

УДК 57.043

ФІЗИКО-МАТЕМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЩІЛЬНОСТІ РОЗПОДІЛУ ЕРИТРОЦИТІВ ДОНОРСЬКОЇ І ПУПОВИННОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ЗА ІНДЕКСОМ СФЕРИЧНОСТІ

Є.О.Гордієнко*, О.І.Гордієнко*, І.Ф.Коваленко*, Ю.Є.Паніна*, Алексєєв О.О.**

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 61015, Харків, вул. Переяславська, 23**

*Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, 61077, Харків, пл. Свободи, 4***

Поступила в редакцію 23 квітня 2000р.

За експериментально визначеними кривими осмотичної крихкості знайдені функція та щільність розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові за індексом сферичності при температурах 37° С і 3° С.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: еритроцити людини, метод малокутового розсіяння світла, індекс сферичності.

Визначення осмотичної крихкості еритроцитів людини і тварин вже давно застосовується в якості діагностичного тесту для встановлення їх функціональної повноцінності. Експериментальне вимірювання цього показника здійснюється таким чином. Невелика кількість еритроцитів змішується з гіпотонічними розчинами хлориду натрію, об'єм якого значно перевищує загальний об'єм клітин. Далі будь-яким чином, наприклад, по вмісту гемоглобіну в надосадковій рідині відносно повної кількості гемоглобіну в тому ж числі еритроцитів, визначається частка клітин, які зазнали гемолізу при спливанні достатньо великого проміжку часу експозиції клітин в цьому розчині. Почергово змішуючи еритроцити в гіпотонічні розчини хлориду натрію різної концентрації (в діапазоні від 0,15 М до 0,06М) знаходять залежність частки еритроцитів, що зазнали гемолізу після тривалого контакту з гіпотонічним розчином хлориду натрію, від концентрації останнього:

$$h = \frac{N_r}{N} = h(n^{out}) \quad (1).$$

Тут N_r - число еритроцитів, що зазнали гемолізу в гіпотонічному розчині хлориду натрію з концентрацією n^{out} , N - повне число еритроцитів, внесених в цей розчин.

Мета даної роботи полягає в тому, щоб, виходячи із сучасних теоретичних уявлень щодо процесу гіпотонічного гемолізу, здобути з експериментально визначеної залежності (1) інформацію про первісний розподіл так званого індексу сферичності еритроцитів в дослідженій популяції клітин і залежність цього клітинного параметру від температури.

Індексом сферичності еритроциту в первісному стані (до контакту з гіпотонічним розчином хлориду натрію) називається величина

$$P_0 = \frac{S_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi} \cdot V_0},$$

де S_0 і V_0 - площа поверхні мембрани еритроциту і його об'єм в цьому стані. Цей геометричний параметр є кількісною мірою відмінності форми мембрани еритроциту від сферичної. Для сферичної клітини $S_0 = 4\pi R_0^2$, $V_0 = \frac{4}{3}\pi R_0^3$ і P_0 дорівнює одиниці. В міру відхилення форми клітини від сферичної параметр P , очевидно, збільшується і наближається до значення

$$P = \frac{S_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi} \cdot V_n},$$

де V_n - об'єм, зайнятий внутрішньоклітинним гемоглобіном. З іншого боку, якщо $P < 1$, то мембрана сфероциту неодмінно зазнає ізотропного розтягу.

Зміна об'єму клітин V з часом t в гіпотонічному розчині не проникаючої в клітини речовини до моменту, коли клітина стає сферою, описується звичайним диференціальним рівнянням

$$\frac{dV}{dt} = S_0 L_p R T (n^{in} - n^{out}) \quad (2),$$

де L_p - коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани, n^{in} і n^{out} - концентрація (моль/м³) внутрішньо- і позаклітинного розчинів відповідно, R - універсальна газова постійна, T - абсолютна температура. Переходячи до безвимірних змінних $y = V/V_0$ (відносний об'єм клітини), $\hat{n}^{in} = n^{in}/n^{in}(0)$, $\hat{n}^{out} = n^{out}/n^{in}(0)$ (приведений осмотичний тиск внутрішньо- і позаклітинного розчину), де $n^{in}(0)$ - початкова концентрація внутрішньоклітинного розчину, можна представити (2) у вигляді

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_o} (\hat{n}^{in} - \hat{n}^{out}) \quad (3)$$

де $\tau_o = \left[\frac{S_0}{V_0} L_p R T n^{in}(0) \right]^{-1}$ - характерний час, за який вирівнюються сумарні концентрації внутрішньо- та позаклітинного розчинів. Для еритроцита людини, котрий порівняно з іншими клітинами має аномально високі значення поверхнево-об'ємного відношення S_0/V_0 і коефіцієнту фільтрації L_p , $\tau \approx 10^{-2}$ с. Тому значення сумарних концентрацій розчинених всередині і поза клітинами речовин практично миттєво стають однаковими.

