

## Применение метода кислотных эритрограмм при изучении адсорбционной способности эритроцитов

---

---

А. П. ГЕРВЕТОВСКИЙ

Способность эритроцитов адсорбировать своей поверхностью различные химические и биологические компоненты известна давно.

Так в опытах Folip и Denis (1912) быстро исчезал из кровотока парентерально введенный аланин, что авторы объясняли переходом его из крови в клетки. Б. И. Збарский (1925), проводя эксперименты с эриптоном, содержащим естественную смесь свободных аминокислот, установил, что при внутривенном введении кроликам от 1 до 3,5 г эриптона в сыворотке не обнаруживались даже следы введенных азотистых веществ. Но в пробах крови, где происходил хотя бы незначительный гемолиз, они содержались в тех или иных количествах.

А. Культиюгин и Н. Ивановский (1928) доказали, что эритроциты некоторых животных (кошек, собак и коров), тщательно отмытые физиологическим раствором, адсорбируют из него аланин. Извлечение аланина эритроцитами представляет собой адсорбционный процесс. Boyden (1951) для повышения адсорбционной способности нативных эритроцитов предложил обработку их раствором таниновой кислоты. В результате такой обработки эритроциты приобретали способность адсорбировать на своей поверхности протеины из солевого раствора.

Agiona, Segavia, Ortega, Perianis (1953) указывают, что поверхность эритроцитов, обработанных танином, адсорбирует как изогетероагглютинины, так и белки сыворотки, которые образуют на ней защитный покров, задерживающий гемагглютинацию. Это очень важно при переливании иногруппной крови.

Ursano-Fabrizio (1954), изучая влияние танина на специфические свойства крови, не установил гемагглютинации при обработке крови различных групп.

Scheiffarth и Frender (1956) считают непрямую реакцию гемагглютинации в модификации Бойдена одним из наиболее чувствительных серологических методов определения полных антител. Методику Бойдена можно использовать не только для определения антибактериальных, но и для антибелковых, антисывороточных, антиорганных и других антител. Как показали исследования Stavitsky и Arguilla (1955), обработка эритроцитов танином может давать неспецифическую агглютинацию. В связи с этим авторами предложена обработка эритроцитов бидиазотированным бензидином.

Hein (1955) провел сравнительные исследования действия на эритроциты танина, поаина, трипсина и пепсина. На обработку эритроцитов протеолитическими ферментами указывает также Доссе (1959).

Однако и до сего времени обработка танином эритроцитов с целью повышения их адсорбционной чувствительности является общепризнанной и широко применяется в гематологических, микробиологических и иммунологических исследованиях.

Так, Т. Рыщай (1956) Gold и Jlian (1957), В. А. Сидницын (1960), А. М. Крупникова, З. Н. Кондрашева и Т. Н. Юрьева (1960), Б. Н. Софронов (1964), А. Е. Эссель (1965) и многие другие исследователи широко используют таннизацию эритроцитов в постановке реакции непрямой гемагглютинации для индикации токсинов и антител к ним.

В настоящей работе мы ставили перед собой задачу выяснить возможность применения кислотных эритрограмм при изучении адсорбционной способности эритроцитов. Кровь для исследования у животных получали из вены и стабилизировали гепарином. Эритроциты осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 15 мин. Осажденные центрифугированием эритроциты отмывали физиологическим раствором поваренной соли до полного просветления надосадочной жидкости. Обычно для этого требовалось трех- или четырехкратное отмывание. Из отмытых эритроцитов готовили 2 и 5%-ную взвеси на физиологическом растворе NaCl, в котором сохранилась различная концентрация танина. При внесении эритроцитов в физраствор с танином содержащее пробирки хорошо перемешивали и инкубировали в термостате при 37° 30 мин. После этого с эритроцитов сни-

мали кислотную эритрограмму по стандартной методике. Каждый опыт сопровождался следующим контролем: записью эритрограммы цельной крови, записью эритрограммы с отмытых эритроцитов и записью эритрограммы с отмытых и инкубированных в термостате эритроцитов без нагрузки танином.

