

ВЛИЯНИЕ ФОРМЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ИМПУЛЬСА НА ЭЛЕКТРОПОРАЦИЮ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

Е. К. Козлова, В. В. Мороз, М. С. Богушевич,
П. Ю. Алексеева, А. М. Черныш

ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва,
Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

Impact of Electrical Pulse Pattern on Red Blood Cell Membranous Electroporation

Ye. K. Kozlova, V. V. Moroz, M. S. Bogushevich, P. Yu. Alekseyeva, A. M. Chernysh

Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow
I. M. Sechenov Moscow Medical Academy

В модельном эксперименте на суспензии эритроцитов крови человека изучали влияние формы импульсного электрического поля, созданного разрядом дефибриллятора, на эффективность электропорации мембран. Проведено обобщение начальных температурных и временных параметров модели. Показано, что скорость гемолиза клеток при действии двумя импульсами увеличивалась в 1,2–3,5 раза по сравнению со скоростью гемолиза при действии одного импульса. Электропорация была эффективнее, а порог её ниже при действии двумя разнополярными импульсами, по сравнению с таковой при действии двумя однополярными. Эти зависимости носят статистический характер.

The impact of the pattern of a pulse electrical field generated by a defibrillator discharge on the efficiency of membranous electroporation was studied in a model experiment on human erythrocytic suspension. The initial temperature and time parameters of the model were substantiated. The rate of cellular hemolysis under the action of two impulses was shown to be increased by 1.2–3.5 times as compared with that under the action of one impulse. Electroporation was more effective and its threshold was lower under the action of two heterodirectional pulses as compared with that under the action of two unidirectional ones. These dependencies are statistical.

Одной из острых проблем современной реаниматологии остаётся необходимость экстренного прекращения фибрилляции желудочков сердца. Несмотря на поиски новых методов, существует лишь единственный эффективный метод — электрическая дефибрилляция сердца. Высоковольтный импульс электрического поля образует в мембранах кардиомиоцитов сквозные поры и как следствие — вызывает прекращение фибрилляции сердечной мышцы [8, 20]. Процесс образования пор называют электропорацией. Электропорация зависит не только от напряжённости электрического поля [3, 7], но и от формы дефибриллирующего импульса. Клинические [9–1, 19–21] и экспериментальные [1–6] исследования показывают, что эффективность биполярного импульса Гурвича выше эффективности однополярного импульса Edmark, хотя эти различия носят статистический характер. В 10–20% наблюдений отмечалась обратная зависимость [9]. В настоящее время разрабатываются рекомендации по использованию диапазона энергий бифазных импульсов в клинике [2, 5, 11, 20, 21].

Несмотря на многочисленные исследования, экспериментальные данные по действию монополярных и биполярных импульсов на биологические мембраны представлены недостаточно. В связи с этим нет единого понимания механизмов электропорации при действии импульсов различной формы.

Целью данной работы явилось исследование воздействия одиночного электрического импульса, двух однополярных и двух разнополярных импульсов на мембраны эритроцитов человека.

Материал и методы исследования

Для изучения процессов нарушения мембранных структур клетки использовали суспензию крови с концентрацией 0,05 мл крови в 1 мл физиологического раствора, что соответствует 230 млн. эритроцитов в 1 мл суспензии.

Импульсное электрическое поле (ИЭП) создавалось с помощью наружных дефибрилляторов Lifepak-7 (США) и ДИ-03 (Россия). В кварцевую кювету заливали разбавленную суспензию крови в 0,9% растворе NaCl. Туда же помещали титановые электроды, на которые подавали разность потенциалов 3 кВ. Титан индифферентен в данной среде к воздействию ИЭП. Расстояние между электродами 1,7 см, а напряженность поля $E=1800$ В/см. Такое поле составляло на мембране эритроцитов

разность потенциалов примерно 570 мВ, что превышало порог пробоя биологической мембраны.

