

© 1994 г. ЛISOVСКАЯ И.Л., АТАУЛЛАХАНОВ Ф.И., ТУЖИЛОВА Е.Г.,
ВИТВИЦКИЙ В.М.

АНАЛИЗ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ ФИЛЬТРАЦИИ ЧЕРЕЗ МЕМБРАННЫЕ ЯДЕРНЫЕ ФИЛЬТРЫ.

II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

С целью проверки адекватности предложенной ранее математической модели процесса прохождения эритроцитов через поры мембранных ядерных фильтров исследовали зависимость скорости фильтрации суспензии эритроцитов человека от осмотичности ресуспенсирующей среды при различных экспериментальных условиях. Проверен и подтвержден вывод модели, согласно которому обращение скорости фильтрации в ноль происходит при критическом значении осмотичности, определяемом только геометрическими параметрами поры и клетки и не зависящем от иных свойств эритроцита. Показано, что в соответствии с предсказаниями модели относительная скорость фильтрации мало зависит от величины гидростатического давления. Получено хорошее соответствие выводов модели и экспериментальных данных, касающихся влияния на скорость фильтрации вязкости внутриклеточного содержимого, а также изменения механических характеристик мембраны эритроцита при различных температурах измерения.

В последние годы широкое распространение получили фильтрационные методы исследования деформируемости эритроцитов. Эти методы позволяют непосредственно оценивать способность эритроцитов проходить по узким каналам, а следовательно, и по капиллярам микроциркуляции, где они выполняют свою основную физиологическую функцию – транспорт кислорода к тканям [1,2]. Однако в настоящее время не существует способов, позволяющих определить относительный вклад различных факторов (объема клетки, площади ее поверхности, внутриклеточной вязкости, упругости мембраны) в величину интегрального показателя, каковым является фильтруемость [3]. Ранее авторами была предложена математическая модель, описывающая взаимодействие эритроцита с узким (диаметром 3–5 мкм) каналом ядерного мембранного фильтра при фильтрации разбавленной суспензии эритроцитов под действием постоянного гидростатического давления [4]. Настоящая работа посвящена экспериментальной проверке теоретических результатов, полученных на основе указанной модели.

Материалы и методы

1. *Приготовление суспензии эритроцитов.* Суспензию эритроцитов для измерения фильтруемости готовили из донорской крови, взятой на гемоконсерванте Глюгидир. Эритроциты дважды отмывали физиологическим раствором, удаляя надосадочную жидкость и верхний слой осажденных клеток. Третий раз эритроциты отмывали забуференным раствором следующего состава: NaCl – 145 мМ, KCl – 5 мМ, HEPES – 5 мМ, альбумин сывороточный – 5 мг/мл, глюкоза – 1 мг/мл, pH = 7,4, осмотичность π = 310 мосм. Затем клетки ресуспандировали в этом же растворе (HEPES-буфере), получая исходную суспензию с гематокритом 50–70% Ht. Исходная суспензия в течение всего времени эксперимента (2–4 ч) находилась при комнатной температуре. Рабочую суспензию с гематокритом 2% готовили непосредственно перед измерением, разбавляя

исходную суспензию изотоническим HEPES-буфером или приготовленной на его основе средой с заданной осмотичностью. Ресуспендирующие среды с заданной осмотичностью получали, добавляя к изотоническому HEPES-буферу воду или 10% раствор NaCl.

2. *Измерение деформируемости.* Деформируемость эритроцитов определяли методом измерения начальной скорости протекания суспензии клеток через ядерные мембранные фильтры под действием силы тяжести с помощью прибора ИДА-01, представляющего собой модификацию гемореометра Хансса [5]. В отличие от гемореометра в приборе ИДА-01 в качестве датчика уровня жидкости используется съемная система из трех электродов. Время вытекания 250 мкл жидкости автоматически регистрируется на цифровом табло с точностью до 0,1 с. Для каждого индивидуального фильтра определяли время протекания 250 мкл ресуспендирующего буфера (t_b) и такого же объема суспензии эритроцитов (t_s) и вычисляли величину показателя деформируемости D:

$$D = t_b \cdot Ht(\%) / (t_s - t_b).$$

В работе использовали фильтры диаметром 13 мм с диаметром пор 3 мкм и толщиной 9 мкм за исключением опытов, в которых исследовали зависимость деформируемости (фильтруемости) от диаметра и длины пор. Деформируемость измеряли при комнатной температуре, кроме опытов, в которых изучали температурную зависимость.

