

© 1991 г.

ИВАНОВ И. Т., ТАНЕВА В. Т.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ПРОИЗВОДНОЙ КОНДУКТОМЕТРИИ И ФОТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СЛОИСТОСТИ КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ

Представлены экспериментальные доказательства возможности применения методов производной кондуктометрии и фотометрии для изучения и оценки структуры эритроцитной суспензии в случае вихревого движения. Показано, что амплитуда регистрируемых импульсов пропорциональна клеточной концентрации и угловой скорости и зависит от формы клеток.

Исследование структуры движущейся крови имеет большое прикладное значение ввиду многообразия и тяжести нарушений, наступающих при различных заболеваниях [1, 2]. Известно, что у движущейся крови существует стохастически усредненная структура, которая создается гидродинамическими силами, действующими на структурные элементы [3], и зависит от формы, деформируемости и взаимодействия между ними [4, 5]. Лучше всего исследован случай ламинарного течения в тонком цилиндрическом сосуде, при котором эффект Бернулли (градиент скорости создает градиент давления) вызывает появление так называемого эффекта сепарации, состоящего в следующем. Эритроциты концентрируются около оси цилиндра (радиальная диффузия), и в то же время плазма отделяется до стенки сосуда, где скорость ниже. Установлено, что этот эффект зависит от формы и деформируемости клеток, а также от вязкости суспензионной среды [6–8].

Слабее исследована структура клеточной суспензии в условиях движения в больших сосудах [1], где наблюдается расслоение, зависящее от формы клеток и скорости движения [3]. Мы проверили возможность применения методов производной кондуктометрии и фотометрии для оценки слоистости эритроцитной суспензии в случае вихревого движения.

Материалы и методы. Эритроцитную суспензию готовили из свежих, трижды промытых клеток, уравновешенных в физиологическом растворе. Для кондуктометрических измерений использовали суспензии с гематокритом от 0,05 до 0,40, в то же время при экспериментах с фотометрированием суспензию дополнительно разбавляли в 10^3 раз.

Под влиянием ряда факторов эритроциты могут совершать обратимую морфологическую трансформацию дискоцит ↔ эхиноцит ↔ сфероцит [9, 10]. В наших измерениях использовали суспензии из клеток, фиксированных в одном из указанных выше состояний. После того как клетки уже приняли желаемую форму, фиксирование проводили глутаровым альдегидом (концентрация 0,5%) в течение 5 мин при 20° С [11]. Фиксированные клетки промывали 2 раза в физиологическом растворе.

Дискоциты получали суспендированием в физиологическом растворе, содержащем 10 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) и 0,2% альбумина. Эхиноциты (смесь из диско- и сфероэхиноцитов) получали двумя способами, при которых обратимость возможна: истощение по АТФ и воздействие с салицилатом натрия (20 мМ, инкубирование в течение 30 мин). В первом случае дискоцитную форму восстанавливали инкубацией клеток при 37° С в среде, содержащей 10 мМ фосфатного буфера, 10 мМ глюкозы и 3 мМ аденозина [9]. Во втором случае восстановление формы клеток осуществляли отмыванием анестетика и добавлением альбумина и фосфатного буфера [12]. Сфероциты получали после суспендирования свежих клеток в гипотонический раствор (90 мМ NaCl). Обратную транс-

формацию совершали восстановлением изотоничности раствора и добавлением альбумина и фосфатного буфера.

Эритроцитную суспензию помещали в цилиндрический стеклянный сосуд и приводили в вихревое движение около вертикальной оси сосуда посредством магнитной мешалки. Электропроводимость суспензии измеряли кольцевыми электродами из гладкой платины, которые фиксировали на стенках сосуда. Фотометрирование суспензии осуществляли при помощи спектрофотометра «СПЕКОЛ-21» на длине волны 690 нм. В этом случае вихревое движение создавали механической мешалкой сверху. В обоих случаях выходной сигнал кондуктометра или спектрофотометра был дифференцирован по времени и подавался на вход дифференцирующего усилителя [13]. Эта операция позволяет делать равным нулю сигнал, соответствующий усредненным параметрам суспензии (который является неизменным во времени), и в то же время усиливать и регистрировать те импульсы, которые порождаются существованием структурных негомогенностей в суспензии. Регистрацию импульсов осуществляли быстродействующим потенциометром «Endim», а для их наблюдения импульсы подавали на осциллограф. Микроструктурную гомогенность покоящейся суспензии контролировали под микроскопом по методике [14]. Физиологический раствор дегазировали под вакуумом, после чего концентрацию кислорода в нем дополнительно уменьшали добавлением 10 мкМ дигитонина, что контролировалось электродом Кларка.

