

УДК 576.324:612.111

ВИДОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭРИТРОЦИТОВ В САХАРОЗНЫХ СРЕДАХ**С.В. Руденко¹, М.Х. Румиэх²**¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская 23, Харьков, 61015, Украина²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина

Поступила в редакцию 18 сентября 2007

Изучена динамика изменений формы эритроцитов человека, крысы и петуха после их введения в неэлектролитные сахарозные среды с низким содержанием ионов хлора и влияние на нее ингибиторов анионного транспорта DIDS, SITS и DNDS, а также альбумина, хлорпромазина, SDS и СТАВ. Показано, что эритроциты человека и крысы обладают идентичной морфологической реакцией на смену состава среды, заключающейся в трехфазном изменении формы клеток, которая значительно отличается от реакции эритроцитов петуха, для которых наблюдается только слабый стоматоцитоз. Установлено, что DIDS и SITS имеют как близкий между собой, так и схожий эффект в отношении эритроцитов человека и крысы. SDS также оказывает схожее воздействие на эти эритроциты, но сам эффект значительно отличается от эффектов DIDS и SITS. Во всех остальных случаях действие агентов отличается друг от друга, а один и тот же агент действует по разному на эритроциты разных видов. Действие агентов на морфологию эритроцитов существенно зависит и от того, присутствуют они в среде изначально или добавляются в нее через 150 с после клеток. Исследование изменений формы с помощью неинвазивного метода светорассеивания и параллельный микроскопический анализ показывает, что эритроциты петуха менее всего подвержены морфологическим изменениям в сахарозных средах и, в отличие от эритроцитов человека и крысы, не трансформируются в сферические формы как в отсутствие, так и в присутствии модификаторов. Установлено, что эритроциты крысы в сахарозной среде трансформируются в стоматоциты как в отсутствие так и в присутствии модификаторов, тогда как эритроциты человека в отдельных случаях могут приобретать форму эхиноцитов. Полученные данные показывают, что действие модификаторов на форму эритроцитов в сахарозной среде представляет собой сложный процесс, который, является видоспецифичным и определяется химической природой модификатора.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, форма, низкая ионная сила, сахароза, DIDS, SITS, DNDS, альбумин, CPR, SDS, СТАВ, человек, крыса, петух.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что дискоидные эритроциты трансформируются в стоматоциты при их переносе в среды с низкой ионной силой, в которых электролит хлорид натрия изоосмотически замещен на сахарозу. Эту трансформацию объясняют тем, что в указанных условиях происходит деполяризация мембраны [1; 2] и положительный потенциал внутри клетки согласно концепции Глазера и др. является главной причиной стоматоцитоза [3; 4]. Нужно отметить, что в этих условиях происходит также активация некоторых транспортных механизмов, которые в нормальных физиологических условиях редуцированы, например резко увеличивается проницаемость мембраны для калия и натрия [5; 6; 7], и активируется неселективный потенциал-зависимый канал (NSVDC-nonselective voltage dependent channel) [2; 8]

Ранее нами было показано, что эритроциты человека после помещения их в среду сахарозы с номинальным отсутствием ионов хлора, претерпевают ряд время-зависимых морфологических превращений, заключающихся в том, что эритроциты сначала быстро сферулируются (фаза 1), потом практически восстанавливают дискоидную форму (фаза 2) и затем снова уменьшают свою дискоидность, достигая терминальных стадий стоматоцитоза (фаза 3).

Современные представления о механизмах регуляции формы безъядерных эритроцитов базируются на гипотезе бислошной пары [9], которая утверждает, что ведущим фактором, приводящим к морфологическим изменениям клетки, является разница в площадях между внешним и внутренним монослоем мембраны. Ряд авторов рассматривают гипотезу, которая является конкретизацией гипотезы бислошной пары, и согласно которой форма эритроцита определяется конформационным состоянием анионного переносчика (белка полосы 3) [10; 11]. При связывании ингибитора с белком его конформация меняется и вероятность нахождения в конформации с большей поверхностной площадью увеличивается, что приводит к увеличению общей площади поверхности внешнего монослоя мембраны и, соответственно к формированию выпячиваний или спикул в соответствии с теорией бислошной пары. Известно, что ингибиторы анионного транспорта DIDS, SITS и DNDS вызывают эхиноцитоз эритроцитов при физиологических условиях [12], которые могут быть обусловлены конформационными