Образование пор в мембране в результате электрического пробоя приводило к дальнейшим разрушениям мембранных структур, к осмотическому гемолизу и гибели клетки. Скорость гибели эритроцитов зависела от степени электропорации мембраны. Кинетику гибели клеток регистрировали по оптической плотности суспензии с помощью концентрационного фотоколориметра КФК-2МП. Оптическая плотность суспензии на длине волны $\lambda=750$ нм определяется концентрацией эритроцитов в суспензии в данный момент времени: $D(t)=kN(t)$. Зависимость оптической плотности от времени $D(t)$ является кинетической кривой.

Различие действия двух однополярных и двух разнополярных импульсов на мембраны эритроцитов носило статистический характер, в ряде случаев результаты различались лишь на 10–30%. В связи с этим, для получения достоверных результатов действию электрических импульсов различной формы на эритроциты необходимо было изучить влияние других физических факторов на исход опытов. К таким факторам, прежде всего, относятся температура суспензии, условия ее создания и хранения. Всего проведено 154 опыта по изучению действия исходных факторов и 216 опытов по действию импульсного электрического поля на мембраны эритроцитов клеток человека. Все представленные экспериментальные данные обработаны с использованием стандартных программ вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что скорость гемолиза эритроцитов при увеличении температуры суспензии возрастала [12]. В наших опытах электропорацию мембран проводили при температуре 10–37 °С.

На рис. 1 представлены кинетические кривые уменьшения числа эритроцитов после воздействия ИЭП для разных значений рабочей температуры (12–13, 19–20, 33–36 °С). При этом температура создания суспензии, температура, при которой производилось воздействие ИЭП, и температура хранения суспензии во всех опытах была одинаковой. Наблюдали увеличение скорости гибели клеток при снижении рабочей температуры. Кривая зависимости скорости изменения числа эритроцитов от температуры на отрезке 10–37 °С имела синусоидальный характер. При температуре от 15 до 25 °С скорость гибели клеток резко уменьшалась, а свыше 25 °С — изменялась незначительно, т. е. электропорация мембраны эритроцитов при меньшей температуре суспензии вызывалась меньшими значениями напряженности электрического поля.

Если суспензию крови создавали при температуре 36 °С и электропорацию проводили при 36 °С, то скорость гибели клеток была меньшей, по сравнению с тем, если суспензию создавали при температуре 12 °С и «пробивали» при 36 °С (рис. 2). Разница составляла примерно 1,3 раза. Это означало, что клетки повреждались уже при выделении эритроцитов из организма (кривые А, В на рис. 2, а и столбики А, В на рис. 2, б). Повреждение было тем больше, чем больше был перепад между температурой крови

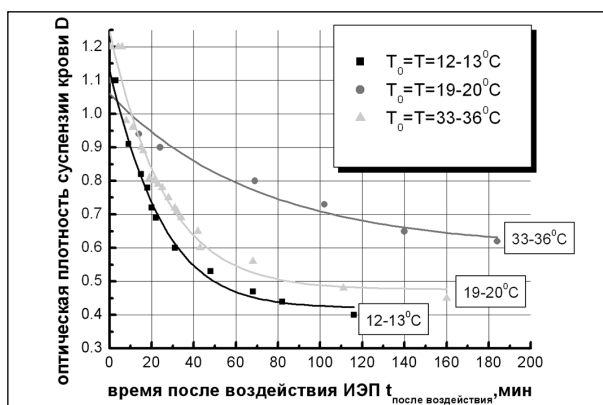


Рис. 1. Влияние температуры на скорость уменьшения численности эритроцитов при воздействии на них ИЭП: Объяснения в тексте.

Здесь и на рис 2, а; 3: По оси абсцисс — время после воздействия ИЭП (в мин). По оси ординат — оптическая плотность суспензии крови (D).