Определение изменения стойкости эритроцитов после нагрузки их танином было проведено в 8 опытах с эритроцитами крупного рогатого скота, в 3 опытах с эритроцитами барана и в 2 с эритроцитами лошади. Для всех опытов кровь получали от клинически здоровых животных.

При анализе кислотных эритрограмм, записанных как с цельной крови, так и отмытых эритроцитов, не нагруженных и нагруженных танином, учитывали время начала и конца гемолиза, положение и высоту максимума гемолиза, характер гемолизной кривой.

На рис. 1 и 2 представлены дифференциальные и интегральные кривые стойкости эритроцитов крупного рогатого скота.

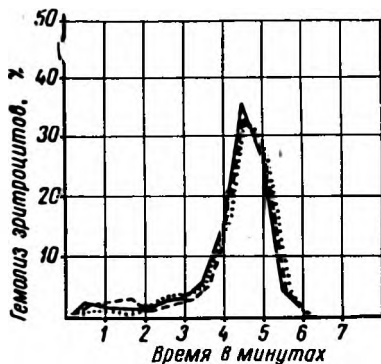


Рис. 1. Дифференциальные кривые стойкости эритроцитов крупного рогатого скота:

— цельной крови; — — — отмытых эритроцитов; . . . . отмытых и инкубированных 30 мин. при 37°.

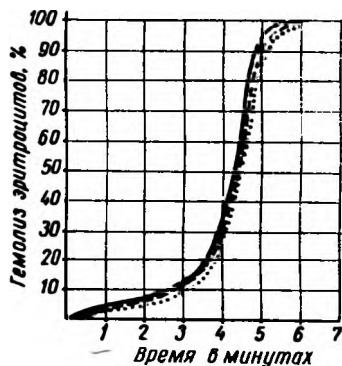


Рис. 2. Интегральные кривые стойкости эритроцитов крупного рогатого скота:

— цельной крови; — — — отмытых эритроцитов; . . . . отмытых и инкубированных 30 мин. при 37°.

Как видно из рис. 1, продолжительность гемолиза эритроцитов цельной крови составляет 6,5 мин., с выраженным максимумом гемолиза на 4,5-й мин. Левая ветвь

эритрограммы, считая от начала гемолиза до выраженного максимума, составляет 4,5 мин., тогда как правая ветвь, начиная от максимума и до конца гемолиза, равняется только 2 мин. За период времени, составляющего левую ветвь эритрограммы, гемолизировалось 68,9% эритроцитов, а правой ветви — 31,1%. Такой процент гемолиза указывает на асимметричность гемолизной кривой. Аналогичный характер имеют эритрограммы, записанные с отмытых эритроцитов, не инкубированных в термостате и инкубированных 30 мин. при 37°. Таким образом, как отмывание эритроцитов, так и инкубирование их не вызывает значительных отклонений в изменения стойкости к кислотному гемолизу.

Установив таким образом изменение стойкости эритроцитов при отмывании от плазмы и инкубации при 37°, проводили нагрузку их раствором танина различной концентрации. На рис. 3 представлены дифференциальные кривые стойкости эритроцитов крупного рогатого скота, нагруженные танином в концентрации 1:5000, 1:10 000, 1:15 000, 1:20 000 и 1:25 000.