3. *Обработка эритроцитов глутаровым альдегидом.* Отмытые эритроциты ($Ht = 70\%$) инкубировали 20 мин с равным объемом изотонического HEPES-буфера, содержащего глутаровый альдегид при комнатной температуре. Затем клетки осаждали центрифугированием и после удаления надосадка дважды отмывали 4-кратным объемом 10 мМ раствора глицина в физиологическом растворе, еще раз отмывали изотоническим HEPES-буфером и, наконец, ресуспендировали в этой же среде.

4. *Приготовление репарированных теней эритроцитов с пониженным содержанием гемоглобина.* Для приготовления репарированных теней эритроцитов к 3 мл отмытой эритроцитной массы с $Ht = 70\%$ добавляли 12 мл гипотонического раствора А (10 мМ Na_2HPO_4), охлажденного до 4°C. после инкубации в течение 1 мин добавляли 15 мл гипертонического раствора В (1800 мг NaCl/100 мл раствора А), нагретого до 37°C, и инкубировали при этой температуре 30 мин. Затем полученные запечатанные тени эритроцитов отмывали в HEPES-буфере и ресуспендировали в нем же. Содержание гемоглобина в исходных эритроцитах было 29,5 г/л, а в репарированных тканях 11,2 г/л.

5. *Другие методы.* Объем эритроцитов измеряли на гемоанализаторе Coultronics (Франция).

Концентрацию гемоглобина определяли цианметгемоглобиновым методом.

Результаты и обсуждение

Представленная в работе [4] математическая модель позволяет интерпретировать экспериментальные кривые зависимости фильтрационного показателя от осмотичности среды (фильтрационные кривые) как результат взаимодействия клетки с определенными параметрами и цилиндрической поры с заданными размерами. Согласно модели значение фильтруемости обращается в ноль при тех значениях осмолярности среды, которые соответствуют достижению клеткой критического объема $V_{\text{крит}}$, определяемого только диаметром и длиной поры, с одной стороны, и площадью поверхности эритроцита, с другой стороны. Иными словами, утверждается, что значение осмотичности, при котором показатель деформируемости обращается в ноль, определяется только геометрическими па-

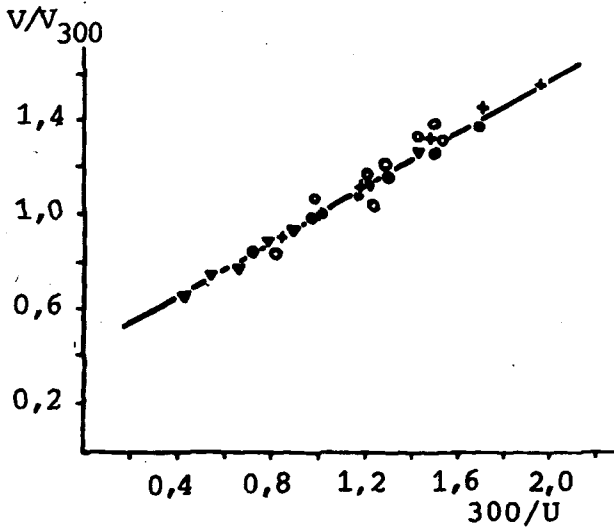


Рис. 1. Зависимость нормированного объема эритроцита V/V_{300} от нормированного обратного осмотического давления $300/u$. V_{300} - изотонический объем эритроцита

раметрами поры и клетки и не зависит от механических или иных свойств эритроцита или его мембраны.