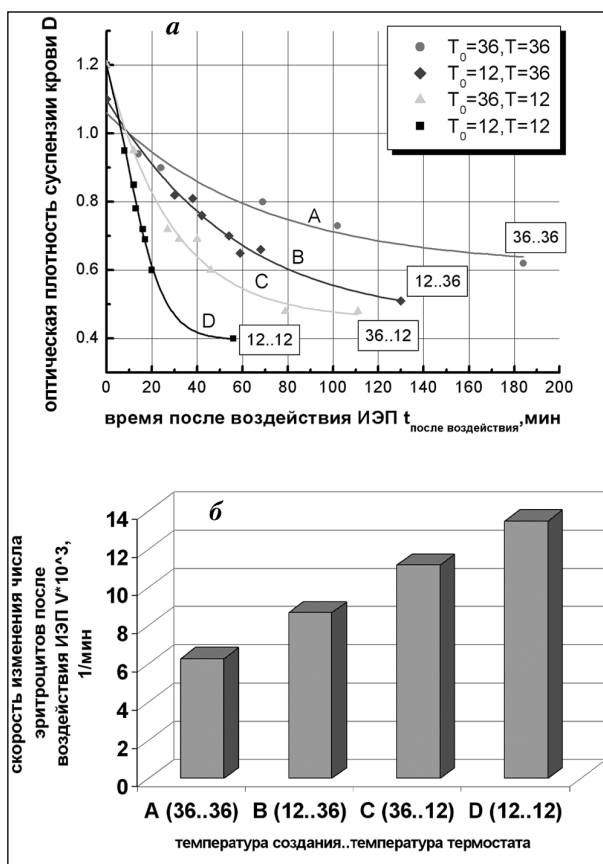


Рис. 2. Отличие степени повреждения мембраны для методов быстрого (со скоростью 24 °С в 1 сек) и медленного (со скоростью 24 °С в 1 мин) охлаждения. Температура, при которой суспензию подвергали воздействию ИЭП варьировала:

а) кинетические кривые уменьшения числа эритроцитов после воздействия ИЭП для разных методов охлаждения: быстрого — кривая В, D и медленного — кривая С и для разных температур электропорации электрическим импульсом: кривые А, В — $T=36$ °С, кривые С, D — $T=12$ °С;

б) диаграмма скоростей изменения числа эритроцитов после воздействия ИЭП для разных методов охлаждения: быстрого — кривая В, D и медленного — кривая С и для разных температур электропорации электрическим импульсом: кривые А, В — $T=36$ °С, кривые С, D — $T=12$ °С.

в организме и температурой физиологического раствора, в который попадали эритроциты.

На степень повреждения клеток влияла и скорость уменьшения температуры. На рис. 2, а показано отличие повреждений для двух методов охлаждения, кривая С — быстрого (20 °С в 1 сек), кривая D — медленного (20 °С в 1 мин). Электропорация осуществлялась при фиксированной температуре. Как видно на рис. 2, а, повреждения при быстром охлаждении были значительно больше и скорость гибели клеток после воздействия ИЭП возрастала в 1,5 раза.

Таким образом, и температура и скорость её уменьшения определяли функциональное состояние мембраны эритроцитов перед воздействием на нее ИЭП. Это связано с тем, что при уменьшении температуры уменьшалась эластичность мембраны [5]. При увеличении скорости охлаждения в самой мембране могли возникать термические напряжения, так как температура снаружи и внутри клетки не успевала выравниваться из-за малой теплопроводности мембраны, что приводило к возникновению структурных дефектов. Изменения в структуре мембраны, возникающие вследствие температурных напряжений в отсутствие электрического воздействия, не проявляются в течение нескольких дней. Результаты повреждения оставались скрытыми, потенциальными. Воздействие же ИЭП проявляло эти повреждения в течение короткого времени (см. рис. 1–4).

Изменения температуры происходили не только при создании суспензии, но и при воздействии на нее ИЭП. При воздействии одним электрическим импульсом температура в суспензии повышалась в среднем на 8 °С, таким образом, относительная величина нагрева при низких температурах была больше, а это приводило к более сильному повреждению.

В опытах исследовали кривые «старения» суспензии, а именно зависимость скорости изменения числа эритроцитов от времени выдержки (промежуток времени от создания суспензии до воздействия на нее ИЭП) для разных значений рабочей температуры. В первые 60 мин в суспензии происходили переходные процессы, затем начинался стационарный участок, который и был выбран для проведения экспериментов. По результатам представленных экспериментов была выбрана рабочая точка 22 °С, так как эта точка лежит на линейном участке кинетической кривой, а градиент температуры в мембране при этом минимальный.

