

УДК 57.043

ОЦІНКА КОЕФІЦІЄНТА ТЕПЛООВОГО РОЗШИРЕННЯ ПЛОЩІ ПОВЕРХНІ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЗА ЗСУВОМ КРИВОЇ РОЗПОДІЛУ ЕРИТРОЦИТІВ ЗА ІНДЕКСОМ СФЕРИЧНОСТІ

О.І.Гордієнко*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 61015, м.Харків, вул.Переяславська, 23**E-mail: gordienko@gala.net*

Надійшла до редакції 27 червня 2003 р

В роботі запропоновано новий спосіб оцінки коефіцієнту теплового розширення площі поверхні мембран еритроцитів, що ґрунтується на визначенні розподілу еритроцитів по індексу сферичності за різних температур. Методом малокутового розсіювання отримуються криві осмотичної крихкості еритроцитів, які шляхом перетворення координат та диференціювання обертаються на криві розподілу клітин по індексу сферичності на підставі розробленої фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу в розчинах непроникаючої речовини. Коефіцієнт теплового розширення мембран еритроцитів визначається за зсувом максимуму розподілу при зміні температури. Отримане значення коефіцієнту теплового розширення задовільно узгоджується з відомим в літературі, що було визначено мікропіпетковим методом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: еритроцити, індекс сферичності, плазматичні мембрани, коефіцієнт теплового розширення

Температура є важливим чинником, що впливає на осмотичну крихкість еритроцитів, змінюючи їх резистентність до гемолізу. Еритроцити є стабільнішими при більш високій температурі аж до 49-50°C [1,2]. Запропоновано багато пояснень цього явища. За першим з них ізотонічний об'єм клітини є температурозалежним, збільшення температури викликає зменшення об'єму при постійній площі поверхні [3]. Це приводить до збільшення поверхнево-об'ємного відношення при зміні температури, отже, зменшує осмотичну крихкість. Експериментальні дослідження не підтвердили такого ефекту: вимірювання мікрогематокриту [4], мікропіпеткові вимірювання [5] не виявили зміни ізотонічного об'єму з температурою. За другим поясненням при збільшенні температури збільшується виключно площа поверхні клітин (і, отже, поверхнево-об'ємне відношення) [4,5]. Внаслідок цього за високих температур необхідна більш значна зміна об'єму, тобто більше зменшення осмотичності позаклітинного середовища для того, щоб викликати набрякання клітин до сферичного об'єму. В ранніх роботах не було виявлено залежності гемолітичного об'єму від температури. Але в роботах [5,6] було показано існування температурної залежності площі поверхні еритроцитів на підставі прямих вимірювань з використанням мікропіпеткового методу. Автори зробили висновок, що площа поверхні еритроцита збільшується з температурним коефіцієнтом $1.2 \cdot 10^{-3} / ^\circ\text{C}$, тобто на 4,8% від 0 до 40 °C. Третє пояснення базується на припущенні температурної залежності витоку калію (що супроводжується витоком води з клітин), яке має місце при досягненні клітинами критичного об'єму [7]. Це могло б пояснити зниження осмотичної крихкості при підвищенні температури, але така температурна залежність експериментально не була доведена [1]. Четверте пояснення так само пов'язано з властивостями мембрани і зв'язує зменшення осмотичної крихкості зі збільшенням механічного опору мембран еритроцитів, (тобто збільшенням модуля ізотропного розтягу) при збільшенні температури, внаслідок чого клітина гемолізує при більшому об'ємі. Автори робіт [3,8] також пов'язують ефект температури на осмотичну крихкість з безпосередньою дією температури на критичний об'єм сфероцита. Але експериментально це не було підтверджено достовірними вимірюваннями гемолітичного об'єму. До того ж, навіть невеликий ізотропний розтяг мембрани еритроцитів приводить до його гемолізу при спливанні достатньо великого проміжку часу [9]. Це пов'язано з флуктуаційним утворенням пори в ізотропно розтягнутій мембрані. Тому величина модуля ізотропного натягу не впливає на кінцеву кількість клітин, що зазнають гемолізу, а залежить тільки від індексу сферичності. П'яте пояснення пов'язує зміну осмотичної крихкості еритроцитів з температурою із змінами в цитоплазмі, наприклад, внаслідок зміни осмотичної активності гемоглобіну. Але припущення, що осмотична відповідь клітини є температурозалежною, не було підтверджено експериментально [3]. Було показано, що нахил залежності об'єму еритроцитів від осмотичності середовища є однаковим як при 0 °C, так і при 40°C. Автори роботи [1] також показали, що еритроцити, які містили різну кількість гемоглобіну, мають однакову залежність осмотичної крихкості від температури і зробили висновок, що температура скоріше впливає на мембрану клітин, ніж на цитоплазматичні компоненти.

