

А. А. МАРКОСЯН

ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТКИ И ЭЛЕКТРОЛИТНЫЙ СОСТАВ СРЕДЫ

Поверхностные свойства клеток играют определяющую роль в возникновении межклеточных контактов, поэтому их изучение позволяет приблизиться к пониманию ряда фундаментальных проблем: морфогенеза, канцерогенеза, тканевой совместимости, тромбогенеза и т. д. Особое внимание привлекают межклеточные взаимодействия форменных элементов крови.

Форменные элементы крови несут на поверхности отрицательный заряд. Широко распространена точка зрения, согласно которой к клеточным суспензиям применима теория стабильности лиофобных коллоидов, развитая Ландау, Дерягиным, Вервеем и Овербиком. Предполагается, что между клетками (как и между коллоидными частицами) действуют силы электростатического отталкивания, уравновешиваемые дальнедействующими межмолекулярными силами Лондона-Ван-дер-Ваальса. Снижение поверхностного заряда клеток должно приводить к уменьшению электростатического отталкивания и, соответственно, к их сближению, адгезии и агрегации. В применении к форменным элементам крови эта гипотеза была впервые выдвинута Абрамсоном [4, 5].

Внутренняя поверхность стенки кровеносного сосуда также имеет отрицательный заряд, поэтому между внутренней поверхностью сосудистой стенки и форменными элементами крови возникают силы отталкивания, препятствующие их прилипанию к сосудистой стенке, а следовательно, возможности формирования тромба.

Наличие отрицательного заряда на поверхности клетки обусловлено адсорбционными и ионными свойствами ее мембраны. Так как клетки находятся в плазме, представляющей собой электролитную среду, то на границе раздела двух фаз — наружной клеточной мембраны и окружающей среды — образуется электрический двойной слой, состоящий из ионов противоположного знака. Один из слоев — адсорбционный — находится на поверхности клетки, а другой — диффузный — в окружающей среде. На формирование двойного электрического слоя оказывают влияние адсорбционная и ионная способности мембраны, т. е. ее морфофункциональное состояние, а также рН и ионная сила окружающей среды. Единственным способом количественного определения электрокинетического, или Z-потенциала, является микроэлектрофорез.

Исследованию эритроцитов методом клеточного электрофореза посвящено большое количество работ. Последнее связано с простотой методики выделения и хранения этих клеток, с относительным постоянством их электрофоретических характеристик и большим функциональным значением их поверхностных свойств.

Результаты ранних работ по электрофорезу красных кровяных клеток приведены в монографии Абрамсона [5], а также в книгах Абрамсона и др. [6, 7]. Имеются, кроме того, более поздние обзоры Рюгенштроф-Бауэра и Захтлебен [17] и Бринтона и Лауффера [9].

Как уже говорилось, для частиц, близких по размерам к эритроцитам, при физиологических условиях величина электрофоретической подвижности зависит только от природы и свойств клеточной поверхности и среды и не зависит от формы и размера частиц [8]. Подвижность эритроцитов при постоянных условиях измерения постоянна для данного вида, но изменяется от вида к виду [7, 13, 18].

Для эритроцитов человека было показано, что их подвижность в фосфатном буфере или в физиологическом растворе не зависит от способа взятия крови, от применяемого антикоагулянта, от возраста, пола и расы донора, а также от группы крови [5, 10].

В то же время имеются данные, свидетельствующие о наличии существенных различий по величине электрофоретической подвижности между эритроцитами в одной и той же пробе крови. Эти различия, по-видимому, связаны с возрастом эритроцитов: молодые клетки перемещаются в электрическом поле быстрее, чем старые [12, 14].

В последние годы было установлено, что за подавляющую часть поверхностного заряда эритроцита ответственны карбоксильные группы сиаловых кислот [16, 19]. Было показано, что при вирусной гемагглютинации происходит разрушение сиаловых кислот, локализованных на мембране эритроцита. Одновременно наблюдается резкое снижение электрофоретической подвижности эритроцитов. Соответствующий фермент вирусного происхождения получил название нейроаминидаза [8]. Сиаловые кислоты были выделены из стромы эритроцитов в кристаллической форме. Все это привело Кленка к предположению, что за отрицательный заряд эритроцитов ответственны ацетилированные нейроаминокислоты [15].

