

## Анализ морфологии эритроцитов и их устойчивости в зависимости от pH и ионной силы среды в условиях гипотермического хранения

UDC 612.111:612.592:541.1

N.V. REPIN<sup>1\*</sup>, V.V. KIROSHKA<sup>1</sup>, O.I. GOLOVKO<sup>2</sup>

## Analysis of Morphology of Erythrocytes and Their Resistance Depending on pH and Ionic Strength Under Hypothermal Storage

Показано, что взаимосвязь между трансформацией формы клеток, осмотической устойчивостью, а также степенью повреждения клеток в процессе гипотермического хранения (ГХ) обусловлено ионной силой и pH среды эквilibрации. Степень повреждения клеток в неэлектролитных средах в процессе ГХ достоверно ниже, а их осмотическая устойчивость выше по сравнению с электролитными. Наиболее устойчивой к действию факторов среды является эхиноцитарная форма эритроцитов.

**Ключевые слова:** эритроциты, гипотермическое хранение, ионная сила, pH среды.

Показано, що взаємозв'язок між трансформацією форми клітин, осмотичною стійкістю, а також ступенем ушкодження клітин у процесі гіпотермічного зберігання (ГЗ) обумовлений іонною силою та pH середовища еквілібрації. Ступінь ушкодження клітин у неелектролітних середовищах при ГЗ достовірно нижче, а їх осмотична стійкість вище у порівнянні з електролітними. Найбільш стійкою до дії факторів середовища є ехіноцитарна форма еритроцитів.

**Ключові слова:** еритроцити, гіпотермічне зберігання, іонна сила, pH середовища.

It has been shown that the observed relationship between transformation of cell shape and their osmotic resistance as well as damage degree during hypothermal storage (HS) is stipulated by ionic strength and equilibration medium pH. The degree of cell damage in non-electrolyte media during HS is statistically lower and their osmotic resistance is higher if compared with electrolyte ones. The most resistant to the factors of medium is echinocyte shape of erythrocytes.

**Keywords:** erythrocytes, hypothermal storage, ionic strength, medium pH.

В последние годы достаточно много внимания уделяется подбору и разработке сред для гипотермического хранения (ГХ) эритроцитов. Несмотря на значительные успехи в этом направлении, отмечается, что свою функциональную полноценность эритроциты сохраняют лишь в течение первых 3-х суток [8]. При ГХ эритроцитов снижаются внутриклеточный pH, концентрации АТФ и 2,3-ДФГ, повышается уровень свободного гемоглобина и изменяется структура мембраны вплоть до формирования микровезикул [7, 10]. Таким образом, вопросы, связанные с изучением механизмов повреждения клеток в условиях ГХ, остаются актуальными.

Цель работы – исследование морфологии эритроцитов и их устойчивости к гипотоническому лизису в зависимости от ионной силы, а также pH среды эквilibрации в условиях гипотермического хранения.

Recently quite much attention has been paid to the selection and designing of the media for hypothermal storage (HS) of erythrocytes. In spite of significant successes in this direction there is noted that its functional integrity the erythrocytes preserve only during first 3 days [8]. At HS of erythrocytes intracellular pH, ATP and 2,3-DPG reduce, the level of free hemoglobin rises and the structure of membrane up to the formation of microvesicles [7, 10] changes. Thus the tasks related to the study of mechanisms of cell damage under HS have remained an actual one.

The research aim is to investigate the morphology of erythrocytes and their resistance to hypotonic lysis depending on ionic strength as well as pH of equilibration medium under hypothermal storage.

### Materials and methods

The research objects were erythrocytes of whole donor's blood of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups (5 donors in

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: nvrepin@mail.ru

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup> V.N. Karazin National University, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: nvrepin@mail.ru

## Материалы и методы

Объектом исследования были эритроциты цельной донорской крови II и III групп (по 5 доноров в каждой группе), трижды отмытые от плазмы и форменных элементов крови раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (20 мМ фосфатного буфера (ФБ; 130 мМ NaCl; 5,6 мМ глюкозы, pH 7,4)) центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин. Для ГХ клеток (гематокрит 20%) использовали холодильную камеру (4°C) и среды различного состава: электролитные – среда 1 (130 мМ NaCl; pH 5,4; 7,2; 8,6) и среда 2 (130 мМ KCl; pH 5,4; 7,2; 8,6); неэлектролитные – среда 3 (260 мМ маннита; pH 5,4; 7,2; 8,6) и среда 4 (260 мМ сахарозы; pH 5,4; 7,2; 8,6). Все исследуемые среды содержали 20 мМ ФБ.

Изменение формы эритроцитов, их размеры и степень гетерогенности популяции контролировали с помощью растрового электронного микроскопа РЭММА-101А (АО “SELMI”, Украина), снабженного системой цифрового вывода изображения. Для морфологических исследований клетки фиксировали 2%-м раствором глутарового альдегида (ГА) на ФБ, смешивая его с суспензией клеток в соотношении 1:1. Конечная концентрация ГА составляла 1% [2]. Для каждой экспериментальной точки был определен морфологический индекс [3].

Ультраструктуру и состояние гликокаликса эритроцитов исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе TEM-125K, снабженном системой съема и анализа изображения САИ-01А (АО “SELMI”, Украина) с помощью CCD камеры DX-2 и пакета программ фирмы “KAPPA” (Германия) при ускоряющем напряжении 75 кВ. В качестве дополнительного фиксатора использовали рутений красный по методу [1].

