

УДК 612.11.014.4

МОДЕЛЬ КИНЕТИКИ ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПУЧКА ЭЛЕКТРОНОВ И ИМПУЛЬСНОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Е. К. Козлова, А. П. Черняев, А. М. Черныш, У. А. Близнюк, П. Ю. Алексеева

(кафедра физики ускорителей высоких энергий)

В данной работе представлено математическое описание изменения численности эритроцитов в результате воздействия на них различных факторов: пучка электронов, импульсного электрического поля, а также их совместного воздействия. В модели учитывается характерная особенность кинетических кривых в результате комбинированного воздействия разнородными факторами. Полученные теоретические зависимости хорошо согласуются с экспериментальными данными.

В настоящее время широко исследуются нарушения структуры биомембран клеток, которые могут приводить к изменению их функционального состояния в целом. В работах [1–3] приведены экспериментальные данные кинетики гемолиза эритроцитов в физиологическом растворе в результате воздействия пучком электронов и импульсным электрическим полем, а также их комбинированного воздействия. Показано, что в результате комбинированного воздействия разнородных факторов скорость гибели эритроцитов больше, чем сумма скоростей при воздействии на них этих же факторов по отдельности. Целью данной работы является математическое описание изменения численности эритроцитов в результате воздействия на них вышеуказанных факторов. Для установления адекватности модели проводится сопоставление теоретических и экспериментальных кинетических кривых. Кинетической кривой в данном случае является зависимость концентрации эритроцитов в суспензии от времени $N(t)$. В экспериментах количество эритроцитов оценивалось по оптической плотности суспензии $D(t)$, которая прямо пропорциональна концентрации клеток: $D(t) = \kappa N(t)$, где κ — коэффициент пропорциональности, оптическая плотность раствора исходной суспензии равна D_0 . Оптическая плотность вещества измерялась с помощью фотоэлектрического концентрационного колориметра КФК-2МП.

Механизм осмотического гемолиза

Эритроциты являются хорошей модельной системой для изучения мембранных процессов. Эксперименты по воздействию различных физических факторов проводились на свежевыделенных эритроцитах, помещенных в изотонический солевой раствор (0.05 мл крови на 1 мл 0.9% изотонического раствора). Содержание белков в эритроцитах выше, а низкомолекулярных веществ ниже, чем в плазме. Осмотическое давление, создаваемое высокой внутриклеточной концентрацией белков, в значительной степени компенсируется малой концентрацией веществ, поэтому осмотическое давление в эритроци-

тах лишь немногим выше, чем в плазме: величина его как раз достаточна для обеспечения нормального объема этих клеток. Стабильность градиента ионов достигается посредством активного транспорта: мембранные белки переносят ионы через мембрану против концентрационного градиента. По причине этого изменение структуры мембраны или ингибирование активного транспорта ионов под внешним воздействием приводит к снижению трансмембранных концентрационных градиентов. Высокое внутриклеточное содержание белков, которое при этом остается постоянным, перестает компенсироваться, и осмотическое давление в эритроците возрастает. В результате вода начинает поступать в эритроцит. Эритроциты, имеющие форму дискоцита, могут увеличить свой объем примерно на 20%, до сферической формы, далее плохо растяжимая мембрана лопается, таким образом осуществляется осмотический гемолиз. В норме эритроциты не являются однородной массой клеток, а образуют систему, в которой закономерно сочетаются клетки различного возраста и состояния (эритроциты в крови живут примерно 100 дней). Распределение клеток по диаметру у здорового человека происходит по закону нормального распределения (кривая Прайс-Джонса, рис. 1), диаметр эритроцита лежит в диапазоне 5.2–9.75 мкм. Необходимо различное время для гемолиза каждого эритроцита. Это связано как с различием диаметров эритроцитов, так и с различием их исходного состояния. Гемолиз «старых» эритроцитов происходит быстрее, чем гемолиз «молодых». Характерное время гемолиза (время, за которое лизирует 50% клеток) для эритроцитов, помещенных в физиологический раствор, составляет 5 ± 2 дней [4].