Враховуючи все вищевикладене, можна зробити висновок, що, оскільки внутрішньоклітинний розчин є практично нестисливим, збільшення осмотичної резистентності при підвищенні температури

пов'язано зі змінами в мембрані, а саме, зі збільшення індексу сферичності внаслідок збільшення площі поверхні мембрани.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проведені на еритроцитах крові дорослих здорових донорів, яку отримували на Харківській обласній станції переливання крові.

Для вимірювання інтенсивності розсіяного суспензією еритроцитів світла під кутом 9° до напрямку падаючого пучка ми використовували прилад, розроблений та виготовлений за нашою участю науково-виробничою фірмою "Кріокон" [10]. Для визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності у вимірювальну кювету приладу, що містить 3 мл розчину хлориду натрію з концентрацією в діапазоні від 0,15 до 0,05 Моль/л, додавали відповідну кількість (однакову в кожній серії) еритроцитів. За даними малокутового розсіювання та калібрувальною кривою визначали відсоток збережених клітин в гіпотонічних розчинах непроникаючої речовини (NaCl) і отримували криві осмотичної крихкості. На відміну від звичайного, загальноприйнятого, методу визначення осмотичної крихкості, застосування методу малокутового розсіювання дозволило уникнути помилок, що пов'язані з додатковими механічними впливами на клітини при центрифугуванні, і прискорити процедуру вимірювання. Криві щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності визначали з експериментальних кривих осмотичної крихкості на підставі розробленої нами фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу в розчині непроникаючої речовини [11,12].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Методом малокутового розсіювання отримано кінетичні криві гемолізу еритроцитів крові трьох донорів в діапазоні концентрацій хлористого натрію від ізотонічного до таких, що викликали гемоліз всіх еритроцитів в популяції, при трьох температурах -3°C , 20°C та 37°C . Характерні кінетичні криві гемолізу подані на рис. 1 (a,b,c). З представлених кривих видно, що швидкість гемолізу значно зменшується при зниженні температури. Залежність експериментальних кривих гемолізу від температури узгоджуються з висунутими нами теоретичними уявленнями про процес гемолізу внаслідок флуктуаційного утворення пори [13]. Оскільки проникність мембран еритроцитів для води навіть при 0°C є дуже великою (характерний час її проникнення становить десятки мілісекунд [14]), неможливо б було пояснити залежність швидкості гемолізу від температури зміною швидкості проникання води в еритроцити.

