

Disciplina de fizică farmaceutică (cond.: șef de lucrări dr. M. Olariu, doctor în fizică), Disciplina de biofizică (cond.: șef de lucrări dr. I. Nicolaescu, doctor în fizică) și Disciplina de chimie farmaceutică (cond.: dr. M. Rocșin, doctor farmacist) ale I.M.F. din Tirgu-Mureș

METODA DE STUDIU PENTRU REZISTENȚA OSMOTICĂ A MEMBRANEI ERITROCITARE

M. Olariu, I. Nicolaescu, I. Opreșor, M. Rocșin

Cercetări efectuate în ultimii zece ani (1, 2, 5, 8, 9, 12,, 13) au arătat că metoda împrăstierii luminii (4) prezintă o serie de aplicații legate de studiul unor celule vii aflate în suspensie într-un mediu apos. În lucrarea de față am încercat să extindem această metodă la studiul suspensiilor eritrocitare, urmărind să tragem anumite concluzii legate de transportul apei la nivelul membranei eritrocitare și să punem în evidență efectul unor factori chimici asupra vitezei de transport al apei. Mai precis, am urmărit să punem la punct o metodă rapidă care să permită studiul rezistenței osmotice a membranei eritrocitare și modificarea ei sub acțiunea unor medicamente, metodă care să permită nu numai observarea momentului în care apare hemoliza, ci și evaluarea cantitativă a „vitezei de hemoliză“.

Principiul metodei și tehnica folosită

Din teoria fenomenului de împrăștiere a luminii pe microorganisme vii (5, 6, 14, 15) rezultă că intensitatea semnalului măsurat la un anumit unghi de observație, convenabil ales (7), crește odată cu numărul de celule din unitatea de volum, cu dimensiunea celulelor și cu indicele de refracție al membranei celulare determinat de structura ei biochimică. Dacă mediul de suspensie a eritrocitelor este o soluție hipotonă, înregistrând variația în timp a intensității difuzate obținem o curbă care descrie scă-

deea în timp a numărului de eritrocite rămase nehemolizate. Intensitatea semnalului la un moment dat ne indică proporția de celule nehemolizate iar panta curbei măsoară un parametru pe care l-am putea numi „viteză de hemoliză“, parametru care variază direct proporțional cu viteza de transport a apei din exteriorul celulei în interiorul ei. Efectul factorilor chimici care modifică viteza de transport a apei este pus în evidență prin faptul că se schimbă valoarea pantei la curba înregistrată, comparativ cu înregistrarea făcută pentru o probă martor. O valoare a pantei mai mare decât cea măsurată pentru proba martor ne indică faptul că substanța analizată are un efect hemolitic. Când panta este mai mică, comparativ cu martorul, înseamnă că avem o substanță cu efect stabilizant. Reprezentând grafic viteza de hemoliză în funcție de concentrația substanței analizate se obține o curbă care dă o imagine cantitativă a efectului pe care substanța respectivă îl are asupra rezistenței osmotice a membranei eritrocitare.

Instalația de împrăștiere utilizată a fost construită după modelul Wippler-Scheibling (3, 11), adaptată fiind pentru utilizarea laserului ca sursă de lumină, partea de amplificare și înregistrare a semnalului fiind luată de la o instalație de difuzie construită la Institutul de fizică București. Am utilizat un laser He-Ne, model LG-150.1 de fabricație I.F.A. București. Pentru observații am fixat unghiul de împrăștiere la 60° . Am utilizat eritrocite umane, spălate în ser fiziologic, suspensia fiind făcută într-o soluție de NaCl hipotonă. Concentrația clorurii de sodiu se alege astfel încât procesul de hemoliză înregistrat să decurgă într-un interval de timp potrivit față de viteza hîrtiei la înregistrator (2—4 minute de la momentul introducerii eritrocitelor). În probele care conțineau substanța al cărui efect era urmărit, ca și în proba martor, se realizează întotdeauna aceeași concentrație de NaCl (0,45—0,50 ‰), la stabilirea ei contribuind într-o oarecare măsură și calitatea (natura) singelui, precum și concentrația de eritrocite realizată în suspensie.

Rezultate și discuții

Pentru înțelegerea modului de efectuare a determinărilor, ca și pentru punerea în evidență a sensibilității metodei, în fig. nr. 1, prezentăm

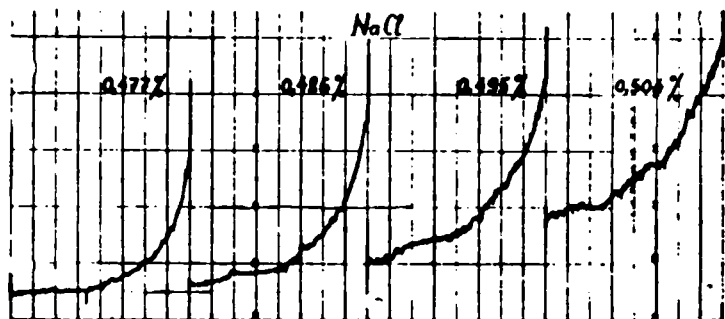


Fig. nr. 1: Curbe de difuzie înregistrate la concentrații diferite de clorură de sodiu

citeva din înregistrările obținute pentru suspensii eritrocitare realizate la diferite concentrații de NaCl. Se observă foarte ușor cum pe măsură ce crește concentrația în NaCl, panta curbei scade foarte mult, deși între probele respective diferența de concentrație era de numai 0,009 %. Măsurând panta pentru fiecare curbă în parte (la 1,5 minute) putem stabili modul de variație a vitezei de hemoliză în funcție de concentrația clorurii de sodiu. Pentru domeniul de concentrații abordat în experiența de

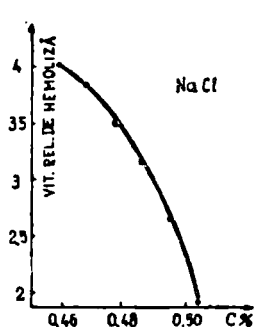


Fig. nr. 2: Variația rezistenței osmotice a membranei eritrocitare în funcție de concentrația clorurii de sodiu.