перестройками анионного переносчика [13]. Для того, чтобы более подробно изучить природу циклических морфологических изменений эритроцитов в неэлектролитной среде, которые отсутствуют в нормальных физиологических условиях, и происходят в отсутствие каких либо дополнительных агентов, которые могли бы вызвать перераспределение мембранных компонент и, таким образом, привести к изменениям формы клеток [14], мы исследовали этот процесс на трех видах эритроцитов – человека, крысы и петуха, которые различаются по своему строению и составу мембраны [15; 16; 17]. Кроме этого, процесс изменений формы изучали как в отсутствие так и в присутствии дополнительных модификаторов, которые в норме вызывают трансформацию эритроцитов в сторону эхиноцитоза, к которым относятся ингибиторы анионного транспорта DIDS, SITS и DNDS, а также детергенты SDS и СТАВ, и в сторону стоматоцитоза – хлорпромазин и сывороточный альбумин человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на свежих эритроцитах человека, крысы и петуха, которые после забора на антикоагулянте (цитрат натрия для человека и петуха и гепарин для крысы) сначала дважды отмывали в незабуференном физиологическом растворе (150 мМ NaCl), а затем осадок разводили в 10 раз в изотоническом растворе HBS (150 мМ NaCl, 5 мМ HEPES, pH 7,4) и использовали как сток-суспензию. Для изучения изменений формы клеток во времени использовали разработанный и изготовленный нами 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. Индекс формы (ИФ) определяли как описано ранее [18] и вычисляли по формуле $ИФ = k \cdot D$ где k - постоянный коэффициент, зависящий от коэффициента усиления сигнала и от калибровки прибора, а D - среднее квадратичное значение амплитуды флуктуаций светового потока, которое вычисляли на интервале усреднения равном 1 с. Калибровочный коэффициент k позволяет сформировать шкалу измерений ИФ который отражает степень дискоидности (или сферичности) эритроцитов (1 – для дисков и нуль – для сфер). В цилиндрическую стеклянную кювету диаметром 10 мм, содержащую 2 мл HBS, добавляли 9-11 мкл сток-суспензии эритроцитов таким образом, чтобы начальное значение ОП было в пределах $0,30 \pm 0,02$. Клеточная суспензия перемешивалась магнитной мешалкой со скоростью 600 об/мин. Динамика морфологических изменений изучалась при введении клеток в незабуференную среду 0,3 М сахарозы (Merck), pH 5,8, содержащую или не содержащую дополнительно модификаторы формы. В отдельных экспериментах модификаторы (от 5 до 40 мкл) добавляли непосредственно в кювету из концентрированных растворов до получения заданной конечной концентрации через 150 с после введения туда клеток. Использовали следующие ингибиторы анионного транспорта: DIDS – 4,4'-Диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота, SITS – 4-Ацетамидо-4'-изотиоцианатостильбен – 2,2'-дисульфоновая кислота (Sigma), DNDS – 4,4'-динитростильбен – 2,2'-дисульфоновая кислота (Pfaltz and Bauer). HSA - сывороточный альбумин человека с концентрацией 50 г/л (Россия), SDS – додецилсульфат натрия (Sigma), CPR – хлорпромазин HCl (Sigma), СТАВ – цетилиметиламмонийбромид (Calbiochem). Стационарная морфология клеток через 5 мин после их калибровки в кювете контролировалась оптической микроскопией в тонком жидком слое без применения фиксирующих агентов, чтобы минимизировать эффект стекла [19]. На рисунках представлены типичные данные, от 3 до 5 независимых экспериментов, проведенных с кровью различных доноров при температуре 20–22 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показаны типичные кривые изменения ИФ эритроцитов человека (А), крысы (Б) и петуха (В), помещенных в изотонический раствор сахарозы, в отсутствие модификаторов (левые треки) или в их присутствии (правые треки). Стрелкой на левых треках показан момент добавления того же количества модификаторов, что и на правых треках. Видно, что в среде без модификаторов морфологическая реакция эритроцитов человека и крысы состоит, по крайней мере, из трех фаз, которые отмечались ранее (С.В. Руденко, М.Х. Румяных, 2007 в печати). Такая форма зависимости ИФ от времени указывает на то, что клетки после помещения их в раствор сахарозы быстро сферулируются, что фиксируется по значительному уменьшению ИФ (фаза 1). Затем значение ИФ восстанавливается до величин, характерных для дискоидных клеток в физиологическом растворе 1.0 – 1.2 (фаза 2), после чего ИФ снова уменьшается (фаза 3). Из приведенных данных видно, что в отличие от эритроцитов человека и крысы, которые демонстрируют практически одинаковую трехфазную зависимость ИФ от времени, для эритроцитов петуха не наблюдается существенных изменений ИФ во времени независимо от того добавляли модификатор к ним через 150 с или он изначально присутствовал в среде. Нужно отметить, что значение ИФ для эритроцитов петуха как в физиологическом растворе, так и в растворе сахарозы

значительно превышает ИФ эритроцитов человека и крысы. Если ИФ дискоидных эритроцитов человека и крысы лежит в пределах от 1,0 до 1,2, то для петуха он может быть равным 1,5 и больше. Это может быть связано с тем, что морфология эритроцитов птиц значительно отличается от морфологии эритроцитов млекопитающих [20; 21]. Ядерные эритроциты петуха больше по объему и в нормальных физиологических условиях представляют собой плоские диски овальной формы большая полуось которых почти в два раза больше диаметра эритроцитов человека. Благодаря этому они вызывают большие флуктуации светового потока через образец, что выражается в большем значении ИФ.