Полный отрицательный заряд поверхности эритроцитов человека и других видов млекопитающих связан, в основном, с наличием карбоксильных групп сиаловых кислот [11, 13, 18], а не обусловлен, как это предполагали ранее, фосфатными группами фосфолипидов или аналогичных соединений.

Поверхностные свойства других форменных элементов крови—тромбоцитов имеют большое функциональное значение. Адгезия тромбоцитов и их агрегация в месте функционального или морфологического нарушения кровеносного сосуда приводят к образованию гемостатического тромба. Таким образом, вопрос о механизмах межклеточных взаимодействий тромбоцитов, в частности, о роли их электрокинетических харак-

теристик в обеспечении этих взаимодействий приобретает не только теоретический, но и практический интерес.

Исследованию зависимости электрофоретической подвижности тромбоцитов от pH и ионной силы посвящены работы с противоречивыми результатами [4, 9, 20, 21], что объясняется, по-видимому, различными экспериментальными условиями. Основной вывод из этих исследований заключается в том, что зависимость электрофоретической подвижности тромбоцитов от pH такая же, как у большинства белков, изоэлектрическая точка расположена между $\text{pH}=3,5$ и $4,5$, в зависимости от состава среды. Если блокировать ацетальдегидом катиногенные группы, то наблюдается увеличение отрицательной подвижности и смещение изоэлектрической точки в сторону меньших значений pH.

В нашей лаборатории проведены исследования, направленные на выяснение влияния электролитного состава окружающей среды на электрокинетический, или Z-потенциал, тромбоцитов [1—3].

В наших опытах микроэлектрофорез тромбоцитов осуществлялся в аппарате «Цитоферометр» фирмы «Opton». Постоянство температуры поддерживалось ультратермостатом типа «К» фирмы «Colog». Измерения проводились при 25°C ($\pm 0,02^\circ$). Электрофоретическая подвижность клеток регистрировалась в передней стационарной зоне плоской вертикальной камеры высотой 14 мм и глубиной 0,7 мм, под постоянным электрическим полем с силой тока 5 мА. Движение клеток наблюдалось фазоконтрастным микроскопом при увеличении в 800 раз. Средой для измерения служил буфер Михаэлиса с pH 7,35 и специальной постоянной удельного сопротивления—68,64 ом/см.

Электрофоретическая подвижность тромбоцитов вычислялась по формуле $V = \frac{l}{t \cdot E}$, где l — путь тромбоцита в сетке окулярмикрометра в одну и другую сторону в см, t — время прохождения этого пути тромбоцитом в сек, E — напряженность электрического поля. Последняя определялась по формуле $E = \frac{l \cdot p}{h \cdot t}$, где l — сила тока в амперах, p — специальная постоянная удельного сопротивления буфера Михаэлиса—68,64 ом/см, h — высота камеры в см, t — глубина камеры в см.

По предложению Смолуховского (von Smoluchowski, 1921) электрокинетический потенциал клетки рассчитывается по формуле $Z = \frac{4\pi\eta V}{D}$, где η — вязкость окружающей среды, D — диэлектрическая постоянная среды, V — электрофоретическая подвижность клетки на единицу напряженности электрического поля. В наших опытах вязкость среды и ее диэлектрические свойства оставались неизменными, поэтому в опытах определялась только электрофоретическая подвижность тромбоцитов, которая, согласно уравнению Смолуховского, отражает колебания их Z-потенциала.

Электрофоретическая подвижность тромбоцитов изучалась у взрослых кроликов. Кровь получалась пункцией сердца и стабилизировалась 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Плазма обогащалась

тромбоцитами центрифугированием крови при 2000 оборотах в течение 5 мин.

Изменение электрофоретической подвижности тромбоцитов изучалось в опытах *in vitro* и *in vivo*. В опытах *in vitro* к плазме добавлялись изотонические и гипертонические растворы солей натрия и калия (NaCl, KCl), а также изотонические растворы кальция и магния (CaCl_2 , MgCl_2). Изотония сохранялась при добавлении 0,16 М раствора CaCl_2 и MgCl_2 . В качестве гипертонических растворов применялись 1 М концентрации NaCl и KCl.

В опытах *in vivo* внутривенно вводились 6 мл 20% раствора NaCl или 6 мл 1% раствора KCl; 10 мл 1% CaCl_2 или MgCl_2 . Опыты были поставлены на 56 кроликах.