Повреждение эритроцитов при ГХ и их устойчивость к гипотонии фиксировали спектрофотометром СФ-4А (ЛОМО, Россия) с проточной кюветой (длина волны 543 нм) по концентрации свободного гемоглобина в надосадке. Осмотическую устойчивость эритроцитов определяли путем их переноса из сред инкубации в среды NaCl (90 и 140 мОсм), содержащие 20 мМ ФБ, pH 7,2 при 37°C, в соотношении 1:10. Осмолярность гипотонических сред контролировали осмометром ОМКА-1Ц-01 (Украина).

## Результаты и обсуждение

При переносе эритроцитов в среды с различным значением pH выявлена достаточно высокая сохранность исходной формы эритроцитов практически до 2-х суток ГХ, за исключением неэлектролитных сред при pH 8,6, в которых с 30-й минуты наблюдались интенсивные процессы трансформации клеток в эхиноциты, а со 2-х суток – в сфероэхиноциты.

each), thrice washed-out from plasma and blood formed elements with the solution of phosphate-salt buffer (PSB) (20 mM phosphate buffer (PB); 130 mM NaCl; 5.6 mM glucose, pH 7.4) with centrifugation at 3,000 rpm for 5 min. For HS of cells (hematocrit 20%) there was used freezing chamber (4°C) and the media of different composition: electrolyte one, medium 1 (130 mM NaCl; pH 5.4; 7.2; 8.6) and medium 2 (130 mM KCl; pH 5.4; 7.2; 8.6); non-electrolyte one, medium 3 (260 mM mannitol; pH 5.4; 7.2; 8.6) and medium 4 (260 mM sucrose; pH 5.4; 7.2; 8.6). All the studies media contained 20 mM phosphate buffer.

The change of the shape of erythrocytes, their sizes and degree of population heterogeneity was controlled with raster electron microscope REMMA-101A (JSC “SELMI”, Ukraine), equipped with the system of digital retrieval of images. For morphological studies the cells were fixed with 2% solution of glutaraldehyde (GA) on PB mixing it with cell suspension in 1:1 ratio. Final GA concentration made 1% [2]. For each experimental point there was found the morphological index [3].

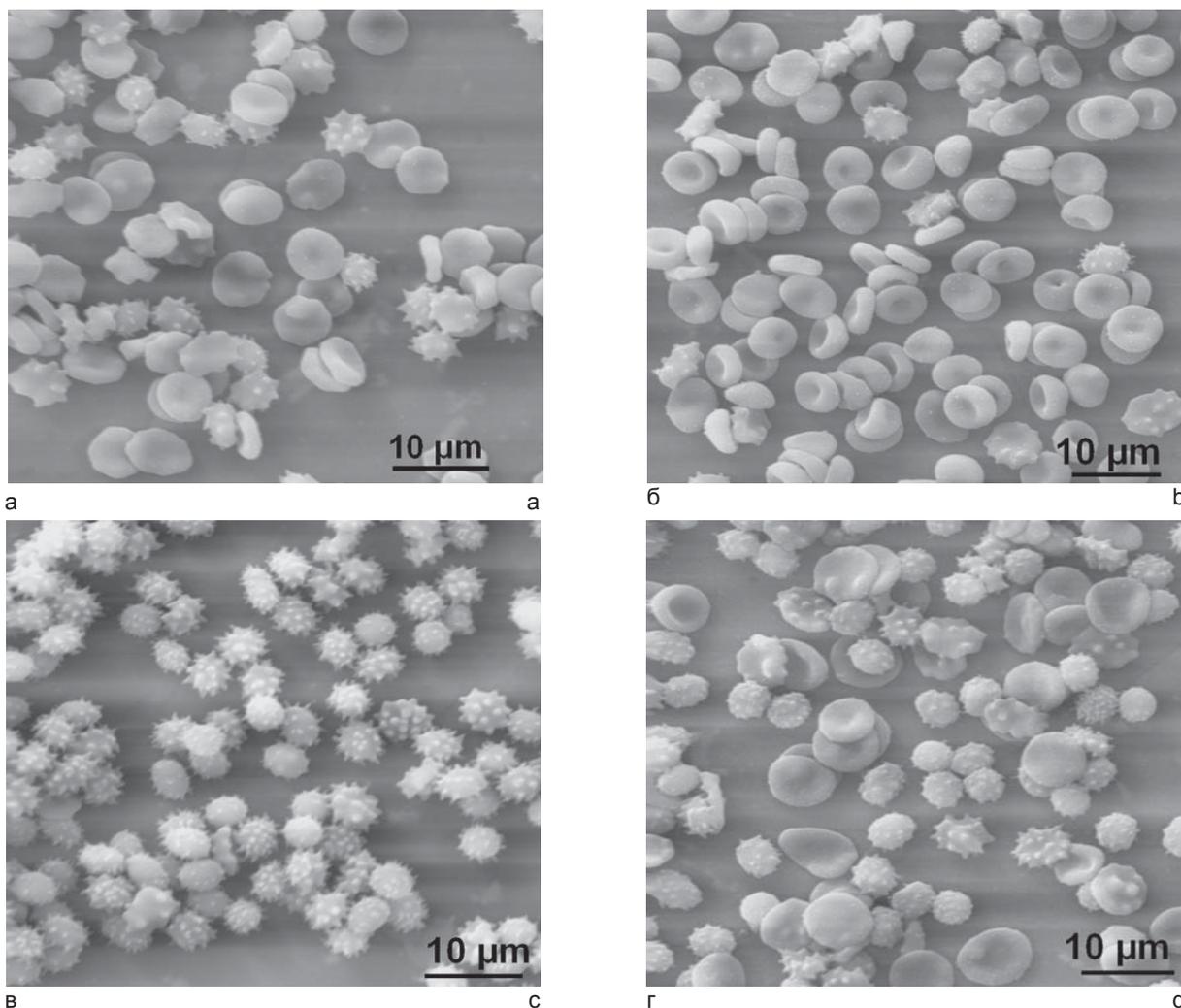
Ultrastructure and state of glycocalyx of erythrocytes were studied with transmission electron microscope TEM-125K equipped with the system of image recording and analysis SAI-01A (JSC “SELMI”, Ukraine) using CCD camera DX-2 and “KAPPA” software (Germany) with accelerating voltage of 75 kV. As additional fixer there was used ruthenium red according to the method [1].

