

УДК 57.043

ФИЗИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА

Сынчикова О.П., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А., *Стрелкова Т.А.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, 61015, г. Харьков, ул. Переяславская, 23, *Харьковский национальный университет радиозлектроники, г. Харьков, пр. Ленина, 14.*

Поступила в редакцию 25 апреля 2002 г.

Предложен физический механизм гипертонического гемолиза, который заключается в том, что при сильном обезвоживании эритроцитов их мембраны подвергается значительному изотропному растяжению за счет всасывания в плотно упакованную матрицу молекул внутриклеточного гемоглобина. Экспериментальные данные о ходе этого процесса, полученные методом световой микроскопии, подтверждают выдвинутые представления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипертонический гемолиз, физический механизм, обезвоживание, изотропное растяжение

Одним из факторов повреждения эритроцитов при их низкотемпературном хранении является резкое изменение осмотических условий среды. Перенесение эритроцитов в высококонцентрированные солевые растворы при положительных температурах позволяет в модельных условиях исследовать механизм гипертонического повреждения клеток при замораживании. Несмотря на то, что гипертонический стресс является одной из основных причин криоповреждения эритроцитов [1], данных для детального описания этого процесса и выяснения его механизма пока мало.

Помещение эритроцитов в гипертонический раствор не проникающего в клетки вещества приводит к их обезвоживанию, в результате которого суммарные концентрации внутриклеточного (n^{in}) и внеклеточного (n^{out}) растворов становятся одинаковыми:

$$n^{in} = n^{out}$$

Если суммарный объем эритроцитов пренебрежимо мал по сравнению с объемом гипертонического раствора, в который они погружаются, можно считать внеклеточную концентрацию n^{out} неизменной и равной ее начальному значению $n^{out}(0)$. Поэтому

$$n^{in} = n^{out}(0).$$

Если N^{in} – количество молей растворенных внутри клетки веществ, V_c – объем обезвоженной клетки и V_n – объемная фракция осмотически неактивных внутриклеточных веществ, то, очевидно,

$$n^{in} = \frac{N^{in}}{V_c - V_n} = n^{out}(0)$$

Объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ в эритроците равна $\alpha = V_n/V_c$ и практически совпадает с объемной долей внутриклеточного гемоглобина. Для эритроцита человека в норме $\alpha(0) = V_n/V_c(0) = 0,35$ при $pH = 6,8$ [1], где $V_c(0)$ – объем дискоцита. Очевидно,

$$V_c = \left(\alpha(0) + \frac{1 - \alpha(0)}{n^{out}(0)/n^{in}(0)} \right) V_c(0),$$

где $n^{in}(0)$ – концентрация электролитов в нормальном эритроците.

После обезвоживания объемная доля внутриклеточного гемоглобина становится равной

$$\alpha = \frac{V_n}{V_c} = \frac{\alpha(0)}{\alpha(0) + \frac{1 - \alpha(0)}{n^{out}(0)/n^{in}(0)}} \quad (1)$$

Если приближенно рассматривать молекулу гемоглобина как сферу, которая имеет эффективный радиус 2,7 нм, то уже при значении $\alpha = 0,74$ гемоглобин в эритроците достигает плотнейшей упаковки [2]. В соответствии с формулой (1) плотнейшая упаковка соответствует концентрациям внеклеточного раствора n_c^{out} , примерно в 5,3 раза или более превосходящей концентрацию физиологического раствора, то есть концентрациям внеклеточного раствора выше 0,8 М. После достижения плотнейшей упаковки раствор внутриклеточного гемоглобина ведет себя как упругое тело: он сопротивляется изменению формы, так как сдвигу молекул гемоглобина друг относительно друга мешают силы сцепления между плотно упакованными молекулами. При более высоких, чем $n_p^{out}(0)$ 0,8 М концентрациях внеклеточного раствора мембрана обезвоженной клетки испытывает изотропное натяжение σ , всасываясь осмотическими силами в небольшие полости между молекулами гемоглобина, которые занимают примерно 26 % от всего объема обезвоженной клетки. Другими типами деформации мембраны по

сравнению с изотропным растяжением можно пренебречь [3]. При этом на мембране эритроцита создается перепад гидростатического давления, который связан с изотропным натяжением мембраны известным соотношением

$$\Delta p = 2\sigma H \quad (2)$$

где H – локальное значение средней кривизны изотропно растянутой мембраны. Разумно предположить, что H^{-1} по порядку величины равно известному эффективному радиусу молекулы гемоглобина, т.е. $H^{-1} \approx 2,7 \text{ нм}$. Перепад гидростатического давления на мембране уравновешивается соответствующим трансмембранным перепадом осмотического давления