Математическое описание

Сложность анализа экспериментальных кинетических кривых заключается в том, что измеряется суммарный эффект изменения количества клеток популяции. При этом необходимо учитывать как характеристики и процессы, происходящие в каждом эритроците, так и статистический вес эритроцита

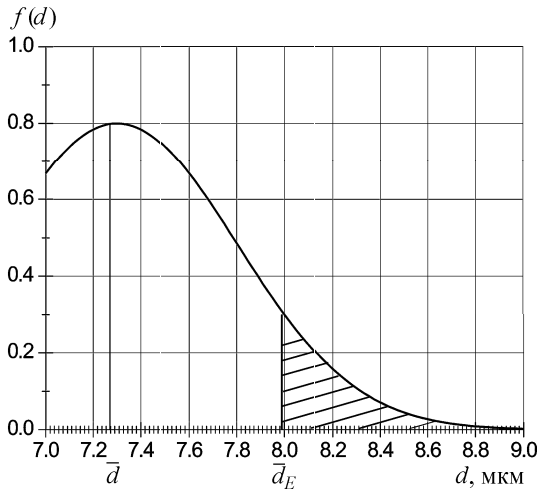


Рис. 1. Кривая Прайс-Джонса — кривая нормального распределения $f(d)$ эритроцитов по диаметру у здорового человека (\bar{d} — среднее значение диаметра эритроцита, \bar{d}_E — средний критический диаметр пробоя эритроцита для данной напряженности поля E)

с данным диаметром в популяции. Назовем временем жизни эритроцита t_l время, в течение которого эритроцит с данным диаметром существует в суспензии с момента ее создания до его «лопания» в результате осмотического гемолиза. В нашей модели будем считать, что

$$t_l = \frac{V_h - V}{q} = \frac{(1/6)\pi (d_h^3 - d^3)}{q}, \quad (1)$$

где V_h — объем, при достижении которого за счет осмоса воды эритроцит гемолизуется, V — исходный объем данного эритроцита, q — скорость изменения объема эритроцита, определяемая характерным временем нарушения его структуры, ионного обмена и осмоса воды в данных условиях, d_h — диаметр, при котором происходит гемолиз, d — исходный диаметр данного эритроцита. В исходной суспензии популяции эритроцитов имеются клетки различных диаметров. Допустим, что максимально возможный диаметр, который необходимо достичь для разрыва мембраны, будет одинаков для всех клеток и равен 12 мкм. На рис. 2 (кривая 1) приведена зависимость времени жизни эритроцита t_l от его диаметра d без внешнего воздействия, при этом $q = q_0$ — скорость изменения объема эритроцита в условиях естественной гибели без внешнего воздействия. Всего в данный момент времени, согласно закону нормального распределения эритроцитов по диаметру, в суспензии будет находиться N эритроцитов с данным диаметром d :

$$\begin{aligned} N &= N_0 F(d) = N_0 \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^d \exp\left(-\frac{(d-\bar{d})^2}{2\sigma^2}\right) dr = \\ &= N_0 \operatorname{erf}\left(\frac{d-\bar{d}}{\sqrt{2}\sigma}\right), \end{aligned} \quad (2)$$

где N_0 — исходная концентрация эритроцитов в физиологическом растворе, $F(d)$ — функция распре-

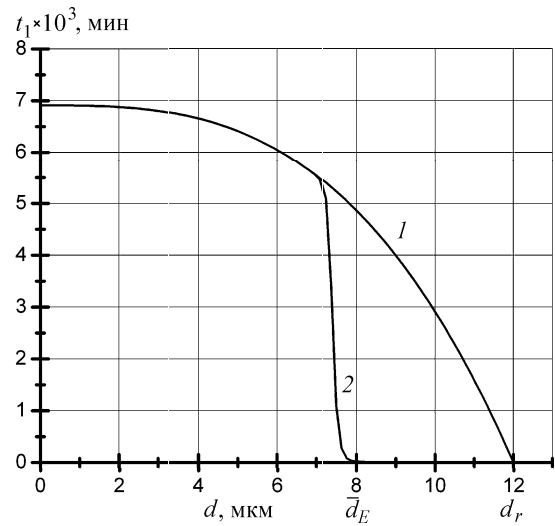


Рис. 2. Теоретическая кривая времени жизни эритроцитов с данным диаметром в суспензии: (1) в случае естественной гибели клеток; (2) в случае воздействия импульсного электрического поля ($\bar{d} = 7.5$ мкм, $\bar{d}_E = 8$ мкм, $d_h = 12$ мкм, $q_0 = 1$ мкм³/с)