Установлено, что электрофоретическая подвижность тромбоцитов у взрослых кроликов равна $0,784 \cdot 10^{-4} \pm 0,103 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$.

Инкубация тромбоцитов с изотоническим и гипертоническим растворами NaCl привела к повышению электрофоретической подвижности (табл. 1).

Таблица 1

Изменение электрофоретической подвижности тромбоцитов под влиянием ионов Na^+ (в опытах *in vitro*)

Электрофоретическая подвижность $\text{см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$		
Исходные данные	После инкубации с изотоническим раствором NaCl	После инкубации с гипертоническим раствором NaCl
$0,784 \cdot 10^{-4} \pm 0,103 \cdot 10^{-4}$	$0,913 \cdot 10^{-4} \pm 0,087 \cdot 10^{-4}$ $p < 0,002$	$0,898 \cdot 10^{-4} \pm 0,103 \cdot 10^{-4}$ $p < 0,002$

Как следует из таблицы, ионы натрия ускоряют электрофоретическую подвижность клетки.

В отличие от них ионы калия замедляют движение клеток между полюсами (табл. 2).

Таблица 2

Изменение электрофоретической подвижности тромбоцитов под влиянием ионов K^+ (в опытах *in vitro*)

Электрофоретическая подвижность		
Исходные данные	После инкубации с изотоническим раствором KCl, $\text{см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$	После инкубации с гипертоническим раствором KCl, $\text{см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$
$0,784 \cdot 10^{-4} \pm 0,103 \cdot 10^{-4}$	$0,701 \cdot 10^{-4} \pm 0,042 \cdot 10^{-4}$ $p < 0,002$	$0,678 \cdot 10^{-4} \pm 0,063 \cdot 10^{-4}$ $p < 0,002$

Аналогичные результаты были получены в опытах *in vivo* (табл. 3).

Таблица 3

Изменение электрофоретической подвижности тромбоцитов под влиянием ионов Na^+ и K^+ (в опытах *in vivo*)

Электрофоретическая подвижность, $\text{см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$		
Исходные данные	После в/в введения 6 мл 20% раствора NaCl	После в/в введения 6 мл 1% раствора KCl
$0,812 \cdot 10^{-4} \pm 0,028 \cdot 10^{-4}$	$0,914 \cdot 10^{-4} \pm 0,017 \cdot 10^{-4}$ $p < 0,001$	$0,788 \cdot 10^{-4} \pm 0,09 \cdot 10^{-4}$ $p < 0,002$

Характерные изменения вызывают и двухвалентные ионы Ca^{++} и Mg^{++} (табл. 4).

Таблица 4

Изменение электрофоретической подвижности тромбоцитов под влиянием ионов Ca^{++} и Mg^{++} *in vitro*

Электрофоретическая подвижность, $\text{см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$		
Исходные данные	После инкубации 1 мл плазмы с 0,2 мл 0,1 М раствора CaCl_2	После инкубации 1 мл плазмы с 0,2 мл 0,1 М раствора MgCl_2
$0,784 \cdot 10^{-4} \pm 0,103 \cdot 10^{-4}$	$0,836 \cdot 10^{-4} \pm 0,012 \cdot 10^{-4}$ $p < 0,002$	$0,723 \cdot 10^{-4} \pm 0,016 \cdot 10^{-4}$ $p < 0,005$

Изменения электрофоретической подвижности тромбоцитов, наблюдаемые при внутривенном введении CaCl_2 и MgCl_2 , аналогичны изменениям, наступающим в опытах *in vitro* (табл. 5).

Таблица 5

Изменения электрофоретической подвижности тромбоцитов под влиянием внутривенного введения 10 мл 1% раствора CaCl_2 или MgCl_2

Электрофоретическая подвижность, $\text{см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$		
Исходные данные	После в/в введения раствора CaCl_2	После в/в введения раствора MgCl_2
$0,794 \cdot 10^{-4} \pm 0,011 \cdot 10^{-4}$	$0,870 \cdot 10^{-4} \pm 0,017 \cdot 10^{-4}$ $p < 0,001$	$0,731 \cdot 10^{-4} \pm 0,013 \cdot 10^{-4}$ $p < 0,001$

Итак, ионы Ca^{++} повышают электрофоретическую подвижность тромбоцитов, а ионы Mg^{++} ее снижают.