Действие одиночного импульса.

На рис. 3 показаны кинетические кривые в результате действия одиночного электрического импульса для значений напряжения электрического импульса от 0 до 4 кВ. До значения напряжения 2,5 кВ кинетические кривые мало отличались

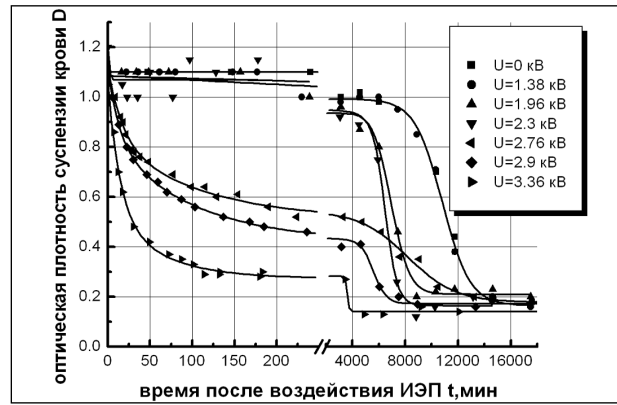


Рис. 3. Электропорация эритроцитов при воздействии ИЭП: кинетические кривые в результате воздействия ИЭП для разных значений напряжения электрического поля ($U=0, 1.38, 1.96, 2.3, 2.76, 2.9, 3.36$ кВ).

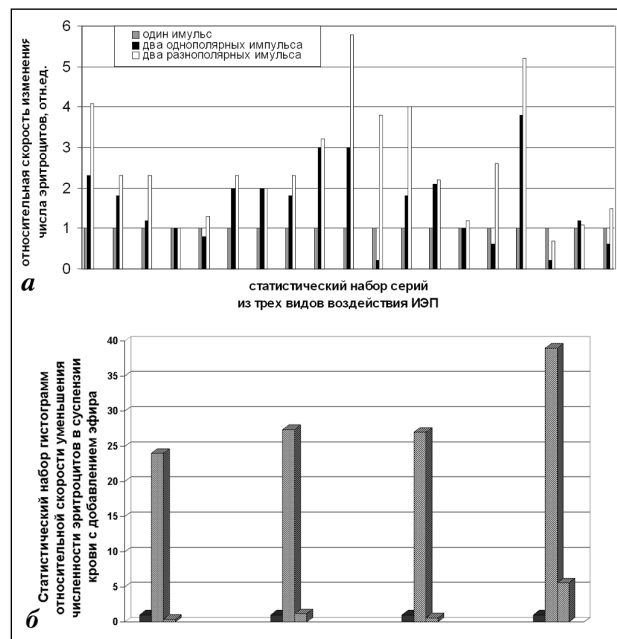


Рис. 4. Статистический набор гистограмм относительной скорости изменения числа эритроцитов при разнородном воздействии ИЭП (за единицу принята скорость изменения числа эритроцитов в случае воздействия одним импульсом). а — Результат импульсного воздействия на суспензию крови. б — Результат импульсного воздействия на суспензию крови с добавлением эфира.

от кинетической кривой контрольной суспензии, не подвергавшейся внешнему воздействию. Скорость процесса гибели клеток незначительно уменьшалась. При напряжении свыше 2,5 кВ скорость процесса гибели клеток начинает резко возрастать, т. е. процесс электропорации имеет выраженный порог (для наших условий 2,5 кВ).

Для сопоставимости результатов дальнейших опытов мы выбрали точку 2,9 кВ, что соответствовало разности потенциалов на мембране примерно 570 мВ. Это значение хорошо согласуется с данными литературы как значение напряжения для пробоя мембраны [12–15].

Действие двух однополярных и двух разнополярных импульсов электрического поля на суспензию крови.