деления эритроцитов по диаметрам, σ^2 — дисперсия диаметра, \bar{d} — среднее значение диаметра эритроцита (см. рис. 1). Зная кривую $t_l(d)$ (1) и принимая во внимание нормальный закон распределения (2), можно рассчитать количество эритроцитов, которые гемолизуются к моменту времени t . Рассмотрим влияние внешних факторов на количество эритроцитов и сравним с результатами проведенных экспериментов.

Воздействие пучком электронов

Под действием пучка электронов в суспензии развиваются ионизационные процессы, влекущие за собой сложную цепь реакций, в которую вовлечены белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы, молекулы воды и различные низкомолекулярные органические соединения. В облучаемом растворе зарождаются высокоактивные продукты радиолитического распада воды — свободные радикалы, способные диффундировать на значительные расстояния и поражать биологические структуры. В результате активированных процессов происходит множество разнообразных функциональных изменений, вызывающих поражение биомембран и последующую гибель клетки [5]. В результате функциональных и структурных повреждений биомембраны возрастает скорость осмотических процессов. Допустим, что при облучении суспензии пространственное распределение пучка электронов было равномерным. Тогда скорость изменения объема эритроцита, определяемая характерным временем нарушения структуры, ионного обмена, осмоса воды в условиях воздействия пучком ускоренных электронов, будет равна

$$q_e = q_0 + a\phi_e(d) = q_0 + a \left(1 - \exp\left(-\frac{cd^2}{d_h^2}\right)\right),$$

где a — коэффициент, учитывающий количество мембранных повреждений, $\phi_e(d)$ — функция, учитывающая зависимость количества повреждений мембраны от площади поверхности клетки, c — коэффициент пропорциональности. Тогда формула для времени жизни каждого эритроцита данного диаметра запишется в виде

$$t_l = \frac{(1/6)\pi (d_h^3 - d^3)}{q_e} = \frac{(1/6)\pi (d_h^3 - d^3)}{q_0 + a \left(1 - \exp\left(-\frac{cd^2}{d_h^2}\right)\right)}$$

С учетом распределения эритроцитов по диаметрам (1) можно построить график зависимости численности клеток от времени в случае воздействия

