

И. Л. Лисовская, В. М. Витвицкий,
Ф. И. Атауллаханов, Р. И. Волкова, Р. А. Кульман,
И. Б. Гончаров, В. А. Аграненко

ФИЛЬТРАЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

Гематологический научный центр РАМН, Институт медико-биологических проблем Минздрава РФ, Москва

Исключительно высокая деформируемость эритроцитов человека — свойство, очень важное для существования и функционирования этих клеток в кровеносном русле. Нарушения деформируемости при различных патологиях ухудшают способность эритроцитов циркулировать по капиллярам и часто вызывают укорочение времени жизни эритроцитов (серповидно-клеточная анемия, врожденный сфероцитоз, диабет и т. д.) [1, 2]. Возможность количественной оценки деформируемости эритроцитов и выяснение механизмов ее нарушений имеют большое диагностическое и прогностическое значение, а также могут послужить основой для разработки методов коррекции [3, 4]. Кроме того, измерение степени деформируемости может быть использовано для характеристики качества консервированных эритроцитов [5]. Разработаны многочисленные методы оценки деформируемости, в том числе эктацитометрия, микропипеточные и фильтрационные методы [6—8]. Однако результаты, получаемые разными авторами, оказываются трудносопоставимы. Причина этого — различия экспериментальных условий, влияние которых на результаты измерений остается не вполне выясненным.

Настоящая работа посвящена сопоставлению методических подходов к измерению деформируемости эритроцитов методом постоянного потока (Constant flow method) и методом измерения начальной скорости (Initial flow rate method).

Эритроциты выделяли из донорской крови, замороженной на гемоконсерванте «Глюгидир» или на 3,8 % цитрате. После трехкратного отмывания

физиологическим раствором клетки ресуспендировали в фосфатном буфере (PBS), растворе Рингера, забуференном трисом, или растворе Рингера, забуференном HEPES [9]. В состав всех буферов входили глюкоза (1 мг/мл) и бычий сывороточный альбумин (5 мг/мл). Наилучшая сохранность фильтруемости эритроцитов в течение 5—6 ч при всех температурах достигалась при ресуспендировании их в растворе Рингера — HEPES. Деформируемость эритроцитов измеряли при комнатной температуре с помощью двух фильтрационных методов, в которых использовали поликарбонатные фильтры фирмы «Nuclepore» с диаметром пор 3 и 5 мкм, а также ядерные фильтры на основе полиэтилентерефталатной пленки с диаметром пор 2,8 мкм, 5 мкм (С-2,8 и С-5) и 3 мкм (АИ-3).

Метод постоянного потока [10, 11]

Принципиальная схема установки представлена на рис. 1. Суспензию эритроцитов в буфере продавливали с постоянной скоростью через фильтр, регистрируя гидродинамическое давление на фильтре. Все фильтры имели диаметр 13 мм и фильтрующую площадь около 0,8 см.

Метод измерения начальной скорости

Система для оценки деформируемости эритроцитов по величине начальной скорости свободного протекания суспензии клеток через фильтр была предложена в 1983 г. и названа по имени автора гемореометром Хансса [12, 13]. Мы использовали установку, представляющую собой модификацию гемореометра Хансса. Термостатированную колонку высотой 60 мм и диаметром 8 мм заполняли суспензией эритроцитов. Регистрировали время протекания фиксированного объема суспензии через фильтр (t_s) и сравнивали его с предварительно измеренным на том же фильтре временем протекания ресуспендирующего буфера (t_b). Вычисляли величину:

$$\frac{t_s - t_b}{t_b} \times \frac{100}{Ht}$$

называемую индексом ригидности (IR) и характеризующую фильтруемость эритроцитов.

На рис. 2, а представлена типичная фильтрационная кривая, полученная методом постоянного потока. Как правило, такая кривая может быть разделена на несколько участков: первый участок — скачок давления, соответствующий началу прохождения через фильтр ресуспендирующего буфера, не содержащего клеток. Величина этого скачка P_0 в наших экспериментах составляла 0,3—1,8 мм рт. ст. Второй участок начинается, когда фронт суспензии подходит непосредственно к поверхности фильтра. При этом наблюдается более или менее быстрое возрастание давления с постоянной максимальной скоростью V_{max} . Этот участок соответствует накоплению перед фильтром клеток, неспособных пройти через поры в данном интервале давления и обратному перекрыванию ими пор фильтра. Величина V_{max} зависит от деформируемости клеток: чем больше не проходящих при низких давлениях клеток, тем выше V_{max} . Протяженность этого участка во времени — от нескольких секунд до

