истощенных по АТФ, снижена способность к их вытягиванию.

Проведенные исследования показали, что FeCl_3 индуцирует выраженную агрегацию от-

Таблица 1. Образование микросферических форм эритроцитов при их термоиндукции

Intactные эритроциты, %	Эритроциты, истощенные по АТФ, %
$15,00 \pm 1,59$	$81,83 \pm 3,42^*$

Примечание. * $p < 0,05$ – сравнение с контролем, критерий Вилкоксона.

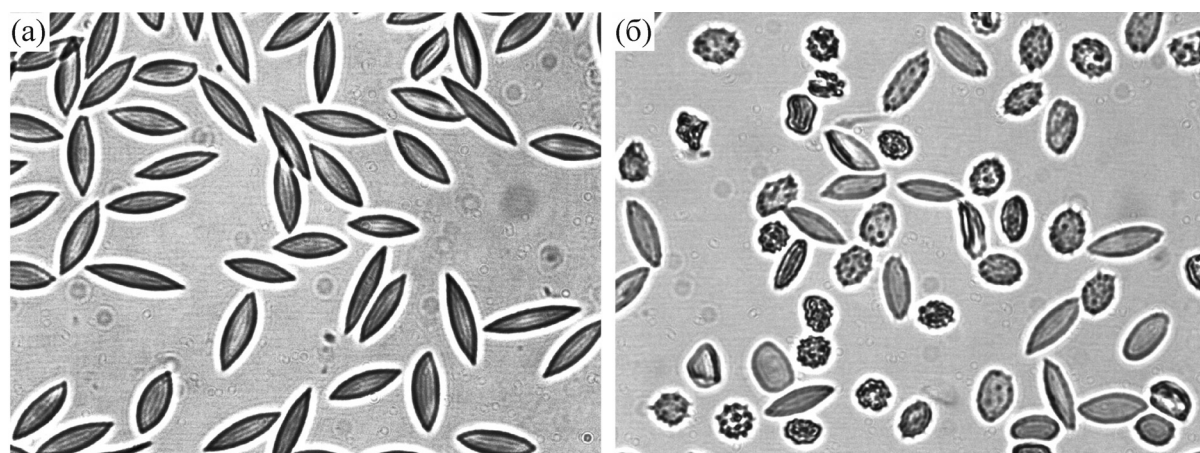


Рис. 4. Деформируемость intactных эритроцитов (а) и эритроцитов, истощенных по АТФ (б). Фиксация глутаровым альдегидом.

мытых intactных эритроцитов. На рис. 5 видны глыбчатые структуры агрегатов, состоящие из большого количества эритроцитов. Такая структура агрегатов характерна для агрегации эритроцитов, стимулированной трехвалентным лантаном [13].

В настоящей работе мы изучили кинетику агрегации не только intactных эритроцитов, но и истощенных по АТФ. Полученные результаты показали, что эритроциты, имеющие эхиноцитарную форму, сниженную стабильность цитоскелета и нарушенную деформацию, обладают низкой агрегационной способностью. Из табл. 2 видно, что степень FeCl_3 -индуцированной агрегации эритроцитов, истощенных по АТФ, значительно снижена по сравнению с intactными клетками ($p < 0,05$). Интересно отметить, что агрегация эхиноцитов в аутологичной плазме крови также снижена [14,15].

Изучение содержания связанного с мембранами эритроцитов акридинового оранжевого показало достоверное снижение его количества (в среднем на 20%) у эритроцитов, истощенных по АТФ (табл. 3). Это свидетельствует об уменьшении количества анионных участков эритроцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы показали, что FeCl_3 индуцирует выраженную агрегацию отмытых intactных эритроцитов. Истощение эритроцитов по АТФ приводит к резкому падению агрегационной способности клеток под влиянием FeCl_3 . Нами выяснено, что эхиноциты, образующиеся при истощении эритроцитов по АТФ, имеют сниженную стабильность цитоскелета и нарушенную деформацию в искусственном

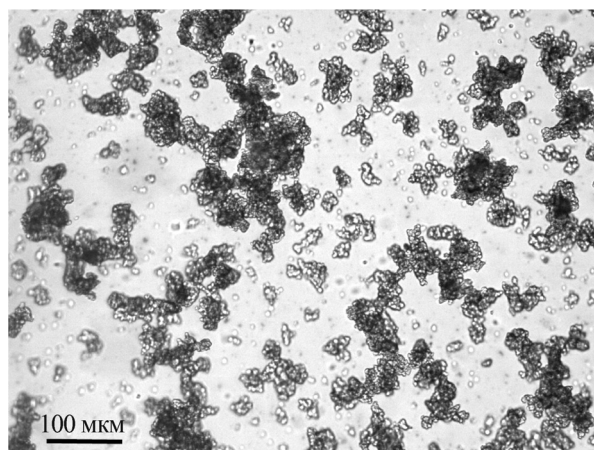


Рис. 5. Агрегация intactных эритроцитов, индуцированная FeCl_3 (финальная концентрация 200 мкМ).