Для того, чтобы более подробно сопоставить морфологические изменения эритроцитов различных типов в сахарозной среде, клетки в конце инкубации анализировались с помощью световой микроскопии. На рис 2 показаны фотографии контрольных эритроцитов в физиологическом растворе (ряд 1), через 5 мин после инкубации в растворе сахарозы (ряд 2) и через 5 мин после инкубации в присутствии модификаторов, т.е. в конце правых треков из каждой серии. Обсуждение полученных результатов с целью обнаружения каких либо общих закономерностей реакции различных типов клеток в приведенных условиях разумно проводить одновременно с анализом их соответствующей морфологии. Из полученных данных очевидно, что реакция эритроцитов петуха кардинально отличается от соответствующей реакции эритроцитов человека и крысы. На основании измерения динамики ИФ, представленных на рис.1, можно ожидать минимальных изменений формы этих эритроцитов в сахарозных средах как в отсутствие так и присутствии модификаторов. Действительно, это подтверждается данными, представленными на рис 2. Поэтому эритроциты петуха можно выделить отдельно, а эритроциты человека и крысы объединить в одну группу, поскольку реакция этих эритроцитов обладает некоторыми общими признаками.

Это относится прежде всего к тому, что оба типа эритроцитов практически одинаково реагируют на их введение в сахарозную среду трехфазной последовательностью морфологических превращений (рис. 1 А, Б левые треки). Это, видимо, обусловлено тем, что общая архитектура этих эритроцитов несмотря на различия в белковом и липидном составе их мембран [16; 17], объеме и площади поверхности мембраны, ее проницаемости и различиях в транспортных механизмах [15; 22] имеет много общего. В физиологическом растворе морфология этих эритроцитов близка – они представляют собой дискоциты и эхиноциты (рис. 2, ряд 1). После инкубации в сахарозе эритроциты в обоих случаях превращаются в стоматоциты (рис. 2, ряд 2). Это означает, что быстрые изменения формы клеток после их помещения в сахарозную среду, происходят в пределах стоматоцитарного, инвагинированного типа, т.е. клетки сферулируются, временно восстанавливают дискоидную форму, а затем снова превращаются в стоматоциты, различающиеся по степени сферичности. После такой морфологической трансформации клетки по разному реагируют на добавление модификаторов, которые сами по себе обладают выраженной способностью менять их форму в обычных физиологических условиях в ту или иную сторону. Так, DIDS и SITS близким образом увеличивают ИФ после их введения (рис. 1 А, Б левые треки), указывая на уплощение эритроцитов, а DNDS такого эффекта не вызывает и практически не влияет на ИФ для эритроцитов человека, но влияет на эритроциты крысы. Аналогично альбумин в значительно большей степени увеличивает ИФ эритроцитов крысы, чем человека. Различным образом ведет себя CPR, который вызывает транзиторные изменения ИФ с последующим медленным его восстановлением для человека и резко снижает ИФ у крысы. Похожий эффект имеет СТАВ, с тем отличием, что он в обоих случаях формирует транзиторный ответ. В этом отношении наиболее выраженным и отчетливым влиянием обладает SDS, который после его добавления приводит к появлению дополнительного пика изменений ИФ по форме и длительности напоминающий первый пик, который формируется в отсутствие модификаторов как в случае эритроцитов человека, так и крысы. Это показывает, что клетки способны, по крайней мере, дважды, за короткий период времени совершить цикл морфологических преобразований от сферической до дискоидной формы и обратно. Из данных, приведенных на рис.1, отчетливо видна разница в величине и направленности эффекта модификаторов в зависимости от момента начала их взаимодействия с клетками в сахарозной среде. В целом для обоих типов клеток прослеживается закономерность, что присутствие многих, но не всех исследованных модификаторов на начальной стадии, т.е. при их присутствии в среде, куда вводятся эритроциты, приводит к изначальной фиксации форм с низким значением ИФ (DIDS, SITS, альбумин, CPR и СТАВ), т.е. менее дискоидных форм. Для других модификаторов (DNDS, альбумина для крыс и, в особенности SDS) тип ответа изменяется в зависимости от типа клеток и вида действующего вещества. При этом в морфологии могут наблюдаться значительные различия в самом типе изменений форм клеток,