На суспензию эритроцитов действовали двумя однополярными или двумя разнополярными импульсами, разность потенциалов между электродами равнялась 2,9 кВ.

Кинетическая кривая в результате действия одним импульсом лежала значительно выше кривых в результате воздействия двумя импульсами. Скорость процесса гибели клеток при действии двумя импульсами увеличивалась в 1,2–3,5 раза по сравнению со скоростью гемолиза в результате воздействия одним импульсом. Порог электропорации оказывался намного ниже. Кинетические кривые при действии двумя однополярными импульсами имели меньшую крутизну по сравнению с таковыми при действии двумя разнополярными импульсами, т. е., скорость гибели клеток во втором случае была больше, чем в первом. Таким образом, действие двух разнополярных импульсов было эффективнее, а порог ниже по сравнению с двумя однополярными импульсами.

На рис. 4, а представлены гистограммы относительной скорости изменения числа эритроцитов при асимметричном импульсном воздействии на суспензию крови. За единицу принята скорость изменения числа эритроцитов при действии одного импульса. В каждой диаграмме представлена серия из трех столбцов: первый столбец — относительная скорость изменения числа эритроцитов в результате действия первого импульса, второй столбец — эффективность воздействия второго импульса из двух однополярных, третий — результат воздействия второго импульса из двух разнополярных.

В 5 опытах из 19 эффективность воздействия второго однополярного импульса была меньше эффективности воздействия первого. Для разнополярных импульсов такой эффект наблюдается лишь в 1 опыте из 19.

На рис. 4, б представлены гистограммы воздействия одного импульса, второго однополярного и второго разнополярного импульсов на суспензию крови с химическими добавками, а именно 0,05 мл эфира на 1 мл суспензии крови. Эффективность действия двух разнополярных импульсов в серии этих опытов всегда была меньше эффективности двух однополярных.

Эффективность действия второго однополярного импульса при добавлении эфира всегда больше эффективности первого импульса (в 2–60 раз).

Для эфира действие второго разнополярного импульса было в 2 случаях из 4 меньшим, чем первого.

Результаты и обсуждение

В литературе имеются данные о несимметричном структурном нарушении мембран при

воздействии ИЭП на клетки млекопитающих, растений, фосфолипидные везикулы [13–18]. Так, в случае воздействия ИЭП на везикулы со стороны анода на мембране образуется много мелких пор, со стороны катода — мало пор, но большего размера. Наблюдается несимметричная диффузия ионов кальция в кардиомиоците.

В наших экспериментах наблюдалось различие эффектов электропорации при воздействии двумя импульсами одной и разной полярности. Электропорация — это результат электрического пробоя мембраны, подобного пробоем диэлектрика. При некотором критическом значении напряженности электрического поля E_0 наступает диэлектрический пробой. При этом ток течет по системе каналов, образовавшихся в диэлектрике. Диэлектрик в электрическом поле находится в механически напряженном состоянии, так как связь между заряженными частицами вещества противодействует силам, вызванным внешним полем E_0 . По мере увеличения напряженности внешнего электрического поля возрастает и интенсивность механических напряжений внутри диэлектрика, что также приводит к образованию пор. В диэлектриках пробоем способствуют неизбежные неоднородности, так как в местах неоднородностей напряженность электрического поля может возрастать.

В отличие от обычного диэлектрика для клеточной мембраны характерно выраженное неоднородное электрическое состояние изначально. Электрические свойства мембраны во многом определяются ее структурной асимметрией. Распределение липидов на внутренней и внешней поверхностях мембраны эритроцитов асимметрично [6]. Ориентированные диполи каждого монослоя мембраны создают в центре фосфолипидного бислоя потенциал, равный примерно 240 мВ, с положительным зарядом внутри [6].