Оскільки, об'єм позаклітинного розчину значно перевищує об'єм вміщених в нього еритроцитів, $\hat{n}^{out}$ можна вважати незмінним і рівним його початковому значенню $\hat{n}^{out} = \hat{n}^{out}(0)$. За визначенням $n^{in} = \frac{N^{in}}{V - V_n}$, N^{in} - сумарна кількість молів розчинених всередині клітини речовин. У початковий момент часу

$$n^{in}(0) = \frac{N^{in}}{V_0 - V_n} \quad (4)$$

і

$$\hat{n}^{in} = \frac{n^{in}}{n^{in}(0)} = \frac{V_0 - V_n}{V - V_n} = \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} \quad (5),$$

де $\alpha = V_n/V_0$ - об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин.

За даними роботи [1] для еритроцита людини $\alpha = 0,42$. З урахуванням (4), (5)

$$y_\infty = \alpha + \frac{1 - \alpha}{\hat{n}^{out}(0)} \quad (6).$$

Таким чином, практично миттєво відносний об'єм еритроцитів, занурених в гіпотонічний розчин ($\hat{n}^{out}(0) < 1$) непроникаючої речовини збільшиться до значення y_∞ . При цьому, очевидно, еритроцити набрякають, і та клітина, котра первісно мала індекс сферичності P_0 , буде мати індекс сферичності

$$P = \frac{\Sigma_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi} \cdot V_\infty} = \frac{\Sigma_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi} \cdot V_0 y_\infty} = P_0 \frac{1}{y_\infty} = P_0 \frac{1}{\alpha + (1 - \alpha)/\hat{n}^{out}} \quad (8)$$

де P - поточне значення індексу сферичності еритроцита, P_0 - первісне значення індексу сферичності еритроцита. При цьому значення індексу сферичності у частини еритроцитів набуде значення меншого за 1. Очевидно, це відбудеться з тими сфероцитами, площа поверхні мембрани яких за рахунок ізотропного розтягування перевищить P_0 . Відомо, що будь-яке скільки завгодно мале ізотропне розтягнення мембрани еритроциту при спливанні достатньо великого проміжку часу призводить до його гемолізу. Тому, при контакті з гіпотонічним розчином хлориду натрію прогемолізують всі клітини, індекс сферичності яких набуває значення, меншого за 1, тобто для яких $P_0 < \alpha + (1 - \alpha)/\hat{n}^{out}$.

Експериментально визначаючи, що при осмотичному тиску позаклітинного розчину $\hat{n}^{out}$ прогемолізувала частка клітин h , ми тим самим визначаємо частку еритроцитів, первісне значення

індексу сферичності $S_0^{3/2}/6\sqrt{\pi} \cdot V_0$ котрих було менше, ніж $y_\infty = \alpha + (1-\alpha)/\pi^{out}$. Переходячи від залежностей, що представлені на рис. 1 і 2 до залежностей $h = h(y)$, отримуємо первісний розподіл індексу сферичності в популяції еритроцитів досліджуваного донора, тобто залежність частки клітин, індекс сферичності яких перевищує відповідне значення аргументу [2]. Диференціюючи цю функцію по аргументу, знаходимо відповідну щільність розподілу індексу сферичності в досліджуваній популяції еритроцитів.

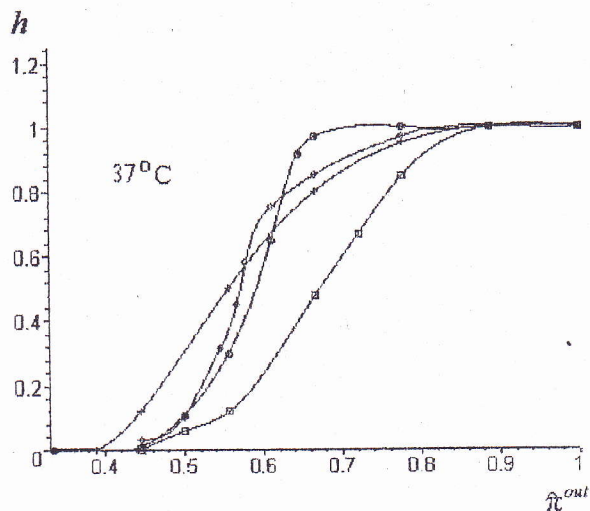


Рис.1.Криві осмотичної крихкості еритроцитів чотирьох донорів при температурі 37 °С