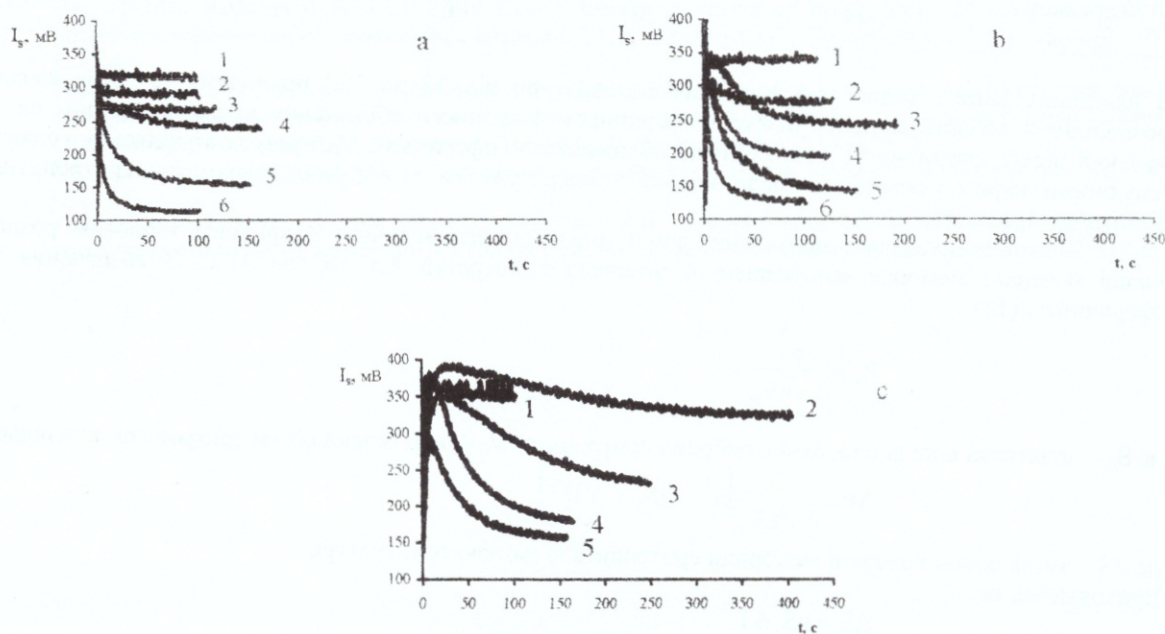


Рис. 1. Кінетичні криві гемолізу еритроцитів донорської крові в розчинах хлориду натрію (1 - 0,9%; 2 - 0,7%; 3 - 0,6%; 4 - 0,55%; 5 - 0,5%; 6 - 0,4%) при температурах 37°C (a), 20°C (b) і 3°C (c)

Отримані з експериментальних даних усереднені криві щільності (ρ) розподілу еритроцитів за індексом сферичності за температур 37°C, 20°C і 3°C подані на рис.2. Розташування та зсув центру головного максимуму індивідуальних та усередненого розподілів подано в таблиці 1.

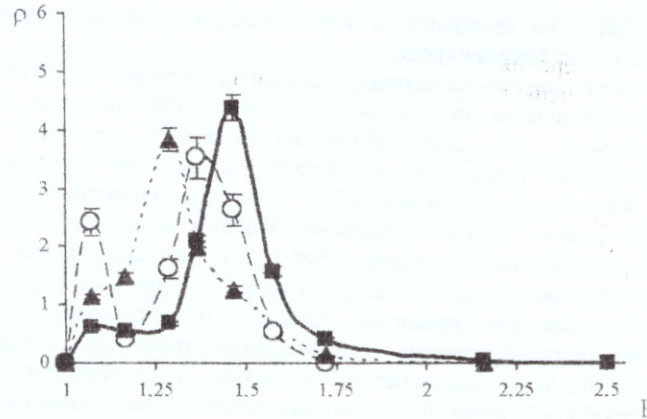


Рис. 2. Розподіл еритроцитів донорської крові за індексом сферичності при температурах 37°C (■), 20°C (○) і 3°C (▲) (усереднені криві)

Табл. 1. Вплив температури на розташування (P_{\max}) та зсув (ΔP) головного максимуму щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності

Донор	P_{\max}			ΔP	
	37°C	20°C	3°C	37→20°C	37→3°C
34	1,48	1,38	1,25	-0,1	-0,23
35	1,52	1,37	1,3	-0,15	-0,22
36	1,45	1,35	1,3	-0,1	-0,15
Усереднена крива	1,48	1,38	1,3	-0,1	-0,18

З наведених даних, видно, що зниження температури від 37 до 3°C приводить до зсуву максимумів розподілів в область менших індексів сферичності і значного збільшення кількості клітин, що мають низький індекс сферичності, тобто більш наближених до сферичних. Цей результат цілком узгоджується з існуючими наразі уявленнями щодо впливу температури на геометричні параметри еритроцитів та їх осмотичну крихкість.