Damage of erythrocytes at HS and their resistance to hypotony was fixed with spectrophotometer SF-4A (LOMO, Russia) with flow cell (543 nm wave length) on concentration of free hemoglobin in supernatant. Osmotic resistance of erythrocytes was found by their transfer from incubation medium in NaCl media (90 and 140 mOsm), containing 20 mM PB, pH 7.2 at 37°C in 1:10 ratio. Osmolarity of hypotonic media was controlled with osmometer OMKA-1C-01 (Ukraine).

## Results and discussion

During transfer of erythrocytes with different pH values there was revealed quite high integrity of initial form of erythrocytes practically up to 48 hrs of HS, excluding non-electrolyte media with pH 8.6., wherein from the 30<sup>th</sup> min there were observed intensive processes of shape transformation into echinocytes and into spherocytes from the second day.

During HS there were revealed manifested change of cell shapes depending on the composition and pH of exposure medium. Under acid values of pH in non-electrolyte media and the one containing NaCl to the 7<sup>th</sup> day of HS there was found a heterogenous population of cell consisting of discocytes and echinocytes (Fig. 1, a), meanwhile in the medium, containing KCl practically all the cells were transformed into slightly stomatocyte shapes (Fig. 1, b). Under neutral pH values



**Рис. 1.** Морфологическое состояние эритроцитов при ГХ к 7-м суткам в зависимости от состава и pH среды экспозиции: а – среда 1, pH 5,4; б – среда 2, pH 5,4; в – среда 1, pH 7,2; г – среда 2, pH 8,6.

**Fig. 1.** Morphological state of erythrocytes at HS to the 7<sup>th</sup> day depending on composition and exposure medium pH: a – medium 1, pH 5.4; b – medium 2, pH 5.4; c – medium 1; pH 7.2, d – medium 2, pH 8.6.

В процессе ГХ выявлены более выраженные изменения формы клеток в зависимости от состава и pH среды экспозиции. При кислых значениях pH в неэлектролитных средах и среде, содержащей NaCl, на 7-е сутки ГХ наблюдалась гетерогенная популяция клеток, состоящая из дискоцитов и эхиноцитов (рис. 1, а), тогда как в среде, содержащей KCl, практически все клетки трансформированы в слабостоматоцитарные формы (рис.1, б). При нейтральных значениях pH в неэлектролитных и электролитных средах на 7-е сутки ГХ 90% клеток имеют форму эхиноцитов (рис. 1, в).

Щелочные значения pH выявили различную направленность трансформации формы эритроцитов в зависимости от ионной силы. В электролитных средах наблюдается образование гетерогенной популяции клеток, состоящей из уплощенных дискоидных форм и сфероэхиноцитов (рис. 1, г), тогда как в неэлектролитных отмечена однонаправленная трансформация формы клеток с образо-

in non-electrolyte and electrolyte media to the 7<sup>th</sup> day of HS 90% of cell were of echinocyte shape (Fig. 1, c).

At alkyl pH values showed different orientation of shape transformation of erythrocytes depending on ionic strength. In electrolyte media there is observed the formation of heterogenous population of cells consisting of discoid forms and spherocytic forms (Fig. 1, d), whilst in non-electrolyte ones there was observed mono-orientated transformation of cell shape with the formation of spherocytic forms (Fig. 2, a). It should be noted that to the 7<sup>th</sup> day of HS at alkyl pH the microvesicles in the media of both types are formed.

When extending the HS terms up to the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days in NaCl- and KCl-containing media at pH 5.4 the damage of some cells and transformation of the rest cells into spherocytic forms is observed, in non-electrolyte media the echinocytes and discocytic forms are preserved. At neutral and alkyl pH in the media of both types to the 21<sup>st</sup> storage day the spherocytic forms dominate (Fig. 2, b).

ванием сфероэритроцитов (рис. 2, а). Следует отметить, что на 7-е сутки ГХ при щелочных pH образуются микровезикулы в средах обоих видов.

При увеличении сроков ГХ до 14- и 21-х суток в NaCl- и KCl-содержащих средах при pH 5,4 наблюдаются повреждение части клеток и трансформация оставшихся клеток в сфероэритроциты, в неэлектролитных средах сохраняются эритроциты и дискоэритроциты. При нейтральных и щелочных pH в средах обоих видов к 21-м суткам хранения доминируют сфероэритроциты (рис. 2, б).