сдвиговом потоке. В мембранах эхиноцитов снижается содержание анионных участков.

Известно, что в нормальных условиях эритроциты человека имеют форму двояковогнутого диска. Одним из важных условий для сохранения intactной формы эритроцитов является стабильное состояние их цитоскелета [16, 17]. Показано, что при температуре 49–50°C происходит денатурация основного белка цитоскелета эритроцитов спектрина [9,10], в результате чего происходит трансформация дискоцитов в микросфероциты. В наших исследованиях появление большого количества микросферических клеток после термоиндукции эритроцитов, истощенных по АТФ, свидетельствует о нарушении стабильного состояния их цитоскелета. Подтверждением этих данных служат опыты, в которых показано, что у эритроцитов,

Таблица 2. FeCl₃-индуцированная агрегация эритроцитов

Интактные эритроциты (Ма, %)	Эритроциты, истощенные по АТФ (Ма, %)
56,18 ± 5,38	9,50 ± 1,61*

Примечание. * $p < 0,05$ – сравнение с контролем, критерий Вилкоксона.

Таблица 3. Количество связанного катионного красителя с мембранами интактных и истощенных по АТФ эритроцитов

Интактные эритроциты, %	Эритроциты, истощенные по АТФ, %
62,95 ± 1,67	49,90 ± 4,60*

Примечание. * $p < 0,05$ – сравнение с контролем, критерий Вилкоксона.

истощенных по АТФ, нарушается экстрагируемость спектрина мембран клеток [10].

Известно, что у эхиноцитов, полученных в результате истощения эритроцитов по АТФ, нарушается их деформируемость [10,18]. В наших опытах мы использовали специально сконструированное устройство для деформации эритроцитов в сдвиговом потоке. При напряжении сдвига 24 Па происходило вытяжение эритроцитов в потоке. С помощью глутарового альдегида фиксировали вытянутые клетки и изучали их морфологию в поле зрения светового микроскопа [7,8]. Интересно отметить, что часть эритроцитов с нарушенной деформацией сохраняют на своей поверхности спиккулы, характерные для эхиноцитов.

Для выяснения механизма действия FeCl₃ на эритроциты мы изучили его влияние не только на интактные эритроциты, но и клетки эхиноцитарной формы со сниженной способностью к деформации и нарушенным цитоскелетом. Агрегация таких клеток под влиянием FeCl₃ значительно снижалась. Возможным механизмом агрегации эритроцитов, индуцированной FeCl₃, может являться электростатическое взаимодействие трехвалентного железа с отрицательно заряженной поверхностью эритроцитов [5]. Для проверки этого предположения мы определили содержание анионных участков эритроцитов, истощенных по АТФ, с помощью катионного красителя акридинового оранжевого. Известно, что количество анионных участков эритроцитов в значительной степени определяется содержанием N-ацетилнейраминной кислоты. Снижение количества N-ацетилнейраминной кислоты в мембранах эритроцитов приводит к уменьшению числа анионных участков [19,20]. Нами показано, что истощение эритроцитов по АТФ приводит к достоверному снижению количества анионных участков на их мембранах. Подтверждением наших данных

могут являться данные [21], в которых показано, что АТФ-истощенные эритроциты теряют 50% N-ацетилнейраминной кислоты. Этим, по-видимому, можно объяснить снижение агрегационной способности эритроцитов, истощенных по АТФ, под действием FeCl₃.