$$\Delta p = RT[n_p^{\text{out}} - n_c^{\text{out}}] = 2\sigma H \quad (3)$$

Изотропное натяжение мембраны, в соответствии с законом Гука, равно

$$\sigma = \Gamma \frac{\Delta S}{\tilde{S}} \quad (4)$$

где Γ – модуль изотропного растяжения мембраны и $\Delta S/\tilde{S}$ – относительное изменение площади поверхности изотропно растянутой мембраны. Для эритроцита человека $\Gamma \sim 0,45 \text{ Н/м}$ [4], а предельное значение величины $\Delta S/\tilde{S}$, при котором происходит мгновенный разрыв мембраны, составляет около 0,04 [5]. Механизм такого разрушения описан в работах [6,7]. Используя эти факты, с помощью равенств (2)–(4) можно оценить концентрацию внеклеточного раствора n_p^{out} , при которой в мембране образуется макроскопический разрыв:

$$\frac{n_p^{\text{out}}}{n^{\text{in } 0}} = \frac{n_c^{\text{out}}}{n^{\text{in}}} + \frac{2\Gamma \left(\frac{S - \tilde{S}}{\tilde{S}} \right)}{RTn^{\text{in } (0)}}$$

С учетом того, что осмотическое давление физиологического раствора $RTn^{\text{in } (0)}$ составляет примерно $8 \times 10^5 \text{ Н/м}^2$, находим

$$\frac{n_p^{\text{out}}}{n^{\text{in } (0)}} \approx 22$$

то есть n_p^{out} примерно в 22 раза превышает концентрацию физиологического раствора:

$$n_p^{\text{out}} = 26 \times n^{\text{in } (0)} \approx 3,3 \text{ М} \quad (5)$$

По данным работы [8] эритроциты ведут себя как идеальные осмометры, уменьшая объем пропорционально концентрации внеклеточного раствора до концентрации, примерно равной 3,5 М. Этот факт, очевидно, согласуется с выдвигаемыми нами представлениями и оценкой (5).

Итак, в соответствии с нашей оценкой, в 4 М растворе хлорида натрия возможно практически мгновенное разрушение эритроцитов по описанному выше механизму. При этом разрыв мембраны происходит в обезвоженной клетке.

Наряду с указанным, имеется и другой, более медленный механизм разрушения эритроцитов в растворе с повышенным содержанием солей – коллоидно-осмотический гемолиз. Можно предположить, что высокие концентрации солей приводят к потере мембраной свойства избирательной проницаемости для ионов электролитов. В результате этого ионы натрия, которые в норме можно считать непроницаемыми, поступают внутрь эритроцитов, так что перепад их концентраций на мембране со временем исчезает. Нескомпенсированное осмотическое давление внутриклеточных белков приводит к постепенному оводнению и набуханию клеток. В конце концов, в набухом сфероците возникает макроскопическая пора, через которую гемоглобин покидает клетку. Детальная теория этого процесса описана в статьях [6,7]. В отличие от быстрого механизма гипертонического гемолиза этот механизм предполагает, что до начала гемолиза первоначально обезвоженный эритроцит превращается в набухший сфероцит, а не гемолизует непосредственно из обезвоженного состояния.

Применение компьютерной записи видеопотока с частотой захвата до 30 кадров в секунду делает возможными запись и последующий анализ быстрых морфологических изменений клеток в условиях высокой тоничности раствора.

Эритроциты помещали в 4,0 М раствор NaCl при комнатной температуре. После перемешивания суспензии пробу в виде капли помещали на предметное стекло микроскопа. Морфологические исследования начинались через 12-15 секунд после внесения клеток в гипертоническую среду. Для решения задачи анализа морфологических изменений клеток в процессе гемолиза была выбрана оптико-электронная система, описанная в [9]. Для регистрации процесса гемолиза видеопоток с передающей телевизионной камеры на основе ПЗС подавался на вход платы видеозахвата компьютера. Частота кадров записи потока составляла 25 кадров/сек (дискретность 40 мсек). Выбранные параметры увеличения телевизионного микроскопа позволяли фиксировать межкадровую трансформацию в

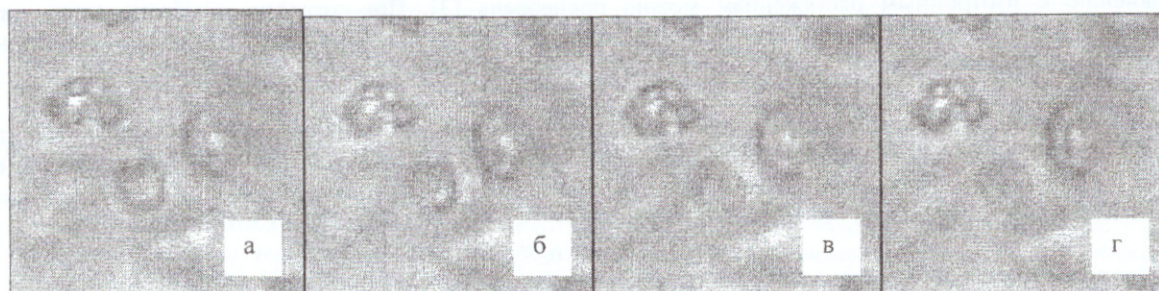


Рис.1 Развитие гипертонического гемолиза: а – 5,36 сек., б – 5,40 сек., в – 5,48 сек., г – 5,64 сек. после перенесения эритроцитов в 4,0 М раствор NaCl.