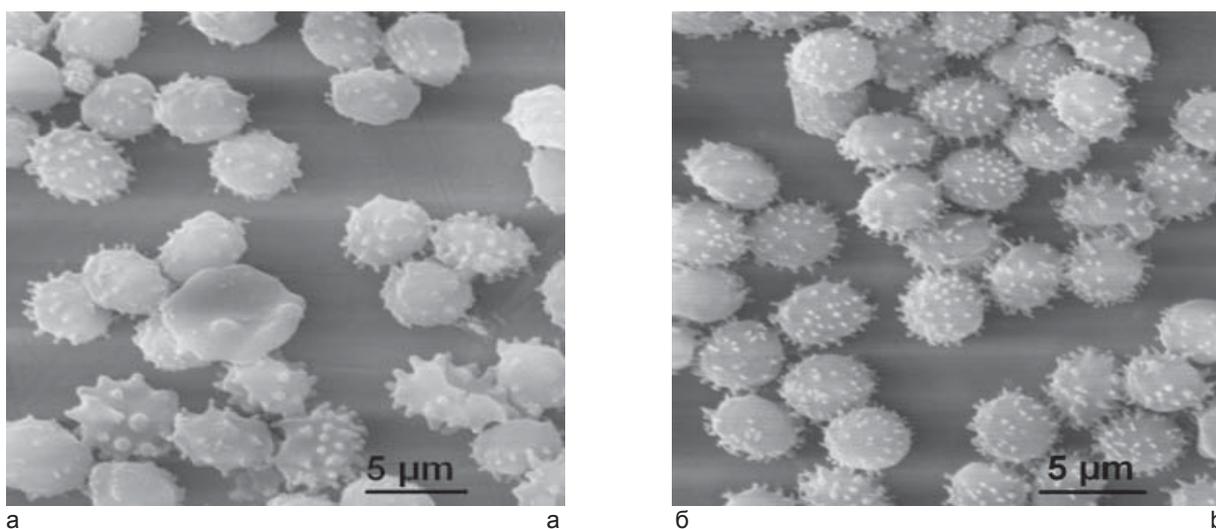
Анализ целостности клеток показал (рис. 3), что во всех исследуемых средах эквilibрации гемолиз отсутствовал на протяжении первых 7 суток ГХ, исключая электролитные среды при кислых значениях pH, где величина гемолиза составляла 4–6%. На 14-е сутки отмечается более выраженная зависимость уровня гемолиза от значений pH среды. Максимальный повреждающий эффект оказывали среды с pH 5,4, в которых к 14-м суткам ГХ уровень гемолиза в электролитных средах составлял 17–20% и в неэлектролитных – 6–10% (рис. 3). При pH 8,6 степень повреждения клеток была несколько ниже (11–14 и 5–6% гемолиза для обоих видов сред соответственно).

Минимальная степень повреждения клеток для данного срока ГХ отмечена для обоих типов сред при pH 7,2, где величина гемолиза составляла 2–3 и 7–8% для неэлектролитных и электролитных сред соответственно. Отмеченная тенденция повреждения клеток, обусловленная составом и pH среды эквilibрации при ГХ, сохранялась и на 21-е сутки хранения (рис. 3). Уровень гемолиза при pH 7,2 оставался минимальным по сравнению с кислыми и щелочными значениями pH в средах как с высо-

The analysis of cell integrity showed (Fig. 3) that in all studied equilibration media the hemolysis was absent for 7 days of HS, excluding electrolyte media at acid pH values, where the hemolysis rate was 4–6%. To the 14<sup>th</sup> day there is noted more manifested dependence of hemolysis rate on medium pH values. The maximum damaging effect was rendered by media with pH 5.4, wherein to the 14<sup>th</sup> day of HS the hemolysis rate in electrolyte media made 17–20% and 6–10% in non-electrolyte ones (Fig. 3). At pH 8.6 the damage rate of cells was somewhat lower (11–14 and 5–6% of hemolysis for both media types, correspondingly).

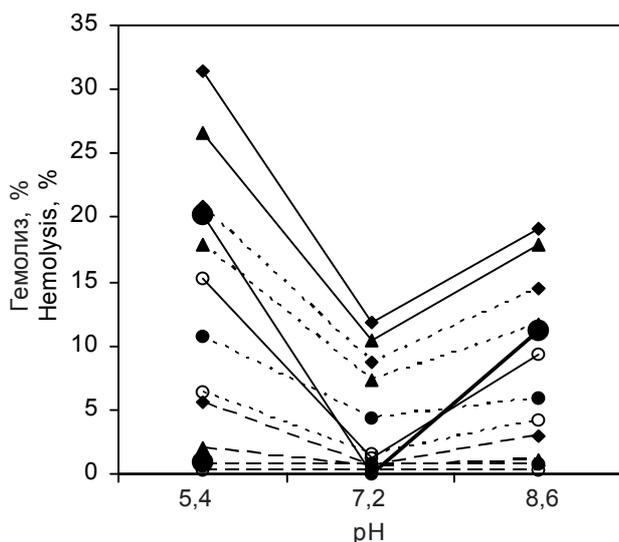
Minimum damage rate of cells for this HS term was noted for both types of media at pH 7.2, where the hemolysis rate made 2–3 and 7–8% for non-electrolyte and electrolyte media, correspondingly. At HS the found tendency of cell damage due to composition and equilibration medium pH was kept to the 21<sup>st</sup> storage day (Fig. 3). Hemolysis rate at pH 7.2 has remained minimal if compared with acid and alkyl pH values in the media both with high and low tonicity. In electrolyte media to the 21<sup>st</sup> day the hemolysis made 10–11% and 4–5% in non-electrolyte ones.

One of the most important membrane components is its glycocalix, formed with negatively charged sialic acids of transmembrane proteins and constituting the surface membrane charge. The charge glycocalix is considered to be reduced due to medium pH decrease. We studied its state during HS using special electron microscopic fixer, containing ruthenium red, binding specifically with membrane glycocalix [1]. It has been established that if in the norm and under short storage terms the glycocalix structure is represented with continuous membrane adjacent layer (Fig. 4, a, b), then to



**Рис. 2.** Морфологическое состояние эритроцитов при ГХ на 7-е (а) и 21-е (б) сутки в зависимости от состава и pH среды экспозиции: а – среда 4, pH 8,6; б – среда 3, pH 7,2.