Результаты и обсуждение. При наличии в сосуде только вихревого движения суспензионной среды после дифференцирующего усилителя не появлялось никаких импульсов. Если, однако, движущаяся суспензионная среда содержала клетки, это сопровождалось появлением импульсов при кондуктометрировании и фотометрировании суспензии (рис. 1). При одинаковой угловой скорости движения амплитуда регистрируемых импульсов зависела линейно от клеточной концентрации. Такая зависимость между амплитудой импульсов и концентрацией клеток была установлена в очень широком интервале концентраций — от очень низких (фотометрически) до 40% (кондуктометрически).

На рис. 2 показана зависимость между амплитудой импульсов и величиной угловой скорости движения при одинаковой концентрации клеток. При отсутствии движения импульсы не регистрируются и суспензия визуально выглядит вполне гомогенной. После приведения мешалки в действие суспензия расслаивалась — появлялись горизонтальные слои, которые двигались снизу вверх, т. е. в сторону уменьшения угловой скорости движения суспензии. В этом случае появлялись импульсы с амплитудой, коррелирующей с интенсивностью вихревого движения. Прекращение движения суспензии вызывало одновременное исчезновение слоистой структуры суспензии и импульсов. Из этих результатов, полученных обоими методами, следует, что регистрируемые импульсы связаны с объемными эффектами, которые могут быть обусловлены концентрационными негомогенностями в объеме суспензии, вызванными характером ее движения. Необходимо отметить также, что импульсация соответствует по времени видимой структуре суспензии, созданной вихревым движением.

Ценную информацию относительно связи между слоистой макроструктурой суспензии и импульсацией дает показанная на рис. 3 зависимость импульсации от температуры. Как кондуктометрическая, так и фотометрическая импульсация имели постоянную амплитуду в интервале 10—50° С. После 50° С наступала резкая перемена, выражающаяся в одновременном исчезновении слоистой макроструктуры суспензии и регистрируемой импульсации. Установлено, что при достижении 50° С в эритроцитарных мембранах начинается быстрая денатурация основного структурного белка спектрина [15]. Этот процесс вызывает сферизацию суспендированных дискоцитов, протекающую в течение нескольких минут [16]. Наряду со сферизацией клеточные мембраны теряют способность деформироваться и становятся намного более жесткими [10]. Зарегистрированный на рис. 3 процесс совпадает по температуре и кинетике с этими изменениями клеточных мембран, которые являются следствием денатурации



Рис. 1

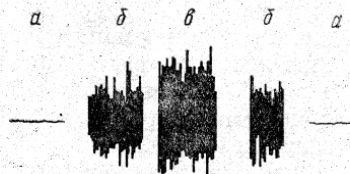


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость между амплитудой структурной импульсации электропроводности (экстинкции ϵ) эритроцитной суспензии и гематокритом (η); η : *a* - 0, *б* - 0,10, *в* - 0,20; ϵ : *a* - 0, *б* - 0,300; *в* - 0,600. Остальные условия эксперимента неизменны. Условия записи импульсов: чувствительность 10 мВ/см, скорость диаграммной бумаги 10^{-2} см/с, продолжительность регистрируемых импульсов 0,2-2 с

Рис. 2. Амплитуда структурной импульсации проводимости (экстинкции) эритроцитной суспензии при гематокрите $\eta=0,10$ ($\epsilon=0,300$) и различном числе оборотов мешалки, создающей вихревое движение: *a* - 0, *б* - 150, *в* - 300 мин^{-1}

