

УДК 577.3

## КИНЕТИКА СНИЖЕНИЯ ФИЛЬТРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭФАЗОЛА

© 1999 г. В.З. Дубинский, Е.С. Шурхина\*, И.А. Ефименко, Ф.И. Атауллаханов\*

*Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, 117907, Москва, Ленинский пр., 31;*

*\*Гематологический научный центр РАМН, 125167, Москва, Ново-Зыковский проезд, 4а*

Поступила в редакцию 29.09.97 г.

После доработки 08.12.98 г.

Методом фильтрации при постоянном давлении изучали влияние палладийсодержащего комплекса (эфазола) на скорость фильтрации суспензии эритроцитов через ядерные фильтры. Показано, что инкубация эритроцитов в присутствии комплекса приводит к снижению их фильтруемости. Зависимости времени фильтрации фиксированного объема суспензии эритроцитов как от времени инкубации, так и от начальной концентрации препарата имеют вид автоускоренных кривых. Анализ кинетических моделей показал, что наблюдаемые эффекты обусловлены нелинейным характером зависимости скорости фильтрации  $w$  от скорости прохождения эритроцита через пору и характером влияния препарата на форму распределения клеток по  $w$ . Обсуждены некоторые модели изменения распределения эритроцитов по  $w$  в процессе инкубации и механизмы связи кинетики фильтрации с параметрами инкубации.

*Ключевые слова: суспензия эритроцитов, скорость фильтрации, эфазол.*

Методы фильтрации суспензии эритроцитов через калиброванные фильтры с диаметром пор, сравнимым с размером клеток за 30 лет своего развития превратились в мощный комплекс методов исследований в обширной области проблем, связанных с механическими свойствами эритроцитов [1–3].

Эта область включает в себя как биофизические аспекты изменения механических свойств эритроцита [4], так и важные для медицины вопросы диагностики заболеваний, мониторинга терапии и различного рода тестирований (качество донорской крови, консерванты, условия хранения, действие лекарственных препаратов и т.д.) [5–8]. Методики тестирования, как правило, включают в себя инкубацию с тестируемым препаратом.

При этом с целью более четкого выявления эффекта часто используется прием, когда клетки инкубируются в присутствии какого-либо повреждающего агента — так называемые стресс-модели [3]. В качестве таких агентов чаще всего используют кислород, изменения рН и осмолярности [9,10], а также вещества, действующие на клеточную мембрану, — глутаровый альдегид, ионофор А23187, хлорпромазин, ацетилфенилгидразин, пентоксифилин и др. [11,12]. Обоснованием подобных стресс-тестов служит то, что инкубация с повреждающим агентом

должна усиливать и как бы проявлять разницу между исследуемыми и контрольными эритроцитами. Прединкубация со стресс-агентом может быть полезна и при использовании метода фильтрации для диагностики заболеваний, особенно в тех случаях, когда некондиционные эритроциты эффективно фагоцитируются в организме [12]. При использовании таких «кинетических вариантов» метода может оказаться важным, каким образом параметры фильтрации зависят от времени инкубации, концентрации агента и других условий.

В данной работе мы исследовали влияние эфазола (N-метил-N-(1-окси-1-фенилизопропил)аммония тетрахлорпалладиевокислого) на фильтрацию эритроцитов. Эфазол — комплексное соединение палладия — может быть использован в качестве стресс-агента, так как препараты на его основе обладают широким спектром биологического действия, проявляя, в частности, заметный иммуномодулирующий эффект, что может быть связано с мембранотропными свойствами комплекса [13,14].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Приготовление суспензии эритроцитов.** Суспензию эритроцитов готовили из крови здоровых доноров, взятой на гемоконсерванте глюгицир. Эритроциты осаждали и отмывали два-

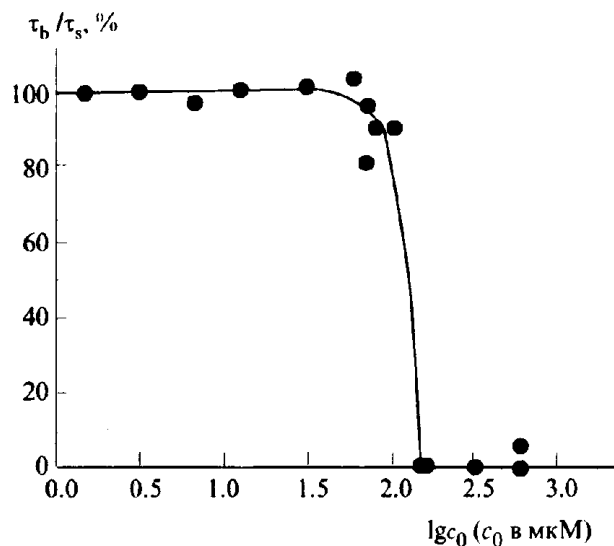


Рис. 1. Зависимость фильтруемости ( $\tau_b/\tau_s$ , %) суспензии эритроцитов от начальной концентрации эфазола в инкубационной среде. Время инкубации  $t = 60$  мин.