**Fig. 2.** Morphological state of erythrocytes at HS to the 7<sup>th</sup> (a) and 21<sup>st</sup> days (b) depending on composition and exposure medium pH: a – medium 4, pH 8.6; b – medium 3, pH 7.2.



**Рис. 3.** Уровень гемолиза эритроцитов при ГХ на 7-е (пунктирная линия), 14-е (пунктир-точки) и 21-е сутки (сплошная линия) в зависимости от pH и состава среды инкубации:  $\blacklozenge$  – среда 1 (NaCl);  $\blacktriangle$  – среда 2 (KCl);  $\bullet$  – среда 3 (маннит);  $\circ$  – среда 4 (сахароза).

**Fig. 3.** Hemolysis rate of erythrocytes at HS to the 7<sup>th</sup> (dash line), 14<sup>th</sup> (dotted line) and 21<sup>st</sup> (solid line) days depending on pH and composition of incubation medium:  $\blacklozenge$  – medium 1 (NaCl);  $\blacktriangle$  – medium 2 (KCl);  $\bullet$  – medium 3 (mannit);  $\circ$  – medium 4 (sucrose).

кой, так и низкой тоничностью. В электролитных средах на 21-е сутки гемолиз составлял 10–11%, а в неэлектролитных – 4–5%.

Одной из важнейших структурных составляющих мембраны является ее гликокаликс, образуемый отрицательно заряженными сиаловыми кислотами трансмембранных белков и формирующий поверхностный мембранный заряд. Считается, что снижение заряда гликокаликса происходит при уменьшении pH среды. Мы исследовали его состояние в процессе ГХ, используя специальный электронно-микроскопический фиксатор, который содержит рутений-красный, специфически связывающийся с гликокаликсом мембран [1]. Установлено, что если в норме и при небольших сроках хранения структура гликокаликса представлена непрерывным примембранным слоем (рис. 4, а, б), то к 10–14-м суткам поверхность эритроцита содержит лишь его фрагменты (рис. 4, в) либо лишена их (рис. 4, г). Именно этим объясняется наблюдаемая агрегация клеток при более длительных сроках ГХ.

Отмеченные выше изменения в структуре гликокаликса подтверждаются данными работы [6], в которой показано, что плотность заряда мембраны эритроцитов значительно снижается после 6 суток хранения, о чем свидетельствует уменьшение электрофоретической подвижности эритроцитов.

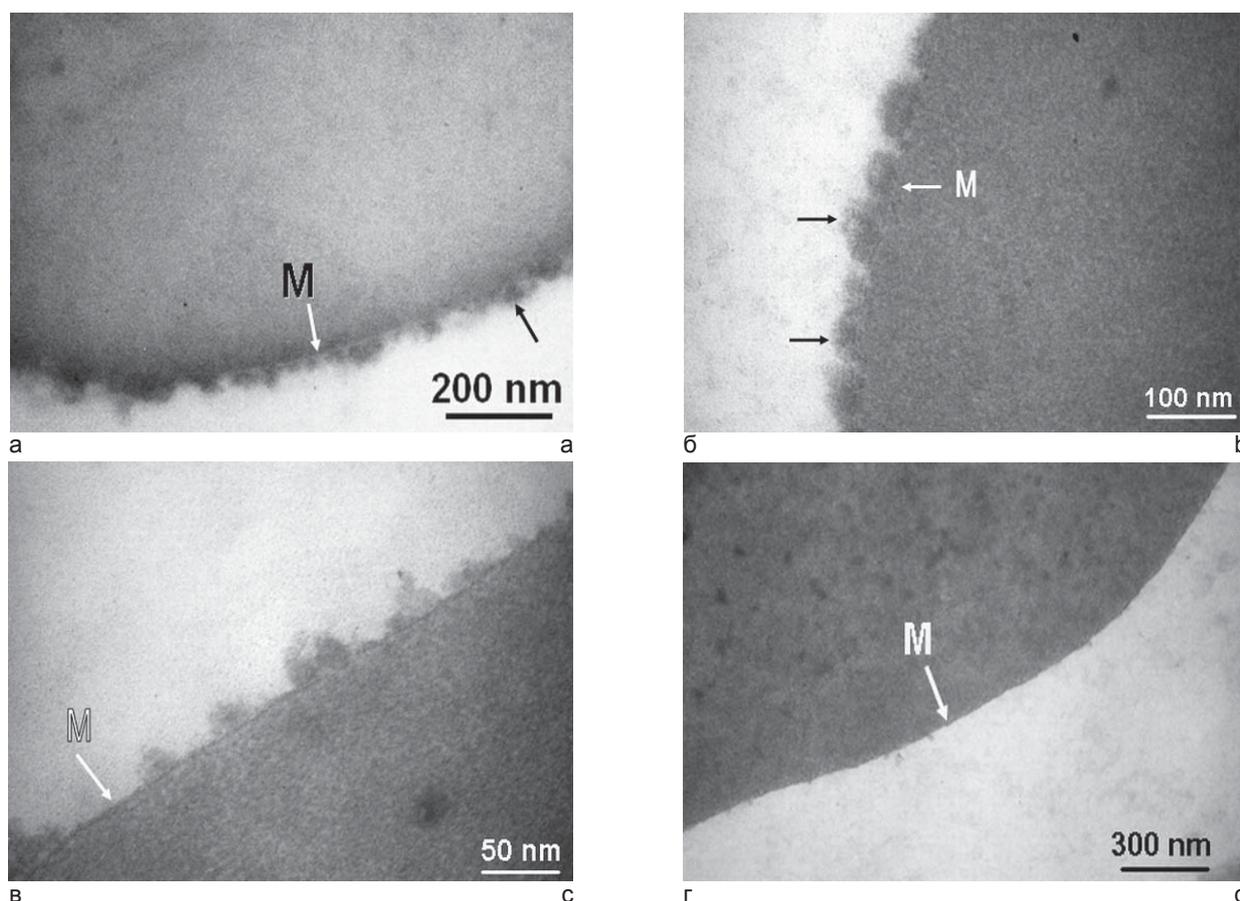
the 10<sup>th</sup>–14<sup>th</sup> days the erythrocyte surface either contains only its fragments (Fig. 2, c) or is deprived of them (Fig. 4, d). The observed aggregation of cells under longer HS terms is explained by very that.

