

И. А. ТЕРСКОВ и И. И. ГИТЕЛЬЗОН

О МЕХАНИЗМЕ РЕВЕРСИИ ГЕМОЛИЗА

(Представлено академиком А. И. Опариным 19 VI 1951)

Если в осмотически гемолизированную кровь ввести гипертонический раствор поваренной соли, то прозрачный гемолизат мутнеет: при микроскопическом исследовании становятся вновь хорошо заметными эритроциты.

В настоящее время нет единого взгляда на природу и механизм наблюдаемого обращения гемолиза. Распространенное представление ⁽¹⁾ трактует это явление как сжатие разбухших стром, приводящее к концентрированию связанного с ними гемоглобина; возврата в эритроциты вышедшего в раствор гемоглобина при этом не происходит. По другому мнению ⁽²⁾, при обращении гемолиза происходит возврат гемоглобина в эритроциты.

Выяснение механизма реверсии гемолиза имеет существенное значение для решения проблемы структуры эритроцита. В настоящей работе предпринята попытка исследовать обращение гемолиза с помощью спектрофотометрического определения гемоглобина.

Осмотический гемолиз производился гипотоническими растворами NaCl; реверсия вызывалась гипертоническими растворами. Измерялась концентрация гемоглобина в растворе до и после реверсии. Очевидно, возврат гемоглобина в эритроциты при реверсии должен выразиться в уменьшении его концентрации в растворе. В случае отсутствия истинной реверсии, в смысле возврата гемоглобина в эритроциты, концентрация гемоглобина в растворе останется неизменной.

Для опыта брался ряд пробирок с растворами от 0,80 до 0,10%. В каждую пробирку, содержащую 2 мл одного из растворов, вводилось 400 μ л цельной человеческой крови. После 2-часового гемолиза содержимое каждой пробирки делилось на две равные части, и в одной из них производилась реверсия добавлением гипертонического раствора до восстановления изотонии. 2-часовая продолжительность гемолиза была выбрана на основании опытов, показавших, что процесс гемолиза заканчивается в течение 1-го часа.

Через 1 час после реверсии все пробирки центрифугировались. Содержимое осторожно отсасывалось и заливалось в плоско-параллельные кюветы толщиной 0,5 см, туда же для растворения нецентрифугированных стром добавлялась крупинка сапонины.

Кривые пропускания всех растворов ряда записывались на одну пленку саморегистрирующим фотоэлектрическим спектрографом, сконструированным И. А. Терсковым. На каждую пленку записывалась кривая пропускания гемоглобина после гемолиза, произведенного сапонином. Концентрация гемоглобина по кривым пропускания рассчитывалась обычным методом ^(3, 4). Все опыты производились при температуре 18—20°.

Проведенные описанным методом опыты показали, что в пробирке, где была произведена реверсия, количество гемоглобина в растворе закономерно снижается по сравнению с концентрацией гемоглобина в параллельной пробирке, в которой реверсия не производилась. Это явление наиболее выражено при концентрации гемолизирующего раствора 0,53—0,43%. Оно снижается в сторону более высоких и более низких солевых концентраций.

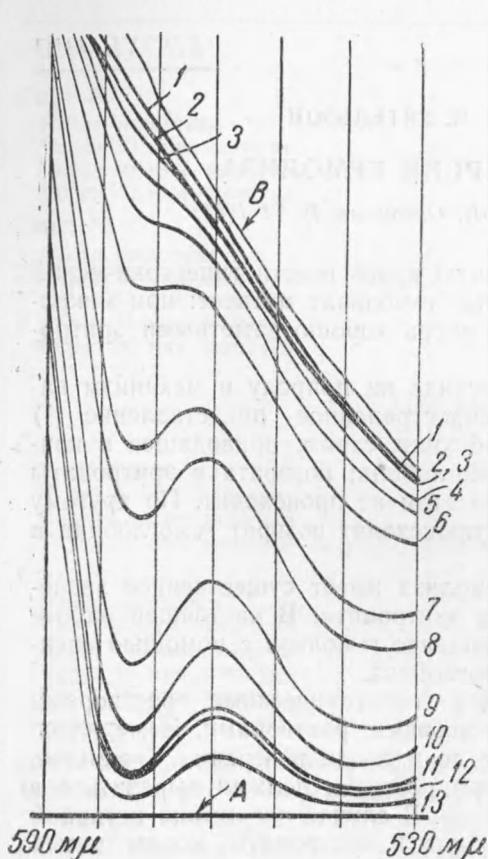


Рис. 1. B — кривая пропускания кюветы с водой, 1 — реверсия 0,53%, 2 — гемолиз 0,53%, 3 — реверсия 0,48%, 4 — гемолиз 0,48%, 5 — реверсия 0,45%, 6 — гемолиз 0,45%, 7 — реверсия 0,43%, 8 — гемолиз 0,43%, 9 — реверсия 0,40%, 10 — гемолиз 0,40%, 11 — реверсия 0,35%, 12 — гемолиз 0,35%, 13 — полный гемолиз, A — нулевая линия