жды физиологическим раствором и затем буфером, pH 7,4, содержащим 10 мМ Нерес и 140 мМ NaCl, удаляя каждый раз надосадочную жидкость и верхний слой осажденных клеток. Осаждение проводили центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин. Отмытая эритроцитарная масса содержала не более 2–3 лейкоцитов на  $10^4$  эритроцитов. Осмолярность растворов определяли с помощью криоскопического осмометра ОМКА 1Ц-01. Инкубацию с эфазолом проводили в суспензиях с гематокритом 15–25%. Эфазол вводили в суспензию в виде раствора в том же буфере, который использовался для ресуспендирования эритроцитов.

**Измерение фильтруемости.** Фильтруемость эритроцитов определяли на модифицированном гемореометре Хансса [15] при постоянном гидростатическом давлении 6 мм вод. ст. Использовали ядерные полиэтилентерфталатные фильтры толщиной 7 мк и средним диаметром пор 3 мк. Время протекания фиксированного объема образца (250 мкл) регистрировали с точностью до 0,1 с. Показателем фильтруемости эритроцитов служило отношение  $\tau_b/\tau_s$ , где  $\tau_b$  и  $\tau_s$  — соответственно время фильтрации буфера и суспензии клеток через данный фильтр. Чем хуже фильтруемость клеток, тем меньше этот показатель. Времена фильтрации изменялись от 3 с (для буфера) до  $\infty$  (отсутствие фильтрации). Таким образом, относительная ошибка метода составляла 3–7%. Экспериментальные данные

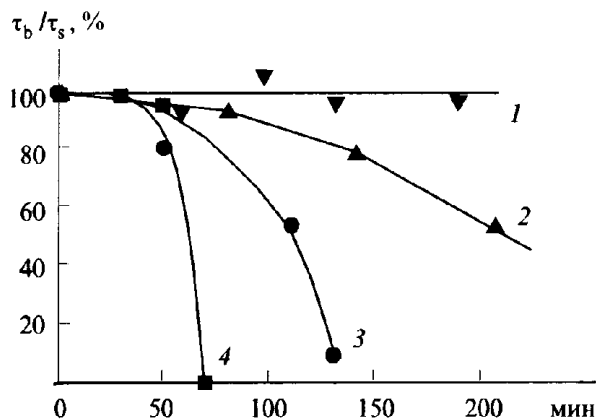


Рис. 2. Снижение фильтруемости ( $\tau_b/\tau_s$ , %) в зависимости от времени инкубации (мин) при концентрациях эфазола в инкубационной среде (мМ): 1 — 0,03; 2 — 0,06; 3 — 0,07; 4 —  $c_0 = 0,08$ .

были получены путем 3–4 измерений времени фильтрации в каждой точке кинетической кривой. Ошибка среднего не превышала 10%.

Фильтруемость измеряли в суспензиях с гематокритом 1%. Для измерения  $\tau_b$  и получения суспензии с необходимым гематокритом использовали тот же буфер, что и для ресуспендирования эритроцитов. Рабочие растворы очищали от механических загрязнений пропусканием через фильтр с диаметром пор 0,22 мк.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эфазол эффективно снижает фильтруемость эритроцитов. Величина  $\tau_b/\tau_s$  зависит как от времени инкубации, так и от концентрации вещества. На рис. 1 представлены результаты измерений  $\tau_b/\tau_s$  после 60 мин инкубации эритроцитов с эфазолом при различных концентрациях препарата. Видно, что при фиксированном времени инкубации зависимость фильтруемости эритроцитов от концентрации эфазола имеет четко выраженный пороговый характер. Обращает на себя внимание высокая крутизна кривой в области перехода — при том, что использованные концентрации изменялись в диапазоне от 1 до 1000 мкМ (собственно порог в условиях наших экспериментов лежит, как видно из рис. 1, в узкой зоне концентраций от 60 до 80 мкМ).