Ресуспендируя эритроциты в средах различной осмотичности, можно варьировать средний объем этих клеток. Зависимость объема эритроцита от обратного осмотического давления среды линейна и имеет вид:

$$V = f/u + V_0 [6,7].,$$

где f и V_0 - константы, величина которых зависит от содержания гемоглобина в клетке, а u - осмотическое давление ресуспендирующей среды. Сложность количественной оценки указанных констант заключается в том, что абсолютные

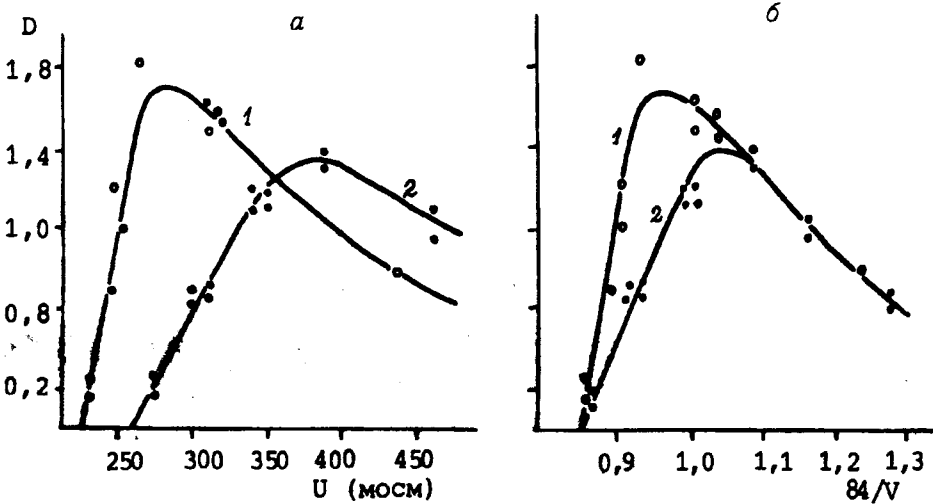


Рис. 2. Зависимость показателя деформируемости от осмотичности среды (а) и от нормированного обратного объема клеток (б) для интактных и хранившихся эритроцитов. 1 - интактные донорские эритроциты ($V_{300} = 84 \text{ мкм}^3$), 2 - донорские эритроциты, хранившиеся при 4°C 16 сут ($V_{300} = 92 \text{ мкм}^3$)

значения объемов эритроцитов, измеренные разными авторами (и разными методами), сильно отличаются друг от друга [8–12]. Однако при нормировании значений объема V относительно его изотонического значения наблюдается удовлетворительное совпадение различных литературных и полученных нами экспериментальных данных. Соответствующая кривая приведена на рис.1. Исходя из этой кривой и принимая изотонический объем V_{300} интактных эритроцитов равным 84 мкм^3 (это значение получено методом изотопного разбавления, что исключает большую часть артефактов, наблюдаемых при измерениях другими методами [13]), получаем $f = (V_{300} - 36,5)300$; $V_0 = 36,5$.

На рис.2,а представлены кривые зависимости деформируемости свежeweделенных донорских эритроцитов (кривая 1) и тех же эритроцитов после 2-недельного хранения в пластиковых контейнерах при 4°C (кривая 2). Можно видеть, что обе кривые (фильтрационные) имеют выраженный оптимум. Максимальное значение показателя деформируемости для свежeweделенных клеток соответствует изотоническим условиям, что согласуется с литературными данными [14], а для хранившихся сдвигается в гипертоническую область. В обоих случаях при уменьшении осмотичности среды от значений, соответствующих максимуму, деформируемость резко и практически линейно снижается. При экстраполяции линейного участка кривой для свежeweделенных эритроцитов до его пересечения с осью абсцисс точка пересечения находится в интервале 220–230 мосм, а для хранившихся – 260–270 мосм.

Как видно на рис.2, максимальное значение показателя деформируемости, а также наклон линейного участка для хранившихся эритроцитов снижены по сравнению с соответствующими показателями для свежих клеток.

Результаты тех же измерений, которые представлены на рис.2,а как зависимость показателя деформируемости от осмотичности ресуспендирующей среды, изображены на рис.2,б как функция показателя деформируемости от обратного клеточного объема. Объемы свежeweделенных и хранившихся эритроцитов при различных значениях осмотичности вычисляли, исходя из измеренных изотонических значений объема (соответственно 84 и 92 мкм^3).

Принимая площадь поверхности интактного эритроцита равной 145 мкм^2 [9,12] и считая, что при двухнедельном хранении в эритроцитах не изменяются существенно ни площадь поверхности, ни содержание гемоглобина [15,16], на основании модели следует ожидать прохождения соответствующих кривых через одну и ту же точку на оси абсцисс, а именно, через точку, соответствующую $V = V_{\text{крит}} = 100 \text{ мкм}^3$. Как видно из рис.2, в пределах точности эксперимента это, действительно, имеет место.