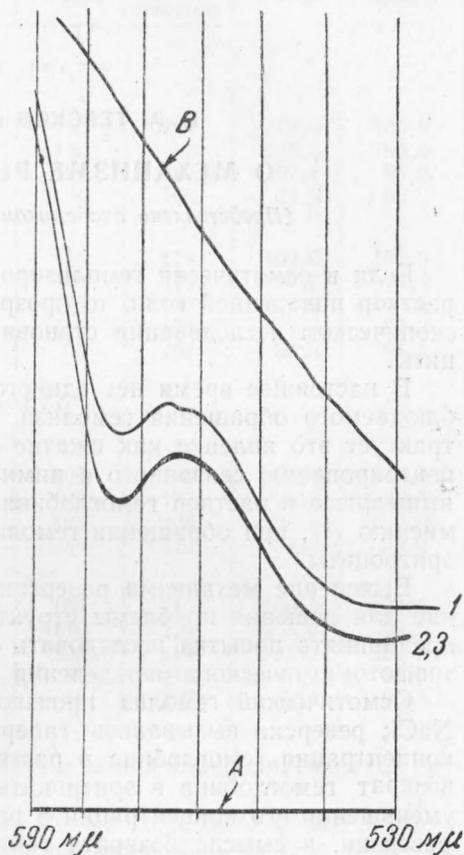


Рис. 2. B — кривая пропускания кюветы с водой, 1 — реверсия 0,48%, 2 и 3 (совпадающие) — кривые пропускания гемолиза в 0,48% NaCl до и после высаливания, A — нулевая линия

Спектрограмма одной из серий приводится на рис. 1. Снимок демонстрирует наблюдавшуюся закономерную убыль гемоглобина в растворе после реверсии (кривые пропускания при гемолизе лежат ниже, чем после реверсии в этом же растворе).

Регистрируемая разница в концентрации гемоглобина до и после реверсии, помимо поглощения гемоглобина эритроцитами, может быть вызвана неодинаковым влиянием центрифугирования на ревертированные и неревертированные эритроциты, высаливанием гемоглобина из раствора или его осаждением на поверхности клеточных элементов крови при добавлении гипертонического раствора.

Параллельные измерения, проведенные с центрифугированными и отстаивавшимися гемолизатами, показали, что центрифугирование не вызывает увеличения концентрации гемоглобина в растворе по сравнению с отстаивавшимися гемолизатами как при реверсии, так и без нее.

Возможность высаливания проверялась следующим опытом. После гемолиза в 0,48% растворе поваренной соли раствор над осадком эритроцитов отсасывался и спектрофотометрировался, затем концентрация растворов доводилась до изотонии и в него вводились неповрежденные эритроциты той же крови. Через 1 час раствор центрифугировался и спектрофотометрировался на прежней пленке. Результат одного из опытов приведен на рис. 2. Совпадение кривой пропускания гемоглобина в гемолизате и кривой пропускания гемоглобина после высаливания в присутствии неповрежденных эритроцитов доказывает, что в условиях наших опытов не имели места высаливание гемоглобина или его осаждение на поверхности клеточных элементов крови.

Таким образом, наблюдаемое при реверсии гемолиза обеднение раствора гемоглобином может быть объяснено лишь его возвращением в эритроциты.

С целью количественного изучения явления обращения гемолиза были проделаны опыты при концентрациях гемолизирующих растворов поваренной соли от 0,40 до 0,55% с интервалом 0,02—0,03%. Результаты всех опытов были подвергнуты однородной обработке. Для каждого опыта вычислялись: абсолютная реверсия в г-% — разность между концентрацией гемоглобина при гемолизе и соответствующей ему реверсии; процент реверсии — отношение абсолютной реверсии к концентрации гемоглобина в данной крови; парциальный гемолиз в г-% — прирост гемоглобина в растворе при падении концентрации гемолизирующего раствора на один интервал ряда; процент парциального гемолиза — отношение парциального гемолиза к концентрации гемоглобина при полном гемолизе данной крови.

