

УДК 57.043

ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЯВЛЕНИЯ ГИПОТОНИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА. I. ЭТАП НАБУХАНИЯ.

Е.А.Гордиенко, Ю.Е.Панина

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
Харьков, ул. Переяславская, 23, 310015
Поступила в редакцию 19 мая 1998 г.*

В данной работе построена физико-математическая модель гипотонического гемолиза эритроцитов человека, которая количественно описывает кинетику этого явления при погружении клеток в гипертонический водный раствор проникающего в них электрически нейтрального вещества на этапе набухания до критического объема.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроцит человека, физико-математическая модель, гипотонический гемолиз, набухание.

В существующих физико-математических моделях явления гипотонического лизиса эритроцитов человека в водном растворе проникающего в клетки неэлектролита предполагается, что гемолиз наступает сразу же, когда клеточный объем достигает определенного фиксированного значения и что выброс гемоглобина из клеток наружу происходит практически мгновенно [1,2]. Уравнения трансмембранного переноса веществ, используемые для количественного описания этого процесса, не имеют аналитического решения и поэтому решаются численно [3,4]. В отличие от существующих разработанная нами модель не предполагает существования определенного фиксированного значения объема, при котором возникает гемолиз, учитывает, что гемоглобин покидает клетки за конечный промежуток времени, и сформулирована на основе приближенного аналитического решения уравнений трансмембранного переноса веществ.

МОДЕЛЬ ГИПОТОНИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА

Изменение объема клетки и внутриклеточной концентрации проникающего в клетку вещества со временем в гипертоническом водном растворе проникающего через клеточную мембрану вещества описывается системой обыкновенных дифференциальных уравнений [4]:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[\sigma (\pi - \pi') + \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} \frac{\Delta p}{\pi_0} \right] \quad (1)$$

$$\frac{d\pi}{dt} = - \frac{1}{\tau_1} \left[- (\pi - \pi') + \sigma \pi \frac{dy}{dt} \frac{1}{y - \alpha} \right]$$

где t - время, $y \equiv V/V_0$ - относительный объем клетки, V и V_0 - текущее и начальное значения объема клетки, σ - коэффициент отражения клеточной мембраны для проникающего в клетку вещества, π и π' - осмотическое давление проникающего через клеточную мембрану вещества внутри и вне клетки соответственно, α - объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ, Δp - перепад давления на мембране, π_0 - осмотическое давление не проникающих через клеточную мембрану внутриклеточных веществ в начальный момент времени, которое в норме равно 8 Па,

$$\pi = \pi / \pi_0, \quad \pi' = \pi' / \pi_0, \quad 1/\tau_0 \equiv \gamma L_p \pi_0, \quad 1/\tau_1 \equiv \gamma K,$$

γ - отношение площади поверхности клеточной мембраны к объему клетки в исходном состоянии, L_p - коэффициент фильтрации клеточной мембраны, K - коэффициент проницаемости клеточной мембраны для растворенного во внеклеточной среде вещества. При пассивном переносе молекул воды через клеточную мембрану коэффициент отражения связан с коэффициентами фильтрации и проницаемости клеточной мембраны следующим образом [5]:

$$1 - \sigma = \varepsilon n_0 \vartheta \quad (2)$$

где $\varepsilon = \tau_0/\tau_1$, $n_0 = \pi_0/RT$, R - универсальная газовая постоянная, T - абсолютная температура, ϑ - молярный объем проникающего через клеточную мембрану вещества. Из (2) следует, что коэффициент отражения становится равным единице, когда $K = 0$, то есть когда растворенное вещество не проникает через клеточную мембрану.