Дополнительными подтверждениями чисто «геометрического» механизма прекращения прохождения эритроцита через пору при увеличении объема клетки явились эксперименты, в которых фильтрационные кривые снимали при разных значениях гидростатического давления (рис.3) и при разных значениях объемов пор мембранных фильтров (рис.4).

На рис.3 представлены фильтраци-

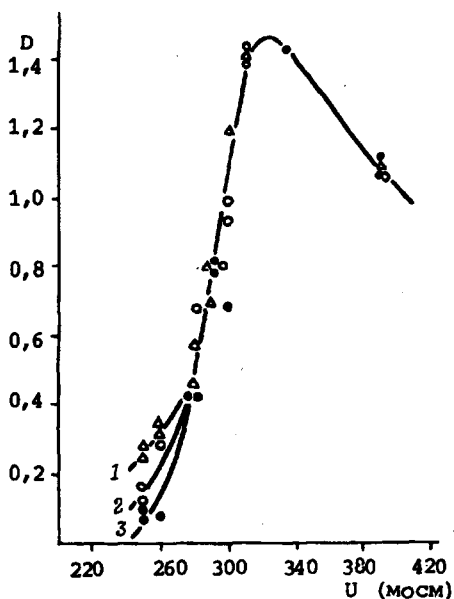


Рис. 3. Кривые зависимости показателя деформируемости эритроцитов от осмотичности среды, снятые при разных значениях фильтрационного давления p (мм вод.ст.): 1 – 60; 2 – 120, 3 – 180

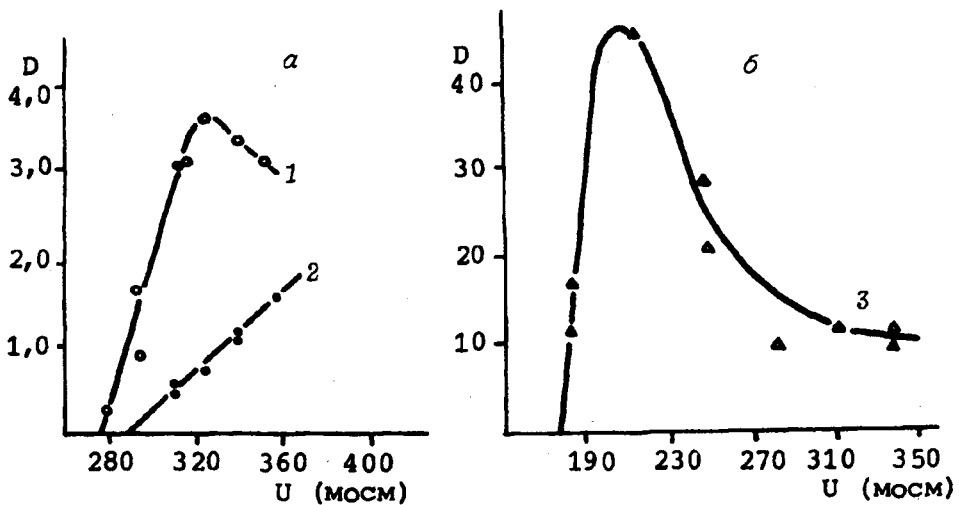


Рис. 4. Кривые зависимости показателя деформируемости эритроцитов от осмотичности среды, полученные при фильтровании через фильтры с разным диаметром пор d (мкм): 1 - 3, 2 - 3,6, 3 - 5

онные кривые, снятые при следующих значениях гидростатического давления: 60, 120 и 180 мм водяного столба. Можно видеть, что все три кривые в основном совпадают, разделяясь на три ветви лишь в области низких значений показателя деформируемости, а именно, там, где линейность зависимости D от $1/u$ уже не соблюдается. По-видимому, конечные (и возрастающие с ростом гидростатического давления) значения D при значениях u , меньших, чем $u_{\text{крит}}$, объясняются наличием на фильтрах некоторого количества перекрывающихся пор (дублетов, триплетов и т.д. [17]), что позволяет проходить через них эритроцитам с объемами, большими, чем $V_{\text{крит}}$. Отметим, что в согласии с моделью вклад этих перекрывающихся пор становится заметным лишь при приближении осмотического давления и соответственно клеточного объема к критическим значениям, т.е. когда деформируемость становится относительно низкой.