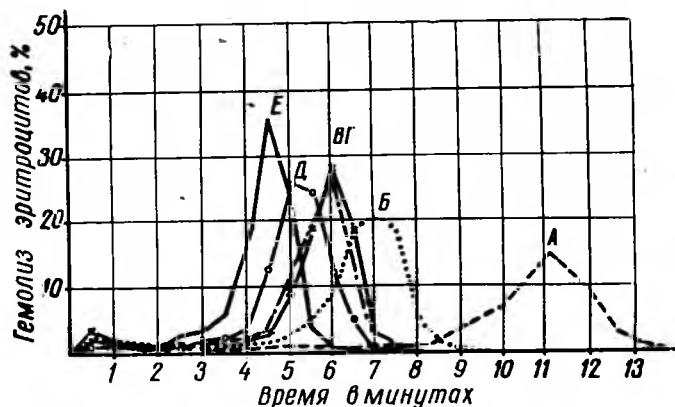


Рис. 3. Дифференциальные кривые стойкости эритроцитов крупного рогатого скота, нагруженных танином в концентрации:

А — 1:5000; Б — 1:10 000; В — 1:15 000; Г — 1:20 000; Д — 1:25 000;  
Е — фон (цельная кровь).

Из полученных данных, приведенных на рис. 3, вытекает, что стойкость эритроцитов, нагруженных танином в концентрации 1:5000, резко изменилась как в сравнении

с фоном (эритрограмма цельной крови), так и в сравнении с эритрограммой, записанной с отмытых от плазмы и не нагруженных танином эритроцитов. Общее время гемолиза вместо 6,5 мин. (фон) увеличилось до 14 мин. с перемещением максимума на 11-ю мин., против 4,5 у фона. Левая ветвь эритрограммы заметно растянута и до 8-й мин. имеет уплощенный характер с гемолизом эритроцитов в отдельные 30-секундные интервалы, не превышающие 2—2,2%. Только начиная с 8-й мин. гемолиза левое крыло имеет заметный подъем, который заканчивается на 11-й минуте, т. е. в точке максимума гемолиза. Общая продолжительность левой ветви эритрограммы составляет 11 мин., правой — 3. Сам характер эритрограммы в ее «активной» фазе начиная с 8-й мин. гемолиза имеет четко выраженную симметричность, чего не наблюдалось на фоновой эритрограмме.

При нагрузке эритроцитов раствором танина в концентрации 1:10 000 эритрограмма отличается как от фоновой, так и от эритрограммы, записанной с эритроцитов, нагруженных танином в разведении 1:5000. Так, общее время гемолиза составляет 9,5 мин., максимум гемолиза падает на 7-ю мин. И на этой эритрограмме отмечается уплощенность и растянутость ее левой ветви до «активной» фазы гемолиза, т. е. когда левая ветвь заметно нарастает до максимума, и на этой эритрограмме в ее «активной» фазе правой и левой ветви наблюдается выраженная симметричность.

Стойкость эритроцитов при нагрузке их растворами танина 1:15 000 и 1:20 000, судя по характеру эритрограмм, примерно одинаковая. Максимум гемолиза эритроцитов отмечается на 6-й мин., левые ветви эритрограмм все еще растянуты и уплощены по сравнению с фоном, общий вид эритрограмм имеет близко однотипный характер, хотя продолжительность гемолиза эритроцитов при нагрузке их раствором танина 1:15 000 составляет 8,5 мин., а при нагрузке 1:20 000 — 7,5 мин.

У эритроцитов, нагруженных раствором танина 1:25 000, продолжительность гемолиза такая же, как и при нагрузке их раствором 1:20 000 — 7,5 мин., но максимум еще больше смещен влево и имеет тот же характер, как и на эритрограмме, записанной с отмытых эритроцитов (рис. 1), однако время максимума падает на 5 мин. против 4,5 мин. фона.

Обращает на себя внимание тот факт, что с уменьшением концентрации раствора танина общая продолжительность гемолиза эритроцитов заметно укорачивается с закономерным смещением влево и максимума. Кроме этого, со смещением влево максимума увеличивается и процент гемолиза в точке максимума. Так, например, на эритрограмме при нагрузке эритроцитов танином 1:5000 максимум гемолизируется всего 15,1% эритроцитов, тогда как при нагрузке эритроцитов танином 1:10 000 максимум падает на 7-ю минуту, а гемолиз составляет 20,1%. Соответственно на эритрограммах с нагрузкой эритроцитов танином 1:15 000, 1:20 000 и 1:25 000 максимум гемолиза приходится на 6,6 и 5,6 мин., а процент гемолиза составляет 28,7; 27,1 и 25,6.