Если исходное значение объема клетки $V_0 \leq (S_0)^{3/2}/6\sqrt{\pi}$ то до тех пор, пока относительный объем клетки будет заключен в интервале

$$1 \leq y \leq y_s = (S_0)^{3/2}/6\sqrt{\pi} \quad (3)$$

перепадом давления на клеточной мембране Δp можно пренебречь, так как клеточная мембрана при этом не подвергается изотропному растяжению. Когда же форма клетки становится сферической и относительный объем клетки превышает значение y_s , клеточная мембрана растягивается и внутри клетки создается избыточное давление, которое равно [4]

$$\frac{\Delta p}{\pi} = C[(y/y_s)^{3/2} - 1] \quad (4)$$

где $C = 4\Gamma\sqrt{\pi}/(\sqrt{S_0}\pi_0)$, Γ - коэффициент изотермического растяжения клеточной мембраны. В среднем для эритроцита человека (в растворе Рингера) $S_0 = 136,9 \times 10^{-12} \text{ м}^2$ и $V_0 = 104,2 \times 10^{-18} \text{ м}^3$ [6], так что $y_s = 1,4458$.

Как известно [7], разрыв мембраны эритроцита возникает при небольшом относительном изменении площади поверхности его мембраны и, следовательно, при небольшом изменении его относительного объема. Поэтому, описывая изменение объема клетки в пределах $y_s < y < y_p$, где y_p - значение относительного объема клетки, при котором в ее изотропно растягиваемой мембране возникает макроскопическая пора, можно считать, что

$$(y - y_s)/y_s \ll 1 \quad \text{и} \quad \Delta p/\pi_0 = 2C(y/y_s - 1)/3\pi_0 \quad (5)$$

Если отношение суммарного объема клеток в клеточной суспензии к объему внеклеточной жидкости значительно меньше единицы, что и предполагается в дальнейшем, то можно считать величину π' неизменной, так как в процессе перераспределения веществ между клетками и окружающей их средой в этом случае практически не изменяется концентрация растворенного вещества во внеклеточном растворе.

Величины τ_0 и τ_1 имеют размерность времени и соответственно представляют собой характерное время установления химического равновесия на мембране клетки для молекул растворителя (воды) и растворенного вещества. Как правило, $\varepsilon \ll 1$ и соответственно $\sigma \sim 1$ [8].

Точное аналитическое решение системы нелинейных уравнений (1) отсутствует, поэтому она решается, как правило, численно на ЭВМ. Это затрудняет как анализ результатов соответствующих численных экспериментов, так и сопоставление численных экспериментов с эмпирическими данными. Можно, однако, получить более эффективное, удобное для анализа и более наглядное решение системы уравнений (1) с помощью асимптотических методов решения сингулярно возмущенных систем [9]. Для этого с учетом приведенных выше соотношений и определений представим систему уравнений (1) в следующем виде

$$\varepsilon \frac{dy}{dt} = \sigma(\pi - \pi') + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} \frac{2C(y-y_s)}{3y_s} \quad (6)$$

$$\frac{dz'}{dt} = -\frac{z'}{y-\alpha} + \pi' + \varepsilon \vartheta \pi_0 \frac{dy}{dt}$$

где введено безразмерное "медленное" время $t = t/\tau_1$ и новая переменная $z' =$

$=(y - \alpha) \pi$. Поскольку в качестве множителя при производной dy/dt фигурирует малый параметр ε , можно получить асимптотическое решение системы уравнений (1) на временах $\tau_0 \ll t \sim 1$ с помощью упомянутого выше метода сингулярных возмущений. Полагая в (6) $\varepsilon = 0$, после несложных преобразований получаем так называемую систему порождающих уравнений, порядок которой понижен на единицу по сравнению с исходной

$$\sigma z + 1 - \alpha = (y-\alpha) \left[\sigma \pi' + \frac{2C(y-y_s)}{3y_s} \right] \quad (7)$$

$$\frac{dz}{dt} = \frac{(1-\alpha) \pi'}{\sigma z + 1 - \alpha}$$

где $z = z'/RT$. Решение (7), то есть решение (6) в несингулярной области, при начальном условии $z(0) = 0$ есть

$$\begin{aligned}
 t - t_s = & 2(y - y_s) - \frac{2C'(y_s - \alpha) + 3\sigma n'}{4C'} \times \ln \left\{ 1 - \frac{2C'}{3(1-\alpha)} [(y-\alpha)^2 - (y_s - \alpha)(y-\alpha)] \right\} + \\
 & + \frac{[2C'(y-\alpha)^2 + 3\sigma n' (y_s - \alpha) + 12(1-\alpha)]}{4\sqrt{C'} \sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1-\alpha)}} \times \\
 & \times \ln \left\{ \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1-\alpha)} + 2\sqrt{C'}(y - y_s/2 - \alpha/2) \sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1-\alpha)} - \sqrt{C'(y_s - \alpha)}}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1-\alpha)} - 2\sqrt{C'}(y - y_s/2 - \alpha/2) \sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1-\alpha)} + \sqrt{C'(y_s - \alpha)}} \right\}
 \end{aligned} \quad (8)$$