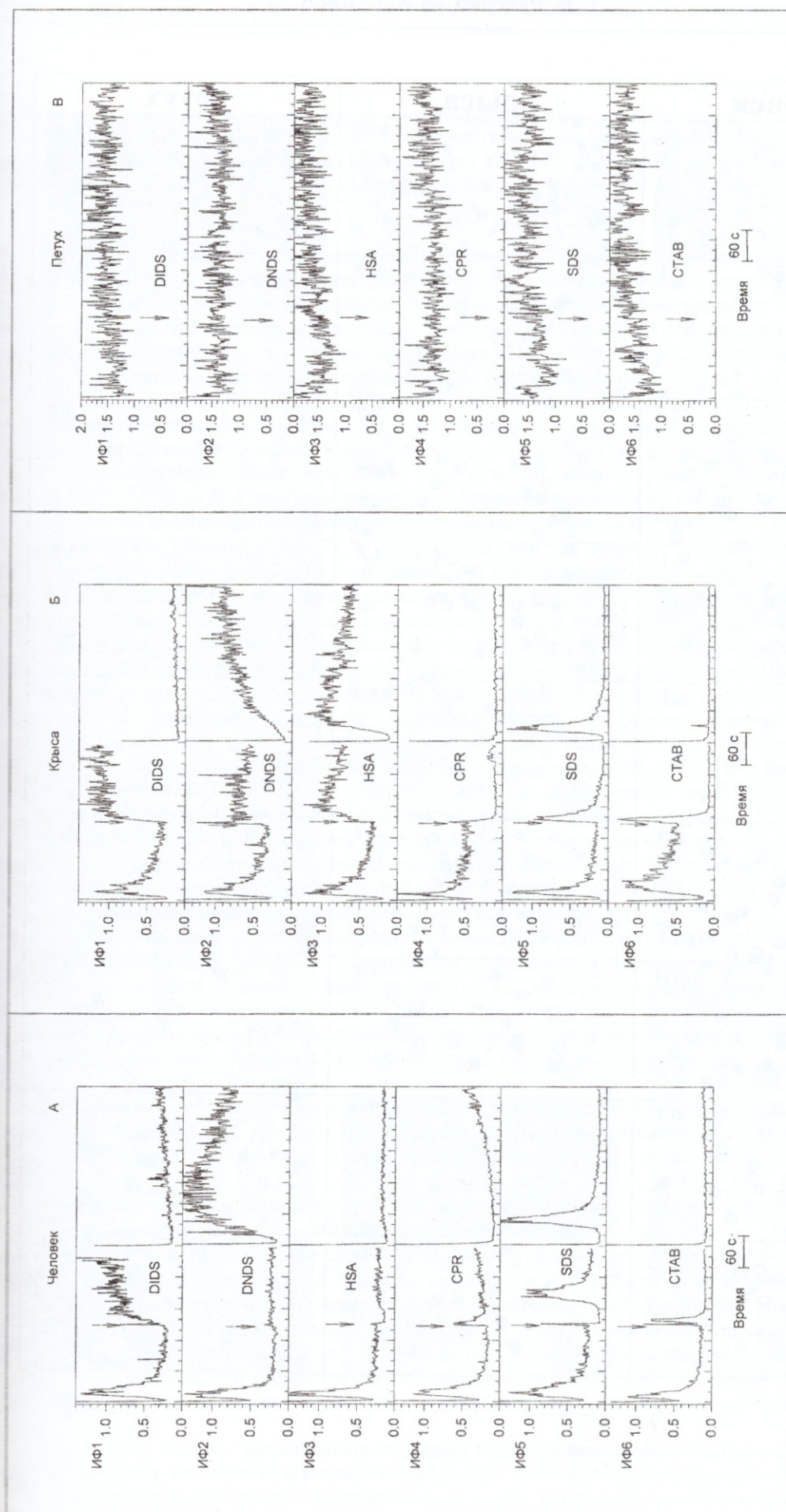


Рис. 1. Влияние ингибиторов анионного транспорта, альбумина, CPR, SDS и STAB на динамику изменения ИФ суспензии эритроцитов человека, крысы и петуха после их введения в изотоническую среду сахарозы (0,3 M) и последующего добавления к ней модифицирующего через 150 с (левые треки), и после введения эритроцитов в сахарозную среду, которая содержит то же количество модификаторов (правые треки). Стрелки отмечают моменты введения в среду реагентов в следующих конечных концентрациях в мкМ: DIDS, человек и петух – 20, крыса – 10; DNDS, человек – 2, крыса – 16, петух – 20; CPR, человек – 80, крыса – 20, петух – 80; SDS, человек – 60, крыса – 10, петух – 100; STAB, человек, крыса, петух – 0,2. Концентрация HSA равна 125 мкг/мл для человека и крысы и 250 мкг/мл для петуха.