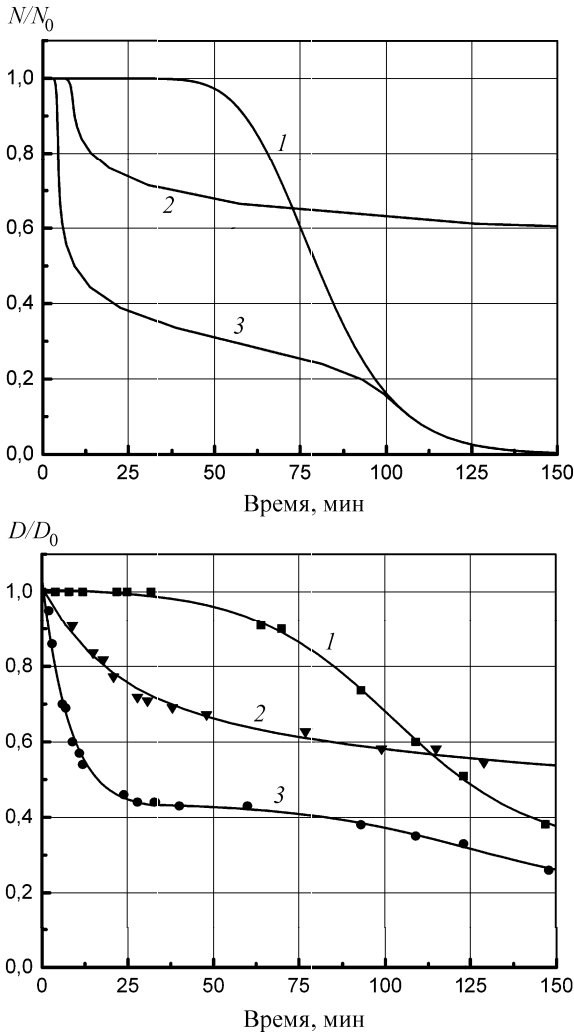


Рис. 3. (а) Теоретические кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов и импульсным электрическим полем: (1) в результате облучения электронами; (2) в результате воздействия импульсным электрическим полем; (3) в результате комбинированного воздействия ($q_0 = 1 \text{ мкм}^3/\text{с}$, $a = 150 \text{ мкм}^3/\text{с}$, $c = 1 \text{ м}^3$ и $b = b' = 1000 \text{ мкм}^3/\text{с}$, $d_h = 12 \text{ мкм}$, $\bar{d}_E = \bar{d}'_E = 7.5 \text{ мкм}$, $\sigma_E = 0.15 \text{ мкм}$). (б) Экспериментальные кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов и импульсным электрическим полем: (1) в результате облучения электронами; (2) в результате воздействия импульсным электрическим полем; (3) в результате комбинированного воздействия (время облучения 4 мин, ток пучка 0.8 мА, энергия импульса $E = 230 \text{ Дж}$)

пучком ускоренных электронов (рис. 3, а, кривая 1). Данный теоретический график хорошо согласуется с экспериментальным (рис. 3, б, кривая 1). Отличие графиков состоит в том, что на экспериментальном графике кривая не опускается до нуля, а проходит примерно по уровню 0.3. Подобное поведение объясняется неоднородностью распределения электронов в пучке при проведении опытов.

Воздействие импульсным электрическим полем

Известно, что биологические структуры различаются по электрическим характеристикам (по проводимости и относительной диэлектрической проницаемости). Эти различия проявляются при воздействии на суспензию электрического поля. Известно, что кратковременное воздействие электрического поля на живые клетки влияет на проницаемость их наружной мембраны [5]. Очевидно, повышение проницаемости обусловлено появлением пор в мембране, достаточно крупных для катионов, но не для гемоглобина. В естественной среде организма после окончания воздействия электрическим полем эти поры могут закрываться в течение 1–30 мин без существенного вреда для клеток. Если же клетки находятся вне организма, например суспензия эритроцитов, то вследствие увеличения проницаемости мембраны наблюдается резкое увеличение скорости их гемолиза. В экспериментах импульсное электрическое поле создавалось с помощью дефибриллятора [1]. Скорость изменения объема эритроцита в условии воздействия импульсным электрическим полем определяется количеством пор, образуемых в мембране в результате достижения критического значения разности потенциалов на внешней и внутренней сторонах мембраны $\Delta\varphi$. Будем считать, что количество повреждений в мембране подчиняется нормальному распределению. Пробиваются в основном эритроциты, диаметр которых больше, чем средний критический диаметр \bar{d}_E для данной напряженности электрического поля E :

$$\bar{d}_E = \frac{4}{3} \frac{\Delta\varphi}{E \cos \theta},$$

где $\Delta\varphi$ — разность потенциалов, при которой возможен пробой, θ — угол между нормалью к плоскости мембраны в данной точке и направлением вектора напряженности поля, E — напряженность электрического поля, определяемая в условиях эксперимента энергией электрического импульса. Допустим, дисперсия при этом σ_E^2 . Тогда количество пор n в мембране эритроцита диаметра d :

$$n \sim \text{erf} \left(\frac{d - \bar{d}_E}{\sigma_E} \right).$$

В этом случае скорость изменения объема эритроцита выразим как $q_E = q_0 + b\phi_E(d) = q_0 + b \text{erf} \left(\frac{d - \bar{d}_E}{\sigma_E} \right)$,

где b — коэффициент, характеризующий значение энергии электрического импульса, а $\phi_E(d)$ — функция, характеризующая скорость осмоса за счет образования пор в мембране под воздействием импульсного электрического поля, которая зависит от энергии импульса. При этом формула для времени жизни каждого эритроцита данного диаметра от момента начала измерения до момента лопания будет выглядеть как

$$t_l = \frac{(1/6)\pi (d_h^3 - d^3)}{q_E} = \frac{(1/6)\pi (d_h^3 - d^3)}{q_0 + b \operatorname{erf} \left(\frac{d - \bar{d}_E}{\sigma_E} \right)}.$$