где $C' = C/y_s$ и

$$t_s = \frac{[(\sigma n')^2 (y_s - \alpha)^2 - (1-\alpha)^2]}{2\gamma K(1-\alpha)\sigma n'}$$

Заметим, что для эритроцитов периферической крови человека при указанных выше средних значениях площади поверхности мембраны и объема клетки $\gamma = S_0/V_0 = 1,3138 \cdot 10^6 \text{ м}^{-1}$. Кроме того для этих клеток $\alpha = 0,42$.

Решение (8) описывает изменение относительного объема клетки со временем после помещения в гипертонический водный раствор проникающего в клетки вещества. В несингулярной области, то есть на временах, превышающих τ_0 , эти решения с точностью до членов порядка $O(\varepsilon)$ аппроксимируют точное решение исходной системы уравнений (1).

Когда $y > y_s$, клеточная мембрана растягивается. Как известно [3], при этом энергетически выгодным становится образование в ней макроскопической поры. Среднее время образования такой поры в изотропно растянутой мембране в стационарном случае равно [4]

$$\langle t_p \rangle = A s^{-1/2} \exp\left(-\frac{\pi \gamma_0^2}{kTs}\right) \quad (9)$$

где s - изотропное натяжение мембраны, k - постоянная Больцмана, γ_0 - коэффициент линейного натяжения границы поры. Предэкспоненциальный множитель A не зависит от натяжения мембраны s и равен 0,01. С учетом закона Гука и (5)

$$s = \frac{2}{3} \Gamma (y/y_s - 1) \quad (10)$$

Поэтому (9) можно представить в виде

$$\langle t_p \rangle = A' C' (y - y_s)^{-1/2} \exp\left(-\frac{3\pi \gamma_0^2}{kTR_s \pi_0 C' (y - y_s)}\right) \quad (11)$$

Сопоставление экспериментальных данных о времени гемолиза эритроцитов донорской крови человека в зависимости от изотропного натяжения их мембраны, полученных методом частичного втягивания одиночных эритроцитов в микропипетку с калиброванным диаметром при фиксированном перепаде давления [10], с (11) приводит к следующим значениям коэффициентов в этой формуле: $A' = 0,01$, $3\gamma_0^2/kTR_s \pi_0 = 0,08676$, что при температуре 25°C соответствует значению $g_0 = 10^{-11}$ Н (это значение совпадает с линейным натяжением границы поры в липидных бислоях).

Непосредственно использовать формулу (11) для описания гипотонического гемолиза эритроцитов нельзя, так как объем клетки и вместе с ним изотропное натяжение мембраны (при $y > y_s$) в рассматриваемом нами случае непрерывно увеличиваются со временем, а не остаются постоянными. Можно, однако, считать, что макроскопическая пора образуется в мембране, если время, в течение которого относительный объем клетки находится в интервале значений Dy , равно среднему времени образования макроскопической поры, соответствующему некоторому значению y , лежащему в этом интервале по формуле (11). В аналитическом виде это утверждение можно представить следующим образом

$$\int_{y^*}^{y_p} \frac{dy}{dt} = \frac{1}{y_p - y^*} \int_{y^*}^{y_p} \langle t_p \rangle dy \quad (12)$$