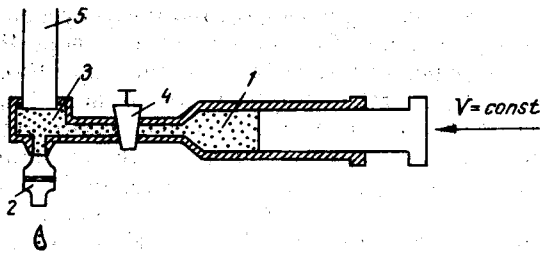


Рис. 1. Установка для фильтрационного определения деформируемости эритроцитов методом постоянного потока (Constant flow method).

1 — шприц с исследуемой суспензией; 2 — фильтр; 3 — переходник; 4 — кран; 5 — датчик давления.

2—3 мин. Далее следует обычно достаточно резкий переход к третьему участку, соответствующему постоянной, меньшей по величине скорости нарастания давления $V_{\text{стац}}$. Этот участок может иметь протяженность 10 мин и более и интерпретируется как результат постепенного необратимого перекрытия (plugging) части пор недеформируемыми клетками. Величина $V_{\text{стац}}$ также возрастает с уменьшением деформируемости клеток, однако этот параметр представляется малоинформативным. В качестве параметра для оценки деформируемости эритроцитов нами использовалась величина Δ — давление, начиная с которого устанавливается постоянная скорость его дальнейшего нарастания. Параметр Δ соответствует величине P_E в работах S. Chien и соавт. [10].

Следует отметить, что такая «классическая» форма фильтрационной кривой наблюдается далеко не всегда. Если клетки обладают высокой деформируемостью, фильтрационная кривая имеет вид, изображенный на рис. 2, б. В этом случае единственным параметром, характеризующим деформируемость, является $V_{\text{max}} = V_{\text{стац}}$. Параметр Δ при этом, очевидно, приближается к нулю. Однако при низкой деформируемости клеток более удобным и информативным является параметр Δ .

Известно, что характер фильтрационных кривых зависит от гематокрита суспензии, скорости ее продавливания через фильтр, типа фильтра и, разумеется, качества самих клеток [9].

Выбор величины гематокрита исследуемой су-

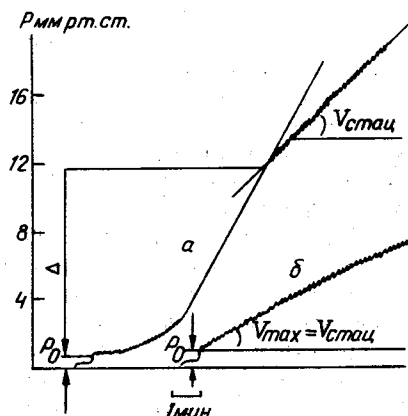


Рис. 2. Типичные фильтрационные кривые (кривые зависимости давления перед фильтром от времени при постоянной скорости продавливания суспензии), $Q=0,54$ мл/мин.

Свежевыделенные эритроциты ресуспендировали в растворе Рингера — НЕРЕС. а — фильтр «Nuclepore» 3 мкм; б — фильтр «Nuclepore» 5 мкм.

пензии эритроцитов в обоих методах определяется, с одной стороны, необходимой чувствительностью системы, с другой — тем, что излишне высокие значения гематокрита могут привести к искажению результатов за счет межклеточных взаимодействий, оседания клеток и слишком быстрого забивания фильтра. В наших условиях индекс ригидности оставался постоянным в интервале значений гематокрита 2—7%. В настоящей работе, как правило, использовали суспензии с гематокритом 4%.

В методе постоянного потока скорость прохождения суспензии через фильтр (Q) должна быть достаточно велика, чтобы обеспечить разрешающую способность измерительной системы, с одной стороны, и достаточно низка, чтобы дать возможность проводить измерения в течение 5—10 мин, а также получать значения давления не более 150—200 мм рт. ст. Тем самым в наших условиях значения Q ограничены интервалом 0,5—1,0 мл/мин.