Наиболее наглядно изменение стойкости эритроцитов при нагрузке их раствором танина можно видеть на интегральных кривых, отражающих нарастание гемолиза. На рис. 4 приведены процентно-гемолизные кривые эритроцитов, не нагруженных и нагруженных танином.

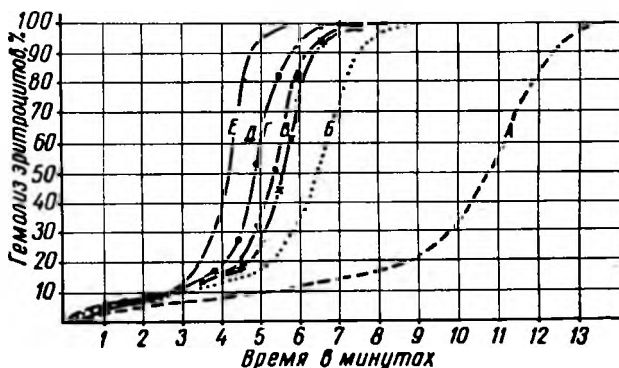


Рис. 4. Интегральные кривые стойкости эритроцитов крупного рогатого скота, нагруженных танином в концентрации:

А — 1:5000; В — 1:10 000; С — 1:15 000; D — 1:20 000; E — фон (цельная кровь).

Как видно из рис. 4, процентно-гемолизные кривые имеют типичную S-образную форму. Нагрузка эритроцитов танином приводит к смещению S-образной кривой вправо, влияя на изменение стойкости всей массы эритроцитов. Однако левая полсвина S-образной кривой по

точке 50% гемолиза имеет большую растянутость, чем правая. Это удлинение процентно-гемолизной кривой тем больше, чем большей концентрацией танина нагружены эритроциты. При нагрузке эритроцитов танином в концентрации 1:5000 точка 50% гемолиза соответствует 10,5 мин. При нагрузке эритроцитов танином в концентрации 1:10 000 точка 50% гемолиза смещается влево и соответствует примерно 6,5 мин. Вместе со смещением влево точки 50% гемолиза смещается влево вся S-образная кривая. Такое явление отмечается на всех интегральных кривых, записанных при гемолизе нагруженных танином эритроцитов. Наибольшее смещение влево имеет S-образная кривая с эритроцитов, нагруженных танином в концентрации 1:25 000. Ее форма и характер близки к S-образной кривой фона (цельная кровь) и отмытых эритроцитов.

Таким образом, проведенные опыты с нагрузкой эритроцитов танином демонстративно показывают изменение стойкости их к кислотному гемолизу. Видимо, такое изменение стойкости эритроцитов зависит от способности их адсорбировать танин, создавая танино-белковые или возможно другие комплексы на поверхностных слоях стромы, так как отмеченное удлинение времени гемолиза никак нельзя объяснить появлением в крови какой-то новой популяции сверхвысокостойких эритроцитов. Нельзя допустить, что за короткий отрезок времени в опыте во взятой порции эритроцитов произошли бы заметные изменения возрастных групп.

Наши наблюдения по изменению стойкости таннизированных эритроцитов согласуются с выводами, к которым пришли В. А. Сеницын, Н. К. Кулешова, Б. Н. Софронов и др.

Исходя из собственных наблюдений и результатов, полученных рядом исследователей, оставалось неясным, наступает ли связь танина с поверхностным слоем эритроцита прочная или этот процесс имеет обратимый характер. Для выяснения этого вопроса мы провели наблюдения с отмыванием эритроцитов, нагруженных танином. Оказалось, что отмывание физиологическим раствором эритроцитов, нагруженных танином, восстанавливает их устойчивость к кислотному гемолизу, хотя реверсия не достигает первоначальной (фоновой).

Полученные данные приведены на рис. 5 и 6.