где y_s - относительный объем клетки, при котором в мембране образуется пора, y^* - относительный объем клетки, который соответствует равенству $t(y) - t_s = \langle t_p \rangle(y)$. Пусть $t(y) = \langle t_p \rangle(y) = t^*$ и t_p - момент времени, в который образуется мембранная пора. Тогда несложные вычисления приводят к следующему учитывающему (12) алгоритму определения полного времени, за которое в мембране клетки, помещенной в гипертонический водный раствор проникающего в нее вещества, возникает макроскопическая пора. Определяем относительный объем клетки y^* и соответствующий ему момент времени t^* , при которых правая сторона равенства (8), деленная на γK становится равной правой стороне равенства (11). Далее, время, за которое в мембране образуется макроскопическая пора, определяется по формуле

$$t_p = \frac{[(\sigma n')^2 (y_s - \alpha)^2 - (1 - \alpha)^2]}{2\gamma K(1 - \alpha)\sigma n'} + \frac{2(y^* - y_s)}{\gamma K} - \frac{2C'(y_s - \alpha) + 3\sigma n'}{4\gamma KC'} \times$$

$$\times \ln \left\{ 1 - \frac{2C'}{3(1 - \alpha)} [(y^* - \alpha)^2 - (y_s - \alpha)(y^* - \alpha)] \right\} + \frac{[2C'(y - \alpha)^2 + 3\sigma n'(y_s - \alpha) + 12(1 - \alpha)]}{4\gamma K \sqrt{C' \sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1 - \alpha)}}} \times$$

$$\times \ln \left\{ \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1 - \alpha)} + 2\sqrt{C'(y - y_s/2 - \alpha/2)}}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1 - \alpha)} - 2\sqrt{C'(y - y_s/2 - \alpha/2)}} \times \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1 - \alpha)} - \sqrt{C'(y_s - \alpha)}}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1 - \alpha)} + \sqrt{C'(y_s - \alpha)}} \right\} +$$

$$\langle t_p \rangle^* = \frac{1 + \frac{3\pi\gamma_0^2 [3(1-\alpha) - 2C'(y^* - y_s)(y^* - \alpha)]}{2 kTR_s \pi_0 C'(y^* - y_s)^2 (y^* - \alpha) [3\sigma n' + 2C'(2y^* - y_s - \alpha)]}{\gamma K}}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

На рис. 1-3 представлены графики функции (13) при некоторых значениях параметров, фигурирующих в построенной нами модели. Как следует из полученных соотношений, время образования макроскопической поры в мембране растет прямо пропорционально концентрации растворенного во внеклеточной среде вещества (рис.1). Обратим внимание, что, поскольку параметр π' задается самим экспериментатором, справедливость этого результата легко проверить экспериментально. Проведенные нами эксперименты по определению времени t_p методом малоуглового рассеяния света [11] подтверждают этот теоретический прогноз для области значений $\pi' < 8$. При более высоких значениях концентрации внеклеточного раствора отклонение от предсказываемой моделью зависимости, по-видимому, объясняется прямым химическим взаимодействием высококонцентрированных растворов с мембраной. Очевидно, изменение концентрации проникающего в клетки растворенного вещества сказывается, главным образом, на времени сферификации клеток t_s , тогда как продолжительность стадии, на которой мембрана эритроцитов испытывает деформацию растяжения, изменяется незначительно. Предсказываемый моделью эффект уменьшения объема эритроцита, при котором в его мембране образуется макроскопическая пора, с ростом внеклеточной концентрации является кинетическим.

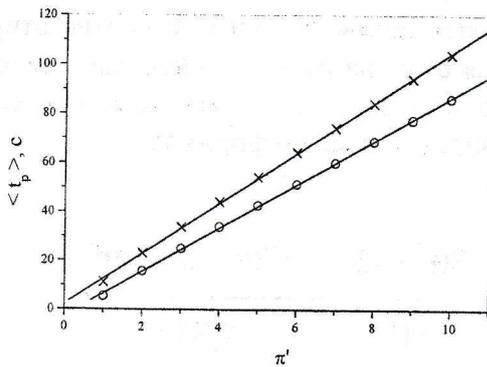


Рис.1 Зависимость времени сферификации (ooo), времени при котором в мембране эритроцита образуется макроскопическая пора (xxx), от приведенного осмотического давления внеклеточного раствора. $\alpha=0,4$; $\sigma=0,95$; $C'=0,25$; $T=298$ К; $\gamma K = 0,1$.