Различные типы ядерных фильтров отличаются друг от друга диаметром пор, их плотностью (количеством пор на единицу площади) и длиной (толщиной фильтра). На рис. 3 приведены фильтрационные кривые, полученные при пропускании суспензии свежевыделенных эритроцитов (см. рис. 3, а) и тех же эритроцитов, подвергнутых метаболическому истощению (см. рис. 3, б), через различные фильтры. В данном случае вызванные метаболическим истощением изменения деформируемости столь велики, что проявляются с помощью любого из использованных типов фильтров. Однако небольшие изме-

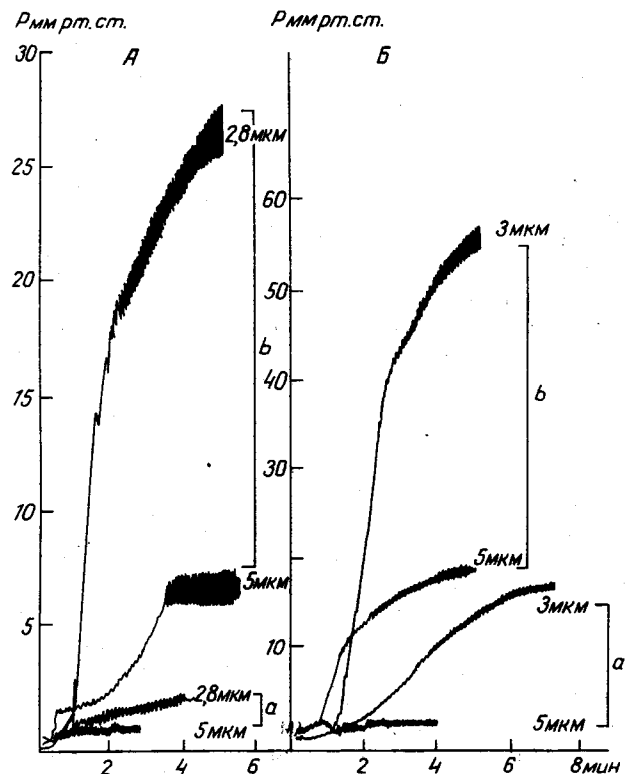


Рис. 3. Фильтрационные кривые, полученные при пропускании суспензии свежевыделенных (а) и инкубированных в течение 24 ч в PBS без альбумина и глюкозы (метаболически истощенных) эритроцитов (б) через различные типы фильтров, $Q=0,54$ мл/мин.

А — фильтры — С—2,8 и С—5 мкм; Б — фильтры «Nuclepore» 3 мкм и 5 мкм.

Влияние хранения крови при 4 °С на IR эритроцитов

День хранения	IR ($M \pm m$)	Число измерений
0	77 ± 4	18
1-й	93 ± 9*	7
2—5-й	135 ± 16**	5

Примечание. Кровь заготавливали на гемоконсерванте «Глюглицер». Измерения с помощью фильтра АИ—3. Одна звездочка — $p > 0,1$, две — $p < 0,001$ по сравнению с днем 0.

нения деформируемости часто не удается зарегистрировать с помощью фильтров с диаметром пор 4,5—5 мкм, в то время как фильтры, оказывающие большее гидродинамическое сопротивление суспензии эритроцитов, позволяют их уловить. Таким образом, выбор типа фильтра должен определяться величиной исходной деформируемости клеток и степенью ожидаемых изменений.

Как видно на рис. 3, наибольшее гидродинамическое сопротивление суспензии эритроцитов оказывает при прочих равных условиях фильтр «Nucleopore» 3 мкм, а наименьшее — С—5 мкм. Правильный выбор типа фильтра играет определяющую роль и при использовании метода постоянной начальной скорости. В этом случае благодаря высокой начальной скорости протекания суспензии через фильтр (4—6 мл/мин) удается зарегистрировать небольшие изменения фильтруемости, которые не проявляются при стандартных условиях измерений методом постоянного потока.

В таблице приведены результаты измерения индекса ригидности эритроцитов из свежей и хранившейся при 4 °С в течение 2—5 сут крови. Зарегистрировано достоверное возрастание IR даже при столь кратковременном хранении эритроцитов. Метод постоянного потока при стандартных значениях Q, как правило, не позволяет обнаружить достоверных различий деформируемости свежих и хранившихся менее недели клеток.

Присутствующие в суспензии эритроцитов лейкоциты оказывают большое влияние на фильтрационные параметры. Это вызвано тем, что, хотя площадь «избыточной» поверхности лейкоцита значительно больше, чем эритроцита, они отличаются высокой вязкостью цитоплазмы. Эта величина у эритроцита составляет $1/10$ Pa, а у нейтрофила — в 1000 раз больше [10]. На рис. 4, а представлены кривые зависимости фильтрационных параметров V_{max} и Δ от содержания лейкоцитов в суспензии. Приведенные данные свидетельствуют о том, что примесь лейкоцитов может существенно исказить видимую картину деформируемости эритроцитов, получаемую методом постоянного потока, поэтому приготовление суспензии с минимальным числом клеток — одно из основных условий получения при его использовании корректных результатов.