Учитывая характер гемолитического процесса, происходящего при записи кислотных эритрограмм, можно предполагать, что изменение стойкости эритроцитов, нагруженных танином, обусловлено адсорбцией последнего поверхностными слоями красных кровяных телец.

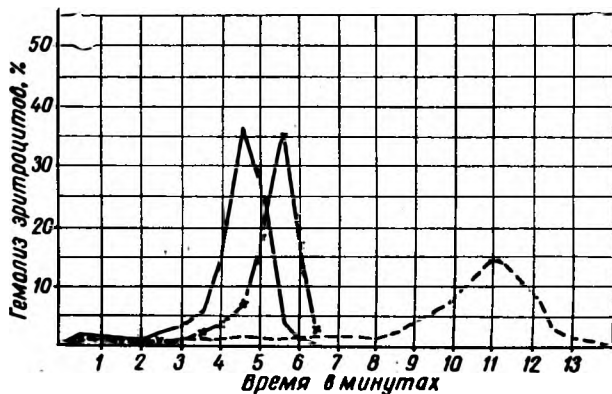


Рис. 5. Дифференциальные кривые стойкости эритроцитов крупного рогатого скота, нагруженных танином и отмытых физиологическим раствором:

— фон; - - - нагруженные 1:5000; - - - х - отмытые.

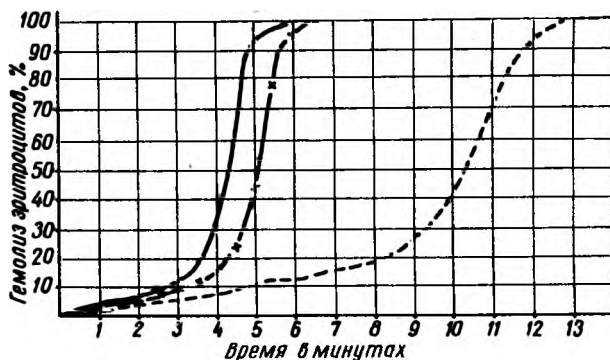


Рис. 6. Интегральные кривые стойкости эритроцитов крупного рогатого скота, нагруженных танином и отмытых физиологическим раствором:

— фон; - - - нагруженные 1:5000; - - - х - отмытые.

На поверхности эритроцита образуются соединения, тормозящие действие гемолитика на клетку, что приводит к



повышению ее устойчивости к кислотному гемолизу. Однако это соединение непрочное и может быть нарушено при отмывании эритроцитов физиологическим раствором. Степень адсорбированного танина поверхностными слоями эритроцитов устанавливали колориметрическим способом. Для этой цели мы использовали раствор ванадата натрия, окрашивающий жидкости, в которых содержится танин, в темно-синий цвет.

Колориметрирование проводили на ФЭК-М в кюветках шириной 10 мм при синем светофильтре. Оптическую плотность учитывали по шкале левого барабана. В качестве контроля, вместо раствора танина, использовали дистиллированную воду. Сам ход определения заключался в следующем. Приготовленный для суспензирования эритроцитов раствор танина смешивали с равным объемом раствора ванадата и определяли его оптическую плотность. Эту экстинкцию раствора танина принимали как исходную. Затем брали 5 мл такой же концентрации раствора танина, создавали в ней 2 и 5%-ную взвесь эритроцитов, 30 мин. инкубировали в термостате, после чего центрифугированием осаждали эритроциты, а надосадочную жидкость колориметрировали. Из исходной экстинкции вычитали полученную, а разность считали как показатель истощения концентрации танина после инкубации эритроцитов. По полученной разности рассчитывали относительный процент.

В таблице приведены данные одного опыта.