The above mentioned changes in the glycocalix structure are confirmed with the report [6], demonstrating that charge density of erythrocyte membrane significantly reduces after 6 storage days, that is testified with the decrease in electrophoretic mobility of erythrocytes.

To reveal the latent cell damage and to explain possible mechanism of shape transformation there was analyzed the resistance of different erythrocyte shapes to hypotonic lysis. It has been shown that during transfer of erythrocytes into hypotonic solutions the most resistant cells occurred to be the ones, stored in non-electrolyte media for all pH values (Fig. 5). In the case of electrolyte media the cell sensitivity to hypotonia was determined with exposure medium pH value: the cells stored at neutral pH values occurred to be more resistant to the effect of osmotic factor. The highest rate of cell damage was found at their transfer into hypotonia from the medium containing KCl at pH 5.4.

The indices of the highest resistance to hypotonia of the cells, stored for 7 and more days if compared with 30 mins' exposure in the media with different composition (Fig. 5) is vividly presented in Fig. 6. The values of morphological index testify to the fact that maximum of presence of echinocytes in all the media for pH values and media with low ionic strength corresponds to minimal damage (see Fig. 3) and maximum of osmotic resistance (Fig. 5).

Revealed by us two maximums: damage (electrolyte media at pH 5.4) and integrity (non-electrolyte media at pH 7.2) of erythrocytes, characterized with different shapes, have to be considered from the point of view of relationship of the shape and ionic homeostasis of a cell in providing its adaptation to the changing conditions. The fact of minimum resistance in acid media at relative preservation of a shape from our point of view is related to the increased intracellular osmotic pressure due to the entrance of H<sup>+</sup> ions and blocking of the release of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions [3, 9], as well as effect of H<sup>+</sup> ions on negatively charged components of cytoskeleton-membrane complex and membrane permeability [4]. The same point of view as for the increase of the amount of intracellular chlorine under low pH, resulting in the change of band 3 protein conformation is presented in the paper [11]. It is supposed that occurring under these conditions protonization of band 3 protein domain causes the change in a balanced state of chlorine between extra- and intracellular medium resulting in its concentration rise inside a cell. The correlation between the concentration



**Рис. 4.** Морфологическое состояние гликокаликса мембран эритроцитов после 1 суток ГХ (а,б) и деградация его структуры к 10–14-м суткам (в, г). Фиксация рутением красным. Обозначения: темные стрелки – гликокаликс; М – мембрана эритроцита.

**Fig. 4.** Morphological state of glycocalyx of erythrocyte membranes after 24hrs' HS (a, b) and its structure degradation to the 10–14<sup>th</sup> days (c, d). Ruthenium red fixation. Legends: dark arrows – glycocalix; M – erythrocyte membrane.

Для выявления латентных повреждений клеток и объяснения возможного механизма трансформации формы была проанализирована устойчивость различных форм эритроцитов к гипотоническому лизису. Показано, что при переносе эритроцитов в гипотонические растворы наиболее устойчивы клетки, хранившиеся в неэлектролитных средах для всех значений pH (рис. 5). В случае электролитных сред чувствительность клеток к гипотонии определялась значением pH среды экспозиции: более устойчивы к действию осмотического фактора оказались клетки, хранившиеся при нейтральных значениях pH. Наиболее высокая степень повреждения клеток отмечена при их переносе в гипотонию из среды, содержащей KCl, при pH 5,4.

Факт наибольшей устойчивости к гипотонии клеток, хранившихся 7 и более суток, по сравнению с 30-минутной экспозицией в средах различного состава (рис. 5) наглядно представлен на рис. 6. Значения морфологического индекса свидетельствуют, что максимум “эхиноцитарности”, отмеченный у эритроцитов во всех средах для значения

of intracellular chlorine and change in the shape with the altering cell pH is reported in the papers [4, 5].

The fact of the highest resistance to hypotonia for the cells of echinocyte shape, stored at alkyl pH in the media of low ionic strength, is quite well explained by the reduction of intracellular osmotic pressure due to the release out of a cell of  $K^+$  and  $Cl^-$  ions on electrochemical gradients, that results in the formation of echinocytes. Heterogeneous population (discocytes, echinocytes and stomatocytes) of different modifications occurred to be more sensitive to osmotic factor effect.

### Conclusions

During HS the relationship between transformation of cell shape and their osmotic resistance, as well as the degree of damage depending on ionic strength and pH of equilibration medium is observed.

Under acid values of pH the erythrocytes are transformed into heterogeneous population of discocytes and echinocytes not depending on the composition of storage medium, while neutral pH values caused transformation of erythrocytes into homogenous, echi-

pH 7,2 и средах с низкой ионной силой при pH 8,6, соответствует минимуму повреждения (см. рис. 3) и максимуму осмотической устойчивости (рис. 5).