пределах характерных изменений размеров объектов. Оригинальное программное обеспечение позволяло формировать запись изображения с задаваемыми параметрами (длительность видеофрагмента, частота кадров в нем, яркость и контрастность изображения), просматривать видеозапись в реальном и задаваемом масштабах времени.

Наблюдение за поведением эритроцитов в гипертоническом солевом растворе проводили в течение 5 минут. В начале регистрации все эритроциты были значительно обезвожены и представляли собой уплощенные кренированные клетки и сфероциты, сморщенные по всей поверхности. Лизис эритроцитов происходил с различной скоростью, и анализ наблюдаемых изменений позволяет говорить о том, что гемолиз в высококонцентрированном солевом растворе происходил двумя различными способами.

В первом случае (рис. 1) клетка, представляющая собой обезвоженный сфероцит, за короткий промежуток времени (0,04 секунды) претерпевала ряд изменений, приводящих к утрате целостности мембраны и выходу гемоглобина. В последующем наблюдалось снижение контрастности изображения клетки и формирование тени. Следует отметить, что изменение площади видимой поверхности клетки не предшествовало, а также не сопровождало процесс гемолиза. Лизис и образование тени завершались за 0,44 секунды. Проведенные наблюдения за обезвоженными сфероцитами свидетельствуют о том, что время лизиса клеток по представленному механизму не превышает 1 секунды, т.е. процесс лизиса быстротекущий.

В случае же уплощенного кренированного эритроцита (рис. 2) имело место сглаживание его мембраны с постепенным увеличением площади изображения и трансформацией клетки в сферу с последующей потерей контрастности изображения. Это позволяет предположить, что гемолизу эритроцитов в гипертонической среде может предшествовать переход в сферу и гемолиз происходит по коллоидно-осмотическому механизму. Наблюдение за клетками, имеющими форму уплощенного диска показало, что процесс лизиса завершается в течение 4-5 секунд.

Таким образом, повреждение эритроцитов в высококонцентрированных солевых средах, по нашему мнению, происходит по двум различным механизмам. Клетка может лизировать либо без изменения объема, теряя через крупный дефект внутриклеточное содержимое, либо мелкие дефекты со временем увеличиваются в размерах, и эритроцит лизирует по коллоидно-осмотическому механизму.

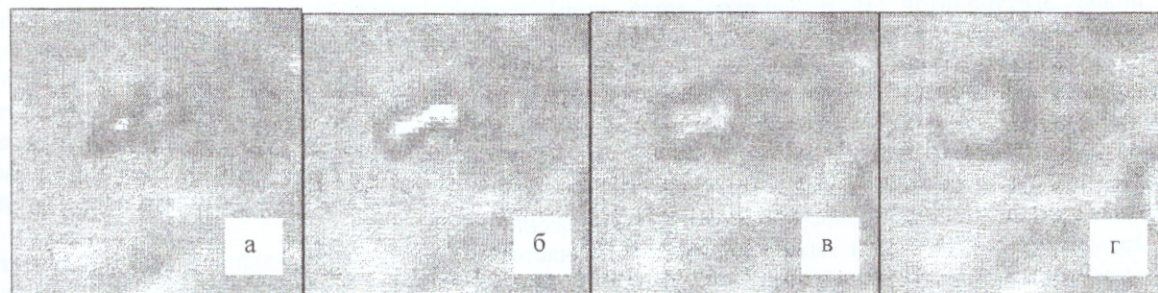


Рис.2 Развитие гипертонического гемолиза: а – 33,80 сек., б – 34,60 сек., в – 35,80 сек., г – 37,40 сек. после перенесения эритроцитов в 4,0 М раствор NaCl.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murphy I.R. // J. Zab. And Clin. Med.- 1969.- 74.- P.319-324.
2. Гильберг Д., Кон-Фоссен С. Наглядная геометрия.-М.: Наука, 1981.- 344с.
3. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М., Теория упругости.- М.: Наука, 1965.- 204 с.
4. Waugh R.E.// Biophys. J.- 1995 - 70.- P.1027-1035.
5. Rand R.P., Burton A.C.// Biophys. J.- 1964.- v.4.- P.115.
6. Гордиенко Е.А., Панина Ю.Е. // Вестник ХГУ.- № 410.- 1998.- с.79-85.
7. Гордиенко Е.А., Панина Ю.Е. // Вестник ХГУ.- № 412.- 1998.- с. 54-58.
8. Wiest S.C., Steponkus P.L., // Cryobiology.-1979.- 16.- p.101-104.
9. Стрелков А.И., Осташко Ф.И., Лыгюга А.П., Стрелкова Т.А. //Медицинская техника. Москва. – 2001 .- № 1. – С. 34-36.