Наблюдаемый вид зависимости обусловлен кинетическими закономерностями изменения свойств эритроцитов при инкубации. Это хорошо видно из представленных на рис. 2 за-

висимостей фильтрации суспензии эритроцитов от времени инкубации при нескольких околопороговых концентрациях эфазола. Видно, что для всех концентраций имеет место увеличение скорости изменения фильтруемости в процессе инкубации.

Поскольку о механизмах влияния эфазола на фильтруемость эритроцитов в настоящее время практически ничего неизвестно, то нет никаких оснований для выбора какого-либо конкретного кинетического описания этого процесса. Чтобы рассмотреть простейшие гипотезы о влиянии эфазола, а также проанализировать условия, при которых зависимость фильтруемости от времени должна иметь вид ускоряющейся кривой, мы рассмотрели модель, использующую следующие допущения: 1) суспензия состоит из основной фракции клеток, обладающих определенным временем прохождения через поры  $\tau_{bas}$  и малой доли (число клеток этой фракции должно быть сопоставимо с числом пор в фильтре) нефилтрирующихся клеток; 2) инкубация с препаратом приводит к увеличению числа нефилтрирующихся клеток.

Тогда для скорости фильтрации чистого буфера можно записать:

$$dV/d\tau = wn_0, \quad (1)$$

где  $V$  – объем раствора, прошедшего через фильтр;  $\tau$  – текущее время фильтрации;  $w$  – удельная скорость фильтрации буфера (объем раствора, проходящего через одну пору за единицу времени);  $n_0$  – общее число пор в фильтре.

Откуда

$$\tau_b = V_0/wn_0, \quad (2)$$

где  $V_0$  – рабочий объем ячейки.

В свою очередь, фильтрация клеточной суспензии с учетом сделанных выше допущений будет описываться системой уравнений (3)–(5) – такой же, как для рассмотренного в работе [16] случая фильтрации разбавленной суспензии эритроцитов, содержащей малую примесь нефилтрирующихся лейкоцитов. Уравнение (5) записано с учетом того, что для разбавленных суспензий кинетика фильтрации суспензии с высокой точностью описывается кинетикой прохождения среды через *не занятые* клетками поры.

$$dn_1/d\tau = k_1(n_0 - n_1 - n_2) - k_2n_1, \quad (3)$$

$$dn_2/d\tau = k_3(n_0 - n_1 - n_2), \quad (4)$$

$$dV/d\tau = w(n_0 - n_1 - n_2), \quad (5)$$

где  $n_0$ ,  $n_1$ ,  $n_2$  – общее число пор в фильтре и число пор, занятых клетками основной и нефилтрирующейся фракций соответственно;  $k_1$ ,  $k_3$  – доля пор, занимаемых соответственно клетками основной и нефилтрирующейся фракций в единицу времени (т.е. удельные скорости закрытия пор клетками этих фракций);  $k_2$  – доля пор, освобождаемых клетками основной фракции в единицу времени (т.е. удельная скорость прохождения клеток через поры;  $k_2 = 1/\tau_{bas}$ ).

Аналитическое решение системы легко получить, используя условие стационарного приближения по  $n_1$ . Полагая  $dn_1/d\tau = 0$ , получим:

$$n_1 = (n_0 - n_2)k_1/(k_1 + k_2).$$

И подставляя полученное значение  $n_1$  в (4), после несложных преобразований имеем:

$$dn_2/d\tau = rk_3(n_0 - n_2),$$

где положено для удобства:

$$r = k_2/(k_1 + k_2).$$

После интегрирования при начальных условиях  $n_2=0$  при  $\tau = 0$ , получим

$$n_2 = n_0[1 - \exp(-rk_3\tau)].$$

Подставляя значения  $n_1$  и  $n_2$  в (5), после преобразований получим:

$$dV/d\tau = wrn_0[1 - \exp(-rk_3\tau)].$$

Интегрируя последнее выражение при граничных условиях:  $V = 0$  при  $\tau = 0$  и  $V = V_0$  при  $\tau = \tau_s$ , находим время фильтрации суспензии.