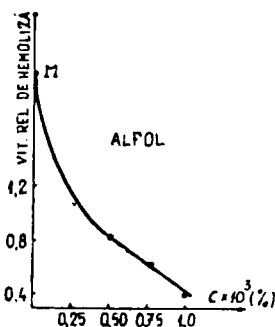


Fig. nr. 3: Scăderea vitezei de hemoliză în funcție de concentrație.

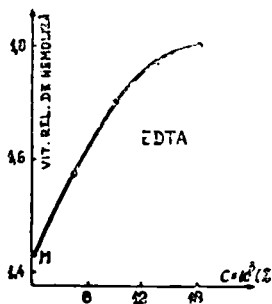


Fig. nr. 4: Creșterea vitezei de hemoliză în funcție de concentrație.

față, această funcție este redată în fig. nr. 2. În ordonată am reprezentat panta curbelor înregistrate, pe care am numit-o viteză „relativă” de hemoliză, deoarece ea nu este o mărime absolută ci rezultă din condițiile tehnice de înregistrare.

Pentru a studia efectul unui medicament asupra vitezei de hemoliză se utilizează ca martor o înregistrare de felul celor prezentate în fig. nr. 1. Efectul medicamentului rezultă din compararea acestei curbe cu cea obținută în condiții identice pentru proba care conține în plus medicamentul studiat. O pantă mai mare decât cea obținută pentru proba martor indică un efect hemolizant, iar o pantă mai mică, un efect stabilizant. Pe baza înregistrărilor efectuate la concentrații diferite se poate trasa o curbă care descrie modul de variație a vitezei de hemoliză în funcție de concentrația substanței analizate. Ca exemple, în figurile 3 și 4 redăm rezultatele obținute pentru o substanță cu un puternic efect stabilizant și respectiv pentru una cu acțiune hemolitică.

Concluzii

Din experiențele efectuate rezultă că față de procedeele curente de evaluare a rezistenței osmotice a membranei eritrocitare, metoda permite evaluarea cantitativă a procesului de hemoliză prin intermediul unui pa-

rametru nou, care descrie evoluția în timp a procesului de hemoliză: viteza de hemoliză. Utilizând acest parametru avem posibilitatea evaluării comode a naturii, precum și a mărimii efectului pe care diferite medicamente îl au asupra procesului de hemoliză. Față de procedeele clasice, metoda prezintă importanță în special în cazurile de evaluare cantitativă a efectelor de stabilizare. Durata foarte scurtă a determinărilor constituie de asemenea un avantaj al metodei. Sensibilitatea metodei, este relativ mare, dar pentru substanțele medicamentoase care se fixează mai greu pe membrană se impune (așa cum am procedat pentru alte substanțe decât cele prezentate în lucrare) efectuarea înregistrărilor după ce eritrocitele au stat un interval anumit de timp într-o soluție de ser fiziologic care conține substanța de studiat.

Dezavantajul metodei constă, pe de o parte în faptul că pentru fiecare experiență trebuie potrivită corespunzător concentrația clorurii de sodiu în soluția hipotonă, iar pe de altă parte, că tehnica utilizată este relativ complicată și costisitoare.

Sosit la redacție: 3 aprilie 1978.

Bibliografie

1. Berkman M., Wyatt P. J., David T. P.: *Nature* (1970), 228, 458; 2. Berkman M., Wyatt P. J.: *Appl. Microbiology* (1970), 20, 510; 3. Ghiță L., Ghiță C.: *Studii și cerc. de fizică* (1963), 5, 725; 4. Kerker M.: *The Scattering of light*. Academic Press, New York—London, 1969; 5. Koch A., Elvera Ehrenfeld: *Biochim. Biophys. Acta* (1968), 165, 262—273; 6. Latimer P., Tully B.: *J. of Colloid and Interface Science* (1968), 27, 475; 7. Olariu M.: *Rev. med.* (1974), 1, 53; 8. Olariu M., Péter M.: *Rev. med.* (1976), 2, 149; 9. Stull V. R.: *J. of Bacteriology* (1972), 109, 1301; 10. Seeman Ph.: *Pharmacological Review* (1972), 24, 616; 11. Wippler C., Scheibling G.: *J. Chim. Phys.* (1954), 51, 201; 12. Wyatt P. J.: *Nature* (1969), 221, 1257; 13. Wyatt P. J.: *Nature* (1970), 226, 277; 14. Wyatt P. J.: *J. of Colloid and Interface Science* (1972), 39, 479; 15. Wyatt P. J.: *Applied Optics* (1968), 7, 1879.

M. Olariu, I. Nicolaescu, I. Oprisor, M. Rocsin

A METHOD TO STUDY THE OSMOTIC RESISTANCE OF ERYTHROCYTE MEMBRANE

The present paper offers a method of studying the osmotic resistance of erythrocyte membrane by means of light scattering in erythrocyte suspensions. Making use of standard hypotonic solution according to the light scattering plot, „the hemolysis rate“ and its modification in the presence of some drugs can be estimated. This method is a very rapid one and it allows a quantitative valuation of the drug effect even if the drug has a steady effect.