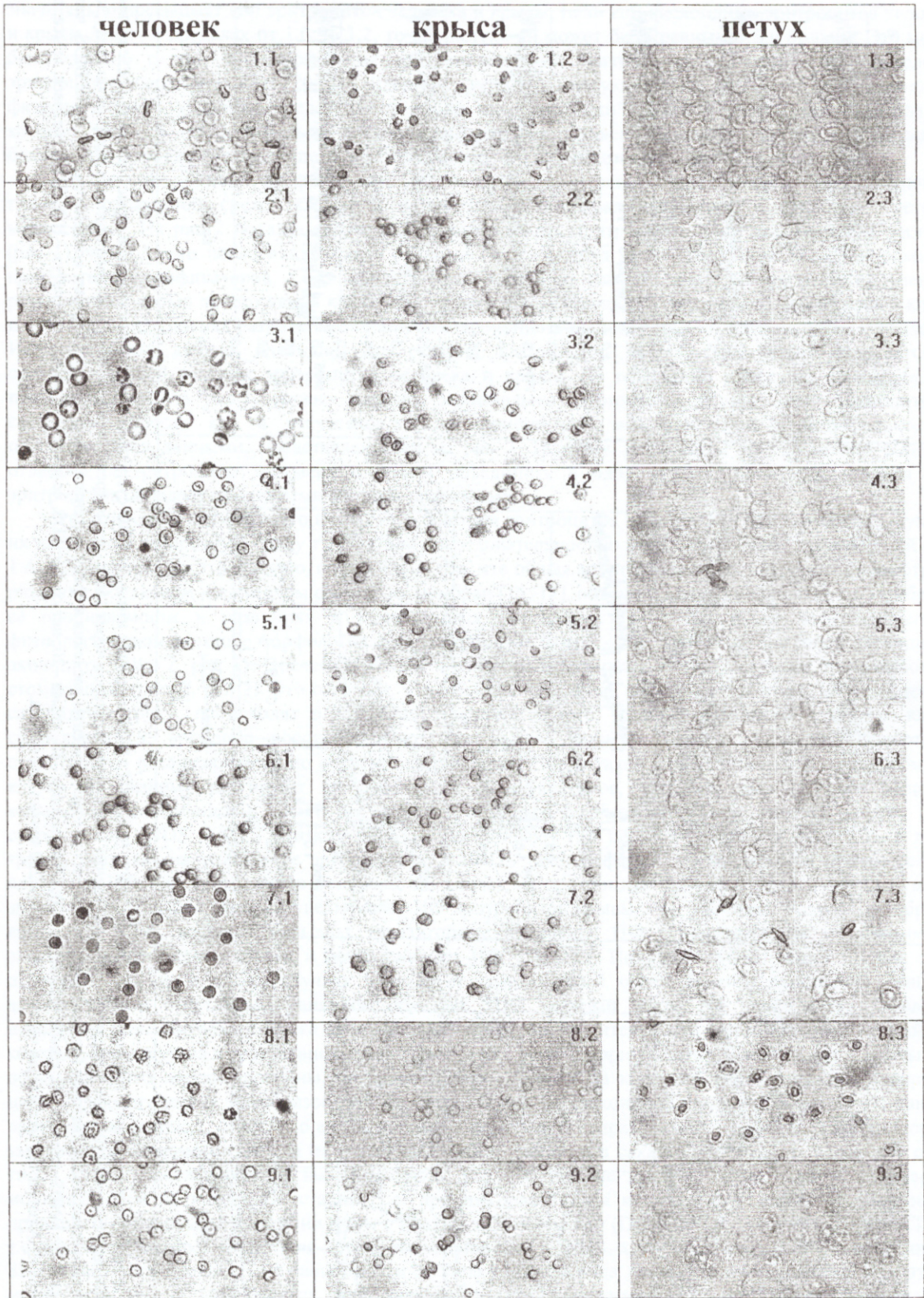


Рис. 2. Морфология эритроцитов человека, крысы и петуха в физиологическом растворе (ряд 1), в растворе 0,3М сахарозы без модификаторов (ряд 2) и через 5 мин после помещения их в сахарозные среды, содержащие модификаторы, в концентрациях, приведенных в подписи к рис. 1. Ряд 3 – DIDS, ряд 4 – SITS, ряд 5 – DNDS, ряд 6 – HSA, ряд 7 – CPR, ряд 8 – SDS, ряд 9 – CTAB. Концентрация SITS - 20 мкМ. Увеличение –450.