На рис.4 приведены фильтрационные кривые, полученные для одних и тех же эритроцитов на трех типах фильтров, имеющих разные значения диаметра пор. Сравнивая критические значения осмотического давления для разных типов фильтров с соответствующими расчетными значениями, полученными с помощью модели, наблюдаем хорошее соответствие. Считая по-прежнему площадь поверхности эритроцита равной 145 мкм^2 , имеем для фильтра с диаметром пор 5 мкм $V_{\text{крит}} = 148 \text{ мкм}^3$ [4]. Из рис.4,а следует, что для фильтра с диаметром пор 3 мкм $u_{\text{крит}} = 290 \text{ мосм}$, т.е. данные эритроциты имеют средний изотонический объем $V_{300} = 99 \text{ мкм}^3$. Такие клетки достигнут объема 148 мкм^3 при $u_{\text{крит}} = 170 \text{ мосм}$, что удовлетворительно согласуется с экспериментальными данными (см. рис.4,б). Расчетное значение $u_{\text{крит}}$ для тех же эритроцитов и фильтра с диаметром пор $3,6 \text{ мкм}$ также соответствует найденному в эксперименте (рис.4,а).

Таким образом, совокупность экспериментальных результатов количественно подтверждает один из основных выводов модели, который утверждает, что при V стремящемся к $V_{\text{крит}}$, определяемому параметрами поры и площадью поверхности эритроцита, показатель деформируемости, т.е. фильтруемость через эту пору стремится к нулю.

Возвращаясь к рис.2, мы видим, что при сдвиге осмотичности среды вправо от значений, соответствующих D_{max} , наблюдается постепенный спад показателя деформируемости D . Согласно модели этот спад обусловлен вязкой компонентой силы трения F_1 , которая может определяться концентрацией внутриклеточного

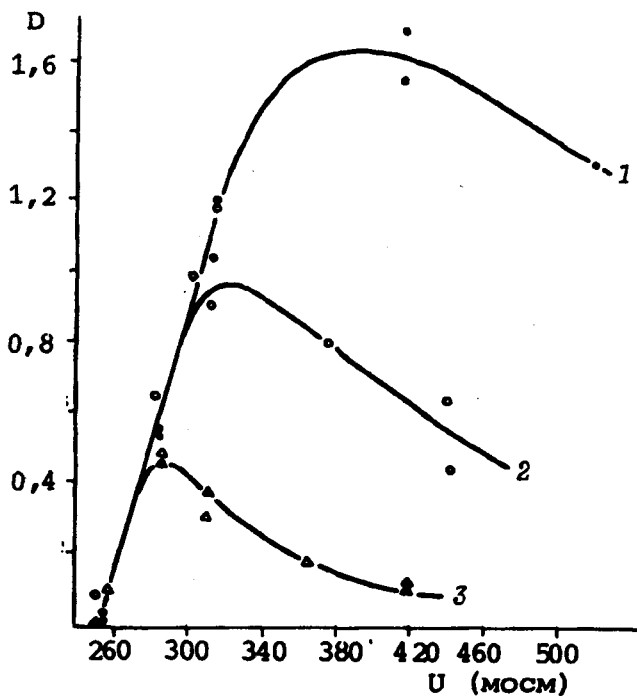


Рис. 5. Зависимость показателя деформируемости эритроцитов от осмотичности среды в контроле (1) и после обработки глутаровым альдегидом (2 - 0,07%, 3 - 0,1%)

гемоглобина [4]. Для проверки этого предположения мы изменяли вязкость содержимого клетки двумя способами: путем обработки эритроцитов растворами с различными концентрациями глутарового альдегида и путем приготовления репарированных теней с пониженным содержанием гемоглобина. Результаты этих экспериментов представлены на рис.5 и 6.