Итак, полученные результаты свидетельствуют о том, что изменение агрегационной способности эритроцитов связано, вероятно, с изменением количества анионных участков на их мембранах. В то же время мы не исключаем возможного влияния изменения формы эритроцитов и деформируемости в изменении их агрегации.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что FeCl₃ индуцирует агрегацию отмытых интактных эритроцитов человека.
2. Истощение эритроцитов по АТФ приводит к образованию эхиноцитов. Показано, что эхиноциты имеют сниженную стабильность цитоскелета. При этом нарушается деформация эхиноцитов в искусственном потоке и снижается количество анионных участков мембран.
3. Выяснено, что истощение эритроцитов по АТФ приводит к резкому снижению их агрегации, индуцированной FeCl₃.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. D. Kurz, B. W. Main, and G. E. Sandusky, *Thromb. Res.* **60** (4), 269 (1990).
2. K. J. Woollard, S. Sturgeon, J. P. F. Chin-Dusting, et al., *J. Biol. Chem.* **284** (19), 13110 (2009).
3. A. Eckly, B. Hechler, M. Freund, et al., *J. Thromb. Haemost.* **9** (4), 779 (2011).
4. J. D. Barr, A. K. Chauhan, G. V. Schaeffer, et al., *Blood* **121** (18), 3733 (2013).

5. J. C. Ciciliano, Y. Sakurai, D. R. Myers, et al., *Blood* **126** (6), 817 (2015).
6. Ю. А. Шереметьев, А. Н. Поповичева, М. М. Рогозин и Г.Я. Левин, *Биофизика* **59** (3), 488 (2014).
7. S. P. Sutera and M. H. Mehrjardi, *Biophys. J.* **15** (1), 1(1975).
8. Г. Я. Левин, В. Г. Яхно, Н. Н. Царевский и Н. П. Котяева, А. с. СССР № 1363065, Б.И., № 48, (1987).
9. J. F. Brandts, L. Erickson, K. Lysko, et al., *Biochemistry* **16** (15), 3450 (1977).
10. S. E. Lux, K. M. John, and T. E. Ukena, *J. Clin. Invest.* **61** (3), 815 (1978).
11. W. T. Coakley and O. T. Deeley, *Biochim. Biophys. Acta* **602** (2), 355 (1980).
12. G. M. Wagner, D. T.-Y. Chiu, M. C. Yee, and B. H. Lubin, *J. Lab. Clin. Med.* **108** (4), 315 (1986).
13. Ю. А. Шереметьев, А. В. Леднев, А. В. Шереметьева и А. Н. Успенский, *Биол. мембраны* **23** (4), 346 (2006).
14. Ю. А. Шереметьев, А. Н. Поповичева, М. Н. Егорихина и Г. Я. Левин, *Биофизика* **58** (2), 264 (2013).
15. Ya. A. Sheremet'ev, A. N. Popovicheva and G. Ya. Levin, *Open J. Biophys.* **3** (4), 212 (2013).
16. M. Nakao, *Curr. Opin. Hematol.* **9** (2), 127 (2002).
17. Y. Marikovsky, *Mech. Ageing Dev.* **86** (2), 137 (1996).
18. C. Feo and N. Mohandas, *Blood Cells* **3**, 153 (1977).
19. G. L. Nicolson, *J. Cell Biol.* **57** (2), 373 (1973).
20. G. L. Nicolson and R. G. Painter, *J. Cell Biol.* **59** (2), 395 (1973).
21. Y. Marikovsky, E. Elazar, and D. Danon, *Mech. Ageing Dev.* **6** (3), 233 (1977).

Study of the Mechanism of the FeCl₃-Induced Aggregation of Human Erythrocytes

Yu.A. Sheremet'ev, A.N. Popovicheva, and G.Ya. Levin

Volga Federal Medical Research Center, the Ministry of Health of the Russian Federation, Verkhne-Volzhskaya nab. 18/1, Nizhny Novgorod, 603155 Russia

Aggregation of intact and depleted in ATP human erythrocytes induced by FeCl₃ in a final concentration of 200 μM was studied. The shape of red cells, erythrocyte cytoskeleton stability, the effect of shear flow on red blood cell deformation and the content of anionic sites of cell membranes were investigated. It is shown that the ATP depletion of erythrocytes leads to the change in their shape: discocytes are transformed into echinocytes. Stability of membrane cytoskeleton decreased and deformation of erythrocytes reduced. The content of anionic sites of membrane erythrocytes depleted of ATP was diminished. Aggregation of such cells was significantly decreased. The possible mechanism of the FeCl₃-induced aggregation of human erythrocytes is discussed.

Keywords: erythrocytes, shape, thermoinduction, deformation, membrane anionic sites, aggregation, ATP, FeCl₃