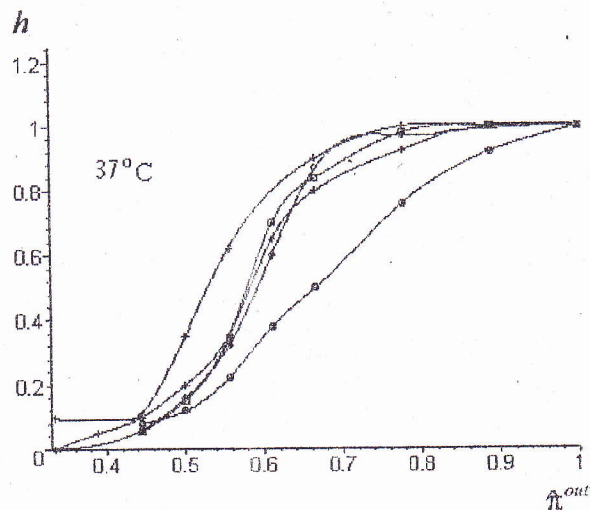


Рис.2.Криві осмотичної крихкості еритроцитів семи зразків плацентарної крові при температурі 37 °С

На рис. 1 і 2 подані експериментально визначені методом малокутового розсіювання світла [3] криві осмотичної крихкості еритроцитів донорської та пуповинної крові людини при температурі 37° С. З урахуванням залежності (7) з них легко визначаються відповідні функції розподілу, а також щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності (рис. 3,4). На рис. 5 (а,б) і 6 наведені також щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності для донорської при двох температурах (37 і 3° С) і для пуповинної крові при трьох температурах (37, 20 і 3° С).

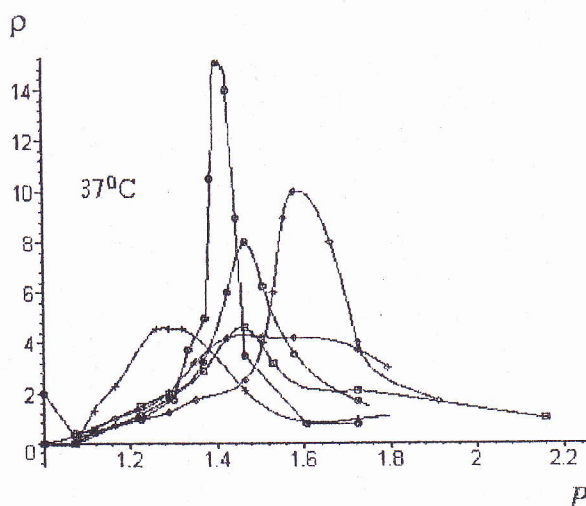


Рис.3.Щільності розподілу еритроцитів шести донорів за індексом сферичності при температурі 37°С.

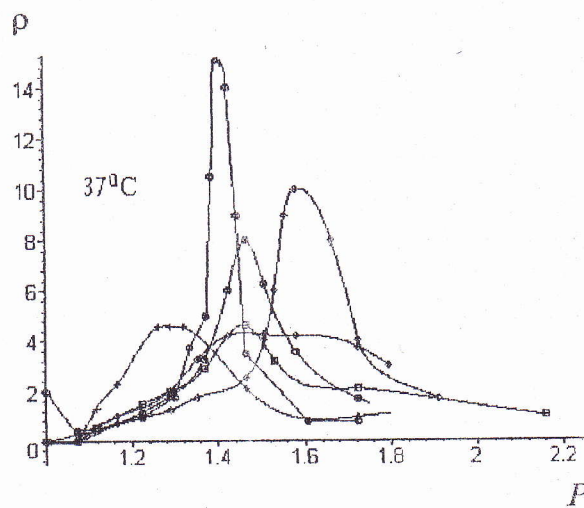


Рис.4.Щільності розподілу еритроцитів восьми зразків пуповинної крові за індексом сферичності при температурі 37 °С

З ортиманих результатів випливає, що розподіл еритроцитів за індексом сферичності для різних донорів і різних зразків пуповинної крові може значно відрізнятися один від одного, що, ймовірно, відбиває як індивідуальні особливості еритропоезу та загальний стан здоров'я донорів крові, так і умови заготівлі та зберігання зразків крові до початку дослідження.