Из приведенных рисунков следует, что снижение концентрации гемоглобина

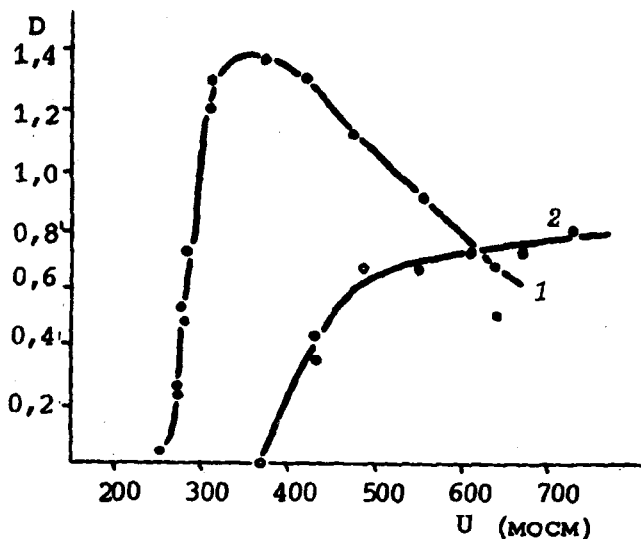


Рис. 6. Зависимость показателя деформируемости эритроцитов от осмотичности среды для исходных эритроцитов (10 сут хранения - 1) и для приготовленных из них репарированных теней (2)

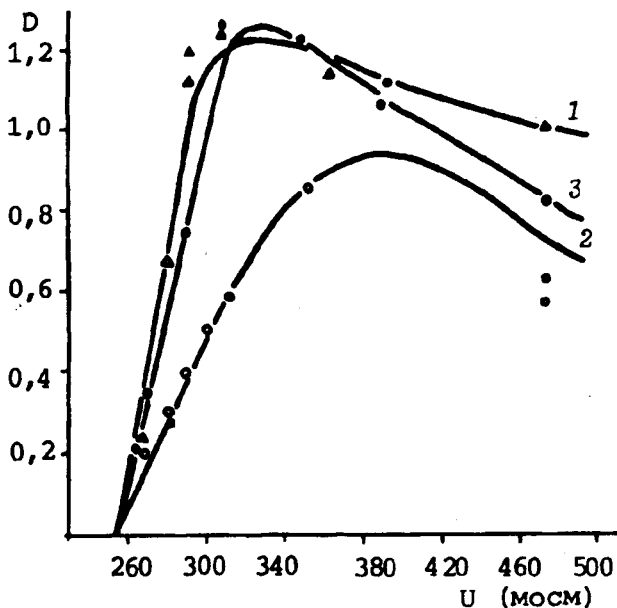


Рис. 7. Кривые зависимости показателя деформируемости эритроцитов из крови (4 суток хранения от осмотичности среды), снятые при разных температурах (°C): 1 - 37, 2 - 20, 3 - 15

в 2,6 раза приводит к практическому исчезновению спада деформируемости после достижения ею максимального уровня вплоть до $u = 530$ мосм (рис.5), а увеличение вязкости содержимого клетки в результате обработки ее растворами с возрастающими концентрациями глутарового альдегида, напротив, приводит к тому, что спад проявляется при существенно меньших, чем в норме, значениях осмолярности (рис.6). Таким образом, характер «гипертонического» участка фильтрационной кривой может давать информацию о содержании и, возможно, о свойствах гемоглобина в эритроците. Отметим, что значительный сдвиг вправо фильтрационной кривой на рис.5 связан, очевидно, с существенным увеличением изотонического объема запечатанных эритроцитов.

Наименее изученным остается в настоящее время вопрос об интерпретации крутизны линейного участка фильтрационной кривой. В терминах модели она определяется изгибной упругостью клеточной мембраны или целой клетки. Нам удалось получить фильтрационные кривые с различными значениями крутизны линейного участка, варьируя температуру измерения показателя деформируемости.

На рис.7 представлены фильтрационные кривые для одних и тех же хранившихся 4 сут эритроцитов. Непосредственно перед измерением каждой точки клетки ресуспендировали в среде с заданной температурой, после чего фильтрование проводили при этой же температуре. Можно видеть, что фильтрационная кривая, снятая при 15°C, имеет значительно меньший наклон линейного участка, чем кривые, снятые при 20 и 37°C. Кажется вероятным, что описанный эффект, действительно, связан с зависящими от температуры изменениями механических свойств мембраны эритроцита, тем более, что имеются данные о существовании в интервале температур 15–20°C фазового перехода в липидном биослое клеточных мембран [18,19].