$$\tau_s = \ln(wn_0/(wn_0 - k_3V_0))/rk_3.$$

Используя (2) можно переписать это выражение в виде, удобном для сравнения с экспериментом:

$$\tau_b/\tau_s = rk_3\tau_b/\ln(1/(1 - k_3\tau_b)). \quad (6)$$

Для дальнейшего анализа зависимости  $\tau_b/\tau_s$  от параметров эксперимента – концентрации препарата и времени инкубации – необходимо выразить  $k_3$  через эти параметры. Из физического смысла этого коэффициента в уравнении (4) следует, что он должен иметь вид:

$$k_3 = Qh\beta,$$

где  $Q$  – коэффициент, характеризующий фильтр;  $h$  – гематокрит фильтруемой суспензии

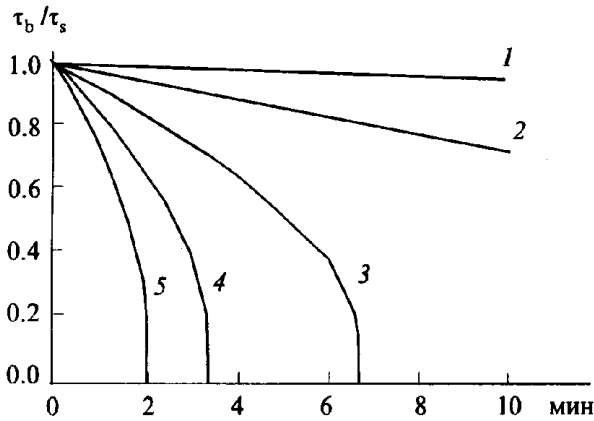


Рис. 3. Зависимости  $\tau_b/\tau_s$  от времени инкубации (мин), рассчитанные по уравнению (6) при  $\beta = \alpha c_0 t$ ,  $r = 1$  и следующих значениях  $\alpha h Q t_b / c_0$ : 1 - 0,01; 2 - 0,05; 3 - 0,15; 4 - 0,3; 5 - 0,5.

(в долях);  $\beta = f(\alpha, c, t)$  – функция, отражающая изменение концентрации забивающих клеток при инкубации с препаратом в концентрации  $c$  в течение времени  $t$ . Коэффициент  $\alpha$  отражает удельную эффективность препарата и/или чувствительность исследуемых клеток к воздействию.

Проанализируем зависимость фильтруемости от концентрации препарата  $c$  и от времени  $t$  для нескольких наиболее практически значимых видов функции  $\beta$ .

а)  $\beta = \alpha c_0$ . Тогда

$$\tau_b/\tau_s = r Q h \alpha c_0 \tau_b / \ln(1/(1 - Q h \alpha c_0 \tau_b))$$

и не зависит от времени. Мы не будем рассматривать этот случай более подробно\*, так как для нашего препарата фильтруемость эритроцитов сильно зависит от времени инкубации клеток с препаратом. Мы должны предположить, что в присутствии эфазола фильтруемость эритроцитов меняется определенным образом. Рассмотрим простейшие варианты таких изменений.

б)  $\beta = \alpha c_0 t$ , что соответствует широко распространенному случаю, когда эффект воздействия пропорционален дозе. Тогда, как это следует из выражения (5), зависимость  $\tau_b/\tau_s$  от любого из сомножителей в произведении  $\alpha Q h c_0 t$  будет иметь одинаковый вид. Из соображений наглядности в сравнении результатов расчета с экспериментом, на рис. 3 приведены расчетные

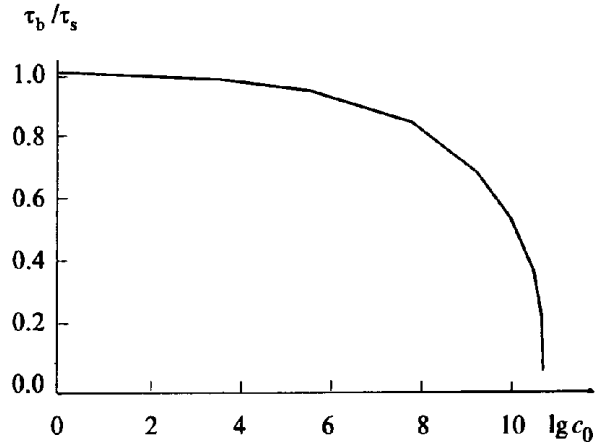


Рис. 4. Зависимость  $\tau_b/\tau_s$  от  $\lg c_0$ , рассчитанная по уравнению (6) и  $\beta = \alpha c_0 t$  ( $r = 1$ ,  $\alpha h Q t_b t = 1$ ).