Таблица

**Данные колориметрирования растворов танина до инкубирования в них эритроцитов и после инкубирования**

Концентрация раствора танина	Исходная экстинкция раствора	Процент взвеси эритроцитов	Экстинкция раствора танина после нагрузки	Разница в экстинкциях	Процент разности
1:5000	0,417	2	0,269	0,148	35,4
		5	0,267	0,150	36,0
1:10000	0,211	2	0,183	0,028	13,2
		5	0,175	0,036	17,1
1:15000	0,172	2	0,155	0,017	9,9
		5	0,151	0,021	12,2
1:20000	0,102	2	0,093	0,009	8,7
		5	0,092	0,010	9,8
К	0,000	—	—	—	—

Данные таблицы показывают, что с повышением концентрации раствора танина увеличивается и процент разницы. Однако независимо от взвеси эритроцитов разница в экстинкциях раствора танина после нагрузки ими эритроцитов незначительная. Так, если 2%-ная взвесь эритроцитов в растворе танина 1:5000 составила процент разности 35,4, то 5%-ная взвесь — всего 36%. Незначительное увеличение как разницы в экстинкциях, так и процента разности 5%-ной взвеси эритроцитов по сравнению с 2%-ной отмечается и в более слабых концентрациях раствора танина, однако прямой зависимости процента разности от процента взвеси эритроцитов не наблюдается.

Эти опыты показывают, что эритроциты крупного рогатого скота извлекают из раствора танина примерно равное количество, независимо от процента их взвеси.

Доказательством этому может служить график, построенный в логарифмических координатах. Для построения графика были вычислены логарифмы исходной экстинкции растворов танина и как их функции — логарифмы разницы в экстинкциях.

Откладывая на горизонтальной координате логарифмы исходной экстинкции, а на вертикальной — логарифмы разницы в экстинкциях получили ряд точек, близко расположенных около прямой. Такое близкое расположение точек около прямой дает основание считать, что извлечение танина эритроцитами является процессом адсорбционным.

На основании литературных данных, а также собственных наблюдений можно сделать следующие выводы:

1. Эритроциты крупного рогатого скота, овец и лошадей, тщательно отмытые физиологическим раствором NaCl, извлекают танин из раствора.

2. Количество извлеченного эритроцитами танина находится в зависимости от его концентрации в растворе: чем большая концентрация танина в растворе, тем больше его извлекают эритроциты.

3. 2 и 5%-ная взвесь эритроцитов извлекает из раствора танин примерно в одинаковом количестве.

4. Извлечение танина эритроцитами можно считать адсорбционным процессом.

5. Адсорбция танина поверхностными слоями эритроцитов — процесс обратимый. Отмывание эритроцитов,

нагруженных танином, возвращает их стойкость к исходной, хотя полной реверсии не наблюдается.

6. Метод кислотных эритрограмм четко дифференцирует стойкость эритроцитов к ряду химических элементов и может быть использован для определения адсорбционной способности их как в клинической, так, видимо, и в иммунобиологической практике.

## О жидкостных и мембранных индикаторах артериальных осцилляций

---

---

Н. В. КУБАСОВ

Для измерения артериального кровяного давления у сельскохозяйственных животных в клинике и при постановке хронических экспериментов практически применим только осцилляторный косвенный метод.

Как известно, индикация осцилляций может осуществляться различными способами. Наиболее распространенными из них являются визуальная отметка изменений колебаний стенки артерии при помощи спиртовых осцилляторов (Н. П. Разумов, 1933, 1934; И. Г. Шарабрин, 1947; Л. Г. Серкин, 1950; Н. В. Иванов, 1945) и графическая регистрация мембранными преобразователями (Magey, 1878; Л. И. Усков, 1905; М. В. Куденко, 1937; И. Г. Шарабрин, 1947; Н. Н. Савицкий, 1956).

Артериальным осциллометрам, в схему которых введен жидкостный (спиртовой) осциллятор, присущи серьезные недостатки, основными из которых являются визуальное чтение результатов измерения одновременно по двум индикаторам (осциллятор, манометр) при ограниченном времени и недостаточная чувствительность.

Чтобы выявить степень усиления спиртового осциллятора, мы поставили эксперименты. Испытаниям подвер-