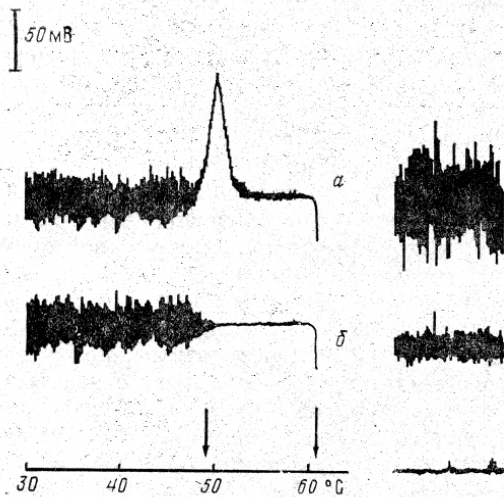


Рис. 3

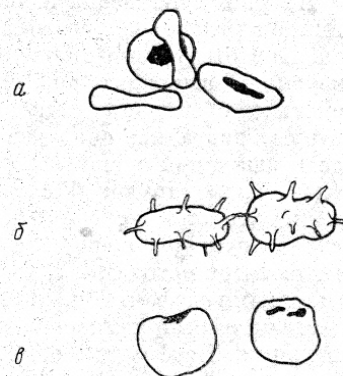


Рис. 4

Рис. 3. Температурная зависимость структурной импульсации проводимости (*a*) и экстинкции (*б*) суспензии из intactных эритроцитов. Стрелками обозначены температуры денатурации спектрина (50°C) и пороговой термогемолиты (62°C). Условия эксперимента: гематокрит $\eta=0,10$ ($\epsilon=0,300$), скорость нагрева $1,5 \text{ K/мин}$, число оборотов мешалки 150 мин^{-1} . Условия для записи импульсов см. рис. 1

Рис. 4. Зависимость структурной импульсации движущейся суспензии от формы суспендированных клеток: *a* - дискоциты, *б* - эхиноциты, *в* - сферо- и стоматоциты. Условия эксперимента: гематокрит $\eta=0,10$ ($\epsilon=0,300$), число оборотов мешалки 150 мин^{-1} , температура - комнатная

спектрина. Это совпадение указывает, что уменьшение импульсации после 50°C может находиться в прямой связи с наступающими при данной температуре изменениями клеточных мембран (сферизация и/или повышение жесткости).

Указанную возможность проверили следующими экспериментами. Известно, что фиксирование интактных эритроцитов глутаровым альдегидом резко повышает жесткость их мембран [17], причем дискоцитная форма клеток после денатурации спектрина сохраняется. Сравнивая амплитуду импульсаций суспензий, состоящих из фиксированных дискоцитов или из интактных дискоцитов при одинаковых прочих условиях (клеточная концентрация, угловая скорость), мы установили, что существенного различия в обоих случаях не наблюдается. Тот факт, что амплитуда импульсации практически не изменилась после употребления фиксатора, указывает на независимость амплитуды от жесткости клеточных мембран. В таком случае причина уменьшения импульсации после 50°C может быть только в изменении клеточной формы, на что указывает также результат следующего эксперимента. Из зависимости амплитуды импульсации от температуры было установлено, что в случае применения суспензии из фиксированных дискоцитов не наблюдается никакого изменения этой амплитуды в интервале $10-70^{\circ}\text{C}$ (не показано). Данные микроскопии показали, что в этом интервале температур форма клеток также сохраняется постоянной. Эти результаты можно объяснить существованием прямой связи между амплитудой импульсации и формой суспендированных клеток.

На рис. 4 приведены результаты, доказывающие существование такой связи. При измерении амплитуды импульсации электропроводности (экстинкции) эритроцитной суспензии было установлено, что при прочих равных условиях (клеточная концентрация, угловая скорость) она проявляет сильную зависимость от усредненной формы суспендированных клеток: максимальна при суспензиях, содержащих 100% дискоцитов, уменьшается по мере увеличения доли эхиноцитов и равна нулю при суспензиях, содержащих 100% сфероцитов. Такая зависимость между формой суспендированных клеток и регистрируемой импульсацией наблюдалась и при осуществлении обратной морфологической трансформации клеток, т. е. после восстановления дискоцитной формы клеток из сфероцитной наблюдалось и восстановление амплитуды импульсации, и наоборот. Например, параллельно с восстановлением нормального уровня АТФ в клетках (наблюдаемым по росту содержания дискоцитных форм в суспензии [9]), было зарегистрировано и увеличение амплитуды импульсации от нуля в начале инкубации до максимального уровня после 3 ч инкубации, когда все клетки переходили в дискоцитную форму.