зависимости  $\tau_b/\tau_s$  от  $t$  для нескольких значений  $c_0$ , а на рис. 4 от  $\ln c_0$  при фиксированном  $t$ . Видно, что расчетные кривые вполне соответствуют экспериментальным зависимостям, представленным на рис. 1 и 2.

в)  $\beta = c_0(1 - e^{-\alpha t})$ , что соответствует другому достаточно широко распространенному случаю, когда действие препарата сопровождается его расходом со скоростью, пропорциональной текущей концентрации. Тогда, если исследуется зависимость  $\tau_b/\tau_s$  от  $\ln c_0$  при одном и том же фиксированном времени инкубации, выражение  $(1 - e^{-\alpha t})$  становится константой и очевидно, что искомая зависимость будет иметь такой же вид, что и рассмотренная ранее на рис. 4, но инвариантность относительно произведения  $c_0 t$  выполняться не будет.

Вид зависимости  $\tau_b/\tau_s$  от времени будет определяться значением множителя  $Q h c_0 t_b$ . При  $c_0$  таких, что  $Q h c_0 t_b < 1$ , получим кривую выпуклостью вниз и имеющую предел, зависящий от величины  $c_0$ . При значениях  $c_0$  таких, что произведение  $Q h c_0 t_b$  будет больше единицы, у кривой появляется перегиб, положение которого на кривой тем выше, чем больше  $c_0$ , и кривая внешне становится похожей на зависимость, рассмотренную в пункте а. На рис. 5 представлены оба типа кривых.

Из вышеизложенного следует, что для всех рассмотренных кинетических вариантов зависимость фильтруемости от начальной концентрации препарата будет иметь вид, как на рис.

\* Зависимости  $\tau_b/\tau_s$  от  $c_0$  можно анализировать, используя формулу для нижеприводимого случая, если положить в ней  $t=1$ .

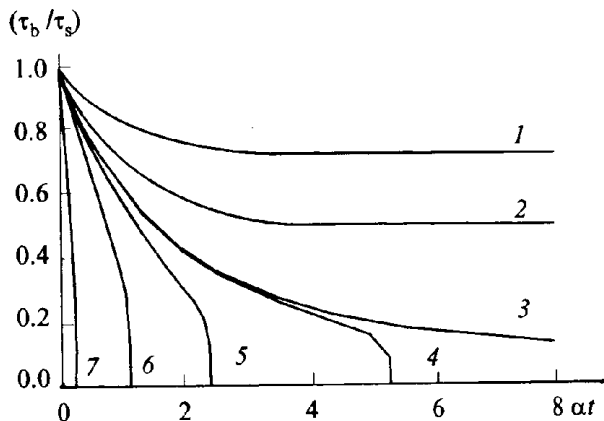


Рис. 5. Расчет зависимостей  $\tau_b/\tau_s$  от времени инкубации ( $\alpha t$ ) по уравнению (6) при  $\beta = c_0(1 - e^{-\alpha t})$ ,  $r = 1$  и следующих значениях  $hQ\tau_b c_0$ : 1 — 0,5; 2 — 0,8; 3 — 1,0; 4 — 1,005; 5 — 1,1; 6 — 1,5; 7 — 5,0.

2 и 4. Как при этом будет выглядеть график фильтруемости — время инкубации будет зависеть от того, действует препарат в условиях кинетики нулевого порядка или первого, а в последнем случае еще и от начальной концентрации препарата (больше или меньше единицы произведение  $Qhc_0\tau_b$ ).

Заметим, что входящая в выражение для  $\beta$  константа  $\alpha$  есть ни что иное, как мера эффективности влияния препарата на клетки и в качестве таковой может быть использована для сравнения препаратов по эффективности или для количественной оценки реакции на данный препарат эритроцитов, различающихся своим происхождением и/или предысторией.

Реально клеточная суспензия состоит не из двух фракций, как в рассмотренной выше модели, а представляет собой некое распределение по удельной скорости прохождения клетки через пору.

Численный анализ показывает, что учет наличия распределения не изменяет характер зависимости  $\tau_b/\tau_s$  от этих параметров. Однако в этом случае вид кривой, помимо исследованных выше переменных, будет зависеть от формы и ширины распределения, а также от того, каким образом форма распределения меняется в результате инкубации.