Таким образом, имеет место хорошее соответствие результатов эксперимента предложенной математической модели. В настоящее время мы не располагаем достаточным количеством экспериментальных данных, чтобы проверить все выводы и предсказания модели. Однако в соответствии с развитыми в ней пред-

ставлениями восходящий участок экспериментальной фильтрационной кривой достаточно близок к линейному. Измеренные значения «критического объема» и соответствующей «критической осмотичности» при разных значениях диаметра каналов, гидростатического давления и изотонического объема эритроцитов хорошо согласуются с оценками, сделанными на основе модели. Нашли свое подтверждение предположения о роли вязкости гемоглобина в спаде показателя деформируемости в гипертонической области и о влиянии жесткости мембраны на крутизну линейного участка фильтрационной кривой.

Для дальнейшего уточнения взаимного соответствия модельной и реальной систем взаимодействия эритроцитов с мембранным ядерным фильтром потребуются дополнительные исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stuart J.* // *Blood Rev.* 1990. V.4, № 3. P.141.
2. *Belboul A.* // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1990. V.50, № 3. P.297.
3. *Kontsouris D., Guillet R., Wenby R.B., Meiselman H.J.* // *Biorheology.* 1989. V.26. P.153.
4. *Атауллаханов Ф.И., Витлицкий В.М., Лисовская И.Л., Тужилова Е.Г.* // *Биофизика* (в печати).
5. *Hanss M.* // *Biorheology.* 1983. V.20. P.199.
6. *Savitz D., Sidel V.W., Solomon A.K.* // *J. Gen. Physiol.* 1964. V.48. P.79.
7. *Freedman J., Hoffman J.H.* // *J. Gen. Physiol.* 1979. V.74. P.157.
8. *Staubli M., Roessler B., Straub P.W.* // *Blut.* 1987. V.54. P.239.
9. *Lindercamp J., Meiselman H.J.* // *Blood.* 1982. V.59. P.1121.
10. *Mohandas N., Kim Y.R., Tycko D.H.* // *Blood.* 1986. V.68. P.506.
11. *Reinhart W.H., Chien S.* // *Am. J. Physiol.* 1985. V.248. P.473.
12. *Westerman M.P., Piers L.E., Jensen W.N.* // *J. Lab.Clin.Med.* 1961. V.57. P.819.
13. *Marvel J.S., Sutura S.P., Krogstad D.J.* // *Blood cells.* 1991. V.17. P.497.
14. *Kontsouris D., Delatour-Hanss F., Hanss M.* // *Biorheology.* 1985. V.22. P.119.
15. *Wegner G., Kucera W.* // *Biomed. Biochim.Acta.* 1989. V.48. P.561.
16. *Wolf L.C.* // *Transfusion.* 1985. V.25. P.185.
17. *Stuart J.* // *J. Clin. Pathol.* 1985. V.38. P.965.
18. *Hanss M., Kontsouris D.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V.769. P.461.
19. *Nash G.B., Meiselman H.J.* // *Biorheology.* 1985. V.22. P.73.

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Поступила в редакцию
08.06.1993

ANALYSIS OF GEOMETRICAL PARAMETERS AND MECHANICAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTES BY FILTRATION THROUGH MEMBRANE NUCLEAR FILTERS.

II. EXPERIMENTAL VERIFICATION OF THE THEORETICAL MODEL

LISOVSKAYA I.L., ATAULLAHANOV F.I., TUZHILOVA E.G., VITLITSKY V.M.

Haematological Scientific Center, Russian Ac.Med.Sci., Moscow

In the accompanying paper the process of erythrocyte passage through pores of membrane nuclear filters has been modelled. In order to test the model we have studied how the filtration rate of human erythrocyte suspension depends on osmoticity of the resuspending medium at various experimental conditions. We have tested and verified the model conclusion that the zero filtration rate is reached at the critical osmoticity value which depends only on geometrical parameters of the pore and the cell and not on other properties of the erythrocyte. It has been demonstrated that the relative filtration rate only weakly depends on the hydrostatic pressure, in agreement with the model predictions. There is a good correspondence between the model and the experimental data about how the filtration rate is influenced by the viscosity of the intracellular content and the mechanical characteristics of the erythrocyte membrane at various temperatures.