В этих экспериментах тоже наблюдалась отмеченная выше связь между видимой структурой суспензии — расслоением суспензии — и наличием импульсации в суспензионной проводимости (экстинкции). В случаях, когда визуально наблюдалась структура в движущейся суспензии (при суспендировании дискоцитов или эхиноцитов), имела место сильная импульсация, и обратно — в отсутствие импульсации (при суспендировании сфероцитов) отсутствовало также и видимое расслоение в движущейся суспензии. Это позволяет утверждать, что регистрируемая импульсация в некоторых макропараметрах клеточной суспензии (электропроводность и экстинкция) отражает или соответствует наличию определенной макроструктуры суспензии, появляющейся вследствие движения этой суспензии.

Известно, что эритроциты не агрегируют в физиологическом растворе [14]. Применяя инъектирование глутарового альдегида в движущуюся суспензию, мы сделали попытку обнаружить образующиеся во время движения суспензии клеточные микроагрегаты, но безуспешно. До и после измерений под микроскопом не наблюдалось никаких клеточных агрегатов или неомогенности другого рода, кроме равномерно распределенных одиночных клеток. Это показывает, что регистрируемая импульсация и связанная с нею видимая макроструктура суспензии вызываются появ-

лением структурных негомогенностей вследствие действия гидродинамических сил. В этом смысле амплитуда импульсации может служить мерой слоистости (структурированности) движущейся суспензии, что имеет прикладное значение.

Полученные результаты показывают, что методами производной кондуктометрии и фотометрии можно оценить структурированность (слоистость) движущейся клеточной суспензии, которая существенно зависит от усредненной формы суспендированных клеток. Подобные эффекты при прецизионном спектрофотометрировании клеточных суспензий были замечены раньше [18, 19], но не нашли принципиального объяснения. Физическое объяснение этой импульсации, реализованное на основе полученных нами результатов, в известной степени повышает информативность указанных методов для биологических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каро К., Педли Т., Шротер Р., Сид У. Механика кровообращения. М.: Мир, 1981.
2. Левтов В. А., Регурер С. А., Шадрин Н. Х. Реология крови. М.: Медицина, 1982.
3. Чижевский А. Л. Структурный анализ движущейся крови. М.: Изд-во АН СССР, 1959.
4. Leonard E. F., Rahmin I., Angarska J. K. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1988. P. 501–512.
5. Braasch D. // Physiol. Rev. 1971. V. 51. P. 679.
6. Goldsmith H. L. // Fed. Proc. 1971. V. 30. P. 1578.
7. Thurston G. M. // Microvasc. Res. 1976. V. 11. P. 133.
8. Segre G., Silberger A. // J. Fluid Mech. 1962. V. 14. P. 136.
9. Nakao M., Nakao T., Yamazoe S. // Nature (L.). 1961. V. 187. P. 945.
10. Leblond P. Red Cell Shape / Eds Bessis M., Weed R. I., Leblond P. N. Y.: Springer Verlag, 1974. P. 95–105.
11. White J. G. // Thromb. Diath. Haemorrh. 1967. V. 18. P. 745.
12. Deuticke B. // Biochim. et biophys. acta. 1968. V. 163. P. 494.
13. Херпи М. Аналоговые интегральные схемы. М.: Радио и связь, 1983.
14. Ашкинази И. Я. Эритроцит и внутреннее тромбопластинообразование. Л.: 1977. С. 52–56.
15. Brandts J. F., Erickson L., Lysko K. et al. // Biochemistry. 1977. V. 16. P. 3450.
16. Rakow A. L., Hochmuth R. M. // Biorheology. 1975. V. 12. P. 1.
17. Heusinkveld R. S., Goldstein D. A., Weed R. I., Lacelle P. L. // Blood cells. 1977. V. 3. P. 175.
18. Tanaka Y., Noue K., Nojima S. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 600. P. 126.
19. O'Brien J. R. // J. Clin. Path. 1970. V. 23. P. 784.

Высший медицинский институт,
Стара Загора, Болгария

Поступила в редакцию
14.11.1990

APPLICATION OF THE METHODS OF DERIVATIVE CONDUCTOMETRY AND PHOTOMETRY FOR EVALUATING THE DYNAMICAL STRUCTURE OF CELL SUSPENSION

IVANOV I. T., TANEVA V. T.

*Department of Physics and Biophysics, Medical
Institute – Stara Zagora, Bulgaria*

Experimental proofs for the possibility of studying the dynamical structure of rotatory moving erythrocyte suspension with the methods of derivative conductometry and photometry are presented. The amplitude of the recorded impulses was proportional to the cell concentration and the angle velocity, and sprongly depended on the shape of the suspended cells.