Таким образом, как экспериментальные данные, так и результаты моделирования указывают на то, что наблюдаемые эффекты — ускоренный характер снижения фильтруемости

при инкубации с препаратом в зависимости от времени инкубации или от начальной концентрации препарата — является проявлением того свойства рассматриваемого метода, что скорость фильтрации нелинейно зависит от параметров распределения клеток по удельной скорости прохождения через пору. Такой «эффект усиления» может оказаться полезным во многих случаях, в частности при измерении слабых, но постоянных или повторяющихся мембранотропных воздействий, в диагностических измерениях и т.д. Его надо учитывать при сравнении мембранотропной активности препаратов. С другой стороны, легко представить себе возможность ошибочной интерпретации результатов эксперимента в случаях, когда при незначительных, а иногда, возможно, и неконтролируемых изменениях условий опыта можно попасть на ту или другую сторону порога.

В заключение авторы считают своим приятным долгом выразить искреннюю благодарность И.Л. Лисовской за чрезвычайно полезное обсуждение.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takeshi Shiga, Nobuji Maeda, Kazunori Kon // Hematology. 1990. V. 10. P. 9–48.
2. Jones J.G., Adams R.A., Evans S.-A. // Clin. Hemorheol. 1994. P. 149–169.
3. Stuart J., Gerard B. Nash Technological Advances in Blood Rheology. Critical Reviews in Clinical Laboratory Science. 1990. V. 28. P. 61–93.
4. Лисовская И.Л., Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Тужилова Е.Г. // Биофизика. 1994. Т. 39, вып. 5. С. 864–871.
5. Timo Somer, Herbert J. // Ann. Medicine. 1993. V. 25. P. 31–39.
6. Staubli M., Stone P.C.W., Straub P.W., Stuart J. // Clin. Hemorheol. 1986. V. 6. P. 589.
7. Nash G.B., Wenby R.B., Sowemimo-Coker S.O., Meiselman H.J. // Clin. Hemorheol. 1987. V.7. P. 93–108.
8. Keidan A.J., Sowter M.C., Johnson C.S., Marwah S.S., Stuart J. // Clin. Sci. 1989. V. 76. P. 357.
9. Johnston M.N., Ellory J.C., Stuart J. // Brit. J. Haematol. 1989. V.73. P. 522.
10. Schmid-Schonbein H., Grebe R., Teitel P., Artman G., Eschweiler H., Schroder S. // Drug Dev. Res. 1988. V. 14. P. 205.
11. Stuart J., Stone P.C.W., Bilto Y.Y., Keidan A.J. // J. Clin. Pathol. 1987. V. 40. P.1182.
12. Proc. 2nd Workshop. London, 23–24 September 1982 / Ed. J. Dormandy. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1983. P. 176–221.
13. Захарова И.А., Мошковский Ю.Ш., Сурайкина Т.Н., Фомштейн Л.М. // ДАН СССР. 1975. Т. 222, № 5. С. 1229–1231.

14. Татьянаенко Л.В., Райхман Л.М., Тоцева Т.А., Захарова И.А., Мошковский Ю.Ш. // Биохимия. 1976. Т. 41, № 8. С. 1516–1521.
15. Hanss M. // *Biorheology*. 1983. V. 20. P. 199–211.
16. Jones J.G., Holland B.M., Humphrys J., Ques R., Wardrop C.A.J. // *Brit. J. Haematol.* 1984. V. 57. P. 457–466.

## Kinetics of Changes in Filterability of Erythrocytes by the Action of Ephazol

V.Z. Dubinskii\*, E.S. Shurkhina\*\*, I.A. Efimenko\*, and F.I. Ataullakhanov\*\*

\*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr.31, Moscow, 117907, Russia

\*\*Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences, Novo-Zykovskii proezd 4a, Moscow, 125167 Russia

The effect of palladium-containing complex Ephazol on the filtration rate of erythrocyte suspensions through nuclear filters was studied by the constant-pressure filtration method. It was shown that the filterability of red blood cells incubated with ephazol decreased. If the time necessary for a fixed volume of red blood cell suspension to pass through a filter was plotted against the time of incubation with Ephazol or against its initial concentration, the curves typical of autoaccelerated processes were obtained. From analysis of kinetic models, it was concluded that the effects observed are due to the nonlinear dependence of the filtration rate  $w$  on the rate at which an erythrocyte passes through a pore and the influence of Ephazol on the distribution of erythrocytes with respect to  $w$ . Several models describing changes in the distribution of erythrocytes with respect to  $w$  in the presence of Ephazol and possible mechanisms relating the filtration kinetics to the incubation parameters are discussed.

*Key words: erythrocyte suspension, filtration rate, Ephazol*