Расчет одного из опытов приводится в табл. 1.

Таблица 1

Концентрация гемолизирующего раствора в %	Концентрация гемоглобина при гемолизе в г-%	Концентрация гемоглобина после реверсии в г-%	Абсолютная реверсия в г-%	Процент реверсии	Парциальный гемолиз в г-%	Процент парциального гемолиза
0,50	0,37	0,30	0,07	0,4		
0,48	0,97	0,53	0,44	2,7	0,60	2,3
0,45	5,35	2,94	2,41	15,0	4,39	27,4
0,43	11,08	9,75	1,33	8,3	5,73	35,7
0,40	13,10	12,70	0,40	2,5	2,02	12,6
Полный гемолиз . .	16,05					

Таблица иллюстрирует наблюдавшуюся в опытах закономерную зависимость абсолютной реверсии от концентрации гемолизирующего раствора. Для нормальной человеческой крови максимум реверсии чаще всего лежит в 0,45% растворе NaCl с индивидуальными колебаниями от 0,48 до 0,40%. Полный возврат гемоглобина в эритроциты нами не наблюдался. Максимальный отмеченный возврат составлял 60% от вышедшего в раствор гемоглобина.

Сопоставление значений парциального гемолиза и процента реверсии (см. рис. 3) показывает, что максимум реверсии, как правило, совпадает или, в некоторых случаях, незначительно предшествует максимальному парциальному гемолизу.

Из совпадения максимумов процента реверсии и парциального гемолиза и их параллельного падения в сторону понижающихся солевых концентраций вытекает, что к реверсии способны лишь эритроциты, гемолизированные раствором, солевая концентрация которого соответствует их резистентности. При гемолизе раствором, более гипотоничным, чем раствор, вызывающий начальное повреждение данного эритроцита, последний теряет способность к реверсии. Если бы дело обстояло иначе, т. е. степень повреждения не влияла существенным образом на ревертирующую способность эритроцита, то наблюдался бы неуклонный рост реверсии вплоть до точки максимальной резистентности. Этот вывод подтверждается также и тем, что при концентрациях гемолизующего раствора ниже максимальной резистентности эритроцитов не происходит возврата гемоглобина в эритроциты, хотя определяемое на глаз помутнение раствора — «оптическая реверсия» — наблюдается и здесь.

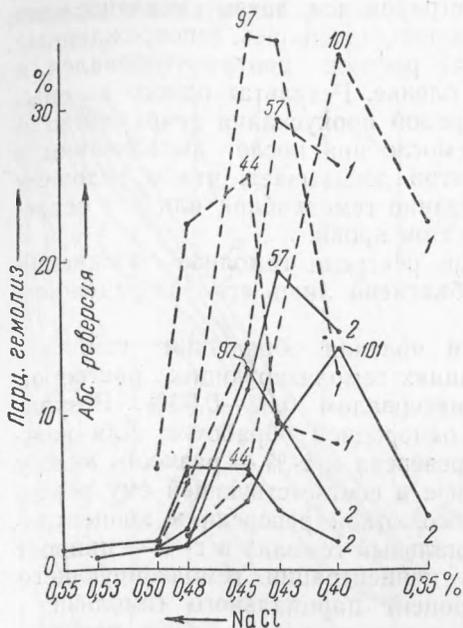


Рис. 3. 1 — гемолиз, 2 — реверсия

Этим свойством эритроцитов объясняется отсутствие истинной реверсии в опытах Д. Л. Рубинштейна и З. П. Баряновой⁽¹⁾, применявших в качестве гемолизующего агента дистиллированную воду.

Отмечены индивидуальные колебания величины реверсии и ее падение по мере удлинения срока хранения консервированной крови.

Описанное явление связано с обратимостью распада гемостроматического комплекса, но не может быть целиком к нему сведено; повидимому, оно обусловлено свойствами структуры эритроцита при его обратимом повреждении.

Описанное явление связано с обратимостью распада гемостроматического комплекса, но не может быть целиком к нему сведено; повидимому, оно обусловлено свойствами структуры эритроцита при его обратимом повреждении.

Красноярский медицинский институт

Поступило
3 V 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Д. Л. Рубинштейн и З. П. Барянова, Биохимия, 1, 10, в. 3, 243 (1945).
² Е. Н. Гапон и А. И. Розенберг, Биохимия, 11, в. 2, 181 (1946). ³ L. Neumeier, Medizinische Spectrophotometrie, Jena, 1933. ⁴ В. М. Чулановский, Введение в молекулярный спектральный анализ, 1950.