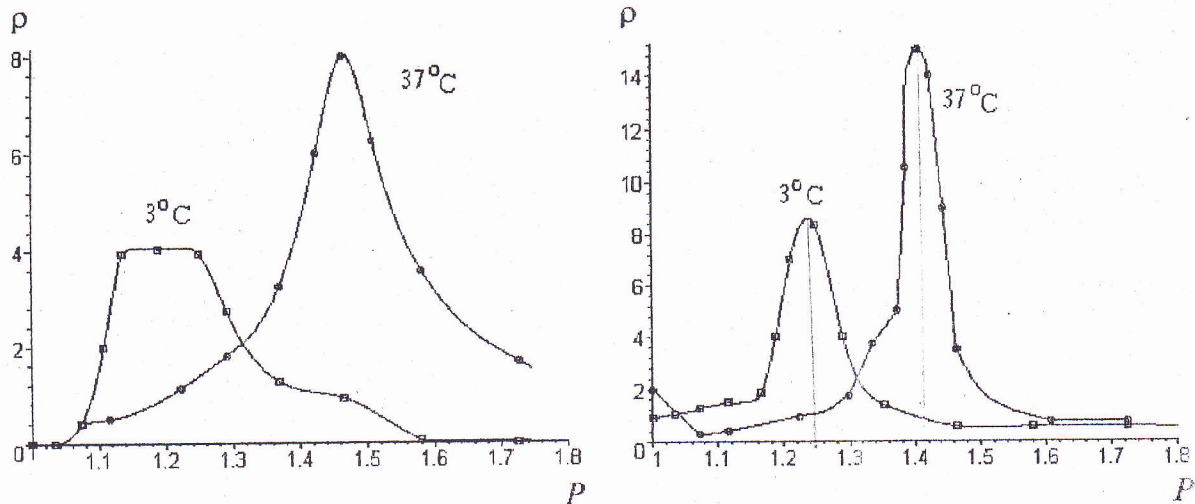


Рис.5.Щільності розподілу еритроцитів двох донорів (а,б) за індексом сферичності при температурах 37 і 3°C.

Щільність цього розподілу, як відомо [4], відбиває динамічну рівновагу між кількістю ретикулоцитів, які викидаються в периферійну кров з кісткового мозку, та кількістю старих еритроцитів, які руйнуються в селезінці. Перші мають значення індексу сферичності біля двох, а другі - біля одиниці, тоді як значення індексу сферичності нормоцитів в середньому дорівнює 1,42 та міститься в інтервалі значень від 1,45 до 1,21 (ці значення розраховані нами за даними, що наведені в [5]). Таким чином зсув щільності розподілу в той, або в інший бік від нормального свідчить або про наявність компенсаційного процесу відновлення кількості еритроцитів в периферійній крові.

Відмінність значення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності від нуля при $P = 1$ свідчить про те, що в популяції еритроцитів, що досліджується, деякі клітини є сфероцитами, тобто знаходяться в передгемолітичному стані. В руслі крові такі клітини неспроможні циркулювати без пошкодження по кровеносним мікросудинам [6].

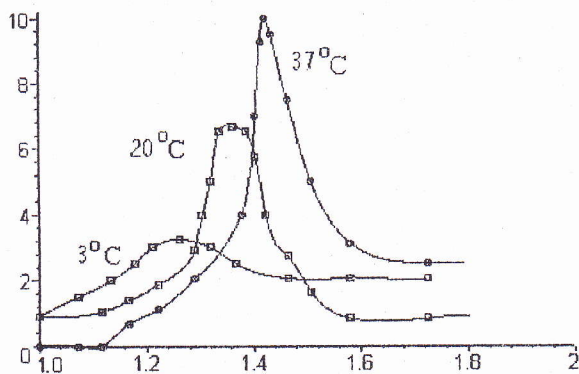


Рис.6.Щільності розподілу зразка пуповинної крові за індексом сферичності при температурах 37, 20 і 3 °C

Як видно, зниження температури гіпотонічного розчину хлориду натрію, в якому експонуються клітини, від 37° до 3° C веде до зменшення середнього значення індексу сферичності клітин. Оскільки внутрішньоклітинна рідина практично є незстисливою, можна вважати, що зменшення індексу сферичності відбувається виключно за рахунок зменшення площі поверхні мембран еритроцитів на величину, що приблизно дорівнює $\Delta S/S_0 = 2\Delta P_{\max}/P_{\max}$. З отриманих нами результатів випливає, що значення коефіцієнту теплового розширення площі поверхні мембран еритроцитів в інтервалі температур від 37°C до 3°C для різних зразків крові міститься в діапазоні від 10^{-3} до $4 \cdot 10^{-3}$ на 1°C, що цілком задовільно узгоджується з літературними даними [7].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 1.Canham P.B., Parkinson D.R.//Can. J. Physiol. Pharmacol.-1970.-V.48.-P.369-376.
- 2.Прохоров Ю.В., Розанов Ю.А.Теория вероятностей. -М.:Наука, 1973.-494с.
- 3.Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф., Паніна Ю.І.//Доповіді НАН України.-1998.-N11.-С.173-176.
- 4.Кассирский И.А., Алексеев Г.А.Клиническая гематология.-М.: Медицина,1970.-800с.
- 5.Fung E.C., Winston C.O., Tsang W.C.O., Paninucci P.//Biorheology.-1981.-V.18.-P.369-385.
- 6.Гардаш Л.И., Гордієнко Е.А.//Биофиз. вестник.-1999.-вып. 4(2).-С.53-58.
- 7.Ивене И., Скейлак Р.Механика и термодинамика биологических мембран.-М.:Мир,1982.-304с.