которые, по-видимому, имеют видоспецифическую природу. Так, в отличие от всех остальных модификаторов, SDS не только сохраняет характерный пик морфологических изменений для обоих типов клеток, но и делает его более выраженным по форме. Видоспецифическая природа этих изменений заключается в том, что при внешней схожести динамики преобразований, регистрируемых по изменению ИФ, класс конечных форм в случае эритроцитов человека и крысы принципиально отличается. Если для человека это эхиноциты, то для крысы – стоматоциты и сферостоматоциты (рис.2, 8.1 и 8.2). Такое же различие в классах форм наблюдается и в случаях DIDS и альбумина (рис. 2, 3.1, 3.2, 6.1, 6.2). К закономерностям поведения эритроцитов крыс в исследованной нами неэлектролитной среде сахарозы, по-видимому, можно отнести то, что во всех случаях они, в отличие от эритроцитов человека, сохраняли конечную стоматоцитарную форму, а в случае CPR и CTAB, такие условия приводили даже к их агрегации (рис. 2, 7.2, 9.2). Для эритроцитов человека эта закономерность не наблюдалась, поскольку в ряде случаев в среде, содержащей модификаторы, формировались эхиноциты (рис. 2, 3.1, 6.1, 8.1).

Морфологические данные (рис. 2) и зависимости ИФ от времени для эритроцитов петуха согласуются между собой и показывают, что форма этих клеток весьма слабо меняется при изменении электролитного состава среды и действии модификаторов. Создается впечатление, что наибольшие изменения происходили в среде сахарозы без модификаторов, где наблюдался специфический для этих клеток стоматоцитоз. Специфичность его состояла в том, эритроциты формировали чашеподобные структуры, в которых периферическое кольцо микротрубочек находилось в горловине чаши, и, при этом, сохраняло свою исходную овальную форму. В среде с модификаторами такие стоматоциты не образовывались, а эритроциты сохраняли плоскую эллиптическую форму. Таким образом, все модификаторы, независимо от их природы, препятствовали стоматоцитозу эритроцитов петуха в сахарозной среде. Несмотря на это некоторые различия в морфологии этих клеток в отдельных случаях можно было обнаружить (рис. 2, 8.3), но они касались, в основном, характера связи ядра с периферическим кольцом микротрубочек и структуры цитоплазмы, а не формы клетки в целом. Полученные нами данные подтверждают данные других авторов, полученные на иных ядерных эритроцитах, что такие клетки, благодаря своей сложной цитоскелетной структуре и, в основном, присутствию периферического кольца микротрубочек очень эластичны и способны восстанавливать и поддерживать свою форму даже в весьма экстремальных условиях [20; 21].

До последнего времени механизм, контролирующим форму эритроцитов, в неэлектролитных средах предавалось меньшее значение по сравнению с таковыми в физиологической электролитной среде. Замещение хлоридов на сахарозу часто используют как экспериментальный прием для изменения величины и знака мембранного потенциала [1; 2; 23]. При этом была установлена корреляция между знаком мембранного потенциала и формой клеток - положительный знак (деполяризация) соответствует стоматоцитозу, а отрицательный соответствует эхиноцитозу [3]. Механизм, лежащий в основе этой закономерности, остается неизвестным, а сама закономерность оспаривается некоторыми авторами, которые рассматривают в качестве основного параметра, управляющего формой, не трансмембранный потенциал, а внутриклеточный pH [23]. Наши данные подтверждают мнение о том, что в условиях сильной деполяризации эритроциты, в том числе и эритроциты петуха, приобретают форму стоматоцитов.

Для объяснения эффектов модификаторов можно воспользоваться достаточно распространенной и хорошо подтвержденной экспериментально моделью бислошной пары и ее последующими усовершенствованиями [10; 11; 24]. Согласно этим моделям форма эритроцита, в конечном счете, определяется разницей в поверхностной площади внешнего и внутреннего монослоев мембраны ΔA . Если больше площадь внешнего монослоя, т.е. ΔA положительна, то формируются эвагинированные формы (эхиноциты), а если отрицательна – то образуются инвагинированные формы (стоматоциты). Исходя из этого было установлено, что агенты с различной направленностью морфологических изменений (эхиноцитарные или стоматоцитарные) компенсируют действие друг друга [25]. С другой стороны, в действии агентов одной направленности должна существовать аддитивность или синергизм [1].