Суспензию эритроцитов, обедненную лейкоцитами, готовили следующим образом. После центрифугирования крови и удаления плазмы эритроциты осторожно отсасывали шприцем через толстую иглу из середины осажденных клеток, дважды отмывали физиологическим раствором, ресуспендировали в небольшом объеме буфера, определяли гематокрит и разбавляли буфером до требуемого гематокрита (4 %). Согласно данным, приведенным в работе [8], в пересчете на гематокрит 4 % эритроциты при таком приготовлении содержат 45 ± 11 кл/мкл. В нашем случае эта величина составляла 56 ± 12 кл/мкл. Соответственно суспензия, приготовленная из верхнего слоя эритроцитов, содержала 785 ± 54 кл/мкл ($n=5$). Отметим, что обычное отмывание эритроцитов физиологическим раствором или буфером с одновременным удалением верхнего слоя осажденных клеток дает худшие результаты: 79 ± 15 кл/мкл.

При использовании метода измерения начальной скорости в отличие от метода постоянного потока результаты мало зависят от содержания в суспензии лейкоцитов вплоть до концентраций 500—600 кл/мкл (рис. 4, б). Это объясняется низким фильтрационным давлением (60 мм вод. ст.), соответственно низкой начальной скоростью протекания и согласуется с данными, приведенными в работе [8]. Таким образом, при измерении начальной скорости вместо отмытых эритроцитов можно применять цельную кровь. Отметим, что в последнем случае следует пользоваться буфером, не содержащим Са.

При измерении деформируемости разные авторы использовали различные ресуспендирующие среды. Значительная часть клинических измерений была выполнена на эритроцитах, ресуспендированных в цельной аутологичной плазме. В последнее время в качестве ресуспендирующих сред применяют, как правило, забуференные солевые

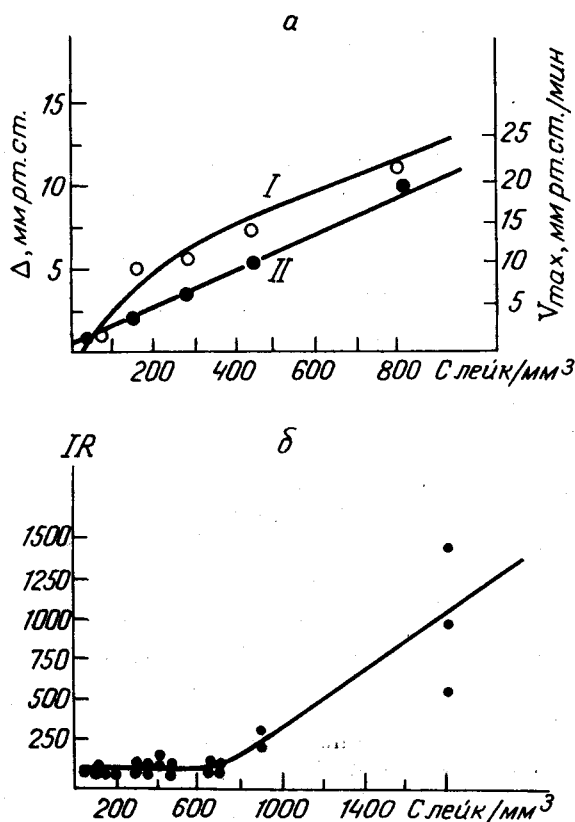


Рис. 4. Зависимость фильтрационных параметров от содержания лейкоцитов в суспензии эритроцитов (Ht=4 %).

а — метод постоянного потока. Фильтр «Nucleopore» 5 мкм, Q=0,54 мл/мин, I — Δ мм рт. ст., II — Vmax мм рт. ст./мин; б — метод постоянной начальной скорости. Фильтр С—2,8. Обогащенную и обедненную лейкоцитами суспензии свежевыделенных эритроцитов смешивали в разных пропорциях.

растворы, содержащие глюкозу (1 мг/мл) и сывороточный альбумин (5 мг/мл). Присутствие альбумина в ресуспендирующей среде необходимо для сохранения дисковидности эритроцитов, которые в противном случае превращаются в эхиноциты, что может повлиять на их фильтрационные свойства [14, 15].