Поверхность большинства биомембран заряжена отрицательно: обычно 10–20% мембранных липидов находятся в форме анионов. Отрицательным зарядом обладают и другие мембранные компоненты, например белки. Анионные группы фиксированы на поверхности мембраны, и их заряд нейтрализуется противоионами, концентрация которых изменяется в объеме водной фазы. Противоионы локализуются не на самой поверхности мембраны, а на некотором расстоянии от нее, создавая так называемый двойной диффузионный слой. Неодинаковая концентрация ионов внутри и снаружи клетки, а также отличие проницаемости мембраны для разных видов ионов создает неоднородное распределение электрического потенциала по всему объему [6].

Внешнее электрическое воздействие на клетку также не симметрично уже при одиночном импульсе. Воздействие внешнего электрического поля на клетки вызывает несимметричное

распределение трансмембранных потоков ионов. Поверхность мембраны со стороны анода гиперполяризуется, а со стороны катода — деполяризуется [5].

Под воздействием внешнего электрического импульса изменяется каждая из указанных выше составляющих, определяющих в целом трансмембранный потенциал. Очевидно, асимметрия процессов возрастает при повторном электрическом воздействии. Если же второй импульс электрического поля имеет противоположное направление по отношению к первому (разнополярные импульсы), то указанные виды неоднородностей будут возрастать в ещё большей степени.

Литература

1. *Богущевич М. С., Востриков В. А., Черныш А. М.* // Вестн. РАМН. — 1997. — №10. — С. 36–44.
2. *Востриков В. А., Сыркин А. Л., Холин П. В. и др.* // Кардиология. — 2003. — № 12. — С. 51–59.
3. *Геннис Р.* Биомембраны. — М., Мир, 1997.
4. *Гурвич Н.* Основные принципы дефибрилляции сердца. — М.: Медицина, 1975.
5. *Мороз В. В., Богущевич М. С., Востриков В. А., Козлова Е. К., Черныш А. М.* // Анестезиол. и реаниматол. — 2002. — № 6. — С. 60–63.
6. *Черныш А. М.* Биомеханика неоднородностей сердечной мышцы. — М., 1993.
7. *A. De Bruin K., Krassowska W.* // Biophys. J. — 1999. — Vol. 77, № 3. — P. 1213–1224.
8. *Al-Khadra A, Nikolski V., Efimov I.* // Circ. Res. — 2000. — Vol. 87. — P. 797–804.
9. *Cansell A.* // La Revue des Samu. — 2000. — Vol. 22, № 6 — P. 280–294.
10. *Fast V. G., Rohr S., Ideker R. E.* // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. — 2000. — Vol. 278, № 3. — P. 688–697.
11. *Jacobs I. G., Tiballs J., Morley P. T. et al.* // Med. J. Aust. — 2003. — Vol. 179, № 8. — P. 451.
12. *Kinosita K., Tsong T. Y.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA — 1977. — Vol. 74, № 5. — P. 1923–1927.
13. *Knisley S. B., Grant A. O.* // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1995. — Vol. 27, № 5. — P. 1111–1122.
14. *Mehrl W., Hampp R., Zimmermann U.* // Biochim. Biophys. Acta. — 1989. — Vol. 978, № 2. — P. 267–275.
15. *Tekle E., Astumian R. D., Chock P. B.* // Biochim Biophys. Res. Commun. — 1990. — Vol. 172, № 1. — P. 282–287.
16. *Tekle E., Astumian R. D., Chock P. B.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA — 1994. — Vol. 91. — P. 11512–11516.
17. *Tekle E., Astumian R. D., Friauf W. A., Chock P. B.* // Biophys. J. — 2001. — Vol. 81, № 2. — P. 960–968.
18. *Teruel M. N., Meyer N.* // Biophys. J. — 1997. — Vol. 73, № 4. — P. 1785–1796.
19. *Tovar O., Tung L.* // Pacing. Clin. Electrophysiol. — 1991. — Vol. 14, Pt. 2. — P. 1887–1892.
20. *Walcott G. P., Killingsworth C. R., Ideker R. E.* // Resuscitation — 2003. — Vol. 59, №1 — P. 59–70.
21. *Wenzel V., Voelckel W. G., Krismer F. C. et al.* // Anaesthesist. — 2001. Vol. 50, № 5. — P. 342–357.

Поступила 27.02.04