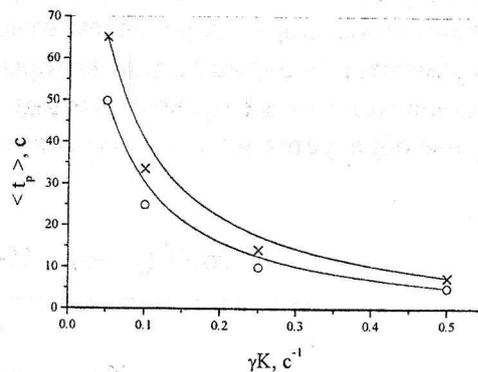


Рис.2 Зависимость времени сферификации (ooo), времени при котором в мембране эритроцита образуется макроскопическая пора (xxx), от параметра γK . $\alpha=0,4$; $\sigma=0,95$; $C'=0,25$; $T=298$ К; $\pi'=3$.

Он обусловлен тем, что повышение перепада осмотического давления на мембране приводит к увеличению скорости изменения клеточного объема, и это, в свою очередь, влечет за собой "проскакивание" клетки до значений $y - y_s > y_s$, при которых время образования макроскопической поры становится сравнительно

небольшим. Рост t_p с уменьшением параметра γK (рис.2), в основном, вызван увеличением времени достижения клеткой сферической формы с уменьшением

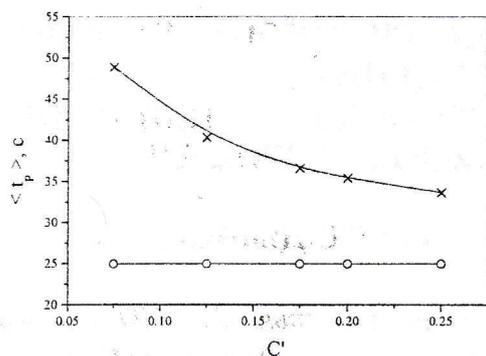


Рис.3 Зависимость времени сферификации (ooo), времени при котором в мембране эритроцита образуется макроскопическая пора (xxx), от параметра C' .

$\alpha=0,4$; $\sigma=0,95$; $\gamma K=0,1$; $T=298$ K; $\pi' = 3$.

коэффициента проницаемости эритроцитов для проникающего в клетки растворенного вещества. Повышение же значения относительного объема эритроцита, при котором в его мембране образуется макроскопическая пора, с увеличением этого параметра также обусловлен упомянутым выше эффектом "проскальзывания", ибо скорость изменения объема клетки обратно пропорциональна произведению γK . Уменьшение t_p в более жесткой мембране, то есть при более высоких значениях параметра C' , объясняется тем, что изотропное натяжение мембраны, необходимое для образования в ней поры, в более жесткой мембране возникает) при меньшем растяжении, и, следовательно, мембранная пора при этом образуется за более короткий промежуток времени (рис.3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wessels J.M.C., Pals D.T.F., Veer Kamp J.H.//BBA.1973.V.291.P.165-177.
2. Mazur P., Leibo S.P., Miller R.H.//J.Membrane Biol.1974.V.15.P.107-136.
3. Козлов М.М., Маркин В.С.//Биол. мембраны.1984.Т.1,№1.С.74-78.
4. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.К.Наук.думка,1994.143с.
5. Levin R.L., Miller T.W.//Cryobiology.1981.V.18.P.32-48.
6. Canham P.B., Parkinson D.R.//Can. J. Physiol. Pharmacol.1970.V.48.P.369-376.
7. Ивенец И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран. М.Мир,1982.304с.
8. Levitt D.G., Mlekoday H.J.//J. Gen. Physiol.1983.V.81.P.239-254.
9. Марри Дж. Нелинейные дифференциальные уравнения в биологии. Лекции о моделях. М.Мир,1983.397с.
10. Rand R.P.//Biophys.J.1964.V.4.P.303-316.
11. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф.//Проблемы криобиологии.1994.С.24-32.