На рис. 2 (кривая 2) представлена соответствующая зависимость времени жизни от диаметра $t_l(d)$. Видно, что t_l мало для эритроцитов с диаметрами, большими чем критический диаметр $d \geq d_E$, а для эритроцитов с диаметрами меньшими критического $d < d_E$ зависимость $t_l(d)$ такая же, как и для неповрежденных. График, выражающий зависимость количества эритроцитов от времени в данном случае, представлен на рис. 3, а (кривая 2). На рис. 3, б (кривая 2) представлена соответствующая экспериментальная кривая в результате воздействия импульсным электрическим полем.

Для действия электрического поля существует порог прочности биомембраны, который зависит от физиологической подолжительности жизни эритроцита, а значит, и его радиуса. Поэтому кривая 2 на рис. 3, а состоит как бы из двух частей, первая обусловлена повреждением мембран крупных клеток, а вторая — естественной гибелью клеток с малыми радиусами, на которые электрическое поле оказало незначительное влияние. Видно, что модельная кривая адекватна экспериментальной.

Комбинированное действие пучка электронов и импульсного электрического поля

Рассмотрим последовательное воздействие пучком электронов и импульсным электрическим полем на суспензию эритроцитов. Суспензия облучалась пучком электронов, а затем сразу же пробивалась электрическим импульсом дефибриллятора, после чего проводились измерения. В результате подобного воздействия скорость изменения объема эритроцита, определяемая характерным временем нарушения структуры, ионного обмена и осмоса воды, будет определяться как скорость, развивающаяся при воздействии первого фактора, к которой прибавится величина скорости за счет возникновения дополнительных повреждений от воздействия второго

фактора:

$$q_{e+E} = q_0 + a \left(1 - \exp \left(-\frac{cd^2}{d_h^2} \right) \right) + b \operatorname{erf} \left(\frac{d - \bar{d}_E}{\sigma_E} \right).$$

Запишем теперь формулу для времени жизни эритроцита:

$$t_l = \frac{(1/6)\pi (d_h^3 - d^3)}{q_0 + a \left(1 - \exp \left(-\frac{cd^2}{d_h^2} \right) \right) + b \operatorname{erf} \left(\frac{d - \bar{d}_E}{\sigma_E} \right)}.$$

Для аддитивности описания экспериментальных кривых необходимо изменить значения параметров \bar{d}_E и b по сравнению с их значениями в случае воздействия физических факторов по отдельности. Кривая 3 на рис. 3, а учитывает нелинейность эффектов комбинированного воздействия. В частности, при воздействии пучком электронов уменьшается эластичность мембраны клеток [5], в результате критический диаметр пробоя d'_E может уменьшиться: $d'_E < d_E$. Возможно, увеличивается количество и размер пор, образующихся в мембране при предварительном облучении клеток [6], это проявляется в увеличении коэффициента b' . Его новое значение $b' > b$. Следует отметить достаточно хорошее соответствие теоретических и экспериментальных кривых при комбинированном воздействии (рис. 3, б, кривая 3).

Нами экспериментально наблюдались нелинейные эффекты и при комбинированном действии химических веществ (эфир, поверхностно-активные вещества, перфторан) и импульсного электрического поля. В этом случае проявлялся эффект неаддитивности скоростей уменьшения численности эритроцитов при комбинированном действии. Данная модель также применяется для адекватного описания этих эффектов.

Литература

1. Козлова Е.К., Черняев А.П., Шведун В.И. и др. // Препринт НИИЯФ МГУ. № 2002-29/713.
2. Козлова Е.К., Фомина У.А., Черняев А.П. и др. // Медицинская физика. 2002. **14**, № 2. С. 45.
3. Козлова Е.К., Черняев А.П., Черныш А.М. и др. // Медицинская физика. 2003. **17**, № 1. С. 50.
4. Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека. Т. 2. М., 1996.
5. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. // Основы радиационной биофизики. М., 1982.
6. DeBuin K.A., Krassowska W. // Ann. Biomed. Eng. 1998. **26**, № 4. P. 584.

Поступила в редакцию
19.09.03