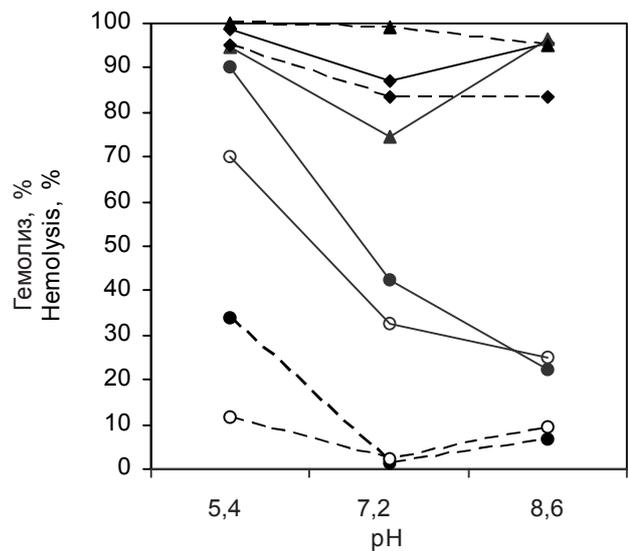
Выявленные нами два максимума – повреждение (электролитные среды при pH 5,4) и сохранность (неэлектролитные среды при pH 7,2) эритроцитов, характеризующихся разными формами, необходимо рассматривать с точки зрения взаимосвязи формы и ионного гомеостаза клетки в обеспечении ее адаптации к меняющимся условиям. Факт минимальной устойчивости в кислых средах при относительном сохранении формы, с нашей точки зрения, связан с повышенным внутриклеточным осмотическим давлением за счет входа ионов  $H^+$  и блокирования выхода ионов  $K^+$  и  $Cl^-$  [3, 9], а также с воздействием ионов  $H^+$  на отрицательно заряженные компоненты цитоскелет-мембранного комплекса и мембранную проницаемость [4]. Аналогичная точка зрения относительно увеличения количества внутриклеточного хлора при низких pH, приводящего к изменению конформации БП-3, изложена в работе [11]. Предполагается, что происходящая в этих условиях протонизация внешнего домена БП-3 вызывает изменение равновесного состояния хлора между вне- и внутриклеточной средой, приводя к увеличению его концентрации внутри клетки. Корреляция между концентрацией внутриклеточного хлора и изменением формы при изменении pH клетки отмечается в работах [4, 5].

Факт наибольшей устойчивости к действию гипотонии клеток эхиноцитарных форм, хранившихся при щелочных pH в средах низкой ионной силы, достаточно хорошо объясняется снижением внутриклеточного осмотического давления за счет выхода из клетки ионов  $K^+$  и  $Cl^-$  по электрохимическому градиенту, что приводит к образованию эхиноцитов. Гетерогенная популяция (дискоциты, эхиноциты и стоматоциты) различных модификаций оказалась более чувствительной к действию осмотического фактора.

### Выводы

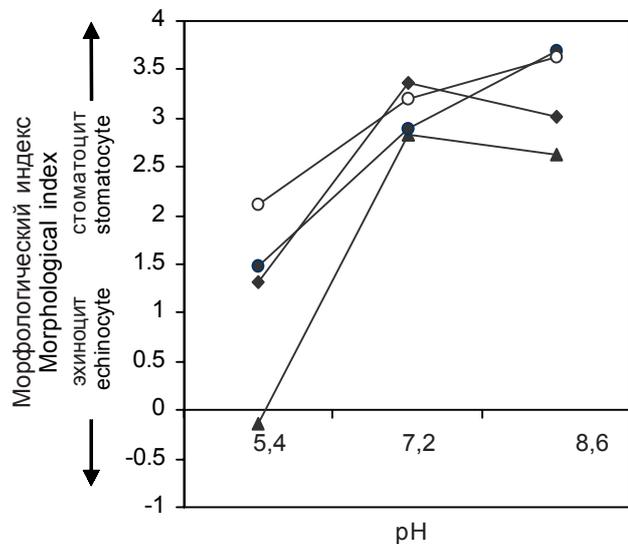
В процессе ГХ наблюдается взаимосвязь между трансформацией формы клеток и их осмотической устойчивостью, а также степенью повреждения в зависимости от ионной силы и pH среды эквilibрации.

При кислых значениях pH эритроциты трансформируются в гетерогенную популяцию дискоцитов и эхиноцитов вне зависимости от состава среды хранения, тогда как нейтральные значения pH вызывали трансформацию эритроцитов в гомогенную, эхиноцитарную популяцию. При щелочных значениях pH среды на 2-е сутки ГХ в неэлектролитных средах клетки интенсивно трансфор-



**Рис. 5.** Осмотическая резистентность эритроцитов в 90 мОсмоль NaCl в условиях 30-минутной экспозиции при 20°C (сплошная линия) и на 7-е сутки ГХ (пунктирная линия) в зависимости от pH среды инкубации с различным ионным составом: ◆ – среда 1 (NaCl); ▲ – среда 2 (KCl); ● – среда 3 (маннит); ○ – среда 4 (сахароза).

**Fig. 5.** Osmotic resistance of erythrocytes in 90 mOsm NaCl under 30 mins' exposure at 20°C (solid line) and to the 7<sup>th</sup> day of HS (dashed line) depending on incubation medium pH with various compositions: ◆ – medium 1 (NaCl); ▲ – medium 2 (KCl); ● – medium 3 (mannitol); ○ – medium 4 (sucrose).



**Рис. 6.** Морфологический индекс формы эритроцитов на 7-е сутки ГХ в зависимости от pH и состава среды инкубации: ◆ – среда 1 (NaCl); ▲ – среда 2 (KCl); ● – среда 3 (маннит); ○ – среда 4 (сахароза).