Принято считать, что время между приготовлением суспензии и началом измерений должно быть минимальным [14]. Нами было показано, что оптимальным является хранение концентрированной суспензии эритроцитов (Ht=80%) в холодильнике и приготовление из нее разбавленной суспензии непосредственно перед измерением (за 20—30 мин для выравнивания температурных условий). Причина гораздо более быстрой утраты фильтруемости эритроцитами, находящимися в разбавленной суспензии, по сравнению с эритроцитами, находящимися в высококонцентрированной суспензии, неясна, но, вероятно, это связано с утечкой из клеток каких-то метаболитов.

В результате проведенных исследований были выбраны следующие основные условия измерений при использовании обоих фильтрационных методов.

1. Ресуспендирующий буфер — раствор Рингера—НЕРЕС с глюкозой и альбумином.
2. Показатель гематокрита суспензии 4%.
3. Содержание лейкоцитов в 4% суспензии эритроцитов менее 50—70 кл/мкл при методе постоянного потока и менее 500—600 кл/мкл при методе измерения начальной скорости.
4. Хранение отмытых эритроцитов в виде 80% суспензии в холодильнике или при комнатной температуре не более 4—5 ч до измерения.
5. Фильтр с диаметром пор от 2,8 до 5 мкм в зависимости от состояния клеток и степени ожидаемых изменений.
6. Скорость продавливания суспензии через фильтр 0,5—1,0 мл/мин в зависимости от желаемой чувствительности измерительной системы (при методе постоянного потока).

Метод постоянного потока и метод измерения начальной скорости с использованием зарубежных и отечественных ядерных фильтров при соблюдении перечисленных методических условий позволяют осуществлять количественные измерения деформируемости эритроцитов. Оба метода могут применяться при клинических обследованиях, оценке функциональной полноценности консервированной крови и эритроцитной массы, а также при решении ряда других задач как прикладного, так и исследовательского характера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chien S. // *Microvasc. Res.*— 1985.— Vol. 29.— P. 129—151.
2. Chien S., Dormandy J., Ernst E., Matrai A. *Clinical Hemoheology.*— Boston, 1987.
3. Dormandy J. *Blood Filtration and Blood Cell Deformability.*— Boston, 1985.
4. Голоборский В. А. // *Анест. и реаниматол.*— 1982.— № 1.— С. 38—40.
5. Wegner G., Kutera W., Lerche D. // *Folia haemat.*— 1986.— Bd 113, N 5.— S. 638—645.
6. Dintenfass L. // *Biorheology.*— 1984.— Suppl. 1.— P. 63—69.
7. Von Scheven Ch. // *Folia haemat.*— 1989.— Bd 116.— S. 653—669.
8. Marcel G. A., Weill D., Carty E. et al. // *Surface*

- Phenomena in Haemorheology.— 1983.— Pt 111.— P. 585—598.
9. Reinhart W. H., Usami S., Schmalzer E. A. et al. // *J. Lab. clin. Med.*— 1984.— Vol. 104, N 4.— P. 501—516.
10. Reinhart W. H., Chien S. // *Microvasc. Res.*— 1987.— Vol. 34.— P. 1—12.
11. Chien S. // *Ann. Rev. Physiol.*— 1987.— Vol. 49.— P. 177—192.
12. Hanss M., Koutsouris D. // *Biochim. biophys. Acta.*— 1984.— Vol. 769.— P. 461—470.
13. Koutsouris D., Delatour-Hanss E., Hanss M. // *Biorheology.*— 1985.— Vol. 22.— P. 119—132.
14. Dormandy J. *Red Cell Deformability and Filtrability.*— 1983.
15. Reinhardt W. H., Chien S. // *Amer. J. Physiol.*— 1985.— Vol. 248.— P. c473—c479.

Поступила 02.04.91

FLOW METHODS IN EVALUATION OF RED CELL DEFORMABILITY

I. L. Lisovskaya, V. M. Vitvitsky, F. I. Ataulkhanov, R. I. Volkova, R. A. Kulman, I. B. Goncharov, V. A. Agrarenko

The study of two flow methods (constant flow method and initial flow rate method) has been conducted to specify and compare methodological approaches to quantitation of red cell deformability. Washed red cells were resuspended in saline medium with glucose and albumin and examined for deformability by the above methods under different conditions. The parameters are presented to characterize flow curves obtained with the constant flow method. The authors have established optimal conditions for the measurements: the composition of the medium, the suspension HCT, leukocyte number, filtrate types, etc. With meeting of the above methodological requirements, both the methods permit quantitation of red cells deformability and can be utilized for stored blood and erythrocyte mass quality control.