З отриманих експериментальних даних можна оцінити величину коефіцієнту теплового розширення площі поверхні мембрани еритроцитів в інтервалі температур від 3°C до 37°C. З визначення індексу сферичності (12)

$$P_0 = \frac{S_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi}V_0},$$

де S_0 – початкова площа поверхні мембрани еритроцита, V_0 – початковий об'єм еритроцита, впливає

$$\Delta P = \frac{1}{6\sqrt{\pi}V_0} \left[S_0^{3/2} - (S_0 + \Delta S)^{3/2} \right],$$

де ΔS – зміна площі поверхні мембрани еритроцита зі зміною температури. Враховуючи, що

$$\Delta S = kS_0\Delta T,$$

де k – коефіцієнт теплового розширення площі поверхні мембрани еритроцита, ΔT – зміна температури, отримуємо

$$k = \frac{1}{\Delta T} \left[\left(1 - \frac{\Delta P}{P_{\max}} \right)^{2/3} - 1 \right]$$

Підставляючи у отримане співвідношення експериментальні дані для усередненої кривої, тобто $P_{\max}=1.48$, $\Delta P=0,18$ для інтервалу температур від 3 до 37°C (тобто для $\Delta T=34$), отримуємо значення коефіцієнту теплового розширення площі поверхні мембрани еритроцита $k=2,4 \cdot 10^{-3} / ^\circ\text{C}$. Ця величина є в два рази більшою від вимірної мікропіпетковим методом [5]. Ми вважаємо, що отримане узгодження з даними роботи [5] є цілком задовільним. На величину коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембрани можуть впливати як чинники, пов'язані з індивідуальними властивостями еритроцитів різних донорів (наприклад, ліпідний склад мембрани), так і розкид параметрів в популяції. Важливу роль можуть відігравати і зовнішні чинники, наприклад, умови зберігання еритроцитів до експерименту, або умови, в яких еритроцити знаходяться під час експерименту. Враховуючи це, можна стверджувати, що запропонований метод визначення коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембран еритроцитів може бути використаний для дослідження дії внутрішніх та зовнішніх чинників на мембрани еритроцитів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Aloni B., Eitan A., Livne A. The erythrocyte membrane site for effect of temperature on osmotic fragility//*Biochem.Biophys.Acta.*-1977.-465.-P.46-53.
- Livne A., Raz A. Erythrocyte fragility and potassium efflux as affected by temperature and hemolysing rate//*FEBS Letter.*-1971.-16.-P.99-101.
- Richiery G.V., Mel H.C. Temperature effects on osmotic fragility and erythrocyte membrane//*Biochem.Biophys.Acta.*-1985.-813.-P.41-50.
- Murphy J.R. Erythrocyte osmotic fragility and cell water-influence of pH and temperature//*J.Lab.Clin.Med.*-1969.-74.-P.319-324.
- Waugh R., Evans E.A. Temperature dependence of the elastic moduli of red blood cell membrane// *Biophys .J.*-1979.-26.-P.115-132.
- Ивенец И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран: Пер. с англ.-М:Мир,1982.-304 с.
- Seeman P. et al. The effect of membrane-strain rate and temperature on erythrocytes fragility and critical hemolytic volume//*Biochem.Biophys. Acta.*-1969.-183.-P.476-489.
- Nishihara Y., Utsumi K. Diminished osmotic fragility and shape alterations of human erythrocytes following the treatment with 1,1,1-trichloro-2,2-bis ethane (DDT)//*Cell.Mol.iol.*-1983.-29.-P.103-111.
- Rand R.P., Burton A.C. Area and volume changes in hemolysis of single erythrocytes//*J.Cell.Comp.Physiol.*-1963.-61.-P.245-253.
- Гордієнко О.І. Коваленко І.Ф., Паніна Ю.Є. Фізико-математична модель та експериментальне визначення явища гіпотонічного гемолізу//*Доповіді НАНУ.*-1998.-11.-с.173-176.
- Пат. 47910А (Україна) МПК⁷ G01N33/49. Спосіб визначення щільності ймовірності розподілу еритроцитів за індексом сферичності//Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Гордієнко Ю.Є., Коваленко І.Ф., Алексеева Л.І.//2002.-Бюл.№7.
- Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф., Паніна Ю.Є., Алексеев О.О. Фізико-математичний аналіз та експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові людини за індексом сферичності//*Вісник Харк.ун-ту.*-2000.-488.-Біофіз.вісник, вип.1(6).-с.75-78.
- Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И. О механизме осмотического лизиса эритроцитов //Криобиология.-1986.-2.-С.23-25.
- Гордиенко О.И., Емец Б.Г., Жидякова Т.А., Шейкин В.И. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой//*Биол. мембраны.*-1985.-2. N3.-С.310-314.