В нашем случае можно рассматривать положительный трансмембранный потенциал, который вызывает стоматоцитоз, как один из агентов, а модификатор, с тем или иным типом действия как второй агент. Используя такой подход можно предположить, что если эритроциты человека и крысы не имеют существенных различий в механизмах регуляции формы, то их реакция на присутствие модификаторов,

согласно теории бислойной пары, также должна быть очень близка. Мы видели, что в ряде случаев это действительно так (SITS, DNDS, CTAB). В иных случаях наблюдаются значительные различия иногда носящие принципиальный характер, например в случае альбумина и SDS. Это различие заключается в том, что указанные агенты приводят к эхиноцитозу в случае эритроцитов человека, и к стоматоцитозу в случае эритроцитов крысы. Анализ полученных данных показывает, что поведение эритроцитов крысы в большей степени соответствует теории бислойной пары по сравнению с эритроцитами человека. При этом можно отметить, что в этом случае все использованные агенты эхиноцитарного действия не приводили к формированию эхиноцитов, хотя и вызывали увеличение степени дискоидности стоматоцитов. Это означает, что эритроциты крысы в сахарозной среде принимают форму стоматоцитов, которая является достаточно устойчивой, что позволяет предположить, что эти клетки обладают специальными механизмами, которые обеспечивают эту устойчивость. Возможно, наличие таких механизмов является основой того, что в условиях действия агентов на начальных этапах, в большинстве случаев происходит стабилизация сферостоматоцитарной формы клеток, независимо от направленности действия агента, что не очень понятно с точки зрения теории бислойной пары. Известно, что морфология эритроцитов зависит от перераспределения мембранных компонент между двумя бислоями [26] и изменение морфологии может быть использовано для анализа этого процесса [14]. Можно ожидать, что в условиях сильной деполаризации мембраны процесс трансмембранного переноса липидов (флип-флоп) также имеет место, более того он может быть весьма существенным, поскольку как сам поток, так и стационарное распределение липидов экспоненциально зависят от величины трансмембранного потенциала [27].

Другие данные [28] указывают, что некоторые эхиноцитарные и стоматоцитарные агенты могут изменять направленность своего действия на форму эритроцитов в зависимости от содержания хлоридов в среде, при этом эти эффекты не зависят от гликокаликса и объясняются вероятным влиянием мембранного потенциала на перераспределение заряженных агентов через мембрану. Так классический стоматоцитарный агент хлорпромазин при определенных условиях может вызывать эхиноцитоз эритроцитов – процесс, который зависит от времени [4], и может объясняться тем, что в условиях деполаризации положительно заряженному хлорпромазину труднее взаимодействовать с внутренним монослоем мембраны. Интересно, что похожий эффект трехфазных морфологических превращений, индуцированных хлорпромазином, наблюдается в физиологических условиях на эритроцитах, обработанных ванадатом [29], который ингибирует аминокислототранслоказу, однако эти превращения занимают значительно больший период времени (порядка нескольких часов). В нашем случае хлорпромазин быстро стимулировал стоматоцитоз, вызванный деполаризацией, и стабилизировал его у эритроцитов крысы (рис. 1 Б). Т.е. напротив, вел себя в соответствии с теорией бислойной пары, в отличие от его влияния на эритроциты человека (рис. 1 А), которое является более сложным. В заключение можно отметить, что обнаруженные различия в морфологической реакции эритроцитов человека и крысы в неэлектролитной среде в присутствии модификаторов или в последующем действии модификаторов, демонстрируют ее видоспецифичность, что, в свою очередь, указывает на то, что механизмы, контролирующие трансмембранный обмен мембранных компонент, которые включают систему транспортных энзимов типа флиппаз, флоппаз и скрамблаз [30] могут существенно различаться в этих близких клетках млекопитающих. Аналогично тому, как эритроциты крысы обладают системой Na^+/H^+ обмена, в то время как у эритроцитов человека она отсутствует [22] отсутствие какой-то из вышеназванных систем или ее существенная модификация может лежать в основе наблюдаемых различий. Полученные данные можно использовать как основу для последующего более подробного изучения этих явлений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Glaser R, Fujii T, Muller P, Tamura E, Herrmann A. Erythrocyte shape dynamics: influence of electrolyte conditions and membrane potential. *Biomed.Biochim.Acta* 1987;46(2-3):S327-S333.
2. Bennekou P, Kristensen BI, Christophersen P. The human red cell voltage-regulated cation channel. The interplay with the chloride conductance, the Ca^{2+} -activated K^{+} channel and the Ca^{2+} pump. *J.Membr.Biol.* 2003;195(1):1-8.
3. Glaser R. Does the transmembrane potential ($\Delta\psi$) or the intracellular pH (pH_i) control the shape of human erythrocytes? *Biophys.J.* 1998;75(1):569-70.
4. Hartmann J, Glaser R. The influence of chlorpromazine on the potential-induced shape change of human erythrocyte. *Biosci.Rep.* 1991;11(4):213-21.
5. Sambasivarao D., Rao N.M., Sitaramam V. Anomalous permeability and stability characteristics of erythrocytes in non-electrolyte media // *Biochim.Biochim.Acta* – 1986 V.857 –N1. – P. 48 – 60.