**Fig. 6.** Morphological index of erythrocyte shape to the 7<sup>th</sup> day of HS depending on pH and composition of incubation medium: ◆ – medium 1 (NaCl); ▲ – medium 2 (KCl); ● – medium 3 (mannitol); ○ – medium 4 (sucrose).

noocyte population. Under alkyl values of medium pH to the 2<sup>nd</sup> day of HS in non-electrolyte media the cells are intensively transformed into spherocytocytes,

мируются в сфероэритроциты, тогда как в электролитных – образуется гетерогенная популяция дискоцитов и эритроцитов.

В процессе ГХ степень повреждения клеток в неэлектролитных средах ГХ достоверно ниже, а их осмотическая устойчивость выше по сравнению с электролитными. Установлено, что вне зависимости от ионной силы среды при кислых значениях pH наблюдается минимальная осмотическая устойчивость эритроцитов. Наиболее устойчивой формой к действию факторов среды является эритроцитарная форма клеток.

Исследование состояния примембранного слоя эритроцитов при их ГХ показало, что между 10 и 14-ми сутками хранения происходит разрушение, а при некоторых условиях отслоение и потеря гликокаликса.

### Литература

1. Гайер Г. Электронная гистохимия.– М.: Мир, 1974.– 488 с.
2. Крымский Л.Д., Нестайко Г.В., Рыбалов А.Г. Растровая электронная микроскопия сосудов и крови.– М.: Медицина, 1976.– 165 с.
3. Gedde M., Davis K., Huestis H. Cytoplasmic pH and human erythrocyte shape // *Biophys. J.* – 1997.– Vol. 72, N3.– P. 1234–1246.
4. Gedde M., Huestis H. Membrane potential and human erythrocytes shape // *Biophys. J.*– 1997.– Vol. 72, N3.– P. 1220–1233.
5. Gimsa J., Ried C. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? // *Mol. Membr. Biol.*– 1995.– Vol. 12, N3.– P. 247–254.
6. Godin Ch., Caprani A. Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity // *Eur. Biophys. J.*– 1997.– Vol. 26, N2.– P. 175–182.
7. Hess J.R., Rugg N., Knapp A. D. et al. The role of electrolytes and pH in RBC ASs // *Transfusion.*– 2001.– Vol. 41, N8.– P. 1045–1051.
8. Högman C. F., Löf H., Meryman H. T. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate // *Transfusion.*– 2006. – Vol. 46, N9. – P. 1543–1552.
9. Liu S., Law F., Knäuf P. Effects of external pH on substrate binding and on the inward chloride translocation rate constant of band 3 // *J. Gen. Physiol.*– 1996.– Vol. 107, N2.– P. 271–291.
10. Valeri C. R., Pivacek L. E., Cassidy G. P. et al. The survival, function, and hemolysis of human RBCs stored at 4°C in additive solution (AS-1, AS-3, or AS-5) for 42 days and then biochemically modified, frozen, thawed, washed, and stored at 4°C in sodium chloride and glucose solution for 24 hours // *Transfusion.*– 2000.– Vol. 40, N11.– P. 1341–1345.
11. Wong P. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte // *J. Theor. Biol.*– 1999.– Vol. 196, N3.– P. 343–361.

Поступила 21.10.2008  
Рецензент В.С. Марченко

meanwhile in electrolyte ones the heterogeneous population of discocytes and echinocytes is formed.

During HS the degree of cell damage in non-electrolyte media is significantly lower and their osmotic resistance is higher if compared with electrolyte ones. It has been established that independently on ionic strength of the medium at acid pH values there is observed minimal osmotic resistance of erythrocytes. The most resistance form to the effect of the medium factors is echinocyte cell shape.

The examination of the state of membrane-adjacent layer of erythrocytes during HS has shown that between 10<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> storage days the desintegration and the exfoliation and loss of glycocalyx under certain conditions take place.

### References

1. Gaer G. Electron microscopy. – Moscow: Mir – 1974.– 488 p.
2. Krymsky L.D., Nestayko G.V., Rybalov A.G. Raster electron microscopy of vessels and blood.– Moscow: Mir.– 1974.– 165 p.
3. Gedde M., Davis K., Huestis H. Cytoplasmic pH and human erythrocyte shape // *Biophys. J.* – 1997.– Vol. 72, N3.– P. 1234–1246.
4. Gedde M., Huestis H. Membrane potential and human erythrocytes shape // *Biophys. J.*–1997.– Vol. 72, N3.– P. 1220–1233.
5. Gimsa J., Ried C. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? // *Mol. Membr. Biol.*– 1995.– Vol. 12, N3.– P. 247–254.
6. Godin Ch., Caprani A. Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity // *Eur. Biophys. J.*– 1997.– Vol. 26, N2.– P. 175–182.
7. Hess J.R., Rugg N., Knapp A. D. et al. The role of electrolytes and pH in RBC ASs // *Transfusion.*– 2001.– Vol. 41, N8.– P. 1045–1051.
8. Högman C. F., Löf H., Meryman H. T. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate // *Transfusion.*– 2006. – Vol. 46, N9. – P. 1543–1552.
9. Liu S., Law F., Knäuf P. Effects of external pH on substrate binding and on the inward chloride translocation rate constant of band 3 // *J. Gen. Physiol.*– 1996.– Vol. 107, N2.– P. 271–291.
10. Valeri C. R., Pivacek L. E., Cassidy G. P. et al. The survival, function, and hemolysis of human RBCs stored at 4°C in additive solution (AS-1, AS-3, or AS-5) for 42 days and then biochemically modified, frozen, thawed, washed, and stored at 4°C in sodium chloride and glucose solution for 24 hours // *Transfusion.*– 2000.– Vol. 40, N11.– P. 1341–1345.
11. Wong P. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte // *J. Theor. Biol.*– 1999.– Vol. 196, N3.– P. 343–361.

Accepted in 21.10.2008