Представляет интерес то обстоятельство, что основные внутриклеточные катионы (K^+ и Mg^{++}) и основные внеклеточные катионы (Na^+ и Ca^{++}) действуют на электрофоретическую подвижность тромбоцитов противоположным образом. Возможными объяснениями наблюдаемого эффекта, например, могут быть следующие:

1. Изменение величины константы α Хейдона. Поскольку клеточные мембраны обладают большей проницаемостью к ионам K^+ и Mg^{++} , то в средах с повышенным содержанием этих ионов их концентрация внутри мембраны возрастает, и, соответственно, уменьшается величина α . При неизменной величине поверхностного заряда это приведет к

снижению Z-потенциала и электроферетической подвижности. По-видимому, повышенное содержание ионов Na^+ и Ca^{++} должно привести к противоположному эффекту.

2) Изменение трансмембранного потенциала в ходе инкубации (его снижение в присутствии избытка K^+ и Mg^{++} и повышение в присутствии избытка Na^+ и Ca^{++}) может вызвать изменение конформации макромолекулярных компонентов мембраны, обладающих дипольным моментом. В этом случае также действие указанных пар ионов будет противоположным.

Подводя итог, необходимо отметить, что характерной особенностью живой клетки являются различия в составе ионов внутри клетки и в окружающей среде. У млекопитающих, за редким исключением, в клетках крови имеется высокий концентрационный градиент ионов K^+ и Mg^{++} , а в окружающей среде преобладают ионы Na^+ и Ca^{++} . Надо полагать, как это следует и из наших экспериментов, что распределение ионов может колебаться в определенных пределах, влияя на электрокинетический потенциал тромбоцитов. Изменение последнего в сторону уменьшения может привести к адгезии и агрегации тромбоцитов.

Институт возрастной физиологии
АПН СССР, Москва

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Маркосян Р. А. В кн. Вопросы нервно-гуморальной регуляции процесса свертывания крови в условиях нормы и патологии, Чита, 96—97, 1971.
2. Маркосян Р. А. Физиологический журнал СССР, 1, 1972.
3. Маркосян Р. А. Бюлл. exper. биол. и мед., 2, 1972.
4. Abramson H. A. J. etp. Med., 47, 677, 1928.
5. Abramson H. A. Elektrokinetic phenomena and their application to biology and medicine, 1934.
6. Abramson H. A., Moyer L. S., Gorin M. H. Elektrophoresis of proteins and the chemistry of cell surfaces, 1, 1942.
7. Abramson H. A., Gorin M. H., Ponder E. Elektrophoresis and the chemistry of cell surfaces. Cold spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 8, 72, 1940.
8. Ada G. L., Stona J. J. Brit. J. Etp. Path., 31, 263, 1950.
9. Bigelow F. S., Desforjes J. F. Amer. J. Med., 14, 155, 1959.
10. Brinton C. A., Lauffer M. A. Elektrophoresis, Theory, Methods and application, 1959.
11. Cook G. M. W., Heard D. H., Seaman G. V. F. Nature, 191, 44, 1961.
12. Danon D., Markowsky I. Compt. Rendus, 253, 1271, 1961.
13. Eylar E. H., Macloff M. A., Brody O. K., Oncley J. L. J. Biol. Chem., 237, 1992, 1962.
14. Laari A. Blood, 33, 159, 1969.
15. Klenk E. Chemistry and Biology of Mucopolysacharides, A Ciba Foundation Symp. 311, 1958.
16. Onkley J. L. Biophysical concepts of Lipoprotein. Biophysical mechanisms in vascular homeostasis and intravascular thrombosis, 231, 1965.
17. Rubenstrath-Bauer L., Sachtleben P. Medizinische Grundlogien forschung Ed. Bauer Thieme, 1959.

18. *Seaman G. V. F., Uhlenbruck G.* Arch. Bioch. Bioph. 100, 493, 1963.
19. *Seaman G. V. F., Cook G. M. W.* Modification of the electrophoretic behaviour of the erythrocyte by chemical and enzymatic methods, Cell electrophoresis, 1965.
20. *Stoltz Y. F., Stoltz M., Jlneste Y., Streife F., Larcen A.* Pathol. Biol., 18, 3—4, 159, 1970.
21. *Zucker M. B., Levine R.* Thrombos, Diathes., Haemorrh. 10, 1, 1963.