Видовая специфичность морфологических изменений эритроцитов в сахарозных средах

6. Bernhardt I, Erdmann A, Vogel R, Glaser R. Factors involved in the increase of K⁺ efflux of erythrocytes in low chloride media. *Biomed.Biochim.Acta* 1987;46(2-3):S36-S40
7. Zeidler RB, Kim HD. Effects of low electrolyte media on salt loss and hemolysis of mammalian red blood cells. *J.Cell Physiol* 1979;100(3):551-61.
8. Kaestner L, Christophersen P, Bernhardt I, Bennekou P. The non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane: reconciliation between two conflicting reports and further characterisation. *Bioelectrochemistry*. 2000;52(2):117-25.
9. Sheetz MP, Alhanaty E. Bilayer sensor model of erythrocyte shape control. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1983;416:58-65.
10. Wong P. Mechanism of control of erythrocyte shape: a possible relationship to band 3. *J.Theor.Biol.* 1994;171(2):197-205.
11. Gimsa J. A possible molecular mechanism governing human erythrocyte shape. *Biophys.J.* 1998;75(1):568-9.
12. Blank ME, Hoefner DM, Diedrich DF. Morphology and volume alterations of human erythrocytes caused by the anion transporter inhibitors, DIDS and p-azidobenzylphlorizin. *Biochim.Biophys.Acta* 1994;1192(2):223-33.
13. Betz T, Bakowsky U, Muller MR, Lehr CM, Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry*. 2007;70:122-6.
14. Daleke DL, Huestis WH. Erythrocyte morphology reflects the transbilayer distribution of incorporated phospholipids. *J.Cell Biol.* 1989;108(4):1375-85.
15. Miseta A, Bogner P, Berenyi E, Kellermayer M, Galambos C, Wheatley DN, Cameron IL. Relationship between cellular ATP, potassium, sodium and magnesium concentrations in mammalian and avian erythrocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1993;1175(1):133-139.
16. Baskurt OK, Farley RA, Meiselman HJ. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study. *Am.J.Physiol* 1997;273(6 Pt 2):H2604-H2612
17. Matei H, Frentescu L, Benga D. Comparative studies of protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *J.Cell.Mol.Med* 2000;4(4):270-276.
18. Руденко С.В. Агрегация эритроцитов как модель агрегации тромбоцитов //Биологические мембраны. – 2006. - Т.23, № 1. - С. 61-68.
19. Eriksson LE. On the shape of human red blood cells interacting with flat artificial surfaces--the 'glass effect'. *Biochim.Biophys.Acta* 1990;1036(3):193-201.
20. Joseph-Silverstein J, Cohen WD. The cytoskeleton system of nucleated erythrocytes. III. Marginal band function in mature cells. *J.Cell Biol.* 1984;98(6):2118-2125.
21. Kim S, Magendantz M, Katz W, Solomon F. Development of a differentiated microtubule structure: Formation of the chicken erythrocyte marginal band in Vivo. *J.Cell Biol.* 1987;104(1):51-59.
22. Orlov SN, Pokudin NI, Riazshkii GG. [Kinetic characteristics of ²²Na transport in human and rat erythrocytes during cytoplasm acidification and cell compression]. *Biokhimiia*. 1988;53(4):637-42.
23. Gedde MM, Huestis WH. Membrane potential and human erythrocyte shape. *Biophys.J.* 1997;72(3):1220-33.
24. Tachev KD, Danov KD, Kralchevsky PA. On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model. *Colloids.Surf.B.Biointerfaces*. 2004;34(2):123-40.
25. Deuticke B. Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment. *Biochim.Biophys.Acta* 1968;163 :494-500
26. Schrier SL, Zachowski A, Devaux PF. Mechanisms of amphipath-induced stomatocytosis in human erythrocytes. *Blood* 1992;79(3):782-6.
27. Haest CW, Oslender A, Kamp D. Nonmediated flip-flop of anionic phospholipids and long-chain amphiphiles in the erythrocyte membrane depends on membrane potential. *Biochemistry* 1997;36(36):10885-91.
28. Nwafor A, Coakley WT. Drug-induced shape change in erythrocytes correlates with membrane potential change and is independent of glycocalyx charge. *Biochem.Pharmacol.* 1985;34(18):3329-36.
29. Chen JY, Huestis WH. Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1997;1323(2):299-309.
30. Devaux PF, Lopez-Montero I, Bryde S. Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells. *Chem.Phys.Lipids* 2006;141(1-2):119-32.